

**Die Überexpression des anti-apoptischen Proteins c-FLIP_L
verhindert die CD95-vermittelte Abtötung von T-Zellen
durch Tumorzellen mit konstitutiver CD95L-Expression**

Ein neuer Ansatz für die Immuntherapie des Kolonkarzinoms

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Bettina Gansneder
aus Bochum

Institut für Anthropologie und Humangenetik

18. April 2001

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg unter Anleitung von Dr. Sabine Wölle durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. E. H. Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. C. N. David

Sondervotum: Dr. S. Wölle

Tag der Einreichung bei der Fakultät für Biologie: 18. April 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2001

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Apoptose	1
1.1.1	Charakteristika der Apoptose und Abgrenzung zur Nekrose	1
1.1.2	Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie	2
1.1.2.1	Mitglieder der TNF-R-Familie.....	2
1.1.2.2	Die Subfamilie der „Todesrezeptoren“	3
1.1.3	Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie	4
1.2	Das CD95/CD95-Ligand-System	5
1.2.1	Entdeckung und Eigenschaften	5
1.2.2	Biologische Funktion.....	6
1.2.3	Die Signalkaskade des CD95-Rezeptors	7
1.2.3.1	Ausbildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes („DISC“)... ..	7
1.2.3.2	Weiterleitung des apoptotischen Signals durch Caspasen	9
1.2.3.3	Typ-I- und Typ-II-Zellen.....	12
1.2.4	Regulierung der CD95-vermittelten Apoptose über c-FLIP.....	14
1.3	Apoptose und Tumorentstehung.....	17
1.3.1	Passive Mechanismen	17
1.3.2	Aktive Mechanismen : Expression des CD95L-Proteins	17
1.4	Klinische Bedeutung des Kolonkarzinoms	20
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Puffer.....	23
2.1.3	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	24
2.1.4	Kulturmedien und Medienzusätze	25
2.1.4.1	Kulturmedien für Bakterien	25
2.1.4.2	Antibiotika.....	25
2.1.4.3	Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen.....	25
2.1.4.4	Zellkulturzusätze	25
2.1.5	Biologisches Material	26
2.1.5.1	Zelllinien	26
2.1.5.2	Bakterienstämme	26
2.1.6	Plasmide	26
2.1.7	Oligonukleotide	27
2.1.8	Enzyme	27
2.1.9	Antikörper.....	28
2.1.9.1	Primäre Antikörper	28
2.1.9.2	Sekundäre Antikörper	28
2.1.10	Agonistische und antagonistische Antikörper	29
2.1.11	Geräte.....	29
2.1.12	Verbrauchsmaterial	29

2.2 Methoden	30
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNS	30
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.1.3 Subklonierung von DNS-Fragmenten in Plasmide	30
2.2.1.3.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNS	30
2.2.1.3.3 Dephosphorylierung kohäsiver Restriktionsenzymststellen	31
2.2.1.3.4 Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.1.3.5 Ligation	31
2.2.1.3.6 Präparation kompetenter Bakterien	31
2.2.1.3.7 Transformation kompetenter Bakterien	32
2.2.1.3.8 PCR-Analyse von Bakterien auf rekombinante Plasmid-DNS	32
2.2.1.3.9 Langzeitlagerung von Bakterien	32
2.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNS	33
2.2.1.5 Erststrang-cDNS-Synthese („Reverse Transkription“)	33
2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.1.7 Sequenzanalyse	34
2.2.1.7.1 Sequenzierreaktion nach der Strangabbruchmethode	34
2.2.1.7.2 Sequenz-Gelelektrophorese	34
2.2.2 Methoden zur Analyse von Proteinen	35
2.2.2.1 Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription/Translation	35
2.2.2.2 Gesamtproteinextraktion aus Zellen	35
2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten	35
2.2.2.4 Immunpräzipitation	36
2.2.2.5 Protein-Gelelektrophorese und „Western Blot“	36
2.2.3 Zellbiologische Methoden	37
2.2.3.1 Zellkultur	37
2.2.3.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen	38
2.2.3.3 Abtrennung toter Zellen	38
2.2.3.4 Stimulierung von Zellen	38
2.2.3.5 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Lipofektion	39
2.2.3.6 Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und Infektion eukaryontischer Zelllinien	39
2.2.3.7 Durchflusszytometrie („FACS-Analyse“)	39
2.2.3.8 Isolierung stabil infizierter Klone	40
2.2.3.8.1 Anreicherung infizierter Zellen mittels magnetischer Zellsortierung	40
2.2.3.8.2 Zellklonierung mittels Einzelzellablage (FACS-Sortierung)	40
2.2.3.9 Markierung von Zellen mittels PKH-26	41
2.2.3.10 Kokultivierungen	41
2.2.4 Apoptosetechniken	42
2.2.4.1 Methoden für die Induktion der Apoptose	42
2.2.4.1.1 Apoptoseinduktion mittels agonistischer Anti-CD95-Antikörper	42
2.2.4.1.2 Apoptoseinduktion mittels rekombinantem CD95-Ligand	42
2.2.4.2 Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Apoptose	42
2.2.4.2.1 „Annexin-V-Test“	42

2.2.4.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.2.4.2.3	Enzym-gekoppelter Nachweis zytoplasmatischer, fragmentierter DNS	43
2.2.5	Statistische Auswertungen	44
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Klonierung und Sequenzierung der c-FLIP _L -cDNS	46
3.1.1	Klonierung der c-FLIP _L -cDNS in den Expressionsvektor pWW15	46
3.1.2	Sequenzierung der c-FLIP _L -cDNS	47
3.2	Nachweis der Funktionalität der klonierten c-FLIP _L -cDNS durch gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription/Translation	48
3.3	Herstellung verschiedener retroviraler Expressionsvektoren für c-FLIP _L	49
3.3.1	Konstruktion des retroviralen Vektors pLMCF	49
3.3.2	Konstruktion des retroviralen Vektors pLFCM	52
3.4	Etablierung und Klonierung stabiler c-FLIP _L -Protein-exprimierender Zellen	54
3.4.1	Transiente Transfektion der ekotropen Verpackungszelllinie E86	54
3.4.2	Infektion der amphotropen Verpackungszelllinie HSRBM01	54
3.4.2.1	Klonierung infizierter HSRBM01-Zellen	55
3.4.2.2	Nachweis der Expression des Reporterproteins LNGFR in klonierten HSRBM01-Zellen	55
3.4.2.3	Nachweis der c-FLIP _L -Proteinexpression in klonierten HSRBM01-Zellen	57
3.4.3	Retroviraler Gentransfer der c-FLIP _L -cDNS in T-Zelllinien	58
3.4.3.1	Klonierung infizierter H9- und Jurkat-Zellen	59
3.4.3.2	Nachweis der LNGFR-Expression in klonierten H9- und Jurkat-Zellen	59
3.4.3.3	Nachweis des c-FLIP _L -Proteins in klonierten H9- und Jurkat-Zellen	61
3.5	Untersuchung der zellbiologischen Wirkungsweise des c-FLIP _L -Proteins	64
3.5.1	Untersuchung der CD95-Expression in H9- und Jurkat-Zellen	64
3.5.2	Charakterisierung der Apoptosesensitivität mit dem ‚Annexin-V-Test‘	66
3.5.2.1	Untersuchung der Apoptosesensitivität von untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen	66
3.5.2.2	Beeinflussung der Apoptosesensitivität durch rekombinante Expression des c-FLIP _L -Proteins	70
3.5.3	Untersuchung der Spaltung von Caspase-8	74
3.5.3.1	Spaltung von Caspase-8 in untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen ..	74
3.5.3.2	Beeinflussung der Spaltung von Caspase-8 durch rekombinante Expression des c-FLIP _L -Proteins	76
3.5.4	Charakterisierung der Apoptosesensitivität von c-FLIP _L -transduzierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	78
3.5.5	Rekombinanter CD95-Ligand als Apoptosestimulus	80
3.5.5.1	Untersuchung der Apoptosesensitivität in untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen	80
3.5.5.2	Beeinflussung der Apoptosesensitivität durch rekombinante Expression des c-FLIP _L -Proteins	85
3.6	Relevanz der Expression von CD95-Ligand in Kolonkarzinomzelllinien	89
3.6.1	Untersuchung der CD95L-mRNS-Expression in Kolonkarzinomzelllinien	89
3.6.2	Untersuchung der CD95L-Proteinexpression in Kolonkarzinomzelllinien	91

3.6.3 Kokultivierung der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 mit den T-Zelllinien H9 und Jurkat	93
3.6.3.1 Nachweis der Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien bei Kokultivierung mit den Kolonkarzinomzelllinien mittels ‚Annexin-V-Test‘	93
3.6.3.2 Überexpression des c-FLIP _L -Proteins beeinflusst die Apoptosesensitivität der T-Zelllinien bei Kokultivierung mit den Kolonkarzinomzelllinien	96
3.6.3.3 Bestätigung der Ergebnisse des ‚Annexin-V-Test‘ mittels Nachweis der DNS-Fragmentierung	100
3.6.4 Blockierung der CD95-vermittelten Apoptose in den T-Zelllinien mit einem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper	102
3.7 Vergleichende Untersuchungen der Primärtumorzelllinie SW480 und der Metastasenzelllinie SW620	106
3.7.1 CD95-Expressionsstatus verschiedener Kolonkarzinomzelllinien	106
3.7.2 Beobachtungen in der Zellkultur	108
3.7.3 Untersuchung der Sensitivität der Kolonkarzinomzelllinien gegenüber CD95-vermittelter Apoptose	110
4 DISKUSSION	111
4.1 Effekte unterschiedlicher Apoptosestimulanzen	111
4.2 Nachweis der anti-apoptotischen Wirkung von c-FLIP _L	113
4.2.1 Korrelation der Apoptosesensitivität mit der relativen Expressionsstärke des c-FLIP _L -Proteins	113
4.2.2 Einfluss des c-FLIP _L -Proteins auf die Spaltung von Caspase-8	116
4.3 Nachweis der CD95L-mRNS und des CD95L-Proteins in Kolonkarzinomen	117
4.4 Kolonkarzinomzellen können in T-Zellen Apoptose induzieren	119
4.4.1 Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion	119
4.4.2 c-FLIP _L blockiert die Apoptoseinduktion	122
4.4.3 CD95L ist an der Apoptoseinduktion beteiligt	122
4.5 Kolonkarzinomzellen entwickeln eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose und zeigen ein verändertes Proliferationsverhalten	125
5 HYPOTHESEN UND AUSBLICK	126
5.1 Entwicklung einer Modellvorstellung für die Entstehung und Progression von CD95L-exprimierenden Tumoren am Beispiel des Kolonkarzinoms	126
5.2 Konventionelle Chemotherapie und das CD95/CD95L-System: ein zweischneidiges Schwert	131
5.3 Ausblick und Entwicklung eines Therapieansatzes mit dem anti-apoptotischen Protein c-FLIP _L	132
6 ZUSAMMENFASSUNG	134
7 LITERATURVERZEICHNIS	136
8 ANHANG	147
8.1 Abkürzungen	147
8.2 Vergleich der Protein-Sequenzen von FLIP-Proteinen und Caspase-8	148
8.3 cDNS- und Protein-Sequenz der klonierten c-FLIP _L -cDNS	149
8.4 Vektorkarte und cDNS-/Protein-Sequenz der klonierten LNGFR-cDNS	151

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Charakteristika der Apoptose und Abgrenzung zur Nekrose

Multizelluläre Organismen verfügen über einen streng regulierten intrinsischen Mechanismus zur schnellen und selektiven Entfernung überflüssiger, fehlentwickelter oder potentiell schädigender Zellen, der als programmierter Zelltod (Apoptose, *Apoptosis* (gr.): „*Fallende Blätter*“) bezeichnet wird. Die Studien von Kerr *et al.*, 1972 zeigten, dass diese physiologische Form des Zelltods während der Embryonalentwicklung und Gewebereorganisation, aber auch bei der Regulation der Immunantwort, der Eliminierung autoreaktiver Immunzellen und der Tumorrogression eine wichtige Rolle spielt.

Apoptotische Zellen sind durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet. Hierzu gehören blasige Veränderungen der Plasmamembran (*membrane blebbing*) und eine starke Abnahme des Zellvolumens (Wyllie *et al.*, 1980). Aufgrund dessen verlieren die Zellen den Kontakt zu den Nachbarzellen und treten in eine Phase ein, die als Zeiose bezeichnet wird. Während der Zeiose findet die Auflösung der Kernmembran, sowie die Kondensierung und anschließende Fragmentierung des Chromatins statt (Wyllie *et al.*, 1984). Einhergehend mit den morphologischen Veränderungen erfolgt im Verlauf der Apoptose auf molekularer Ebene ein Verlust der Membranasymmetrie durch Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) auf die Membranaußenseite (Fadok *et al.*, 1992) und die Aktivierung endogener Proteinasen und Nukleasen (Wyllie, 1980; Duke *et al.*, 1983). Die beobachtete Destabilisierung der Kernmembran und die Kondensation des Chromatins werden durch die Proteolyse der DNS-Gerüstkomponente Lamin verursacht. Anschließend folgt die Degradierung der Kern-DNS durch DNasen, welche die DNS in den internukleosomalen Regionen spalten (Sakahira *et al.*, 1998). Dadurch entstehen DNS-Fragmente mit einer Größe von 200 bp und Vielfachen dieser internukleosomalen Fragmente, die bei gelelektrophoretischer Auftrennung eine charakteristische „Leiterbildung“ (*DNA laddering*) erzeugen. In der Endphase des programmierten Zelltods werden die Zellorganellen in einzelne intakte Vesikel eingeschlossen, die als „apoptotische Körperchen“ (*apoptotic bodies*) bezeichnet werden. Diese werden anschließend von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut. Die Identifizierung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein auf apoptotischen Zellen exprimiertes Thrombospondin-bindendes Protein durch einen Komplex aus dem Vitronektin-Rezeptor, CD36 und Thrombospondin auf der Oberfläche von Phagozyten erkannt wird (Savill *et al.*, 1990; Savill *et al.*, 1993). Ein weiterer möglicher Erkennungsmechanismus könnte das im Verlauf der Apoptose auf die Membranaußenseite translozierte PS darstellen, das von Makrophagen über den PS-Rezeptor gebunden wird (Fadok *et al.*, 2000). Abbildung 1 zeigt die morphologischen Charakteristika apoptotischer Zellen.

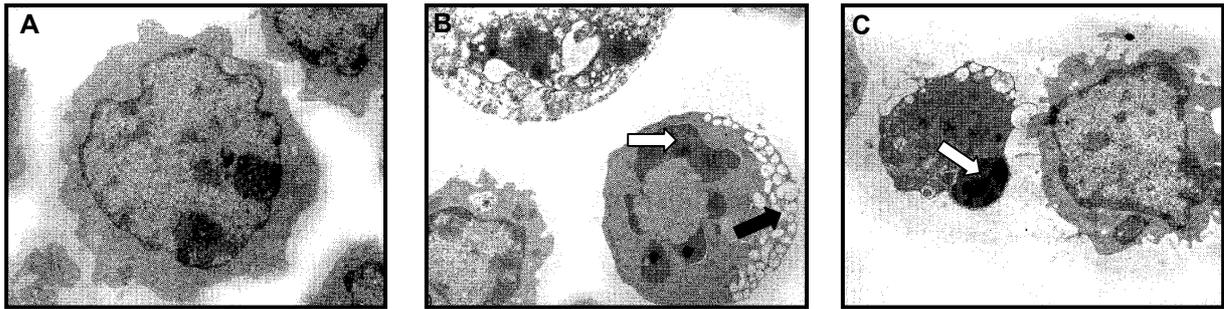


Abbildung 1: **Mikroskopische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der verschiedenen Phasen des Apoptoseprozesses (aus Janeway and Travers, 1997)**

A: Lebende Zelle mit normalem Kern

B: In einem frühen Apoptosestadium erfolgt eine Kondensation des Chromatins (weißer Pfeil) einhergehend mit blasigen Veränderungen der Zellmembran (schwarzer Pfeil)

C: In einer späten Phase der Apoptose weisen Zellen einen stark kondensierten Zellkern auf (weißer Pfeil); durch die Freisetzung von Membranvesikeln tritt eine starke Zellschrumpfung ein

Alle Vergrößerungen: 3500-fach

Von dem geregelten Prozess der Apoptose unterscheidet man eine weitere Form des Zelltods, die bei mechanischen oder chemischen Verletzungen von Zellen oder Geweben (z.B. Strahlung, Sauerstoffmangel oder Chemikalieneinfluss) auftritt und als Nekrose bezeichnet wird. Nekrotische Zellen sind durch ein starkes Anschwellen des Zellkörpers charakterisiert und weisen geschädigte Organellen auf. Im Gegensatz zur Apoptose, bei der die Integrität der Zellmembran bis zur Phagozytose gewahrt bleibt, resultiert nekrotischer Zelltod in einem Zerfall der Zelle einhergehend mit einer Entleerung des Zellinhalts. Die Zellreste werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut. Ausgelöst durch die Freisetzung zellulärer Enzyme und Metaboliten ist der Nekroseprozeß im Unterschied zur Apoptose von einer Entzündungsreaktion begleitet.

1.1.2 Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie

1.1.2.1 Mitglieder der TNF-R-Familie

Die Mitglieder der TNF-R-Familie gehören zur Kategorie der Typ-I-Transmembranproteine und zeichnen sich durch mehrere extrazelluläre Cystein-reiche Domänen (CRD) aus (Tabelle 1). Mitglieder dieser Familie üben abhängig vom Zelltyp und anderen Signalen pleiotrope Funktionen aus. Neben der Induktion der Zellproliferation, Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und der Genexpression spielen einige dieser Moleküle auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort und der Auslösung des apoptotischen Zelltodprogramms (Nagata, 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998). Die Rezeptormoleküle liegen nach Bindung ihres Liganden in Form von trimeren oder multimeren Komplexen vor, die durch Disulfid-Brücken zwischen den CRD stabilisiert werden. Ein Teil der Proteine kommt auch in einer löslichen Form vor, die durch Abspaltung des extrazellulären Anteils der Rezeptoren oder durch alternatives Spleißen entsteht (als Übersichtsartikel s. Gruss und Dower, 1995).

Mitglieder der TNF-R-Familie	Anzahl der CRD
TNF-R II	4
TNF-RP	4
CD40	4
CD30	5
LT β -R	4
CD27 (Dimer)	2x3
4-1 BB	4
GITR	3
RANK	4
ATAR	3
HVEM	3
OPG	3
CD134 (OX40)	4

Tabelle 1: Mitglieder der TNF-R-Familie

TNF-R: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor; **TNF-RP:** *tumor-necrosis-factor-receptor-related protein*; **LT β -R:** Lymphotoxin β -Rezeptor; **GITR:** *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related receptor*; **RANK:** *receptor activator of nuclear factor- κ B*; **OPG:** Osteoprotegerin; **ATAR:** "another TRAF-associated receptor"; **HVEM:** *herpes virus entry mediator*

1.1.2.2 Die Subfamilie der „Todesrezeptoren“

Die sich ständig vermehrende Zahl der Mitglieder der Subfamilie der „Todesrezeptoren“ (*death receptors*) umfasst derzeit neun Mitglieder (Abbildung 2). Die Rezeptoren gehören zur TNF-R-Familie und sind durch eine konservierte, 80 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Domäne gekennzeichnet, die „Todesdomäne“ (*death domain*) (Tartaglia *et al.*, 1993). Die „Todesdomäne“ wird im Folgenden als D-Domäne bezeichnet. Mutationsanalysen zeigten, dass die intrazelluläre D-Domäne für die Weiterleitung des apoptotischen Signals verantwortlich ist (Itoh und Nagata, 1993.). Zu dieser Rezeptorfamilie gehören auch 3 Rezeptoren, durch die keine Signalweiterleitung erfolgt. Diese werden als sogenannte „Köderrezeptoren“ (*decoy receptors*, DcR) bezeichnet und sind durch eine fehlende (DcR1) oder eine verkürzte, nicht-funktionelle D-Domäne (DcR2) gekennzeichnet (als Übersichtsartikel s. Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Der „Köderrezeptor 3“ (DcR3) besitzt eine mutierte D-Domäne (Yu *et al.*, 1999). In Hühnern konnte ein weiteres Mitglied der „Todesrezeptoren“ identifiziert werden, das als CAR1 (*circumvent adenovirus receptor 1*) bezeichnet wird (als Übersichtsartikel s. Strasser *et al.*, 2000).

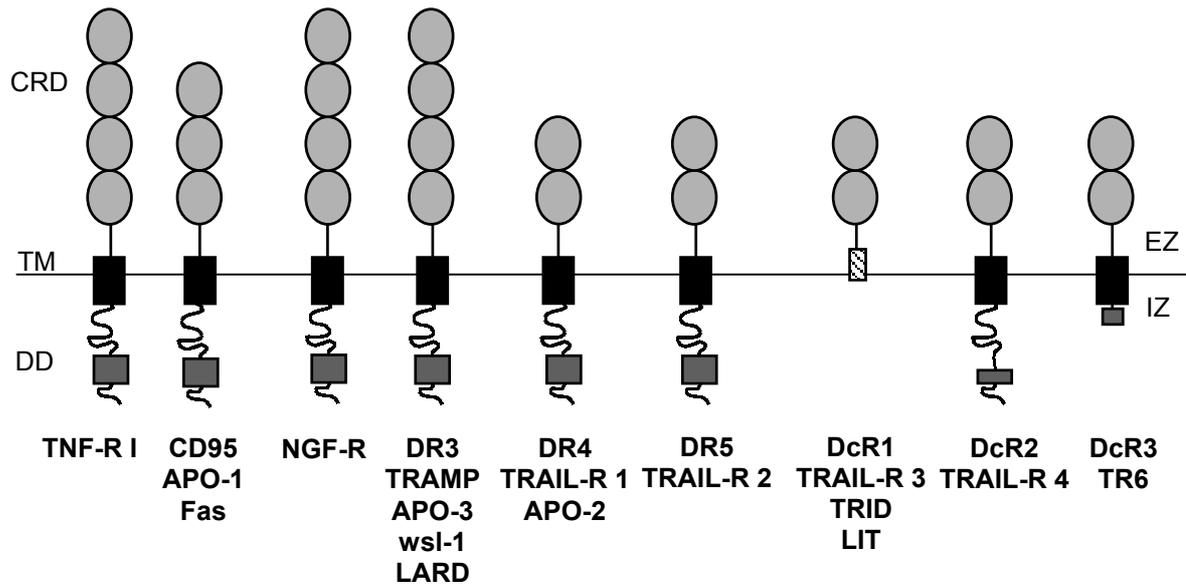


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der humanen Mitglieder der Subfamilie der „Todesrezeptoren“ (death receptors)**

Die extrazellulären Cystein-reichen Domänen (CRD) wurden in Form von Kreisen, die Transmembrandomänen (TM) in Form von schwarzen Rechtecken dargestellt. Alle Mitglieder dieser Familie mit Ausnahme des „Köderrezeptors 1“ (*decoy receptor 1, DcR1*) weisen eine zyttoplasmatische „Todesdomäne“ (bezeichnet als DD, *death domain*) auf, die in Form von grauen Rechtecken dargestellt wurde. Der „Köderrezeptor 2“ (*decoy receptor 2, DcR2*) besitzt eine verkürzte, nicht-funktionelle D-Domäne. Der „Köderrezeptor 3“ (*decoy receptor 3, DcR3*) hat eine mutierte D-Domäne. Einige der Rezeptoren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen gleichzeitig entdeckt und mit verschiedenen Namen bezeichnet.

TNF-R: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor; **NGF-R:** Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); **DR:** *death receptor*; **LARD:** *lymphocyte-associated receptor of death*, **DcR:** *decoy receptor*. **TRID:** *TRAIL receptor without an intracellular domain*, **LIT:** *lymphocyte inhibitor of TRAIL*.

EZ: extrazellulär; **IZ:** intrazellulär

1.1.3 Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie

Die Liganden der Rezeptoren der TNF-R-Familie sind mit Ausnahme des löslichen Lymphotoxin α (LT α) Typ-II-Transmembranproteine und werden in der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie zusammengefasst (Tabelle 2). Die Mitglieder dieser Familie weisen untereinander nur eine geringe Homologie (20-25 %) auf, die sich hauptsächlich auf eine 150 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Region dieser Moleküle beschränkt, über welche die Rezeptorbindung erfolgt (Wallach *et al.*, 1998). Alle Mitglieder der TNF-Familie bilden Trimere aus drei identischen Untereinheiten aus, welche die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren vermitteln. Durch die Bindung des Liganden wird eine Oligomerisierung der Rezeptormonomere induziert, die eine Aktivierung des intrazellulären Signalübertragungswegs auslöst (Eck *et al.*, 1988; Eck *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1992; Banner *et al.*, 1993). Unter physiologischen Bedingungen können die meisten Moleküle der TNF-Familie auch in einer löslichen Form vorliegen. Die Abspaltung der Liganden erfolgt durch spezifische Matrix-Metalloproteinasen (Black *et al.*, 1997).

Ligand	Rezeptor
LIGHT	HVEM, LT β -R
LT α	TNF-R I, TNF-R II
LT β	LT β -R
TNF α	TNF-R I, TNF-R II
TRAIL (APO-2L)	DR4, DR5, DcR1, DcR2
TRANCE (RANKL/OPGL)	OPG
CD95L	CD95
CD40L	CD40
CD30L	CD30
CD27L (CD70)	CD27
4-1 BBL	4-1 BB
CD134L (OX40L, gp 34)	CD134 (OX40)
NGF	NGF-R

Tabelle 2: **Liganden der Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie**

LIGHT: *ligand for herpes virus entry mediator* (HVEM); **LT α /LT β :** Lymphotoxin α /Lymphotoxin β ; **TNF α :** Tumor-Nekrose-Faktor α ; **TRAIL:** *TNF-related apoptosis inducing ligand*; **GITR:** *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related receptor*; **RANKL:** *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*; **OPGL:** Osteoprotegerin-Ligand; **NGF:** Nerven-Wachstumsfaktor (*nerve growth factor*)

1.2 Das CD95/CD95-Ligand-System

1.2.1 Entdeckung und Eigenschaften

Der Zelloberflächenrezeptor APO-1 wurde von Trauth *et al.*, 1989 mittels eines monoklonalen Antikörpers entdeckt, der in verschiedenen humanen Zelllinien innerhalb von 5 Stunden Apoptose auslöst. Unabhängig davon isolierten Yonehara *et al.*, 1989 ein Zelloberflächenmolekül mit gleichen Eigenschaften, das mit Fas bezeichnet wurde. Die Klonierung und anschließende Sequenzierung der APO-1/Fas-cDNS deckte auf, dass die beiden Moleküle identisch sind (Itoh *et al.*, 1991, Oehm *et al.*, 1992). Der Zelloberflächenrezeptor wird heute nach der CD-Nomenklatur (Schlossmann *et al.*, 1995) als CD95-Rezeptor bezeichnet und stellt das am besten charakterisierte Mitglied der Familie der „Todesrezeptoren“ dar. Das CD95-Rezeptormolekül weist je nach Grad der Glykosylierung eine Größe von 45-52 kD auf und wird als Transmembranrezeptor an der Zelloberfläche exprimiert. Neben der membrangebundenen Form existiert auch eine lösliche Variante, die durch alternatives Spleißen entsteht (Kayagaki *et al.*, 1995). Das Gen für den CD95-Rezeptor (APT-Gen) wurde auf Chromosom 10q23 lokalisiert, das Gen des CD95-Rezeptors der Maus liegt auf Chromosom 19 (Lichter *et al.*, 1992; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Die Signalkaskade des CD95-Rezeptors kann durch agonistische Antikörper oder den natürlichen Liganden ausgelöst werden. Das CD95-Protein besitzt ein breites Expressionsspektrum und konnte in Zellen des Immunsystems, sowie in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden (Nagata und Golstein, 1995).

Der Ligand des CD95-Rezeptors, CD95-Ligand (CD95L), wurde aus der cDNS einer natürlichen Killer (NK)-Zelllinie isoliert (Suda *et al.*, 1993). Das Gen des humanen und des CD95-Liganden der Maus liegt auf Chromosom 1 (Takahashi *et al.*, 1994). Die lösliche Form des CD95L-Proteins bildet Homotrimere, die jedoch im Vergleich mit der Transmembranform eine wesentlich geringere zytotoxische Wirkung zeigt (Schneider *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998). Die Expression des CD95L-Proteins ist auf aktivierte T-Zellen (Suda *et al.*, 1993), B-Zellen (Hahne *et al.*, 1996), NK-Zellen (Montel *et al.*, 1995; Eischen *et al.*, 1996) und neutrophile Granulozyten (Liles *et al.*, 1996) beschränkt.

1.2.2 Biologische Funktion

Die biologische Funktion des CD95-Rezeptors und seines Liganden wurde an Mäusen, die Mutationen in den jeweiligen Genen aufweisen, aufgeklärt. Mäuse mit der *lpr* (*lymphoproliferation*)-Mutation, die durch die Insertion eines retroviralen Transpositionselements entstanden ist, besitzen keinen CD95-Rezeptor (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Adachi *et al.*, 1993). Die *gld*-Punktmutation (*general lymphoproliferative disorder*) erzeugt ein aberrantes CD95L-Protein (Takahashi *et al.*, 1994). Der Mangel an funktionellem CD95-Rezeptor bzw. CD95-Ligand führt in Mäusen zu einer Autoimmunerkrankung, die der humanen „systemischen Lupus erythematoses“ (SLE)-Erkrankung ähnelt. In beiden Fällen konnte eine Anhäufung von Thy-1-positiven, CD4- und CD8-negativen T-Zellen und die Produktion von Autoantikörpern nachgewiesen werden. Beim Menschen wurde eine ähnliche Krankheit, die auf einer Fehlfunktion des CD95/CD95L-Systems basiert, beschrieben. Diese als ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) oder „Canale-Smith-Syndrom“ bezeichnete Erkrankung basiert auf einer Mutation in der „Todesdomäne“ des CD95-Rezeptors (Drappa *et al.*, 1996) und ist durch die Entwicklung einer massiven gutartigen Lymphadenopathie, Vergrößerung der Milz, Veränderung der T-Zellpopulationen und andere Charakteristika systemischer Autoimmunerkrankungen gekennzeichnet (Fisher *et al.*, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Durch Rückführung dieser Defekte auf Mutationen im CD95/CD95L-System konnte die physiologische Bedeutung der CD95-vermittelten Apoptose aufgeklärt werden. Diese Form der Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von B- und T-Vorläuferzellen, die aufgrund einer nicht erfolgten oder falschen Umordnung der Rezeptorgene keinen funktionellen Oberflächenrezeptor bilden. Darüber hinaus wird der Apoptoseinduktion über den CD95-Rezeptor eine wichtige Bedeutung bei der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen im Thymus und somit der Aufrechterhaltung der „Selbst“-Toleranz beigemessen. In den Lymphknoten und der Milz trägt die CD95-vermittelte Apoptose außerdem zur Aufrechterhaltung der „Selbst“-Toleranz in der Peripherie bei und ist essentiell für die Beendigung einer Immunreaktion durch die Eliminierung aktivierter, überschüssiger T-Zellen (Yagita *et al.*, 1995). Dieser Mechanismus des durch Aktivierung induzierten Zelltods (*activation-induced cell death*, AICD) beruht auf der Erkennung von Antigenen, die von MHC-Molekülen präsentiert werden, durch den T-Zell-Rezeptor und einer daraus resultierenden Aktivierung der T-Zellen. Aktivierte T-Zellen weisen eine verstärkte Expression des CD95L-Proteins auf. Durch die Interaktion von

CD95L mit CD95-Rezeptormolekülen wird die Apoptose in direkt benachbarten T-Zellen („Brudermord“, *T cell fratricide*), sowie in den aktivierten T-Zellen selbst („Selbstmord“, *autocrine T cell suicide*) ausgelöst (Dhein *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995). Zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTL) und NK-Zellen vermitteln Immunität gegenüber viralen Infektionen, Fremdtransplantaten und neoplastisch transformierten Zellen. Für die Eliminierung der Zielzellen verfügen CTL über zwei Mechanismen. Hierbei spielt die Quervernetzung des CD95-Rezeptors auf der Zielzelloberfläche neben der Perforin-vermittelten Einschleusung von Proteasen in die Zielzellen eine wichtige Rolle (Kojima *et al.*, 1994; Lowin *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1994). Der CD95-Rezeptor wird auch in nicht-lymphozytären Geweben, beispielsweise der Leber, exprimiert. Primäre humane und Hepatozytenkulturen der Maus zeigen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Galle *et al.*, 1995). Ein Defekt im CD95-Rezeptorgen führt zu einer Zellanhäufung, einhergehend mit einer starken Leber-Hyperplasie (Adachi *et al.*, 1995). Daher wird dem CD95/CD95L-System auch bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase in der Leber eine wichtige Bedeutung beigemessen.

