

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München

# **Funktion und Differenzierung der Leukozy- ten in einer cFLIPs-transgenen Maus**

Volker Johannes Brand

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Uni-  
versität München zum Erlangen des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
2. Univ.-Prof. Dr. R. Lange

Die Dissertation wurde am 29.07.2009 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.10.2009  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1 APOPTOSE.....	8
1.1.1 <i>Molekulare Mechanismen der Apoptose</i> .....	9
1.1.2 <i>Caspasen</i> .....	9
1.1.3 <i>Todesrezeptoren</i> .....	11
1.1.4 <i>Signaltransduktion von CD95 (Fas/APO-1)</i> .....	11
1.1.5 <i>Caspase-8</i> .....	13
1.1.6 <i>Zwei CD95 Signalwege</i> .....	14
1.1.7 <i>Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren</i> .....	15
1.2 FLIP .....	16
1.2.1 <i>Expression von cFLIP</i> .....	17
1.2.2 <i>Physiologische Bedeutung von cFLIP</i> .....	18
1.3 DER CD95 SIGNALWEG IN DER IMMUNANTWORT .....	20
1.3.1 <i>Die Rolle von CD95 in aktivierten T-Zellen</i> .....	21
1.3.2 <i>Zelltod aktivierter T-Zellen</i> .....	22
1.4 NICHT-APOPTOTISCHE SIGNALTRANSDUKTION DURCH CASPASE-8 UND cFLIP .....	22
1.4.1 <i>Aktivierung von T-Zellen</i> .....	22
1.4.2 <i>Differenzierung und Aktivierung myeloider Zellen</i> .....	24
1.5 AUFGABENSTELLUNG .....	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
2.1 MATERIAL .....	26
2.1.1 <i>Geräte</i> .....	26
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	26
2.1.3 <i>Chemikalien und Radiochemikalien</i> .....	27

2.1.4	<i>Häufig verwendete Puffer</i> .....	28
2.1.5	<i>Zellkulturmedien</i> .....	29
2.1.6	<i>Antikörper</i> .....	29
2.1.7	<i>Apoptosestimuli</i> .....	30
2.1.8	<i>Mausgenerierung und -zucht</i> .....	30
2.1.9	<i>Software</i> .....	31
2.2	<b>METHODEN</b> .....	31
2.2.1	<i>Gewinnung primärer Zellen</i> .....	31
2.2.2	<i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	32
2.2.3	<i>Prinzip der immunmagnetischen Zellseparierung</i> .....	33
2.2.4	<i>Stimulierung primärer eukaryontischer Zellen</i> .....	33
2.2.5	<i>Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (FACS)</i> . .....	37
2.2.6	<i>Kolonie-Formations-Assay (CFUc)</i> .....	39
2.2.7	<i>Datenauswertung und -darstellung</i> .....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
3.1	<b>NACHWEIS DES TRANSGENS cFLIP<sub>S</sub>-GFP</b> .....	42
3.2	<b>CFLIP<sub>S</sub> INHIBIERT DIE FASL/CD95-VERMITTELTE APOPTOSE IN ZELLEN DER TRANSGENEN MAUS</b> .....	43
3.2.1	<i>Lymphozyten</i> .....	44
3.2.2	<i>Thymozyten</i> .....	47
3.3	<b>VERTEILUNG VON LEUKOZYTEN UND VON LEUKOZYTEN-SUBPOPULATIONEN IN DER MILZ DER cFLIP<sub>S</sub>-MAUS</b> .....	48
3.3.1	<i>Die Leukozyten-Gesamtzellzahl war in der Milz von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen erniedrigt</i> .....	48
3.3.2	<i>Die Lymphozyten-Zellzahl war in der Milz älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse erniedrigt</i> .....	49
3.3.3	<i>Die Anzahl myeloischer Zellen in der Milz älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse war vergrößert</i> .....	51
3.4	<b>AKTIVIERUNG VON LYMPHOZYTEN</b> .....	53

3.4.1	<i>Leukozyten</i> .....	54
3.4.2	<i>T-Zellen</i> .....	56
3.4.3	<i>B-Zellen</i> .....	58
3.5	cFLIP <sub>S</sub> VERURSACHT IN DER MLR EINE VERBESSERTE T-ZELLSTIMULATION .....	59
3.6	cFLIP <sub>S</sub> STÖRTE DIE REIFUNG VON VORLÄUFERZELLEN IN ZELLEN DER MYELOIDEN ZELLINIE.....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>63</b>
4.1	STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN VON cFLIP <sub>S</sub> .....	63
4.2	cFLIP <sub>S</sub> IM TRANSGENEN MAUSMODELL .....	64
4.2.1	<i>GFP-Expression</i> .....	64
4.2.2	<i>Inhibition der CD-induzierten Apoptose in vitro</i> .....	65
4.3	MORPHOLOGISCHER UND FUNKTIONELLER PHÄNOTYP DES cFLIP <sub>S</sub> MAUSMODELLS .....	66
4.3.1	<i>Absolute Zellzahlen und prozentuale Populationsgrößen</i> .....	66
4.3.2	<i>T-Zellpopulationen und Funktion</i> .....	67
4.3.3	<i>B-Zell-Populationen und -Funktion</i> .....	69
4.3.4	<i>Antigen-präsentierende Zellen: Funktion und Expression von Oberflächenmolekülen</i> .....	70
4.4	FAZIT UND OFFENE FRAGEN .....	75
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>77</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>78</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
	<b>WIDMUNG &amp; DANKSAGUNG</b> .....	<b>88</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANA	antinukleäre Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
Bak	(engl.: Bcl-2-antagonist/killer)
Bax	(engl.: Bcl-2 associated X protein)
Bcl-2	(engl.: B-cell leukemia/lymphoma 2)
Bcl-X <sub>L</sub>	(engl.: B-cell leukemia/lymphoma X <sub>L</sub> )
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
BH3	Bcl-2-ähnliche Domäne Typ 3
Bid	(engl.: BH3-interacting domain death agonist)
Bim	(engl.: Bcl-2 interacting mediator of cell death)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
CAD	caspasenaktivierte DNase
CARD	caspasenaktivierende Rekrutierungsdomäne (engl.: Caspase activating recruiting domain)
CD95	(engl.: cluster of differentiation 95)
CFUc	Kolonie-Formations-Assay (engl.: Colony-Forming-Unit-Culture-Assay)
ConA	Concanavalin A
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
CREB	c-AMP-antwortendes elementbindendes-Protein (engl.: cyclic AMP-responsive-element-binding protein)
Da	Dalton
Daxx	CD95-DD-assoziertes Protein (engl.: Fas death domain associated protein)
DC	Dendritische Zelle
DD	Todesdomäne (engl.: death domain)
DED	Todeseffektordomäne (engl.: death effector domain)
DISC	todinduzierender Signalkomplex (engl.: death inducing signalling complex)
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DR	Todesrezeptor (engl.: death receptor)
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ERK	extrazellulär-signal-regulierte Kinase (engl.: extracellular-signal-regulated-kinase)
FACS	(engl.: fluorescence-activated cell sorter)

FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne (engl.: Fas-associated-protein with death-domain)
FAP-1	CD95-assoziierte Phosphatase 1 (engl.: Fas-associated phosphatase 1)
FasL	Fas-Ligand
FCS	fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLASH	(engl.: FLICE-associated huge protein)
FLIP	(engl.: FLICE like inhibitory protein)
GCs	Keimzentren
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gld	Generalisierte Lymphoproliferative Erkrankung
GM-CSF	granulozyten-makrophagen-koloniestimulierender Faktor
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl.: insulin-like growth factor 1)
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
JNK	C-Jun-N-Terminalen-Kinase
kb	Kilobasenpaar
lpr	Lymphoproliferation
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar, (Mol/l)
MACS	magnetische aktivierende Zellsortierung (engl.: magnetic activated cell sorting)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute(n)
MLR	heterologe, gemischte Leukozytenreaktion (engl.: mixed leukocyte reaction)
mol	1 Mol enthält $6,022 \times 10^{23}$ Moleküle
MYC	(engl.: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)
NEX	(engl.: N-terminal extension)
NF-κB	nukleärer-Faktor Kappa-B
NK	Natürliche Killerzellen
Noxa	Aktivator von NADPH-Oxidase
OPG	Osteoprotegrin
P53	Tumorsuppressorprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kD
PCD	Programmierter Zelltod (engl.: programmed cell death)

P/I	Phorbol Myristinsäure + Ionomycin
PJ	Propidiumjodid
PKB	Proteinkinase B
PLAD	(engl.: pre-ligand-binding assembly domain),
PMA	Phorbol Myristinsäure
Puma	(engl.: p53-upregulated modulator of apoptosis)
Rag1	rekombinations-aktivierendes Gen-1
RIP	rezeptor-interagierendes Protein (engl.: receptor interacting protein)
sec	Sekunde(n)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMAC/	(engl.: second mitochondria-derived activator of Caspase)/
DIABOLO	(engl.: direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI)
STS	Staurosporin
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor (engl.: tumor nekrosis factor)
TNFR	TNF-Rezeptor (engl.: TNF receptor)
TRADD	TNFR-assoziertes DD-enhaltendes Protein (engl.: TNF-Receptor associated protein with a death domain)
TRAF	TNFR-assoziierter Faktor (engl.: TNF receptor-associated factor)
TRAIL	TNF-verwandter apoptoseinduzierender Ligand (engl.: TNF related apoptosis inducing ligand)
V-EGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor)
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

Das Protein cFLIP<sub>S</sub> (engl.: cytosolic FLICE like inhibitory protein short form), das in der transgenen Maus überexprimiert wurde, moduliert die Signaltransduktion von Todesrezeptoren (DR). Im Folgenden werden daher zunächst die grundlegenden Prinzipien der Apoptose und die nicht-apoptotischen Funktionen der DR besprochen. Anschließend wird der aktuelle Kenntnisstand der Funktionen von cFLIP<sub>S</sub> und anderer FLIP-Formen dargestellt.

## 1.1 Apoptose

Die Apoptose (griechisches Kunstwort *απόπτωσης*: das Abfallen, der Niedergang) beschreibt eine Form des Zelltodes (PCD) mehrzelliger Organismen mit oft einheitlichem morphologischen Erscheinungsbild. (Hacker, 2000).

Kurz nach Formulierung der Zelltheorie durch Schleiden und Schwann beobachtete 1842 Carl Vogt das Verschwinden von Zellen während der Knorpelentwicklung der Geburtshelferkröte und vermutete, dass die Zellen starben. 1890 beschrieb William Councilman vakuolisierte, azidophile Körperchen in virusbefallenen Hepatozyten, die, wie man heute weiß, apoptotischen Zellen zuzuordnen waren (Clarke and Clarke, 1996). 1952 konnte der Embryologe Glucksmann die Regression embryonalen Gewebes auf das Absterben einzelner Zellen zurückführen (Los et al., 1999). Heute ist bekannt, dass die Apoptose ein zentrales Prinzip der Ontogenese zur gesetzmäßigen Entwicklung von Körperform und Organen innerhalb mehrzelliger Organismen ist (Vaux and Korsmeyer, 1999). Ein anschauliches Beispiel hierfür ist die apoptotische Elimination von Zellen des Interdigitalraumes, die zur Freilegung von Fingern und Zehen führt. Kerr, Wyllie und Currie entdeckten schließlich 1972 bei lichtmikroskopischen Studien von toxinbehandelten Leberzellen zellmorphologische Veränderungen, die sich analog zu sterbenden Embryonalzellen verhielten (Kerr et al., 1972). Zur Beschreibung dieses Phänomens wandten sie erstmalig den Begriff Apoptose an.

Morphologisch sind folgende Vorgänge für die Apoptose kennzeichnend: Die Zelle schrumpft und löst sich aus dem Zellverband. Das Chromatin kondensiert und apoptotische Körperchen, die intakte Mitochondrien enthalten, werden aus der Zelloberfläche abgeschnürt (Zeiose; „membrane blebbing“). Diese Vesikel werden durch phagozytierende Zellen, aber auch durch nicht-professionell phagozytierende Zellen eliminiert (Devitt et al., 1998, Savill et al., 1993). Charakteristische biochemische Vorgänge der Apoptose sind die Aktivierung von Endonukleasen und Caspasen (Saraste and Pulkki, 2000). Dabei wird DNA durch internukleosomale Spaltung fragmentiert und durch Inversion der Membran Phosphatidylserin auf der

Zelloberfläche exponiert (Wyllie et al., 1980). Apoptose ist die Folge der Aktivierung eines spezialisierten Signalwegs (Trump et al., 1997). Anhand des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* gelang ein elegantes Modellsystem, das ermöglichte, von den ersten Zellteilungen der befruchteten Eizelle an die Rolle der Apoptose über den gesamten Lebenszyklus hinweg genau zu verfolgen (Ellis and Horvitz, 1986, Sulston and Horvitz, 1977).

Apoptose spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Eindämmung von Infektionen und dem Schutz vor der Entstehung von Tumoren und Autoimmunität. Ferner wird diskutiert, dass Fehlregulationen der Apoptose möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese von Herzerkrankungen, AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen spielen (Thompson, 1995). Auch exogene physikalische und chemische Faktoren induzieren die Apoptose (Kulms and Schwarz, 2000).

### 1.1.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die meisten Autoren unterscheiden zwei getrennte Wege der Apoptoseinduktion. Der intrinsische Weg wird unter anderem durch zytotoxischen Stress ausgelöst. Ein zentraler Schritt dabei ist die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Zytosol (Gogvadze et al., 2006). Der extrinsische Signalweg erfolgt exogen über so genannte Todesrezeptoren (DR) durch zytotoxische Zellen oder durch lösliche Liganden (Budihardjo et al., 1999). Beide Signalwege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die durch die Aktivität der Proteasenfamilie der Caspasen gekennzeichnet ist.

### 1.1.2 Caspasen

Die Caspasen (**C**ysteinyln **A**spartat **P**roteinase) sind so genannte Cystein Proteasen, d.h. sie enthalten ein Cystein im aktiven Zentrum und schneiden die Substrate spezifisch an einem bestimmten Aspartat (Earnshaw et al., 1999). Die Caspasen werden als inaktive Vorstufen (Zymogene), die Pro-Caspasen genannt werden, exprimiert. Die Pro-Caspasen bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne sowie aus einer kleinen (~10 kDa) und einer großen (~20 kDa) Untereinheit. Die normale Aktivierung erfolgt unter Spaltung des Polypeptidvorläufers in diese Untereinheiten, die große und die kleine Form bilden das aktive Enzym. Diese Aktivierung erfolgt autokatalytisch (Initiatorcaspasen) oder durch andere Proteasen (Caspasen, Granzym B) (Greenberg, 1996, Bleackley, 2005). Die aktivierte Caspase ist ein aus je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten bestehendes Heterodimer mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren (Shi, 2002).

Die Caspasenfamilie umfasst 14 Mitglieder, deren Vorkommen und Funktionen noch nicht vollkommen geklärt sind. So kann Caspase-11 bislang nur bei Maus und Ratte nachgewiesen werden, Caspase-12 besitzt beim Menschen wohl keine proteolytische Aktivität gegenüber Substraten außer gegen sich selbst und Caspase-13 wird nur in Rindern nachgewiesen (Koenig et al., 2001, Roy et al., 2008). Unklar ist ferner die Rolle von Caspase-14, die offenbar nur in Epithelzellen exprimiert wird und dort vermutlich die Differenzierung der Keratinozyten moduliert (Eckhart et al., 2000).

Je nach ihrer Funktion und Struktur können die Caspasen unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (Sanfilippo and Blaho, 2003):

- 1) Inflammatorische Caspasen (Caspase-1, -4, -5): Prozessierung von proinflammatorischen Zytokinen während der Immunantwort.
- 2) Apoptotische Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 und -14): Beteiligung an der apoptotischen Signalleitung
  - Apikale Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9, -10): Prozessierung und Aktivierung typischerweise in großen Proteinkomplexen anhand von so genannten Adaptormolekülen (siehe unten). Sie besitzen lange N-Termini; im Fall der Caspase-8 und -10 mit Todeseffektordomänen (DED) oder im Fall der Caspase-9 mit einer caspase-aktivierenden Rekrutierungsdomäne (CARD).
  - Distale Effektorcaspasen (Caspases-3, -6, -7): Aktivierung durch Initiatorcaspasen. Sie sind charakterisiert durch eine kurze oder fehlende Prodomäne (Slee et al., 2001)

Die nachfolgende Aktivierung von Effektorcaspasen durch Initiatorcaspasen wird von manchen Autoren als „Caspasenkaskade“ bezeichnet und endet in der Aktivierung anderer Effektorproteine (Slee et al., 2001). Beispielsweise aktiviert Caspase-3 die caspasenaktivierte DNase (CAD) durch Abspaltung ihres Inhibitors (ICAD). Die aktivierte CAD schneidet anschließend die genomische DNA zwischen den Nukleosomen (Sakahira et al., 1998, Enari et al., 1998). Antiapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, IAPs und cFLIP sowie Kinasen, wie Proteinkinase B (AKT), FAK und das rezeptor-interagierende Protein (RIP) werden vermutlich von Caspasen durch Spaltung inaktiviert. Ein wichtiges Substrat der Caspase-8 nach Todesrezeptorstimulation ist das BH3-only Protein Bid. Spaltung von Bid bewirkt dessen Aktivierung, führt zu dessen Translokation an die Mitochondrien und verbindet dadurch den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg (Yin, 2000).

Darüber hinaus werden nicht-apoptotische Funktionen von Caspasen kontrovers diskutiert (Lamkanfi et al., 2007). Klar sind solche Funktionen im Fall von Caspase-8. Dieser Zusammenhang wird weiter unten beschrieben werden.

### 1.1.3 Todesrezeptoren

Todesrezeptoren (DR) initiieren nach Interaktion mit ihren Liganden den extrinsischen Apoptosesignalweg. Liganden sind beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Fas-Ligand (FasL) oder TNF-verwandter apoptoseinduzierender Ligand (TRAIL) (Ashkenazi and Dixit, 1998). DR gehören der Gen-Superfamilie der TNF-Rezeptoren (TNFR) an, die durch ihre cysteinreichen extrazellulären Domänen sowie durch homologe zytoplasmatische Todesdomänen (DD) charakterisiert sind. DD bestehen aus 80 Aminosäuren und sechs  $\alpha$ -Helices (Tartaglia et al., 1993, Aravind et al., 1999). Nach Bindung eines Liganden wird der DR vermutlich durch eine Rezeptorkomplexformation höherer Ordnung (Multimerisierung) oder eine Konformationsänderung aktiviert (Siegel et al., 1998, Chan et al., 2000). Dies führt zur Rekrutierung von ebenfalls DD-enhaltenden Adaptorproteinen, wie die Fas-assoziierte Todesdomäne (FADD) oder das TNFR-assoziiertes DD-enhaltendes Protein (TRADD) (Chinnaiyan et al., 1995, Park and Baichwal, 1996). Die Adaptorproteine vermitteln im Weiteren über so genannte Effektormoleküle das DR-Signal.

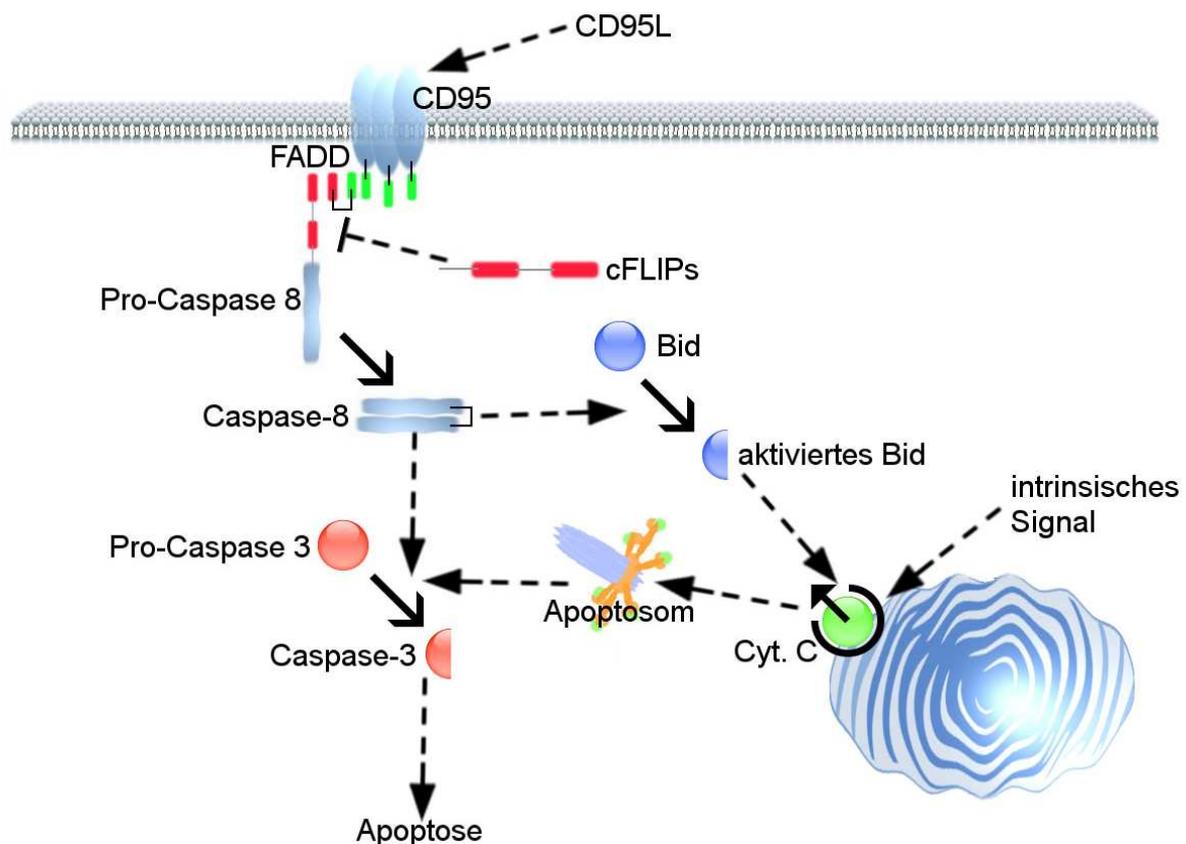
Bisher wurden zahlreiche DR beschrieben. Einige DR induzieren via Transkriptionsfaktoren wie Aktivator Protein 1 (AP-1) und nukleärer-Faktor Kappa-B (NF- $\kappa$ B) die Aktivierung und Differenzierung der Zelle. Andere DR hingegen verursachen die Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen (Baud and Karin, 2001, Locksley et al., 2001). Am besten charakterisiert ist der DR CD95, der auch Fas oder Apo1 genannt wird. Weitere DR sind unter anderen der bei Vögeln vorkommende Rezeptor CAR1 sowie die humanen DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMO, LARD), DR4 (TRAIL-R1, APO-2), DR5 (TRAIL-R2, TRICK 2, KILLER) und der Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NFGR) (Ashkenazi and Dixit, 1998).

### 1.1.4 Signaltransduktion von CD95 (Fas/APO-1)

CD95 (Fas/Apo-1) wurde erstmalig 1989 als ein apoptoseinduzierendes Antigen von humanen Krebs- und Leukämie-Zelllinien identifiziert (Trauth et al., 1989, Yonehara et al., 1989). Neben der Apoptoseinduktion scheint CD95 auch an der Zellaktivierung und -proliferation beteiligt zu sein (Wajant et al., 2003a).

#### 1.1.4.1 Fas-L (CD178/Apo1L/CD95L)

FasL gehört zur TNF-Familie und ist ein glykosyliertes Typ-II-Transmembranprotein. FasL ist als Trimer biologisch aktiv. Es bindet CD95 an seinem C-Terminus und kann am N-Terminus andere Liganden rekrutieren (Orlinick et al., 1999). Neben einer löslichen Form konnte die Expression von FasL primär auf aktivierten T-Killerzellen nachgewiesen werden. Die membran-gebundene Form stimulierte CD95 jedoch stärker als die lösliche Form (Wajant et al., 2003a). Ferner wird FasL vermehrt auf Zellen so genannter immunprivilegierter Organe wie dem Auge und dem Hoden exprimiert (Griffith et al., 1995, Ferguson and Griffith, 2006).



**Abb. 1: Fas-induzierte Apoptosewege**

Apoptose kann durch Todesrezeptorkomplexe an der Zelloberfläche und durch mitochondrien-abhängige Signalwege ausgelöst werden. Zytotoxische T-Lymphozyten exprimieren CD95 Ligand, der am CD95-Rezeptorkomplex auf der Zielzelle bindet. Dieser rekrutiert dann Adaptorproteine wie Fas-assoziierte Todesdomäne (FADD) und bildet den todinduzierenden Signalkomplex, der im Folgenden die Caspase-8 aktiviert. Caspase-8 aktiviert weitere Caspasen wie die Caspase-3. Dies führt zur Apoptose. Das Todessignal kann ferner durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert werden. Dadurch wird das Apoptosom, bestehend aus Apoptoseprotease-aktivierende Faktor 1 (Apaf-1), die Caspase-9 und das Cytochrom c, ausgebildet, das eine Vielzahl intrazellulärer Proteine, wie die Caspase-3, aktiviert. Ein weiteres Substrat der Caspase-8 ist das BH3-only Protein Bid. Spaltung von Bid bewirkt dessen Aktivierung und Translokation an die Mitochondrien. Dies verbindet den extrinsischen und intrinsischen Signalweg.

#### 1.1.4.2 CD95 (Apo1, Fas)

CD95 (Apo1, Fas) ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein mit einer Molekularmasse von 48 kDa und gehört zur TNFR-Familie. Der Rezeptor wird auf den meisten normalen Zellen sowie auf bestimmten neoplastischen Zellen exprimiert (Leithauser et al., 1993). Beschrieben wurde auch eine lösliche Form, s-CD95, deren Plasmalevel insbesondere bei Autoimmunerkrankungen und malignen hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der T-Zell-Leukämie (ATL), erhöht sind (Kamihira and Yamada, 2001).

#### 1.1.4.3 Der todinduzierende Signalkomplex (DISC)

Der DISC wurde 1995 im CD95-Signalweg identifiziert (Kischkel et al., 1995). Seine Bestandteile sind CD95, FasL, Adaptorproteine wie FADD sowie Pro-Caspase-8. Die Ausbildung erfolgt sukzessive durch die Interaktion homophiler Domänen. FADD, das ebenfalls eine DD enthält, wird nach Ligandenbindung an die DD von CD95 rekrutiert. Neben der DD enthält FADD eine Todeseffektordomäne (DED). Pro-Caspase-8 besitzt zwei direkt aufeinander folgende DEDs (Tandem-DED), die wiederum über die DED von FADD die Bindung von Pro-Caspase-8 am CD95-FasL-FADD-Komplex ermöglichen (Chinnaiyan et al., 1995). Der DISC katalysiert die autoproteolytische Prozessierung und Dimerisierung von Pro-Caspase-8 durch „induzierte Nähe“ (siehe 1.1.5.1). Dass neben den Spaltprodukten auch Untereinheiten der prozessierten Caspase-8 am DISC detektiert werden können, impliziert die Ausbildung des aktiven Caspase-8-Heterotetramer direkt am DISC und anschließend die Freisetzung ins Zytosol (Lavrik et al., 2003). Mittels FADD und caspase-8-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass beide Moleküle unentbehrlich für CD95-vermittelte Apoptose sind (Zhang et al., 1998, Kuang et al., 2000, Thornberry and Lazebnik, 1998).

#### 1.1.5 Caspase-8

1995 wurde ein im Gel als Cap4 beschriebener Proteinspot als erster Bestandteil des DISC identifiziert (Kischkel et al., 1995). Aufgrund der Ähnlichkeit mit FADD und den Caspasen, wurde er als FADD-ähnliches Interleukin-1 $\beta$ -konvertierendes Protein (FLICE) und später als Caspase-8 bezeichnet (Alnemri et al., 1996). Bislang wurden 11 unterschiedliche mRNA-Spezies für Caspase-8 beschrieben, jedoch nur 4 Isoformen auf Proteinebene: Caspase-8/a /b /i /l. Während Caspase-8/a und /b regulär an den DISC rekrutiert werden, wird Caspase-8/i aufgrund der fehlenden Proteasedomäne eine inhibitorische Funktion zugeschrieben. Die enzymatisch aktive Caspase-8 ist aus zwei großen (p18) und zwei kleinen (p10) Untereinheiten

ten in Form eines  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut. Die große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum (Blanchard et al., 1999).

#### *1.1.5.1 Dimerisierung ist Voraussetzung zur Aktivierung*

Salvesen und Dixit formulierten 1998 das „Induced Proximity Model“, das Beobachtungen zahlreicher Gruppen subsumierte. Demzufolge ist die autoproteolytische Aktivierung von Pro-Caspase-8 nur durch die unmittelbare Nähe zweier Caspase-8-Moleküle möglich. Da bei den zugrundeliegenden Experimenten hohe Proteinkonzentrationen durch die Überexpression in Bakterien verwendet wurden, blieb zu klären, wie die notwendige Konzentration unter physiologischen Bedingungen erreicht wird. In diesem Modell wurde vorgeschlagen, dass die vorherige Dimerisierung von Pro-Caspase-8 die notwendige Nähe herstellt und somit die kritische Voraussetzung der autoproteolytischen Prozessierung darstellt. Das daraus abgeleitete „Dimerization Induced Proximity Model“ (Boatright and Salvesen, 2003) berücksichtigte, dass die ungespaltene Pro-Caspase-8 hauptsächlich als Monomer, die katalytisch aktive Caspase-8 vorwiegend aber als Dimer vorliegt (Donepudi et al., 2003). Das „Dimerization Induced Proximity Model“ bewährte sich scheinbar auch bei Anwendung auf andere Initiatorcaspasen (Bao and Shi, 2007). Im Widerspruch dazu wurde gezeigt, dass Pro-Caspase-8 auch außerhalb des DISC durch Caspase-3 und -6 proteolytisch aktiviert werden konnte. Das bedeutet, dass ähnlich der Aktivierung von Effektorcaspasen die Autoprozessierung nicht zwingend vorangehen muss (Sohn et al., 2005).

#### *1.1.5.2 Prozessierung*

Die Prozessierung am DISC vollzieht sich in drei aufeinander folgenden Schritten (Chang et al., 2003): Zunächst bildet sich am DISC ein Dimer zweier Pro-Caspase-8-Moleküle durch die Interaktion ihrer beiden Proteasezentren. Im zweiten Schritt wird durch Pro-Caspase-8-Aktivität die Untereinheit p10 (10kD) eines anderen Pro-Caspase-Dimers proteolytisch abgespalten, so dass die N-Termini der beiden Isoformen Caspase-8/a und /b mit entsprechend p43 oder p41 übrig bleiben. Im dritten Schritt erfolgt die Abspaltung der p18 Untereinheit (18kD) von den verbleibenden Prodomänen p26 bzw. p24 (Medema et al., 1997). Nach Konformationsänderung wird das reife Caspase-8-Heterotetramer ins Zytosol entlassen.

#### **1.1.6 Zwei CD95 Signalwege**

Hinsichtlich einer obligaten Beteiligung des Signalweges über die Mitochondrien an der CD95-induzierten Apoptose wurde eine Einteilung von Zellen in zwei Gruppen vorgeschlagen. Die Apoptoseinduktion in Typ-I-Zellen (u.a. Thymozyten und Lymphozyten) erfolgt

vorwiegend durch direkte Aktivierung der Caspasenkaskade. Typ-II-Zellen (u.a. Hepatozyten) benötigen hingegen erst eine durch Caspase-8 vermittelte Prozessierung von Bid, einem Protein der Bcl-2-Familie (Yin, 2000). Die aktive Form von Bid bewirkt die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien. Die Freisetzung von Cytochrom *c* führt zur Ausbildung des Apoptosoms, das durch unmittelbare Nähe von Pro-Caspase-9 dessen Autoaktivierung begünstigt (Acehan et al., 2002). In der Folge aktiviert Caspase-9 die Effektorcaspasen, u.a. Caspase-3 (Nicholson and Thornberry, 1997).