1.2.3 Die Signalkaskade des CD95-Rezeptors

1.2.3.1 Ausbildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes („DISC“)

Die Signalkaskade des CD95-Rezeptors ist in Abbildung 3 dargestellt. Studien mit agonistischen Antikörpern verschiedener Immunglobulin-Subklassen belegten, dass eine effektive Oligomerisierung des CD95-Rezeptors für die Auslösung und Weiterleitung des apoptotischen Signals essentiell ist (Dhein *et al.*, 1992). Unter physiologischen Bedingungen löst die Bindung des trimeren CD95L eine Zusammenlagerung der CD95-Rezeptormonomere zu tri- und oligomeren Komplexen aus. Infolgedessen lagern sich die zytoplasmatischen „Todesdomänen“ der CD95-Moleküle zusammen. Die daraus resultierende Konformationsänderung in den D-Domänen löst die Freilegung einer Proteindomäne aus, welche die Assoziation der D-Domänen mit der D-Domäne des Adaptorproteins FADD/MORT1 (*Fas-associated protein with a death domain*) erlaubt (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996). FADD besitzt neben der carboxy-terminalen D-Domäne eine weitere Domäne, die als DE-Domäne (*death effector domain*) bezeichnet wird und für die Weiterleitung des Apoptosesignals essentiell ist. Über die DE-Domäne von FADD erfolgt sodann die Bindung an eine inaktive Vorstufe einer Protease der Caspasen-Familie, die als FLICE (*FADD-like interleukin-1 β converting enzyme*)/MACH/Mch 5 oder Caspase-8 bezeichnet wird (Boldin *et al.*, 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997). Der Komplex aus dem oligomerisierten CD95-Rezeptor, dem Adaptorprotein FADD und Caspase-8 wird als Zelltod-induzierender Signalkomplex (*death-inducing signaling complex*, DISC) bezeichnet (Kischkel *et al.*, 1995). Mit der Aktivierung von Caspase-8 am „DISC“ wird eine Kaskade von Aktivierungsprozessen weiterer Caspasen in Gang gesetzt (Medema *et al.*, 1997), die im Abschnitt 1.2.3.2 genauer erläutert wird. Neben dem durch den CD95-Todesrezeptor initiierten Signalweg wird durch bislang ungeklärte Mechanismen eine mitochondriale Signal-

kaskade ausgelöst, die möglicherweise durch aktivierte Initiator-Caspasen des CD95-Signalwegs auf direktem oder indirektem Weg verstärkt werden kann (Kroemer *et al.*, 1997). Somit könnten sich beide Signalkaskaden in ihrer Apoptose-auslösenden Wirkung gegenseitig potenzieren. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Mitochondrienkaskade auf eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials („*permeability transition*“) zurückzuführen ist, die in einer Öffnung von Membrankanälen und damit der Freisetzung mitochondrialer Proteine resultiert (Zamzami *et al.*, 1996a; Zamzami *et al.*, 1996b). Es konnte gezeigt werden, dass dieser mitochondriale Signalweg durch die anti-apoptischen Moleküle Bcl-2 und Bcl-x_L gehemmt werden kann. Die Blockierung der mitochondrialen Signalkaskade erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Bcl-2 bildet Ionenkanäle in der äußeren Mitochondrienmembran und verhindert direkt oder indirekt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Schendel *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Bcl-x_L hingegen, das ebenfalls Ionenkanäle in der mitochondrialen Membran ausbildet, bindet Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) an der Mitochondrienmembran (Minn *et al.*, 1997). Dies resultiert in der Formierung eines inhibitorischen Komplexes aus Bcl-x_L, Apaf-1 und Procaspase-9 (Pan *et al.*, 1998). Der mitochondriale Signalübertragungsweg des CD95-Rezeptors wird in Abschnitt 1.2.3.3 detailliert vorgestellt.

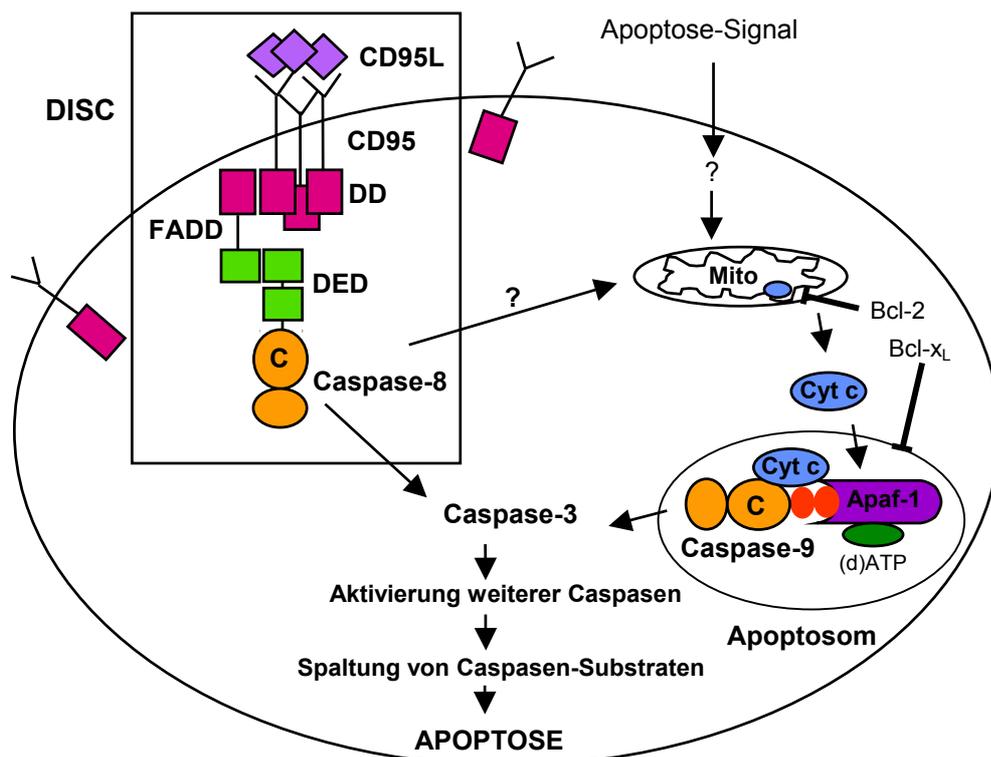


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Signalübertragung durch den CD95-Rezeptor**

Die Bindung des trimeren CD95-Liganden führt zur Oligomerisierung der CD95-Rezeptormonomere in der Zellmembran und zur anschließenden Assoziation der „Todesdomänen“ (D-Domänen) mit der D-Domäne des Adaptorproteins FADD. FADD enthält eine zusätzliche DE-Domäne, die mit der DE-Domäne von Caspase-8 interagiert. Der Komplex aus CD95-Rezeptor, FADD und Caspase-8 wird als Zelltod-induzierender Signalkomplex (*death-inducing signaling complex*, DISC) bezeichnet.

CD95: CD95-Rezeptor; **CD95L:** CD95-Ligand; **FADD:** Fas-associated protein with a death domain; **DD:** D-Domäne (*death domain*); **DED:** DE-Domäne (*death effector domain*); **DISC:** *death-inducing signaling complex*; **C:** Cystein-Rest im aktiven Zentrum von Caspasen; **Apaf-1:** *apoptotic protease activating factor*; **Cyt c:** Cytochrom c; **Mito:** Mitochondrium

1.2.3.2 Weiterleitung des apoptotischen Signals durch Caspasen

Der Apparat für die Ausführung der Apoptose ist in jeder Körperzelle vorhanden. Im Zentrum dieser „Exekutionsmaschinerie“ steht eine Familie intrazellulärer Cystein-Proteasen, die Caspasen. In die Bezeichnung „Caspasen“ geht die Zugehörigkeit der Caspasen zur Familie der Proteasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms enthalten als auch die Substratspezifität (Caspasen spalten Peptide hinter einem Aspartat-Rest) ein. Die grundlegenden Erkenntnisse über die Funktion und Struktur der Caspasen wurden bei der Untersuchung des programmierten Zelltods während der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Anhand von Mutationsanalysen in *C. elegans* wurden 2 Gene identifiziert, *ced-3* und *ced-4* (*cell death-defective*), die für die Ausführung des Zelltodprogramms wesentlich sind. Ein weiteres Gen, *ced-9*, verhindert die Apoptose (als Übersichtsartikel s. Liu und Hengartner, 1999). Zu allen drei Caspasen von *C. elegans* existieren Gegenstücke in Säugern, die ähnliche, aber komplexere Funktionen während des Apoptoseprozesses übernehmen. Das Säuger-Homolog zu *ced-9* ist das Bcl-2-Protein, dessen Expression in vielen Tumoren fehlreguliert ist (Reed, 1995). Das Bcl-2-Protein ist in der äußeren Mitochondrienmembran, der Membran des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran lokalisiert und schützt die Zellen vor einigen Formen des apoptotischen Zelltods (Vaux, 1997). Die Sequenz des *ced-3*-Gens zeigt große Ähnlichkeit zu der des Interleukin-1 β -konvertierenden Enzyms (*interleukin-1 β -converting enzyme*, ICE), dem ersten Mitglied der Caspasen-Familie in Säugern (Yuan *et al.*, 1993). Das Homolog zu *ced-4*, Apaf-1, wurde durch seine Caspase-3-aktivierende Funktion identifiziert (Zou *et al.*, 1997). Die Caspasen-Familie in Säugern umfasst mittlerweile 14 Mitglieder, die in die Subfamilien der ICE-ähnlichen-Proteasen, die CED-3-Familie und die CED-2-Familie eingeteilt werden (s. Tabelle 3).

Name	zusätzliche Domänen	Zuordnung zu Subfamilie
Initiator-Caspasen		
Caspase-2	CARD	Caspase-2 Familie
Caspase-9	CARD	Caspase-3 Familie
Caspase-8	DED	Caspase-3 Familie
Caspase-10	DED	Caspase-3 Familie
Effektor-Caspasen		
Caspase-3	-	Caspase-3 Familie
Caspase-6	-	Caspase-3 Familie
Caspase-7	-	Caspase-3 Familie
Caspase-1	CARD	ICE-Familie
Caspase-4	CARD	ICE-Familie
Caspase-5	-	ICE-Familie
Caspase-11	-	ICE-Familie
Caspase-12	-	ICE-Familie
Caspase-13	-	ICE-Familie
Caspase-14	-	ICE-Familie

Tabelle 3: **Übersicht über die Mitglieder der Caspasen-Familien in Säugern**

CARD: *caspase-recruitment domain* (s. 1.2.3.3); **DED:** DE-Domäne (*death effector domain*)

Alle Caspasen werden konstitutiv und in Form von katalytisch inaktiven Proenzymen synthetisiert, die aus einer aminoterminalen Prodomäne, sowie der Caspasen-Domäne, die aus einer großen und einer kleinen Untereinheit aufgebaut ist, bestehen. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch die autoproteolytische Prozessierung der Proenzyme, wodurch die drei Domänen des Enzyms freigesetzt werden. Das aktive Enzym ist ein Heterotetramer, das aus je einem Heterodimer der großen und kleinen Untereinheit aufgebaut ist (Walker *et al.*, 1994). Abbildung 4 zeigt den Aktivierungsprozess am Beispiel von Caspase-8, die in 2 funktionellen Isoformen, Caspase-8a und Caspase-8b, in der Zelle vorkommt (Scaffidi *et al.*, 1997). Die beiden Isoformen unterscheiden sich lediglich in der Größe der ersten DE-Domäne in der Prodomäne des Enzyms.

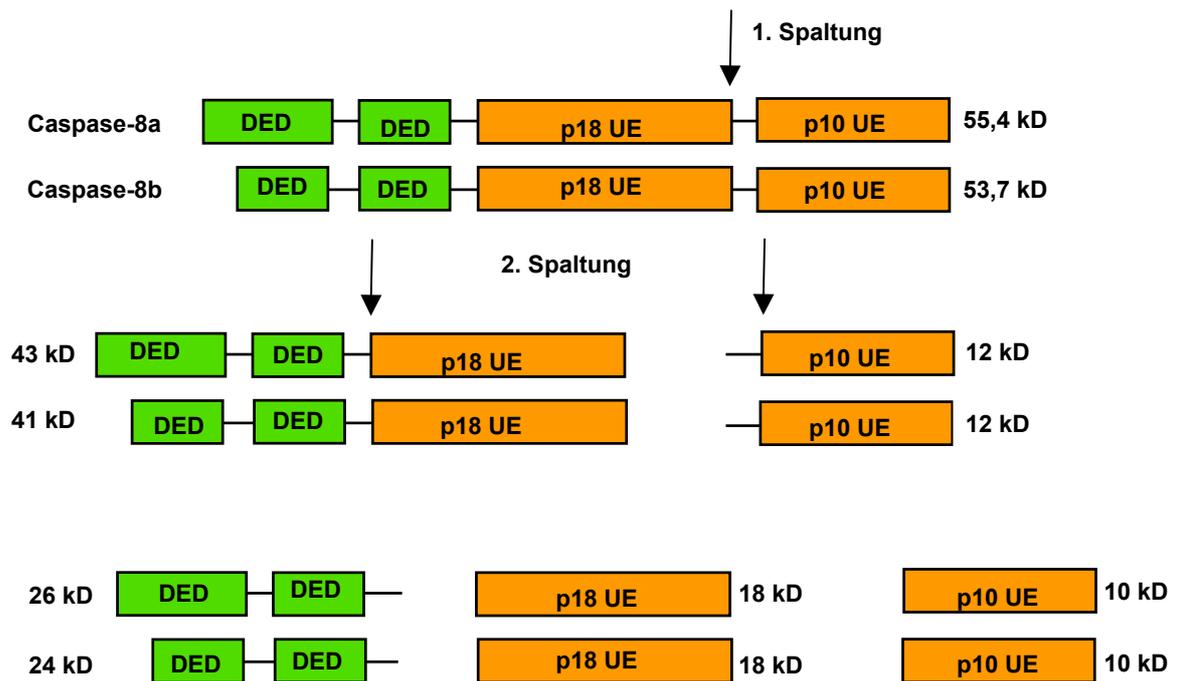


Abbildung 4: **Proteolytische Prozessierung von Caspase-8**

Die inaktiven Proenzyme Caspase-8a (55,4 kD) und Caspase-8b (53,7 kD) werden durch zwei proteolytische Spaltungen aktiviert. Mit der ersten Spaltung wird die kleine Untereinheit mit einer intermediären Größe von 12 kD freigesetzt. Die resultierenden intermediären Spaltprodukte haben eine Größe von 43 kD (Caspase-8a) und 41 kD (Caspase-8b). Die zweite Spaltung setzt die Prodomäne der Isoenzyme (26 kD bei Caspase-8a (p26); 24 kD bei Caspase-8b (p24)), die große Untereinheit mit einer Größe von 18 kD (p18) und die kleine Untereinheit mit einer Größe von 10 kD (p10) frei.

DED: DE-Domäne (*death effector domain*); **UE:** Untereinheit

Die hierarchische Einordnung der Caspasen ist bislang noch nicht genau aufgeklärt. Die Aktivierungskaskade der Caspasen wird durch apikale Initiator-Caspasen ausgelöst, die den initialen, Apoptose-induzierenden Stimulus weiterleiten und die Aktivierung von sogenannten Effektor-Caspasen bewirken, die letztendlich zelluläre Proteinsubstrate aktivieren oder inaktivieren, die an der Vollstreckung des Zelltodprogramms beteiligt sind. Muzio *et al.*, 1997 konnten nachweisen, dass Caspase-8 *in vitro* direkt die Spaltung von Caspase-3, -4, -7, -9 und -10 initiiert. Caspase-2 und -6 werden dagegen indirekt durch andere Caspase-8-aktivierte Caspasen

gespalten. Des Weiteren existieren Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Caspase-3 die Spaltung von Caspase-6, -7 und -9 zur Folge hat (Srinivasula *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 1998). Die Proteinsubstrate der Caspasen umfassen Strukturproteine, Signalproteine und Kinasen, Regulatoren des Zellzyklus, sowie Proteine, die am DNS/RNS-Metabolismus beteiligt sind (s. Tabelle 4).

Protein	Funktion
Strukturproteine	
Aktin	Bestandteil des Zytoskeletts
Keratin-18	Bestandteil von Intermediärfilamenten
Lamine	Bestandteile der Kernmembran
Gas2	Reorganisation des Zytoskeletts
Gelsolin	Modulation der Aktin-Reorganisation
β-Catenin	Beteiligung an der Zellmigration
Fodrin	mögliche Beteiligung am „ <i>membrane blebbing</i> “
Signalproteine und Kinasen	
cPLA ₂	noch unbekannte Funktion bei der Vermeidung der Auslösung einer Entzündungsreaktion bei der Apoptose
D4-GDI	Aktivierung der Mitglieder der Ras-verwandten Rho-GTPasen
MEKK-1	Regulation des JNK-Signaltransduktionswegs; Blockierung der durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptose
PKC δ	Beteiligung an der PS-Membrantranslokation
FAK	Organisation des Zytoskeletts und Signaltransduktion
PITSLRE (cdc2- verwandt)	Regulation des Zellzyklus
Zellzyklusregulatoren	
MDM2	Regulation des Zellzyklus
RB-Protein	Regulation des Zellzyklus
Proteine des DNS/RNS-Metabolismus	
DNS-PK	Erkennung von DNS-Doppelstrangbrüchen und DNS-Schäden
hnRNP-C;U1-70 kD; C2, C3	RNS-Spleißen
PARP	Erkennung von DNS-Strangbrüchen
RFC	Beteiligung an der DNS-Replikation
DFF	Beteiligung an der DNS-Fragmentierung
iCAD	Blockierung der internukleosomalen DNS-Spaltung durch CAD

Tabelle 4: **Zusammenfassung der wichtigsten Caspasen-Substrate und ihrer Funktion**

Gas2: *growth arrest specific gene 2*; **cPLA₂:** *cytosolic phospholipase A2*; **D4-GDI:** *D4-GDP dissociation inhibitor*; **MEKK-1:** *mitogen-activated protein kinase kinase-1*; **PKCδ:** Protein-Kinase C-Isoform δ; **FAK:** *focal adhesion kinase*; **mdm2:** *murine double-minute chromosome 2*; **RB-Protein:** Retinoblastom-Protein; **DNS-PK:** DNS-Protein-Kinase; **hnRNP-C:** *heteronuclear ribonucleoprotein C*; **PARP:** Poly(ADP-Ribose)-Polymerase; **RFC:** Replikationsfaktor C; **DFF:** *DNA fragmentation factor*; **iCAD:** *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*; **CAD:** *Caspase-activated deoxyribonuclease*

1.2.3.3 Typ-I- und Typ-II-Zellen

Neben dem in Abbildung 3 dargestellten Signaltransduktionsweg des CD95-Rezeptors gibt es Hinweise auf die Existenz eines weiteren Signalwegs des Rezeptors (Scaffidi *et al.*, 1998). Die beiden möglichen Apoptose-auslösenden Signalkaskaden werden dabei von verschiedenen Zelltypen benutzt, die demzufolge in Typ-I- und Typ-II-Zellen unterschieden werden. Zu Typ-I-Zellen gehören beispielsweise die T-Leukämie-Zelllinie H9 und die B-Lymphom-Zelllinie SKW6.4. Die T-Lymphom-Zelllinien Jurkat und CEM wurden dagegen als Vertreter der Typ-II-Zellen kategorisiert. In Typ-I-Zellen konnte die Ausbildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes („DISC“) nachgewiesen werden. Nach Auslösung der Apoptose mittels eines agonistischen Anti-CD95-Antikörpers der IgG3-Subklasse erfolgt in Typ-I-Zellen die Aktivierung von Caspase-8 am „DISC“ innerhalb weniger Sekunden, die Spaltung von Caspase-3 konnte innerhalb von 30 Minuten nachgewiesen werden. Somit wird für Typ-I-Zellen der in Abbildung 3 dargestellte CD95-Signalübertragungsweg postuliert. In Typ-II-Zellen hingegen ist die Ausbildung des „DISC“ beeinträchtigt. Dennoch werden geringe Mengen von Caspase-8 gespalten. In Typ-II-Zellen kann ebenso wie in Typ-I-Zellen eine mitochondriale Signalkaskade aktiviert werden, die in Abbildung 5 dargestellt ist.

Aufgrund der verminderten „DISC“-Ausbildung hängt in Typ-II-Zellen die Auslösung der CD95-vermittelten Apoptose wahrscheinlich von der Aktivierung dieses mitochondrialen Signalübertragungswegs ab. Obwohl Typ-II-Zellen einen Defekt in der „DISC“-Formierung aufweisen, könnten die wenigen am CD95-Rezeptor aktivierten Caspase-8-Moleküle ausreichend sein, um den Signalweg in Gang zu setzen. An diesem Prozess ist ein Protein der Bcl-2-Familie, BID, beteiligt (Tan *et al.*, 1999). BID wird nach Aktivierung durch Caspase-8 als integrales Membranprotein in die Mitochondrienmembran eingelagert und bildet dort einen Ionenkanal, über den die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma erfolgt (Gross *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998). Freigesetztes Cytochrom c assoziiert im Zytoplasma mit dem Protein Apaf-1 (vgl. 1.2.3.2). Durch die Bindung von Cytochrom c wird in Apaf-1 in Gegenwart von (d)ATP eine Konformationsänderung ausgelöst, welche die Freilegung einer aminoterminalen Domäne in Apaf-1 zur Folge hat. Diese als Caspase-Rekrutierungsdomäne (*caspase recruitment domain*, CARD) bezeichnete Proteinregion kommt auch in Caspase-1, -2, -4 und -9 vor (Hofmann *et al.*, 1997). Die freigelegte Domäne von Apaf-1 bindet und aktiviert Procaspase-9, die anschließend die Aktivierung von Caspase-3 auslöst. Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und (Pro)Caspase-9 wird auch als „Apoptosom“ bezeichnet (Saleh *et al.*, 1999), welches als Ausgangspunkt für weitere aufeinanderfolgende Caspasen-Aktivierungen dient (Li *et al.*, 1997). Dementsprechend wird in Typ-II-Zellen wahrscheinlich ein Großteil der Caspase-8-Moleküle erst nach Auslösung der mitochondrialen Signalkaskade aktiviert.

Der Einfluss der Expression der Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L auf den CD95-Signalübertragungsweg stellt sich jedoch kontrovers dar. In einigen Zellen konnte eine Blockierung der CD95-vermittelten Apoptose durch Bcl-2 und Bcl-x_L nachgewiesen werden (Itoh *et al.*, 1993; Mandal *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). Die Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden (Vanhaesebroeck *et al.*, 1993; Memon *et al.*, 1995).

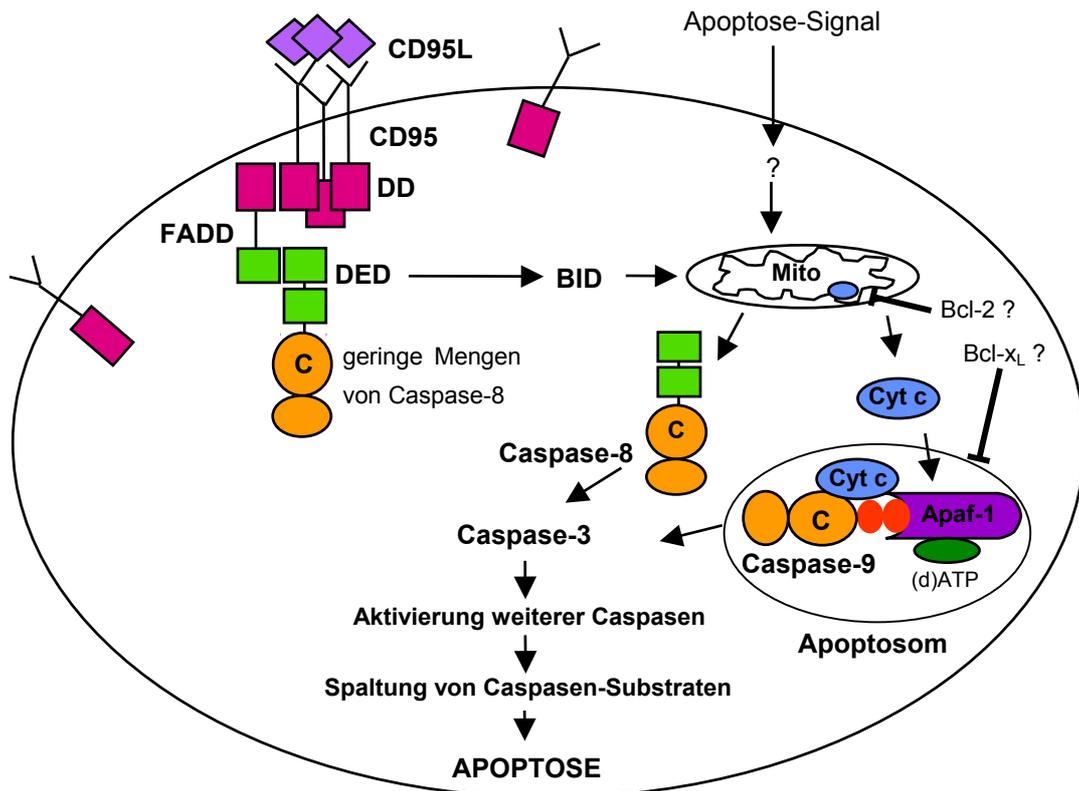


Abbildung 5: **Schematische Darstellung des alternativen Signalübertragungswegs des CD95-Rezeptors**

In Typ-II-Zellen, die in ihrer Ausbildung des „DISC“ beeinträchtigt sind, wird ein alternativer Signalübertragungsweg des CD95-Rezeptors durch die Bildung geringer Mengen aktiver Caspase-8 an den verbleibenden „DISC“-Molekülen ausgelöst. Dieser Signalweg verläuft über die Mitochondrien und kann neben CD95 auch durch andere Apoptosestimuli ausgelöst werden. Aktive Caspase-8 induziert die proteolytische Aktivierung des Proteins BID, das daraufhin in die Mitochondrienmembran als integrales, Ionenkanal-bildendes Protein integriert. Dadurch erfolgt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Infolgedessen werden in Typ-II-Zellen große Mengen von Caspase-8 hauptsächlich nach Auslösung der mitochondrialen Signalkaskade aktiviert. Das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom c assoziiert dort mit dem Protein Apaf-1 und löst in diesem in Gegenwart von (d)ATP eine Konformationsänderung aus, die zur Freilegung der CARD-Domäne in Apaf-1 führt. Diese Domäne von Apaf-1 bindet die CARD-Domäne von Procaspase-9. Dies resultiert in der Aktivierung von Procaspase-9, die anschließend die Aktivierung von Procaspase-3 auslöst. Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und (Pro)caspase-9 wird als „Apoptosom“ bezeichnet.

CD95: CD95-Rezeptor; **CD95L:** CD95-Ligand; **FADD:** Fas-associated protein with a death domain; **DD:** D-Domäne; **DED:** DE-Domäne; **DISC:** death-inducing signaling complex; **Cyt c:** Cytochrom c; **Mito:** Mitochondrium; **Apaf-1:** apoptotic protease activating factor; **C:** Cystein-Rest im aktiven Zentrum von Caspasen

In vivo werden periphere T-Zellen und Thymocyten, in denen die Ausbildung des „DISC“ nachgewiesen werden konnte, als Typ-I-Zellen eingestuft (Peter *et al.*, 1997). In diesen Zellen konnte die CD95-vermittelte Apoptose auch nicht durch Überexpression von Bcl-2 verhindert werden (Moreno *et al.*, 1996). Leberzellen hingegen werden als Vertreter der Typ-II Zellen eingeordnet, da in diesen Zellen eine Bcl-2-vermittelte Inhibition der CD95-induzierten Apoptose beobachtet wurde (Lacronique *et al.*, 1996).

1.2.4 Regulierung der CD95-vermittelten Apoptose über c-FLIP

Das CD95/CD95L-System übernimmt wie unter 1.2.2 beschrieben eine wichtige biologische Funktion bei der raschen und selektiven Entfernung von Zellen. Um die hohe Spezifität der Eliminierungsprozesse sicherzustellen, unterliegt die Auslösung der CD95-Signalkaskade einer feinregulierten Kontrolle. Erste Hinweise auf derartige Kontrollmoleküle, welche die Sensitivität von Zellen gegenüber Apoptosesignalen beeinflussen, wurden erstmals in Viren entdeckt, die verschiedene Strategien entwickelt haben, um die Selbstvernichtung infizierter Zellen zu verhindern. Mitglieder der Familie der viralen Serpine (Serinprotease-Inhibitoren) spielen beispielsweise bei der Inaktivierung von Granzym B eine Rolle, das von aktivierten zytotoxischen T-Zellen nach Antigenerkennung exozytiert wird, um die Lyse der Zielzellen herbeizuführen (Ray *et al.*, 1992).

Mit der Entdeckung von Caspase-8, die zwei DE-Domänen besitzt (s. 1.2.3.2), konnte eine Familie DE-Domänen enthaltender Proteine identifiziert werden. Zu dieser gehören auch virale Proteine mit Homologie zu Caspase-8, z.B. von Herpes Virus Saimirii (HSV), Pferdeherpesvirus 2, Rinderherpesvirus 4, humanem Karposi-Sarkom-assoziiertem Herpes Virus 8 (HHV8) und von humanem Molluskipoxvirus, die in der Familie der v-FLIPs (*viral FLICE inhibitory proteins*) zusammengefasst werden (Thome *et al.*, 1997). v-FLIPs besitzen wie Caspase-8 zwei DE-Domänen, die kleine und große Untereinheit der Caspasen fehlen jedoch.

Das zelluläre Homolog der v-FLIP-Proteine wird als c-FLIP (Irmeler *et al.*, 1997), I-FLICE (Hu *et al.*, 1997), Casper (Shu *et al.*, 1997), CASH (Goltsev *et al.*, 1997), CLARP (Inohara *et al.*, 1997), FLAME-1 (Srinivasula *et al.*, 1997), MRIT (Han *et al.*, 1997) oder Usurpin (Rasper *et al.*, 1998) bezeichnet. Im Folgenden wird der Name ‚c-FLIP‘ verwendet. Das humane c-FLIP-Gen umfasst 13 Exons und liegt zusammen mit den Genen für Caspase-8 und Caspase-10 auf Chromosom 2q33-34 (Rasper *et al.*, 1998). Durch alternatives Spleißen des c-FLIP-Transkripts entstehen eine kurze und eine lange Variante des c-FLIP-Proteins, die als c-FLIP_S (*c-FLIP short*) und c-FLIP_L (*c-FLIP long*) bezeichnet werden. Die kurze Form des c-FLIP-Proteins besteht wie die v-FLIPs aus zwei DE-Domänen und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 28 kD. Die lange Form des Proteins ist wie Caspase-8 aus zwei DE-Domänen, sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit aufgebaut und weist ein Molekulargewicht von 55 kD auf. Der Vergleich der Aminosäuresequenzhomologien des humanen c-FLIP-Proteins (hc-FLIP) und des c-FLIP-Proteins der Maus (mc-FLIP) mit v-FLIPs und Caspase-8 ist im Anhang 8.2 dargestellt.

Im Gegensatz zu Caspase-8 besitzt c-FLIP_L keine proteolytische Aktivität. Dies ist auf den Austausch zweier Aminosäuren (Histidin und Cystein) der katalytischen Triade (Histidin, Glycin und Cystein) des Caspase-8-Proteins durch die Aminosäuren Arginin (hc-FLIP_L) bzw. Leucin (mc-FLIP_L) und Tyrosin zurückzuführen (Walker *et al.*, 1994). Aufgrund dessen repräsentiert c-FLIP_L ein inaktives Mitglied der Caspasen-Familie.

Die Aktivierung von Caspase-8 erfolgt vermutlich nach der in Abbildung 6 dargestellten Modellvorstellung. In Zellen, die ein Apoptose-auslösendes Signal erhalten haben, wird Caspase-8 am „DISC“ zyklisch aktiviert. Hierbei tritt je ein Procaspase-8-Molekül in den „DISC“ ein und wird in

zwei proteolytischen Aktivierungsschritten (s. 1.2.3.1) prozessiert. Die resultierenden Spaltprodukte werden aus dem „DISC“ freigesetzt, so dass der Komplex für die Aufnahme und Aktivierung eines weiteren Caspase-8-Moleküls frei ist.

Die Apoptose-hemmende Wirkung der c-FLIP-Proteine beruht vermutlich auf der Interaktion der DE-Domänen der c-FLIP-Moleküle mit der DE-Domäne des Adaptormoleküls FADD und den DE-Domänen von Caspase-8. Aufgrund dieser Wechselwirkungen würde in Gegenwart eines Überschusses an c-FLIP-Proteinen die Rekrutierung von Caspase-8 zu FADD-Molekülen blockiert. Von bereits an den „DISC“ gebundenen Caspase-8-Molekülen wird zunächst die kleine Untereinheit (p10) abgespalten, der Rest des Moleküls wird jedoch nicht weiter prozessiert und verbleibt im Komplex mit FADD und c-FLIP am CD95-Rezeptor. Demzufolge würde eine weitere Rekrutierung von Caspase-8 in den „DISC“ und damit die Aktivierung von Procaspase-8-Molekülen verhindert.