### 1.1.7 Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren

#### 1.1.7.1 *Tumor Nekrose Faktor (TNF)*

Das proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) wird hauptsächlich von Makrophagen hergestellt. TNF ist Ligand hauptsächlich zweier Rezeptoren: TNF-R1 (CD120a, p55/60) wird in den meisten Geweben exprimiert; die Expression von TNF-R2 (CD120b, p75/80) ist hingegen auf Zellen des Immunsystems beschränkt (Wajant et al., 2003b). Die Hauptfunktion von TNF-R1 führt im Sinne eines Überlebenssignals offenbar zur Induktion von Genen komplexer Zellfunktionen und antiapoptotischer Proteine einschließlich cFLIP, Bcl-X<sub>L</sub> und XIAP (Wajant et al., 2003b). Die TNF-vermittelte Apoptose wird im Gegensatz zu Signalwegen anderer DR nicht spontan induziert, sondern bedarf der Blockierung der antiapoptotischen Aktivität des NF-κB Signalweges. Dabei scheinen ähnlich wie bei CD95 und TRAIL auch FADD und Caspase-8 eine Schlüsselrolle zu spielen (Thorburn, 2004).

#### 1.1.7.2 *TNF-verwandter apoptoseinduzierender Ligand (TRAIL)*

Die physiologische Rolle von TRAIL ist weitgehend unbekannt. Wie CD95 ist TRAIL vermutlich in die gezielte Tötung durch zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten während der Immunantwort sowie in die Tumorzelltötung durch Natürliche Killerzellen (NK) involviert (Thomas and Hersey, 1998, Smyth et al., 2001).

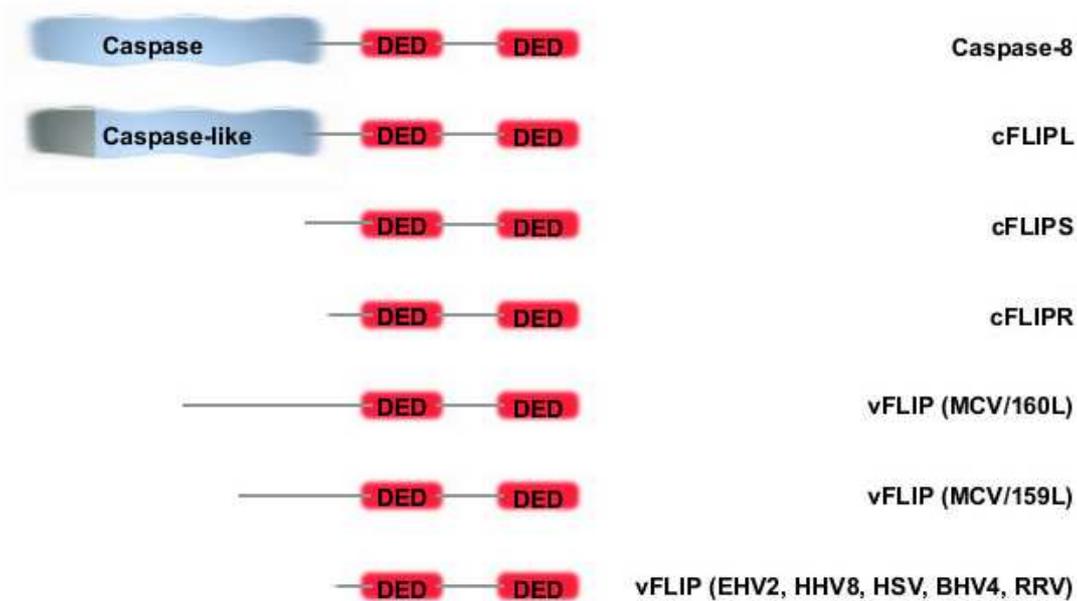
Bislang wurden fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren identifiziert. Die Todesrezeptoren DR-4 (TRAIL-R1) (Pan et al., 1997) und DR-5 (TRAIL-R2, KILLER) (Walczak et al., 1997) besitzen eine C-terminale DD und induzieren Apoptose ähnlich wie CD95 entweder direkt durch Aktivierung der Caspasenkaskade oder indirekt unter Beteiligung des mitochondrialen Signalweges. Die Signaltransduktion beinhaltet die Formation eines DISC und wird durch FADD, IAP, p53 und cFLIP reguliert. Im Gegensatz zu TNF und anti-CD95 wäre TRAIL durch höhere Spezifität und dadurch geringer Toxizität gegenüber normalen Zellen ein

vielversprechendes Medikament (Ashkenazi et al., 1999). Die Toxizität kann offenbar durch Kombination mit Caspase-9-Inhibitoren (Kim et al., 2004) oder mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern gegen DR4 oder DR5 weiter gesenkt werden (Guo et al., 2005).

## 1.2 FLIP

Durch Homologiesuche in Datenbanken auf der Suche nach DED-enthaltenden Proteinen wurden 1997 virale Moleküle identifiziert, die die DR-induzierte Apoptose inhibieren konnten. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu Caspase-8 wurde dieses neue Protein virales FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein (vFLIP) genannt. vFLIP wird von  $\gamma$ -Herpesviren, wie dem Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus-4 (HHV-8), dem Herpesvirus Saimiri (HSV), dem bovinen Herpesvirus-4 (BHV-4), dem equinen Herpesvirus-2 (EHV-2) und dem humanen Molluscum Contagiosum Virus (MCV) kodiert (Thome et al., 1997, Hu et al., 1997). vFLIP dient diesen Viren vermutlich als Abwehrstrategie gegen attackierende zytotoxische Killerzellen, die infizierte Zellen durch CD95-Aktivierung eliminieren. vFLIP interagiert durch zwei DEDs mit dem DISC und kann auf diese Weise die Rekrutierung und die autoproteolytische Spaltung von Pro-Caspase-8 blockieren. Die Deletion von *vFLIP* aus HVS bewirkte entsprechend fehlende antiapoptotische Aktivität und zeigte ferner, dass vFLIP nicht für die virale Replikation benötigt wird (Glykofrydes et al., 2000).

Kurze Zeit nach Charakterisierung von vFLIP wurden ein zelluläres Homolog in Säugetierzellen identifiziert: cFLIP (auch als CASH, Casper, CLARP, FLAME, MRIT, Usurpin bezeichnet). Elf verschiedene cFLIP-Splicing-Varianten wurden auf RNA-Ebene beschrieben. Drei davon werden als Proteine exprimiert: cFLIP<sub>S</sub>, cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>R</sub> (Budd et al., 2006). Die 26 kDa kurze Isoform cFLIP<sub>S</sub> entspricht in etwa der Struktur von vFLIP. Sie unterscheidet sich jedoch durch 20 Aminosäuren, die der Tandem-DED am C-Terminus folgen. Diese Sequenz enthält die Lysinreste Lys192 und Lys195, die als Ubiquitin-Akzeptor zur proteasomalen Degradierung dienen und somit einen raschen Umsatz bewirken (Poukkula et al., 2005). Das mit 24 kDa kleinste cFLIP<sub>R</sub> enthält zwei DEDs, nicht aber die C-terminalen Aminosäuren. Die lange Isoform cFLIP<sub>L</sub> (55 kDa) besitzt ebenfalls die Tandem-DED und einen im Vergleich zu cFLIP<sub>S</sub> längeren C-Terminus. cFLIP<sub>L</sub> gleicht strukturell der Caspase-8, deren caspase-ähnliche Domäne besitzt jedoch keine katalytische Aktivität. Dieser Domäne fehlen die zwei für Caspasen charakteristische AS-Motive des aktiven Zentrums (Cohen, 1997).



**Abb. 2: Molekulare Struktur von FLICE like inhibitory protein (FLIP)**

Alle *cFLIP*-Splicing-Varianten enthalten, ähnlich wie *Caspase-8*, zwei Todeseffektordomänen (DEDs). Die Carboxy(C)-terminalen Regionen variieren in ihrer Länge und Sequenz. Virales FLIP (*vFLIP*) wurde ursprünglich in verschiedenen  $\gamma$ -Herpesviridae entdeckt. Später wurden auch in humanem Molluscipoxivirus *vFLIP*-Varianten mit C-terminale Extensionen identifiziert, deren Funktion bislang nicht bekannt ist. Die lange Splicevariante von zellulärem FLIP (*cFLIP<sub>L</sub>*) enthält eine C-terminale enzymatisch inaktive caspase-ähnliche Domäne, deren molekulare Struktur mit *Caspase-8* und *Caspase-10* verwandt ist. Den kurzen Splicevarianten *cFLIP<sub>S</sub>* und der Variante *cFLIP<sub>R</sub>*, die aus der Raji-B-Zelllinie kloniert wurde, fehlt diese caspase-ähnliche Domäne. *vFLIP*-Gene wurden in verschiedenen viralen Genomen gefunden (Budd et al., 2006).

### 1.2.1 Expression von cFLIP

Der Genlocus von *cFLIP* besteht aus 14 Exons und liegt auf Chromosom 2q33-34 in einem 200 kb großen Cluster in direkter Nachbarschaft zu *caspase-8* und *-9* (Budd et al., 2006). Die Expression von *cFLIP* erfolgt in den meisten Zellen des humanen Körpers und wird durch eine Vielzahl von Signalwegen kontrolliert (Budd et al., 2006). In T-Zellen, in mit Transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) stimulierter Mikroglia, in mit Gallensäure stimulierten Hepatozyten und in mit Notch3 stimulierten glatten Muskelzellen sind dies in erster Linie die extrazellulär-signal-regulierte Kinase (ERK) und das u. a. durch den ERK-regulierten Transkriptionsfaktor c-AMP-antwortende Elementbindende-Protein (CREB) (Qiao et al., 2003, Yeh et al., 1998a, Schlapbach et al., 2000, Wang et al., 2002). Ferner verstärkt die Proteinkinase B (PKB) offenbar durch Wachstumsfaktoren wie vaskulärer endothelialer

Wachstumsfaktor (V-EGF), Notch1 und insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) die Expression von cFLIP (Sade et al., 2004, Suhara et al., 2001).

Eine gesteigerte cFLIP-Expression wird durch TNF, IL-1, Lipopolysaccharid (LPS) oder CD40 verursacht. Auch CD3- und CD28-spezifische Antikörper oder Ionomycin steigern durch die Expression von cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> die Aktivierung von T-Zellen. In diesen Fällen dürfte die Expression zumindest zum Teil durch NF- $\kappa$ B reguliert sein, da die Gegenwart nicht degradierbarer Mutanten von NF- $\kappa$ B- $\alpha$ -Inhibitoren oder die Abwesenheit von I $\kappa$ B- $\gamma$ -Kinase zu einer gestörten cFLIP-Expression führten (Micheau et al., 2001, Kreuz et al., 2001).

Als weitere Regulatoren der cFLIP-Expression wurden ferner MYC sowie p53 identifiziert (Ricci et al., 2004). P53 steigert die cFLIP-Expression auf dem Level der Transkription und reguliert die Proteindegradierung (Bartke et al., 2001, Inoue et al., 2004).

## 1.2.2 Physiologische Bedeutung von cFLIP

### 1.2.2.1 Studien mit cFLIP-defizienten Mäusen

Der Versuch, *cFLIP*<sup>-/-</sup>-Mäuse zu generieren, scheiterte an Entwicklungsdefekten des Herzen sowie an peripherer Akkumulation von Erythrozyten. Dies führte zum Tod im frühen Embryonalstadium (Yeh et al., 2000). Zuvor war ähnlich die Generierung von *caspase-8*<sup>-/-</sup>- und *fadd*<sup>-/-</sup>-Knockdown-Mäusen fehlgeschlagen. Fibroblastenstämme von *caspase-8*<sup>-/-</sup>-Embryonen wiesen eine unbeeinträchtigte Aktivierung der JNK durch TNFR, CD95 und DR3 sowie eine normale Phosphorylierung und Degradierung von I $\kappa$ B auf, während die extrinsische Apoptose nicht induziert werden konnte (Varfolomeev et al., 1998). Da eine Untersuchung durch Funktionsverlustes von cFLIP auf diesem Weg nicht untersucht werden konnte, musste alternativ auf die Züchtung und Untersuchung von Mäusen mit einer selektiven Deletion von cFLIP im T-Zellkompartiment sowie auf die Komplementbildung von Rag1-defizienten Blastozyten mit cFLIP-defizienten embryonalen Stammzellen zurückgegriffen werden (Zhang and He, 2005, Chau et al., 2005). In beiden Fällen waren die periphere T-Zellzahl und deren Proliferation nach TCR-Stimulation reduziert. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die cFLIP-defizienten T-Zellen vermehrt starben, sowohl spontan als auch nach TCR-Stimulation. Offenbar war dieser Effekt weder von CD95 abhängig noch wurde eine Beeinträchtigung der Aktivierung von ERK oder NF- $\kappa$ B nachgewiesen (Zhang and He, 2005, Chau et al., 2005). Dies bedeutet, dass cFLIP diese beiden Signalwege zwar modulieren kann, für diese jedoch nicht essentiell ist. Der Phänotyp cFLIP-defizienter Mäuse ähnelt demnach stark dem der caspase-8-defizienten T-Zellen (Salmena et al., 2003). Ferner gleichen die Ergebnisse den

Befunden einer Caspase-8-Mutation einer Immundefizienzerkrankung im Menschen, die durch erniedrigte Zellzahlen und eine verringerte Proliferation der T-Zellen charakterisiert ist (Chun et al., 2002).

#### 1.2.2.2 Studien mit cFLIP-transgenen Mäusen

Da cFLIP ein Inhibitor des extrinsischen Apoptose-Signalwegs ist, wurde ursprünglich erwartet, dass cFLIP-transgene Mäuse dem Phänotyp der CD95-defizienten *lpr*-Maus entsprechen würden. Entgegen dieser Annahme wiesen cFLIP<sub>L</sub>-transgene Mäuse keine Lymphoproliferation oder Akkumulierung von T-Gedächtniszellen auf, sondern normale Zellzahlen von Thymozyten und peripheren T-Zellen (Lens et al., 2002). Dieses Phänomen könnte durch eine gesteigerte Proliferation bei gleichzeitig erhöhter Apoptose erklärt werden und steht im Einklang mit der Theorie der konzentrationsabhängigen Aktivierung von Caspase-8 durch cFLIP<sub>L</sub> (Dohrman et al., 2005). Die erhöhte Apoptosesensibilität betrifft offenbar vor allem Typ-I-Helferzellen (CD8+, TH1) und reduziert deren periphere Anzahl um 30-50%. Typ-II-Helferzellen (CD4+, TH2) sind dagegen in erhöhter Anzahl vorhanden (Tseveleki et al., 2004). Diese Verschiebung des TH1/TH2-Verhältnisses wurde mit der erhöhten Inzidenz von allergischen Atemwegserkrankungen bei erniedrigtem Auftreten von experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE) in *lpr*-Mäusen in Zusammenhang gebracht (Chun et al., 2002). Ferner wurde beobachtet, dass der klonalen Expandierung von antigen-spezifischen T-Zellen in cFLIP<sub>L</sub>-transgenen Mäusen eine schnelle, vorzeitige Beseitigung folgte, so dass T-Gedächtniszellen nicht akkumulierten (Dohrman et al., 2005).

#### 1.2.2.3 Apoptose

Während cFLIP<sub>S</sub> die DR-vermittelte Apoptose hemmt, wird die Rolle von cFLIP<sub>L</sub> noch immer kontrovers diskutiert. Wie oben dargestellt, konkurrieren cFLIP<sub>S</sub> und cFLIP<sub>L</sub> mit Caspase-8 um die Rekrutierung an den DISC (Irmeler et al., 1997, Rasper et al., 1998). Ferner scheint cFLIP<sub>S</sub> den ersten Schritt der autoproteolytischen Spaltung von Pro-Caspase-8 an den DISC zu unterbinden (Krueger et al., 2001). Die Rolle von cFLIP<sub>L</sub> ist hingegen komplexer. Einerseits steht cFLIP<sub>L</sub> ebenfalls in Konkurrenz mit Caspase-8 am DISC und hemmt offenbar den zweiten Schritt der Prozessierung von Caspase-8, also der proteolytischen Abspaltung von p18 (Krueger et al., 2001). Sowohl in geringen als auch in sehr hohen Konzentrationen wurde entsprechend eine Hemmung der Apoptose durch cFLIP<sub>L</sub> nachgewiesen (Chang et al., 2002, Micheau et al., 2002, Boatright et al., 2004). Darüber hinaus verstärkte die selektive Deletion von cFLIP<sub>L</sub> auf RNA-Ebene die Aktivierung von Caspase-8 (Sharp et al., 2005).

CFLIP<sub>L</sub> kann aufgrund seiner beiden DEDs und seiner caspase-ähnlichen Domäne mit Caspase-8 ein Heterodimer ausbilden. Der C-Terminus von cFLIP<sub>L</sub> enthält eine Aktivierungsschleife, die nach Heterodimerbildung mit Caspase-8 dessen aktives Zentrum exponiert und die Autoprozessierung von Caspase-8 ermöglicht (Irmeler et al., 1997, Han et al., 1997). Daher besitzt cFLIP<sub>L</sub> vermutlich eine konzentrationsabhängige Wirkung: die eines Apoptose-Inhibitors bei niedriger und hoher zytosolischer Konzentration und die eines Apoptose-Augmentors bei mittlerer Konzentration. Diese These steht im Einklang mit dem „Dimerization Induced Proximity Model“ (siehe 1.1.5.1), zumal auch Heterodimere autokatalytische Aktivität entfalten konnten (Bao and Shi, 2007). Diesem Modell zufolge wird die autokatalytische Aktivität in erster Linie durch die Dimerisierung der Initiatorcaspasen verursacht. Der DISC dient vor allem dieser Dimerisierung, indem die lokale Konzentration der Initiatorcaspasen gesteigert wird. (Yin et al., 2006).

### **1.3 Der CD95 Signalweg in der Immunantwort**

Nach Antigenstimulation proliferieren antigenspezifische T-Zellen. Am Ende der Immunantwort und nach Entfernung des Antigens wird die Zellzahl durch apoptotische Elimination wieder auf das ursprüngliche Niveau gebracht (Kawabe and Ochi, 1991). Dieser Prozess beugt einer fehlgeleiteten Gewebsschädigung und der Autoimmunität durch potenziell autoreaktive Immunzellen vor (Hildeman et al., 2002). Ob Fehlregulationen in diesem System zu autoimmunen Symptomkomplexen wie dem Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) führen, ist umstritten. Canale und Smith beschrieben vor 50 Jahren erstmalig das ALPS als eine Erkrankung, die durch nicht-maligne Lymphadenopathie und Autoimmunität gekennzeichnet war (Canale and Smith, 1967). Diese Erkrankung wird durch Mutationen in Genen von Proteinen des CD95 Signalweges verursacht. *In vitro* werden entsprechend der Sensitivität von Lymphozyten gegenüber CD95-induzierter Apoptose verschiedene Subtypen unterschieden. T-Zellen dieser Patienten können bei Expressionsverlust komplett resistent (ALPS 0) und bei reduzierter bis normaler Expression partiell resistent (ALPS I und II) werden oder auch eine normale Apoptoseinduktion aufweisen (ALPS III).

Ähnlich dem humanen Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) entwickelte die Lymphoproliferationsmaus (*lpr*) Autoimmunität mit Nephritis, Lymphadenopathie,  $\gamma$ -Hyperglobulinämie und antinukleäre Antikörper (ANA) (Cohen and Eisenberg, 1991). Die alternden *lpr*-Mäuse waren ferner durch die Akkumulierung von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>-T-Zellen in der Peripherie charakterisiert. Kurze Zeit später wurden weitere natürliche Mutanten beschrieben, die *lpr<sub>cg</sub>*- und die Generalisierte-Lymphadenopathie-Erkrankung-(*gld*) (Takahashi

et al., 1994, Kimura and Matsuzawa, 1994). Während *lpr* durch einen nahezu kompletten Verlust der CD95-Expression charakterisiert ist, erlaubt *lpr<sub>cg</sub>* die Expression eines nicht funktionellen Proteins (Nagata and Golstein, 1995). Die *gld*-Mutante hingegen verursachte durch Punktmutation in *fas<sub>L</sub>* eine komplette Funktionsstörung der extrazellulären Domäne von FasL (Adachi et al., 1996, Cohen and Eisenberg, 1991). Der Phänotyp dieser drei Mausmodelle unterschied sich hauptsächlich im Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung (Rieux-Laucat et al., 1999). Gezielte Deletion von *fas* (Karray et al., 2004) oder *fas<sub>L</sub>* (Nagata, 1996) führten weiterhin zu wesentlich schwerwiegenderen Pathologien. Analog zum Tiermodell konnten die oben genannten Mutationen des CD95-Signalwegs auch bei ALPS-Patienten nachgewiesen werden (Wu et al., 1996).

### 1.3.1 Die Rolle von CD95 in aktivierten T-Zellen

Eine erste Schlussfolgerung der Analyse der *lpr*-Maus war, dass sich aktivierte T-Zellen am Ende der Immunantwort durch CD95-vermittelte Apoptose selbst eliminieren könnten. Dies glaubte man durch die Beobachtung bestätigt, dass T-Zellen nach Stimulation des T-Zellrezeptorkomplexes (TCR, CD3) vermehrt FasL produzierten (Irmeler et al., 1997). Ferner verminderte sich im Verlauf der Immunantwort die intrazelluläre Konzentration von cFLIP nach initialem Anstieg. Dies wurde als Sensibilisierung gegenüber CD95-induzierter Apoptose gedeutet (Van Parijs et al., 1999). Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen ist indes umstritten.

Im Widerspruch zu dieser These wiesen Mausmodelle mit T-Zell-spezifischer Deletion von CD95 oder Komponenten des CD95-Signalweges eine Lymphopenie und eine der pulmonalen Fibrose ähnliche Erkrankung auf, jedoch keine Lymphoproliferation, die für den Phänotyp der ALPS/*lpr* charakteristisch ist (Hildeman et al., 2002). Daher kann davon ausgegangen werden, dass für den ALPS/*lpr*-Phänotyp die Interaktion weiterer Zelltypen notwendig ist, beispielsweise antigen-präsentierende Zellen (Hao et al., 2004). Vor kurzem konnte entsprechend gezeigt werden, dass die spezifische Deletion von CD95 in APCs Autoimmunität verursachte (Stranges et al., 2007). Es wird angenommen, dass im Sinne eines negativen Regulationsmechanismus aktivierte CD95<sup>+</sup>-APCs normalerweise durch aktivierte T-Zellen eliminiert werden. CD95<sup>-</sup>APC, die Autoantigene präsentieren, würden folglich die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen triggern. Diese These wurde durch die Beobachtung gestützt, dass DCs nach der Aktivierung von T-Zellen offenbar getötet wurden (Wong and Pamer, 2003). Derzeit ist jedoch umstritten, ob die CD95-vermittelte Apoptose von APCs primär an der Regulation von CD4<sup>+</sup>- und/oder der CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort beteiligt ist, da CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

eine kontinuierliche Stimulation durch APCs und CD8<sup>+</sup> einen einzigen Hit oder ebenfalls eine kontinuierliche Simulation durch APCs benötigen (Obst et al., 2005, Bevan and Fink, 2001, Curtsinger et al., 2005).

### 1.3.2 Zelltod aktivierter T-Zellen

Der Zelltod aktivierter T-Zellen erfolgt durch den intrinsischen Apoptose-Signalweg. Dabei werden proapoptotische BH3-only-Proteine aktiviert, die ein strukturell charakteristisches Motiv, die Bcl-2-ähnliche-Domäne Typ-3 (BH3), enthalten. Dies sind insbesondere Bim, Puma und Noxa, die über Aktivierung von Bax/Bak Apoptose auslösen (Zhu et al., 2004, Hacker et al., 2006). Entsprechend blockierte die Überexpression von Bcl-2 ebenso wie der gleichzeitige Verlust von Bak und Bax den Zelltod aktivierter T-Zellen (Zhong et al., 2006). Außerdem könnten Zytokine wie Typ-I-IFN, IL-1, IL-2, IL-7, IL-12 und IL-15 sowie die NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signaltransduktion eine Rolle in der Apoptose aktivierter T-Zellen spielen (Vella et al., 1998, Marrack et al., 1999, Bauer et al., 2006).

## **1.4 Nicht-apoptotische Signaltransduktion durch Caspase-8 und cFLIP**

Entgegen der ursprünglichen Annahme sind *in vivo* CD95 und cFLIP an der Elimination von T-Zellen nach einer Infektion vermutlich nicht beteiligt, sondern vielmehr an der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen.

### 1.4.1 Aktivierung von T-Zellen

1993 wurde erstmalig beobachtet, dass *in vitro* die Ligandenbindung am CD95-Rezeptor und die gleichzeitige Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) kostimulierende Aktivierungssignale darstellten (Migone et al., 2002). Ähnliche Effekte wurden auch bei anderen Mitgliedern der TNF Superfamilie beobachtet (Budd et al., 2006). T-Zellen, bei denen gezielt DR, wie z.B. CD95, ausgeschaltet wurden, waren hingegen in der Lage, normal zu proliferieren (Chun et al., 2002). Die physiologische Relevanz dieser Kostimulation ist daher nicht eindeutig.

Ferner wurde berichtet, dass möglicherweise auch Caspasen eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen spielen. So konnte nach TCR-Stimulation eine starke Erhöhung der Aktivität von Caspase-8 nachgewiesen werden, während deren zytosolische Konzentration gleich blieb (Thome, 2004). Einen weiteren Hinweis ergab die Identifizierung weiterer, so genannter atypischer Formen der ALPS, die durch eine heterozygote Mutation von Caspase-10 bzw. eine homozygote Mutation von Caspase-8 die Inaktivierung des jeweiligen Enzyms verursachten.

Dies resultierte in Aktivierungs- und Proliferationsdefekten von Lymphozyten mit reduzierter IL2-Bildung (Chun et al., 2002, Wang et al., 1999). Ähnliche Effekte wurden durch Caspase-Inhibitoren hervorgerufen. Dies unterstützte die Theorie, dass Caspasen eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten spielen (Alam et al., 1999, Kennedy et al., 1999, Boissonnas et al., 2002).

Erste Hinweise, dass cFLIP einen Effekt auf die Aktivierung von T-Zellen haben könnte, ergaben Experimente mit Jurkat-T-Zellen, die cFLIP<sub>L</sub> überexprimierten und nach TCR-Stimulation mehr IL-2 produzierten als WT Zellen. Weitere Untersuchungen der Signalpfade, die die IL-2-Expression regulieren, zeigten, dass die TCR-vermittelte Aktivierung von NF-κB und von ERK durch die Anwesenheit von cFLIP<sub>L</sub> gesteigert wurde (Kataoka et al., 2000). Dabei assoziiert cFLIP<sub>L</sub> offenbar mit TRAF1, TRAF2 und RIP1 bzw. mit RAF1 zu einem Komplex, der NF-κB und ERK aktiviert (Budd et al., 2006). Besonders „suboptimale Dosen“ von CD3-Antikörpern führten zu vermehrter Proliferation der T-Zellen (Lens et al., 2002). Wie oben dargestellt, konnte durch cFLIP Mausmodelle gezeigt werden, dass cFLIP die Signalwege von ERK oder NF-κB moduliert, jedoch für diese nicht essentiell ist (Zhang and He, 2005, Chau et al., 2005). Grundsätzlich ist jedoch nicht vollständig geklärt, wie nach der TCR-Stimulation die Assoziation von Caspase-8 und cFLIP<sub>L</sub> reguliert wird, ohne dabei Apoptose zu induzieren.

cFLIP<sub>S</sub> begrenzt die Aktivierung von Caspase-8 durch kompetitive Bindung an den DISC und besitzt vermutlich während der Aktivierung von T-Zellen eine andere Funktion als cFLIP<sub>L</sub>. Da cFLIP<sub>S</sub> nach der Aktivierung von T-Zellen in erhöhter zytosolischer Konzentration nachgewiesen wurde, ist denkbar, dass cFLIP<sub>S</sub> die Aktivierung der T-Zellen limitieren kann. (Krueger et al., 2001). Ferner wurde gezeigt, dass cFLIP<sub>S</sub> nicht in der Lage war, RIP1 und TRAF2 zu rekrutieren (Kataoka and Tschoop, 2004). Die relativen Mengen von cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> könnten daher das Gleichgewicht zwischen Caspasen- und NF-κB-Aktivierung kontrollieren. Entsprechend minderte die transgene Expression von vFLIP die Anzahl von CD8+-Gedächtnis-Zellen (Wu et al., 2004).

Eine weitere Bedeutung in der Aktivierung von T-Zellen besitzen wahrscheinlich intermediäre Spaltprodukte von cFLIP<sub>L</sub>, wie p43cFLIP (Golks et al., 2006) oder p22-FLIP (Esche et al., 1999). Diese sollen TRAF2 oder RIP1 besser rekrutieren und dadurch unmittelbar zu einer erhöhten NF-κB-Aktivierung führen.

### 1.4.2 Differenzierung und Aktivierung myeloider Zellen

Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen sind zur Antigenpräsentation befähigt und werden daher als antigen-präsentierende Zellen (APCs) bezeichnet. Unreife DCs sind in verschiedensten Geweben lokalisiert und kontrollieren ihre Umgebung. Nach Identifizierung und Prozessierung eines Antigens reifen DCs und emigrieren in lymphatisches Gewebe. Dort präsentieren diese DCs den T-Zellen Antigenfragmente anhand ihres Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und koordinieren die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen.

Täglich werden über eine Billionen Monozyten produziert, von denen jedoch nur wenige zu Makrophagen und DCs differenzieren. Das legt einen streng kontrollierten Prozess nahe, der bis heute ungeklärt ist. Für diese negative Selektion der Monozyten wurde eine Beteiligung der CD95-vermittelten Apoptose vorgeschlagen, da Fas-Knockdown-Mäuse *in vivo* mehr zirkulierende Monozyten und eine vermehrte Anzahl an Gewebemakrophagen aufwiesen (Perlman et al., 1999, Ashany et al., 1999).

Auch cFLIP scheint eine Rolle in der Differenzierung von Makrophagen und reifen DCs aus Knochmarksvorläuferzellen zu spielen. Nach *in vitro* Stimulation durch den granulozytenmakrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) gemeinsam mit IL-4 traten Veränderungen der intrazellulären cFLIP-Konzentration auf: Monozyten hatten eine geringe cFLIP-Konzentration und waren hochsensibel gegenüber CD95 vermittelter Apoptose, während Makrophagen und unreife DCs erhebliche Mengen cFLIP exprimierten und Apoptose-resistent wurden (Rescigno et al., 2000). Fraglich ist jedoch, ob die Funktion von cFLIP in APCs allein in der Verhinderung der Apoptose liegt oder auch wie in den T-Zellen zur Differenzierung und Aktivierung beiträgt. Tatsächlich konnte *in vitro* eindrücklich gezeigt werden, dass die Stimulation von CD95 unreife DCs nicht tötet, sondern dass diese zur phänotypischen und funktionellen Reifung gebracht wurden (Hohlbaum et al., 2001).

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Kenntnis von molekularen Mechanismen der Signalleitung in Zellen des Immunsystems ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Physiologie dieser Zellen sowie für das Verständnis mancher menschlicher Erkrankungen.

In dieser Arbeit sollte anhand eines cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mausmodells die Bedeutung der nicht-apoptotischen DR-Signaltransduktion in Zellen des Immunsystems untersucht werden. Die Proteine der zellulären FLIP-Familie interagieren mit Proteinen dieser Signalwege und regulieren dadurch vermeintlich die Zell-Aktivierung, die Differenzierung und die Apoptose

von Immunzellen sowie deren Antigenpräsentation. Die kurze Isoform cFLIP<sub>S</sub> ist nach heutigem Wissensstand ein ausschließlicher Inhibitor von Caspase-8 und erschien daher zur Untersuchung in transgenen Mäusen besser geeignet zu sein als cFLIP<sub>L</sub>, das die Caspase-8 abhängig von der intrazellulären Konzentration sowohl inhibieren als auch aktivieren kann.

Das verwendete Transgen war ein Fusionsprotein aus cFLIP<sub>S</sub> und GFP (Grün fluoreszierendes Protein). Dies erlaubte die einfache Identifikation von cFLIP<sub>S</sub>-GFP exprimierenden Zellen, ohne deren Funktion zu stören. Das Transgen wurde unter der Kontrolle des *vav*-Promotors in das Genom einer Maus eingebracht. Der *vav*-Promotor wurde gleichmäßig exklusiv auf hämatopoetische Zellen exprimiert (Rescigno et al., 2000). Entsprechend konnten daher die Konsequenzen einer erhöhten cFLIP<sub>S</sub>-Expression nicht nur in Lymphozyten, sondern auch in DCs und Makrophagen untersucht werden.