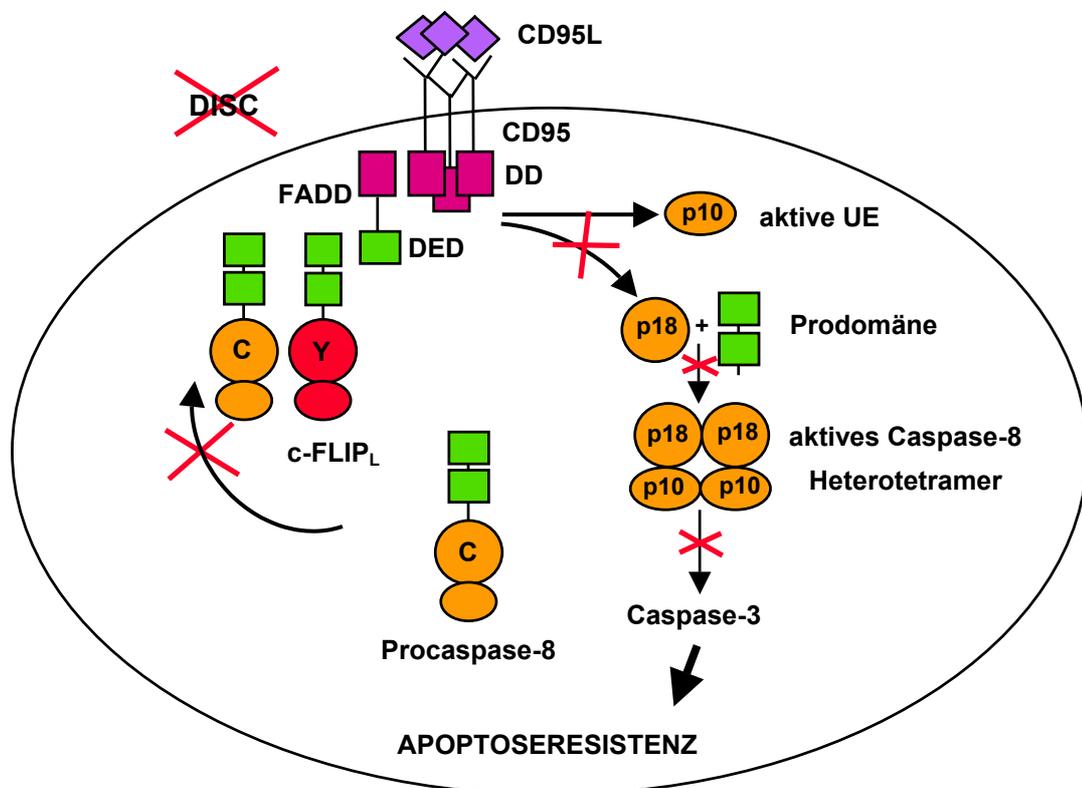


Abbildung 6: **Modellvorstellung der zyklischen, proteolytischen Aktivierung von Caspase-8 und der Funktionsweise von c-FLIP-Proteinen**

Infolge eines Apoptose-auslösenden Signals wird das Caspase-8-Proenzym in den Komplex aus CD95-Rezeptoroligomeren und dem Adaptormolekül FADD rekrutiert. Dies resultiert in der Ausbildung eines funktionellen Zelltod-auslösenden Signalkomplexes („DISC“). In Gegenwart von c-FLIP-Proteinen (hier dargestellt in Form von c-FLIP_L) erfolgt zunächst eine Abspaltung der kleinen Untereinheit (p10) der bereits gebundenen Caspase-8-Proteine. Der Rest des Moleküls wird jedoch nicht weiter gespalten und verbleibt im Komplex mit FADD und c-FLIP_L am CD95-Rezeptor. Demzufolge würde eine weitere Rekrutierung von Procaspase-8 in den „DISC“ und damit die Aktivierung von Procaspase-8-Molekülen verhindert.

CD95: CD95-Rezeptor; **CD95L:** CD95-Ligand; **FADD:** Fas-associated protein with a death domain; **DD:** D-Domäne (death domain); **DED:** DE-Domäne (death effector domain); **DISC:** death-inducing signaling complex; **C:** Cystein-Rest im aktiven Zentrum von Caspasen; **Y:** Tyrosin-Rest im „aktiven Zentrum“ von c-FLIP_L-Proteinen; **UE:** Untereinheit.

Neben der verkürzten Variante c-FLIP_S existieren zwei weitere Spleißformen, denen ein Teil der kodierenden Sequenz der Caspasen-Domäne fehlt. c-FLIP-Proteine werden in den meisten Geweben und Zellen, vor allem in peripheren Blutlymphozyten (PBL), sowie Herz- und Skelettmuskelgewebe exprimiert.

Im Vergleich zu der kurzen Form des c-FLIP-Proteins gewährt die lange Variante einen stärkeren Schutz vor der Auslösung der Apoptose (Irmiler *et al.*, 1997). Dies ist möglicherweise auf eine zusätzliche Interaktion der Caspasen-Domäne von c-FLIP_L mit der entsprechenden Domäne des Caspase-8-Proteins zurückzuführen. Da FADD und Caspase-8 an der Signalübertragung aller bislang bekannten „Todesrezeptoren“ (s. 1.1.2.2) beteiligt sind, spielen c-FLIP-Moleküle auch bei der Blockierung der Apoptose, die durch TNF-R I, DR3 und die Rezeptoren für TRAIL (DR4, DR5) ausgelöst wird, eine wichtige Rolle (Irmiler *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997; Goltsev *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997). Neben FADD und Caspase-8 interagiert c-FLIP_L auch mit Caspase-3 (Shu *et al.*, 1997), Bcl-x_L (Han *et al.*, 1997), sowie den Proteinen TRAF-1 und TRAF-2, die an der Signalweiterleitung des TNF-R I beteiligt sind.

In *in vitro*-Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des c-FLIP_L-Proteins mit der Apoptosesensitivität aktivierter T-Zellen korreliert (Irmiler *et al.*, 1997; Refaeli *et al.*, 1998). ‚Western Blot‘-Analysen von aktivierten T-Zellen zeigten, dass die Zellen an Tag 1 ihrer Aktivierung eine starke Expression des c-FLIP_L-Proteins aufweisen. Im Gegensatz dazu sind die Zellen an Tag 6 ihrer Aktivierung durch einen Apoptose-sensitiven Phänotyp charakterisiert. Dies korreliert mit einer verringerten Expression des c-FLIP_L-Proteins. Aktivierte T-Zellen exprimieren einen hochaffinen IL-2-Rezeptor und sezernieren IL-2 (Wang *et al.*, 1996). Das Zytokin IL-2 induziert dabei die Transkription des CD95L-Gens und damit die CD95L-Zelloberflächenexpression. Das CD95L-Protein bindet an den CD95-Rezeptor der T-Zellen und löst so den unter 1.2.2 erläuterten Prozess des durch Aktivierung induzierten Zelltods (*activation-induced cell death*, AICD) aus. IL-2 spielt zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression des c-FLIP-Gens. Versuche mit Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einer Mutation in beiden Allelen des IL-2-Gen (IL-2^{-/-}-Mäuse) zeigten, dass die Transkription des c-FLIP-Gens in Gegenwart von IL-2 inhibiert wird (Refaeli *et al.*, 1998; Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Inhibition ist jedoch bislang nicht bekannt. Darüber hinaus wurde auch ein Einfluss des anti-apoptotischen Bcl-x_L-Proteins auf die Sensitivität aktivierter T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beschrieben (Boise *et al.*, 1995).

1.3 Apoptose und Tumorentstehung

1.3.1 Passive Mechanismen

Die Zellhomöostase eines Gewebes resultiert aus einer streng regulierten Balance zwischen Zellteilung (Proliferation) und apoptotischem Zelltod. Tumore entstehen aus einzelnen transformierten Zellen, in denen die Mechanismen, welche die kontrollierte Zellproliferation und den geregelten Zelltod sicherstellen, versagen. Somit wird der Zelleliminierung mittels Apoptose nicht nur bei der Tumorregression, sondern auch bei der Krebsentstehung und der Tumorprogression eine große Bedeutung beigemessen.

Tumorzellen verfügen außerdem über verschiedenen Mechanismen, sich dem zellulären Immunüberwachungssystem zu entziehen (als Übersichtsartikel s. Marincola *et al.*, 2000). Hierzu gehört beispielsweise ein Verlust der Immunogenität aufgrund einer verringerten oder fehlenden Expression von Tumor-assoziierten antigenen Peptiden (*tumor-associated antigens*, TAA) oder Haupthistokompatibilitätskomplexmolekülen (*major histocompatibility complex*, MHC). Des Weiteren können Defekte in der intrazellulären Prozessierung antigenen Peptide und die fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle, die für eine effektive T-Zell-Aktivierung und damit für die Eliminierung der entarteten Zellen notwendig sind, zur Tumorprogression beitragen.

1.3.2 Aktive Mechanismen : Expression des CD95L-Proteins

Neben den genannten passiven Mechanismen haben Tumorzellen auch aktive Strategien entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen. Eine Strategie könnte die Sekretion immunregulatorischer Zytokine, beispielsweise des transformierenden Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) oder der Interleukine IL-6 und IL-10 darstellen (Marincola *et al.*, 2000).

Ein weiterer Mechanismus, der möglicherweise bei der Tumorentstehung und -progression eine Rolle spielt, könnte auf die Expression von CD95L-Molekülen an der Zelloberfläche von Tumoren zurückzuführen sein. O'Connell *et al.*, 1996 berichteten erstmals, dass Kolonkarzinomzellen funktionelles CD95L-Protein exprimieren und *in vitro* T-Zellen durch Induktion des CD95-vermittelten Apoptoseprogramms abtöten. Das CD95L-Protein konnte mittlerweile in einer Reihe von Tumoren verschiedenen Ursprungs nachgewiesen werden (s. Tabelle 5).

Zelltypen	Literaturstelle
Astrozytome	Saas <i>et al.</i> , 1997
B-Zell-Lymphome	Daniel <i>et al.</i> , 1997; Mullauer <i>et al.</i> , 1998
Eileiterkarzinome	Rabinowich <i>et al.</i> , 1998
Gallenwegskarzinome	Que <i>et al.</i> , 1999
Gebärmutterkarzinome	Contreras <i>et al.</i> , 2000
Glioblastome	Gratas <i>et al.</i> , 1997
Kolonkarzinome	O'Connell <i>et al.</i> , 1996
Leberzellkarzinome	Strand <i>et al.</i> , 1998; Shiraki <i>et al.</i> , 1997
Leukämie-Zellen	Bremner <i>et al.</i> , 1999
Lungenkarzinome	Niehans <i>et al.</i> , 1997
Magenkarzinome	Bennett <i>et al.</i> , 1999
Melanome	Hahne <i>et al.</i> , 1996
Mammakarzinome	O'Connell <i>et al.</i> , 1999; Mullauer <i>et al.</i> , 2000
Myelome	Villunger <i>et al.</i> , 1997
Nierenkarzinome	Kim <i>et al.</i> , 2000
Pankreaskarzinome	Ungefroren <i>et al.</i> , 1998; Ungefroren <i>et al.</i> , 1999
Schilddrüsenkarzinome	Giordano <i>et al.</i> , 1997
Speiseröhrenkarzinome	Bennett <i>et al.</i> , 1998
T-Zell-Lymphome	Mullauer <i>et al.</i> , 1998
Weichteilkarzinome des Kopf- und Halsbereichs	Gastman <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 5: **Überblick über Tumore verschiedenen Ursprungs mit CD95L-Expression**

Die Expression des CD95L-Zelloberflächenproteins auf Tumorzellen ist häufig begleitet von einer gleichzeitigen Resistenzentwicklung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Plumas *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 1999). Eine verminderte Sensitivität gegenüber Apoptose, die durch den CD95-Rezeptor ausgelöst wird, könnte Tumorzellen ermöglichen, sich einer gegenseitigen Eliminierung und dem CD95-vermittelten Tötungsmechanismus zytotoxischer Tumor-infiltrierender Lymphozyten (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) zu entziehen (s. 1.2.2).

Darüber hinaus würden Tumorzellen durch die gleichzeitige Expression funktioneller CD95L-Proteine über eine „Waffe“ verfügen, um zytotoxische TAA-spezifische T-Zellen und NK-Zellen anzugreifen und abzutöten. Dieser postulierte Mechanismus eines aktiven Vorgehens der Tumorzellen gegen TIL und NK-Zellen wird als „Gegenangriff-Modell“ (*counterattack model*, O'Connell *et al.*, 1996) bezeichnet (Abbildung 7). In Übereinstimmung mit dieser Modellvorstellung konnten *in situ* apoptotische TIL in Tumorgewebeproben nachgewiesen werden, in denen eine Expression des CD95L-Proteins festgestellt wurde (Hahne *et al.*, 1996; Strand *et al.*, 1996).

Einige Daten unterstützen jedoch die Hypothese des Gegenangriff-Modells nicht. Zaks *et al.*, 1999 konnten die Expression des CD95L-Proteins in Melanomzellen nicht bestätigen. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass in Melanomzellen nur im Fall einer MHC-restringierten Erkennung von antigenen Peptiden eine Apoptoseinduktion in den TAA-spezifischen TIL zu beobachten war. Unter diesen Voraussetzungen wäre die beobachtete Apoptosestimulierung in den Effektor-T-Zellen Resultat des bereits unter 1.2.2 beschriebenen Prozesses des durch Aktivierung induzierten Zelltods (AICD).

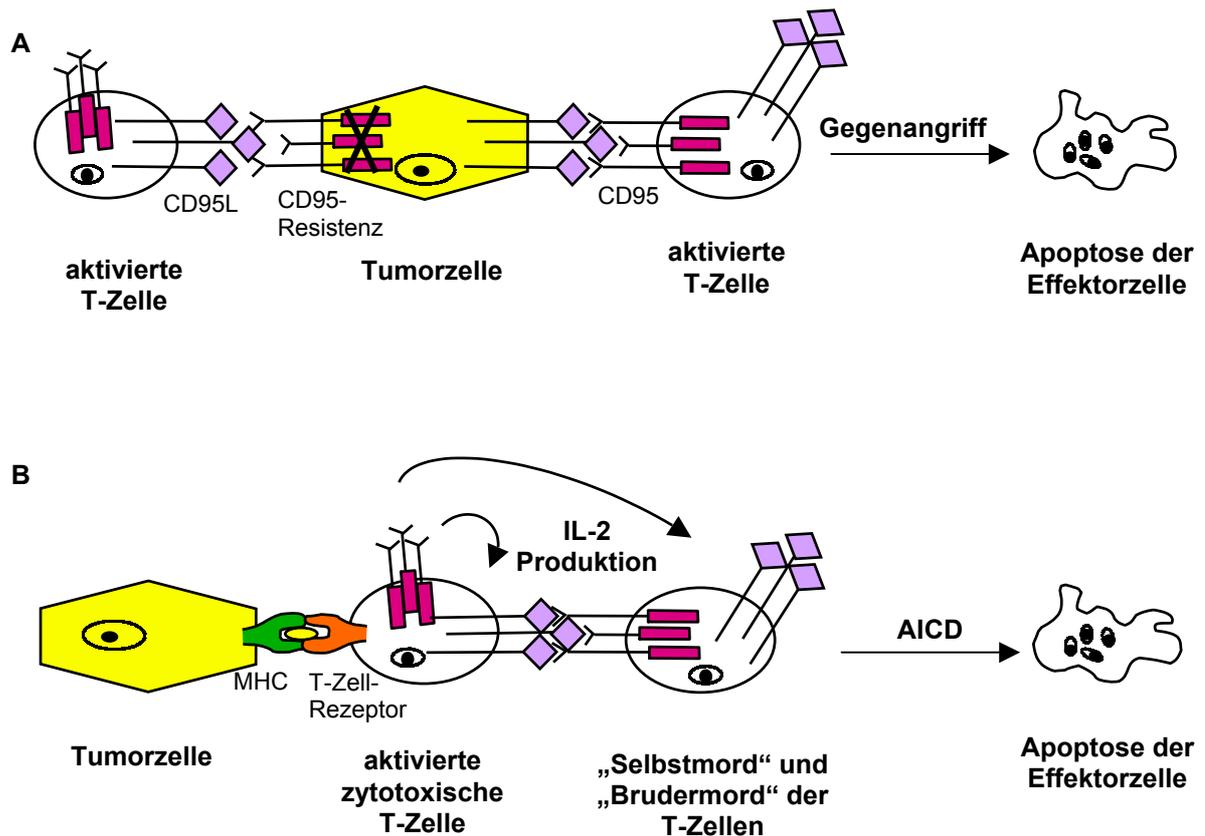


Abbildung 7: **Zwei verschiedene Mechanismen kommen für das CD95-vermittelte Absterben aktivierter Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) in Betracht**

A: „Gegenangriff-Modell“ (counterattack model): Aktivierte T-Effektorzellen koexprimieren den CD95-Rezeptor und das CD95L-Protein an ihrer Oberfläche. Tumorzellen, die eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose entwickelt haben und funktionelles CD95L-Protein exprimieren, könnten in TIL-Effektorzellen durch Bindung an deren CD95-Rezeptor das Apoptoseprogramm auslösen.

B: Modell des durch Aktivierung induzierten Zelltods (activation-induced cell death, AICD): Im Falle einer MHC-restringierten Erkennung von antigenen Peptiden der Tumorzellen durch TIL werden diese aktiviert. Aktivierte Lymphozyten weisen neben dem CD95-Rezeptor eine deutlich erhöhte Expression des CD95L-Proteins auf. Durch die Interaktion von CD95L mit CD95-Rezeptormolekülen wird die Apoptose in direkt benachbarten T-Zellen („Brudermord“) und umgebenden Zellen (parakrine Wirkungsweise), sowie in den aktivierten T-Zellen selbst („Selbstmord“) ausgelöst.

1.4 Klinische Bedeutung des Kolonkarzinoms

Neoplasien im Bereich des Kolons und des Rektums gehören in Deutschland und anderen westlichen Industrienationen zu einer der häufigsten Krebserkrankungen neben Mammakarzinomen und Lungenkarzinomen (McLeod *et al.*, 2000). Die Inzidenz und Mortalität des Kolonkarzinoms steigen bei Frauen und Männern gleichermaßen ab dem 50. Lebensjahr zunehmend an. Risikofaktoren stellen fettreiche, ballaststoffarme Nahrung und Polypenbildungen im Dickdarm dar. Die frühen Symptome des sich entwickelnden Darmkrebses sind sehr unspezifisch und äußern sich meist nur in einer veränderten Darmtätigkeit oder einem Wechsel zwischen Diarrhoe und Obstipation. Da eine eindeutige Diagnose häufig erst gestellt werden kann, wenn sich der Tumor bereits in einem weit fortgeschrittenen Stadium befindet, wirkt sich dies auf eine stark reduzierte Überlebenschance der Patienten aus. 95 % der kolorektalen Karzinome gehen vom Epithelgewebe des Darms aus (Adenokarzinome). Der Definition des pathologischen Stadiums des Kolonkarzinoms liegt die Bestimmung der lokalen Invasion und des Befalls der mesenterialen Lymphknoten zugrunde. Die Progression des Kolonkarzinoms wird in vier Stadien, die als Duke's A-D bezeichnet werden, eingeteilt. Im Stadium Duke's A und B ist das Karzinom auf die Darmwand beschränkt. Im Stadium Duke's C wird bereits ein Befall der regionalen Lymphknoten beobachtet, im Stadium Duke's D sind Fernmetastasen nachweisbar (Jones *et al.*, 1988). Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 10 % der Patienten das Stadium Duke's A, 20-30 % das Stadium Duke's B und 30-40 % das Stadium Duke's C auf. Etwa 60 % aller Patienten entwickeln im Verlauf der Progression des kolorektalen Karzinoms Metastasen und sterben an der Erkrankung.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Protein c-FLIP_L weist eine starke Homologie zu Caspase-8 auf, im aktiven Zentrum des Proteins sind jedoch zwei Aminosäurereste, die für die katalytische Funktion essentiell sind, ausgetauscht. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Funktion des c-FLIP_L-Proteins noch weitgehend kontrovers diskutiert. Neben Indizien für eine Apoptose-inhibierende Rolle des Proteins existierten auch einige Anhaltspunkte für eine mögliche Apoptose-induzierende Funktion von c-FLIP_L. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Signalübertragungswege des CD95-Rezeptors beschrieben. In Typ-I-Zellen wird die Apoptose durch die Ausbildung des Zelltod-auslösenden Signalkomplexes („DISC“) ausgelöst. In Typ-II-Zellen liegt ein Defekt in der Formierung des „DISC“ vor. In diesen Zellen wird das Zelltodprogramm wahrscheinlich durch die Aktivierung einer mitochondrialen Signalkaskade initiiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte in funktionellen Studien die zelluläre Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins untersucht werden. Hierzu sollte die c-FLIP_L-cDNS mit Hilfe retroviraler Expressionsvektoren stabil in T-Zellen, die als Typ-I- und Typ-II-Zellen kategorisiert wurden, eingeführt werden. Anschließend sollten Typ-I- als auch Typ-II-Zellen, die das rekombinante c-FLIP_L-Protein in unterschiedlicher Expressionsstärke bilden, hinsichtlich ihrer Apoptosesensitivität untersucht werden. Als Apoptosestimulans sollten zum einen agonistische Anti-CD95-Antikörper als auch rekombinanter CD95-Ligand miteinander verglichen werden.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, die klinische Relevanz der Expression des CD95L-Proteins durch Tumorzellen am Beispiel von Kolonkarzinomzelllinien zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob Kolonkarzinome, die das CD95L-Protein exprimieren, in T-Lymphozyten über den postulierten aktiven „Gegenangriff-Mechanismus“ Apoptose auslösen können, sollten Koinkubationen von Kolonkarzinomzelllinien mit den T-Zelllinien H9 (Typ-I) und Jurkat (Typ-II) durchgeführt werden. Aktivierte T-Zellen sind aufgrund der Regulation der c-FLIP_L-Genexpression durch IL-2 jedoch nur transient vor einem möglichen „Gegenangriff“ durch die Tumorzellen geschützt. Um im Rahmen einer *ex vivo*-Immuntherapie von kolorektalen Karzinomen einen effektiven Schutz der T-Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch die Tumorzellen zu erzielen, wäre es notwendig, in diesen Zellen eine konstitutive Resistenz gegen den CD95L-vermittelten Eliminationsmechanismus der Tumorzellen zu etablieren. Aufgrund dessen bestand eine weitere Aufgabe dieser Arbeit darin, in Kokultivierungsversuchen mit Kolonkarzinomzellen, die funktionelles CD95L-Protein bilden, zu überprüfen, ob durch die stabile Expression des c-FLIP_L-Proteins in T-Zellen beider Kategorien ein konstitutiver Apoptoseschutz erzielt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 19:1	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose MP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ampuwa (dest. H ₂ O)	Fresenius, Bad Homburg
APS	Sigma, St. Louis, USA
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DTT	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Formamid, deionisiert	Sigma, St. Louis, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Bio-Rad, Hercules, USA
Harz zum Deionisieren (AG [®] 501-X8)	Bio-Rad, Hercules, USA
Hoechst 33342-Farbstoff	Hoechst AG, Frankfurt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LB-Agar	GibcoBRL, Eggenstein
LB-Broth	GibcoBRL, Eggenstein
Lymphoprep (Ficoll)	Nycomed/Gibco, Eggenstein
Matrix-Metalloproteinase Inhibitor KB8301	PharMingen, San Diego, USA
Oligo (dT) ₁₅ -Primer	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Orange G	Sigma, St. Louis, USA
PKH-26	Sigma, St. Louis, USA
PMA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PMSF	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polybren	Abbott Laboratories, Illinois, USA
Propidiumiodid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein-A-Lösung	Sigma, St. Louis, USA
Protein-G-Lösung	Sigma, St. Louis, USA
Protein-G-Agarose	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase-Inhibitor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Rainbow-MultiMark	Novex, San Diego, USA
TEMED	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Alle Chemikalien und Lösungsmittel waren von p.A.-Qualität und stammten von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Radiochemikalien und ^{14}C -Längensstandard stammten von Amersham (Braunschweig), Reagenzien für die Protein-Gelelektrophorese und ‚Western Blot‘-Analysen von Novex (San Diego, USA). Sämtliche weiteren Reagenzien, Nukleotide und Nukleinsäure-Molekulargewichtsstandards wurden, soweit nicht anders vermerkt, von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, bidestilliertem H_2O angesetzt. Prozentangaben beziehen sich bei Feststoffeinwagen immer auf w/v, bei Flüssigkeiten auf v/v.

2.1.2 Puffer

Dephosphorylierungs-Puffer (10x)	0,5 M Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8,5
Ligations-Puffer (10x)	660 mM Tris-HCl 50 mM MgCl_2 10 mM DTT, pH 7,5
MACS-Puffer	0,5 % BSA in PBS 2 mM EDTA, pH 8,0
Probenauftrags-Puffer für DNS-Agarosegele (6x)	50 % Lymphoprep (Ficoll) 0,5 % Bromphenolblau oder Orange G in TE-Puffer
Probenauftrags-Puffer für Sequenziergele	125 μl deionisiertes Formamid 25 μl 50 mM EDTA, pH 8,0
reduzierender Probenauftrags-Puffer für NuPAGE-Gele (4x)	Novex, San Diego, USA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 2 mM EDTA, pH 7,5
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5
PBST	PBS + 0,05 % Tween 20
Zelllyse-Puffer für Gesamtproteinextraktion	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM PMSF 1 % Triton X-100 10 % Glycerol 1 Tablette Complete Mini/10 ml Zelllyse- Puffer ; pH 7,5

2.1.3 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Abi Prism™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Biosystems, Warrington, England
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
AMPLIFY-Lösung	Amersham, Braunschweig
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, Hercules, USA
Blocking solution	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Casyton-Lösung	Schärfe System, Reutlingen
Cellular DNA Fragmentation ELISA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Complete™ Mini	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMEM	GibcoBRL, Eggenstein
Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)	Amersham, Braunschweig
Expand™ High Fidelity	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Fas (CD95) Ligand (recombinant) Kit	Alexis Corporation, San Diego, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lipofectamin PLUS	GibcoBRL, Eggenstein
Magnetic Cell Sorting (MACS) Magnetkügelchen und Säulen	Miltenyi Biotec, Bologna, Italien
NucleoSpin Kit	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE™-Bis-Tris-Gele und Puffer	Novex, San Diego, USA
Mounting-Medium	Sigma, St. Louis, USA
PBS	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PKH-26 General Cell Linker Kit	Sigma, St. Louis, USA
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuiaEx II Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
RIPA-Lysepuffer für Gesamtproteinextraktion	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RPMI 1640	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
10xTAE	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
10x TBE	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TNT® T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Madison, USA
Trypanblau-Lösung	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit	Novex, San Diego, USA

2.1.4 Kulturmedien und Medienzusätze

2.1.4.1 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	1 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt 17 mM NaCl	pH 7,4
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar	
SOC-Medium	2 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM NaOH 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose	pH 7,0

Die Medien werden 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden 100 µg/ml Ampicillin zugefügt.

2.1.4.2 Antibiotika

Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
------------	--

2.1.4.3 Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen

Kulturmedium für Mauszelllinien	DMEM 1xNEAA 1 mM Natrium-Pyruvat 2 mM L-Glutamin
Kulturmedium für humane Zelllinien	RPMI 1640 1xNEAA 1 mM Natrium-Pyruvat 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	7,5 % DMSO 92,5 % FKS

2.1.4.4 Zellkulturzusätze

Nicht-essentielle Aminosäuren NEAA (100x)	Biochrom, Berlin
Na-Pyruvat (100 mM)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein
Mycoplex FKS	PAA Laboratories, Linz, Österreich

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 Zelllinien

Name	Art	Herkunft
E86	Derivat der embryonalen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 aus der Maus	ATCC, Rockville, # CRL-9642
HSRBM01	Derivat der embryonalen Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 aus der Maus	C. Bordignon, Istituto Scientifico San Raffaele, Mailand, Italien
Jurkat	akute T-Zell-Leukämie	ATCC, Rockville, # TIB-152
H9	akute T-Zell-Leukämie	Prof. P. Krammer, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
SW480	kolorektales Adenokarzinom	ECACC, Salisbury, England
SW620	Lymphknotenmetastase der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie SW480, Duke's Stadium Typ C	NCI, Bethesda USA
HCT 116	kolorektales Karzinom	NCI, Bethesda USA
HCT15	kolorektales Adenokarzinom	NCI, Bethesda USA
HT29	kolorektales Adenokarzinom	NCI, Bethesda USA
KM12	kolorektales Karzinom	NCI, Bethesda USA
Colo205	Metastase aus der Aszitesflüssigkeit der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie Colo201, Duke's Stadium Typ D	NCI, Bethesda USA

2.1.5.2 Bakterienstämme

E.coli JM110: *F'*, *ara*, *dam*⁻, *dcm*⁻, *galK*, *galT*, *lacD1*, *lacI*^g^Z, *lacZ*ΔM15 *leu*, *proD1*, *proA*⁺⁺, *proB*⁺⁺, *strA*, *supE44*, *thi*, *thr*, *tonA*, *tra* 36, *tsx*

E.coli DH5α *F*⁻, *f80dlacZ*ΔM15, *D(lacZYA-argF)*U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r*κ⁻, *m*κ⁺), *phoA*, *supE44* I⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*

Epicurian Coli XL2-Blue ultrakompetente Zellen (Stratagene, Heidelberg) *ΔmcrA183*, *ΔmcrCB-hsdSMR-mrr173*, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [*F'*, *proAB*, *lacI*^g^ZΔM15, *Tn10(TetR)*]

2.1.6 Plasmide

pLNCX Roche Diagnostics GmbH
 pWW15 Wels *et al.*, 1992
 pLDNS-TK-*opa* Roche Diagnostics GmbH

2.1.7 Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5' → 3' Orientierung	Richtung	Verwendung
MCS f	GATCACTCGAGgacGGATCCgacGTT AACGTCGACgtcAGATCTAT	vorwärts	Einführung der multiplen Klonierungsstelle
MCS r	CGATAGATCTagcGTCGACGTTAACG TCGGATCCgctCT	rückwärts	Einführung der multiplen Klonierungsstelle
LNGFR f	taatgtcgacgccaccATGGGGGCAGGTG CCACCGGC	vorwärts	Klonierung
LNGFR r	taatagatctTCAGATCCCCCTGTTCCAC CTCTTG	rückwärts	Klonierung
FLIP f	taatgtcgacgccaccATGTCTGCTGAAGT CATCCATCAG	vorwärts	Klonierung; Sequenzierung
FLIP r	taatagatctttaattcagatcctctctgagatgagtttt tgttcTGTGTAGGAGAGGATAAGTTTC	rückwärts	Klonierung; Sequenzierung
FLIP f2	GAGACCCACCTGCTCAGG	vorwärts	Sequenzierung
FLIP f3	AGTCTCAAGGATCCTTCAAATA	vorwärts	Sequenzierung
FLIP f4	CACCGAGACTACGACAGCTT	vorwärts	Sequenzierung
FLIP f5	CCATCCCTGTACCGGCAG	vorwärts	Sequenzierung
FLIP r2	CATGCATGTAGCCATTGAGTTC	rückwärts	Sequenzierung
FLIP r3	TGATGTGATGCAGGGGGAG	rückwärts	Sequenzierung
FLIP r4	CTTCACTGGTTCTTGTGAGC	rückwärts	Sequenzierung
FLIP r5	AAAATTAATGAGGACACATCAGA	rückwärts	Sequenzierung
M13 r	CAGGAAACAGCTATGAC	vorwärts	Sequenzierung
M13 (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	rückwärts	Sequenzierung
CD95L f	GGATTGGGCCTGGGGATGTTCA	vorwärts	RT-PCR
CD95L r	TTGTGGCTCAGGGGCAGGTTGTTG	rückwärts	RT-PCR
TRAIL f	TGCACTTGAGGAATGGTGAAGTGG	vorwärts	RT-PCR
TRAIL r	TGTCCCTTAAGGAAACCTGGAGGC	rückwärts	RT-PCR
CD95 f	CAGAACTTGGAAGGCCTGCATC	vorwärts	RT-PCR
CD95 r	TCTGTTCTGCTGTGTCTTGGAC	rückwärts	RT-PCR
β-Aktin f	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	vorwärts	RT-PCR
β-Aktin r	GGTCTCAAACATGATCTGGG	rückwärts	RT-PCR

Nicht-komplementäre „Überhänge“ der Oligonukleotide sind in Kleinbuchstaben angegeben. Die Kleinbuchstaben in den Primern MCS f und MCS r kennzeichnen „Linker“-Nukleotide, die eingefügt wurden, um direkt benachbarte Restriktionsenzymkennungsstellen voneinander zu trennen.

2.1.8 Enzyme

Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer stammten alle von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim). Alle sonstigen verwendeten Enzyme und Reaktionspuffer wurden ebenfalls, soweit nicht anders vermerkt, von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

Name	Spezies	Klon	Isotyp	Verwendung	Bezug über:
Anti-c-FLIP	Maus	NF6	IgG1	Nachweis des c-FLIP _L -Proteins im ‚Western Blot‘	Scaffidi <i>et al.</i> , 1997
Anti-Caspase-8	Maus	5F7	IgG2b	Nachweis des Caspase-8-Proteins im ‚Western Blot‘	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-CD95	Maus	DX2	IgG1	Nachweis des CD95-Proteins in der Durchflusszytometrie	PharMingen, San Diego, USA
Anti-c-myc	Maus	9E10	IgG1	indirekter Nachweis des c-FLIP _L -Proteins im ‚Western Blot‘	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-ERK2	Maus	G263-7	IgG1	Isotyp-Kontrollantikörper für die Durchflusszytometrie und Blockierungsversuche	PharMingen, San Diego, USA
Anti-FasL (CD95L)	Maus	NOK-1	IgG1	Nachweis des CD95-Ligand-Proteins in der Durchflusszytometrie; Immunpräzipitation	PharMingen, San Diego, USA
Anti-FasL (CD95L)	Maus	G247-4	IgG1	Nachweis des CD95-Ligand-Proteins im ‚Western Blot‘	PharMingen, San Diego, USA
Anti-LNGFR	Maus	8211	IgG1	Nachweis des LNGFR-Proteins in der Durchflusszytometrie; Anreicherung infizierter Zellen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Neurofilament 200 kD	Maus	RT97	IgG1	Isotyp-Kontrollantikörper für die Durchflusszytometrie	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Ig-Klasse	Isotyp	Bezug über:
Anti-Maus Ig-Fluorescein (FITC)	Schaf	IgG	FITC-gekoppelter Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Maus IgG-POD	Schaf	IgG	POD-gekoppelter Sekundärantikörper für ‚Western Blot‘	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Maus IgG-AP	Schaf	IgG	AP-gekoppelter Sekundärantikörper für ‚Western Blot‘	Novex, San Diego, USA

2.1.10 Agonistische und antagonistische Antikörper

Name	Spezies	Klon	Isotyp	Verwendung	Bezug über :
Anti-Fas (CD95)	Maus	2R2	IgG3	Induktion von Apoptose	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Fas (CD95)	Maus	CH-11	IgM	Induktion von Apoptose	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-Fas (CD95)	Maus	ZB4	IgG1	Blockierung des CD95-Rezeptors	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA

2.1.11 Geräte

Bakterienschüttler	TH 25/SM 25, Edmund Bühler
CASY TTC Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer (FACSscan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	GibcoBRL, Eggenstein
ELISA-Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Geltrockner	Bio-Rad, München
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Lumilmager	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Mikroskop (Axiovert)	Zeiss, Oberkochen
Minifuge T	Heraeus Instruments, Hanau
NuPAGE™ Electrophoresis System	Novex, San Diego, USA
pH-Meter inoLab	WTW, Wien
Röntgenfilmentwickler	Agfa, Leverkusen
Sequenziergelapparatur	PE Biosystems, Warrington, England
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer UVIKON 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Sterilwerkbank	BDK, Reutlingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	UVP, San Gabriel, USA
Zellsortierer (FACSsort)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.12 Verbrauchsmaterial

Polypropylen Reaktionsgefäße	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF-Membranen	Novex, San Diego, USA
Röntgenfilme	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
„Transwell“-Platten	Costar, Cambridge, USA

Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhäusen), Biozym (Oldendorf) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNS

Die Präparation der Plasmid-DNS (20 µg) erfolgt aus 5-ml-Schüttelkulturen mit dem ‚Nucleospin Kit‘ nach Vorschrift des Herstellers. Größere Plasmid-DNS-Mengen werden mit dem ‚Plasmid Midi Kit‘ nach Anleitung des Herstellers präpariert.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird spektrofotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Absorptionseinheit einer Konzentration von 50 µg/ml DNS und 40 µg/ml RNS. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm erlaubt eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäurelösung.

2.2.1.3 Subklonierung von DNS-Fragmenten in Plasmide

2.2.1.3.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid-DNS werden je 1-2 µg DNS für 1 h mit 1-5 U der geeigneten Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgt bei der Enzym-spezifischen Temperatur und mit den vom Hersteller empfohlenen optimalen Reaktionspuffern. Zur gleichzeitigen Spaltung von DNS mit zwei Restriktionsendonukleasen wird ein Reaktionspuffer verwendet, in dem beide Enzyme optimale Aktivität besitzen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

Je nach Größe der zu analysierenden DNS-Fragmente werden 0,5- bis 2 %-ige Flachbett-Agarosegele verwendet. Hierzu wird Agarose in der entsprechenden Konzentration mit 1xTAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Die Agaroselösung wird nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in eine Flachbett-Gelkammer mit einem Kamm als Taschenformer gegossen. Die zu analysierenden DNS-Proben werden mit 1/6 Volumen Probenauftrags-Puffer versetzt und neben einem geeigneten DNS-Molekulargewichtsstandard in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgt in 1xTAE Puffer bei 100 V. Die nach ihrer Größe aufgetrennte DNS wird über die Fluoreszenz des

interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.1.3.3 Dephosphorylierung kohäsiver Restriktionsenzymchnittstellen

Um eine Religation oder Konkatemerbildung der kohäsiven Enden von Plasmid-Vektoren nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, werden deren 5' Enden dephosphoryliert. Dazu werden 20 µl des Restriktionsansatzes für 10 min bei 68°C inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Dann wird die Plasmid-DNS mit 1xDephosphorylierungs-Puffer und 1,6 U alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNS-Bande mittels des ‚QuiaEx II Gelextraktions Kit‘ isoliert.

2.2.1.3.4 Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Restriktionsansätzen oder Dephosphorylierungsreaktionen werden die DNS-Fragmente zur Entfernung von Enzymen und Salzen auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNS wird anschließend aus der entsprechenden Bande mit dem ‚QuiaEx II Gelextraktions Kit‘ nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.1.3.5 Ligation

Für die Ligation werden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 3:1 miteinander vermischt. Die einzusetzende Fragmentmenge berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Fragmentmenge (ng)} = (1-3) \times \frac{\text{Länge des Fragments (bp)} \times 50 \text{ ng Vektor}}{\text{Länge des Vektors (bp)}}$$

Das gewählte Verhältnis richtet sich nach der Fragmentgröße. Die Ligation wird mit 1x Ligationspuffer und 1 U T4-DNS-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Der Ligationsansatz wird zunächst 30 min auf Eis und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3.6 Präparation kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter DH5α- und JM110-Bakterienzellen werden 100 ml frisches LB-Medium mit 0,5 ml einer 5-ml-Bakterien-Übernachtskultur (ausgehend von einer Einzelkolonie) beimpft und bei 37°C angeschüttelt. Beim Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,3-0,9 (je nach Bakterienstamm) wird die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (200xg, 10 min, 4°C). Das Bakteriensediment wird in eiskalter CaCl₂/MgCl₂-Lösung resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, dann werden die Zellen erneut abzentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Schritts werden die Bakterien in 2 ml eisgekühlter CaCl₂/Glycerin-Lösung

2.2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNS

Die Gesamt-RNS wird aus 1×10^6 eukaryontischen Kulturzellen mittels des ‚High Pure RNA Isolation Kit‘ nach Angaben des Herstellers isoliert. Die durchschnittliche Ausbeute beträgt ca. $10 \mu\text{g RNS}/10^6$ Zellen. Die isolierte Gesamt-RNS kann direkt in die Erststrang-cDNS-Synthese (s. 2.2.1.5) eingesetzt werden.

2.2.1.5 Erststrang-cDNS-Synthese (‚Reverse Transkription‘)

Für die ‚Reverse Transkription‘ werden $1 \mu\text{g}$ gesamtzelluläre RNS zusammen mit 25 pmol Erststrang-cDNS-Synthese-Primer (Oligo (dT)₁₅-Primer) in einem Gesamtvolumen von $11 \mu\text{l}$ für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden $4 \mu\text{l}$ des 5xReaktionspuffers, $2 \mu\text{l}$ DTT (100 mM), $2 \mu\text{l}$ dNTP-Mix (10 mM), $1 \mu\text{l}$ RNase-Inhibitor ($40 \text{ U}/\mu\text{l}$) und $1 \mu\text{l}$ ‚Expand Reverse Transkriptase‘ ($50 \text{ U}/\mu\text{l}$) zugesetzt. Der Ansatz wird 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis abgestoppt. Die cDNS kann dann direkt in eine PCR (s. 2.2.1.6) eingesetzt oder bei -20°C verwahrt werden.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Je 5 ng Plasmid-DNS oder $1\text{-}5 \mu\text{l}$ Erststrang-cDNS (s. 2.2.1.5) werden mit dem ‚Expand High Fidelity PCR System‘ amplifiziert. Dieser „Kit“ enthält einen Enzym-Mix aus der thermostabilen Taq-Polymerase und Pwo-DNS-Polymerasen, die durch ihre $3' \rightarrow 5'$ Exonuklease-Korrekturleseaktivität eine sehr hohe Genauigkeit und Spezifität (1 falsche Base pro $8,5 \times 10^6$ amplifizierte Basenpaare) besitzen. Neben der zu amplifizierenden DNS werden $1 \times$ Expand HF-Puffer (mit 15 mM MgCl_2), $0,2 \text{ mM}$ dNTP-Mix, jeweils 50 pmol der beiden Amplifikations-Oligonukleotide und $3,5 \text{ U}$ ‚Expand High Fidelity PCR System Enzym Mix‘ in einem Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Oligonukleotid- und MgCl_2 -Konzentrationen müssen für jede PCR optimiert werden.

Die PCR-Reaktion setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Anfangsdenaturierung	94°C	5 min oder 10 min
20-40 x	Denaturierung	94°C	1 min
	Oligonukleotid-Anlagerung	T_m	1 min
	Elongation	72°C	1 min für 1000 bp
1 x	Abschluss-Extension	72°C	7 min

Die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide errechnet sich empirisch (Wallace *et al.*, 1979):

$$T_m [^\circ\text{C}] = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$

2.2.1.7 Sequenzanalyse

2.2.1.7.1 Sequenzierreaktion nach der Strangabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierreaktionen werden mittels des ‚Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit‘ durchgeführt. Pro Ansatz werden 500 ng Plasmid-DNS mit 4 µl ‚Terminator Premix‘, 10 pmol Primer und 1 µl DMSO in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Strangmarkierung erfolgt unter folgenden Bedingungen in der PCR-Maschine:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	96°C	10 min
25 x	96°C	30 sec
	T _m	30 sec
	60°C	4 min

T_m = Schmelztemperatur der Sequenzieroligonukleotide (s. 2.1.7)

Bei der Sequenzierreaktion wird die Elongation bei 60°C durchgeführt, weil die verwendete ‚AmpliTaq‘ DNS-Polymerase nicht-markierte dNTP gegenüber fluoreszenzmarkierten ddNTP bevorzugt als Substrat verwendet.

Die Sequenzierprodukte werden zur Entfernung überschüssiger ddNTP, dNTP und Oligonukleotide mittels Ethanolpräzipitation gemäß dem Hersteller-Protokoll gereinigt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden die Sequenzierprodukte in 4 µl Probenauftrags-Puffer aufgenommen, 2 Minuten bei 95°C inkubiert, um die doppelsträngige DNS zu Einzelsträngen zu denaturieren und dann auf Eis verwahrt.

2.2.1.7.2 Sequenz-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Sequenzierprodukte werden denaturierende, 6 %-ige Polyacrylamidgele hergestellt. Die Gellösung wird 5 min deionisiert, durch einen 0,2-µm-Sterilfilter filtriert und anschließend durch Anlegen eines Vakuums entgast, bevor die Polymerisationsbildner APS und TEMED zugegeben werden. Die Gellösung wird luftblasenfrei zwischen zwei entfettete, mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und anschließend wird ein Gießkamm eingesetzt.

Sequenziergel-Lösung:

- 40 g Harnstoff
- 12 ml Acrylamid-Lösung (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1)
- 8 ml 10x TBE
- 72 ml bidestilliertes H₂O
- 240 µl APS (10 %)
- 32 µl TEMED

Die denaturierten Proben werden nach dem Polymerisieren des Gels bei 20 mA mit 1xTBE Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.2.1 Gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation

Die *in vitro*-Synthese von ^{35}S -markiertem c-FLIP_L-Protein erfolgt mit dem ‚TNT T3/T7 Coupled Reticulocyte Lysate System‘ unter Zusatz von 2 μl ^{35}S -markiertem Methionin. Die mit einer angehängten „myc-Sequenz“ versehene c-FLIP_L-cDNS wurde zunächst in den Vektor pWW15 inkloniert (s. 3.1.1) und dann mittels T3-RNS-Polymerase gemäß dem Hersteller-Protokoll transkribiert und anschließend translatiert. Danach werden 10 μl des Ansatzes mit reduzierendem NuPAGE-Probenauftragspuffer auf ein 10 % NuPAGE-Bis-Tris-Gel aufgetragen und mit dem im „Kit“ mitgeliefertem Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Fixieren der Proteine wird das Gel im Anschluss an den Lauf zunächst 30 min in Isopropanol-H₂O-Essigsäure-Lösung und danach in „AMPLIFY-Lösung“ geschwenkt, um die radioaktiven Signale zu verstärken. Vor der Autoradiografie (hier kommt es zu einer Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms aufgrund der Inkorporierung der Radioaktivität in die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine) wird das Gel 1-2 h im Geltrockner getrocknet.

Isopropanol-H ₂ O-Essigsäure-Lösung	25 % Isopropanol
	65 % bidestilliertes H ₂ O
	10 % Essigsäure

2.2.2.2 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Gewinnung von Zelllysaten werden 1×10^6 - 1×10^7 Zellen aus subkonfluenten Kulturen (adhärente Zellen) bzw. Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase (Suspensionszelllinien) zwei- bis dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Zelllyse-Puffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Lysate für den Nachweis fragmentierter DNS im Zytoplasma apoptotischer Zellen mit dem ‚Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit‘ werden mit dem Lysepuffer des Herstellers gewonnen. Anschließend werden die Kerne und Zelltrümmer abzentrifugiert (10000xg, 30 min, 4°C) und die Überstände bis zur weiteren Analyse in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und bei -20°C verwahrt.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten wurde das ‚Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent‘ (Bradford, 1976) verwendet. Rinderserum-Albumin dient als Standard zur Erstellung einer Eichkurve. Über die Eichkurve kann aus der Absorption der Probe ihre Proteinkonzentration ermittelt werden. Um die Proteinkonzentration einer großen Anzahl von Proben parallel bestimmen zu können, wird die Proteinbestimmung im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt.

Hierzu werden die gewonnenen Zelllysate geeignet mit PBS verdünnt und 100 µl jeder Probe in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von Bio-Rad-Lösung (1:5 verdünnt mit bidestilliertem H₂O) werden die Proben 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm im „ELISA-Reader“ gemessen wird.

2.2.2.4 Immunpräzipitation (nach Crawford *et al.*, 1980)

Für die Immunpräzipitation werden 1×10^7 Zellen aus subkonfluenten Kulturen (adhärente Zellen) bzw. Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase (Suspensionszelllinien) mit 500 µl eiskaltem ‚RIPA-Lysepuffer‘ versetzt und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10000xg, 10 min, 4°C). Der Proteingehalt der Zelllysate wird wie unter 2.2.2.3 beschrieben bestimmt. Danach werden 500 µg Gesamtprotein für eine Vorreinigung („Preclearing“) des Proteinextrakts mit 1 µg Kontrollantikörper geeigneter Isotyp-Spezifität unter Zusatz von 50 µl Protein-G-Agarose oder Protein-A-Agarose (welche Agarose verwendet wird hängt von der Immunglobulin-Subklasse der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper ab) für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch diese Vorinkubation werden irrelevante zelluläre Proteine, die unspezifisch an den spezifischen Antikörper binden könnten, entfernt. Die Protein-G-Agarose- oder Protein-A-Agarose-Präzipitate werden dann bei 10000xg sedimentiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden die spezifischen Proteine mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers bzw. des Antikörpers der Isotyp-Kontrolle bei 4°C innerhalb 1 h unter Rotation inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe werden durch Zugabe von 50 µl Protein-G-Agarose oder Protein-A-Agarose 1 h bei 4°C präzipitiert. Nach kurzer Zentrifugation (10000xg, 15 sec, 4°C) wird der Überstand verworfen. Die Immunpräzipitate werden anschließend dreimal mit je 1 ml RIPA-Lysepuffer gewaschen, mit 20 µl reduzierendem Probenauftrags-Puffer für NuPAGE-Bis-Tris-Gele versetzt und wie unter 2.2.2.5 beschrieben analysiert.

2.2.2.5 Protein-Gelelektrophorese und ‚Western Blot‘

Proteine aus Zelllysaten (s. 2.2.2.2) oder nach einer Immunpräzipitation (2.2.2.4) werden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Regel werden hierfür 10-100 µg Gesamtprotein pro Gelspur aufgetragen. Für die Gelelektrophorese werden fertige 10 %-ige oder 4-12 %-ige Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gele und die dazugehörigen Puffer sowie der reduzierende Probenauftrags-Puffer der Firma Novex verwendet. Die Probenvorbereitung und der Gellauf werden gemäß dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung werden in einer Spur 5 µl ‚Rainbow-MultiMark‘ aufgetragen.

Die aufgetrennten Proteine werden anschließend mittels des „Semidry-Blotting“-Verfahrens (Burnette, 1981) nach Vorschrift des Herstellers auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranvorbereitung und der Transferlauf werden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss an den Transfer werden die Membranen zweimal für 5 min in 20 ml bidestilliertem H₂O gewaschen, um Gel- und Transferpufferreste zu entfernen. Danach erfolgt der Nachweis der

spezifischen Proteine entweder mit dem ‚Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit‘ oder durch Inkubation der PVDF-Membranen für 1-2 h in Blockierungslösung. Im Anschluss daran wird die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min mit PBST folgt eine 1-stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur. Vor dem Proteinnachweis wird der ‚Blot‘ erneut dreimal gewaschen. Für den Proteinnachweis wird das ‚Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)‘ für POD-gekoppelte sekundäre Antikörper oder CDP* aus dem ‚Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit‘ für AP-gekoppelte Zweitantikörper verwendet.

Blockierungslösung: 10 % Blocking solution in PBST

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultur

Alle Zellen und Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die ekotrope retrovirale Verpackungszelllinie E86 sowie die amphotrope Verpackungszelllinie HSRBM01 werden in DMEM-Medium kultiviert. Alle anderen Zelllinien werden in RPMI1640-Medium gehalten (s. 2.1.4.3). Das Kulturmedium von Suspensionszellen wird dann erneuert, wenn das dem Medium zugesetzte Phenolrot in verbrauchtem, angesäuertem Kulturmedium zu einer Gelbfärbung des Mediums führt. Das Medium von adhären Zellen wird erneuert, wenn diese einen nahezu konfluenten Zellrasen gebildet haben. Da sich Zellen für alle Experimente in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, werden die Zellen am Tag vor dem Experiment noch einmal passagiert. Bei der Passagierung von Suspensionszellen werden diese im Verhältnis 1:5-1:10 mit Kulturmedium verdünnt und anschließend mit 2/3 frischem Medium und 1/3 konditioniertem Medium versetzt. Für die Passagierung und Ernte von adhären wachsenden Zelllinien wird das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und die Zellen durch 2-minütige Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Die Reaktion wird durch Zusatz von Medium gestoppt. Die Zellen werden anschließend abzentrifugiert (200xg, 5-10 min, RT), je nach Verwendung mit PBS oder Medium gewaschen und erneut wie oben beschrieben ausgesät oder für weitere Analysen verwendet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit einer 1:100- oder 1:1000-Verdünnung der Zellsuspension in Casyton-Lösung mit dem Zellzählgerät. Für die Beurteilung der Zellvitalität werden die Zellen mit Trypanblau-Lösung angefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Alle Lösungen für zelluläre Experimente werden mit Ampuwa-Wasser angesetzt und durch 0,2-µm-Sterilfilter filtriert.

2.2.3.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen

Zellkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 2×10^5 - 4×10^6 Zellen/ml mit einem Anteil toter Zellen $< 10\%$) werden wie unter 2.2.3.1 beschrieben geerntet. Nach dem Zentrifugieren wird das Zellsediment von je 5×10^5 - 5×10^6 Zellen in 500 μ l kaltem FKS (4°C) resuspendiert und in auf Eis gelagerte Einfrierröhrchen überführt. Anschließend werden 500 μ l einer eiskalten Mischung aus 15 % DMSO und 85 % FKS in die Ampullen hinzugefügt. Die so erreichte Endkonzentration von DMSO beträgt 7,5 % pro Ampulle. Diese werden dann in einen Einfrierbehälter (Nalgene, Rotherwas, England) verbracht und bei -80°C verwahrt. Für eine Langzeitlagerung bei -182°C werden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

2.2.3.3 Abtrennung toter Zellen

Um tote Zellen aus Suspensionskulturen und adhärennten Zellkulturen zu entfernen, werden die Zellen einer Dichtegradienten-Zentrifugation in Lymphoprep-Trennmedium unterworfen. Hierzu wird Lymphoprep mit einem gleichen Volumen der auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellten Zellsuspensionen langsam überschichtet, so dass es zu einer möglichst geringen Vermischung der beiden Phasen kommt. Die Röhrchen werden anschließend 30 min bei 400xg ohne Bremse zentrifugiert. Vitale Zellen sammeln sich in der Interphase zwischen Lymphoprep und dem überschichteten Kulturmedium, tote Zellen verteilen sich in der Lymphoprep-Schicht. Die lebenden Zellen werden mit einer Pipette aus der Interphase extrahiert, mit Medium versetzt, abzentrifugiert (200xg, 5-10 min, RT) und noch zweimal mit Kulturmedium gewaschen, bevor sie in weitere Versuche eingesetzt werden.

2.2.3.4 Stimulierung von Zellen

Um die Expression des CD95-Ligand-Zelloberflächenmoleküls auf den T-Leukämie-Zelllinien Jurkat und H9 für die Analyse mittels reverser Transkription (s. 2.2.1.5) und anschließender PCR (s. 2.2.1.6), mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.3.7) oder mittels ‚Western Blot‘ (s. 2.2.2.5) zu induzieren, müssen die Zelllinien *in vitro* aktiviert werden. Hierzu werden je 1×10^6 Zellen/ml für 3 Tage in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A in Kulturmedium inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 10 ng/ml PMA und 1 μM Ionomycin für 4 h stimuliert. Da CD95L durch Matrix-Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten werden kann, wird den Zelllinien, deren Matrix-Metalloproteinase Aktivität nicht bekannt ist, gegebenenfalls während der Stimulierung der Matrix-Metalloproteinase Inhibitor KB8301 in einer Konzentration von 1 μM zugesetzt.

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen für eine FACS-Analyse zwei- bis dreimal mit erwärmtem PBS, für die Isolierung von Gesamt-RNS (s. 2.2.1.4) und die Gesamtproteinextraktion (s. 2.2.2.2) mit eiskaltem PBS gewaschen.

2.2.3.5 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Lipofektion

Für die transiente Transfektion der ekotrophen retroviralen Verpackungszelllinie E86 wird das liposomale Transfektionsreagenz ‚Lipofectamin PLUS‘ verwendet. Am Tag vor der Transfektion werden 5×10^5 Zellen in 60-mm²-Zellkulturschalen ausgesät. Pro Transfektionsansatz werden 2 µg Plasmid-DNS eingesetzt. Die Transfektion wird gemäß dem Hersteller-Protokoll durchgeführt.

2.2.3.6 Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und Infektion eukaryontischer Zelllinien

Zwei Tage nach der liposomalen Transfektion der E86-Zellen wird der Zellkulturüberstand abpipettiert und durch einen 0,45-µm-Sterilfilter (durchlässig für virale Partikel) filtriert. Der Überstand über den am Tag zuvor in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen in 60-mm²-Zellkulturschalen ausgesäten HSRBM01-Zellen wird abgesaugt. Pro Infektion werden 1,5 ml des gewonnenen Zellkulturüberstands mit einem gleichen Volumen an frischem Medium zusammen mit 8 µg/ml Polybren zu den zu infizierenden Zellen zugegeben. Für die Infektion werden die Zellen 6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum wird der Überstand abgenommen. Die Zellen werden mit 4 ml frischem Kulturmedium versorgt und für mindestens drei weitere Tage kultiviert, bevor der Erfolg der retroviralen Infektion durchflusszytometrisch (s. 2.2.3.7) untersucht werden kann.

Für die Infektion der T-Leukämie-Zelllinien Jurkat und H9 werden „Transwell“-Platten verwendet. Diese bestehen aus einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit Filtereinsätzen, die eine Porengröße von 0,4 µm aufweisen. Für die Kokultivierung der T-Leukämie-Zelllinien mit einem stabilen HSRBM01-Klon wird die Verpackungszelllinie HSRBM01 auf 5×10^5 Zellen/ml, die T-Zelllinien werden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Infektionsansatz werden 1×10^6 HSRBM01-Zellen für 2-5 Tage mit 1×10^6 Zellen der T-Zelllinien in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren kokultiviert. Um die Proliferation der T-Zelllinien zu stimulieren, wird den Kokultivierungen außerdem 10 µg/ml Concanavalin A zugesetzt. Nach der Infektion werden die Filtereinsätze, welche die infizierten T-Zelllinien enthalten, entfernt. Die Zellen werden durch Spülen mit Kulturmedium von dem Filter in eine 10-cm-Zellkulturschale überführt, mit 10 ml frischem Kulturmedium versorgt und für mindestens drei weitere Tage kultiviert, bevor der Erfolg der retroviralen Infektion (s. 2.2.3.7) untersucht werden kann.

2.2.3.7 Durchflusszytometrie („FACS-Analyse“)

Die Messung der LNGFR-Expression der infizierten Zelllinien und die Bestimmung der CD95- und CD95L-Expression der Kolonkarzinom- und T-Leukämie-Zelllinien erfolgt am Durchflusszytometer (FACSscan) mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierfür werden 1×10^6 Zellen zweimal mit PBS/FCS-Lösung gewaschen. Die Zellen werden anschließend abzentrifugiert (200xg, 10 min, RT) und mit 1 µg/ml des unkonjugierten primären Antikörpers für 30 min bei 4°C

inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper werden die Zellen dreimal mit PBS/FCS-Lösung gewaschen und dann 30 min mit 1 µg/ml des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers bei 4°C inkubiert. Die Verpackungszelllinien, die unter S2-Bedingungen gehalten werden müssen, werden vor der Analyse am Durchflusszytometer mit 500 µl einer 1 %-igen Paraformaldehyd-Lösung für 60 min fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen werden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und zur Gegenfärbung toter Zellen mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt. Die Bedingungen für die Messung der Grünfluoreszenz der gefärbten Zellen und der Rotfluoreszenz des PI werden für jede Zelllinie so gewählt, dass sich die spektralen Überlappungen minimieren und bei 530 ± 30 nm (Grünfluoreszenz des FITC) und 675 nm ± 22 nm (Rotfluoreszenz des PI) liegen. Unerwünschte Überlappungen werden durch elektronische Kompensation eliminiert.

PBS/FCS-Lösung

PBS + 2 % FCS

2.2.3.8 Isolierung stabil infizierter Klone

2.2.3.8.1 Anreicherung infizierter Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

Für die Anreicherung von Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) werden zunächst tote Zellen aus den Kulturen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Lymphoprep-Trennmedium entfernt (s. 2.2.3.3). Anschließend werden je 1×10^7 Zellen mit 2 µg Anti-LNGFR-Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden anschließend zweimal mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (300xg, 10 min, RT). Das Zellsediment wird in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Danach werden 20 µl der magnetischen Ratte-Anti-Maus IgG1-Magnetkügelchen zugegeben und der Ansatz wird 20 min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Magnetkügelchen werden durch nachfolgendes Waschen mit 500 µl MACS-Puffer entfernt. Für die magnetische Separation der LNGFR-exprimierenden Zellen werden diese auf eine zuvor mit MACS-Puffer äquilibrierte MS⁺-Säule (mit einer Anreicherungskapazität von bis zu 1×10^7 Zellen) geladen. Die Säule wird dann in einen Magneten eingespannt und nicht-gebundene Zellen werden durch dreimaliges Waschen der Säule mit 500 µl MACS-Puffer entfernt. Die Elution der angereicherten Zellen erfolgt durch Zugabe von 1 ml MACS-Puffer. Die Zellen werden anschließend zweimal mit Medium gewaschen und dann in 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.3.8.2 Zellklonierung mittels Einzelzellablage (FACS-Sortierung)

Für die Einzelzellablage werden die Zellen wie für die FACS-Analyse (s. 2.2.3.7) beschrieben gefärbt und dann am Durchflusszytometer (FACSSort) bei geeigneter Geräteeinstellung mit einer gekoppelten Sortierapparatur in 96-Loch-Mikrotiterplatten abgelegt. Nach der Ablage werden die Zellen mit 100 µl Kulturmedium versorgt und in Kultur gehalten. Das Wachstum der Klone wird

nach ca. 1-2 Wochen unter dem Mikroskop verfolgt. Heranwachsende Klone werden weiter expandiert.

2.2.3.9 Markierung von Zellen mittels PKH-26 (nach Horan und Slezak, 1989)

PKH-26 ist ein aliphatischer Fluoreszenz-konjugierter Farbstoff, der in die Lipidmembran von Zellen inkorporiert wird. Die Markierungsintensität und -verteilung sind Zelltyp-abhängig. Pro Markierungsansatz werden 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellen werden zunächst zweimal mit Serum-freiem Kulturmedium gewaschen und abzentrifugiert (200xg, 5-10 min, RT). Anschließend wird das Zellsediment in 1 ml Serum-freiem Kulturmedium resuspendiert.

Danach wird eine 4×10^{-6} molare Lösung des Farbstoffs PKH-26 in ‚Verdünnungsflüssigkeit C‘ des ‚Kits‘ in 50-ml-Polypropylen-Reaktionsgefäßen hergestellt. Nach Zugabe der Zellsuspension zur Farbstofflösung wird das Gemisch 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 2 ml FKS durch einminütige Inkubation bei RT abgestoppt. Danach werden die gefärbten Zellen mit 4 ml Vollmedium gewaschen und abzentrifugiert (200xg, 10 min, RT). Das Zellsediment wird in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein neues Polypropylen-Reaktionsgefäß überführt. Es folgen vier weitere Waschschrte mit jeweils 10 ml Kulturmedium.

2.2.3.10 Kokultivierungen

Die Kokultivierung der humanen Kolonkarzinomzelllinien mit den T-Leukämie-Zelllinien erfolgt in 6-Loch-Zellkulturplatten. Hierzu werden die fluoreszenzmarkierten Kolonkarzinomzellen sowie die T-Zelllinien zunächst einer Dichtegradienten-Zentrifugation in Lymphoprep-Trennmedium unterworfen (s. 2.2.3.3), um den Anteil toter Zellen in den Kulturen zu verringern. Anschließend werden alle Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt.

Für die Kokultivierungsversuche werden 1×10^6 Kolonkarzinomzellen/Loch ausgesät und 4 h im Brutschrank inkubiert, bevor die T-Leukämiezellen hinzugefügt werden. Es werden Koinkubationsversuche mit verschiedenen Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen (0,5:1 bis 40:1) angesetzt. Hierfür bleibt die Zahl der Tumorzellen/Loch konstant, während die Menge der zugeetzten T-Zelllinien entsprechend variiert. Die Zellkulturplatten werden dann kurz zentrifugiert (100xg, 5 min, RT), um einen effizienten Kontakt zwischen den beiden Zelllinien herzustellen und dann für 36 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die T-Zellen (Suspensionszellen) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von den Zellkulturplatten geerntet und hinsichtlich der Apoptoseinduktion analysiert (s. 2.2.4.2). Bei Kinetikbestimmungen der Apoptoseinduktion werden die Zellen in Zeitintervallen von 8 h bis 56 h geerntet und mittels Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Annexin-V untersucht (s. 2.2.4.2.1). Um die Apoptose in den T-Leukämie-Zelllinien zu blockieren, werden die Zelllinien nach der Dichtegradienten-Zentrifugation zunächst 2 h mit einem antagonistischen Antikörper (s. 2.1.10) vorinkubiert, bevor sie in die Kokultivierung mit den Kolonkarzinomzelllinien eingesetzt werden.

2.2.4 Apoptosetechniken

2.2.4.1 Methoden für die Induktion der Apoptose

2.2.4.1.1 Apoptoseinduktion mittels agonistischer Anti-CD95-Antikörper

Agonistische Anti-Fas (CD95)-Antikörper werden verwendet, um experimentell ein apoptotisches Signal in Zellen zu induzieren. Um die Apoptose-auslösende Wirkung der monoklonalen Antikörper zu verstärken, werden diese durch Zugabe von 1 µg Protein-G (für Anti-CD95-Antikörper der Immunglobulinklasse IgG3) bzw. 1 µg Protein-A (für Anti-CD95-Antikörper der Immunglobulinklasse IgM) pro 1 µg Antikörperlösung durch zweistündige Rotation bei 4°C kreuzvernetzt. Für die Apoptoseinduktion wird je 1 µg/ml kreuzvernetzter Anti-CD95-Antikörper pro 1×10^6 Zielzellen eingesetzt und für 1 h-36 h auf den Zielzellen belassen. Nach der Inkubation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Apoptose wird mit den unter 2.2.4.2 beschriebenen Methoden bestimmt.

2.2.4.1.2 Apoptoseinduktion mittels rekombinatem CD95-Ligand

Für die Auslösung der Apoptose kann auch rekombinantes, lösliches CD95L-Peptid (Alexis Corporation) eingesetzt werden. Bei dem verwendeten CD95L-Peptid wurde die extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 103-281) des CD95L-Proteins im Leserahmen mit einer Peptidsequenz (FLAG) fusioniert (Schneider *et al.*, 1998). Dadurch kann eine effiziente Multimerisierung des rekombinanten CD95L-Peptids durch Zusatz von 1 µg/ml Anti-FLAG Antikörper („Enhancer Protein“) erzielt werden. Für die Apoptoseinduktion werden je 5 ng/ml-100 ng/ml rekombinantes CD95L-Peptid pro 1×10^6 Zielzellen eingesetzt und für 2 h-36 h auf den Zielzellen belassen. Nach der Inkubation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Apoptose wird mit den unter 2.2.4.2 beschriebenen Methoden bestimmt.