Zunächst sollten hämatopoetische Zellen auf deren cFLIP<sub>S</sub>-GFP Expression hin untersucht und typisiert werden. Voraussetzung weiterer Untersuchungen war der Nachweis der durch cFLIP<sub>S</sub> verursachten Resistenz gegenüber CD95 induzierter Apoptose. Der nächste Parameter, der untersucht werden sollte, war eine mögliche Einflussnahme von cFLIP<sub>S</sub> auf Signalwege, die bei der Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen eine Rolle spielen könnten. Ferner sollte überprüft werden, ob die Differenzierung von APCs aus primären Vorläuferzellen des Knochenmarks durch die cFLIP<sub>S</sub>-Überexpression gestört oder ob die Interaktion reifer APCs mit Lymphozyten beeinträchtigt ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Brutschränke	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometrie	FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Großzentrifugen	Megafuge 1.0 R (4°C)	Heraeus, Hanau
	Sorvall RC 26 Plus (4°C) Ultrazentrifuge	Du Pont, Newton, CT, USA
Großzentrifugen	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.OR, 4°C	Heraeus, Hanau
Harvester	Micro96 Harvester	Shatron Instruments, Norwegen
Lichtmikroskop	ID203, Axiovert 100	Zeiss, Jena
LS Separation Columns (MACS)		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micro-Betacounter	Matrix 9600	Packard, Niederlande
Sterilwerkbank	HERAsafe HSP 18	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C (RT)	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge 15R (4°C)	Heraeus, Hanau
	Biofuge fresco (4°C)	Heraeus, Hanau
	Omnifuge 2.ORS (RT)	Heraeus, Hanau
Zählkammer	Neubauer	HBG

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Einmalspritzen (27 G)	Einmal-Injektions-Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
FACS Röhrchen	1,2 ml Microtubes Loose NS	Alpha Laboratories, Hampshire, U.K.
Filter (Harvester)	Glass Fiber Filters	Packard, Niederlande
Gewebekulturplatten	6 Well, Flat Bottom	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
	12 Well, Flat Bottom	
	96 Well, Flat Bottom	

*Fortsetzung Seite 27*

Gewebekulturplatten	96 Well, U Bottom	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
V-Boten-Platte	Microplate PS 96V	Joseph Peske GmbH, Aindling-Arnhofen
Gewebekulturschalen	100 mm x 20 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen	5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	10 ml	
	25 ml	
Reaktionsgefäß	1,5 ml	Eppendorf
	2,0 ml	Eppendorf
Röhrchen	15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	50 ml	

### 2.1.3 Chemikalien und Radiochemikalien

<i><b>Bezeichnung</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Bio-Rad, München
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin-V-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
Azetat (Na-Azetat)	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanvalin A (ConA)	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100%)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Roth, Karlsruhe
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37°C)	Roth, Karlsruhe
GM-CSF (granulozyten-makrophagen-koloniestimulierender Faktor)	Eigene Herstellung aus Überstand von Ag8653 Myelomzellen, die mit muriner GM-CSF cDNA transfiziert wurden
Ionomycin	Calbiochem/Merck, Darmstadt

*Fortsetzung Seite 28*

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
M-CSF (Makrophagen koloniestimulierender Faktor)	R&D Systems, MN, USA
Methanol (99%)	Merck, Darmstadt
Methyl-[3H]-Thymidine	Amersham Biosciences, Schweden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.4 Häufig verwendete Puffer

<i>Puffer</i>	<i>Menge</i>	<i>Stoff</i>
Lysepuffer (Eukaryonten)	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1 mM	PMSF
	10% (w/v)	Glycerol
	1% (w/v)	Triton X-100
	10 T/500 ml	Complete (Roche)
Ammoniumchloridpuffer 10x (Erythrozytolyse)	1,5 M	NH <sub>4</sub> Cl
	100 mM	NaCO <sub>3</sub>
	10 mM	EDTA
Annexin-V-Bindpuffer	pH 7,4	
	10 mM, pH 7,4	Hepes/NaOH
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
		Aqua dest

## 2.1.5 Zellkulturmedien

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Click's-RPMI	<p>Instamed Click's-RPMI (Biochrom, Berlin), 1 Beutel in 10 l destilliertes Wasser, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C</p> <p>23,83 HEPED</p> <p>11,75 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,2</p> <p>Vor Anwendung wurden folgende Zusätze beigemischt:</p> <p>2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)</p> <p>10% Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin); Hitzeinaktivierung der Komplementfaktoren bei 56°C für 1 Stunde</p> <p>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000U/10000µg/ml) (Biochrom, Berlin)</p> <p>50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)</p>
PAA-RPMI	<p>10% FCS (Biochrom, Berlin); Hitzeinaktivierung der Komplementfaktoren bei 56°C für 1 Stunde</p> <p>100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)</p> <p>50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)</p>
Methylzellulosemedium: <i>Methocult SF H4436</i>	<p>1% Methylzellulose in IMDM</p> <p>1% BSA</p> <p>10 ng/ml Rinderinsulin</p> <p>200 ng/ml Eisen-gesättigtes humanes Transferrin</p> <p>3 U/ml rh Erythropoetin</p> <p>10,4 M 2-Mercaptoethanol</p> <p>2 mM L-Glutamin</p> <p>50 ng/ml rh Stammzell-Faktor</p> <p>20 ng/ml rh IL-3</p> <p>20 ng/ml rh IL-6</p> <p>20 ng/ml rh G-CSF</p>

## 2.1.6 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-FITC Micro Beads	---	---	Miltenyi Biotex, Bergisch Gladbach

*Fortsetzung Seite 30*

CD3ε Hamster-anti-Maus	APC	145-2C11	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD11b	PE	M1/70	eBioscience, San Diego, USA
CD11c	APC	N418	eBioscience, San Diego, USA
CD28 Hamster-anti-Maus	---	37.51	
CD3 Hamster-anti-Maus	---	145-2C11	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD3	Cy5	---	Eigene Herstellung
NK1.1 Maus-anti-Maus	FITC	PK136	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD45R/B220 Ratte-anti-Maus	FITC	RA3-6B2	BD Pharmingen, San Diego, USA
IgM Ziege-anti-Maus	---	Polyklonal	Dianova
CD80	PE	16-10A1	eBioscience, San Diego, USA
CD86	PE	09275B	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CD40	PE	1C10	eBioscience, San Diego, USA

### 2.1.7 Apoptosestimuli

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
FasL	Prof. Harald Wajant, Würzburg
MG-132	Biomol GmbH, Hamburg

### 2.1.8 Mausgenerierung und -zucht

Das Fusionsgen FLIP<sub>5</sub>-GFP (Prof. Harald Wajant, Würzburg) wurde durch Frau Svetla Chaneva in den *vav*-Vektor (Prof. Jerry Adams, Melbourne) kloniert.

Der *vav*-Promotor wird gleichmäßig exklusiv in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Rescigno et al., 2000, Ogilvy et al., 1998). Entsprechend konnten die Konsequenzen einer erhöhten Expression von cFLIP<sub>5</sub> nicht nur in Lymphozyten, sondern auch in Dendritischen Zellen und Makrophagen untersucht werden.

Die Injektion des Transgens in die Oozyten von C57BL/6 Mäusen erfolgte durch Prof. Dr. Eckhard Wolf am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie des Genzentrums der LMU München (Feodor-Lynen Str. 25, 81377 München). Dabei wurden zwei Mauslinien

etabliert, von denen eine das Transgen nicht exprimierte. Das Transgen cFLIP<sub>S</sub>-GFP wurde zunächst mittels Southern Blot nachgewiesen.

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter SPF (Specific pathogen free)-Bedingungen im Mausstall des Instituts für Mikrobiologie in München. Zur Genotypisierung wurde die durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression angewandt. Versuche mit transgenen Mäusen wurden mit Wildtyp-Mäusen desselben Wurfs oder mit Mäusen der gleichen Generation durchgeführt.

### 2.1.9 Software

Folgende Software wurde verwendet: Microsoft Office, CellQuestPro, Adobe Acrobat und FlowJO.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung primärer Zellen

Zur Gewinnung primärer Zellen wurden in gleicher Anzahl jeweils transgene und WT Mäuse getötet. Die Tötung erfolgte schnell und schmerzfrei durch Genickbruch, die Organentnahme unter möglichst keimfreien Bedingungen. Die entnommenen Organe und die Einzelzellsuspensionen wurden stets schonend auf Eis gelagert.

#### 2.2.1.1 *Milz, Thymus und Lymphknoten*

Nach Entnahme von Milz, Thymus und von abdominalen, subclaviculären sowie inguinalen Lymphknoten wurden diese jeweils in ein Röhrchen mit 10 ml Click's RPMI Medium überführt. Zur Erstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die lymphatischen Organe mit einem Stempel durch separate Siebe gedrückt. Nach ausgiebiger Spülung der Siebe mit Medium wurden die Suspensionen zurück in die Röhrchen überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 5 min.).

Die Milzzellsuspension enthält in hohem Anteil Erythrozyten, die durch Aufnahme der Niederschläge in 2 ml Ammoniumchloridpuffer und anschließender zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur eliminiert wurden. Zur sofortigen Beendigung der Erythrozytolyse wurden 9 ml Click's RPMI Medium hinzupipettiert, erneut bei 500 g 5 min sedimentiert und zweimal gewaschen.

Die Niederschläge wurden schließlich in 10 ml Click's RPMI Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.1.2 Knochenmark

Als Erstes wurden Femora und Tibiae der Mäuse frei von Cutis, Muskel- und Bindegewebe präpariert. Nach Abschneiden der Epiphysen wurde das Knochenmark mit 10 ml RPMI Medium anhand einer 27 G Nadel aus den Röhrenknochen herausgespült und in 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, zweimal gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.1.3 Generierung von Dendritische Zellen

Zur Generierung primärer Dendritischer Zellen wurden  $5 \cdot 10^6$  Knochenmarkvorläuferzellen gelöst in 10 ml RPMI Medium in eine Petrischale überführt und 160  $\mu$ l GM-CSF hinzugegeben (entspricht einer Konzentration des GM-CSF von 1,6%). Am Tag 3 wurden erneut 10 ml RPMI Medium und 160  $\mu$ l GM-CSF hinzugegeben. Am Tag 6 wurden zur Erneuerung des Mediums 10 ml abgenommen, zentrifugiert und der Niederschlag in 10 ml frischem RPMI-Medium gemeinsam mit 160  $\mu$ l GM-CSF aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann zusammen mit den restlichen 10 ml aus der vorherigen Petrischale in eine neue Zellkulturschale überführt. Die Verwendung von Zellkulturschalen ermöglichte die Entfernung von Makrophagen, da diese durch Adhäsion fest am Boden der Platten gebunden wurden. Am Tag 8 wurden nochmals 10 ml durch frisches RPMI mit 160  $\mu$ l GM-CSF ersetzt. Am Tag 10 konnten durch vorsichtige Abnahme des Überstandes die nicht-adhärenenten Dendritischen Zellen geerntet werden.

### 2.2.1.4 Generierung von Makrophagen

Zur Generierung primärer Makrophagen wurden  $20 \cdot 10^6$  Knochenmarkvorläuferzellen in 10 ml RPMI Medium mit 10  $\mu$ l M-CSF überführt (entspricht einer M-CSF Konzentration von 0,1%). Am Tag 3 wurden weitere 10  $\mu$ l M-CSF hinzupipettiert. Am Tag 10 wurden die nicht-adhärenente Zellen durch Abnahme des Überstandes entfernt. Die haftenden Makrophagen konnten anschließend durch 20-minütige Inkubation in Accutase von der Oberfläche der Petrischale gelöst werden. Nach Zugabe von 10 ml RPMI Medium wurden die Zellsuspensionen in Röhrchen abgefüllt. Die enthaltenen ausdifferenzierten Makrophagen wurden zweimal gewaschen und standen anschließend zur weiteren Verwendung bereit.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10  $\mu$ l gut durchmischter Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer eingefüllt. Bei 100facher Vergrößerung wurden meist zwei Quadranten der Zählkammer (je 16 Quadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt und aus den Einzelwerten der

Mittelwert gebildet. Multipliziert man den Mittelwert der Zellzahlen mit  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor, erhält man die Zellzahl pro ml.

### 2.2.3 Prinzip der immunmagnetischen Zellseparierung

Die immunmagnetische Zellseparierung, auch magnetische aktivierende Zellsortierung (MACS) genannt, dient der Isolierung einer bestimmten Zell-Subpopulation aus Zellgemischen anhand der Markierung von Oberflächenmolekülen durch magnetische Antikörper.

Zunächst wurde das Zellgemisch mit für B- und NK-Zellen spezifischen, an Fluoreszeini-sothiocyanat (FITC) gekoppelten Antikörpern gefärbt. Dazu wurde das Zellsediment in 500  $\mu$ l PBS/BSA (0,5% BSA) gelöst und je 5  $\mu$ l anti-B220-FITC sowie anti-NK1.1-FITC hinzugegeben. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA (0,5% BSA) gewaschen und anschließend in 400  $\mu$ l Medium aufgenommen. Im folgenden Schritt wurden 40  $\mu$ l magnetische anti-FITC Kleinstpartikel, auch Microbeads genannt, hinzupipettiert. Nach der Inkubation (20 min, 4°C) wurden die Zellen sedimentiert und in 3 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurde das Gemisch in eine mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben, die in einem Dauermagnetfeld stand. Microbeads-FITC-AK-gebundene Zellen wurden durch das magnetische Feld in der Säule immobilisiert, so dass nur B220/NK1.1-negative Zellen, d.h. hauptsächlich T-Zellen, die Säule passieren konnten. Diese wurden nach zweimaligem Spülen mit je 5 ml Click's RPMI Medium in 15 ml Spitzbodenröhrchen aufgefangen. Dieses negative Auswahlverfahren mit Hilfe von MACS-Säulen (Miltenyi Biotec) isolierte T-Zellen ohne Aktivierung. Nachdem die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt worden waren, konnten die verbliebenen Zellen, in der Mehrheit B-Zellen, mit Hilfe eines Stempels in ein weiteres Röhrchen gedrückt werden. Anschließend wurden die separierten Populationen gezählt und standen zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

### 2.2.4 Stimulierung primärer eukaryontischer Zellen

Für die Untersuchung folgender Zellfunktionen war die vorhergehende Stimulierung primärer eukaryotischer Zellen notwendig:

- Aktivierung immunkompetenter Zellen: Untersuchung im Proliferationsassay in 96-Well-Platten anhand verschiedener Stimuli und Messung des Aktivierungsgrades durch den proportionalen Einbau radioaktiver Isotope ( $^3$ [H]-Thy)
- Apoptosesensibilität durch FasL: Aktivierung reifer Lymphozyten in 6-Well-Platten zur Sensibilisierung gegenüber der anschließenden Apoptoseinduktion durch FasL

- Aktivierung Dendritischer Zellen: Durchflusszytometrische Messung der Expression aktivierungsspezifischer Oberflächenmarker nach Stimulierung in 12-Well-Platten

#### 2.2.4.1 *Thymidin Proliferationsassay*

Anhand eines Proliferationsassays können immunkompetente Zellen funktionell untersucht werden; das Ausmaß der Proliferation dieser Zellen entspricht deren Aktivierung. Zur Messung wird radioaktiv markiertes Thymidin appliziert, das in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Der Einbau ist ein quantitatives Maß der DNA-Syntheserate und damit der Zellteilungsrate direkt proportional.

In 96-Well-Platten wurden  $1 \cdot 10^5$  –  $3 \cdot 10^5$  Zellen je Well in dreifacher Konstellation in 100  $\mu$ l Click's RPMI Medium ausplattiert. Um Unterschiede der Zellanzahl sowie der Konzentration zu vermeiden, wurde das so genannte Mastermix-Verfahren angewandt. Dazu wurden zunächst die benötigte Zellzahl aller Wells einer Maus sowie das Gesamtvolumen eines stimulierenden Agens berechnet und gesondert hergestellt. Anschließend konnten Volumina mit definierter Zellzahl und Konzentration der stimulierenden Agenzien unter Zuhilfenahme von Multikanalpipetten ausplattiert werden. Anschließend wurden die gewünschten Stimuli in weiteren 100  $\mu$ l hinzugefügt. Die Inkubationsdauer (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit) betrug gewöhnlich 48 h, bei der heterologen, gemischten Leukozytenreaktion (MLR) 6 Tage.

Nach dem definiertem Inkubationszeitraum wurden 25  $\mu$ l einer Verdünnung des radioaktiv markierten Thymidin (<sup>3</sup>[H]-Thy, Amersham, U.K.) hinzupipettiert. Die Verdünnung bestand aus 45,5 ml Medium mit 0,5ml <sup>3</sup>[H]-Thy. Die applizierte Menge entsprach ca. 1  $\mu$ Ci. Die Platten wurden im Folgenden weitere 6 h bzw. 16 h (MLR) inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit) und dann bei –20°C tiefgefroren. Bei diesem Vorgang wird die Zellwand zerstört.

Zum Ernten der Zellen im Harvester (Mikro96 Harvester, Shatron Instruments, Norwegen) mussten die Platten 2 h im Brutschrank aufgetaut werden. Im Harvester wurde der Inhalt der 96-Well-Platte durch ein Glass-Fiber-Filterpapier aufgesaugt. Dabei blieben alle Proteine im Filter hängen einschliesslich der mit radioaktiven Thymidin markierten DNA.

Nach dem Trocken der Filter konnte die  $\beta$ -Strahlung des Thymidins im Micro-Betacounter (Matrix 9600, Packard, Niederlande) in counts per minute (cpm) gemessen werden.

### 2.2.4.1.1 Stimuli

Die folgende Tabelle führt die im Proliferationsassay verwendeten Stimuli auf, deren Konzentration und welche Zellen durch diese stimuliert werden.

<b>Stimulus</b>	<b>Konzentration</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>
Lipopolysaccharid (LPS)	1 µg/ml		X
Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin (CpG)	1 µM		X
Phorbol Myristinsäure (PMA)	2 ng/ml		
+ Ionomycin	0,2 µg/ml	X	X
Concanavalin A (ConA)	2 µg/ml	X	
Anti-CD3*	5 µg/ml	X	
Anti-CD3*	2 µg/ml	X	
+ Anti-CD28*	10 µg/ml		
Anti-IgM	5 µg/ml		X
Anti-IgM	5 µg/ml		X
Anti-CD40	1 µg/ml		

\* Zur Stimulierung in U-Bottom 96-Well-Platten durch anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28, die am Boden der Wells haften, mussten die Platten zuvor präpariert werden: die Platten wurden zunächst mit den Antikörpern 16 h bei 4°C inkubiert und direkt vor der Verwendung zweimal mit 100 µl PBS gewaschen, um noch gelöste, nicht haftende Reste der Antikörper zu entfernen.

### 2.2.4.1.2 Heterologe, gemischte Leukozytenreaktion

Die heterologe, gemischte Leukozytenreaktion (MLR) ermöglichte die Untersuchung der funktionellen Antigenpräsentation, indem Immunzellen zweier verschiedener Individuen interagieren: Native T-Lymphozyten des als „Responder“ dienenden Organismus erkennen über den T-Zellrezeptor (TCR) einen allelen Polymorphismus von fremden MHC-II-Molekülen der antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Stimulator-Organismus. Die Responder-T-Zellen werden dadurch aktiviert und zur Proliferation angeregt. Entsprechend verhält sich die Antigenpräsentation direkt proportional zur Proliferation. Die vorhergehende Bestrahlung der Stimulator-Zellen (20 – 25 Gray) unterband deren Proliferation, nicht jedoch die zu untersuchende Antigenpräsentation.

Die Stimulator-Zellen waren unsortierte Milzzellpopulationen der cFLIP<sub>S</sub>- und WT Mäuse (MHCII). Als Responder dienten durch MACS isolierte T-Zellen einer BALB/c-Maus (MHCI). Je Vertiefung wurden maximal  $4 \cdot 10^5$  Zellen von jeweils Responder- und Stimulator-

Zellen gelöst in Click's RPMI Medium zugegeben. Die Zellen wurden im Folgenden 6 Tage im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit). Für die letzten 16 Stunden wurde radioaktives Thymidin hinzugefügt.

#### 2.2.4.2 *Aktivierung und Apoptoseinduktion von Leukozyten und Thymozyten*

Abgesehen von den Thymozyten sind die Leukozyten *in vitro* relativ unsensibel gegenüber durch FasL induzierter Apoptose und wurden daher zunächst über einen Zeitraum von 48 h in 6-Well-Platten zu je  $2 \cdot 10^6$  Zellen stimuliert. Die unsortierten Milzzellen und isolierte T-Zellen wurden mit Concanavalin A (ConA) behandelt, isolierte B-Zellen mit Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin (CpG) (Konzentrationen siehe 2.2.4.1.1).

Die Induktion der Apoptose erfolgte in einer sechsstündigen Inkubation mit FasL bzw. mit Staurosporin (STS) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit). Dazu wurden in 96-Well-Platten zu  $3 \cdot 10^5$  Zellen je Well in 200 µl Click's RPMI Medium geben. Neben der Nullkontrolle wurde mit FasL in der Endkonzentration von 50 ng/ml, 200 ng/ml und 500 ng/ml, und als Kontrolle des intrinsisch induzierten Apoptose-Signalweges mit Staurosporin in der Konzentration von 1µM stimuliert.

Nach diesen 6 Stunden wurden die Zellen in FACS-Röhrchen gefüllt. Zur Darstellung der Vitalität der Zellen wurden 10 µl Propidiumjodid-Stammlösung (1,0 mg/ml) hinzugegeben oder im Falle der Thymozyten zuvor mit Annexin-V und Propidiumjodid gefärbt. Diese Färbungen werden ausführlich unter 2.2.5.1. beschrieben.

#### 2.2.4.3 *Aktivierung von Dendritischen Zellen*

Die aus Knochenmarkvorläuferzellen generierten DCs wurden gezählt und zu je  $2 \cdot 10^6$  Zellen je Well in eine 12-Well-Platte überführt. Als Stimuli wurden Lipopolysaccharid (LPS) (1 mg/ml), FasL (50 ng/ml) und JO2 (100 ng/ml) mit Alpha-Hamster (1 µg/ml) in 2 ml RPMI Medium eingesetzt. Nach 16 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit) wurde der Überstand der Wells in separate Eppendorfgefäße überführt. Um die durch Aktivierung adhären APCs von der Oberfläche zu lösen, wurde sogleich je Well 200 µl Accutase zugegeben und 20 min inkubiert. Die gelösten APCs konnten danach ebenfalls in die richtigen Eppendorfgefäße überführt werden. Die Eppendorfgefäße wurden zweimal zentrifugiert und mit RPMI Medium gewaschen. Im letzten Waschgang wurde der Niederschlag in 900 µl PBS/BSA (0,5% BSA) aufgenommen und je 200 µl in ein Well einer 96-V-

Bottom-Well-Platte überführt. Nach Zentrifugation wurden die Niederschläge in je 25 µl Fc-Block in PBS/BSA (1:50) aufgenommen und 20 min bei 4°C inkubiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung von Oberflächenmolekülen zur Identifikation in der Durchflusszytometrie durch Inkubation in je 25 µl fluoreszenzmarkierten Antikörpern (20 min, 4°C). Diese Färbungen werden ausführlich unter 2.2.5.1. beschrieben.

### 2.2.5 Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (FACS).

Diese Form der Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Erfassung einer Zellpopulation hinsichtlich ihrer Größe und Granularität sowie von intrazellulären Proteinen und Fluoreszenzfarbstoffen, die über Antikörper an Oberflächenantigene gebunden sind. Die Zellen werden während der Messung einzeln durch eine dünne Glaskapillare geleitet (hydrodynamische Fokussierung) und mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Die Anwesenheit einer Zelle im Strahlengang, die Streuung des Laserstrahls und das von den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht werden durch Photodetektoren gemessen. Die Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laser überführt diese auf ein höheres Energieniveau. Kehren die Elektronen von diesem erhöhten Energieniveau zu ihrem Ursprungsniveau zurück, wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper je Zelle. Die Vorwärtsstreuung ist ein Maß für die Größe der Zelle, während sich anhand der seitlichen Streuung die Granularität bestimmen lässt. Neben der Messung von markierten Oberflächenmolekülen erlaubt die Durchflusszytometrie auch die Detektion von zytosolischen Proteinen wie beispielsweise GFP (Grün fluoreszierendes Protein), die in den Zellen produziert werden.

In dieser Arbeit konnten die transgenen Mäuse durch Nachweis der Expression des Fusionsgens cFLIP<sub>S</sub> mit GFP von den Wildtyp-Mäusen der gleichen Generation abgegrenzt und typisiert werden. Sich überlappende Fluoreszenzen bei Messung mehrerer Farbstoffe konnten durch individuelle Einstellungen kompensiert werden, so dass mehrere Parameter einer Zellpopulation untersucht werden konnten.

Zur Analyse wurde das Durchflusszytometrie-Gerät FACS-Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Je Messung wurden mindestens  $1 \cdot 10^5$  Zellen untersucht und im Histogramm oder in Zweiparameterdarstellung visualisiert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) und FlowJo (V 8.2 für OSX) ausgewertet.

<b>Farbstoff</b>	<b>Wellenlänge</b>	<b>Fluoreszenz</b>
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	503 nm	FL-1 (grün)
Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	509 nm	FL-1 (grün)
Phycoerythin (PE)	578 nm	FL-2 (rot)
Propidiumjodid (PJ)	617 nm	FL-3 (dunkelrot)
Allophycocyanin (APC)	635 nm	FL-4 (dunkelrot)
Cyanin 5 (Cy5)	670 nm	FL-4 (dunkelrot)

### *2.2.5.1 Färbungen der Zellen mit Propidiumjodid und Annexin V*

Propidiumjodid (PJ) kann die defekten Membranen von sterbenden oder toten Zellen passieren und dort DNA binden. Die dunkelrote Fluoreszenz des PJ in der durchflusszytometrischen Messung ermöglicht die Differenzierung und quantitative Erfassung dieser toten Zellen in Abgrenzung von lebenden Zellen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur einfachen Lebend-Tot-Unterscheidung bei Lymphozyten verwendet. Kurz vor der Messung wurden dazu 10 µl PJ-Stammlösung (1,0 mg/ml) hinzugegeben.

Eine weitere Methode, die bei den Thymozyten verwendet wurde, ist die kombinierte Färbung mit Annexin-V und Propidiumjodid. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin. Phosphatidylserin wird in der lebenden Zelle unzugänglich an der Innenseite der Zellmembran exprimiert. In der frühen Phase der Apoptose wird es jedoch an der Membranaußenseite exponiert. Die gleichzeitige Färbung mit Annexin-V, FITC und Propidiumjodid dient der Unterscheidung zwischen frühapoptotischen (Annexin-V<sup>+</sup>, PJ<sup>-</sup>), spätapoptotischen (Annexin-V<sup>+</sup>, PJ<sup>+</sup>) und nekrotischen Zellen (Annexin-V<sup>-</sup>, PJ<sup>+</sup>). Der Niederschlag der Thymozyten wurde dazu zunächst zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und in 50 µl PBS/BSA (0,5% BSA) mit Annexin-V (1:20) und Propidiumjodid (1:200) aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei 4°C und Dunkelheit wurde kurz vor der durchflusszytometrischen Messung jeweils 200 µl Annexin-V-Bindepuffer hinzugegeben.

### *2.2.5.2 Zellfärbungen mit fluoreszierenden Antikörpern*

Die Färbungen wurden in 96-V-Well-Platten zu  $3 \cdot 10^5$  Zellen je Well durchgeführt. Die fluoreszierenden Antikörper wurden in definierter Konzentration in PBS/BSA (0,5% BSA) gelöst (siehe unten). Nach der Sedimentation wurden die Niederschläge in dieser Lösung aufgenommen und 20 min bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS/BSA (0,5% BSA) entfernt. Darauf folgte entweder die direkte Analyse in der Durchflusszytometrie oder aber die Aufnahme in 4% Paraformaldehyd

zur Fixierung der gefärbten Zellen. Die Fixierlösung blieb 20 min (im Dunkeln und bei RT) im Ansatz und wurde dann zur Lagerung der Zellen durch PBS/BSA (0,5% BSA) ersetzt.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verwendung</b>
CD11b-PE	1:200	Makrophagen, Oberflächenmarker
CD11c-APC	1:200	DCs, Oberflächenmarker
CD40-PE	1:200	DCs, Aktivierungsmarker
CD80-PE	1:200	DCs, Aktivierungsmarker
CD86-PE	1:200	DCs, Aktivierungsmarker
CD3-Cy5	1:200	T-Zellen, T-Zellrezeptor
CD3-APC	1:200	T-Zellen, T-Zellrezeptor
B220-FITC	1:200	B-Zellen
NK1.1-FITC	1:200	Natürliche Killerzellen
Gr1.1-FITC	1:200	Granulozyten

### 2.2.6 Kolonie-Formations-Assay (CFUc)

Das Kolonie-Formations-Assay (engl.: Colony-Forming-Unit-Culture-Assay; CFUc) dient der Kultivierung von hämatopoetischen Zellen *in vitro*. Dabei lässt sich unter anderem das Differenzierungsverhalten verschiedener Zellreihen untersuchen.

Ein CFUc für eine Maus besteht aus drei kleinen Schalen, die während der 10-tägigen Inkubationsphase in einer großen Petrischale gelagert wurden. In zwei Schalen wurden zur Doppelbestimmung jeweils  $2,5 \cdot 10^4$  Knochenmarksvorläuferzellen zur Ausdifferenzierung angesetzt. Hierfür wurden zu 2,5 ml aufgetautem Medium aliquots  $6,25 \cdot 10^4$  Knochenmarksvorläuferzellen hinzugefügt, anschließend je 1 ml in eine kleine Petrischale überführt und der Rest verworfen. Die dritte Schale enthielt destilliertes Wasser zur Befeuchtung der Kulturen.

Nach der 10-tägigen Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit) wurden die Kolonien unter dem Lichtmikroskop gezählt. Zellansammlungen von mehr als 30 Zellen wurden als Kolonie gewertet. Geringere Zellzahlen, so genannte Cluster, wurden dagegen bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

## 2.2.7 Datenauswertung und -darstellung

Neben der einfachen Darstellung der Daten dieser Arbeit im Ergebnisteil sind ferner Diagramme mit prozessierten Daten abgebildet. Die Prozessierung der Rohdaten diente dem Ausgleich experimenteller Schwankungen, die durch unterschiedliche Bedingungen der einzelnen Experimente entstanden. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass jedes einzelne Experiment mit der gleichen Gewichtung in die Statistik einbezogen wurde. Im Folgenden wird die jeweils angewandte Methodik beschrieben.

### 2.2.7.1 Apoptose

Die Daten der Apoptose-Experimente, dargestellt unter 3.2, wurden auf folgende Weise prozessiert: Die durchflusszytometrisch bestimmten lebenden Zellen einer mit einem bestimmten Apoptose-Stimulus behandelten Probe (P), geteilt durch die lebenden Zellen der Negativ-Kontrolle derselben Maus (negK), ergab den prozessierten Wert dieser Probe ( $P_{\sim}$ ). Dadurch wurde der Wert um die Zellen bereinigt, die bereits ohne Stimulus gestorben waren.

$$P_{\sim} = \left( \frac{P}{negK} \right)$$

Beispiel: *Im Fall der Negativ-Kontrolle sind 90% der Zellen lebendig. Eine Probe derselben Maus, die mit 50ng FasL behandelt wurde, ergibt noch 40% lebendige Zellen. Der prozessierte Wert ist dann:  $P_{\sim} = 0,4 / 0,9 = 0,445$ .*

### 2.2.7.2 Leukozyten und Leukozyten-Subpopulationen in der Milz

Die Prozessierung der Daten der Zellzahl der Milzzellen und der Leukozyten-Subpopulationen, dargestellt unter 3.3, erfolgte auf folgende Weise: Da davon ausgegangen werden konnte, dass die Färbungen innerhalb eines Experiments annähernd identischen Bedingungen unterlagen, wurden die Daten einer Probe jeweils in Relation zur korrespondierenden Probe des WT gesetzt. Die durchflusszytometrisch bestimmte Zellzahl einer Probe (P), geteilt durch den Mittelwert der am selben Experiment teilnehmenden WT Mäuse ( $M_{WT}$ ), ergab den prozessierten Wert dieser Probe ( $P_{\sim}$ ). Dieser Wert stand daher in direkter Relation zum Referenzwert des entsprechenden Experiments.

$$P_{\sim} = \frac{P}{M_{WT}}$$

Beispiel: Die DC-Zellpopulation zweier WT Mäuse sind  $P_{WT1} = 2,1\%$  bzw.  $P_{WT2} = 2,4\%$ , die einer *cFLIP<sub>S</sub>*-transgenen Maus  $P_{FLIP} = 4\%$ . Der Mittelwert der Referenz ist damit  $M_{WT} = (0,021 + 0,024) / 2 = 0,0225$ . Die prozessierten Werte sind  $P_{\sim WT1} = (0,021 / 0,0225) = 0,933$ ;  $P_{\sim WT2} = 1,066$ ;  $P_{\sim cFLIPs} = 1,777$ .

Eine weitere Abbildung berücksichtigt ferner die Gesamtzahl der Milzzellen der gleichen Versuchsreihe. Dadurch sollte die absolute Anzahl einer Subpopulation abgeschätzt werden. Dieser Wert ( $P_{\text{absolut.}}$ ) ist das Produkt aus der jeweiligen Probe (P) und dem Mittelwert der Gesamtzellzahlen der korrespondierenden Mausgruppe ( $M_E$ ). Ferner sollten dabei altersspezifische Effekte berücksichtigt werden. Die Menge der untersuchten Mäuse ermöglichte die Einteilung anhand des Alters in zwei Gruppen: Mäuse älter und jünger als 200 Tage.

$$P_{\text{absolut.}} = P * M_E$$

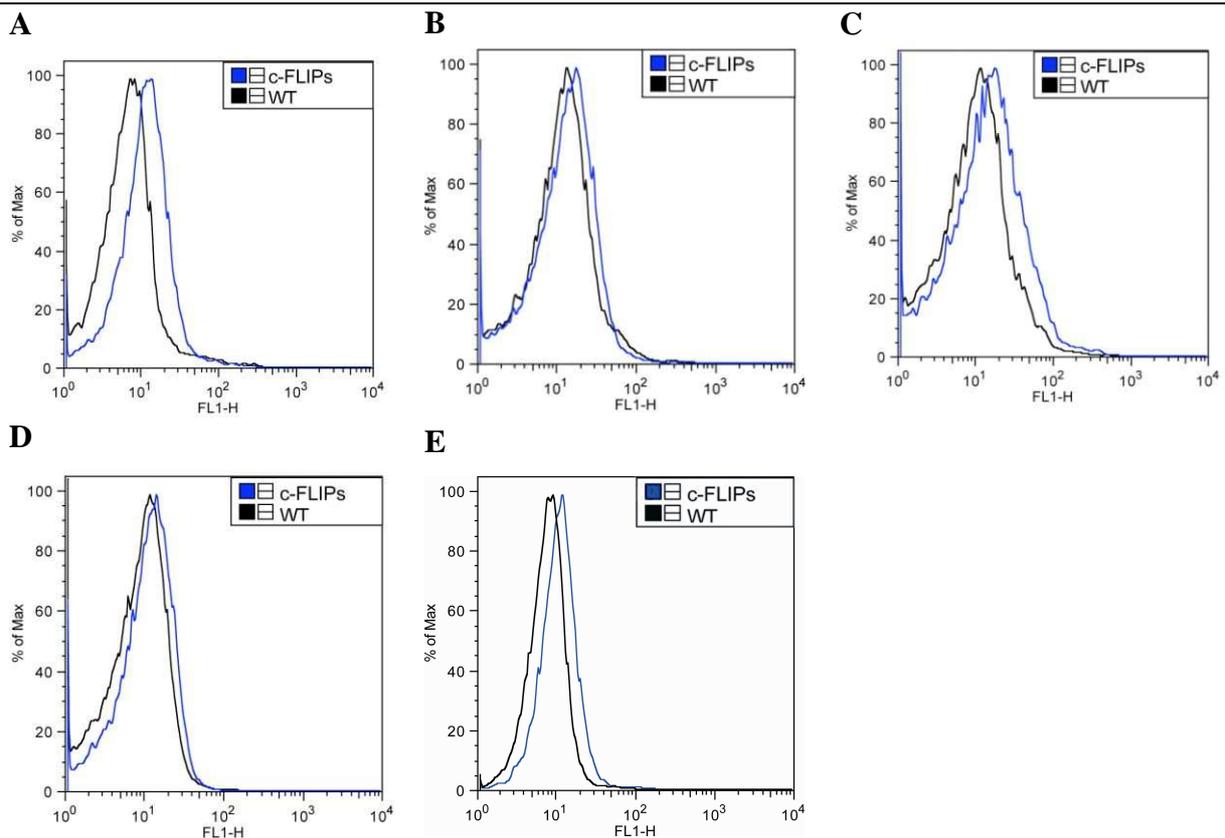
Beispiel (verwendet Werte aus vorhergehendem Beispiel): Angenommen alle Mäuse sind älter 200 Tage. Die Gesamtzellzahl der Milzzellen aller WT Mäuse > 200 Tage wäre im Durchschnitt  $110 * 10^6$  Zellen, die der *cFLIP<sub>S</sub>*-Mäuse > 200 Tage  $85 * 10^6$ . Die abgeschätzten absoluten Werte sind  $P_{\text{absolutWT1}} = (0,021 * 110 * 10^6) = 2,31 * 10^6$ ;  $P_{\text{absolutWT2}} = 2,64 * 10^6$ ;  $P_{\text{absolutcFLIPs}} = (0,04 * 85 * 10^6) = 3,4 * 10^6$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis des Transgens cFLIP<sub>S</sub>-GFP

Nach Transfer wurde das Transgen cFLIP<sub>S</sub>-GFP zunächst mittels radioaktiver DNA-Sonde im Southern Blot nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

Das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) absorbiert Blau und UV (470 bzw. 395 nm) und emittiert grünes Licht (509 nm), das anhand der Durchflusszytometrie im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) nachgewiesen werden konnte. Die Zellen der transgenen Mäuse, die das Fusionsgen cFLIP<sub>S</sub>-GFP unter Kontrolle des *vav*-Promotors exprimierten, zeigten dementsprechend eine Rechtsverschiebung im FL-1 Histogramm im Vergleich zum Wildtyp (WT) in allen Zellen der Hämatopoese. Dieses Verfahren wurde zur Typisierung der Mäuse und zur Kontrolle von Zellsuspensionen während eines Experiments angewandt. Abbildung 3 zeigt die Rechtsverschiebung im FL-1 Histogramm der durchflusszytometrisch analysierten Zellsuspensionen der primär- und sekundär-lymphatischen Organe.



**Abb. 3: Rechtsverschiebung im FL-1 Histogramm durch das Transgen cFLIP<sub>S</sub>-GFP**

Die Abbildungen zeigen die Rechtsverschiebung im FL-1 Histogramm, die in Zellen cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse durch das intrazelluläre Produkt des Transgens cFLIP<sub>S</sub>-GFP verursacht wurde. **A:** Milz; **B:** Lymphknoten; **C:** Knochenmark; **D:** Thymus; **E:** Blut

### **3.2 CFLIP<sub>S</sub> inhibiert die FasL/CD95-vermittelte Apoptose in Zellen der transgenen Maus**

CFLIP<sub>S</sub> ist ein ausschließlicher Inhibitor der Prozessierung von Pro-Caspase-8 an dem DISC und blockiert die durch FasL induzierte, CD95-vermittelte Apoptose. Zur Untersuchung dieses inhibitorischen Effekts wurden aktivierte Milzzellen und aktivierte, isolierte B- und T-Lymphozyten sowie Thymozyten über einen Zeitraum von durchschnittlich sechs Stunden entweder nicht, oder durch FasL bzw. durch Staurosporin (STS) stimuliert. STS ist ein globaler Proteinkinase-Inhibitor und induziert die mitochondrien-vermittelte, intrinsische Apoptose, die durch cFLIP<sub>S</sub> nicht direkt beeinflusst wird. Die Konzentrationen von FasL waren 50 ng, 200 ng und 500 ng, von STS 1 µM.

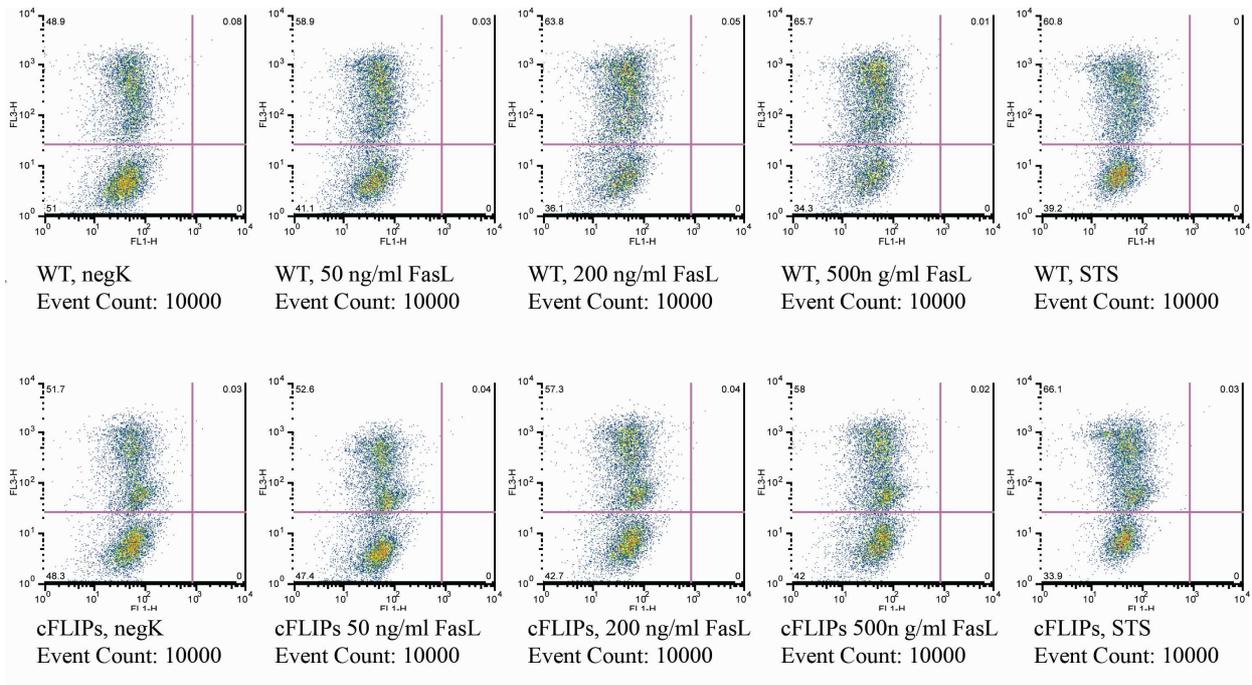
Zur Darstellung der toten Zellen wurden nach Ablauf der sechs Stunden die Zellsuspensionen mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Emissionswellenlänge von PJ beträgt 617 nm und kann in FL-3 dargestellt werden. Abbildung 4 zeigt beispielhaft die abgrenzende Darstellung überlebender Zellen gegenüber toter, Propidiumjodid-positiver Zellen.

In den Experimenten mit Milzzellen, Thymozyten und isolierten B- und T-Zellen konnte der inhibitorische Effekt von cFLIP<sub>S</sub> auf die CD95-vermittelte Apoptose nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass in diesen Zellen das Transgen cFLIP<sub>S</sub>-GFP in kontinuierlich funktionell messbaren Spiegeln exprimiert wurde.

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen Zusammenfassungen der Daten von mehreren Experimenten mit mindestens je drei cFLIP<sub>S</sub>-transgenen und drei WT Mäusen.

Neben der einfachen Darstellung der Daten sind ferner Diagramme mit prozessierten Daten abgebildet (siehe 2.2.7). Dadurch konnte besser gewährleistet werden, dass jedes einzelne Experiment zum Ausgleich experimenteller Schwankungen mit der gleichen Gewichtung in die Statistik einbezogen wurde.

Die Diagramme im Folgenden zeigen Mittelwerte und den Standardschätzfehler (SEM) von *n* Mäusen mehrerer Experimente.



**Abb. 4: Beispiel einer Durchflusszytometrische Analyse nach Induktion der Apoptose anhand der Propidiumjodid-Färbung.**

*WT: Wildtyp; NegK.: Negativ Kontrolle; FasL: Fas-Ligand; STS: Staurosporin; PJ: Propidiumjodid.*

*Dargestellt sind beispielhaft B-Zellen einer WT und einer cFLIPs-transgenen Maus nach Apoptoseinduktion des extrinsischen CD95-vermittelten Signalweges durch 6 h Inkubation mit FasL und zur Kontrolle des intrinsischen Signalweges mit STS (1  $\mu$ M). Anschließend Färbung mit PJ und durchflusszytometrische-Analyse. PJ wird auf der Y-Achse dargestellt. PJ-negative, lebende Zellen sind im linken unteren Quadranten abgebildet, PJ-positive, gestorbene Zellen im linken oberen Quadranten. Die B-Zellen der cFLIPs-transgenen Maus waren gegenüber der FasL-induzierten Apoptose besser geschützt, waren jedoch gegenüber der STS-induzierten Apoptose sensibilisiert.*

### 3.2.1 Lymphozyten

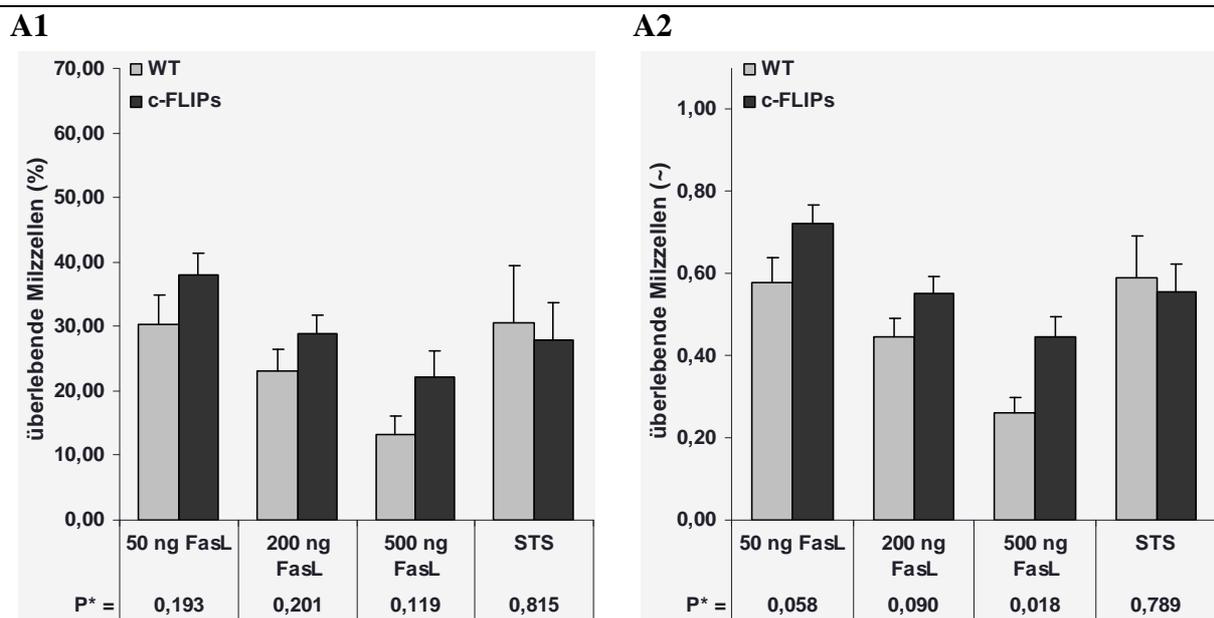
Nicht aktivierte Lymphozyten exprimieren geringe Mengen CD95 auf ihrer Oberfläche und sind daher *in vitro* relativ unempfindlich gegenüber FasL-induzierter Apoptose. Nach Aktivierung wird CD95 vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert, so dass die Lymphozyten sensibel gegenüber FasL-induzierter Apoptose werden (Trauth et al., 1989).

Zur Erhöhung der Sensibilität gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose wurden die Lymphozyten daher über den Zeitraum von drei Tagen durch Concanavalin A (ConA) oder Phorbol Myristinsäure + Ionomycin (P/I) aktiviert. Anschließend erfolgte durch sechsstündige Inkubation mit FasL bzw. STS die Induktion der Apoptose.

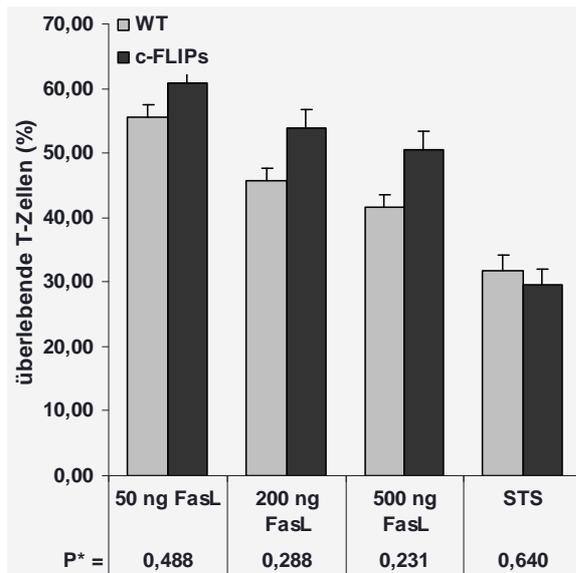
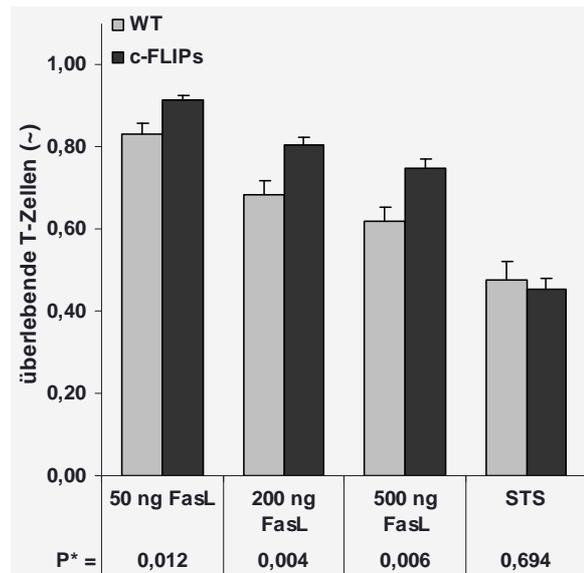
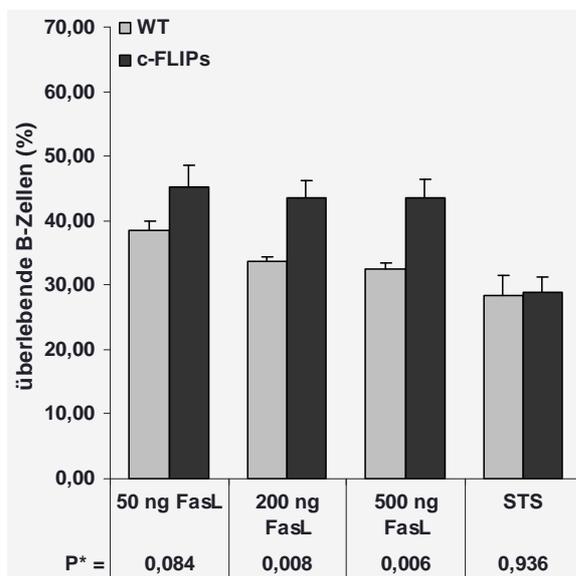
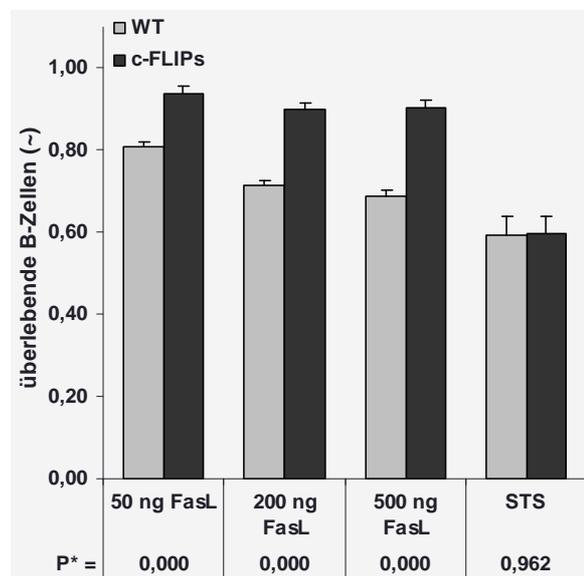
Abbildung 5A zeigt, dass das Überleben der Milzzellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus im Vergleich zum WT unter Stimulation mit FasL verbessert war, während unter dem Einfluss von STS kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Ferner wurden untersucht, ob gereinigte T-Zellen und B-Zellen jeweils gegen Apoptose geschützt waren oder ob dieser Schutz auf eine Subpopulation begrenzt war. Hierfür wurden die Zellen zunächst durch MACS-Sorting isoliert. Anschließend erfolgte die dreitägige Stimulation der T-Zellen mit ConA oder P/I, im Fall der B-Zellen mit CpG.

Die Abbildungen 5B und 5C zeigen, dass die gereinigten Subpopulationen an T-Zellen und B-Zellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus unter Stimulation mit FasL besser überlebten als die der WT Vergleichsgruppe. Besonders deutlich waren B-Zellen geschützt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression von cFLIP<sub>S</sub> in B-Zellen erhöht war. Im Fall der T-Zellen wurde ein Versuch ausgeschlossen, der zwar die gleichen Ergebnisse zeigte, bei dem jedoch durch eine längere Expositionsdauer insgesamt deutlich mehr Zellen gestorben waren. Die Kontrollen der STS-Stimulation wiesen keine Unterschiede auf.



Fortsetzung Abb.5 auf Seite 46

**B1****B2****C1****C2**

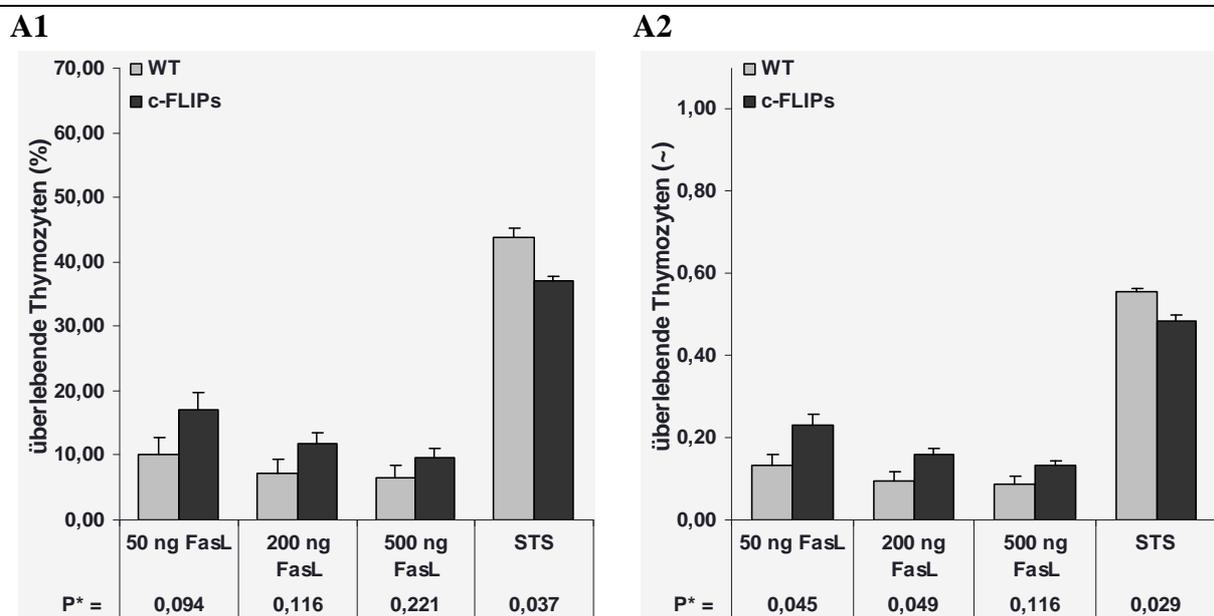
**Abb. 5: Schutz gegenüber FasL-induzierter Apoptose in Lymphozyten durch cFLIP<sub>S</sub>**

*FasL: Fas-Ligand; STS: Staurosporin; P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch); 1 (%) = ursprüngliche Daten; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit negativer Kontrolle als Referenzwert*

*Überlebende Zellen nach Apoptoseinduktion des extrinsischen CD95-vermittelten Signalweges durch 6 h Inkubation mit FasL und zur Kontrolle des intrinsischen Signalweges mit STS (1  $\mu$ M). Anschließende Färbung mit Propidiumjodid und durchflusszytometrische-Analyse. A: Milzzellen (n = 23), zuvor 3 d stimuliert durch P/I oder ConA. B: Gereinigte T-Zellen (n = 15), zuvor 3 d durch P/I oder ConA stimuliert. C: Gereinigte B-Zellen (n = 12), zuvor 3 d durch Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin (CpG).*

### 3.2.2 Thymozyten

Thymozyten exponieren CD95 in hohem Ausmaß auf ihrer Membranaußenoberfläche und sind im Gegensatz zu nicht aktivierten Lymphozyten sehr empfindlich gegenüber FasL-induzierter Apoptose. Direkt nach Isolierung aus dem Thymus wurden die Thymozyten über den Zeitraum von ca. sechs Stunden durch FasL oder STS stimuliert. Abbildung 6 zeigt, dass nach diesem Zeitraum bereits viele Thymozyten gestorben waren, die Thymozyten der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus jedoch in leicht geringerer Anzahl als die der WT Maus. Ein Versuch wurde ausgeschlossen, der zwar die gleichen Ergebnisse zeigte, bei dem jedoch insgesamt wesentlich weniger Zellen gestorben waren im Vergleich zu den anderen Versuchen. Die Kontrolle mit STS wies keine Unterschiede auf.



**Abb. 6: Schutz gegenüber FasL-induzierter Apoptose in Thymozyten durch cFLIP<sub>S</sub>**

*FasL: Fas-Ligand; STS: Staurosporin; P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch); 1 (%) = ursprüngliche Daten; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit jeweiliger negativer Kontrolle als Referenzwert*

*A: Thymozyten (n = 10), überlebende Zellen nach 6 h Inkubation mit FasL und STS (1 μM). Die Inkubation erfolgte ohne vorhergehende Aktivierung direkt nach Isolierung aus dem Thymus. Anschließende Färbung durch Propidiumjodid und durchflusszytometrische Analyse.*

### **3.3 Verteilung von Leukozyten und von Leukozyten-Subpopulationen in der Milz der cFLIP<sub>S</sub>-Maus**

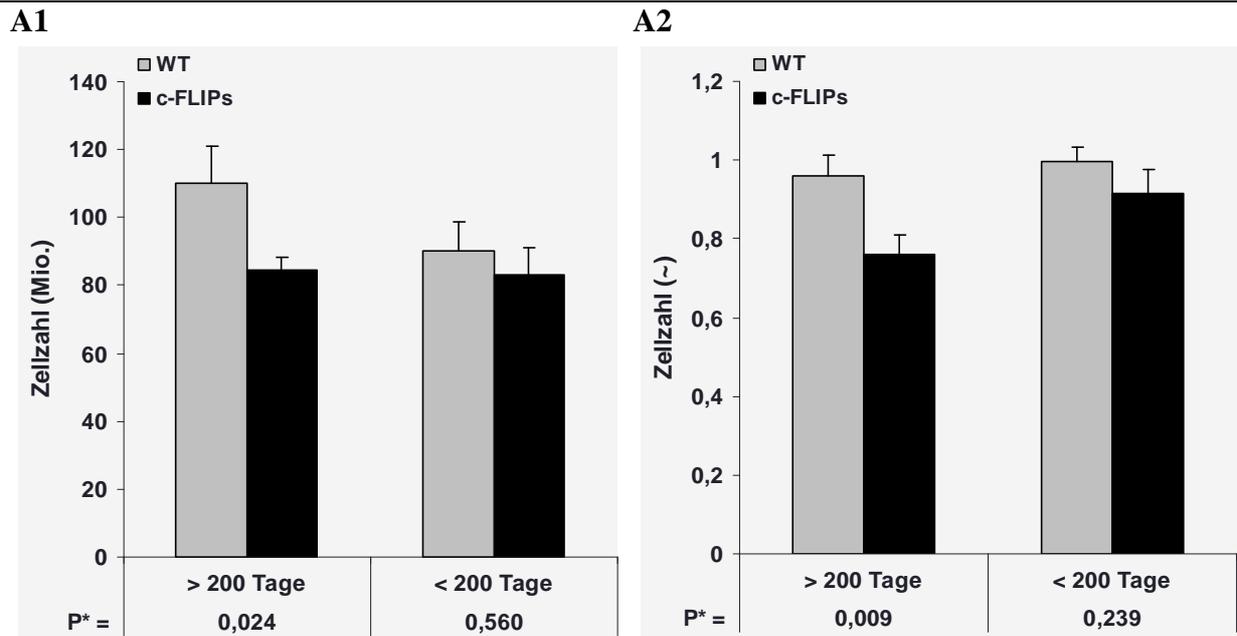
Die Bestimmung der Zellzahlen und der Vergleich mit der WT Maus ermöglichen erste Eindrücke der physiologischen Konsequenzen einer erhöhten cFLIP<sub>S</sub>-Produktion *in vivo*. Zu Anfang dieser Arbeit waren zahlreiche ältere Mäuse vorhanden. Dies erlaubte die Auswirkungen der cFLIP<sub>S</sub>-Produktion auch im fortgeschrittenen Lebensverlauf zu untersuchen. Tatsächlich konnten Unterschiede beobachtet werden, so dass im Folgenden die Gruppe von Mäusen älter als 200 Tage von einer Gruppe jünger als 200 Tage unterschieden werden.

Zunächst wurde die Gesamtzellzahl der Milz in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Leukozyten-Subpopulationen durch Anfärbung von spezifischen Oberflächenmarkern anhand der Durchflusszytometrie charakterisiert.

Wie bereits im Apoptose-Experiment werden neben den ursprünglichen Daten Abbildungen von prozessierten Daten dargestellt (siehe 2.2.7). Eine weitere Abbildung berücksichtigt die im gleichen Versuch bestimmte Gesamtzahl der Milzzellen und setzt die jeweilige Probe dazu in Beziehung. Dadurch konnte der Effekt der verringerten Gesamtzellzahl in Milzen von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen miteinbezogen werden.

#### **3.3.1 Die Leukozyten-Gesamtzellzahl war in der Milz von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen erniedrigt**

Nachdem die Milzen in Suspension gebracht und die Erythrozytolyse durchgeführt worden war, wurde in der Neubauer-Zählkammer die Leukozyten-Gesamtzellzahl bestimmt. Abbildung 7 zeigt, dass die Leukozyten-Gesamtzellzahl in den Milzen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse reduziert war. Insbesondere Mäuse mit dem Alter größer als 200 Tage waren durch eine deutliche Reduktion der Lymphozyten charakterisiert.