2.2.4.2 Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Apoptose

2.2.4.2.1 „Annexin-V-Test“ (nach Koopman *et al.*, 1994)

In frühen Apoptosestadien findet eine Translokation von Phosphatidylserin (PS), das normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran statt. Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS (Vermes *et al.*, 1995). Daher kann Annexin-V als empfindliches Nachweismolekül für die Exposition von PS auf die Membranaußenseite apoptotischer Zellen eingesetzt werden und eignet sich deswegen zum Nachweis apoptotischer Zellen. Da es bei apoptotischen Zellen in der späten Phase des Zelltods zu einem Verlust der Membranintegrität kommt, kann durch gleich-

zeitige Anfärbung der Zellen mit FITC-markiertem Annexin-V und Propidiumiodid die Verteilung der Zellen auf frühe und späte Phasen des Zelltods bestimmt werden.

Die Färbung der Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ wird nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die simultane Messung der Grünfluoreszenz des Annexin-V und der Rotfluoreszenz des PI erfolgt bei 530 ± 30 nm (Annexin-V) und $675 \text{ nm} \pm 22$ nm (PI) und geeigneter Wellenlängenkompensation. Bei der Messung der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien, die mit Kolonkarzinomzelllinien koinkubiert wurden (s. 2.2.3.10), wird bei der Quantifizierung der Apoptose nur das Intervall („gate“) der ungefärbten Fraktion der T-Zelllinien berücksichtigt, das von der rotfluoreszierenden Fraktion der mittels PKH-26 markierten Kolonkarzinomzelllinien unterschieden werden kann. Die Messung erfolgt bei 530 ± 30 nm (Grünfluoreszenz des Annexin-V), 585 ± 42 nm (Rotfluoreszenz des Membranfarbstoffs PKH-26) und $675 \text{ nm} \pm 22$ nm (Rotfluoreszenz des PI) bei geeigneter elektronischer Kompensation.

2.2.4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Unterschiedliche Apoptosestadien können auch fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Hierzu wird die Apoptose wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben induziert. Nach 24-stündiger Inkubation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Anfärbung der Zellkerne werden die Zellen 5 min mit $4 \mu\text{g/ml}$ des Farbstoffs Hoechst 33342 gefärbt. Um tote Zellen in der späten Phase der Apoptose anzufärben, werden die Zellen für 5 min mit $2 \mu\text{g/ml}$ PI versetzt. Nach erneutem zweimaligem Waschen werden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ ‚Mounting-Medium‘ resuspendiert. Ein Aliquot von $50 \mu\text{l}$ (entspricht 5×10^5 Zellen) der Suspensionszelllinien wird auf einen Objektträger aufgetropft auf den dann ein Deckgläschen gesetzt und mit Nagellack fixiert wird. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern bei 25- bis 100-facher Vergrößerung.

2.2.4.2.3 Enzym-gekoppelter Nachweis zytoplasmatischer, fragmentierter DNS

Im Endstadium der Apoptose wird die mit Histonen zu Nukleosomen verpackte DNS in den internukleosomalen Regionen durch DNasen, die während des Zelltodprogramms aktiviert werden, geschnitten (1.1.1). Die daraus resultierenden DNS-Fragmente werden aus dem Kern in das Zytoplasma der Zelle ausgeschleust. Das Auftreten zytoplasmatischer DNS-Fragmente eignet sich daher für den Nachweis apoptotischer Zellen. Die zytoplasmatischen DNS-Fragmente werden mittels des ‚Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit‘, der auf dem Prinzip des sogenannten „Sandwich“-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) beruht, nachgewiesen. Die zu analysierenden Zielzellen werden zunächst mit dem Thymidin-Analogen Bromdesoxyuridin (BrdU), das in die DNS inkorporiert, markiert. Nach der Apoptoseinduktion werden die Zellen mit einem milden Lysepuffers lysiert, der nur die Zellmembran, nicht aber die Kernmembran zerstört. Die so gewonnenen Lysate werden dann in eine mit Anti-DNS-Antikörper beschichtete

Mikrotiterplatte pipettiert. Der Nachweis der gebundenen, zytoplasmatischen DNS-Fragmente erfolgt mittels eines POD-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers. Der durch die POD induzierte Farbumschlag des Substrats TMB wird bei einer Absorption von 405 nm im „ELISA-Reader“ gemessen. Je Versuchsansatz werden 1×10^6 Zellen über Nacht in Gegenwart einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ BrdU kultiviert. Die Zellen werden anschließend zweimal mit BrdU-freiem Kulturmedium gewaschen. Nach der Abtrennung toter Zellen (s. 2.2.3.3) werden die Zellen in eine Kokultivierung eingesetzt (s. 2.2.3.10) oder mit kreuzvernetztem, rekombinantem CD95L behandelt (s. 2.2.4.1.2). Nach den entsprechenden Inkubationszeiten werden die Zellen für den Nachweis fragmentierter DNS im Zytoplasma mit dem Lysepuffer des Herstellers lysiert. Anschließend wird der Gesamtproteingehalt der Zelllysate wie unter 2.2.2.3 beschrieben bestimmt. Von jeder Probe werden je $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein in den „ELISA“ eingesetzt und gemäß Hersteller-Protokoll prozessiert.

2.2.5 Statistische Auswertungen

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte \pm der dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Für die Bestimmung der spezifischen Apoptose in einer Probe, die mittels „Annexin-V-Test“ untersucht wurde (s. 2.2.4.2.1), werden die „FACS“-Diagramme durch eine Gitternetzlinie in vier Quadranten unterteilt, die mit „oben links (OL)“, „oben rechts (OR)“, „unten links (UL)“ und „unten rechts (UR)“ bezeichnet wurden. Nach erfolgter Apoptoseinduktion wird der Gesamtanteil apoptotischer Zellen (bezeichnet als A_E = experimentelle Apoptose) durch Addition der Anteile in den Quadranten OL, OR und UR berechnet. Der Anteil apoptotischer Zellen der Negativkontrolle wird ebenfalls über die Quadranten OL, OR und UR summiert und repräsentiert den Anteil spontan in der Probe auftretender Apoptose (bezeichnet als A_S = spontane Apoptose). Somit berechnete sich der relative Prozentanteil apoptotischer Zellen einer Probe nach folgender Formel:

$$\text{Apoptose [\%]} = [A_E (=OL+OR+UR)] - [A_S (=OL+OR+UR)]$$

Um das Ausmaß der linearen Abhängigkeit der spezifischen Apoptoserate von der Expressionsstärke des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins zu quantifizieren (s. 3.5.2.2 und 3.5.5.2), wird der Korrelationskoeffizient (R) als Grad des Zusammenhangs beider Variablen (Apoptoserate und c-FLIP_L-Expressionsstärke) nach folgender Formel bestimmt:

$$R_{X,Y} = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \text{ mit } -1 \leq R_{X,Y} \leq 1 \text{ und mit } Cov(X,Y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu_x) \cdot (y_i - \mu_y)$$

Hierbei gilt: Cov = Kovarianz
 X, Y= untersuchte Variablen
 σ = Standardabweichung
 μ = Mittelwert

Für die Auswertung der Absorptionsmessungen mit dem ‚Cellular DNA Fragmentation ELISA‘ (s. 2.2.4.2.3), wird die spezifische Apoptoserate einer Probe in Form der erhaltenen Absorptionsmesswerte ($A_{405 \text{ nm}}$) quantifiziert und nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Apoptose } [A_{405 \text{ nm}} \text{ Messwert}] = (A_{405 \text{ nm}}\text{-Messwert } A_E) - (A_{405 \text{ nm}}\text{-Messwert } A_S)$$

Hierbei gilt: experimentelle Apoptose (A_E): gemessene Apoptose der T-Zellen in den Kokultivierungsansätzen
 spontane Apoptose (A_S): gemessene Apoptose der T-Zellen ohne Zusatz der Kolonkarzinomzelllinien

Für die Berechnung der Hemmung der Apoptose nach Inkubation mit neutralisierendem Anti-CD95-Antikörper wird folgende Formel angewandt:

$$\text{Hemmung } [\%] = 100 \% - \frac{[100 \% \times (A_E\text{-Wert mit neutralisierendem Antikörper} - A_S)]}{(A_E\text{-Wert mit Isotyp-Kontrollantikörper} - A_S)}$$

Die Auswertung der Versuche erfolgt mittels ‚Annexin-V-Test‘ (s. 2.2.4.2.1). Hierbei wird wie oben erläutert der Anteil apoptotischer Zellen über die Quadranten OL, OR und UR addiert;
 A_E = experimentelle Apoptose; A_S = spontane Apoptose in der Probe.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Sequenzierung der c-FLIP_L-cDNS

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer rekombinanten Überexpression des Proteins c-FLIP_L auf die Apoptosesensitivität von Zellen, die den CD95-Rezeptor tragen, untersucht werden. Dazu sollte nach Klonierung der c-FLIP_L-cDNS in einen eukaryontischen Expressionsvektor die biologische Funktionalität der cDNS verifiziert werden, um diese anschließend für die Herstellung verschiedener retroviraler Expressionsvektoren für die Infektion humaner T-Zelllinien zu nutzen.

3.1.1 Klonierung der c-FLIP_L-cDNS in den Expressionsvektor pWW15

Da zu Beginn der Arbeiten noch kein Antikörper für den direkten Nachweis des c-FLIP_L-Proteins zur Verfügung stand, wurde eine c-FLIP_L-cDNS konstruiert, der am 3' Ende des offenen Leserahmens die kodierenden Basen für eine 11 Aminosäuren lange Peptidsequenz des *c-myc*-Gens angefügt wurden (*Epitop-Tagging*). Dazu wurde die aus dem Labor von Prof. Krammer (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) erhaltene c-FLIP_L-cDNS (EST-Klon # 115792) mit dem 3' Oligonukleotid FLIP r amplifiziert, das die kodierenden Nukleotide für den 3' angefügten „myc-tag“ gefolgt von einem Stop-Kodon, sowie eine Restriktionsenzymkennungssequenz für *Bgl* II enthält. Als 5' Primer diente FLIP f, der zusätzlich die Basen für die Konsensussequenz der Kozak-Translationsinitiationsstelle (Kozak, 1987) und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Sal* I besitzt. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 94°C (1 min), einer Anlagerungsphase bei 50°C (1 min) und einer Elongationsphase bei 72°C (1 min). Die Abschluss-Extension erfolgte bei 72°C (7 min). Das PCR-Produkt enthält somit die gesamte kodierende Sequenz der c-FLIP_L-cDNS und weist mit dem eingeführten „myc-tag“ und den Restriktionsenzymkennungsstellen eine Größe von 1494 bp auf. Die amplifizierte c-FLIP_L-cDNS wurde anschließend in den Expressionsvektor pWW15 mittels *Sal* I/*Bgl* II -Restriktion subkloniert. Das erhaltene Konstrukt wurde mit pWW15xc-FLIP_L bezeichnet (Abbildung 8).

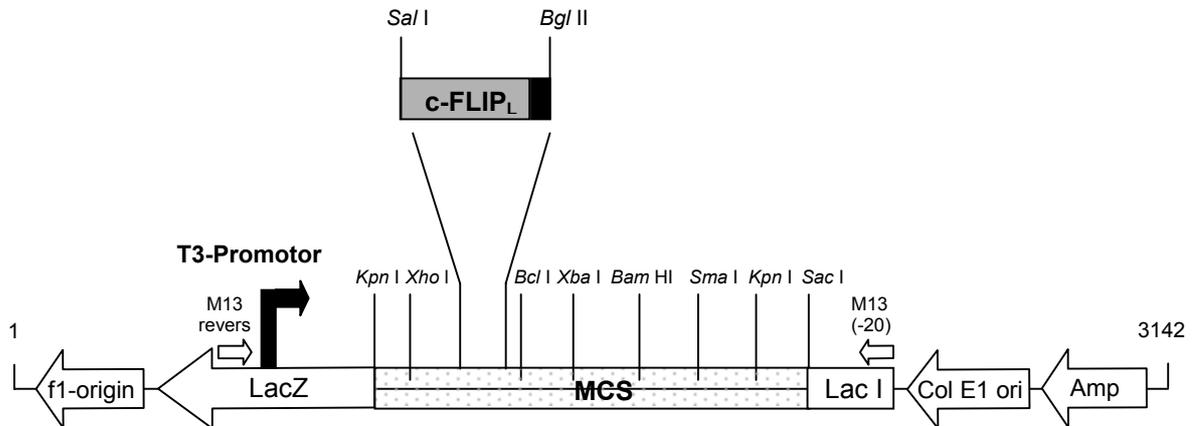


Abbildung 8: Plasmidkarte des Expressionsvektors pWW15 mit einklonierter c-FLIP_L-cDNS-Sequenz

Die c-FLIP_L-cDNS-Sequenz wurde mit den Primern FLIP f und FLIP r amplifiziert. Dadurch wurde am 5' Ende der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz eine Erkennungssequenz für *Sal* I und die Kozak-Translationsinitiationsstelle eingefügt. Am 3' Ende wurde die kodierende Sequenz für eine 11 Aminosäuren umfassende Peptidsequenz aus dem *c-myc*-Gen (dargestellt als schwarzes Rechteck) und die Erkennungssequenz für *Bgl* II angefügt. Die erhaltene cDNS wurde mit *Sal* I und *Bgl* II geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pWW15 einligiert. Es resultierte das Konstrukt pWW15xc-FLIP_L.

LacZ: Gen für β-Galaktosidase; **Amp**: Ampicillin-Resistenz-Gen; **MCS**: multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*); **ori**: Replikationsursprung (*origin*)

3.1.2 Sequenzierung der c-FLIP_L-cDNS

Um sicherzustellen, dass der „myc-tag“ und die eingeführten Restriktionsenzymststellen korrekt an den 5' und 3' untranslatierten Bereich der c-FLIP_L-cDNS angefügt wurden, erfolgte eine vollständige Sequenzierung der klonierten c-FLIP_L-cDNS sowie des 5' und 3' untranslatierten Bereichs des Expressionsvektors pWW15xc-FLIP_L. Dazu wurden die unter 2.1.7 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Um Sequenzfehler sicher ausschließen zu können, wurden beide DNS-Stränge der c-FLIP_L-cDNS sequenziert. Die amplifizierte 1494-bp-cDNS-Sequenz und die 491 Aminosäuren umfassende Protein-Sequenz von c-FLIP_L sind im Anhang 8.3 dargestellt. Der für die weiteren Arbeiten ausgewählte Klon wies keinerlei Abweichungen von der Nukleotidsequenz des EST-Klons # 115792 auf und enthält am 3' Ende der c-FLIP_L-cDNS einen im korrekten Leseraster angefügten „myc-tag“.

3.2 Nachweis der Funktionalität der klonierten c-FLIP_L-cDNS durch gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation

Zunächst wurde mittels gekoppelter *in vitro*-Transkription/Translation in Retikulozyten-Lysaten überprüft, ob die amplifizierte und in den Expressionsvektor pWW15 subklonierte c-FLIP_L-cDNS mit angehängtem „myc-tag“ translatierbar ist. Da in dem Expressionsvektor pWW15 in der 5' Region vor der einklonierten c-FLIP_L-cDNS-Sequenz der Bakteriophagenpromotor T3 lokalisiert ist (s. Abbildung 8), wurde T3-RNS-Polymerase für die Transkription verwendet. In die Translationsansätze wurden verschiedene Ausgangsmengen (0,3 µg; 0,5 µg; 0,8 µg; 1 µg) des Plasmids pWW15xc-FLIP_L eingesetzt. Für die Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit einem Plasmid mit Luciferase-cDNS (0,1 µg und 1 µg) mitgeführt, als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zusatz von Plasmid-DNS. Die Translationsansätze wurden anschließend auf 10 % NuPAGE-Bis-Tris-Gelen gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiografie nachgewiesen. Die in Abbildung 9 dargestellte Autoradiografie zeigt, dass die c-FLIP_L-cDNS-Sequenz translatierbar ist und ein Protein mit der erwarteten Größe von 55 kD ergibt.

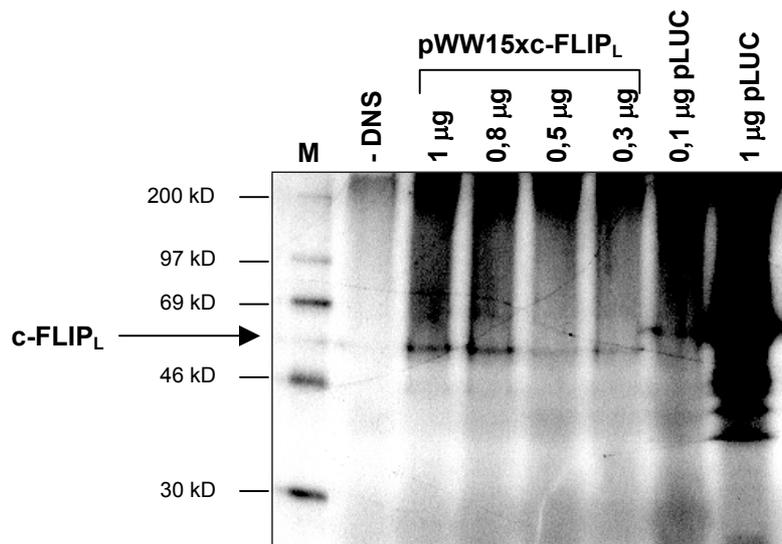


Abbildung 9: **Autoradiografie der Protein-Gelelektrophorese zum Nachweis des c-FLIP_L-Proteins nach gekoppelter *in vitro*-Transkription/Translation**

Für die *in vitro*-Transkription/Translation wurden unterschiedliche Mengen (0,3-1 µg) des Plasmids pWW15xc-FLIP_L mit carboxyterminalem „myc-tag“ eingesetzt. Die Plasmide wurden 2 h bei 30°C in Gegenwart von ³⁵S-Methionin inkubiert. 10 µl des Ansatzes wurden mit NuPAGE-Probenauftragspuffer auf ein 10 % NuPAGE-Bis-Tris-Gel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiografie nachgewiesen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 5 µl des ¹⁴C-Molekulargewichtsstandards aufgetragen.

M: ¹⁴C-Molekulargewichtsstandard; **pWW15xc-FLIP_L:** Unterschiedliche Mengen (0,3 µg, 0,5 µg, 0,8 µg, 1 µg) des Vektors pWW15 mit einklonierter c-FLIP_L-cDNS-Sequenz mit 3' angefügtem „myc-tag“ dienten als Matrize für die gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation; **pLUC:** Translation des Kontroll-Plasmids mit Luciferase-cDNS (Positivkontrolle) erzeugte eine Proteinbande mit einer Größe von 61 kD. Die zusätzlich zu erkennenden Proteinbanden stellen „Abbruch-Translationsprodukte“ dar; **- DNS:** Transkriptions/Translationsansatz ohne Plasmid-DNS-Zusatz (Negativkontrolle).

3.3 Herstellung verschiedener retroviraler Expressionsvektoren für c-FLIP_L

Nachdem die Sequenz der klonierten c-FLIP_L-cDNS überprüft und die Translatierbarkeit des Proteins sichergestellt werden konnte, wurden zwei verschiedene retrovirale Expressionsvektoren hergestellt. Diese enthalten neben dem Promotor in der 5' LTR (*long terminal repeat*)-Region des retroviralen Vektors zusätzlich einen internen Promotor, den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor. Als Ausgangsvektor für die nachfolgenden Klonierungen wurde das Plasmid pLNCX, das auf dem Moloney Maus Leukämievirus (MoMLV) basiert, eingesetzt. Neben der klonierten c-FLIP_L-cDNS sollte die cDNS-Sequenz des als Reportergen zu verwendenden niedrig-affinen Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptors (*low affinity nerve growth factor receptor*, LNGFR) einkloniert werden. Dieses Gen kodiert für eine verkürzte Form des LNGF-Rezeptors, dessen zytoplasmatische Domäne deletiert wurde (Machl *et al.*, 1997). Das Transmembranprotein ist daher nicht in der Lage, Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten und eignet sich aufgrund seiner geringen Immunogenität als Zelloberflächen-Reporterprotein für *in vitro*- und *in vivo*-Studien.

Um zu ermitteln, welcher Promotor für die Expression der c-FLIP_L-cDNS am geeignetsten ist, wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Die Namensgebung der Konstrukte erfolgte unter Berücksichtigung der 5'→3'-Abfolge der einklonierten Gene.

3.3.1 Konstruktion des retroviralen Vektors pLMCF

Der gesamte Klonierungsablauf für die Konstruktion von pLMCF und pLMC (Mock-Kontrollvektor) ist in Abbildung 10 dargestellt. Zunächst wurde der retrovirale Expressionsvektor pLNCX, der auf der 5' Seite des CMV-Promotors das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase (Neomycin-Resistenzgen, Neo^R) trägt, mit *Bcl* I und *Cla* I verdaut. Durch diese Restriktion werden der CMV-Promotor und das Neo^R-Gen aus dem Vektor herausgeschnitten. Anschließend wurde für weitere Klonierungsschritte eine multiple Klonierungsstelle (MCS) eingefügt. Dazu wurden je 200 pmol der Oligonukleotide MCS f und MCS r mit 3 µl 10xExpand HF-Puffer des 'Expand High Fidelity PCR System' und 30 µl bidestilliertem H₂O für 5 min bei 95°C inkubiert. Für eine Aneinanderlagerung der komplementären Oligonukleotide wurde die Reaktion langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, wodurch eine doppelsträngige DNS-Sequenz entsteht, die am 5' Ende das kohäsive Ende einer *Bcl* I-Schnittstelle trägt. Es folgen in 5'→3' Orientierung Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xho* I, *Bam* HI, *Hpa* I, *Sal* I und *Bgl* II, gefolgt von dem kohäsiven Ende einer *Cla* I-Schnittstelle. Von dieser Reaktion wurden 10 µl in eine Ligation mit dem dephosphorylierten, *Bcl* I/*Cla* I-geschnittenen Vektor pLNCX eingesetzt. Das erhaltene Konstrukt wurde mit pL(MCS) bezeichnet. Die Insertion der multiplen Klonierungsstelle wurde mittels *Bcl* I/*Cla* I-Restriktion überprüft. Danach wurde die CMV-Promotorsequenz aus dem pLNCX-Plasmid mittels *Bam* HI/*Hpa* I-Doppelverdau isoliert. Für die Einklonierung des CMV-Promotors in die erzeugte multiple Klonierungsstelle folgte eine Restriktion des Konstrukts pL(MCS) mit *Bam* HI und *Hpa* I, in das dann das Restriktionsfragment des CMV-Promotors

einligiert wurde. Das resultierende Konstrukt wurde als pLC bezeichnet. Die Ermittlung korrekter pLC-Bakterienklone erfolgte mittels *Bam* HI/*Hpa* I-Verdau.

Um nun die cDNS-Sequenz des LNGFR-Reportergens einzufügen, wurde das Plasmid pLDNS-TK-*opa*, in das die komplette LNGFR-cDNS-Sequenz inkloniert worden war (s. 8.4), mit den Oligonukleotiden LNGFR f und LNGFR r amplifiziert. Der 5' Primer LNGFR f enthält zusätzlich die Basen für die Kozak-Translationsinitiationssequenz und die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Sal* I. Das 3' Oligonukleotid enthält die kodierenden Nukleotide für die *Bgl* II-Restriktionsenzymkennungssequenz. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 94°C (1 min), einer Anlagerungsphase bei 50°C (1 min) und einer Elongationsphase bei 72°C (1 min). Die Abschluss-Extension erfolgte bei 72°C (7 min). Das resultierende PCR-Produkt, das mit den eingeführten Restriktionsenzymstellen eine Größe von 837 bp aufweist, wurde anschließend mit *Sal* I und *Bgl* II nachverdaut. Da die Restriktionsenzymstellen für *Sal* I mit der des Enzyms *Xho* I und die Erkennungssequenz von *Bgl* II mit der des Enzyms *Bam* HI kompatibel ist (s. Abbildung 10) konnte die LNGFR-cDNS durch Verdau des pLC-Konstrukts mit *Xho* I und *Bam* HI nachfolgend einligiert werden. Mit erfolgter Ligation besitzen die hybriden Restriktionsenzymstellen *Xho* I/*Sal* I und *Bam* HI/*Bgl* II nicht mehr die korrekte Sequenz für eines der beiden Restriktionsenzyme. Somit wurde die Insertion der LNGFR-cDNS durch Restriktion mit *Bam* HI (schneidet nur in der LNGFR-cDNS) und *Hind* III (schneidet nur in der CMV-Promotorsequenz) überprüft. Das erhaltene Konstrukt wurde als pLMC bezeichnet und in weiteren Versuchen als Mock-Kontrollvektor benutzt.

Für die Einführung der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz wurde die in den Expressionsvektor pWW15 mittels *Sal* I/*Bgl* II-Restriktion subklonierte c-FLIP_L-cDNS-Sequenz (s. 3.1.1) durch Verdau mit *Sal* I und *Bgl* II isoliert und in das mit den gleichen Enzymen linearisierte, dephosphorylierte Konstrukt pLMC ligiert. Die Insertion der c-FLIP_L-cDNS in dem so entstandenen pLMCF-Konstrukt wurde durch Doppelverdau mit *Sal* I und *Bgl* II kontrolliert. Im pLMCF-Konstrukt steht die Expression der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz mit angehängtem „myc-tag“ unter der Kontrolle des internen CMV-Promotors, während das Reportergen LNGFR unter der Kontrolle des retroviralen MoMLV-LTR-Promotors exprimiert wird.

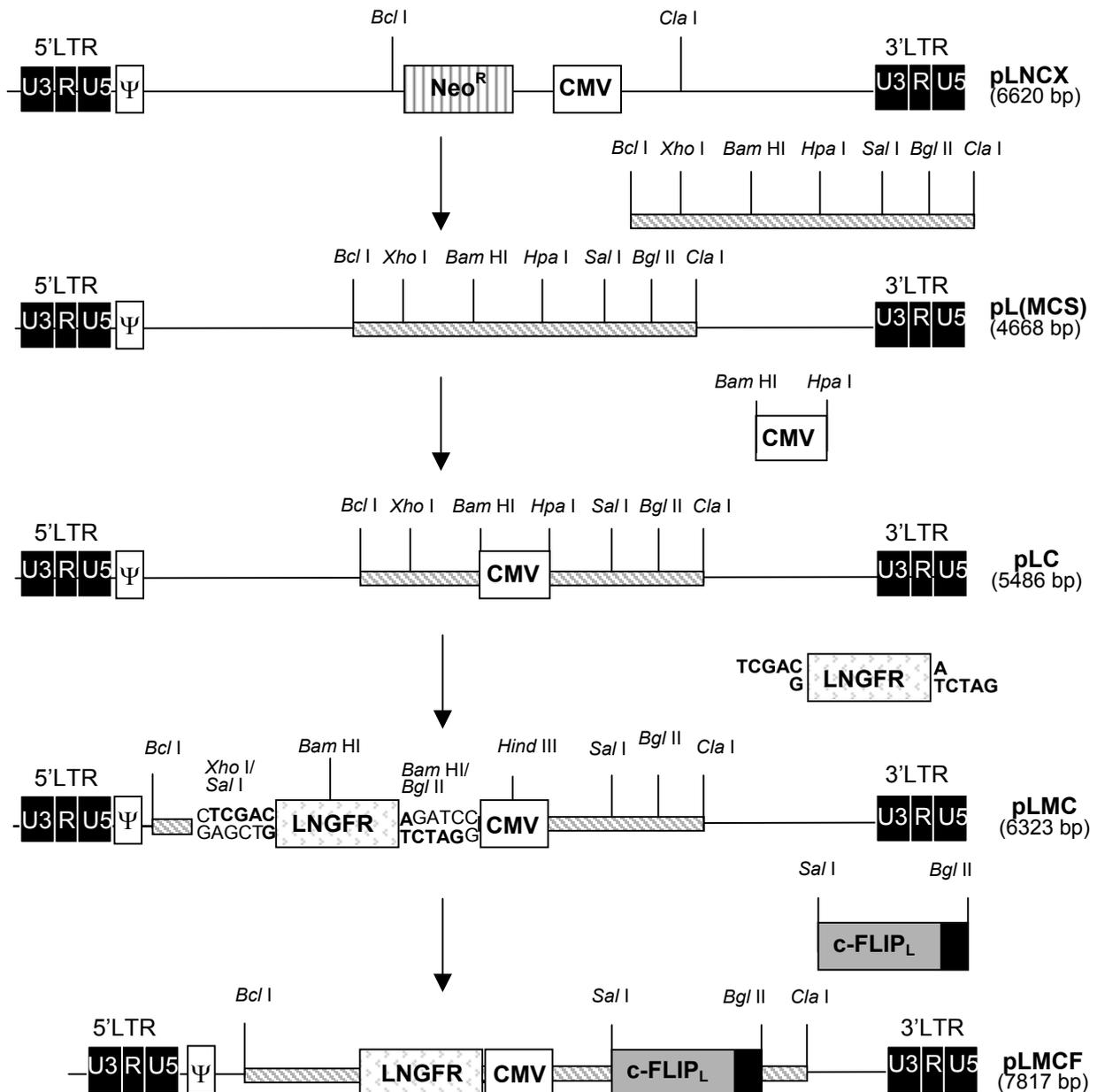


Abbildung 10: Konstruktion des retroviralen Expressionsvektors pLMCF

Die Sequenzen für den CMV-Promotor und das Neomycin-Resistenzgen (Neo^R) wurden mittels *Bcl* I/*Cla* I-Verdau aus dem retroviralen Vektor pLNCX ausgeschnitten. Eine multiple Klonierungsstelle (MCS) wurde durch Oligonukleotid-Anlagerung von Primern mit kohäsiver 5' *Bcl* I- und 3' *Cla* I-Schnittstelle einligiert. Durch *Bam* HI/*Hpa* I-Restriktion von pLNCX und pL(MCS) wurde die CMV-Promotorsequenz isoliert und in den Vektor pL(MCS) kloniert. Das so entstandene Konstrukt wurde als pLC bezeichnet. Die LNGFR-cDNS-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden LNGFR f und LNGFR r aus dem Plasmid pLDNS-TK-*opa* amplifiziert und enthält somit am 5' Ende eine Erkennungssequenz für *Sal* I und die Kozak-Translationsinitiationsstelle. Am 3' Ende wurde die Erkennungssequenz für *Bgl* II angefügt. Die resultierende cDNS wurde mit *Sal* I und *Bgl* II geschnitten und in den mit den Enzymen *Xho* I und *Bam* HI linearisierten Vektor pLC aufgrund der Kompatibilität der Restriktionsenzym-schnittstellen *Xho* I/*Sal* I und *Bgl* II/*Bam* HI einligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als Mock-Kontrollvektor benutzt und mit pLMC bezeichnet. Die Insertion der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz erfolgte durch Restriktion des pLMC-Vektors und des pWW15-Vektors, in den die c-FLIP_L-cDNS mit 3' angehängtem „myc-tag“ subkloniert wurde (s. 3.1.1) mit *Sal* I und *Bgl* II und anschließender Ligation. Das resultierende Konstrukt wurde mit pLMCF benannt.

LTR: long terminal repeat; **U:** untranslatierte Region; **Ψ:** Verpackungssignal; **Neo^R:** Neomycin-Resistenzgen (Neomycin-Phosphotransferase); **LNGFR:** low affinity nerve growth factor receptor; **c-FLIP_L:** lange Variante des c-FLIP-Gens; **p:** Plasmid; **MCS:** multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site); **L:** retroviraler LTR-Promotor; **M:** cDNS-Sequenz des LNGFR-Gens (marker gene); **F:** cDNS-Sequenz des c-FLIP_L-Gens mit 3' „myc-tag“ (dargestellt als schwarzes Rechteck).

3.3.2 Konstruktion des retroviralen Vektors pLFCM

Der Klonierungsablauf für die Konstruktion von pLFCM und pLCM (Mock-Kontrollvektor) ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Klonierung bis zum Erhalt des Vektors pLC wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

Für die Herstellung des Mock-Kontrollvektors pLCM wurde die cDNS-Sequenz des LNGFR-Reportergens wie unter 3.3.1 beschrieben mit den Oligonukleotiden LNGFR f und LNGFR r aus dem Plasmid pLDNS-TK-opa amplifiziert (s. 8.4). Das resultierende 837-bp-PCR-Produkt wurde mit *Sal* I und *Bgl* II nachverdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen dephosphorylierten pLC-Vektor ligiert. Die Einklonierung der LNGFR-cDNS wurde durch Restriktion mit *Sal* I und *Bgl* II überprüft.

Für die Herstellung des pLFCM-Konstrukts wurde zunächst die in den Expressionsvektor pWW15 subklonierte c-FLIP_L-cDNS-Sequenz durch Verdau mit *Sal* I und *Bgl* II isoliert und anschließend in das pLC-Konstrukt, das durch Verdau mit *Xho* I und *Bam* HI linearisiert wurde, eingebracht. Dies war wie unter 3.3.1 erläutert durch die Kompatibilität der Restriktionsenzymchnittstellen *Xho* I/*Sal* I und *Bgl* II/*Bam* HI möglich. Die Insertion der c-FLIP_L-cDNS in das so entstandene pLFC-Konstrukt wurde durch Doppelverdau mit *Bam* HI (schneidet nur in der c-FLIP_L-cDNS) und *Sna* BI (schneidet nur in der CMV-Promotorsequenz) kontrolliert.