**Abb. 7: cFLIP<sub>S</sub> verringert in der Milz die Gesamtzellzahl der Leukozyten**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 (Mio.) = ursprüngliche Daten; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit jeweiligem Wert des Wildtyps eines Experiments als Referenz*

*Zellzahlbestimmung der Leukozyten nach Isolierung aus der Milz und nach Erythrozytolyse. Mäuse älter 200 Tage (n = 20) und älter 200 Tage (n = 43).*

### 3.3.2 Die Lymphozyten-Zellzahl war in der Milz älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse erniedrigt

Folgende Oberflächenmarker wurden durch Antikörper zur Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert:

- 1) CD3-Cy5: T-Zellrezeptor
- 2) B220-FITC: B-Zellrezeptor
- 3) Gr.1: Granulozyten

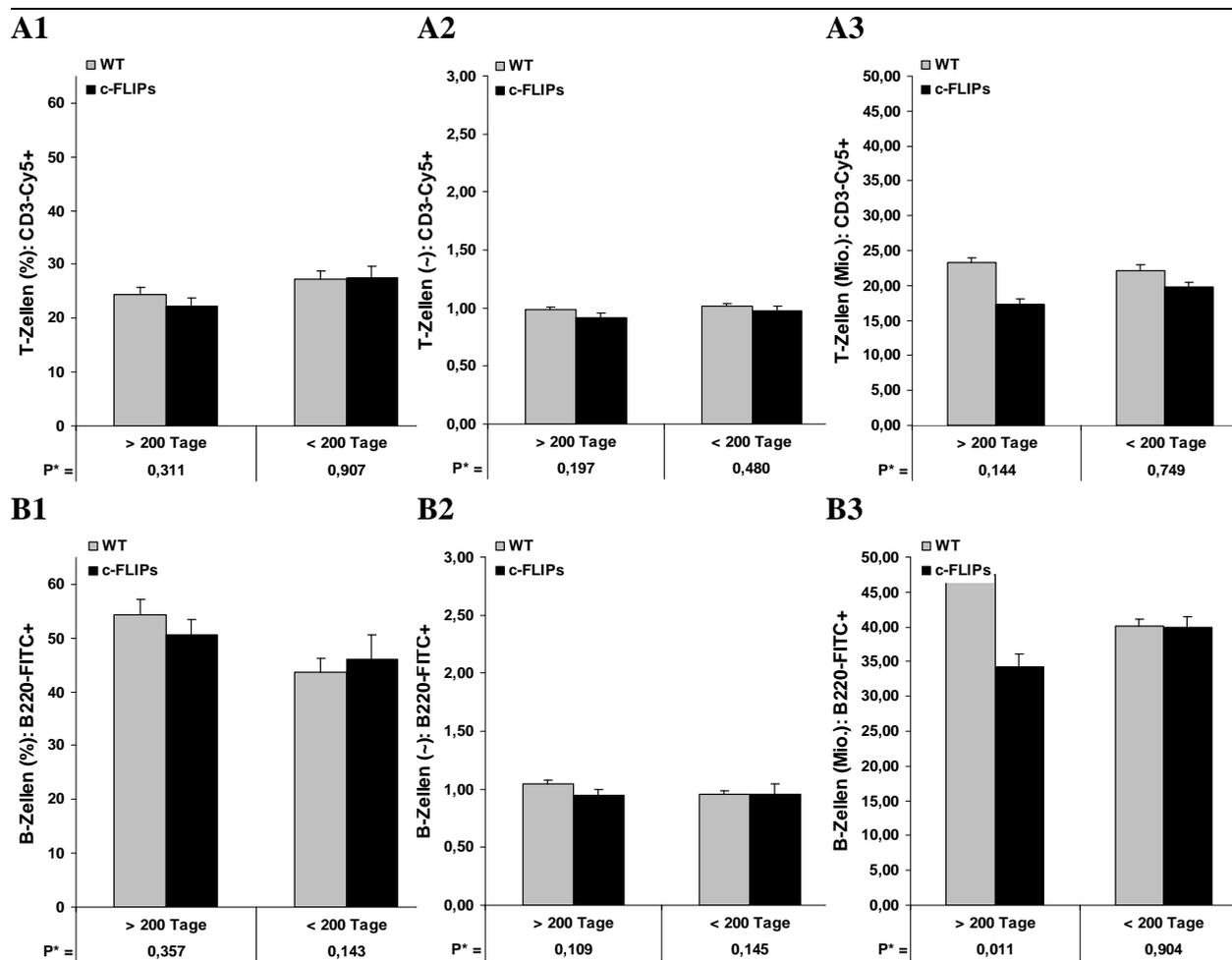
Abbildung 8 zeigt die statistische Auswertung der ursprünglichen Daten (1), deren prozessierte Daten (2) sowie die absoluten Zahlen (3). Die Methodik ist unter 3.3 beschrieben.

Die T-Zellzahl (A) der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse entspricht ungefähr der der WT Mäuse. Auch im B-Zell-Segment (B) sind keine erheblichen Unterschiede erkennbar. Die Gesamtzahl der Populationen in der Milz zeigt, dass der Phänotyp bei jungen Mäusen jeweils nahezu

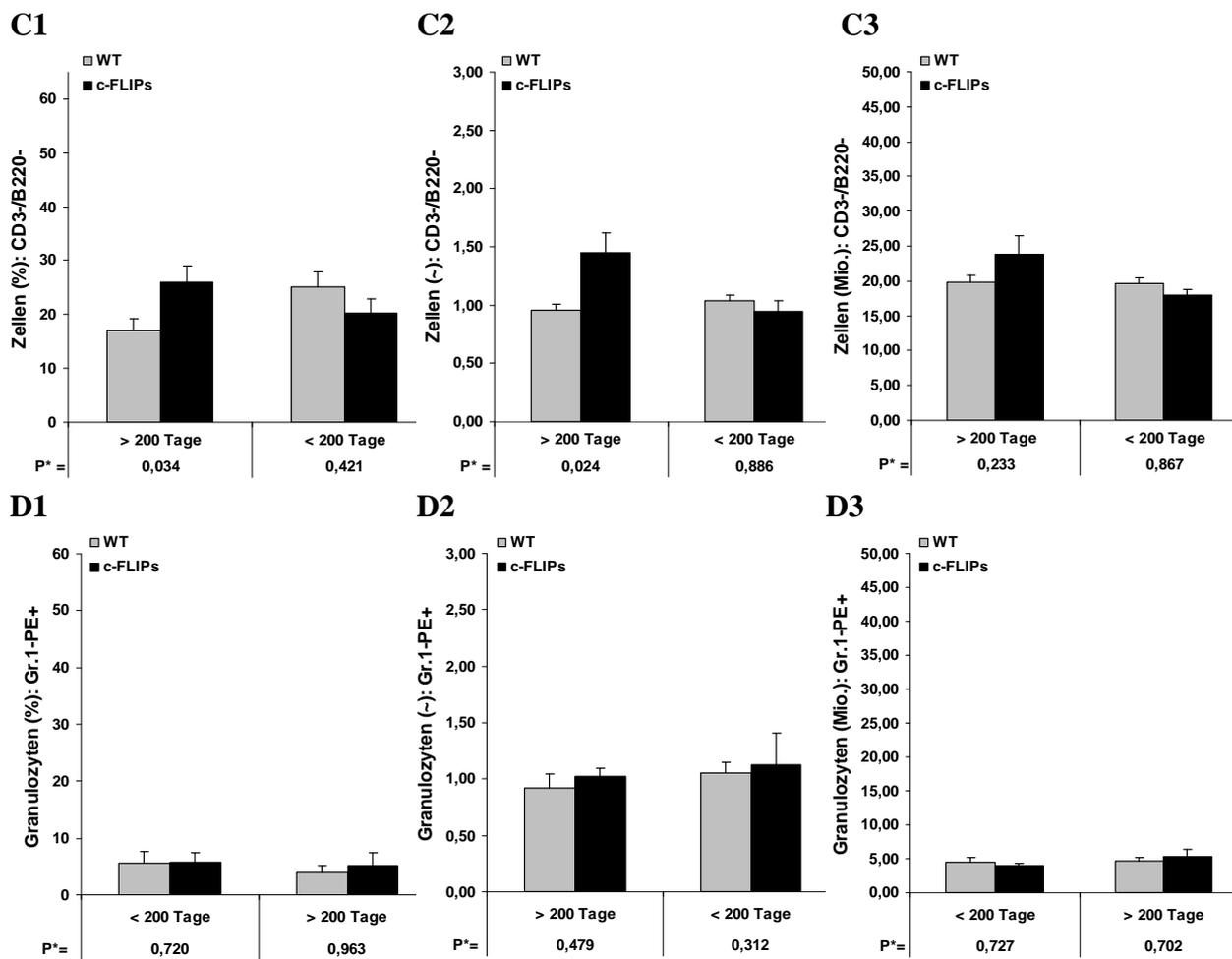
identisch ist, dass jedoch mit zunehmendem Alter sowohl T- als auch B-Zellen von der absoluten Reduktion der Gesamtzellzahl betroffen sind.

Auffällig hingegen ist, dass bei den Färbungen CD3-Cy5 gegen B220-FITC in den Milzen von Mäusen älter als 200 Tage eine Population (C) auftritt, die keine der beiden Oberflächenmarker exprimiert. Interessanterweise zeigt die Absolutzahl, dass diese doppelt-negative Population in älteren Mäusen nicht von der absoluten Reduktion der Gesamtzellzahl betroffen, sondern tendenziell vergrößert ist.

Die Anzahl der Granulozyten (D) war bei den cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen in der Jugend und im Alter nahezu unverändert.



Fortsetzung Abb.8  
auf Seite 51



**Abb. 8: T- und B-Zell-Zahl sind bei älteren cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen verringert**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 (%) = prozentualer Anteil der Antikörper-positiven Zellen; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; 3 (Mio.) = absolute Zellzahl in Millionen unter Berücksichtigung der jeweiligen Milzgesamtzellzahl der Alters-Referenzgruppe;*

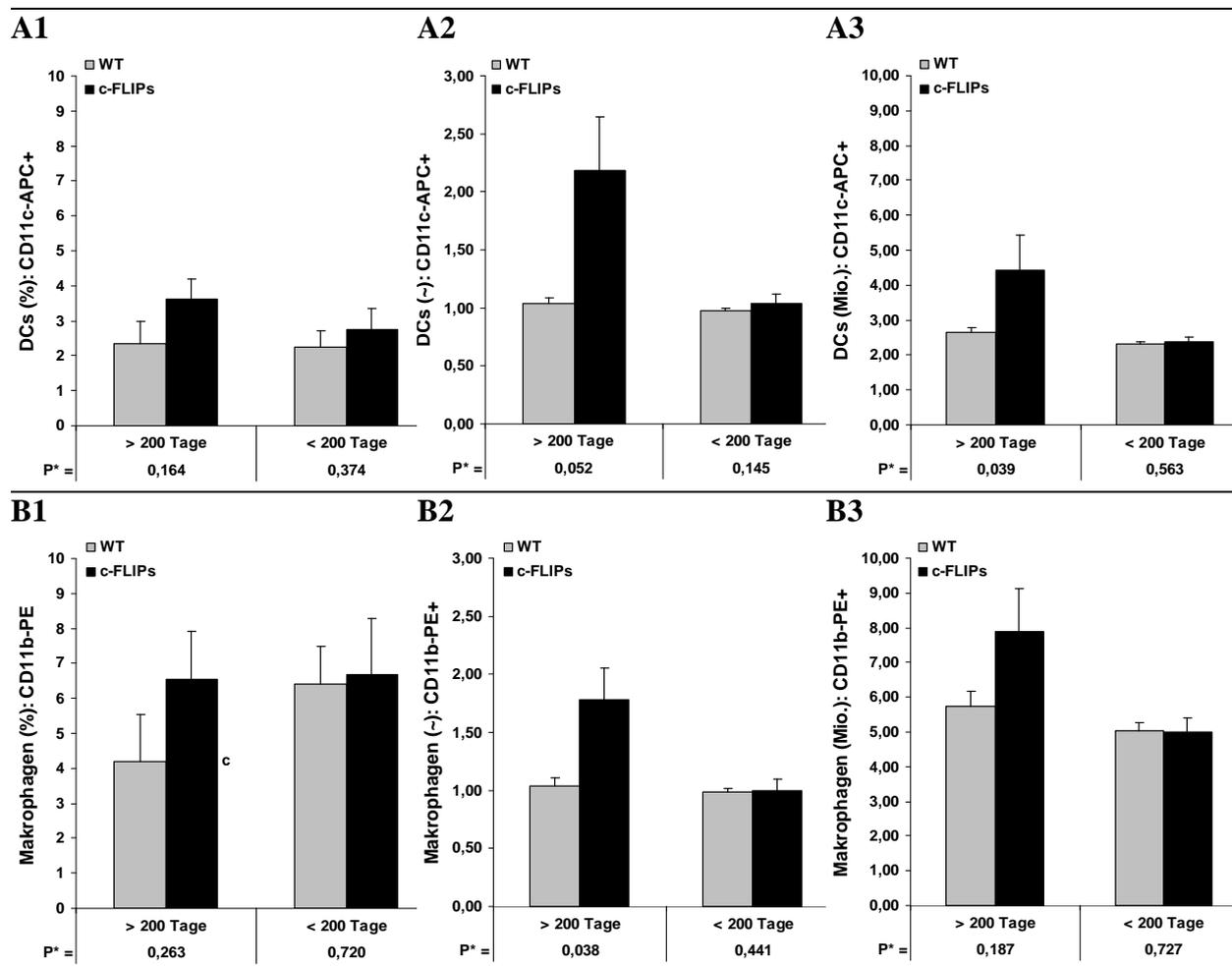
*Milzzellen wurden gleichzeitig mit den Antikörpern CD3-Cy5 und B220-FITC oder mit Gr.1-PE gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von Mäusen älter (n = 27) oder jünger (n = 25) als 200 Tage. A: CD3-Cy5-positive T-Zellen; B: B220-FITC-positive B-Zellen; C: CD3/B220-doppeltnegative Zellen; D: Gr.1-positive Granulozyten*

### 3.3.3 Die Anzahl myeloischer Zellen in der Milz älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse war vergrößert

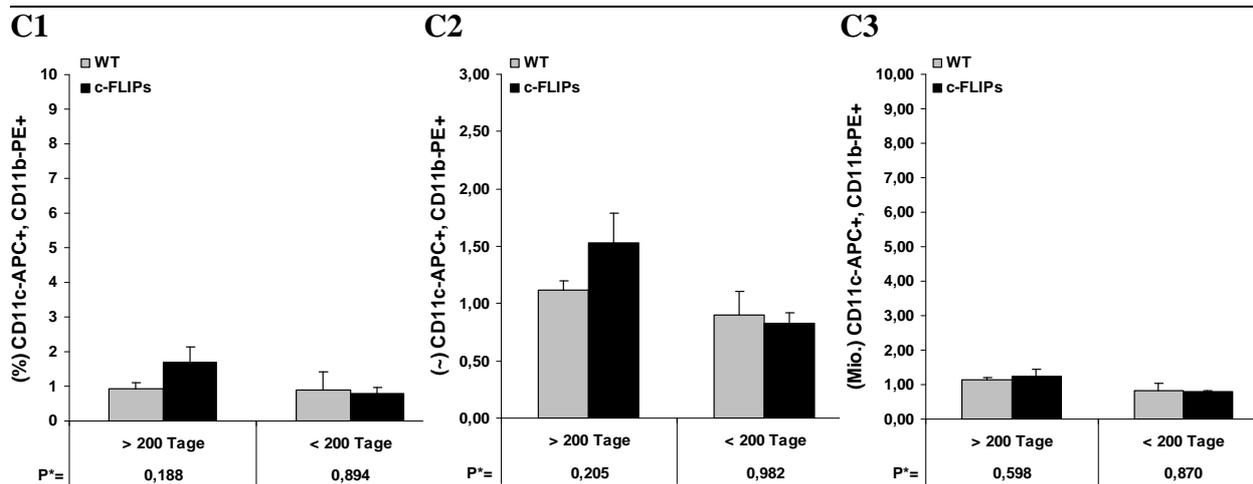
Unter 3.3.2. wurde eine CD3/B220-doppeltnegative Population beschrieben, die insbesondere in der Milz von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen, die älter als 200 Tage waren, vergrößert war. Möglicherweise war diese Veränderung auf eine Akkumulation von antigen-präsentierenden Zellen (APC) zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden Färbungen mit Antikörpern mit

CD11c-APC (Dendritische Zellen) und CD11b-PE (Makrophagen) durchgeführt, um die APC-Subpopulationen zu identifizieren und zu quantifizieren.

Abbildung 9 zeigt einerseits, dass die Verhältnisse bei jungen Mäusen, die eine kaum vergrößerte CD3-/B220-Population aufwiesen, zwischen WT und cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen ähnlich waren. Der prozentuale Anteil sowie die absolute Zellzahl der Dendritischen Zellen (A) als auch Makrophagen (B) in der Milz der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse entsprachen denen der WT Mäuse. Andererseits waren in Mäusen älter als 200 Tage die APC-Populationen korrespondierend mit der CD3-/B220-Population vergrößert. Interessanterweise wird dieser beobachtete Effekt nicht durch die verringerte Gesamtzellzahl relativiert. DCs und Makrophagen akkumulieren demnach in den Milzen älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse.



Fortsetzung Abb.9  
auf Seite 53



**Abb. 9: Akkumulierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen in der Milzen der in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage.**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 (%) = prozentualer Anteil der Antikörperpositiven Zellen; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; 3 (Mio.) = absolute Zellzahl in Millionen unter Berücksichtigung der jeweiligen Milzgesamtzellzahl der Alters-Referenzgruppe; DCs = Dendritische Zellen; P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch)*

*Milzzellen wurden gleichzeitig oder einzeln mit den Antikörpern CD11c-APC und CD11b-PE gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von Mäusen älter (n = 27) oder jünger (n = 25) 200 Tage. A: CD11c-Cy5-positive DCs; B: CD11b-PE-positive Makrophagen; C: CD11c-APC/CD11b-PE-positive mononukleäre Zellen*

### 3.4 Aktivierung von Lymphozyten

*In vivo* werden nicht aktivierte Lymphozyten durch direkten Antigenkontakt, durch die APC-Antigenpräsentation und eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert. Die Aktivierung bewirkt die Proliferation der Lymphozyten. *In vitro* können anhand des so genannten Proliferationsassays diese Aktivierungsprozesse durch die Inkubation mit antigenen oder mitogenen Stimuli und Zytokinen hervorgerufen und untersucht werden.

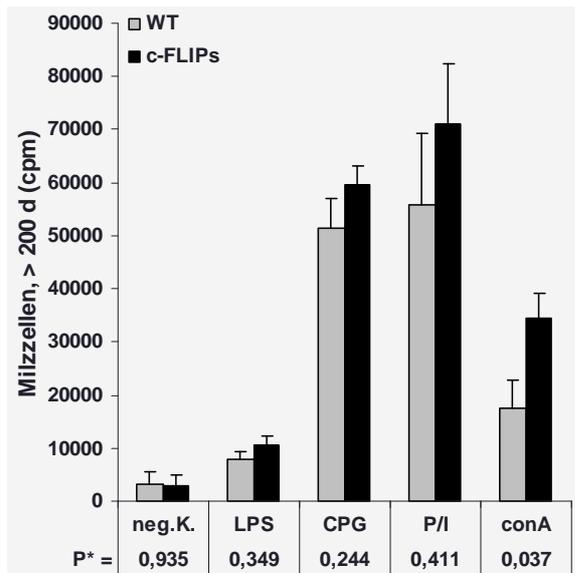
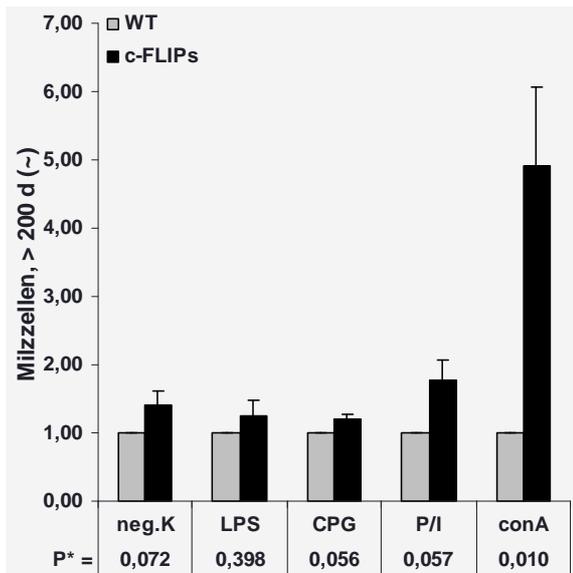
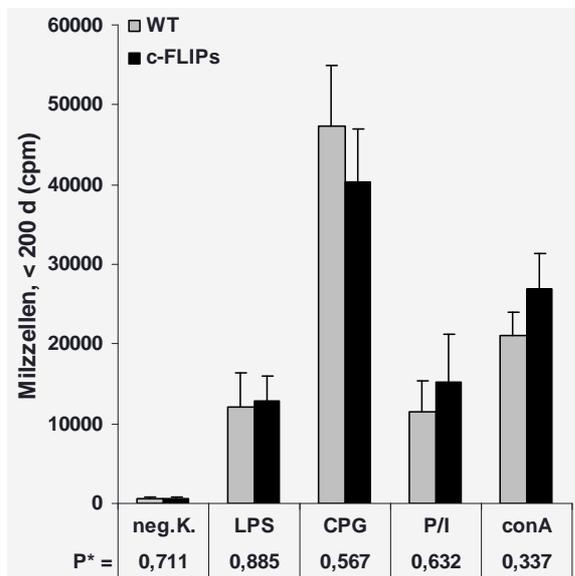
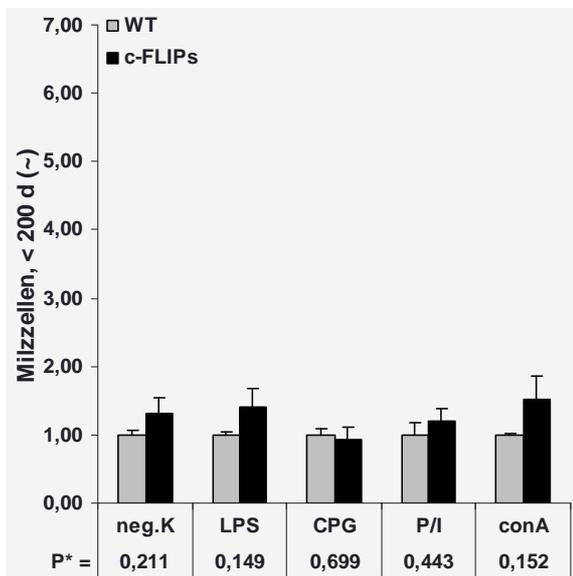
Diese Arbeit verglich anhand des Proliferationsassays die Aktivierung der Leukozyten von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen mit WT Mäusen. Die einzelnen Ansätze wurden mit stimulierenden Agentia 48 Stunden inkubiert. In den letzten 6 Stunden wurde <sup>3</sup>H-Methyl-Thymidin hinzugegeben, das korrespondierend zur Zellteilung in die DNA eingebaut wird. Cpm (counts per minute) entspricht der in einer Minute im β-Counter gemessenen Emission des eingebauten Thymidins und damit dem Ausmaß der Proliferation. Aus dem Dreifachansatzes einer Probe des Experiments wurde der Mittelwert gebildet.

Die Diagramme im Folgenden zeigen Mittelwerte und den Standardschätzfehler (SEM) von  $n$  Mäusen mehrerer Experimente. Zum Ausgleich der interexperimentellen Schwankungen und zur Gleichgewichtung der einzelnen Experimente sind neben den ursprünglichen Daten deren prozessierte Daten abgebildet. Die Methodik wird unter 3.3. beschrieben.

### 3.4.1 Leukozyten

Die aus der Milz gewonnenen Zellsuspensionen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS), Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-DNA (CpG), PMA + Ionomycin (P/I) und Concanavalin A (ConA) inkubiert. Diese mitogenen Agentia werden auch als polyklonale Aktivatoren bezeichnet, da sie unspezifisch B- und/oder T-Zellen stimulieren können. LPS, das der Zellmembran Gram-negativer Bakterien entstammt, stimuliert Monozyten und B-Zellen über TLR4. CpG ist ein DNA-Motiv aus nicht-methyliertem Cytosin und Guanosin, das vorwiegend in Bakterien und Viren vorliegt. CpG-Motive enthaltende DNA ist in der Lage, B-Zellen unspezifisch zu stimulieren. P/I aktiviert sowohl B-Zellen als auch T-Zellen durch direkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und Aktivierung der Proteinkinase C. ConA ist ein Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) und stimuliert in erster Linie T-Zellen über den CD3-Rezeptorkomplex. Die polyklonale Proliferation der T-Zellen unter Stimulation mit ConA wird durch die Interaktion mit APCs beeinflusst (Goodell et al., 1987).

Abbildung 10 zeigt, dass sich das Aktivierungsverhalten von cFLIP<sub>S</sub>-Mäusen älter als 200 Tage im Proliferationsassay deutlich von dem jüngerer Mäuse unterschied. In der Gruppe der Mäuse älter als 200 Tage war die Aktivierung der Milzzellen der cFLIP<sub>S</sub>-Mäuse unter Einfluss von CpG und P/I minimal und unter ConA stark, um das 4,8-fache, gegenüber den WT Mäusen erhöht. Diese gesteigerte Proliferation war in der Gruppe der jungen Mäuse unter keinem der Stimuli zu erkennen.

**A1****A2****B1****B2**

**Abb. 10: Vermehrte Proliferation von Milzzellen von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage unter Stimulation mit CpG, P/I und ConA**

*P\** = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; **1** (cpm) = gemessene  $\beta$ -Strahlung in der Minute (counts per minute); **2** (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; neg.K. = negativ Kontrolle; LPS = Lipopolysaccharid (1  $\mu$ g/ml); CpG = Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-DNA (1  $\mu$ M); P/I = Phorbol Myristinsäure (2 ng/ml) und Ionomycin (0,2  $\mu$ g/ml); ConA = Concanavalin A (2  $\mu$ g/ml);

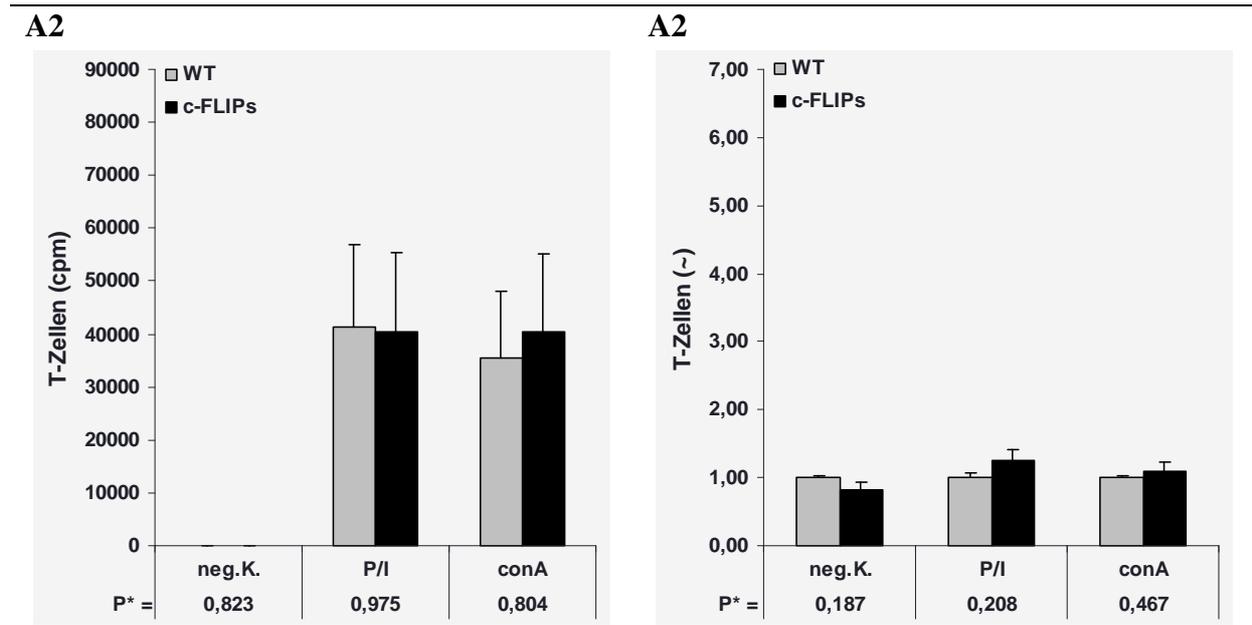
Aus den Milzen isolierte Leukozyten wurden über 48 Stunden mit LPS, CpG, P/I und ConA inkubiert. Für die letzten 6 Stunden wurde <sup>3</sup>[H]-Thy hinzugegeben, anschließend die Platten eingefroren, im Harvester geerntet und die Filter im  $\beta$ -Counter analysiert. **A:** Mäuse älter 200 Tage (n = 23); **B:** Mäuse jünger 200 Tage (n = 20)

### 3.4.2 T-Zellen

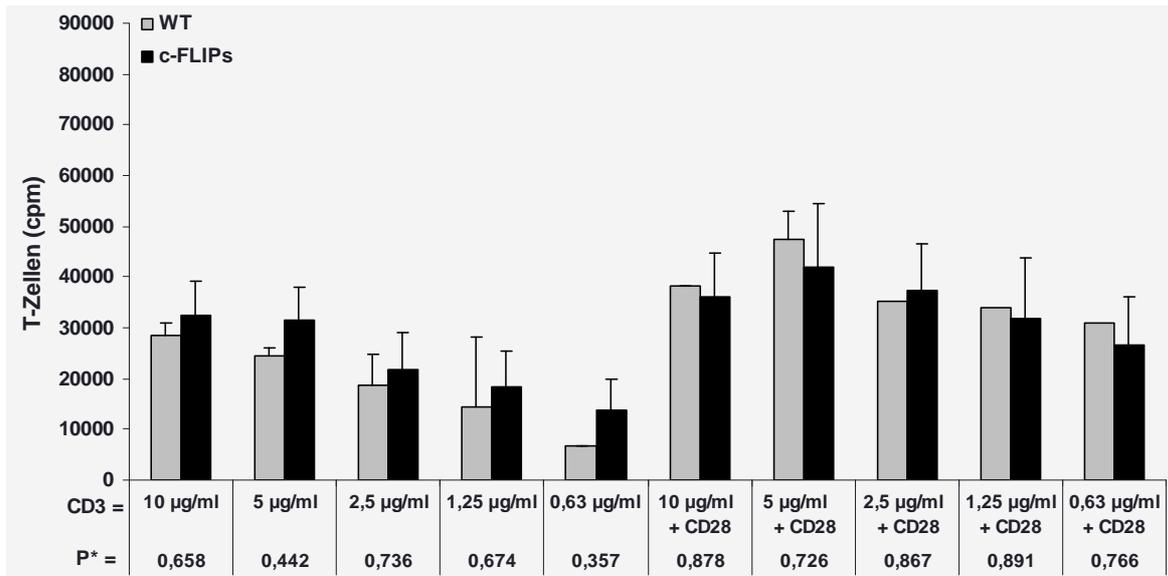
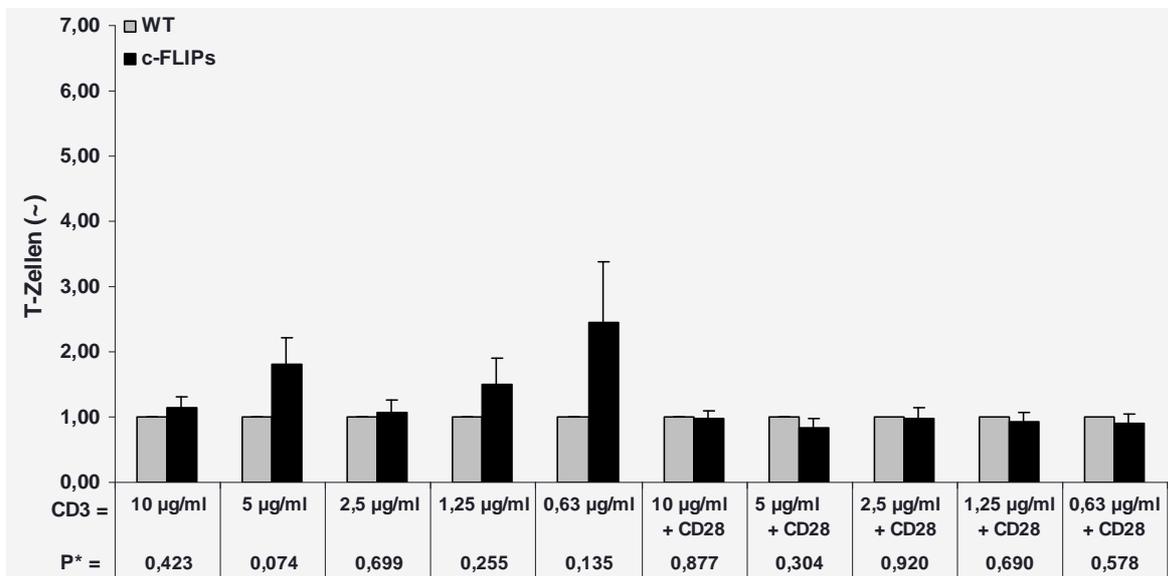
Die Untersuchung isolierter T-Zellen sollte zeigen, ob die anfangs bei den Leukozyten beobachtete gesteigerte Proliferation unter ConA, CpG und P/I durch eine funktionelle Veränderung verursacht wurde, die exklusiv auf die T-Zellen zurückzuführen war.

Nach magnetischer Separation der Milzzellsuspension wurden die isolierten T-Zellen 48 h mit ConA und P/I inkubiert. Ferner wurden die isolierten T-Zellen 6 Tage in Platten inkubiert, die zuvor mit titrierten Konzentrationen von Zell-Rezeptor-Ligand (CD3) mit oder ohne den Kostimulus CD 28 beladen worden waren.

Abbildung 11 zeigt, dass weder die Stimulation mit P/I noch mit ConA zu einer unterschiedlichen Proliferation der T-Zellen führte. Ebenso konnten keine Veränderungen in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen unter der Stimulation mit CD3 allein oder mit CD3 mit CD28 beobachtet werden.



*Fortsetzung Abb.11 auf Seite 57*

**B1****B2**

**Abb. 11: Keine Unterschiede der Proliferation von gereinigten T-Zellen unter Stimulation mit P/I, ConA, CD3 und CD3 & CD28**

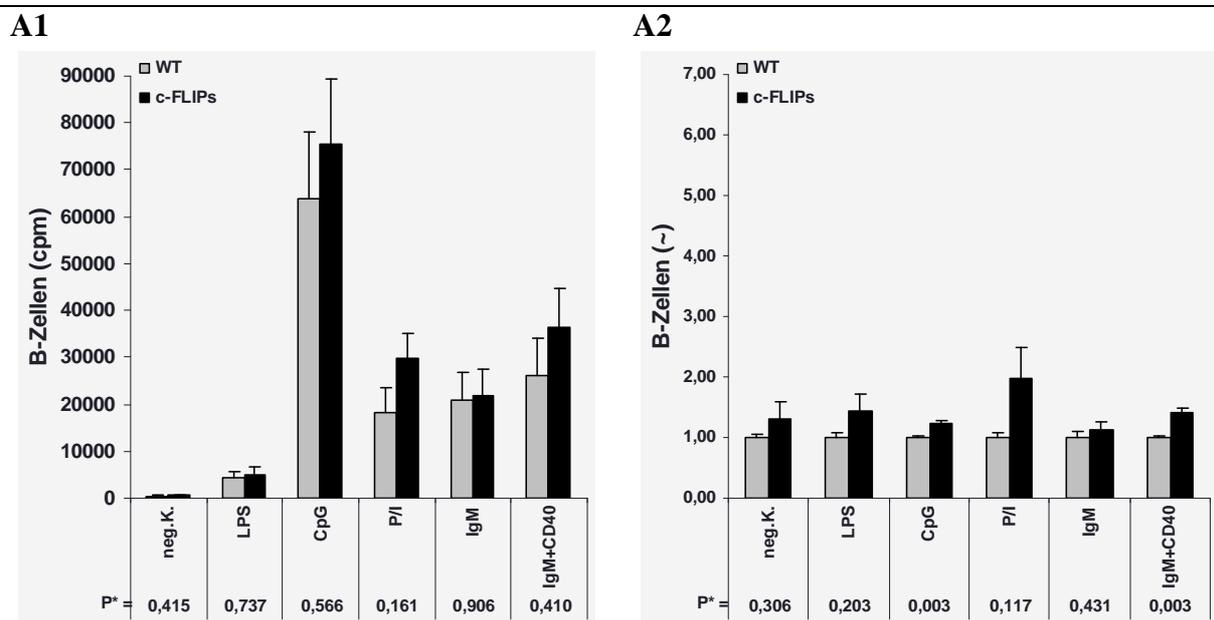
$P^*$  = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; **1** (cpm) = gemessene  $\beta$ -Strahlung in der Minute (counts per minute); **2** (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; neg.K. = negativ Kontrolle; P/I = Phorbol Myristinsäure (2 ng/ml) und Ionomycin (0,2 µg/ml); ConA = Concanavalin A (2 µg/ml)

**A:** Sortierte T-Zellen ( $n = 23$ ), 48 Stunden inkubiert mit P/I und ConA. Für die letzten 6 Stunden wurde  $^3\text{H}$ -Thy hinzugegeben, anschließend wurden die Platten eingefroren, im Harvester geerntet, und die Filter wurden im  $\beta$ -Counter analysiert; **B:** Sortierte T-Zellen ( $n = 18$ ), 6 Tage inkubiert mit CD3 mit oder ohne Kostimulation durch CD28

### 3.4.3 B-Zellen

In 3.4.1.1 wurde gezeigt, dass Leukozyten der cFLIP<sub>5</sub>-transgenen Mäuse in der Lage sind, unter der Stimulation mit P/I besser zu proliferieren. Neben der Untersuchung der T-Zellen war daher auch eine nähere Betrachtung isolierter B-Zellen sinnvoll.

Nach der magnetischen Separation von B-Zellen aus der Milz wurden diese durch LPS, CpG, P/I und IgM 48 Stunden lang stimuliert. Überdies wurden B-Lymphozyten mit Anti-IgM ohne oder mit dem Kostimulus CD40 inkubiert. Anti-IgM führt über die Quervernetzung des B-Zell-Rezeptors (BCR) zur Aktivierung der B-Zelle.



**Abb. 12: B-Zellen von cFLIP<sub>5</sub>-transgenen Mäusen proliferierten unter Stimulation mit CpG und mit IgM+CD40 geringfügig besser**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 (cpm) = gemessene  $\beta$ -Strahlung in der Minute (counts per minute); 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; neg.K. = negativ Kontrolle; LPS = Lipopolysaccharid (1  $\mu$ g/ml); CpG = Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin-DNA (1  $\mu$ M); P/I = Phorbol Myristinsäure (2 ng/ml) und Ionomycin (0,2  $\mu$ g/ml); IgM = anti-Immunglobulin M (5  $\mu$ g/ml); CD40 = anti-CD40 Antikörper, Kostimulus von IgM (1  $\mu$ g/ml);*

*A: Sortierte B-Zellen (n = 15) wurden über 48 Stunden mit LPS, CpG, P/I, IgM und IgM+CD40 inkubiert. Für die letzten 6 Stunden wurde  $^3$ [H]-Thy hinzugegeben, anschließend die Platten eingefroren, im Harvester geerntet, und die Filter im  $\beta$ -Counter analysiert.*

Abbildung 12 zeigt, dass unter Stimulation mit CpG die gereinigten B-Zellen der cFLIP<sub>5</sub>-transgenen Mäuse um das 1,2-fache signifikant (p = 0,003) besser proliferierten als die der

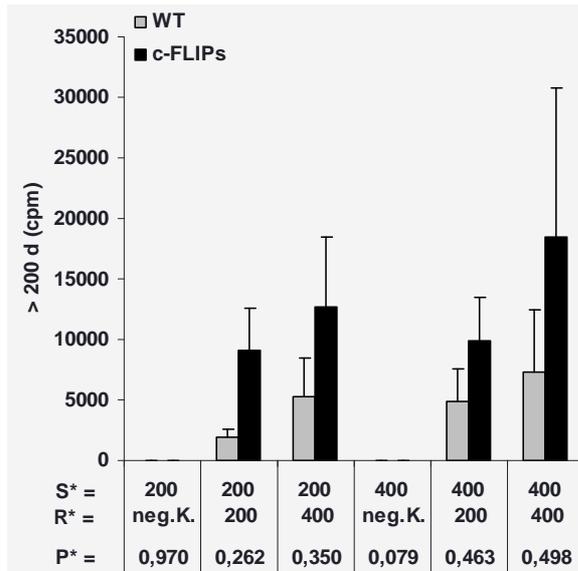
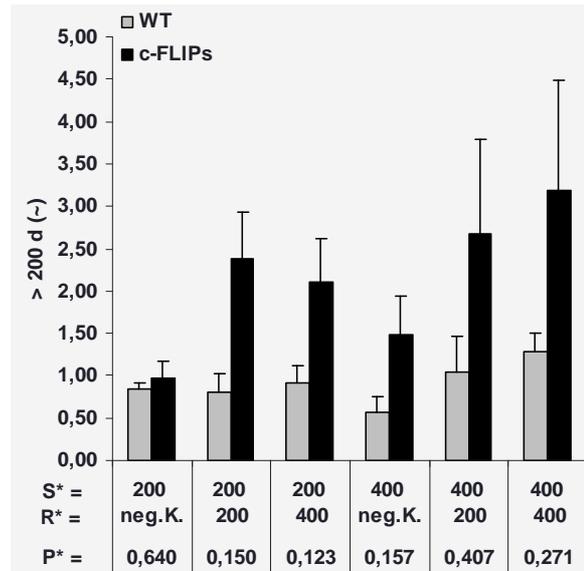
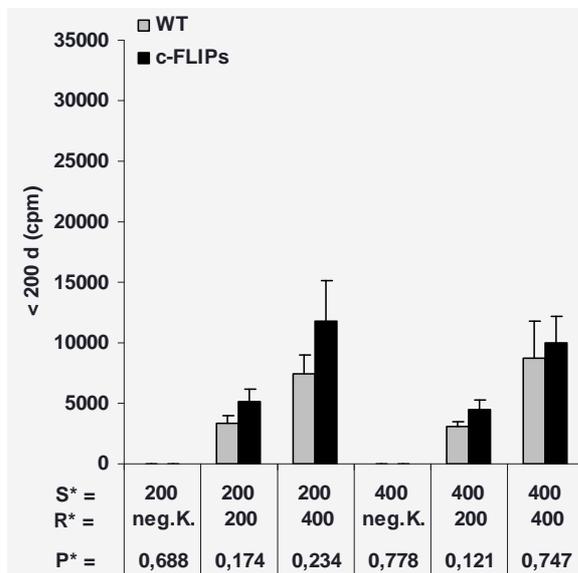
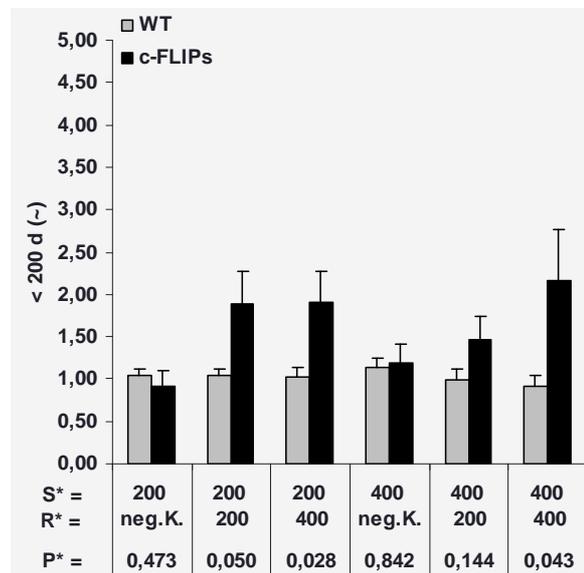
WT Mäuse. Dagegen konnten keine Unterschiede unter LPS, P/I und alleiniger IgM-Stimulation beobachtet werden. Hingegen führte die Kostimulation von IgM mit CD40 zu einer eindeutig gesteigerten Proliferation um das 1,3-fache ( $P = 0,003$ ).

### **3.5 cFLIP<sub>S</sub> verursachte in der MLR eine verbesserte T-Zellstimulation**

Dass der Effekt einer deutlich gesteigerten Proliferation von Leukozyten unter Stimulation mit ConA bei isolierten T-Zellen nicht mehr beobachtet werden konnte, legte eine Beteiligung von APCs nahe. Um die Effizienz der T-Zellstimulation von DCs und anderen APCs zu untersuchen, wurde die so genannte heterologe, gemischte Leukozytenreaktion (MLR, engl. mixed leukocyte reaction) eingesetzt. Das Prinzip der MLR ist die Koinkubation von APCs der zu untersuchenden Maus gemeinsam mit T-Zellen einer Maus mit unterschiedlichen MHC-Typen. Die APCs fungieren in diesem Fall als Stimulator, die T-Zellen als Responder. Die Proliferation der Responderzellen ist proportional zur Stimulation durch APC (Nussenzweig and Steinman, 1980).

Stimulatorzellen waren die Leukozyten der WT und cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse. Um zu verhindern, dass die enthaltenen T-Zellen selbst proliferieren, wurden die Stimulatorzellen bestrahlt. Dies unterbindet weitgehend die eigene Proliferation, erhält jedoch die Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Als Responderzellen wurden gereinigte T-Zellen einer BALB/c-Maus verwendet. Die Inkubation dauerte 6 Tage, dann wurde durch die Proliferationsrate durch Zugabe von <sup>3</sup>H-Methyl-Thymidin bestimmt.

Abbildung 13 zeigt, dass die Effizienz der Stimulation cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse älter (A) und jünger (B) als 200 Tage gegen über den WT Mäusen erhöht war. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei den älteren Mäusen.

**A1****A2****B1****B2****Abb. 13: CFLIP<sub>S</sub> verbessert die T-Zellstimulation in der MLR**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 (cpm) = gemessene  $\beta$ -Strahlung in der Minute (counts per minute); 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; neg.K. = negativ Kontrolle; S\* = Stimulatorzellen (in tausend je Well); R\* = Responderzellen (in tausend je Well);*

*Leukozyten der cFLIP<sub>S</sub> transgenen Mäuse und WT Mäuse (Stimulatorzellen) wurden mit 25 Gray bestrahlt und anschließend jeweils mit isolierten T-Zellen einer BALB/c-Maus (Responderzellen) in verschiedenen Zellzahlen für 6 Tage inkubiert. Die Responderzellen werden korrespondierend zur Menge der Antigenpräsentation der Stimulatorzellen aktiviert und proliferieren. Für die letzten 6 Stunden wurde 3[H]-Thy hinzugegeben, anschließend die Platten eingefroren, im Harvester geerntet, und die Filter im  $\beta$ -Counter analysiert. **A:** Mäuse älter als 200 Tage (n = 7) **B:** Mäuse jünger als 200 Tage (n = 19)*

### **3.6 cFLIP<sub>S</sub> störte die Reifung von Vorläuferzellen in Zellen der myeloiden Zelllinie**

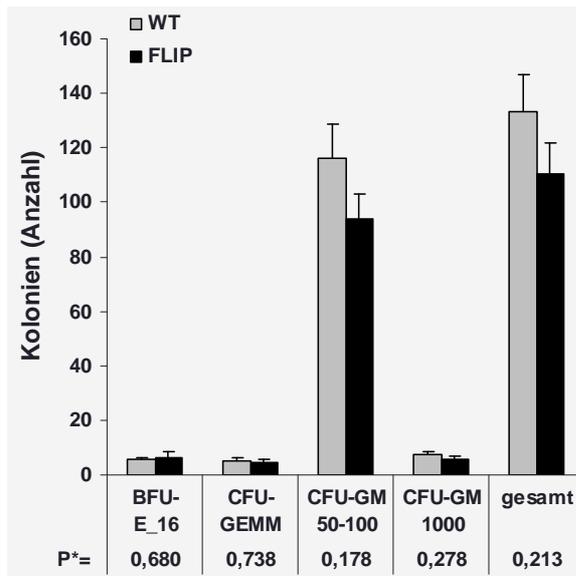
Nach 10-tägiger Stimulation von Knochenmarksvorläuferzellen mit GM-CSF wurde in mehreren Fällen beobachtet, dass in den Zellkulturen cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse insgesamt weniger Zellen ausdifferenzierten als in jenen von WT Mäusen. Um diesen Eindruck zu festigen, wurde die Reifung der Knochenmarksvorläuferzellen mit Hilfe eines Knochenmark-Stammzell-Assays (CFUc) untersucht.

Aus Knochenmarksvorläuferzellen bilden sich im halbflüssigen Methylzellulose-Medium nach 10 Tagen charakteristische Kolonien, die als burst-forming-units (BFU) und colony-forming-units (CFU) bezeichnet und in weitere Subklassen unterteilt werden (Metcalf, 1977):

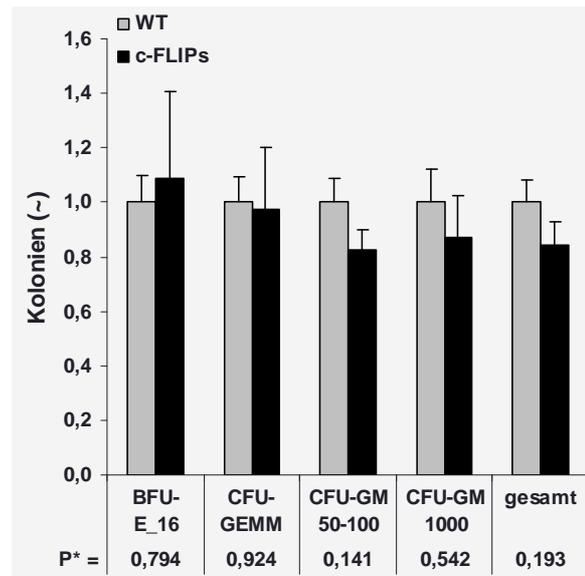
- BFU-E (burst-forming-unit-erythroid): Kolonien der erythropoetischen Zelllinie
- CFU-GM: (CFU-granulocyte-macrophage): Kolonien, generiert aus myeloiden Vorläuferzellen. Diese bestehen aus Granulozyten und Makrophagen.
- CFU-GEMM (CFU-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte): so genannte Multi-lineage Kolonien, bestehend aus Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten. Diese gemischten Kolonien entstehen aus sehr frühen pluripotenten Vorläuferzellen, die sich noch in all diese Zellen ausdifferenzieren können.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der CFUc-Experimente. Nach 10 Tagen Inkubation der Knochenmarksvorläuferzellen in Methylzellulose bei 37°C wurden die generierten Kolonien unter dem Lichtmikroskop typisiert und ausgezählt. Die Kolonien der einzelnen Subpopulationen waren tendenziell bei den cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen jeweils zwischen 20% und 30% erniedrigt. Von dieser Reduktion sind insbesondere Granulozyten und Makrophagen Kolonien betroffen (CFU-GM). Bis auf ein Experiment, das unerklärlich deutlich andere Ergebnisse ergab und daher nicht ausgeschlossen werden konnte, waren diese Ergebnisse eindeutig.

A1



A2



**Abb. 14: CFLIP<sub>S</sub> minderte im CFUc die Zellexpansion von differenzierenden Knochenmarksvorläuferzellen**

*P\* = T-Test (zweiseitig, homoskedastisch; 1 = Anzahl der jeweiligen charakterisierten Kolonien; 2 (~) = prozessierte Ergebnisse mit Wert des Wildtyps des jeweiligen Experiments als Referenz; BFU-E\_16 = Kolonien der erythropoetischen Zelllinie ; CFU-GEMM = Multi-lineage Kolonien; CFU-GM = Kolonien der myeloiden Zellline, mit einer Anzahl von 50-100 Kolonien bzw. ca. 1000 Kolonien; gesamt = Gesamtzahl der Kolonien*

*A: Knochenmarkzellen ( $n = 18$ ) wurden zu  $0,25 \cdot 10^5$  Zellen im Kolonie-Formations-Assay (CFUc) über 10 Tage stimuliert und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.*

## 4 Diskussion

Eine Fehlregulation der Apoptose ist ein prädisponierender Faktor für eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen einschließlich Krebs und Autoimmunität (Vaux and Flavell, 2000). Todesrezeptoren, die traditionell mit Apoptose in Verbindung gebracht werden, sind vermutlich wie deren Signaltransduktionsmoleküle in die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen involviert (Budd, 2002). Die Spleißprodukte von cFLIP, die die Aktivierung der Caspase-8 modulieren, wurden ursprünglich als inhibitorische Proteine der apoptotischen Signalleitung von CD95 und anderer Todesrezeptoren identifiziert. Paradoxaerweise scheinen jedoch sowohl Caspase-8 als auch cFLIP als auch Caspase-8 unter bestimmten Umständen für das Überleben und die Proliferation von Lymphozyten und anderer Zelltypen benötigt zu werden (Budd et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp einer cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus untersucht und funktionell charakterisiert. Das Transgen wurde unter der Kontrolle des *vav*-Promotors in das Erbgut einer C57BL/6 Maus eingebracht. Dadurch sollte cFLIP<sub>S</sub> kontinuierlich in Zellen der hämatopoetischen Reihe über das physiologische Ausmaß hinaus exprimiert werden.

### 4.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von cFLIP<sub>S</sub>

Die beiden wichtigsten Vertreter der cFLIP-Proteine, cFLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub>, unterscheiden sich in ihren Strukturen und funktionellen Eigenschaften. Beide Proteine besitzen DDs und können über diese an den DISC binden. CFLIP<sub>L</sub> scheint bei sehr niedrigen Konzentrationen die Spaltung von Caspase-8 an der Disk zu erleichtern, während cFLIP<sub>S</sub> dies verhindert (Chang et al., 2002). Daneben besitzt cFLIP<sub>L</sub> als Charakteristikum die caspase-ähnliche Domäne. Bei relativ niedriger intrazellulärer Konzentration kann cFLIP<sub>L</sub> anhand dieser caspase-ähnliche Domäne mit Caspase-8 im DISC ein Heterodimer ausbilden und diese unabhängig vom DISC aktivieren (Boatright et al., 2004). CFLIP<sub>S</sub> besitzt dagegen keine caspase-ähnliche Domäne. Daher ist cFLIP<sub>S</sub> nicht in der Lage, Caspase-8 zu aktivieren, sondern inhibiert grundsätzlich die Rekrutierung und Prozessierung von Caspase-8 an dem DISC (Krueger et al., 2001). Somit ist wahrscheinlich, dass cFLIP<sub>S</sub> in aktivierten T-Zellen mit cFLIP<sub>L</sub> um die Bindung von Caspase-8 konkurriert, um deren Aktivierung zu limitieren. Ferner ist cFLIP<sub>S</sub> nicht wie cFLIP<sub>L</sub> und dessen Spaltprodukt p43-cFLIP in der Lage, RIP1 und TRAF2 zu rekrutieren. Es wäre daher vorstellbar, dass cFLIP<sub>S</sub> im Sinne eines Gegenspielers von cFLIP<sub>L</sub> den NFκB-Signalweg indirekt inhibieren als auch die Aktivierung von Caspasen-8 beschränken könnte (Budd et al., 2006). In diesem Falle wäre eine verringerte Proliferation zu erwarten.

Für das transgene Mausmodell dieser Arbeit wurde cFLIP<sub>S</sub> aufgrund der besser abgrenzbaren Eigenschaften cFLIP<sub>L</sub> vorgezogen. Die Ergebnisse erlaubten ferner auch, indirekte Rückschlüsse auf die Funktion von cFLIP<sub>L</sub> und Caspase-8 zu ziehen.

## 4.2 cFLIP<sub>S</sub> im transgenen Mausmodell

Die Proteine des DR-Signalweges spielen eine essentielle Rolle in der Embryogenese. Die Generierung von *fadd*<sup>-/-</sup>, *caspase-8*<sup>-/-</sup> und *cFLIP*<sup>-/-</sup> Mäusen scheiterte an frühen tödlichen kardialen Entwicklungsstörungen (Yeh et al., 2000, Yeh et al., 1998b, Varfolomeev et al., 1998). Die Erstellung einer transgenen Maus, die in hohem Maße cFLIP<sub>S</sub> exprimiert, könnte durch eine vollständige Inhibition von Caspase-8 problematisch sein.

Bevor die eigentlichen Experimente begonnen werden konnten, musste belegt werden, ob die Einbringung von cFLIP<sub>S</sub> in das Erbgut der Maus grundsätzlich erfolgreich war. Das Gen stand unter Kontrolle des *vav*-Promotors, so dass die Expression in Thymozyten, T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen nachzuweisen war.

### 4.2.1 GFP-Expression

Zum unkomplizierten Nachweis des Transgens wurde an cFLIP<sub>S</sub> das Grün-Fluoreszierende-Protein gekoppelt. Die grüne Emission von GFP (509 nm) konnte durchflusszytometrisch im FL-1 Kanal gemessen und dadurch auf die Anwesenheit des Fusionsgens geschlossen werden. Die resultierende Rechtsverschiebung im FL-1 Histogramm, wie sie in Abbildung 3 erkennbar ist, war ein erster positiver Befund. Obwohl die Verschiebung nicht sehr ausgeprägt war, war sie bei allen c-FLIP<sub>S</sub>-Mäusen permanent vorhanden und konnte daher als Identifikationsmerkmal verwendet werden. Da eine einzige Population in ihrer Gesamtheit verschoben war, konnte davon ausgegangen werden, dass cFLIP<sub>S</sub>-GFP zwar in allen Zellen, aber vermutlich in nur geringer intrazellulärer Konzentration exprimiert wurde. Eine geringe Expression birgt das Risiko, dass Effekte, die durch das Transgen hervorgerufen werden, nur wenig ausgeprägt sind oder überhaupt nicht zum Vorschein kommen könnten. Andererseits muss dieses Problem *in vivo* vermutlich in Kauf genommen werden, da eine hohe Expression von Caspase-8-Inhibition ähnlich den *caspase-8*<sup>-/-</sup> Mäusen bereits im Embryonalstadium zum Tode führen könnte. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der Caspase-8 sowie des Adaptorproteins FADD Voraussetzungen für die Zytokin-induzierte Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen sind. Allein eine niedrige Konzentration des Caspase-8-Inhibitors Cytokine-Response-Modifier A (CrmA) wurde zur Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Systems toleriert. Dies führte interessanterweise zu einer Akkumulierung

von myeloiden Zellen im Knochenmark (Pellegrini et al., 2005). Zuvor waren zudem Versuche gescheitert, transgene Mäuse zu generieren, die Inhibitoren von FADD oder Caspase-8 ebenfalls unter Kontrolle des *vav*-Promotors exprimieren sollten (Pellegrini et al., 2005). Es besteht die Möglichkeit, dass auch cFLIP eine Rolle in diesem aus FADD und Caspase-8 bestehenden Komplex spielt, der für den zytokin-induzierten Proliferations-Signalweg benötigt wird.

#### 4.2.2 Inhibition der CD-induzierten Apoptose *in vitro*

*In vitro* kann FasL über den CD95-Signalweg die Apoptose induzieren. Es ist gut untersucht, dass cFLIP<sub>S</sub> an den DISC rekrutiert wird und dort die Prozessierung von Caspase-8 inhibiert (Krueger et al., 2001, Irmeler et al., 1997). Die funktionelle Expression des Transgens konnte wie erwartet durch den Schutz vor CD95-induzierter Apoptose im Experiment nachgewiesen werden. Die hämatopoetischen Zellen der Mäuse, die zuvor durchflusszytometrisch durch GFP-Expression als cFLIP<sub>S</sub>-transgene Mäuse identifiziert worden waren, überlebten im Vergleich zu Zellen der WT Mäuse je nach Stimulus um ca. 5 bis 20% besser. Dass dieser Effekt nicht so stark wie im cFLIP<sub>S</sub>-Transfektionsmodell ausfiel (Irmeler et al., 1997), deutet wie die anhand der Durchflusszytometrie bestimmte geringe Rechtsverschiebung im FL1-Histogramm auf eine niedrigere intrazelluläre Expression von cFLIP<sub>S</sub>-GFP hin.

Die Kontrolle des intrinsischen Apoptose-Signalweges durch Staurosporin war wie erwartet bis auf einen Fall unverändert. In Thymozyten scheint cFLIP<sub>S</sub> dagegen interessanterweise einen entgegengesetzten Effekt zu haben, indem die Zellen unter der Behandlung mit Staurosporin nicht weniger, sondern vermehrt starben. Folglich scheint cFLIP<sub>S</sub> in Thymozyten diese einerseits gegenüber CD95-induzierter Apoptose zu schützen, jedoch andererseits diese gegenüber Staurosporin zu sensibilisieren. Die Ursache dafür ist unklar. Eine Sensibilisierung gegenüber Staurosporin konnte jedoch bereits bei anderen Proteinen des CD95-Signalwegs wie z.B. in dominant-negative Mutante von FADD (FADD-DN) exprimierenden Zellen beobachtet werden (Tang et al., 2000). Möglicherweise liegt dies an einem Reifungsdefekt cFLIPs-transgener Zellen.

Die Rolle von CD95 *in vivo* wird noch immer kontrovers diskutiert. Dessen Ligand FasL wird auf Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Makrophagen exprimiert (Ashkenazi and Dixit, 1998, Kiener et al., 1997). Einige Infektionen, wie mit HIV-1 und HBV, bewirken durch eine Hochregulierung von CD95 in infizierten Zellen eine erhöhte Immunantwort, während dagegen andere Viren wie beispielsweise HHV-8 sich möglicherweise durch die Expression von vFLIP gegenüber der CD95-induzierten Apoptose schützen. Der CD95-Signalweg scheint

folglich eine wichtige Rolle in der Elimination infizierter Zellen einzunehmen (Dockrell, 2003). Eine Weile wurde darüber hinaus angenommen, es könnte sich am Ende der Immunantwort um den entscheidenden Mechanismus im Zelltod aktivierter T-Zellen handeln. Dies konnte jedoch widerlegt werden. Dem derzeitigen Modell nach erfolgt der Zelltod aktivierter T-Zellen durch die BH3-Proteine Bim und Puma, die wiederum zur Aktivierung der proapoptischen Proteine Bax und Bak führen (Zhu et al., 2006, Bauer et al., 2006).

### **4.3 Morphologischer und funktioneller Phänotyp des cFLIP<sub>S</sub> Mausmodells**

cFLIP<sub>S</sub> greift als Inhibitor der Caspase-8 in eine Vielzahl zellulärer Vorgänge ein, beispielsweise in der Embryogenese oder der Immunantwort. Möglicherweise interagiert cFLIP<sub>S</sub> mit weiteren, bislang nicht untersuchten Proteinen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit anhand der aktuellen Literatur diskutiert werden.

#### **4.3.1 Absolute Zellzahlen und prozentuale Populationsgrößen**

Hinsichtlich der gesamten Zellzahl in der Milz der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse im Vergleich mit den WT Mäusen ergaben sich zwei Auffälligkeiten: Erstens war die Zellzahl deutlich niedriger, zweitens trat dieser Effekt mit zunehmendem Alter deutlicher zum Vorschein.

Bedenkt man, dass die Leukozyten der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus gegenüber CD95-induzierter Apoptose geschützt sind, überrascht diese Beobachtung. Angenommen CD95 würde allein die Funktion eines Todesrezeptors besitzen, wäre eher eine Akkumulation von Lymphozyten und damit eine Vergrößerung der Gesamtzellzahl zu erwarten gewesen. Dieser Effekt ist also nicht auf Apoptoseinduktion durch CD95 zurückführbar, sondern spricht prinzipiell gegen eine wesentliche proapoptische Rolle von CD95 in nicht aktivierten Leukozyten *in vivo*.

Im Wesentlichen konnten zwei Ursachen einer reduzierten Zellzahl unterschieden werden: eine verminderte Bildung oder ein erhöhter Zelltod der ausdifferenzierten Zellen. Während der Reifung könnte die Inhibition von Caspase-8 in den cFLIP<sub>S</sub> exprimierenden Zellen ein Selektionsnachteil darstellen, indem das Differenzierungsvermögen oder die zelluläre Funktion gestört sind. Wenn man in diesem Fall davon ausgeht, dass von diesem Prozess nur ein geringer Prozentsatz betroffen ist, könnte die Summierung eines solchen Effekts die stärkere Ausprägung im Verlauf des Lebensalters erklären. Ferner könnte auch die gestörte Bildung von langlebenden Zellen wie beispielweise Gedächtniszellen eine Rolle spielen.