Danach wurde die amplifizierte LNGFR-cDNS (s. 3.3.1) in den mit *Sal* I und *Bgl* II geschnittenen pLFC-Vektor eingefügt. Die Einklonierung der LNGFR-cDNS wurde durch Restriktion mit *Sal* I und *Bgl* II überprüft. Das so erhaltene Konstrukt wurde im Folgenden mit pLFCM bezeichnet.

In diesem Konstrukt wird die cDNS-Sequenz des c-FLIP_L-Gens mit angehängtem „myc-tag“ unter der Kontrolle des retroviralen LTR-Promotors transkribiert. Das LNGFR-Gen wird unter der Kontrolle des internen CMV-Promotors exprimiert.

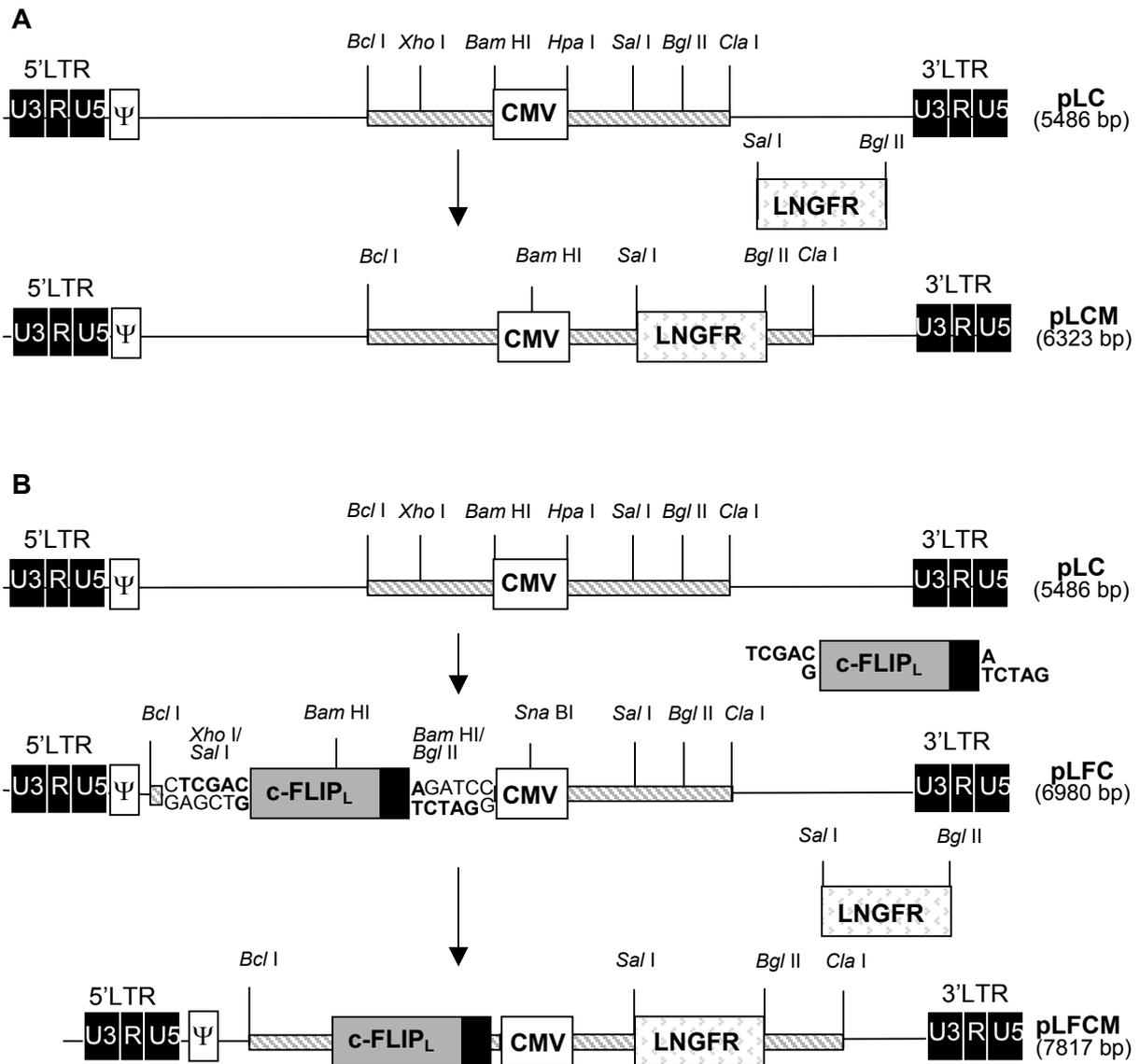


Abbildung 11: **Konstruktion des retroviralen Expressionsvektors pLFCM**

Die Entfernung der CMV-Promotor-Sequenz und des Neomycin-Resistenzgens (Neo^R) aus dem retroviralen Vektor pLNCX und die Einfügung einer multiplen Klonierungsstelle (MCS), sowie die anschließende Reinsertion des CMV-Promotors ist in Abbildung 10 dargestellt.

A: Die LNGFR-cDNS-Sequenz wurde mit den Primern LNGFR f und LNGFR r aus dem Plasmid pLDNS-TK-*opa* amplifiziert und enthält somit am 5' Ende eine Erkennungssequenz für *Sal* I und die Kozak-Translationsinitiationsstelle. Am 3' Ende wurde die Erkennungssequenz für *Bgl* II angefügt. Die resultierende cDNS wurde mit *Sal* I und *Bgl* II geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pLC einligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als Mock-Kontrollvektor benutzt und mit pLCM bezeichnet.

B: Die Insertion der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz in das pLC-Plasmid erfolgte durch Restriktion des pWW15-Vektors, in den die c-FLIP_L-cDNS mit 3' angehängtem „myc-tag“ subkloniert wurde (s. 3.1.1), mit *Sal* I und *Bgl* II. Anschließend wurde die cDNS in den mit *Xho* I und *Bam* HI linearisierten Vektor pLC aufgrund der Kompatibilität der Restriktionsenzymstellen *Xho* I/*Sal* I und *Bgl* II/*Bam* HI eingeführt. Aus diesem Klonierungsschritt resultierte das Konstrukt pLFC. Die LNGFR-cDNS-Sequenz wurde mit den Oligonukleotidprimern LNGFR f und LNGFR r aus dem Plasmid pLDNS-TK-*opa* amplifiziert und enthält am 5' Ende eine Erkennungssequenz für *Sal* I und am 3' Ende die Erkennungssequenz für *Bgl* II. Die cDNS wurde mit *Sal* I und *Bgl* II nachverdaut und in den durch Verdau mit *Sal* I und *Bgl* II linearisierten Vektor pLFC ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde mit pLFCM bezeichnet.

LTR: long terminal repeat; **U:** untranslatierte Region; **Ψ:** Verpackungssignal; **LNGFR:** low affinity nerve growth factor receptor; **c-FLIP_L:** lange Variante des cFLIP-Gens; **p:** Plasmid; **MCS:** multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site); **L:** retroviraler LTR-Promotor; **M:** cDNS-Sequenz des LNGFR-Gens (marker gene); **F:** cDNS-Sequenz des c-FLIP_L-Gens mit 3' „myc-tag“ (dargestellt als schwarzes Rechteck).

3.4 Etablierung und Klonierung stabiler c-FLIP_L-Protein-exprimierender Zellen

3.4.1 Transiente Transfektion der ekotropen Verpackungszelllinie E86

In den hergestellten retroviralen Expressionsvektoren wurden die für die Replikation und Verpackung des Virus notwendigen viralen Gene durch die einklonierten cDNS-Sequenzen ersetzt, die Signalsequenz für die Initiation der Viruspartikelverpackung Ψ blieb jedoch erhalten (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Somit müssen derartig modifizierte retrovirale Vektoren zunächst in eine Verpackungszelllinie eingeschleust werden, welche die zur Replikation und Verpackung der Viruspartikel notwendigen Proteine bereitstellt. Hierbei unterscheidet man ekotrope Verpackungszelllinien, die das ekotrope Virus-Hüllprotein *env* (*envelope*) exprimieren und somit nur in der Lage sind, Maus- und Rattenzellen zu infizieren, die den Rezeptor für das entsprechende ekotrope *env*-Genprodukt exprimieren. Amphotrope Verpackungszelllinien exprimieren ein *env*-Hüllprotein das ihnen ein breiteres Wirtsspektrum verleiht. Somit können mit amphotropen Verpackungszelllinien auch humane Zellen infiziert werden. Das Ziel der Arbeit war die Herstellung amphotroper Verpackungszelllinien, die für die Infektion menschlicher als auch (für eventuelle spätere *in vivo*-Versuche) Maus-Zellen genutzt werden können. Um die hergestellten Vektoren effizient in die amphotrope Verpackungszelllinie HSRBM01 einzuschleusen, wurde zunächst die Helfer-Virus (Wildtyp-Virus)-freie ekotrope Verpackungszelllinie E86 mittels Lipofektion mit ‚Lipofectamin PLUS‘ mit je 2 μg der hergestellten retroviralen Expressionsvektoren pLMCF und pLFCM und der Mock-Kontrollvektoren pLMC und pLCM transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand der E86-Zellen, der die freigesetzten Viren enthält, gewonnen und durch einen 0,45- μm -Sterilfilter filtriert, der für die viralen Partikel, nicht aber für Zellen durchlässig ist.

3.4.2 Infektion der amphotropen Verpackungszelllinie HSRBM01

HSRBM01-Zellen wurden mit 1,5 ml des gewonnenen Zellkulturüberstands von E86-Zellen (s. 3.4.1) in Gegenwart von Polybren infiziert. Das Polykation Polybren neutralisiert negative Ladungen auf der Membranaußenseite von Zellen und retroviralen Partikeln und fördert so den Kontakt zwischen den Zellen. Nach der Infektion wurden die Zellen für drei weitere Tage kultiviert, bis die Expression der stabil in das Genom der amphotropen Verpackungszelllinie integrierten cDNS-Sequenzen untersucht werden konnte. Um die Effektivität der Infektion der HSRBM01-Zellen mit den retroviralen Expressionsvektoren pLMCF, pLFCM und den entsprechenden Kontroll-Vektoren zu ermitteln, wurde die Expression des LNGFR-Zelloberflächenproteins in den infizierten Zellen im Durchflusszytometer untersucht (s. 2.2.3.7). Die Zellfärbung erfolgte nach der indirekten Methode für 30 min mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des primären Anti-LNGFR-Antikörpers und anschließender 30-minütiger Inkubation mit dem FITC-markierten Detektionsantikörper (Anti-Maus Ig-FITC). Nach Ausgrenzung toter Zellen durch Gegenfärbung mit PI wurde der Anteil LNGFR-positiver Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Kontrollfärbungen wurden

mit einem monoklonalen Antikörper gleichen Isotyps, jedoch irrelevanter Spezifität (Anti-Neurofilament-Antikörper) durchgeführt. Der durchschnittliche Anteil LNGFR-positiver Zellen lag in den infizierten HSRBM01-Zellen bei 1-4 % (Daten nicht gezeigt).

3.4.2.1 Klonierung infizierter HSRBM01-Zellen

Für die Anreicherung von Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, s. 2.2.3.8.1) wurden je 1×10^7 infizierte HSRBM01-Zellen mit Anti-LNGFR-Antikörper markiert und anschließend mit Ratte-Anti-Maus IgG1-Magnetkügelchen inkubiert. Die magnetische Separation der LNGFR-exprimierenden Zellen wurde je drei- bis viermal durchgeführt, um die Anreicherungs-effizienz zu verbessern. Die so abgetrennten, LNGFR-positiven Zellen wurden dann in DMEM-Kulturmedium zum weiteren Wachstum ausgesät und anschließend mittels FACS-Sortierung (s. 2.2.3.8.2) kloniert.

Für die Zellklonierung mittels Einzelzellablage wurden die Zellen wie für die FACS-Analyse beschrieben gefärbt (s. 2.2.3.7) und dann am Durchflusszytometer (FACSsort) mittels einer gekoppelten Sortierapparatur in 96-Loch-Mikrotiterplatten abgelegt. Von den HSRBM01-Zellen, die mit den retroviralen Expressionskonstrukten pLMCF und pLFCM infiziert wurden, sind je fünf, von den Mock-Kontrollen jeweils zwei 96-Loch-Zellkulturplatten abgelegt worden. Das Wachstum der Klone wurde unter dem Mikroskop verfolgt und heranwachsende Klone nach ca. 1-2 Wochen expandiert.

3.4.2.2 Nachweis der Expression des Reporterproteins LNGFR in klonierten HSRBM01-Zellen

Die resultierenden Klone wurden mit HSRBM01xpLMCF bzw. HSRBM01xpLFCM und der entsprechenden Koordinate in der Mikrotiterplatte bezeichnet. Die mocktransduzierten Klone wurden demgemäß mit HSRBM01xpLMC bzw. HSRBM01xpLCM benannt.

Die Klonierungseffektivität sowie die Stabilität der Expression des LNGFR-Zelloberflächenproteins wurden im Durchflusszytometer analysiert (s. 2.2.3.7). Nach indirekter Anfärbung der verschiedenen Klone mit Anti-LNGFR-Antikörper erfolgte die Ausgrenzung toter Zellen durch Gegenfärbung mit PI. Als Kontrolle dienten HSRBM01-Klone, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper (Anti-Neurofilament-Antikörper) angefärbt wurden. Mehr als 90 % aller untersuchten HSRBM01-Klone zeigten eine hohe Expression des LNGFR-Proteins. Die LNGFR-Expression (bezeichnet mit FL1-H) der für weitere Arbeiten ausgewählten Klone HSRBM01xpLMCF H4 und HSRBM01xpLMCF 2A7 sowie der Mock-Kontrollen HSRBM01xpLMC 2B12 und HSRBM01xpLCM 1G12 ist in Abbildung 12 dargestellt.

Im Vergleich zu HSRBM01-Klonen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper angefärbt wurden, zeigt der Logarithmus der LNGFR-Signalintensität (bezeichnet als FL1-H) der HSRBM01xpLMCF-Klone als auch der HSRBM01xpLFCM-Klone im Vergleich zu der Anfärbung der Isotyp-Kontrolle eine 10- bis 20-fach stärkere Fluoreszenzsignalintensität und damit eine starke Expression des

LNGFR-Zelloberflächenproteins. Hinsichtlich der Expressionsstärke des LNGFR-Proteins konnte in der Zelllinie HSRBM01 kein signifikanter Unterschied in den Klonen der beiden hergestellten Expressionskonstrukte pLMCF und pLFCM beobachtet werden. Auch in den Klonen der Mock-Kontrollen konnten keine Unterschiede in der Expressionsintensität des LNGFR-Proteins in den Konstrukten pLMC und pLCM festgestellt werden.

Somit zeigte sich, dass in HSRBM01-Zellen die LNGFR-cDNS unter der Transkriptionskontrolle des retroviralen MoMLV-LTR-Promotors ebenso effizient transkribiert wird, wie unter der Transkriptionskontrolle des internen CMV-Promotors.

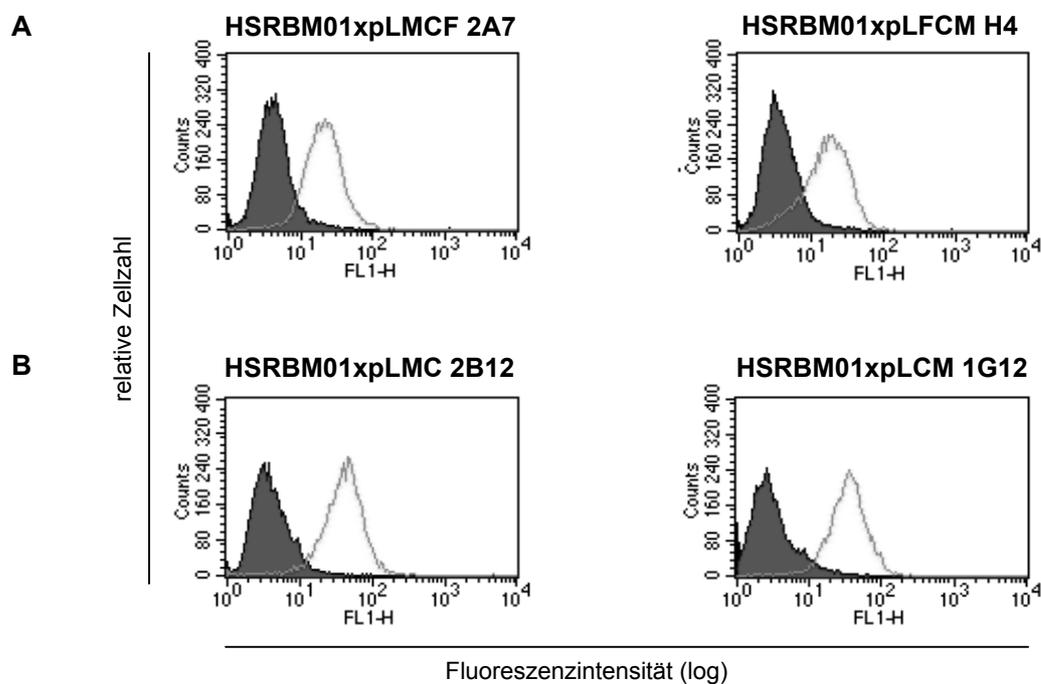


Abbildung 12: **Durchflusszytometrischer Nachweis der Zelloberflächenexpression von LNGFR in HSRBM01-Klonen, die mit den retroviralen Expressionsvektoren pLMCF und pLFCM bzw. den Mock-Kontrollvektoren infiziert wurden**

A: Darstellung der LNGFR-Proteinexpression von HSRBM01-Zellen, die mit dem retroviralen Expressionskonstrukten pLMCF und pLFCM infiziert wurden

B: Darstellung der LNGFR-Proteinexpression von HSRBM01-Zellen, die mit den retroviralen Kontrollvektoren pLMC und pLCM infiziert wurden

Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des unkonjugierten primären Antikörpers Anti-LNGFR für 30 min bei 4°C gefärbt. Für die Kontroll-Färbung (Isotyp-Kontrolle) wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ Anti-Neurofilament-Antikörper benutzt. Nach der Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des sekundären Antikörpers Anti-Maus Ig-FITC wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. In den Histogrammen ist die relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. In jedem Diagramm wird die Färbung der unterschiedlichen Klone mit Anti-LNGFR-Antikörper (graue Linie) mit der Anfärbung durch den Anti-Neurofilament Isotyp-Kontrollantikörper (grau ausgefüllte Kurve) verglichen.

3.4.2.3 Nachweis der c-FLIP_L-Proteinexpression in klonierten HSRBM01-Zellen

Die Expression des c-FLIP_L-Proteins in den HSRBM01-Zellen wurde zunächst indirekt über den Nachweis des im offenen Leserahmens angefügten „c-myc-Epitops“ mit Anti-c-myc-Antikörper (s. 2.1.9.1) untersucht. Es wurden je 20 µg Gesamtproteinextrakt aus 1×10^6 Zellen der HSRBM01xpLMCF-Klone und HSRBM01xpLFCM-Klone unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels ‚Western Blot‘ auf PVDF-Membranen übertragen (s. 2.2.2.5). Für den Nachweis des c-FLIP_L-Proteins wurden 1-10 µg/ml des Anti-c-myc-Antikörpers 9E10 und 40 mU/ml des Sekundärantikörpers Anti-Maus IgG-POD eingesetzt. Bei keinen der LNGFR-positiven HSRBM01-Klone konnte die Expression des c-FLIP_L-Proteins aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis des c-FLIP_L-Transkripts in den untersuchten Klonen mittels ‚RT-PCR‘ war jedoch möglich (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die c-FLIP_L-cDNS in der Verpackungszelllinie nicht transkribiert werden kann. Da auch ein Fehler und damit eine mögliche Fehlkodierung bzw. Rasterschubmutation in der c-FLIP_L-cDNS-Sequenz ausgeschlossen werden konnte (s. 3.1.2), konnte dies ebenfalls nicht die Nichtnachweisbarkeit des c-FLIP_L-Proteins erklären. Daher wurde für den direkten Nachweis des c-FLIP_L-Proteins der Anti-c-FLIP-Antikörper NF6 verwendet. Je 10 µg Gesamtproteinextrakt aus 1×10^6 HSRBM01xpLMCF- und HSRBM01xpLFCM-Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und im ‚Western Blot‘ mit 1 µg/ml des Anti-c-FLIP-Antikörpers NF6 und 40 mU/ml des Sekundärantikörpers Anti-Maus IgG-POD nachgewiesen (Abbildung 13). Als Positivkontrolle diente ein Zelllysats aus dem Labor Krammer, in dem das c-FLIP_L-Protein bereits erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Als Negativkontrolle wurden untransduzierte HSRBM01-Zellen mitgeführt.

Mit dem Anti-c-FLIP-Antikörper NF6 konnte das 55-kD-c-FLIP_L-Protein in allen untersuchten HSRBM01xpLMCF- und HSRBM01xpLFCM-Klonen, sowie in der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Untransduzierte HSRBM01-Zellen wiesen erwartungsgemäß kein rekombinantes c-FLIP_L-Protein auf. Die in allen Zellen zu erkennende schwache Proteinbande, die ein etwas geringeres Molekulargewicht als das rekombinant exprimierte c-FLIP_L-Protein besitzt, repräsentiert das endogen von den Zellen gebildete c-FLIP_L-Protein. Aufgrund des angefügten „myc-tags“ bzw. des angefügten „FLAG-tags“ bei der Positivkontrolle besitzt das Protein in den transduzierten Zellen ein geringfügig größeres Molekulargewicht und damit ein reduziertes elektrophoretisches Laufverhalten im Vergleich zu endogenem c-FLIP_L-Protein.

Somit konnte gezeigt werden, dass die für weitere Arbeiten ausgewählten Klone die eingefügte c-FLIP_L-cDNS effizient in c-FLIP_L-Protein translatieren. Da in allen untersuchten HSRBM01xpLFCM-Klonen bei Einsatz gleicher Gesamtproteinmengen weniger c-FLIP_L-Protein nachweisbar war, wurde vermutet, dass in HSRBM01-Zellen, in denen die c-FLIP_L-cDNS unter der Transkriptionskontrolle des retroviralen LTR-Promotors steht (pLFCM-Konstrukte), diese weniger effizient translatiert wird im Vergleich zu pLMCF-Expressionskonstrukten, in denen die c-FLIP_L-cDNS unter der Transkriptionskontrolle des internen CMV-Promotors exprimiert wird.

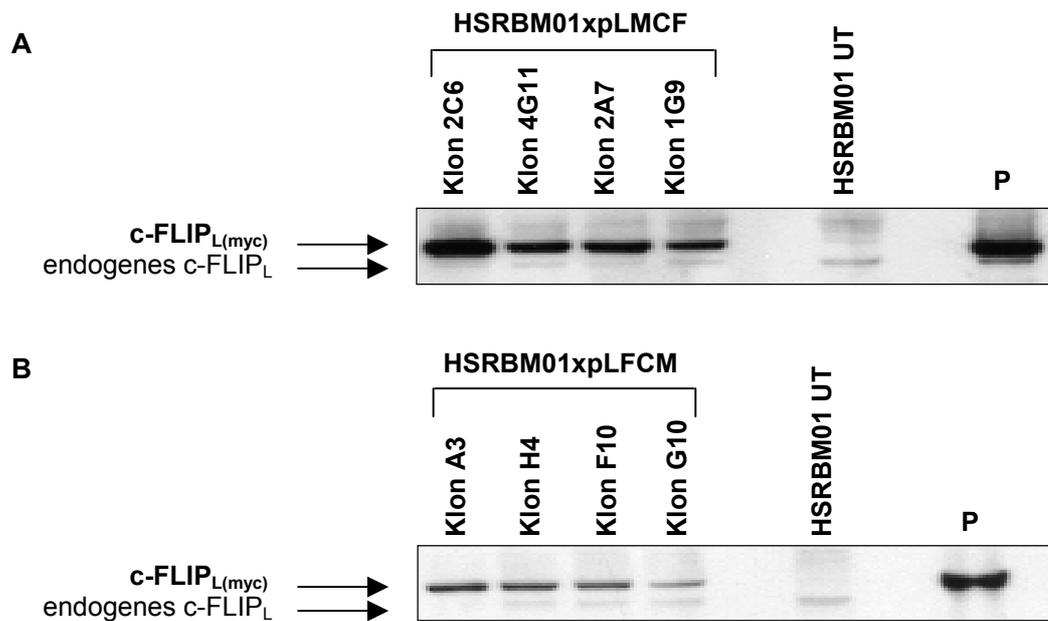


Abbildung 13: **Nachweis des c-FLIP_L-Proteins in einzelnen Klonen der Verpackungszelllinie HSRBM01, die mit den retroviralen Expressionsvektoren pLMCF und pLFCM infiziert wurde mittels ‚Western Blot‘**

A: c-FLIP_L-Proteinexpression in infizierten HSRBM01-Zellen (pLMCF-Konstrukt)

B: c-FLIP_L-Proteinexpression in infizierten HSRBM01-Zellen (pLFCM-Konstrukt)

Jeweils 20 µg Gesamtproteinextrakt aus 1x10⁶ HSRBM01-Zellen wurde unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis des c-FLIP_L-Proteins erfolgte durch Über-Nacht-Inkubation des ‚Blots‘ mit 1 µg/ml Anti-c-FLIP-Antikörper NF6 bei 4°C und 30-minütige Inkubation mit 40 mU/ml des Sekundärantikörpers Anti-Maus IgG-POD. Für den Proteinnachweis wurde das ‚Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)‘ verwendet.

P: Positivkontrolle (Zelllysate mit nachgewiesener Proteinexpression von c-FLIP_L mit angehängtem ‚FLAG-tag‘ aus dem Labor Krammer, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg); **HSRBM01 UT:** untransduzierte HSRBM01-Zellen (Negativkontrolle).

3.4.3 Retroviraler Gentransfer der c-FLIP_L-cDNS in T-Zelllinien

Für weitere Arbeiten wurden die Klone HSRBM01xpLFCM H4 und HSRBM01xpLMCF 2A7, sowie die Mock-Kontrollklone HSRBM01xpLCM 1G12 und HSRBM01xpLMC 2B12 ausgewählt. Diese Auswahl basiert auf einer Reihe von Vorversuchen, im Laufe derer deutlich wurde, dass mit diesen Klonen der Verpackungszelllinie die effizienteste Infektion der T-Zelllinien H9 und Jurkat erzielt werden konnte (Versuche nicht gezeigt). Für die Infektion der T-Zelllinien wurden ‚Transwell‘-Zellkulturplatten verwendet (s. 2.2.3.6), in denen die Zelllinien 2-5 Tage in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren und 10 µg/ml Concanavalin A (induziert die T-Zell-Proliferation und fördert damit die Infektion) mit den ausgewählten Klonen der Verpackungszelllinie HSRBM01 koinkubiert wurden. Nach der Infektion wurden die Zellen für weitere 3 Tage kultiviert, bis die Effektivität der Infektion durchflusszytometrisch und mittels ‚Western Blot‘ untersucht werden konnte.

Der Erfolg der Infektion wurde auch in diesem Fall durch den Nachweis des LNGFR-Proteins beurteilt. H9- und Jurkat-Zellen wurden mit 1 µg/ml des primären Anti-LNGFR-Antikörpers für 30 min inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit dem FITC-markierten Detektionsantikörper (Anti-Maus Ig-FITC). Anschließend konnte der Anteil lebender, LNGFR-positiver Zellen durch Gegenfärbung mit PI bestimmt werden. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 1 µg/ml des Isotyp-Kontrollantikörpers (Anti-Neurofilament-Antikörper) angefärbt wurden. Der durchschnittliche Anteil LNGFR-positiver Zellen lag in den infizierten T-Zelllinien bei 1-8 % (Daten nicht gezeigt).

3.4.3.1 Klonierung infizierter H9- und Jurkat-Zellen

Je 1×10^7 infizierte, LNGFR-exprimierende H9- und Jurkat-Zellen wurden zunächst mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, s. 2.2.3.8.1) angereichert. Dazu wurden die Zellen mit Anti-LNGFR-Antikörper markiert und anschließend mit Ratte-Anti-Maus IgG1-Magnetkügelchen inkubiert. Die Anreicherung der LNGFR-exprimierenden Zellen wurde je drei- bis viermal durchgeführt, um die Abtrennung untransduzierter Zellen zu verbessern. Die separierten H9- und Jurkat-Zellen wurden in RPMI-Kulturmedium expandiert. Für die Klonierung mittels Einzelzellablage (FACS-Sortierung, s. 2.2.3.8.2) wurden die Zellen durch indirekte Anfärbung mit Anti-LNGFR-Antikörper markiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem FITC-markierten Detektionsantikörper (Anti-Maus Ig-FITC). Die Einzelzellablage erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACSort) mit einer gekoppelten Sortierapparatur in 96-Loch-Zellkulturplatten. Als Isotyp-Kontrolle dienten Zellen, die mit Anti-Neurofilament-Antikörper angefärbt wurden.

Die nach 1-2 Wochen heranwachsenden Klone wurden expandiert. Resultierende Klone wurden abhängig vom infizierten Zelltyp und den verwendeten retroviralen Konstrukten mit H9xpLMCF und H9xpLMCF bzw. JurkatxpLMCF und JurkatxpLMCF und der entsprechenden Koordinate in der Mikrotiterplatte benannt. Die Mock-infizierten Kontroll-Klone wurden demgemäß mit H9xpLMC und H9xpLMC bzw. JurkatxpLMC und JurkatxpLMC bezeichnet.

3.4.3.2 Nachweis der LNGFR-Expression in klonierten H9- und Jurkat-Zellen

Die Effektivität der Klonierungen wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse bestimmt. Nach Anfärbung der verschiedenen Klone der T-Zelllinien mit Anti-LNGFR-Antikörper (vgl. 3.4.2.2) wurde deren Expression des LNGFR-Proteins im Durchflusszytometer quantifiziert (s. 2.2.3.7). Als Isotyp-Kontrolle diente auch in diesem Fall die Färbung der Zellen mit Anti-Neurofilament-Antikörper. Abbildung 14 zeigt die LNGFR-Expression einiger ausgewählter Klone, die auch nachfolgend im ‚Western Blot‘ untersucht wurden (s. 3.4.3.3). Die meisten H9- und Jurkat-Klone wiesen eine hohe Expression (20- bis 30-fach stärkere Fluoreszenzsignalintensität) des LNGFR-Proteins (bezeichnet mit FL1-H) im Vergleich zur Isotyp-Kontrollfärbung mit Anti-Neurofilament-Antikörper auf. Auch in den T-Zelllinien konnte kein wesentlicher Unterschied in der Expressionsstärke des LNGFR-Proteins in Abhängigkeit von dem verwendeten Expressionskonstrukt festgestellt werden. Für die weiteren Analysen wurden 12 Klone der H9xpLMCF-Transduktanden,

9 Klone der H9xpLMCF-Transduktanden, 11 Klone der JurkatxpLMCF-Transduktanden und 11 Klone der H9xpLFCM-Transduktanden, sowie pro Zelllinie je 1 Klon, der mit dem entsprechenden Mock-Kontrollvektor hergestellt wurde, ausgewählt.

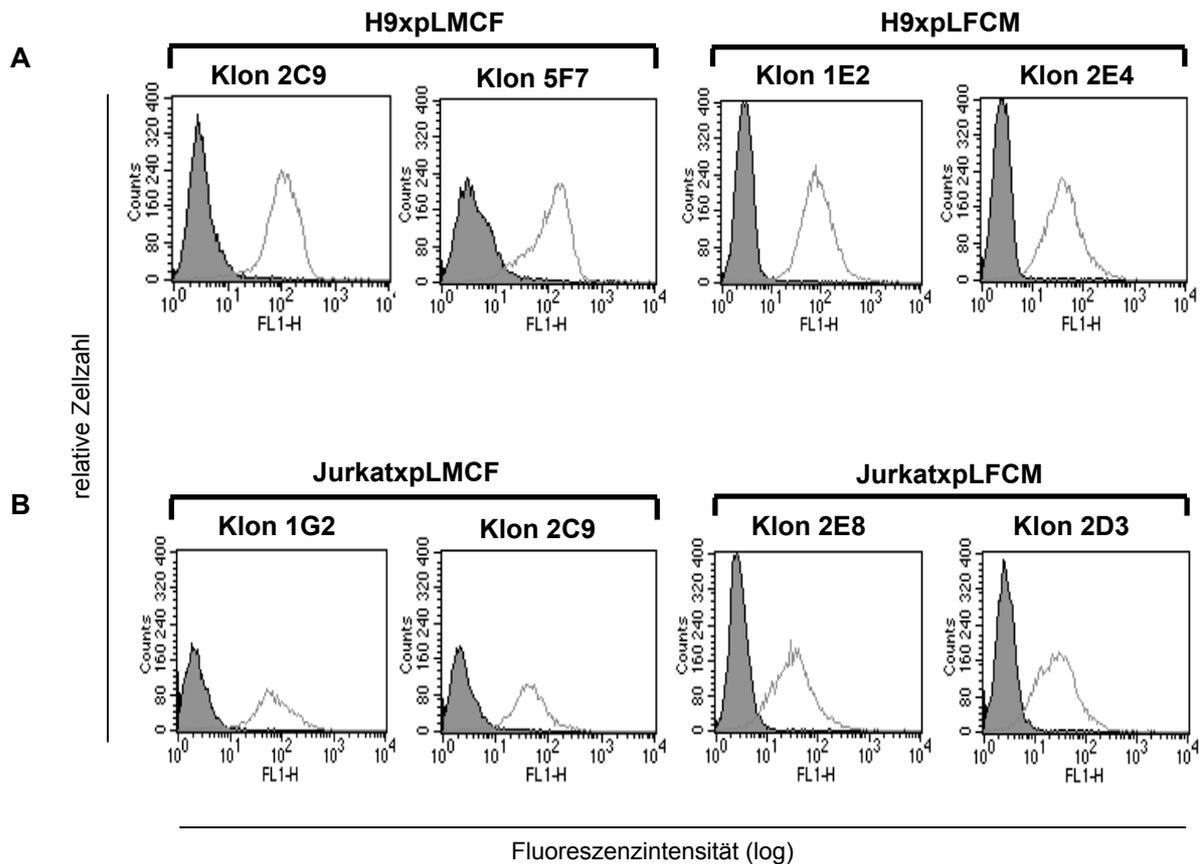


Abbildung 14: **Durchflusszytometrischer Nachweis der LNGFR-Zelloberflächenexpression in H9- und Jurkat-Klonen, die mit den retroviralen Expressionskonstrukten pLMCF und pLFCM infiziert wurden**

A: Darstellung der LNGFR-Proteinexpression in H9-Zellen

B: Darstellung der LNGFR-Proteinexpression in Jurkat-Zellen

Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des unkonjugierten primären Antikörpers Anti-LNGFR für 30 min bei 4°C gefärbt. Für die Kontroll-Färbung (Isotyp-Kontrolle) wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ Anti-Neurofilament-Antikörper eingesetzt. Nach Markierung der Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des sekundären Antikörpers Anti-Maus Ig-FITC wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Von jeder Probe wurden 10000 Zellen analysiert. In den Histogramm-Darstellungen ist die relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. In jedem Diagramm wird die Färbung der unterschiedlichen Klone mit Anti-LNGFR-Antikörper (graue Linie) mit der Anfärbung durch den Anti-Neurofilament Isotyp-Kontrollantikörper (grau ausgefüllte Kurve) verglichen.