Die polyklonale Aktivierung *in vitro* von Milzleukozyten der c-FLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse und der WT Mäuse wies keine signifikanten Unterschiede auf. Eine Ausnahme war eine deutlich gesteigerte Proliferation unter der Stimulation durch ConA (Abbildung 10). Interessanterweise trat dieser Effekt allein in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen mit einem Alter von über 200 Tagen auf. Daraus ergeben sich prinzipiell zwei Fragen: Wieso rief nur ConA, nicht jedoch andere polyklonale Aktivatoren wie LPS, CpG oder P/I eine veränderte bzw. verbesserte Proliferation der Leukozyten hervor? Weshalb ist dieser Effekt allein im fortgeschrittenen Lebensalter erkennbar, und steht dies im Zusammenhang mit der gleichzeitig auftretenden Reduktion der Gesamtzellzahl?

Die Betrachtung der einzelnen Zellsubpopulationen hinsichtlich ihrer Anzahl, Funktion und Differenzierung sollte weitere Erkenntnisse bringen.

#### 4.3.2 T-Zellpopulationen und Funktion

Der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen in der Milz von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen war unverändert. Bezieht man die Gesamtzellzahl der Leukozyten in der Milz in die Betrachtung mit ein, ist erkennbar, dass die absolute T-Zellpopulation in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage ungefähr um ein Viertel reduziert war (Abbildung 8).

Die funktionelle Untersuchung der isolierten T-Zellen durch polyklonale Antikörper ergab keine Veränderungen. Bemerkenswerterweise war auch die Stimulation der T-Zellen mit ConA unverändert (Abbildung 11). Dies bedeutet, dass der bei den unsortierten Leukozyten älterer cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse feststellbare Effekt einer erhöhten Proliferation unter ConA kein autonomer Prozess der T-Zellen war, sondern von anderen Zellen abhing. In der Tat wird die polyklonale Proliferation unter ConA maßgeblich durch die Interaktion der T-Zellen mit APC beeinflusst (Goodell et al., 1987). Diese sind in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage signifikant vermehrt.

Hinsichtlich der T-Zellen gleicht die c-FLIP<sub>S</sub>-transgene Maus mehr der Caspase-8-defizienten als der FADD-defizienten Maus. Mäuse mit einer FADD-S191D-Mutation, die eine konstitutive Phosphorylierung imitieren, wiesen keinen Defekt der CD95-vermittelten Apoptose auf, sondern eine reduzierte Proliferation, wie es bereits bei FADD-defizienten T-Zellen beobachtet worden war (Hua et al., 2003, Zhang et al., 1998). Mäuse mit einem auf T-Zellen beschränkten Verlust von Caspase-8 waren dagegen gegenüber CD95-induzierter Apoptose geschützt und wiesen eine verringerte Anzahl an peripheren T-Zellen auf, entwickelten aber keinen Zellzyklus-Defekt (Salmena et al., 2003). Eine stark reduzierte T-Zellpopulation trat

interessanterweise auch bei Mäusen auf, in deren T-Zellen cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> ausgeschaltet wurden (Zhang and He, 2005, Chau et al., 2005).

Die Beobachtungen sind ferner mit dem vFLIP-Mausmodell von Wu et al. vergleichbar, das eine inkomplette Infektionsantwort sowie eine gestörte Generierung von T-Gedächtniszellen aufwies (Wu et al., 2004). Zu entgegengesetzten Ergebnissen kamen hingegen Untersuchungen des vFLIP-Mausmodells von Woelfel et al., in dem die transgenen Mäuse offenbar eine *lpr/gld* ähnliche Lymphoproliferation entwickelten (Woelfel et al., 2006). Diese Lymphoproliferation trat aber nur bei homozygot-transgenen Mäusen (tg-/tg-) auf, so dass Kreuzreaktionen oder Nebeneffekte anderer Gene verantwortlich gewesen sein könnten. Eine weitere Erklärung dieses Phänomens könnte eine höhere Expression und intrazelluläre Konzentration von vFLIP darstellen.

CD3-Antikörper imitieren in T-Zellen die Stimulation, die *in vivo* durch MHC und antigen-induzierte Aktivierung des T-Zellrezeptors stattfindet. Dass sich unter Stimulation mit CD3- oder CD3/CD28 die Proliferation der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse nicht vom WT unterschied (Abbildung 11B), deckt sich mit dem vFLIP-Mausmodell von Woelfel et al., unterscheidet sich jedoch von den Resultaten einer verringerten Proliferation des vFLIP-Modells von Salmena et al. (Salmena et al., 2003). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch bei Experimenten mit cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden transgenen Mäusen gemacht (Tai et al., 2004, Lens et al., 2002). Eine gesteigerte Proliferation unter suboptimaler CD3-Stimulation wurde bei den T-Zellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus dieser Arbeit nicht beobachtet (Lens et al., 2002). Diese Unterschiede sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass cFLIP<sub>S</sub> nicht mit RIP1 and TRAF2 interagiert, wie es für cFLIP<sub>L</sub> und p43-FLIP nachgewiesen wurde (Kataoka and Tschoop, 2004). Es wurde argumentiert, dass cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierende Mäuse eine normale periphere T-Zellzahl aufwiesen, indem deren verstärkte Proliferation durch eine gesteigerte Apoptose während der Differenzierung ausgeglichen worden sein könnte (Lens et al., 2002). Prinzipiell ist umstritten, ob cFLIP eine wesentliche Rolle in der T-Zellaktivierung spielt. So wurden T-Zellen mit selektiv ausgeschaltetem cFLIP<sub>L</sub> und cFLIP<sub>S</sub> nach TCR-Stimulation genauso gut aktiviert wie WT Zellen (Zhang and He, 2005).

Die Proliferation von T-Zellen ist von der Anwesenheit von Caspasen abhängig (Kennedy et al., 1999, Alam et al., 1999, Chun et al., 2002). Dies konnte durch ein Caspase-8-Knockout-Mausmodell bestätigt werden (Salmena et al., 2003). In dieser Arbeit könnte in diesem Sinn aufgrund der Hemmung von Caspase-8 durch die Überexpression von cFLIP<sub>S</sub> eine verringerte T-Zellproliferation erwarten werden. Dies war jedoch nicht der Fall. Ob cFLIP in der T-

Zellproliferation überhaupt eine Rolle spielt, ist noch nicht geklärt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass das Spaltprodukt von cFLIP<sub>L</sub> p43 die Caspase-8-abhängige NF-κB-Aktivierung verstärkte und so eine bessere Aktivierung von T-Zellen bewirkte (Dohrman et al., 2005, Kataoka and Tschopp, 2004). Es wurde jedoch auch Gegenteiliges beobachtet (Kreuz et al., 2004, Legembre et al., 2004).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass cFLIP<sub>S</sub> wahrscheinlich eine Rolle in der Reifung von T-Zellen spielt. CFLIP<sub>S</sub> nimmt jedoch keinen direkten Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen.

#### 4.3.3 B-Zell-Populationen und -Funktion

Ähnlich wie die T-Zellen war der prozentuale Anteil der B-Zellen in der Milz cFLIP<sub>S</sub>-transgener Mäuse unverändert. Die absolute B-Zellpopulation in den Milzen von cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage war ebenfalls um mehr als ein Viertel reduziert (Abbildung 8B). Die polyklonale Aktivierung ergab für CpG sowie für IgM+CD40 einen nur unwesentlichen Unterschied (Abbildung 12)

Die Auswirkungen einer erhöhten cFLIP-Expression in B-Zellen transgener Mäuse ist bisher nur wenig untersucht worden. Die reduzierte B-Zellzahl in der Milz älterer Mäuse, die in der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus dieser Arbeit beobachtet werden konnte, trat unter retroviraler Transduktion von cFLIP<sub>L</sub> in hämatopoetischen Stammzellen nicht auf (Djerbi et al., 2003). In anderen Untersuchungen wurde dagegen eine Akkumulation von B-Zellen in Keimzentren (GCs) sekundärer Lymphorgane sowie eine Sekretion von doppelsträngigen Anti-DNA-Autoantikörpern beobachtet (Hennino et al., 2001). Dieser Effekt ähnelte im Wesentlichen dem Autoimmunen-Lymphoproliferativen-Syndrom, wie es auch in CD95- oder FasL-mutierten Mäusen auftrat (Davignon et al., 1991). CFLIP könnte daher eine mögliche Rolle in der positiven Selektion von B-Zellen während ihres Reifungsprozesses in GCs der Sekundärfollikel spielen. Welchen Effekt die Überexpression von cFLIP<sub>S</sub> in diesem Fall hervorruft, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dies ist eine interessante Fragestellung, die in Zukunft weiter analysiert werden sollte.

In reifen B-Lymphozyten induziert die Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch IgM den apoptotischen Zelltod. Die Stimulation durch CD40, dessen Ligand auf aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird, unterdrückt hingegen die Apoptose (Tsubata et al., 1993). Da T-Helferzellen sowohl FasL als auch CD40L exprimieren, sind diese dadurch vermutlich in der Lage, durch todinduzierende Signale und durch Überlebenssignale das Schicksal der B-Zellen

zu lenken. Eventuell könnte cFLIP in der B-Zelle ein zentraler Regulationspunkt dieses Fließgleichgewichtes darstellen. Dass cFLIP selbst einen Einfluss auf das BCR/CD40 Signal hat, konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden. Die leicht verbesserte Proliferation der B-Zellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus unter Behandlung mit IgM + CD40 könnte auf eine verringerte Apoptoserate und daher eine erhöhte Zellzahl zurückzuführen sein (Abbildung 12). Dies sollte in zukünftigen Experimenten ausführlicher untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde vor kurzem gezeigt, dass B-Zellblasten der Akuten-Lymphatischen-Leukämie (ALL) nach Aktivierung durch CD40 zwar vermehrt CD95 exprimierten, jedoch möglicherweise durch eine hohe Expression von cFLIP<sub>S</sub> gegenüber CD95-vermittelter Apoptose geschützt wurden. Die Behandlung mit Cycloheximid verhinderte diese Hochregulierung von cFLIP<sub>S</sub> und sensibilisierte die Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Troeger et al., 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Rolle von cFLIP<sub>S</sub> in der Regulation der B-Zellantwort hin. Die Rolle von cFLIP<sub>S</sub> in B-Zellen ist nicht ausreichend erforscht und sollte in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden.

#### 4.3.4 Antigen-präsentierende Zellen: Funktion und Expression von Oberflächenmolekülen

Die Reduktion der Gesamtzahl der Leukozyten in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen älter als 200 Tage war insbesondere auf verkleinerte B- und T-Zellpopulationen zurückzuführen. Bei der Färbung dieser Zellpopulationen traten zudem signifikant vergrößerte doppeltnegative Populationen auf (Abbildung 8C). Weitere Färbungen zur Identifizierung dieser CD3<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>-Zellen ergaben, dass diese hauptsächlich aus antigen-präsentierenden Zellen bestanden. Während die relative Populationsgröße und absolute Zellzahl von Makrophagen und Dendritischen Zellen in jungen Mäusen unverändert war, waren diese in älteren signifikant vergrößert (Abbildung 9). CFLIP<sub>S</sub> reduzierte *in vivo* also nicht die periphere Zellzahl wie im Fall der Lymphozyten, sondern schien auf APCs einen umgekehrten Effekt zu haben. Zur Erklärung dieses Phänomens kommen mindestens vier Mechanismen in Frage:

- 1) cFLIP<sub>S</sub> wirkt sich auf den Reifungsprozess der Vorläuferzellen in APCs aus, indem unbekannte Signalwege der apoptotischen Selektionsmechanismen inhibiert werden, in denen DR wie CD95 sowie Caspase-8 eine Rolle spielen. Die periphere Anzahl der APCs würde dadurch erhöht, ihre Funktion jedoch nicht zwangsläufig beeinträchtigt werden.

- 2) cFLIP<sub>S</sub> stört den Reifungsprozess, so dass die Zellen im unreifen Zustand akkumulieren und sich der gewöhnlichen apoptotischen Elimination entziehen. In diesem Fall wären die APCs in ihrer Funktion möglicherweise stark eingeschränkt.
- 3) cFLIP<sub>S</sub> schützt APCs nach deren Aktivierung vor der apoptotischen Elimination, so dass vermehrt aktivierte Zellen in der Peripherie verbleiben. Sekundär müssten in diesem Fall jedoch auch mehr Lymphozyten vorliegen.
- 4) cFLIP<sub>S</sub> hat keine Auswirkungen auf APCs. Die Bildung hämatopoetischer Zellen ist durch die Reduktion der Lymphozytenzahl im Allgemeinen erhöht, basierend auf einem unbekanntem Signal-Mechanismus.

Anfangs sollte das Aktivierungsverhalten von APCs, die eigens durch GM-CSF aus Knochenmarkvorläuferzellen ausdifferenziert worden waren, untersucht werden. Die Ergebnisse waren jedoch uneinheitlich – in manchen Experimenten zeigte sich eine gesteigerte, manchmal eine unveränderte Aktivierung der APCs (Daten nicht dargestellt). Interessanterweise schien der Reifungsprozess der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Zellen gestört zu sein. Bei gleicher Anzahl der angesetzten Knochenmarkzellen war nach 10-tägiger Stimulation die Gesamtmenge der cFLIP<sub>S</sub>-überexprimierenden APCs vermindert. Dies war insbesondere der Fall, wenn suboptimale Stimulationsdosen von GM-CSF verwendet wurden (Daten nicht dargestellt).

Anhand des Kolonie-Formations-Assays (CFUc) sollte genauer untersucht werden, ob der Reifungsprozess durch die cFLIP<sub>S</sub>-Überexpression beeinträchtigt wird. In der Tat bildeten die Knochenmarkvorläuferzellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus ca. 20% weniger Kolonien als die der WT Maus (Abbildung 14). Dies bestätigt, dass die Reifung der APCs durch die Überexpression von cFLIP<sub>S</sub> gestört war. Es bedeutet jedoch vielleicht auch, dass die vergrößerten APC-Populationen in der Milz darauf nicht ursächlich zurückzuführen sind, sondern dass cFLIP darüber hinaus Effekte auf die Selektion der APCs während deren Reifung oder auf die Elimination nach deren Aktivierung besitzt.

Die Funktion der APC wurde durch eine Alloreaktion im MLR untersucht. Das Prinzip der MLR ist die Koinkubation von Zellen der zu untersuchenden Maus (Stimulator) gemeinsam mit T-Zellen einer Maus mit unterschiedlichen MHC-Typen (Responder). Die Proliferation der Responderzellen ist proportional zur Summe der Antigenpräsentation (Nussenzweig and Steinman, 1980). Die Stimulation durch Milzzellen der cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäuse war signifikant gesteigert (Abbildung 13). Bemerkenswerterweise war dieser Effekt jedoch nicht nur auf Mäuse beschränkt, die älter als 200 Tage waren (Abbildung 13A), sondern war auch

bei jungen Mäusen vorhanden (Abbildung 13B). Zum Teil könnte dieser Effekt durch die erhöhte Anzahl der APCs erklärt werden, zumal dieser in älteren Mäusen stärker hervortritt. Die Verbesserung in jungen Mäusen ist damit jedoch nicht zu begründen, sondern könnte auf eine verbesserte Funktion und Aktivierung der APCs zurückzuführen sein. Im Folgenden wurde ein MLR-Versuch mit APCs durchgeführt, die zuvor aus Knochenmarkvorläuferzellen durch GM-CSF bzw. M-CSF differenziert wurden. Dabei konnte kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Dies lieferte ein weiteres Argument, dass durch den Einfluss einer erhöhten Expression von cFLIP<sub>S</sub> die Elimination aktivierter APCs beeinflusst wurde, diese daher vermehrt vorlagen und diese Zellen zur verbesserten Stimulation führten. Kürzlich wurde ferner gezeigt, dass die enzymatische Aktivität von Caspase-8 sowie des Adaptorproteins FADD für die Zytokin-induzierte Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen benötigt werden (Pellegrini et al., 2005). CFLIP könnte in einem unbekanntem Komplex modulierend eingreifen, der unter anderem FADD und Caspase-8 enthält und der für die Differenzierung von APCs benötigt wird. Welche Rolle dabei CD95 spielen könnte, ist unklar. Überraschenderweise genügte die spezifische Deletion von CD95 in APCs, um Autoimmunität zu verursachen (Stranges et al., 2007). Es ist daher denkbar, dass CD95 regulierend an diesem Prozess beteiligt ist. Im Sinne eines negativen Regulationsmechanismus könnten CD95<sup>+</sup>-APCs im Normalfall beispielsweise durch aktivierte T-Zellen eliminiert werden. CD95<sup>-</sup>-APCs, die Autoantigene präsentieren, würden folglich die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen initiieren. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass DCs nach Aktivierung von T-Zellen offenbar getötet werden (Wong and Pamer, 2003). Die Stimulation von nicht voraktivierten APCs durch FasL führte indes zu deren phänotypischen und funktionellen Reifung und induzierte *in vivo* eine dramatische Entzündungsantwort (Hohlbaum et al., 2001). Dieser Prozess geht mit einer hohen intrazellulären Konzentration von cFLIP, der Expression von Chemokinen und der Rekrutierung von Granulozyten einher (Rescigno et al., 2000, Hohlbaum et al., 2001)

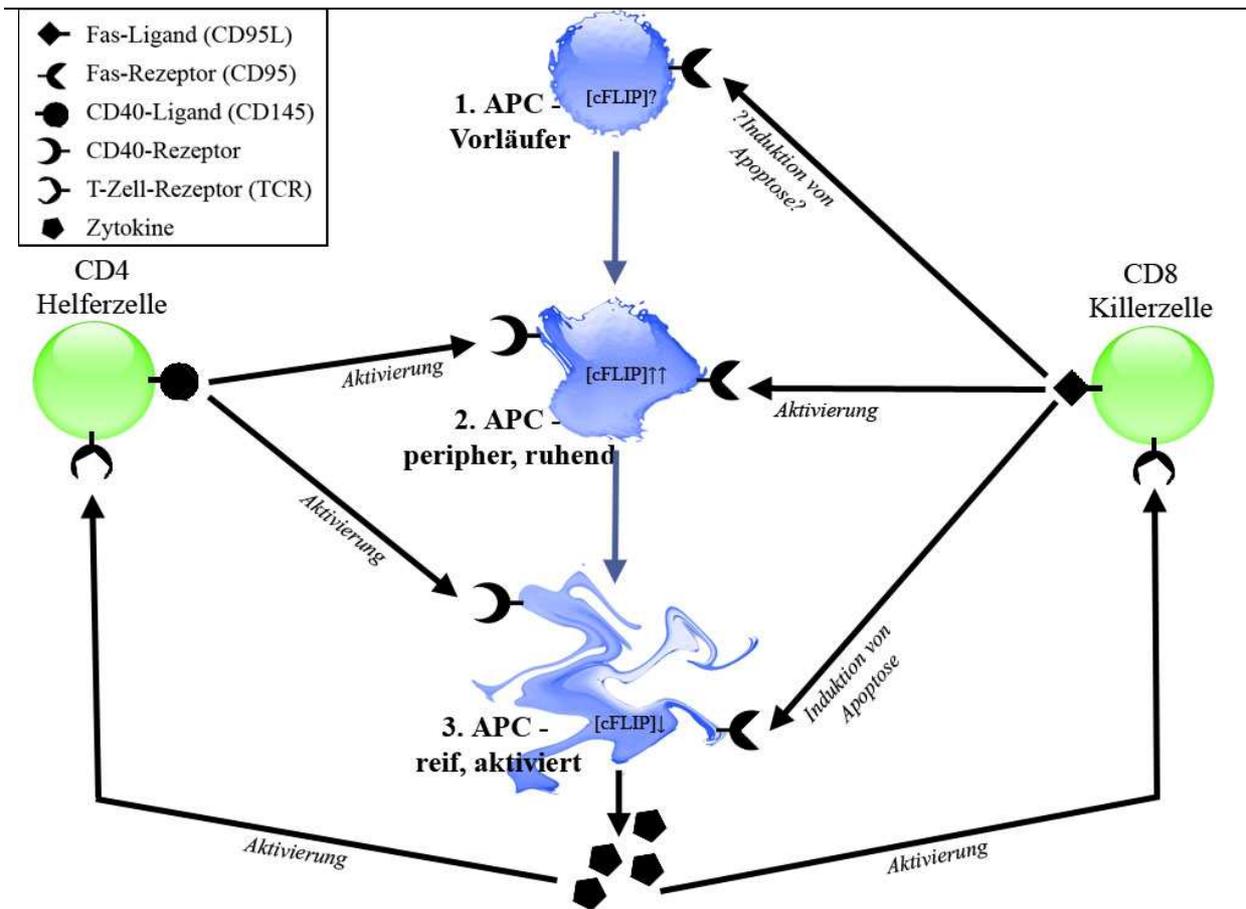
Zusammenfassend kann folgendes Modell vorgeschlagen werden: Für die Differenzierung von APCs ist die Anwesenheit, vielleicht auch enzymatische Aktivität von Caspase-8 und die Anwesenheit von FADD notwendig; die Aktivierung dieser Proteine wird durch cFLIP und andere Inhibitoren reguliert. Ferner wird die Stimulation von Lymphozyten während einer Infektion möglicherweise auch durch die Feinregulation der Reifung der APCs moduliert (Abbildung 15):

- APC-Vorläuferzellen werden durch CD95-induzierte Apoptose eliminiert; dies verhindert eine überschießende Immunantwort sowie Autoimmunität.

- Nicht aktivierte APCs werden durch CD95 Stimulation zur phänotypischen und funktionellen Reifung gebracht; dies verbessert die Präsentation von Antigenen.
- Reife APCs werden durch CD95 abgetötet; dies begrenzt die Immunantwort.

Um dieses Modell zu überprüfen, sind weitere Versuche notwendig. Es könnte jedoch widersprüchliche Beobachtungen der *lpr*-Maus erklären, indem dieser Phänotyp nicht auf Lymphozyten selbst, sondern auf die veränderte Funktion von APCs zurückzuführen ist.

Die Reifung von APCs wird ferner durch die Stimulation durch CD145, dem CD40-Liganden, vermittelt (Marrack and Kappler, 2004). CD40L wird auf aktivierten, nicht aber auf nicht aktivierten T-Zellen exprimiert. Die CD40L-Expression kann auf TH0-, TH1- und TH2-Zellen induziert werden, ist jedoch in erster Linie auf CD4+-Zellen vorhanden (Lederman et al., 1992, van Kooten and Banchereau, 2000).



**Abb. 15: Modell der Regulation der Differenzierung von APCs durch T-Zellen**

*FasL wird auf aktivierten CD8-Zellen exprimiert und dient dort nicht nur der Apoptoseinduktion, sondern ist während der Immunantwort vermutlich auch als partieller Gegenspieler von CD40L anzusehen. CD40L wird auf CD4-Helferzellen exprimiert:*

1. *APC-Vorläuferzellen werden durch CD95-induzierte Apoptose eliminiert; dies verhindert eine überschießende Immunantwort sowie Autoimmunität.*
2. *Nicht aktivierte APCs werden durch Stimulation von CD95 und CD40 zur Reifung gebracht; dies verbessert die Präsentation von Antigenen in einer Immunantwort. Dieser Prozess geht mit einer gesteigerten intrazellulären Konzentration von cFLIP in Dendritischen Zellen einher.*
3. *Reife, aktivierte APCs werden durch CD95 zur Apoptose angeregt; dies begrenzt die Immunantwort. CD40 hält als Gegenspieler die Aktivierung aufrecht. Aktivierte APCs stimulieren durch die Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen wiederum über den TCR CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.*

*Dieser durch CD95-vermittelte Regulationsmechanismus ist in lpr-Maus nicht funktionsfähig. Dauerhaft aktivierte APCs verursachen eine überschießende, ungerichtete Stimulation von T-Zellen. Dies führt zur Lymphproliferation und Autoimmunität.*

#### 4.4 Fazit und offene Fragen

In dieser Arbeit wurden die Funktion und die Differenzierung der Leukozyten in einer cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Maus untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente werfen eine Reihe neuer Fragen auf.

Einerseits konnte gezeigt werden, dass es zu erheblichen Verschiebungen in der Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen mit zunehmendem Effekt im Alter kommt, ohne dass die Funktion der Leukozyten erheblich beeinflusst wäre. Die Ursache hierfür ist nicht vollkommen geklärt. Daher müsste genauer untersucht werden, ob die Anzahl der T-Lymphozytenpopulationen CD4-positiver und CD8-positiver T-Zellen und deren Apoptosesensibilität unterschiedlich betroffen sind, wie es bei der Überexpression cFLIP<sub>L</sub> in T-Zellen beobachtet worden ist (Tseveleki et al., 2004). Ferner sollte untersucht werden, ob die Funktion dieser Subpopulationen isoliert beeinträchtigt ist. Eine weitere zu überprüfende Möglichkeit ist, dass cFLIP<sub>S</sub> die Bildung von Lymphozytengedächtniszellen beeinflusst und bei Reinfektionen die Effizienz der lymphozytären Immunantwort gestört ist. In diesem Zusammenhang wurde bereits berichtet, dass in MC159-vFLIP-transgenen Mäusen das Überleben von T-Gedächtniszellen reduziert und die Antwort auf wiederholte Infektionen gestört war (Wu et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass cFLIP<sub>S</sub> den Reifungsprozess von APCs und vermutlich auch deren Funktion im aktivierten Zustand beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die APC-Population in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen vergrößert war. Dies stand im Einklang mit der Hypothese des in Abbildung 15 dargestellten Modells, konnte jedoch nicht leicht mit der Beobachtung in Einklang gebracht werden, dass die Differenzierung von APCs gestört war. In diesem Sinne sind die genaue Untersuchung der einzelnen Schritte der Differenzierung und die jeweilige Rolle von Stimuli wie beispielsweise CD40L oder FasL von primärem Interesse. Es könnte angenommen werden, dass die Überexpression von cFLIPs in einer frühen Phase der Differenzierung einen hemmenden Effekt auf die Reifung hat und später in den reifen APCs einen protektiven Effekt gegenüber FasL-induzierter Apoptose besitzt. Dies könnte bedeuten, dass in cFLIP<sub>S</sub>-transgenen Mäusen am Ende mehr aktivierte APCs mit verbesserter Antigenpräsentation vorliegen könnten. Dieser Frage könnte in Stimulationsexperimenten von APCs und T-Zellen mit löslichem Antigen nachgegangen werden. Eine verbesserte Aktivierung durch die erhöhte intrazelluläre cFLIP<sub>S</sub>-Konzentration hätte eine bessere Antigenpräsentation zur Folge und damit eine gesteigerte Aktivierung der Indikator-T-Zellen.

Von grossem Interesse wäre darüber hinaus, andere bekannte Mausmodelle der Autoimmunität mit der cFLIPS-transgenen Maus zu kreuzen, um die Wechselwirkung einer CFLIP<sub>S</sub>-Überexpression mit Genprodukten verwandter Signalwege oder deren Ausschaltung zu untersuchen. In Frage kommen würden beispielsweise die *lpr* und *gld* Mäuse, aber auch das Lupusmodell New Zealand White oder *ALI5*, eine Punktmutation im Gen des Signalproteins Phospholipase C2, welches dessen Signal verstärkt und zu entzündlichen Autoimmunerkrankungen führt.

Ferner sind weitere Analysen der verschiedenen cFLIP-Formen cFLIP<sub>L</sub>, cFLIP<sub>R</sub>, cFLIP<sub>S</sub> und p43FLIP notwendig, um deren Funktionen klarer zu definieren und dadurch ein Verständnis des Zusammenspiels dieser Proteine in der Regulation von Apoptose und Differenzierung von Leukozyten zu gewinnen.

## Zusammenfassung

Zelltod durch Apoptose ist ein wichtiger Regulationsmechanismus in Metazoen. Apoptose erfolgt, indem spezialisierte intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert werden. Ein solcher Weg ist die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche von Zellen des Menschen und der Maus. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre zeigten darüber hinaus, dass die Komponenten der Signaltransduktion von Todesrezeptoren (DR) auch in Differenzierungswege der Zelle eingreifen, jedoch ist bislang nur wenig über diese Wege und ihre Relevanz in Immunzellen bekannt. In dieser Arbeit wurde eine transgene Maus charakterisiert, die einen Inhibitor dieses Apoptoseweges, cFLIP<sub>S</sub>, in allen Zellen der Hämatopoese exprimiert.

Neben CD95 (Fas, Apo-1) konnten bislang sieben weitere DRs identifiziert werden. Nach Ligandenbindung oligomerisiert CD95 zum todinduzierenden Signalkomplex (DISC) und bindet zytosolische Proteine mit Todeseffektordomänen (DEDs). Zu diesen DED enthaltenden Proteinen gehören Pro-Caspase-8, die autoproteolytisch an dem DISC aktiviert wird, und verschiedene Spliceformen des Proteins cFLIP. Diese modulieren die Signaltransduktion von CD95 sowie von anderen DRs: Während cFLIP<sub>S</sub> die Prozessierung von Pro-Caspase-8 inhibiert, scheint die Wirkung von cFLIP<sub>L</sub> in Abhängigkeit von dessen zytosolischer Konzentration sowohl inhibierend als auch aktivierend zu sein. Von wesentlichem Interesse sind darüber hinaus nicht-apoptotische Funktionen der DR-Signalwege, die durch überwiegend noch unbekannte Mechanismen zur Aktivierung und Differenzierung der Zellen führen können.

Diese Arbeit untersuchte den Effekt der Überexpression von cFLIP<sub>S</sub> in einem transgenen Mausmodell. Die Expression eines Fusionsgens aus cFLIP<sub>S</sub> und des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) erfolgte unter Kontrolle des *vav*-Promotors, der eine gezielte Überexpression in Zellen des hämatopoetischen Systems ermöglichte. GFP diente dem einfachen Nachweis des Transgens.

Die Expression von cFLIP<sub>S</sub> konnte in Lymphozyten und Thymozyten anhand der Inhibition der CD95-induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Die lymphozytäre Aktivierung durch cFLIP<sub>S</sub> wies überraschend keine Beeinträchtigung auf, während nach Stimulation von Milzzellen mit Concanavalin A eine gesteigerte Proliferation von T-Lymphozyten beobachtet wurde. Dieser Effekt wurde als eine verbesserte Lymphozytenstimulation durch antigen-präsentierenden Zellen (APCs) interpretiert und konnte durch die heterologe, gemischte Leukozytenreaktion bestätigt werden. Ferner konnte in peripheren lymphatischen Organen

von älteren Mäusen eine Akkumulierung von CD11c<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, möglicherweise eine Folge verminderter Apoptose.

Interessanterweise war bei cFLIP<sub>S</sub>-Mäusen die *in vitro* Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen in Dendritischen Zellen und Makrophagen geringfügig gestört, während *in vivo* die Anzahl reifer APCs erhöht war. CFLIP<sub>S</sub> besitzt daher vermutlich durch unbekannte Signalwege in den einzelnen Stadien der Differenzierung von APCs eine unterschiedliche Funktion.

Diese Arbeit zeigte eine neue Funktion des Todesrezeptorsignalwegs in Zellen der myeloiden Reihe, die während der adaptiven Immunantwort für die Interaktion von APCs und T-Zellen von Bedeutung ist.

Stichwörter:

Apoptose, FLIP, Todesrezeptor, CD95, Fas, DISC, DED, DD, APC, Caspase, TNF

## Abstract

Cell death by apoptosis is an important regulatory mechanism in multicellular organisms. Apoptosis can be initiated by specialized intracellular signalling pathways. One of these pathways follows the activation of death receptors (DR) on the surface of human and mammalian cells. Moreover, components of this signalling pathway have been shown to be involved in cell differentiation but the relevance of this in cells of the immune system remains controversial. This study investigated the characterization of a transgenic mouse that over expresses in hematopoietic cells an inhibitor of FasL induced apoptosis and possibly differentiation: cFLIP<sub>S</sub>.

In addition to CD95 (Fas, Apo-1) seven other DRs have been identified. Ligation of Fas Ligand by CD95 causes the association of the death inducing signalling complex (DISC). The DISC consists of intracellular proteins containing death effector domains such as pro-caspase-8 and splice variants of cFLIP. Activation by auto proteolysis of pro-caspase-8 at the DISC can be modulated by the cFLIP proteins in different ways: whereas cFLIP<sub>S</sub> inhibits the recruitment of pro-caspase-8 at the DISC, cFLIP<sub>L</sub> seems to be competent not only to inhibit but also to activate pro-caspase-8, depending on its intracellular concentration.

Furthermore, non-apoptotic functions of the DR signalling pathways involved in both cell activation and differentiation are of significant importance.

In this research a transgenic mouse was generated by inserting a fusion gene of cFLIP<sub>S</sub> and the green fluorescent protein (GFP). This fusion gene was under the control of the *vav* promoter that drives expression restricted to hematopoietic cells. The expression of cFLIP<sub>S</sub> in lymphocytes and thymocytes was demonstrated by showing the inhibition of CD95 induced apoptosis. Surprisingly, the activation of lymphocytic subpopulations was not affected by cFLIP<sub>S</sub>, whereas the stimulation of unsorted spleen cells by the mitogen Concanavalin A resulted in an enhanced proliferation of T-lymphocytes. This effect was likely due to an improved stimulation of T-cells by antigen presenting cells (APCs) and was confirmed in a heterologous, mixed leukocyte reaction. Furthermore, an accumulation of CD11c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells was observed in peripheral lymphoid organs of older mice, potentially a result of reduced apoptosis. Interestingly, *in vitro*, the over expression of cFLIP<sub>S</sub> impaired the differentiation of bone marrow cells into dendritic cells and macrophages, whereas *in vivo* the number of mature APCs was increased. Therefore, cFLIP<sub>S</sub> might at various stages of the differentiation of APCs have altered functions.

This work demonstrated a new feature of the DR signalling pathway in cells of the myeloid lineage, which is particularly important for the interaction of APCs and T-cells and may thus impact on the adaptive immune response.

Keywords:

Apoptosis, FLIP, death receptor, CD95, Fas, DISC, DED, DD, APC, Caspase, TNF

## Literaturverzeichnis

- ACEHAN, D., JIANG, X., MORGAN, D. G., HEUSER, J. E., WANG, X. & AKEY, C. W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9, 423-32.
- ADACHI, M., SUEMATSU, S., SUDA, T., WATANABE, D., FUKUYAMA, H., OGASAWARA, J., TANAKA, T., YOSHIDA, N. & NAGATA, S. 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2131-6.
- ALAM, A., COHEN, L. Y., AOUAD, S. & SEKALY, R. P. 1999. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med*, 190, 1879-90.
- ALNEMRI, E. S., LIVINGSTON, D. J., NICHOLSON, D. W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N. A., WONG, W. W. & YUAN, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- ARAVIND, L., DIXIT, V. M. & KOONIN, E. V. 1999. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, 24, 47-53.
- ASHANY, D., SAVIR, A., BHARDWAJ, N. & ELKON, K. B. 1999. Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway. *J Immunol*, 163, 5303-11.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ASHKENAZI, A., PAI, R. C., FONG, S., LEUNG, S., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S. A., BLACKIE, C., CHANG, L., MCMURTREY, A. E., HEBERT, A., DEFORGE, L., KOUMENIS, I. L., LEWIS, D., HARRIS, L., BUSSIÈRE, J., KOEPPEN, H., SHAHROKH, Z. & SCHWALL, R. H. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104, 155-62.
- BAO, Q. & SHI, Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14, 56-65.
- BARTKE, T., SIEGMUND, D., PETERS, N., REICHWEIN, M., HENKLER, F., SCHEURICH, P. & WAJANT, H. 2001. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene*, 20, 571-80.
- BAUD, V. & KARIN, M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11, 372-7.
- BAUER, A., VILLUNGER, A., LABI, V., FISCHER, S. F., STRASSER, A., WAGNER, H., SCHMID, R. M. & 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.
- BEVAN, M. J. & FINK, P. J. 2001. The CD8 response on autopilot. *Nat Immunol*, 2, 381-2.
- BLANCHARD, H., KODANDAPANI, L., MITTL, P. R., MARCO, S. D., KREBS, J. F., WU, J. C., TOMASELLI, K. J. & GRUTTER, M. G. 1999. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure*, 7, 1125-33.
- BLEACKLEY, R. C. 2005. A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing. *Biochem Cell Biol*, 83, 747-51.
- BOATRIGHT, K. M., DEIS, C., DENAULT, J. B., SUTHERLIN, D. P. & SALVESEN, G. S. 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J*, 382, 651-7.
- BOATRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 725-31.
- BOISSONNAS, A., BONDUELLE, O., LUCAS, B., DEBRE, P., AUTRAN, B. & COMBADIÈRE, B. 2002. Differential requirement of caspases during naive T cell proliferation. *Eur J Immunol*, 32, 3007-15.
- BUDD, R. C. 2002. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest*, 109, 437-41.
- BUDD, R. C., YEH, W. C. & TSCHOPP, J. 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol*, 6, 196-204.
- BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X. & WANG, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 269-90.
- CANALE, V. C. & SMITH, C. H. 1967. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr*, 70, 891-9.
- CHAN, F. K., CHUN, H. J., ZHENG, L., SIEGEL, R. M., BUI, K. L. & LENARDO, M. J. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351-4.

CHANG, D. W., XING, Z., CAPACIO, V. L., PETER, M. E. & YANG, X. 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J*, 22, 4132-42.

CHANG, D. W., XING, Z., PAN, Y., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., BARNHART, B. C., YAISH-OHAD, S., PETER, M. E. & 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., MIRTOSOS, 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. & 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. & 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.

CHUN, H. J., ZHENG, L., AHMAD, M., WANG, J., SPEIRS, C. K., SIEGEL, R. M., DALE, J. K., PUCK, J., DAVIS, J., HALL, C. G., SKODA-SMITH, S., ATKINSON, T. P., STRAUS, S. E. & LENARDO, M. J. 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, 419, 395-9.

CLARKE, P. G. & CLARKE, S. 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)*, 193, 81-99.

COHEN, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 ( Pt 1), 1-16.

COHEN, P. L. & EISENBERG, R. A. 1991. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol*, 9, 243-69.

CURTSINGER, J. M., VALENZUELA, J. O., AGARWAL, P., LINS, D. & MESCHER, M. F. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol*, 174, 4465-9.

DAVIGNON, J. L., ARNOLD, L. W., COHEN, P. L. & EISENBERG, R. A. 1991. CD3 expression, modulation and signalling in T-cell subpopulations from MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Autoimmun*, 4, 831-44.

DEVITT, A., MOFFATT, O. D., RAYKUNDALIA, C., CAPRA, J. D., SIMMONS, D. L. & GREGORY, C. D. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392, 505-9.

DJERBI, M., ABDUL-MAJID, K. B., ABEDI-VALUGERDI, M., OLSSON, T., HARRIS, R. A. & GRANDIEN, A. 2003. Expression of the long form of human FLIP by retroviral gene transfer of hemopoietic stem cells exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 170, 2064-73.

DOCKRELL, D. H. 2003. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*, 9, 766-79.

DOHRMAN, A., RUSSELL, J. Q., CUENIN, S., FORTNER, K., TSCHOPP, J. & BUDD, R. C. 2005. Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol*, 175, 311-8.

DONEPUDI, M., MAC SWEENEY, A., BRIAND, C. & GRUTTER, M. G. 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*, 11, 543-9.

EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.

ECKHART, L., DECLERCQ, W., BAN, J., RENDL, M., LENGAUER, B., MAYER, C., LIPPENS, S., VANDENABEELE, P. & TSCHACHLER, E. 2000. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol*, 115, 1148-51.

ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-29.

ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & NAGATA, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43-50.

ESCHE, C., LOKSHIN, A., SHURIN, G. V., GASTMAN, B. R., RABINOWICH, H., WATKINS, S. C., LOTZE, M. T. & SHURIN, M. R. 1999. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 66, 336-44.

FERGUSON, T. A. & GRIFFITH, T. S. 2006. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev*, 213, 228-38.

GLYKOFRYDES, D., NIPHUIS, H., KUHN, E. M., ROSENWIRTH, B., HEENEY, J. L., BRUDER, J., NIEDOBITEK, G., MULLER-FLECKENSTEIN, I., FLECKENSTEIN, B. & ENSSER, A. 2000. Herpesvirus saimiri vFLIP provides an antiapoptotic function but is not essential for viral replication, transformation, or pathogenicity. *J Virol*, 74, 11919-27.

- GOGVADZE, V., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 639-47.
- GOLKS, A., BRENNER, D., KRAMMER, P. H. & LAVRIK, I. N. 2006. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med*, 203, 1295-305.
- GOODELL, E. M., STOLTENBORG, J. K. & BOWERS, W. E. 1987. Accessory cell dependent T lymphocyte proliferation: potent activity of dendritic cells. *Immunobiology*, 174, 30-42.
- GREENBERG, A. H. 1996. Activation of apoptosis pathways by granzyme B. *Cell Death Differ*, 3, 269-74.
- GRIFFITH, T. S., BRUNNER, T., FLETCHER, S. M., GREEN, D. R. & FERGUSON, T. A. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270, 1189-92.
- GUO, Y., CHEN, C., ZHENG, Y., ZHANG, J., TAO, X., LIU, S., ZHENG, D. & LIU, Y. 2005. A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death. *J Biol Chem*, 280, 41940-52.
- HACKER, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301, 5-17.
- HACKER, G., BAUER, A. & VILLUNGER, A. 2006. Apoptosis in Activated T Cells: What Are the Triggers, and What the Signal Transducers? *Cell Cycle*, 5.
- HAN, D. K., CHAUDHARY, P. M., WRIGHT, M. E., FRIEDMAN, C., TRASK, B. J., RIEDEL, R. T., BASKIN, D. G., SCHWARTZ, S. M. & HOOD, L. 1997. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11333-8.
- HAO, Z., HAMPEL, B., YAGITA, H. & RAJEWSKY, K. 2004. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 199, 1355-65.
- HENNINO, A., BERARD, M., KRAMMER, P. H. & DEFRANCE, T. 2001. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med*, 193, 447-58.
- HILDEMAN, D. A., ZHU, Y., MITCHELL, T. C., KAPPLER, J. & MARRACK, P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol*, 14, 354-9.
- HOHLBAUM, A. M., GREGORY, M. S., JU, S. T. & MARSHAK-ROTHSTEIN, A. 2001. Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. *J Immunol*, 167, 6217-24.
- HU, S., VINCENZ, C., BULLER, M. & DIXIT, V. M. 1997. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 9621-4.
- HUA, Z. C., SOHN, S. J., KANG, C., CADO, D. & WINOTO, A. 2003. A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity*, 18, 513-21.
- INOUE, H., SHIRAKI, K., MURATA, K., SUGIMOTO, K., KAWAKITA, T., YAMAGUCHI, Y., SAITOU, Y., ENOKIMURA, N., YAMAMOTO, N., YAMANAKA, Y. & NAKANO, T. 2004. Adenoviral-mediated transfer of p53 gene enhances TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*, 14, 271-5.
- IRMLER, M., THOME, M., HAHNE, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., STEINER, V., BODMER, J. L., SCHROTER, M., BURNS, K., MATTMANN, C., RIMOLDI, D., FRENCH, L. E. & TSCHOPP, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-5.
- KAMIHIRA, S. & YAMADA, Y. 2001. Soluble Fas (APO-1/CD95) isoform in adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma*, 41, 169-76.
- KARRAY, S., KRESS, C., CUVELLIER, S., HUE-BEAUVAIS, C., DAMOTTE, D., BABINET, C. & LEVI-STRAUSS, M. 2004. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol*, 172, 2118-25.
- KATAOKA, T., BUDD, R. C., HOLLER, N., THOME, M., MARTINON, F., IRMLER, M., BURNS, K., HAHNE, M., KENNEDY, N., KOVACSOVICS, M. & TSCHOPP, J. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, 10, 640-8.
- KATAOKA, T. & TSCHOPP, J. 2004. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 24, 2627-36.
- KAWABE, Y. & OCHI, A. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature*, 349, 245-8.
- KENNEDY, N. J., KATAOKA, T., TSCHOPP, J. & BUDD, R. C. 1999. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med*, 190, 1891-6.

- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIENER, P. A., DAVIS, P. M., RANKIN, B. M., KLEBANOFF, S. J., LEDBETTER, J. A., STARLING, G. C. & LILES, W. C. 1997. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol*, 159, 1594-8.
- KIM, S. H., KIM, K., KWAGH, J. G., DICKER, D. T., HERLYN, M., RUSTGI, A. K., CHEN, Y. & EL-DEIRY, W. S. 2004. Death induction by recombinant native TRAIL and its prevention by a caspase 9 inhibitor in primary human esophageal epithelial cells. *J Biol Chem*, 279, 40044-52.
- KIMURA, M. & MATSUZAWA, A. 1994. Autoimmunity in mice bearing lprcg: a novel mutant gene. *Int Rev Immunol*, 11, 193-210.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, 14, 5579-88.
- KOENIG, U., ECKHART, L. & TSCHACHLER, E. 2001. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 1150-4.
- KREUZ, S., SIEGMUND, D., RUMPF, J. J., SAMEL, D., LEVERKUS, M., JANSSEN, O., HACKER, G., DITTRICH-BREIHOLZ, O., KRACHT, M., SCHEURICH, P. & WAJANT, H. 2004. NF-kappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol*, 166, 369-80.
- KREUZ, S., SIEGMUND, D., SCHEURICH, P. & WAJANT, H. 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 21, 3964-73.
- KRUEGER, A., SCHMITZ, I., BAUMANN, S., KRAMMER, P. H. & KIRCHHOFF, S. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 276, 20633-40.
- KUANG, A. A., DIEHL, G. E., ZHANG, J. & WINOTO, A. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 275, 25065-8.
- KULMS, D. & SCHWARZ, T. 2000. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 16, 195-201.
- LAMKANFI, M., FESTJENS, N., DECLERCQ, W., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 14, 44-55.
- LAVRIK, I., KRUEGER, A., SCHMITZ, I., BAUMANN, S., WEYD, H., KRAMMER, P. H. & KIRCHHOFF, S. 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ*, 10, 144-5.
- LEDERMAN, S., YELLIN, M. J., KRICHEVSKY, A., BELKO, J., LEE, J. J. & CHESS, L. 1992. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*, 175, 1091-101.
- LEGEMBRE, P., BARNHART, B. C., ZHENG, L., VIJAYAN, S., STRAUS, S. E., PUCK, J., DALE, J. K., LENARDO, M. & PETER, M. E. 2004. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep*, 5, 1084-9.
- LEITHAUSER, F., DHEIN, J., MECHTERSHEIMER, G., KORETZ, K., BRUDERLEIN, S., HENNE, C., SCHMIDT, A., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H. & MOLLER, P. 1993. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest*, 69, 415-29.
- 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. & 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.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. & LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- LOS, M., WESSELBORG, S. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 1999. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, 10, 629-39.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. 2004. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol*, 22, 765-87.
- MARRACK, P., KAPPLER, J. & MITCHELL, T. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med*, 189, 521-30.

- MEDEMA, J. P., SCAFFIDI, C., KISCHKEL, F. C., SHEVCHENKO, A., MANN, M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J*, 16, 2794-804.
- METCALF, D. 1977. In-vitro cloning techniques for hemopoietic cells: clinical applications. *Ann Intern Med*, 87, 483-8.
- MICHEAU, O., LENS, S., GAIDE, O., ALEVIZOPOULOS, K. & TSCHOPP, J. 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*, 21, 5299-305.
- MICHEAU, O., THOME, M., SCHNEIDER, P., HOLLER, N., TSCHOPP, J., NICHOLSON, D. W., BRIAND, C. & GRUTTER, M. G. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 277, 45162-71.
- MIGONE, T. S., ZHANG, J., LUO, X., ZHUANG, L., CHEN, C., HU, B., HONG, J. S., PERRY, J. W., CHEN, S. F., ZHOU, J. X., CHO, Y. H., ULLRICH, S., KANAKARAJ, P., CARRELL, J., BOYD, E., OLSEN, H. S., HU, G., PUKAC, L., LIU, D., NI, J., KIM, S., GENTZ, R., FENG, P., MOORE, P. A., RUBEN, S. M. & WEI, P. 2002. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*, 16, 479-92.
- NAGATA, S. 1996. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 406, 119-24.
- NAGATA, S. & GOLSTEIN, P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-56.
- NICHOLSON, D. W. & THORNBERRY, N. A. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22, 299-306.
- NUSSENZWEIG, M. C. & STEINMAN, R. M. 1980. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med*, 151, 1196-212.
- OBST, R., VAN SANTEN, H. M., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2005. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J Exp Med*, 201, 1555-65.
- OGILVY, S., ELEFANTY, A. G., VISVADER, J., BATH, M. L., HARRIS, A. W. & ADAMS, J. M. 1998. Transcriptional regulation of vav, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment. *Blood*, 91, 419-30.
- ORLINICK, J. R., VAISHNAW, A. K. & ELKON, K. B. 1999. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol*, 18, 293-308.
- PAN, G., O'ROURKE, K., CHINNAIYAN, A. M., GENTZ, R., EBNER, R., NI, J. & DIXIT, V. M. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-3.
- PARK, A. & BAICHWAL, V. R. 1996. Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J Biol Chem*, 271, 9858-62.
- PELLEGRINI, M., BATH, S., MARSDEN, V. S., HUANG, D. C., METCALF, D., HARRIS, A. W. & STRASSER, A. 2005. FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood*, 106, 1581-9.
- PERLMAN, H., PAGLIARI, L. J., GEORGANAS, C., MANO, T., WALSH, K. & POPE, R. M. 1999. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 190, 1679-88.
- POUKKULA, M., KAUNISTO, A., HIETAKANGAS, V., DENESSIOUK, K., KATAJAMAKI, T., JOHNSON, M. S., SISTONEN, L. & ERIKSSON, J. E. 2005. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem*, 280, 27345-55.
- QIAO, L., HAN, S. I., FANG, Y., PARK, J. S., GUPTA, S., GILFOR, D., AMORINO, G., VALERIE, K., SEALY, L., ENGELHARDT, J. F., GRANT, S., HYLEMON, P. B. & DENT, P. 2003. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol*, 23, 3052-66.
- RASPER, D. M., VAILLANCOURT, J. P., HADANO, S., HOUTZAGER, V. M., SEIDEN, I., KEEN, S. L., TAWA, P., XANTHOUDAKIS, S., NASIR, J., MARTINDALE, D., KOOP, B. F., PETERSON, E. P., THORNBERRY, N. A., HUANG, J., MACPHERSON, D. P., BLACK, S. C., HORNUNG, F., LENARDO, M. J., HAYDEN, M. R., ROY, S. & NICHOLSON, D. W. 1998. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, 5, 271-88.
- RESCIGNO, M., PIGUET, V., VALZASINA, B., LENS, S., ZUBLER, R., FRENCH, L., KINDLER, V., TSCHOPP, J. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2000. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med*, 192, 1661-8.

- RICCI, M. S., JIN, Z., DEWS, M., YU, D., THOMAS-TIKHONENKO, A., DICKER, D. T. & EL-DEIRY, W. S. 2004. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol*, 24, 8541-55.
- RIEUX-LAUCAT, F., BLACHERE, S., DANIELAN, S., DE VILLARTAY, J. P., OLEASTRO, M., SOLARY, E., BADER-MEUNIER, B., ARKWRIGHT, P., PONDARE, C., BERNAUDIN, F., CHAPEL, H., NIELSEN, S., BERRAH, M., FISCHER, A. & LE DEIST, F. 1999. Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*, 94, 2575-82.
- ROY, S., SHAROM, J. R., HOUDE, C., LOISEL, T. P., VAILLANCOURT, J. P., SHAO, W., SALEH, M. & NICHOLSON, D. W. 2008. Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4133-8.
- SADE, H., KRISHNA, S. & SARIN, A. 2004. The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem*, 279, 2937-44.
- SAKAHIRA, H., ENARI, M. & NAGATA, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-9.
- 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. & HAKEM, R. 2003. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*, 17, 883-95.
- SANFILIPPO, C. M. & BLAHO, J. A. 2003. The facts of death. *Int Rev Immunol*, 22, 327-40.
- SARASTE, A. & PULKKI, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45, 528-37.
- SAVILL, J., FADOK, V., HENSON, P. & HASLETT, C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14, 131-6.
- SCHLAPBACH, R., SPANAUS, K. S., MALIPIERO, U., LENS, S., TASINATO, A., TSCHOPP, J. & FONTANA, A. 2000. TGF-beta induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur J Immunol*, 30, 3680-8.
- SHARP, D. A., LAWRENCE, D. A. & ASHKENAZI, A. 2005. Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 19401-9.
- SHI, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 9, 459-70.
- SIEGEL, R. M., MARTIN, D. A., ZHENG, L., NG, S. Y., BERTIN, J., COHEN, J. & LENARDO, M. J. 1998. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, 141, 1243-53.
- SLEE, E. A., ADRAIN, C. & MARTIN, S. J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-6.
- SMYTH, M. J., CRETNEY, E., TAKEDA, K., WILTROUT, R. H., SEDGER, L. M., KAYAGAKI, N., YAGITA, H. & OKUMURA, K. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med*, 193, 661-70.
- SOHN, D., SCHULZE-OSTHOFF, K. & JANICKE, R. U. 2005. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 5267-73.
- STRANGES, P. B., WATSON, J., COOPER, C. J., CHOISY-ROSSI, C. M., STONEBRAKER, A. C., BEIGHTON, R. A., HARTIG, H., SUNDBERG, J. P., SERVICK, S., KAUFMANN, G., FINK, P. J. & CHERVONSKY, A. V. 2007. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity*, 26, 629-41.
- SUHARA, T., MANO, T., OLIVEIRA, B. E. & WALSH, K. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res*, 89, 13-9.
- SULSTON, J. E. & HORVITZ, H. R. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 56, 110-56.
- TAI, T. S., FANG, L. W. & LAI, M. Z. 2004. c-FLICE inhibitory protein expression inhibits T-cell activation. *Cell Death Differ*, 11, 69-79.

- TAKAHASHI, T., TANAKA, M., BRANNAN, C. I., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., SUDA, T. & NAGATA, S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76, 969-76.
- TANG, D., LAHTI, J. M. & KIDD, V. J. 2000. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 275, 9303-7.
- TARTAGLIA, L. A., AYRES, T. M., WONG, G. H. & GOEDDEL, D. V. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 845-53.
- THOMAS, W. D. & HERSEY, P. 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol*, 161, 2195-200.
- THOME, M. 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol*, 4, 348-59.
- THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., FICKENSCHER, H., MEINL, E., NEIPEL, F., MATTMANN, C., BURNS, K., BODMER, J. L., SCHROTER, M., SCAFFIDI, C., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. & TSCHOPP, J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 386, 517-21.
- THOMPSON, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- THORBURN, A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 16, 139-44.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.
- TRAUTH, B. C., KLAS, C., PETERS, A. M., MATZKU, S., MOLLER, P., FALK, W., DEBATIN, K. M. & KRAMMER, P. H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301-5.
- TROEGER, A., SCHMITZ, I., SIEPERMANN, M., GLOUCHKOVA, L., GERDEMANN, U., JANKA-SCHAUB, G. E., SCHULZE-OSTHOFF, K. & DILLOO, D. 2007. Up-regulation of c-FLIPs+R upon CD40 stimulation is associated with inhibition of CD95-induced apoptosis in primary precursor B-ALL. *Blood*, 110, 384-7.
- TRUMP, B. F., BEREZESKY, I. K., CHANG, S. H. & PHELPS, P. C. 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*, 25, 82-8.
- TSEVELEKI, V., BAUER, J., TAOUFIK, E., RUAN, C., LEONDIADIS, L., HARALAMBOUS, S., LASSMANN, H. & PROBERT, L. 2004. Cellular FLIP (long isoform) overexpression in T cells drives Th2 effector responses and promotes immunoregulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 173, 6619-26.
- TSUBATA, T., WU, J. & HONJO, T. 1993. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature*, 364, 645-8.
- VAN KOOTEN, C. & BANCHEREAU, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67, 2-17.
- VAN PARIJS, L., REFAELI, Y., ABBAS, A. K. & 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. & 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.
- VAUX, D. L. & FLAVELL, R. A. 2000. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 719-24.
- VAUX, D. L. & KORSMEYER, S. J. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96, 245-54.
- VELLA, A. T., DOW, S., POTTER, T. A., KAPPLER, J. & MARRACK, P. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3810-5.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K. & SCHEURICH, P. 2003a. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 53-66.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K. & SCHEURICH, P. 2003b. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
- WALCZAK, H., DEGLI-ESPOSTI, M. A., JOHNSON, R. S., SMOLAK, P. J., WAUGH, J. Y., BOIANI, N., TIMOUR, M. S., GERHART, M. J., SCHOOLEY, K. A., SMITH, C. A., GOODWIN, R. G. & RAUCH, C. T. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J*, 16, 5386-97.

- WANG, J., ZHENG, L., LOBITO, A., CHAN, F. K., DALE, J., SNELLER, M., YAO, X., PUCK, J. M., STRAUS, S. E. & LENARDO, M. J. 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, 98, 47-58.
- WANG, W., PRINCE, C. Z., MOU, Y. & POLLMAN, M. J. 2002. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 21723-9.
- WOELFEL, M., BIXBY, J., BREHM, M. A. & CHAN, F. K. 2006. Transgenic expression of the viral FLIP MC159 causes *lpr/gld*-like lymphoproliferation and autoimmunity. *J Immunol*, 177, 3814-20.
- WONG, P. & PAMER, E. G. 2003. Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity*, 18, 499-511.
- WU, J., WILSON, J., HE, J., XIANG, L., SCHUR, P. H. & MOUNTZ, J. D. 1996. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest*, 98, 1107-13.
- WU, Z., ROBERTS, M., PORTER, M., WALKER, F., WHERRY, E. J., KELLY, J., GADINA, M., SILVA, E. M., DOSREIS, G. A., LOPES, M. F., O'SHEA, J., LEONARD, W. J., AHMED, R. & SIEGEL, R. M. 2004. Viral FLIP impairs survival of activated T cells and generation of CD8+ T cell memory. *J Immunol*, 172, 6313-23.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F. & CURRIE, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- YEH, J. H., HSU, S. C., HAN, S. H. & LAI, M. Z. 1998a. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med*, 188, 1795-802.
- YEH, W. C., ITIE, A., ELIA, A. J., NG, M., SHU, H. B., WAKEHAM, A., MIRTOSOS, C., SUZUKI, N., BONNARD, M., GOEDDEL, D. V. & 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. & MAK, T. W. 1998b. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279, 1954-8.
- YIN, Q., PARK, H. H., CHUNG, J. Y., LIN, S. C., LO, Y. C., DA GRACA, L. S., JIANG, X. & WU, H. 2006. Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell*, 22, 259-68.
- YIN, X. M. 2000. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*, 10, 161-7.
- YONEHARA, S., ISHII, A. & YONEHARA, M. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 169, 1747-56.
- ZHANG, J., CADDO, D., CHEN, A., KABRA, N. H. & WINOTO, A. 1998. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392, 296-300.
- ZHANG, N. & HE, Y. W. 2005. An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med*, 202, 395-404.
- ZHONG, F., DAVIS, M. C., MCCOLL, K. S. & DISTELHORST, C. W. 2006. Bcl-2 differentially regulates Ca<sup>2+</sup> signals according to the strength of T cell receptor activation. *J Cell Biol*, 172, 127-37.
- ZHU, Y., LIU, X., HILDEMAN, D., PEYERL, F. W., WHITE, J., KUSHNIR, E., KAPPLER, J. & MARRACK, P. 2006. Bax does not have to adopt its final form to drive T cell death. *J Exp Med*, 203, 1147-52.
- ZHU, Y., SWANSON, B. J., WANG, M., HILDEMAN, D. A., SCHAEFER, B. C., LIU, X., SUZUKI, H., MIHARA, K., KAPPLER, J. & MARRACK, P. 2004. Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7681-6.

## Widmung & Danksagung

Meinem Opa, *Dr. med. Otto Bader*,

Meinen Eltern, *Paul* und *Dr. med. Gerda Brand*,

Meinem Bruder, *Roger Brand*,

Meiner Schwester, *Dr. med. Karen Tiemann*,

Meinem Patenkind, *Nicolas Brand*,

Meiner Familie, *Dr. Sandra Brand*, *Johannes Brand*, *Dominique Brand*, *Holger Tiemann*,  
*Frau Anita Hillmann*

Meiner Großfamilie,

Meinen Freunden, stellvertretend *Eva Grogro*, *Dr. med. Konstantinos Dimitriadis*, *Jonas Zopf*,  
*Felix Rübcke*, *Patrick Schunter*, *Ana Jardon Alvarez*, *Florian Karner*, *Mathias Bü-*  
*low*, *Dr. med. Christine Klasen*, *Benigno Varela*, *Dirk Möllmeier*, *Karoline Hehl-*  
*mann*, *Axel Wodrich*, *Christoph Schell*, *Familie Fehrenbach*, *Familie Breinlinger*,  
*Holger Knorn*, *Marc Bürgel*, *Paul Kreuter*, *Wolfgang Eichhorn*, *Katrin Sattlegger*,  
*Katharina Fitzthum*, *Michael Weiler*, *Anne Pfleger*, *Sebastian Zopf*, *Bela Buzasi*  
und allen anderen, die hier nicht aufgeführt sind,

den Mitgliedern des Labors, insbesondere *Svetla Chaneva* und *Stephie Potthoff*,

und meinem Mentor und Doktorvater *Prof. Dr. med. Georg Häcker*

für vorbehaltlose Unterstützung und Motivation,

persönlich und fachspezifisch,

auch in störrischen Phasen der Arbeit,

in der ich vermutlich nicht immer der angenehmste Zeitgenosse war.

## Lebenslauf

Geburtsdatum 16.05.1981  
Geburtsort Scherzingen (CH)  
Nationalität Deutsch  
Email volker.brand@mytum.de

### AUSBILDUNG

---

Seit 11/2009 **Assistenzarzt Innere Medizin**, Innenstadt-Klinikum der LMU München  
05/2006 – 12/2009 **Dissertation**, Institut für Mikrobiologie und Immunologie der TUM  
04/2005 – 07/2009 **Medizin**, Technische Universität München (TUM)  
08/2002 – 03/2005 **Medizin**, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
10/2001 – 04/2002 **Europäische Wirtschaft**, Otto-Friedrich-Universität Bamberg  
08/1991 – 06/2000 **Abitur**, Ev. Gymnasium Schloss Gaienhofen

### STIPENDIEN & AUSZEICHNUNGEN

---

05/2004 – 06/2009 **Stipendiat der Stiftung der Deutschen Wirtschaft (SDW)**  
06/2008 – 07/2008 **Stipendium** der TUM für das **Weill Cornell Medical College**  
11/2007 – 07/2008 **Stipendiat der Carl Duisberg Stiftung**

### ARBEITSERFAHRUNG

---

06/2008 – 07/2008 **Innere Medizin** (PJ, Tertial 3.2), New York Presbyterian Hospital, Weill Cornell Medical College, Cornell University, USA  
04/2008 – 05/2008 **Innere Medizin** (PJ, Tertial 3.1), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, USA  
01/2008 – 03/2008 **Orthopädie und Unfallchirurgie** (PJ, Tertial 2), Schulthess Klinik, Universität Zürich, Schweiz  
10/2007 – 12/2007 **Chirurgie** (PJ, Tertial 1.2), Queen Mary Hospital, Hong Kong University, SAR Hong Kong  
08/2008 – 09/2007 **Chirurgie** (PJ, Tertial 1.1), St. James Hospital, Trinity College Dublin, Irland  
03/2006 – 04/2006 **Herz- und Thoraxchirurgie** (Famulatur), Groote Schuur Hospital, University of Cape Town, Südafrika  
09/2005 – 10/2005 **Kardiologie** (Famulatur), AIMS Hospital Cochin, Amrita Institute of Medical Sciences, Indien  
08/2005 – 09/2005 **Allgemein- und Notfallmedizin** (Famulatur), Pasam Trust Medical Center, Kodaikanal, Indien  
09/2004 – 10/2004 **Anästhesie und Intensivmedizin** (Famulatur), LMU München  
07/2000 – 05/2001 **Interventionelle Kardiologie** (Wehrersatzdienst), Herzzentrum Bad Krozingen: Entwicklung kardiologischer Diagnosesoftware