3.4.3.3 Nachweis des c-FLIP_L-Proteins in klonierten H9- und Jurkat-Zellen

Die Expression des c-FLIP_L-Proteins in den infizierten T-Zelllinien wurde im ‚Western Blot‘ analysiert. Von allen untersuchten Klonen wurden je 50 µg Gesamtproteinextrakt aus 1×10^6 Zellen unter reduzierenden Bedingungen mittels Protein-Gelelektrophorese aufgetrennt, und im ‚Western Blot‘ mit 1 µg/ml Anti-c-FLIP-Antikörper NF6 analysiert (Abbildung 15). Als Positivkontrolle diente ein Zelllysate der mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt infizierten Verpackungszelllinie HSRBM01 (in der Abbildung nicht dargestellt). Untransduzierte H9- bzw. Jurkat-Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Auch in den Klonen der Mock-Kontrollen konnte keine Expression des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das c-FLIP_L-Protein konnte in allen untersuchten T-Zell-Klonen in unterschiedlicher Stärke, sowie in der Positivkontrolle als 55-kD-Proteinbande nachgewiesen werden. In H9- und Jurkat-Zellen wurde wie in HSRBM01-Zellen (s. Abbildung 13) eine zusätzliche Proteinbande mit geringerer Größe nachgewiesen, die das endogen exprimierte c-FLIP_L-Protein repräsentiert. Aufgrund des angefügten „myc-tags“ zeigt das c-FLIP_L-Protein in den transduzierten Zellen ein reduziertes elektrophoretisches Laufverhalten im Vergleich zu dem endogen gebildeten Protein. In Übereinstimmung mit dem Nachweis des c-FLIP_L-Proteins in HSRBM01-Zellen (s. Abbildung 13) zeigte sich auch in den T-Zelllinien, dass in allen ausgewählten H9- und Jurkat-Klonen, in denen die Expression der c-FLIP_L-cDNS durch den viralen LTR-Promotor kontrolliert wird (pLFCM-Konstrukte), das Protein in geringerem Maße gebildet wird im Vergleich zu den entsprechenden Klonen, in denen die cDNS unter der Transkriptionskontrolle des internen CMV-Promotors steht (pLMCF-Vektoren). Somit konnte vermutet werden, dass die c-FLIP_L-cDNS in den pLFCM-Konstrukten in beiden T-Zelllinien weniger effizient translatiert wird.

Insgesamt wiesen alle untersuchten H9xpLMCF-Klone eine stärkere Überexpression des c-FLIP_L-Proteins im Vergleich zu den analysierten JurkatxpLMCF-Klonen auf.

Es wurden Klone ausgewählt, die sich in der Expressionsstärke des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins unterscheiden. Für eine bessere Vergleichsmöglichkeit wurde die Klonauswahl auf H9- und Jurkat-Zellen beschränkt, die mit dem retroviralen Expressionskonstrukt pLMCF transduziert wurden. Die ausgesuchten Klone sind in Abbildung 15 mit einem Stern gekennzeichnet.

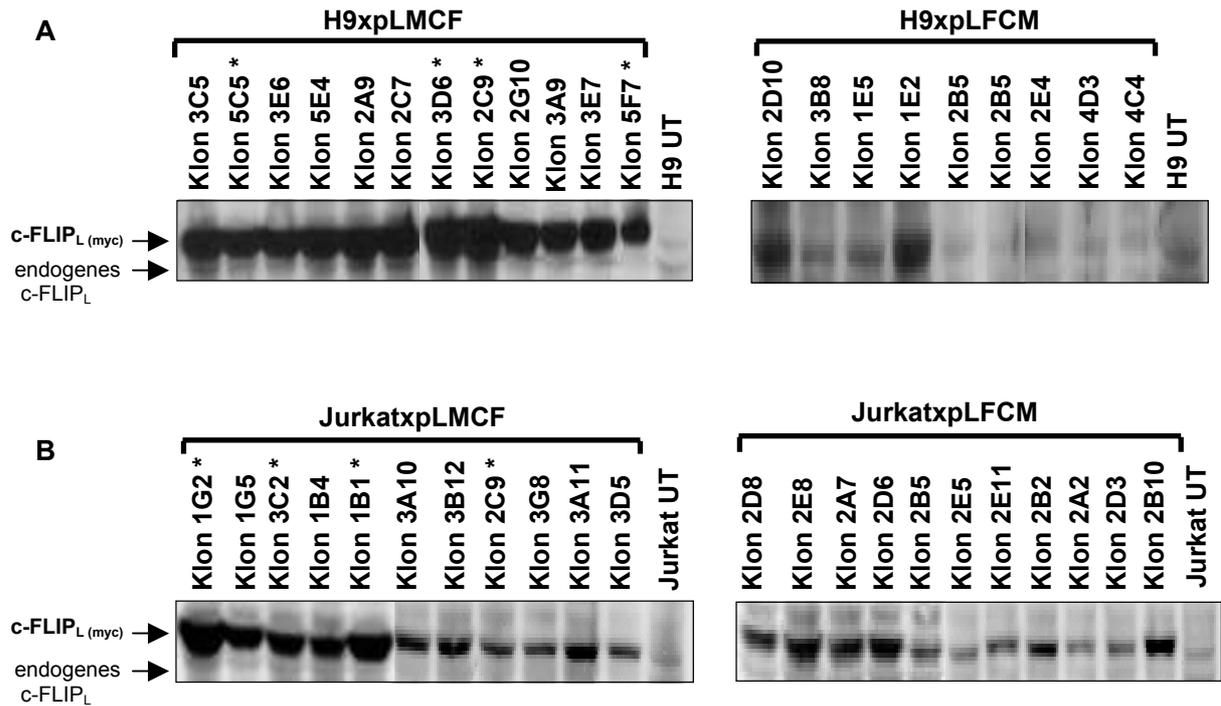


Abbildung 15: Nachweis des c-FLIP_L-Proteins in einzelnen Klonen der T-Zelllinien H9 und Jurkat, die mit den retroviralen Expressionsvektoren pLMCF und pLFCM infiziert wurden mittels ‚Western Blot‘

A: Expression des c-FLIP_L-Proteins in H9-Zellen

B: Expression des c-FLIP_L-Proteins in Jurkat-Zellen

Jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakt aus je 1x10⁶ Zellen wurde unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis des c-FLIP_L-Proteins erfolgte durch Über-Nacht-Inkubation des ‚Blots‘ mit 1 µg/ml Anti-c-FLIP-Antikörper NF6 bei 4°C und 30-minütige Inkubation mit 40 mU/ml des Sekundärantikörpers Anti-Maus IgG-POD. Für den Proteinnachweis wurde das ‚Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)‘ verwendet.

H9 UT: untransduzierte H9-Zellen (Negativkontrolle); **Jurkat UT:** untransduzierte Jurkat-Zellen (Negativkontrolle)

*: für weitere Analysen ausgewählte Klone.

Der Expressionsgrad des c-FLIP_L-Proteins wurde in den ausgewählten Klonen durch Ermittlung der Chemilumineszenzintensität der 55-kD-c-FLIP_L-Proteinbanden in den ‚Western Blot‘-Analysen mit dem ‚Lumilmager‘-Chemilumineszenzmessgerät im Vergleich zu der Expressionsstärke des endogenen c-FLIP_L-Proteins in untransduzierten Zellen bestimmt. Pro Zelllinie wurden für die weiteren zellbiologischen Untersuchungen 2 Klone mit einer starken Überexpression des c-FLIP_L-Proteins ausgewählt, um klonale Unterschiede auszuschließen. Zusätzlich wurde ein Klon mit mittlerer Expressionsstärke und ein Klon mit niedriger Expressionsstärke ausgewählt (s. Abbildung 16). Die ausgewählten Klone wurden in den weiteren Experimenten mit H9 Mock 4G5, H9xc-FLIP_L 2C9, H9xc-FLIP_L 3D6, H9xc-FLIP_L 5C5 und H9xc-FLIP_L 5F7 bezeichnet. Entsprechend wurden die Jurkat-Klone mit Jurkat Mock 1H10, Jurkatxc-FLIP_L 1G2, Jurkatxc-FLIP_L 1B1, Jurkatxc-FLIP_L 3C2 und Jurkatxc-FLIP_L 2C9 benannt. Des Weiteren wurden untransduzierte H9- und Jurkat-Zellen in den Versuchen mitgeführt, die im Folgenden mit H9 UT bzw. Jurkat UT (untransduziert) bezeichnet wurden.

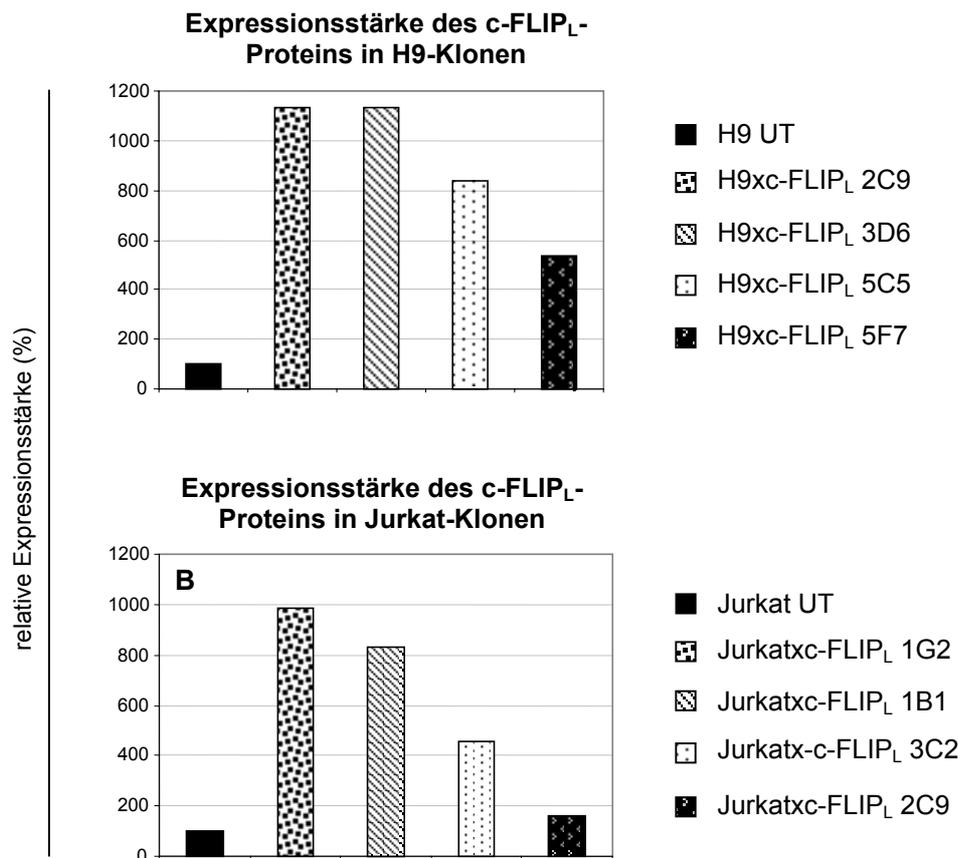


Abbildung 16: **Quantifizierung der rekombinanten Expression des c-FLIP_L-Proteins in ausgewählten H9- und Jurkat-Klonen**

A: Expressionsstärke des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins in pLMCF-transduzierten Klonen der T-Zelllinie H9

B: Expressionsstärke des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins in pLMCF-transduzierten Klonen der T-Zelllinie Jurkat

Die Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins wurde mittels Chemilumineszenzintensitätsmessung von ‚Western Blot‘-Analysen, die dem Nachweis des c-FLIP_L-Proteins in den infizierten T-Zelllinien H9 und Jurkat dienen, mit dem Lumilmager quantifiziert. Die Überexpression des c-FLIP_L-Proteins in den infizierten Zellen wurde in Relation zu der Expression des endogenen c-FLIP_L-Proteins (100 %) in den jeweiligen untransduzierten Zellen bestimmt.

H9xc-FLIP _L Klon	-fache Überexpression des rekombinanten c-FLIP _L -Proteins [%]	Jurkatxc-FLIP _L Klon	-fache Überexpression des rekombinanten c-FLIP _L -Proteins [%]
2C9	11,34	1G2	9,82
3D6	11,31	1B1	8,33
5C5	8,37	3C2	4,57
5F7	5,34	2C9	1,60

Tabelle 6: **Auswertung der rekombinanten Expression des c-FLIP_L-Proteins in den ausgewählten H9- und Jurkat-Klonen**

Der Faktor der Überexpression des c-FLIP_L-Proteins in den infizierten H9- und Jurkat-Zellen wurde in Relation zu der Expression des endogenen c-FLIP_L-Proteins (100 %) in den jeweiligen untransduzierten Zellen bestimmt (vgl. Abbildung 16).

3.5 Untersuchung der zellbiologischen Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins

3.5.1 Untersuchung der CD95-Expression in H9- und Jurkat-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Sensitivität der T-Zelllinien H9 und Jurkat, die das c-FLIP_L-Protein stabil überexprimieren, gegenüber Apoptose, die durch den CD95-Rezeptor vermittelt wird, untersucht werden. Um auszuschließen, dass Abweichungen in der Zelloberflächenexpression des CD95-Rezeptors zu einer unterschiedlichen Apoptosesensitivität der Zellen beitragen könnten, wurde die Expression des Rezeptors in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den verwendeten transduzierten Zellen untersucht. Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ des unkonjugierten primären Antikörpers Anti-CD95 für 30 min bei 4°C angefärbt. Für die Isotyp-Kontrollfärbung wurde Anti-Neurofilament-Antikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente FITC-markierter Anti-Maus Ig-Antikörper. Der Anteil LNGFR-positiver Zellen wurde im Durchflusszytometer (s. 2.2.3.7) nach Ausgrenzung toter Zellen durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid bestimmt (Abbildung 17).

Wie man an der relativen Verschiebung des Fluoreszenzintensitätsmaximums der Färbung mit dem Anti-CD95-Antikörper gegenüber der Färbung mit dem Isotyp-Kontrollantikörper Anti-Neurofilament erkennt, weisen H9-Zellen eine ca. 2- bis 3-fach stärkere Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors im Vergleich zu Jurkat-Zellen auf. Die CD95-Oberflächenexpression innerhalb einer Zelllinie war jedoch bei untransduzierten Zellen und den infizierten Klonen einheitlich.

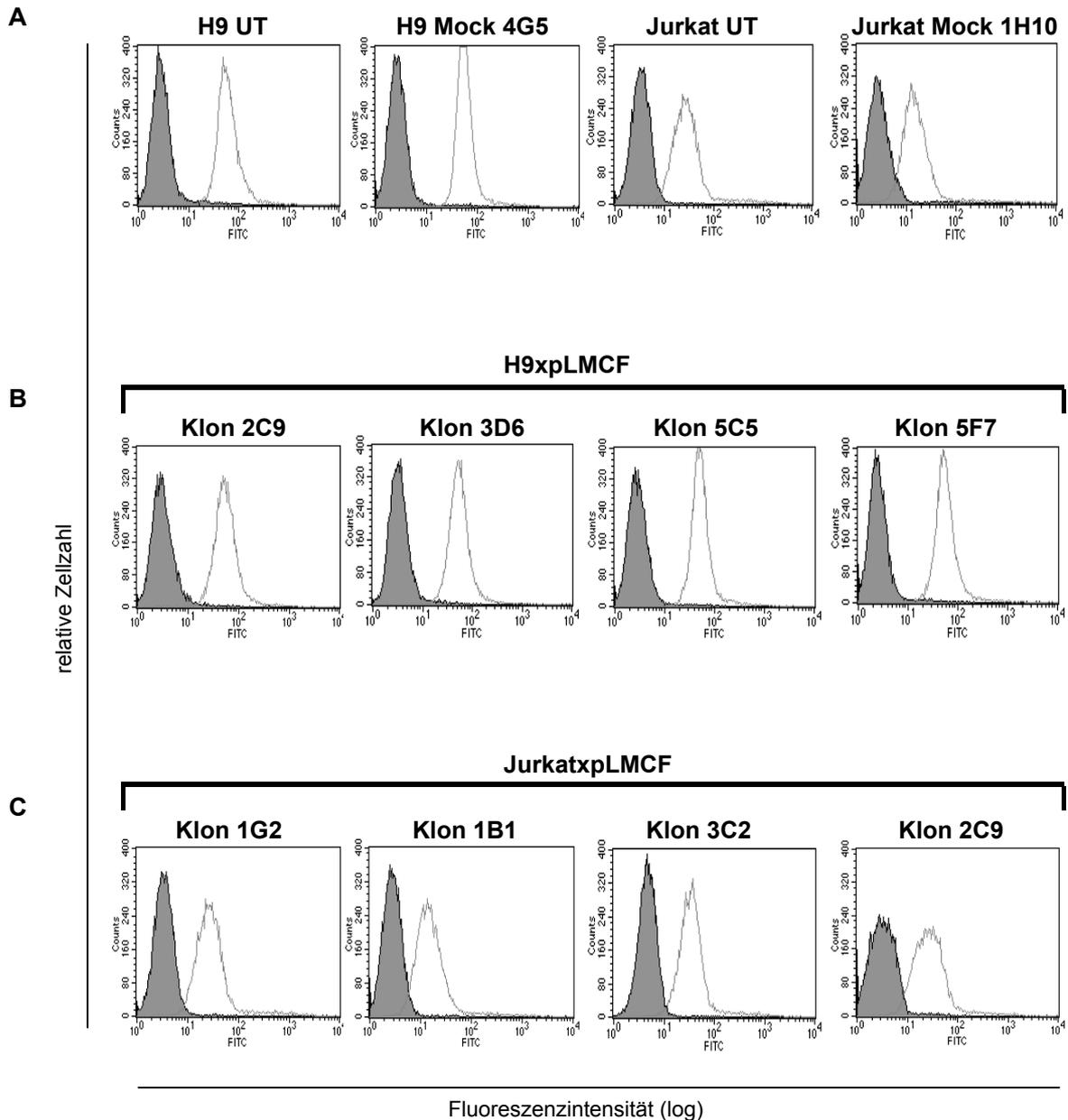


Abbildung 17: **Vergleichende durchflusszytometrische Untersuchung der Zelloberflächenexpression des CD95-Rezeptors in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen, sowie in ausgewählten H9- und Jurkat-Transduktanden**

A: CD95-Proteinexpression in untransduzierten Zellen und den Klonen der Mock-Kontrollen

B: CD95-Proteinexpression in transduzierten H9-Zellen

C: CD95-Proteinexpression in transduzierten Jurkat-Zellen

Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des Primärantikörpers Anti-CD95 für 30 min bei 4°C gefärbt. Für die Kontrollfärbung (Isotyp-Kontrolle) wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ Anti-Neurofilament-Antikörper benutzt. Nach anschließender Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des sekundären Antikörpers Anti-Maus Ig-FITC wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. In den Histogrammen ist die relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. In jedem Diagramm wird die Färbung der unterschiedlichen Klone mit Anti-CD95-Antikörper (graue Linie) mit der Anfärbung durch den Anti-Neurofilament Isotyp-Kontrollantikörper (grau ausgefüllte Kurve) miteinander verglichen.

3.5.2 Charakterisierung der Apoptosesensitivität mit dem ‚Annexin-V-Test‘

Für die Auslösung des zellulären Apoptoseprogramms müssen die CD95-Rezeptormonomere effektiv kreuzvernetzt werden. Diese Kreuzvernetzung führt zu einer Zusammenlagerung der Rezeptormoleküle in der Membran und resultiert dann in der Induktion des Zelltodprogramms (vgl. 1.2.3.1). Für die Stimulierung der Apoptose unter experimentellen Bedingungen wurden die agonistischen Antikörper Anti-CD95 Klon 2R2 (IgG3) und Anti-CD95 Klon CH-11 (IgM) verwendet. Zur Verstärkung der Apoptose-induzierenden Wirkung des Antikörpers der IgG3-Subklasse wurde dieser durch eine zweistündige Vorinkubation mit 1 µg Protein-G-Lösung pro 1 µg Antikörperlösung kreuzvernetzt. Antikörper der Immunglobulin-Klasse IgM bilden Pentamere und besitzen somit zehn Antigenbindungsstellen. Durch Verwendung dieses Antikörpers sollte somit eine effektive Kreuzvernetzung des CD95-Rezeptors möglich sein. Um die Apoptose-induzierende Wirkung dieses Antikörpers zusätzlich zu verstärken, wurde eine zweistündige Vorinkubation mit 1 µg Protein-A-Lösung pro 1 µg Antikörperlösung vorgenommen. Je 1×10^6 Zellen der transduzierten H9- und Jurkat-Zellen, sowie untransduzierte H9- und Jurkat-Zellen wurden anschließend mit 1 µg/ml dieser so behandelten Antikörperlösungen inkubiert.

In einer Reihe von Vorversuchen konnte mit beiden Antikörpern Apoptose in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen induziert werden. Da kein Unterschied in der Apoptose-auslösenden Wirkung zwischen den beiden Antikörpern beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde für die weiteren Studien der Antikörper der IgG3-Subklasse verwendet.

3.5.2.1 Untersuchung der Apoptosesensitivität von untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen

Um die Kinetik der Apoptoseinduktion zu verfolgen, wurden die untersuchten Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h geerntet und die Anzahl apoptotischer Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen 1 µg/ml der zur Kreuzvernetzung verwendeten Protein-G-Lösung zugesetzt wurde. Ein repräsentativer Versuch mit untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen ist in Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt. Der Apoptoseverlauf der Mock-Kontrollklone entsprach dem der untransduzierten Zellen und ist daher hier nicht gesondert angeführt. Die Diagramme wurden wie unter 2.2.5 beschrieben durch eine Gitternetzlinie in vier Quadranten unterteilt, die mit „oben links (OL)“, „oben rechts (OR)“, „unten links (UL)“ und „unten rechts (UR)“ bezeichnet wurden. Lebende Zellen, die weder mit Annexin-V noch mit PI anfärbbar sind, befinden sich im Quadranten UL. Zellen, die sich in einem frühen Apoptosestadium befinden und mit Annexin-V, nicht aber mit PI anfärbbar sind, befinden sich im Quadranten OL. Der Quadrant OR umfasst alle Zellen, die sowohl mit Annexin-V als auch mit PI markiert werden. Im Quadranten UR sind dagegen Zellen in einer sehr späten Phase der Apoptose zu finden, die sich bereits nicht mehr mit Annexin-V, sondern nur noch mit dem Farbstoff PI anfärben lassen. Der Gesamtanteil apoptotischer Zellen (bezeichnet als A_E = experimentelle Apoptose) wurde durch Addition der Anteile in den Quadranten OL, OR und UR berechnet. Der Anteil apoptotischer Zellen der Negativkontrolle wurde ebenfalls über die

Quadranten OL, OR und UR summiert und repräsentiert den Anteil spontan in der Probe auftretender Apoptose (bezeichnet als A_S = spontane Apoptose). Somit berechnete sich der relative Prozentanteil apoptotischer Zellen aus der Subtraktion $A_E - A_S$.

Der Apoptoseverlauf der beiden T-Zelllinien H9 und Jurkat, die als Typ-I- und Typ-II-Zellen kategorisiert wurden (s. 1.2.3.3), zeigte deutliche Unterschiede. Bereits nach einer 4-stündigen Inkubationszeit mit dem agonistischen Anti-CD95-Antikörper wies der größte Teil der H9-Zellen eine Anfärbung mit Annexin-V auf (Abbildung 18, Quadrant OL 62,7 %). In der T-Zelllinie Jurkat hingegen zeigten zu diesem Zeitpunkt 34,1 % der Zellen eine Anfärbung mit Annexin-V (Quadrant OL). Diese beobachteten Unterschiede wurden nach einem Inkubationszeitraum von 8 h und 24 h noch offensichtlicher. Nach 24 h betrug der Anteil Annexin-V-positiver Zellen in der Zelllinie H9 5,8 % (Quadrant OL). Mit PI wurden 69,9 % der Zellen markiert (Quadrant OR). Jurkat-Zellen wiesen dagegen zu diesem Zeitpunkt einen Anteil von 23,8 % Annexin-V- und 46,1 % PI-positiver Zellen auf (Quadrant OL und Quadrant OR).

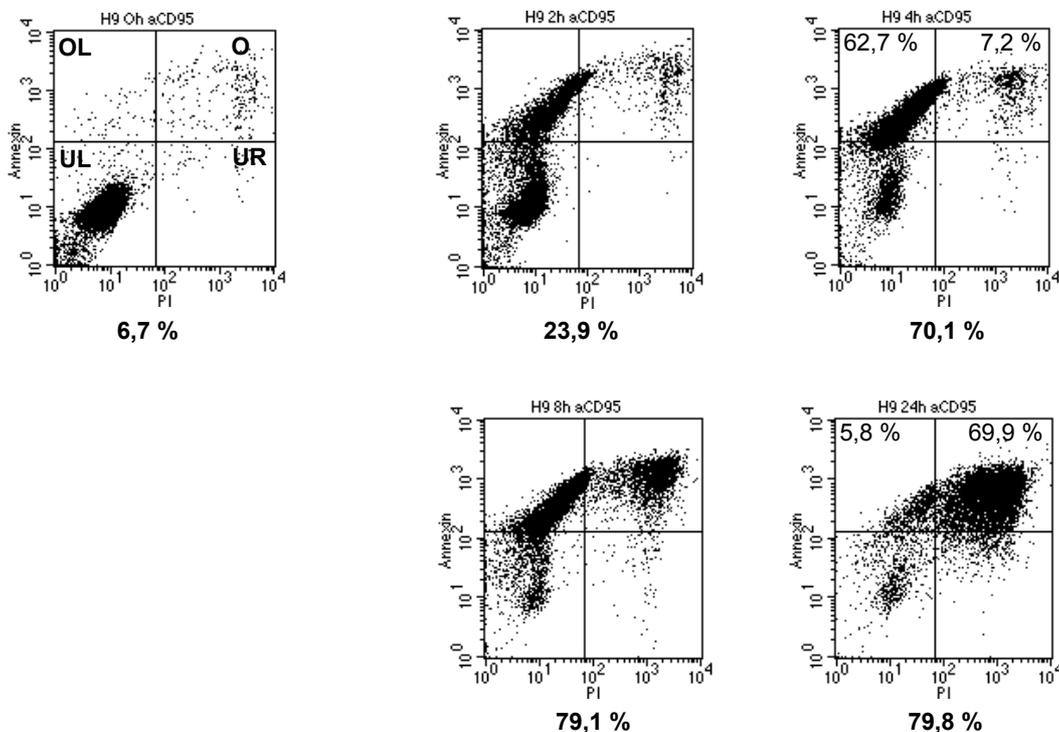


Abbildung 18: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in untransduzierten H9-Zellen nach Stimulierung mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem 'Annexin-V-FLUOS Staining Kit' gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur. Die Prozentangaben in den Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einzelner, im Text erläuteter Verteilungen Annexin-V- und PI-positiver Zellfraktionen aufgeführt.

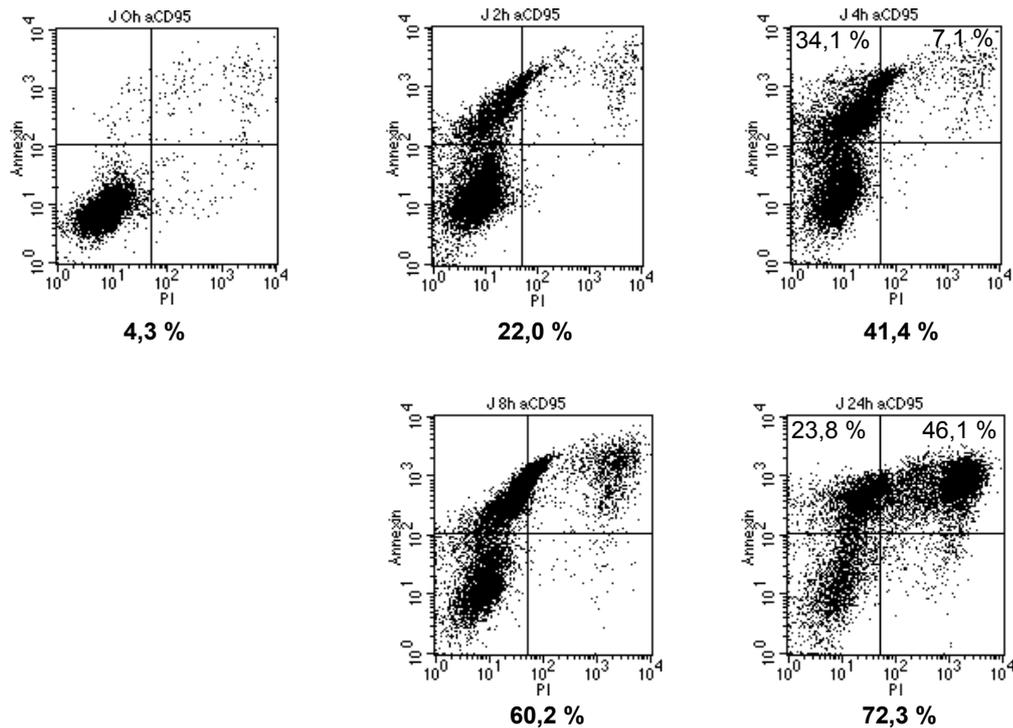


Abbildung 19: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in untransduzierten Jurkat-Zellen nach Stimulierung mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur. Die Prozentangaben in den Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einzelner, im Text erläuteter Verteilungen Annexin-V- und PI-positiver Zellfraktionen aufgeführt.

J: Jurkat

Abbildung 20 zeigt eine grafische Darstellung des Apoptoseverlaufs in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den Klonen der Mock-Kontrollen über einen Zeitraum von 0 h-24 h.

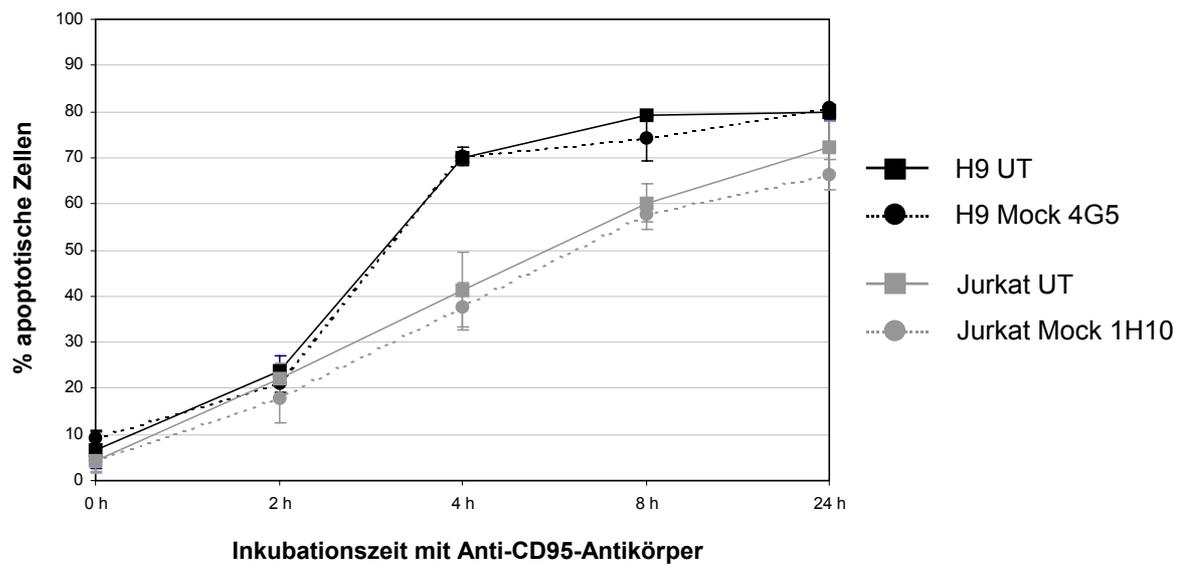


Abbildung 20: **Grafische Darstellung des Apoptoseverlaufs in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den jeweiligen Mock-Kontrollen nach Stimulierung mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper über einen Zeitraum von 0 h-24 h**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den Zeitpunkt der Zellernte (in h) aufgetragen.

3.5.2.2 Beeinflussung der Apoptosesensitivität durch rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins

Um den Einfluss des Expressionsgrads des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins auf die Apoptosesensitivität der transduzierten H9- und Jurkat-Zellen zu untersuchen, wurden die in Tabelle 6 dargestellten Klone unter gleichen Bedingungen mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper (IgG3-Subklasse) behandelt und nach den entsprechenden Zeitintervallen geerntet. Als Negativkontrollen dienten Zellen, denen 1 µg/ml Protein-G-Lösung zugesetzt wurde.

In allen untersuchten Klonen beider T-Zelllinien konnte eine deutlich reduzierte Sensitivität der Klone gegenüber der Apoptoseauslösung im Vergleich zu untransduzierten Zellen und der jeweiligen Mock-Kontrolle beobachtet werden. Abbildung 21 zeigt je eine repräsentative Messung des Ablaufs der Apoptose in den Klonen H9xc-FLIP_L 2C9 und Jurkatxc-FLIP_L 1G2, die eine sehr starke Expression des c-FLIP_L-Proteins aufweisen. Für die Auswertung wurde die gleiche Quadranteneinteilung vorgenommen wie bei den entsprechenden untransduzierten Zellen bzw. den Mock-Kontrollen.

Im Vergleich zu den untransduzierten Zellen (s. Abbildung 18 und Abbildung 19) wiesen Klone mit einer starken Expression des c-FLIP_L-Proteins eine deutlich verringerte Apoptosesensitivität auf. Nach einem Inkubationszeitraum von 24 h in Gegenwart des Apoptose-induzierenden Antikörpers zeigten 6,5 % der Zellen des Klons H9xc-FLIP_L 2C9 eine Anfärbung mit Annexin-V (Quadrant OL), der Anteil Annexin-V- und PI-positiver Zellen betrug 10,5 % (Quadrant OR). Der Gesamtanteil apoptotischer Zellen in der Kultur machte durchschnittlich 17,4 % aus.

Der Klon Jurkatxc-FLIP_L 1G2 wies im Durchschnitt einen Anteil apoptotischer Zellen von 12,4 % auf. Der Teil Annexin-V-positiver Zellen betrug 4,6 % (Quadrant OL). Die Fraktion der Annexin-V- und PI-positiven Zellen machte 7,5 % (Quadrant OR) aus.

Abbildung 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Apoptose über einen Zeitraum von 24 h in allen untersuchten Klonen der Zelllinien H9 und Jurkat im Vergleich zu den jeweiligen untransduzierten Zellen.

Aus diesen Ergebnissen ging somit klar hervor, dass Klone, die eine starke Überexpression des c-FLIP_L-Proteins aufweisen (s. Abbildung 15 und Abbildung 16), eine deutlich verringerte Apoptosesensitivität besitzen. Diese reduzierte Sensitivität resultiert in einem eindeutig verlangsamten Apoptoseverlauf im Vergleich zu den entsprechenden untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen. Auch nach 24-stündiger Inkubation mit dem Antikörper war der Gesamtanteil apoptotischer Zellen deutlich niedriger als in untransduzierten Zellen und den entsprechenden Klonen der Mock-Kontrolle.

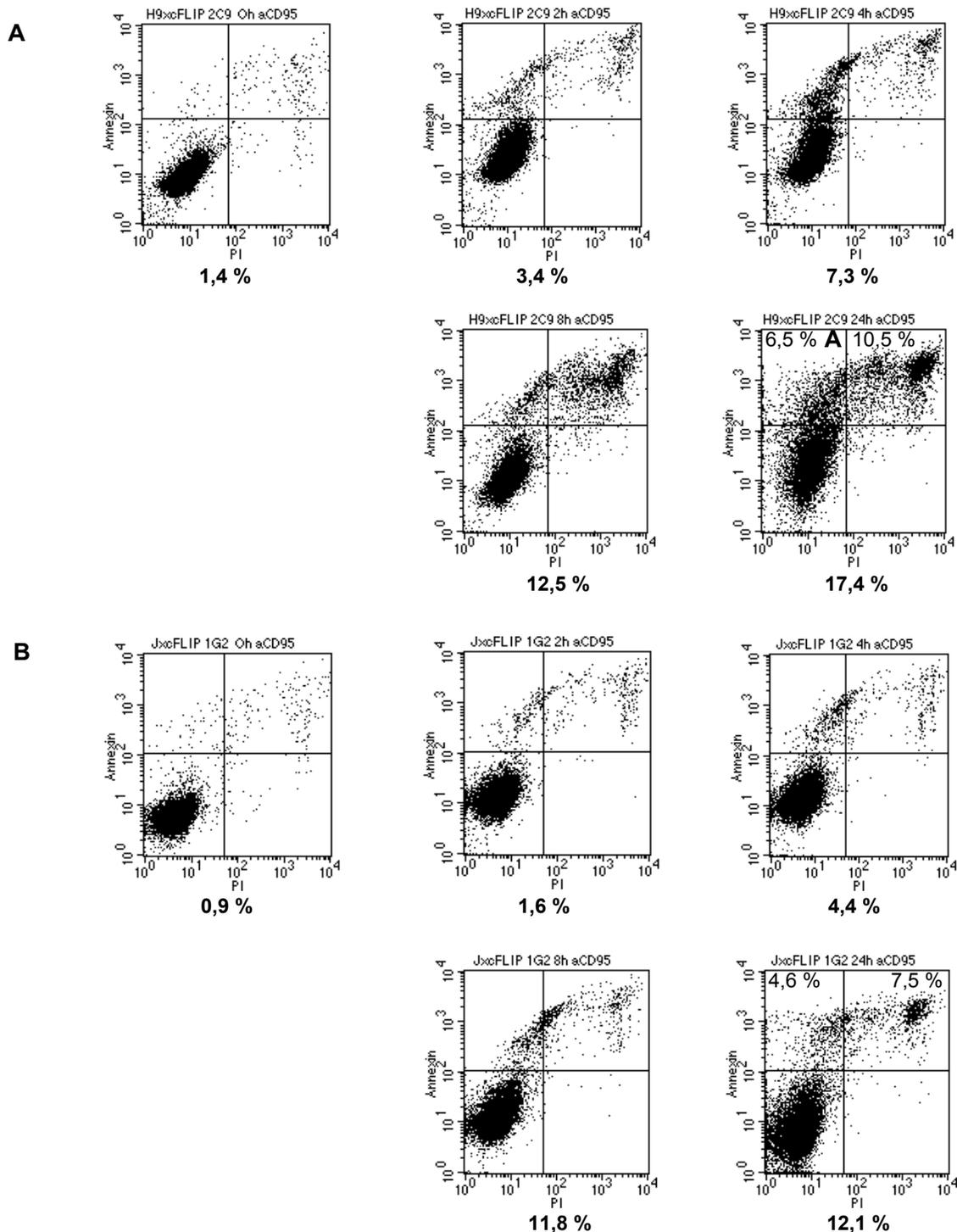


Abbildung 21: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptose in den Transduktanten H9xc-FLIP_L 2C9 und Jurkatxc-FLIP_L 1G2 nach Stimulierung mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper**

A: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in dem Klon H9xc-FLIP_L 2C9

B: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in dem Klon Jurkatxc-FLIP_L 1G2

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur. Die Prozentangaben in den Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einzelner, im Text erläuteter Verteilungen Annexin-V- und PI-positiver Zellfraktionen aufgeführt.

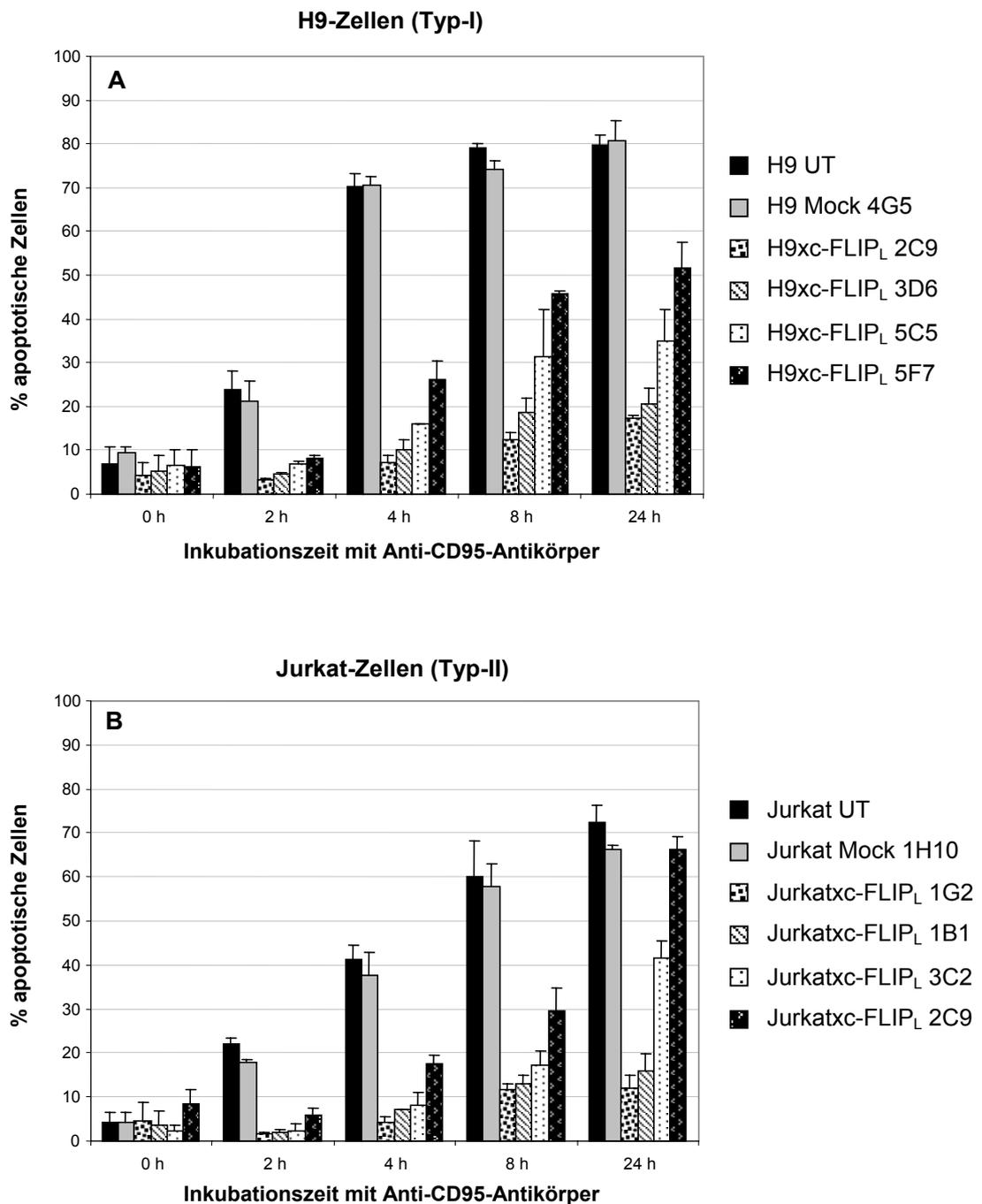


Abbildung 22: **Grafische Darstellung der Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Expressionsstärken des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins im Vergleich zu untransduzierten Zellen und dem Klon der Mock-Kontrolle nach Stimulierung mit Anti-CD95-Antikörper**

A: Apoptosesensitivität der ausgewählten H9-Klone im Vergleich zu untransduzierten Zellen

B: Apoptosesensitivität der ausgewählten Jurkat-Klone im Vergleich zu untransduzierten Zellen

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den Zeitpunkt der Zellernte (in h) aufgetragen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Apoptoseresistenz der einzelnen Klone mit deren Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins (vgl. Abbildung 16) korreliert (Abbildung 23). Klone mit starker Expression des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins (Jurkatxc-FLIP_L 1G2 und Jurkatxc-FLIP_L 1B1 bzw. H9xc-FLIP_L 2C9 und H9xc-FLIP_L 3D6) wiesen dementsprechend eine deutliche Resistenz gegenüber dem Apoptosestimulus auf. Klone mit mittlerer Expressionsstärke (Jurkatxc-FLIP_L 3C2 bzw. H9xc-FLIP_L 5C5) und Klone mit schwacher Expression des c-FLIP_L-Proteins (Jurkatxc-FLIP_L 2C9 bzw. H9xc-FLIP_L 5F7) waren demgemäß weniger Apoptose-resistent. Insgesamt war in den ausgewählten Jurkat-Klonen eine größere Apoptosesensitivität im Vergleich zu allen untersuchten H9-Klonen festzustellen. Die Korrelationskoeffizienten (R), die das Ausmaß der linearen Abhängigkeit der spezifischen Apoptoserate von der Expressionsstärke des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins quantifizieren, wurden nach der unter 2.2.5 angegebenen Formel berechnet und liegen bei R=0,997 (H9-Klone) und R=0,993 (Jurkat-Klone).

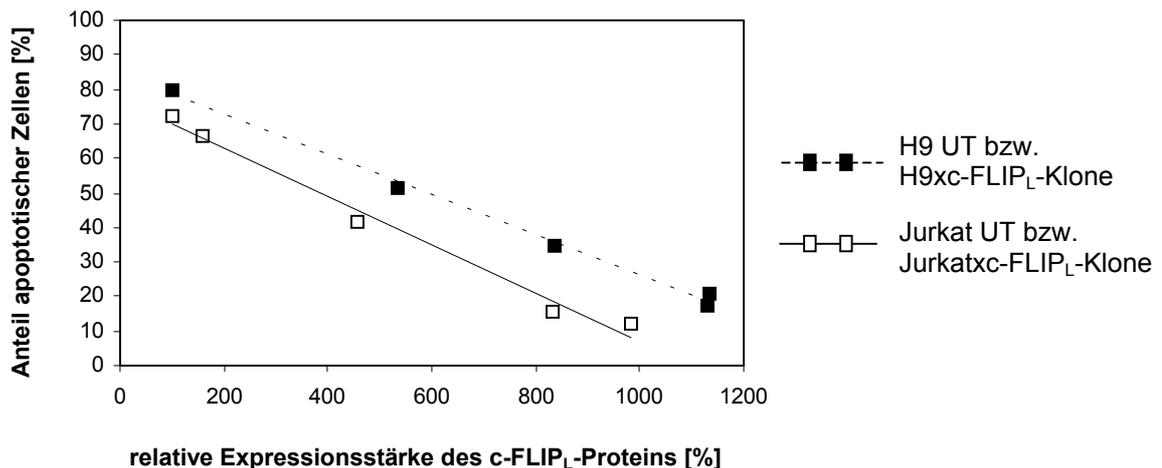


Abbildung 23: **Korrelation der Apoptosesensitivität mit der Stärke der Überexpression des c-FLIP_L-Proteins in H9- und Jurkat-Zellen**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurde die Apoptosesensitivität der Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ durchflusszytometrisch quantifiziert (vgl. Abbildung 22). Die Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins wurde mittels Chemilumineszenzintensitätsmessung mit dem Lumilmager bestimmt (s. 3.4.3.3). Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den relativen Überexpressionsgrad des c-FLIP_L-Proteins (in %) in den 4 ausgewählten transduzierten H9- bzw. Jurkat-Klonen und den jeweiligen untransduzierten Zellen (Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins in untransduzierten Zellen = 100 %, s. Abbildung 16) aufgetragen.

3.5.3 Untersuchung der Spaltung von Caspase-8

3.5.3.1 Spaltung von Caspase-8 in untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen

In folgenden Experimenten wurde der Einfluss der rekombinanten Überexpression des c-FLIP_L-Proteins auf die Spaltung von Caspase-8 untersucht. Je 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit $1 \mu\text{g/ml}$ der zur Kreuzvernetzung verwendeten Protein-G-Lösung versetzt wurden. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und nach 24 h. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann sofort mit Lysepuffer behandelt. Jeweils $20 \mu\text{g}$ der Proteinextrakte wurden anschließend unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ analysiert. Der Nachweis von Caspase-8 erfolgte mit dem Antikörper Anti-Caspase-8. In Zellen, die in Gegenwart von Protein-G-Lösung inkubiert wurden, war keine Spaltung von Caspase-8 nachweisbar (‚Western Blots‘ nicht dargestellt). Abbildung 24 zeigt charakteristische ‚Western Blot‘-Ergebnisse der Versuche.

In unbehandelten (0 h) untransduzierten H9-Zellen und dem Klon der Mock-Vektorkontrolle konnten die beiden ungespaltenen Caspase-8-Isoproteine (Caspase-8a und Caspase-8b, s. 1.2.3.2) mit einem Molekulargewicht von 55,4 kD (Caspase-8a) bzw. 53,7 kD (Caspase-8b) nachgewiesen werden. Aufgrund der Stärke des Signals ist nur eine Bande zu erkennen. Bereits 1 h nach Zugabe des agonistischen Anti-CD95-Antikörpers waren die beiden ungespaltenen Caspase-8-Isoformen nur noch schwach nachweisbar. Dagegen wurden die gleich großen aktiven Untereinheiten der beiden gespaltenen Caspase-8-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 18 kD (p18) und 10 kD (p10), sowie die während des ersten Schritts der Caspase-8-Spaltung auftretenden intermediären Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 43 kD (p43) und 41 kD (p41) nachgewiesen. Untransduzierte H9-Zellen und der Klon der Mock-Kontrolle wiesen eine hohe Abundanz der aktiven p10-Untereinheit nach 2- bis 4-stündiger Inkubation mit dem Antikörper auf.

In unbehandelten (0 h), untransduzierten Jurkat-Zellen und dem entsprechenden Klon der Mock-Kontrolle konnten die beiden ungespaltenen Caspase-8-Isoproteine ebenfalls nachgewiesen werden. Nach 1-stündiger Inkubation mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper waren auch in dieser Zelllinie die Banden der ungespaltenen Caspase-8-Proteine nur noch schwach zu erkennen. Wie bei der T-Zelllinie H9 konnten auch bei Jurkat-Zellen die aktive p10-Untereinheit des Enzyms und die intermediären Spaltprodukte p43 und p41 nachgewiesen werden. Die Untereinheit p18 war hier nur schwach nachweisbar.

Bei dem untersuchten mocktransduzierten Klon 1H10 ist deutlich zu erkennen, dass die Akkumulation der aktiven p10-Untereinheit nach einem Zeitraum von 6 h bis 8 h nach Beginn der Inkubation der Zellen mit dem Apoptose-induzierenden Antikörper erfolgt.

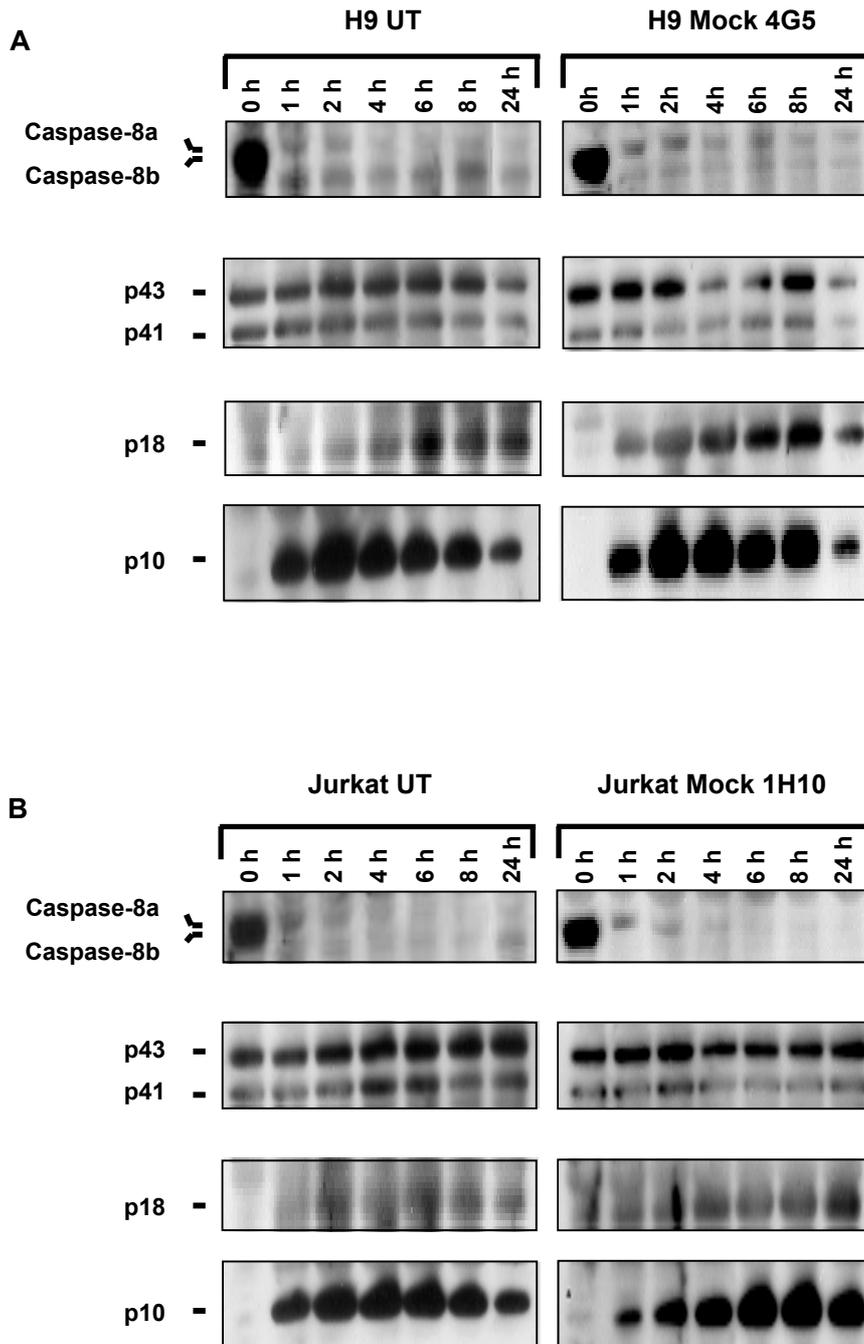


Abbildung 24: Spaltung von Caspase-8 in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den entsprechenden Klonen der Mock-Kontrollen mittels ‚Western Blot‘

A: Caspase-8-Spaltung in untransduzierten H9-Zellen (H9 UT) und dem Klon der Mock-Kontrolle (H9 Mock 4G5)

B: Caspase-8-Spaltung in untransduzierten Jurkat-Zellen (Jurkat UT) und dem Klon der Mock-Kontrolle (Jurkat Mock 1H10)

Je 1×10^6 Zellen wurden für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) inkubiert und nach der Ernte lysiert. Jeweils $20 \mu\text{g}$ des Proteinextrakts wurden unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ mit Anti-Caspase-8-Antikörper analysiert. Die ‚Blots‘ wurden über Nacht mit $1 \mu\text{g/ml}$ des primären Antikörpers bei 4°C und anschließend 30 min mit 40 mU/ml des Sekundärintikörpers Anti-Maus IgG-POD inkubiert. Für den Proteinnachweis wurde das ‚Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)‘ verwendet.

3.5.3.2 Beeinflussung der Spaltung von Caspase-8 durch rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins

In den ‚Western Blot‘-Versuchen wurden nur Klone mit starker Überexpression des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins untersucht. Um klonale Effekte ausschließen zu können, wurden je Zelllinie zwei Klone, in denen eine starke Expression des c-FLIP_L-Proteins nachgewiesen werden konnte (H9xc-FLIP_L 2C9 und H9xc-FLIP_L 3D6 bzw. Jurkatxc-FLIP_L 1G2 und Jurkatxc-FLIP_L 1B1), verwendet (s. 3.4.3.3). Alle Klone wurden unter gleichen Bedingungen mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) versetzt und nach den gleichen Zeitintervallen geerntet wie die entsprechenden untransduzierten Zellen und die Mock-Kontrollen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen 1 µg/ml Protein-G-Lösung zugesetzt wurde. In den so behandelten Zellen war keine Spaltung von Caspase-8 nachweisbar (‚Western Blots‘ nicht gezeigt). Abbildung 25 zeigt einen repräsentativen ‚Western Blot‘-Versuch.

In allen untersuchten Klonen, die rekombinantes c-FLIP_L-Protein überexprimieren, wird die Spaltung von Caspase-8 blockiert. Demzufolge waren die ungespaltenen Caspase-8-Isoproteine zu allen untersuchten Zeitpunkten in Form einer 53,7/55,4-kD-Bande nachweisbar. Die nach autoproteolytischer Aktivierung der Caspasen auftretenden aktiven Untereinheiten konnten in Form der p10-Untereinheit erst nach einer 8- bis 24-stündigen Inkubation mit dem agonistischen Antikörper nachgewiesen werden.

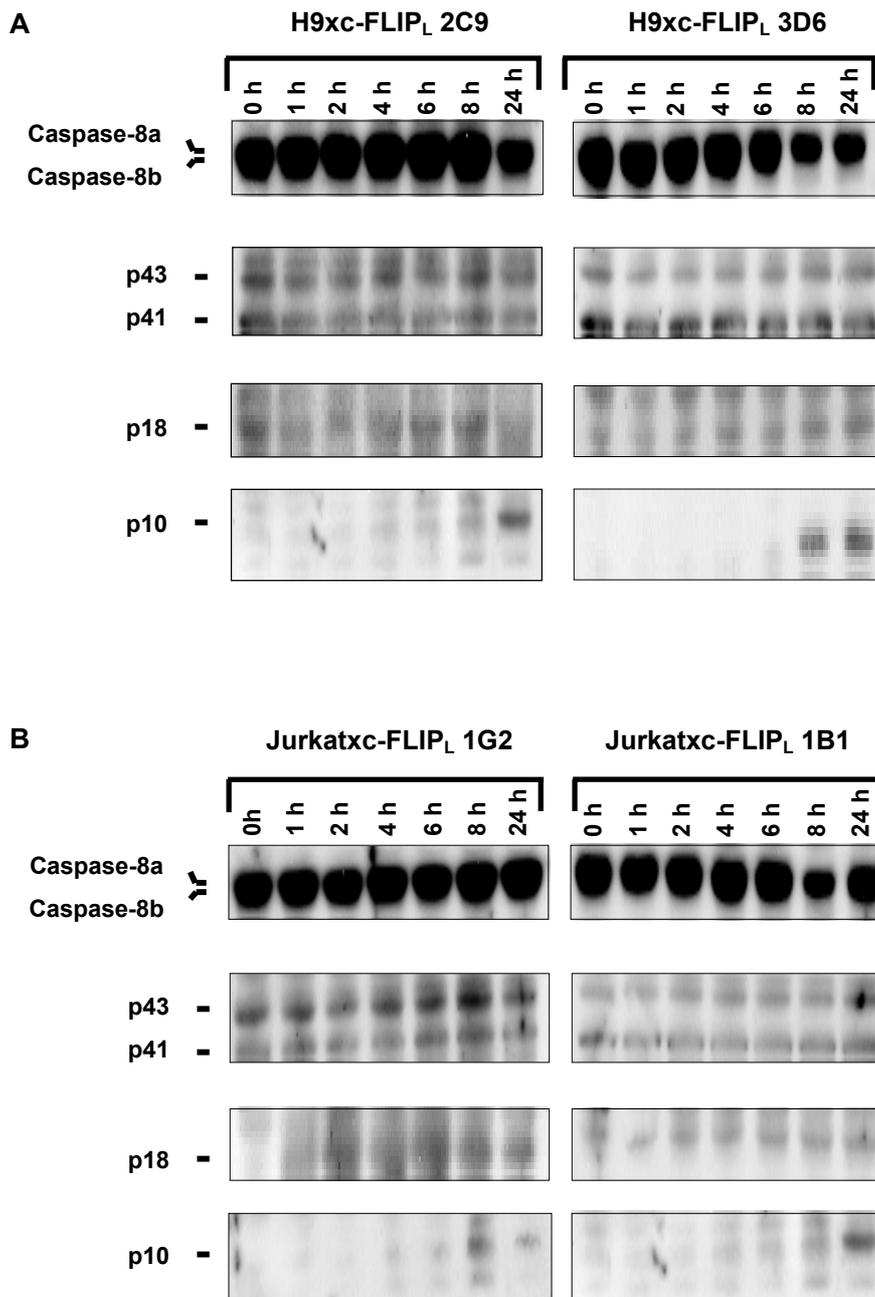


Abbildung 25: **Blockierung der Spaltung von Caspase-8 in transduzierten H9- und Jurkat-Zellen mit starker Expression des c-FLIP_L-Proteins mittels ‚Western Blot‘**

A: Caspase-8-Spaltung in den Transduktanden H9xc-FLIP_L 2C9 und H9xc-FLIP_L 3D6

B: Caspase-8-Spaltung in den Transduktanden Jurkatxc-FLIP_L 1G2 und Jurkatxc-FLIP_L 1B1

Je 1×10^6 Zellen wurden für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3-Subklasse) inkubiert und nach der Ernte lysiert. Jeweils $20 \mu\text{g}$ des Proteinextrakts wurden unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ mit Anti-Caspase-8-Antikörper analysiert. Die ‚Blots‘ wurden über Nacht mit $1 \mu\text{g/ml}$ des primären Antikörpers bei 4°C inkubiert und anschließend 30 min mit 40 mU/ml des Sekundärantikörpers Anti-Maus IgG-POD inkubiert. Für den Proteinnachweis wurde das ‚Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL)‘ verwendet.

3.5.4 Charakterisierung der Apoptosesensitivität von c-FLIP_L-transduzierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die mittels ‚Annexin-V-Test‘ und der Untersuchung der Spaltung von Caspase-8 nachgewiesene anti-apoptotische Wirkung des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins sollte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verifiziert werden. Für die Untersuchungen wurden die mocktransduzierten Klone H9 Mock 4G5 bzw. Jurkat Mock 1H10 ausgewählt, sowie je ein Klon (H9xc-FLIP_L 2C9 bzw. Jurkatxc-FLIP_L 1G2), der eine starke Überexpression des c-FLIP_L-Proteins aufweist (vgl. 3.4.3.3).

Je 1×10^6 Zellen wurden 24 h mit 1 µg/ml kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) inkubiert. Die entsprechenden Negativkontrollen wurden mit 1 µg/ml der zur Kreuzvernetzung verwendeten Protein-G-Lösung behandelt. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet und die Kerne mit 4 µg/ml Hoechst 33342-Farbstoff gefärbt. Für die Anfärbung toter Zellen erfolgte eine anschließende Gegenfärbung mit 2 µg/ml Propidiumiodid. Die Färbungen wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und repräsentative Zellen fotografiert.

Mit diesen Experimenten konnte die bereits festgestellte anti-apoptotische Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins verifiziert werden. In Mikroskopaufnahmen bei einer 25-fachen Vergrößerung (Daten nicht gezeigt) war bei den Negativkontrollen bei allen Zellen lediglich eine Anfärbung der Kerne mit H33342 zu beobachten. Der Anteil toter, PI-positiver Zellen lag bei allen Negativkontrollen unter 1 %. Dahingegen konnte in den Mock-Kontrollen eine sehr starke Anfärbung mit PI (> 95% PI-positive-Zellen) festgestellt werden. Die Anfärbbarkeit der Zellen mit PI beruht auf der Permeabilität der Zellmembran toter Zellen, wodurch ein Eindringen des Farbstoffs möglich ist. Im Gegensatz dazu konnte man bei den Klonen H9xc-FLIP_L 2C9 und Jurkatxc-FLIP_L 1G2 bei den meisten Zellen lediglich die Fluoreszenz des Kern-Farbstoffs H33342 nachweisen. Der Anteil toter, PI-positiver Zellen lag im Durchschnitt bei 10-15 %. In den entsprechenden Negativkontrollen lag der Anteil PI-positiver Zellen unter 1 %. Die Bildaufnahmen bei 100-facher Vergrößerung (Abbildung 26) zeigen einige der charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen (vgl. 1.1.1). In den Mock-Kontrollen (Abbildung 26 A und B) konnte mit dem Kern-Farbstoff H33342 (blaue Fluoreszenz) die Ausbildung der sogenannten „apoptotischen Körperchen“ (*apoptotic bodies*) nachgewiesen werden, die durch Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins entstehen. Ebenso waren blasige Veränderungen der Plasmamembran bei gleichzeitiger Anfärbung mit PI (rote Fluoreszenz) zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte in dem Klon H9xc-FLIP_L 2C9 neben nicht-apoptotischen Zellen lediglich eine beginnende Kondensation der Zellkerne beobachtet werden (Abbildung 26 C). Zellen des Klons Jurkatxc-FLIP_L 1G2 (Abbildung 26 D) wiesen ebenso lediglich eine beginnende Kernkondensation bei schwacher Anfärbbarkeit mit PI auf.

Als Negativkontrollen dienten Zellen, die mit 1 µg/ml Protein-G-Lösung behandelt wurden (Aufnahmen nicht gezeigt).

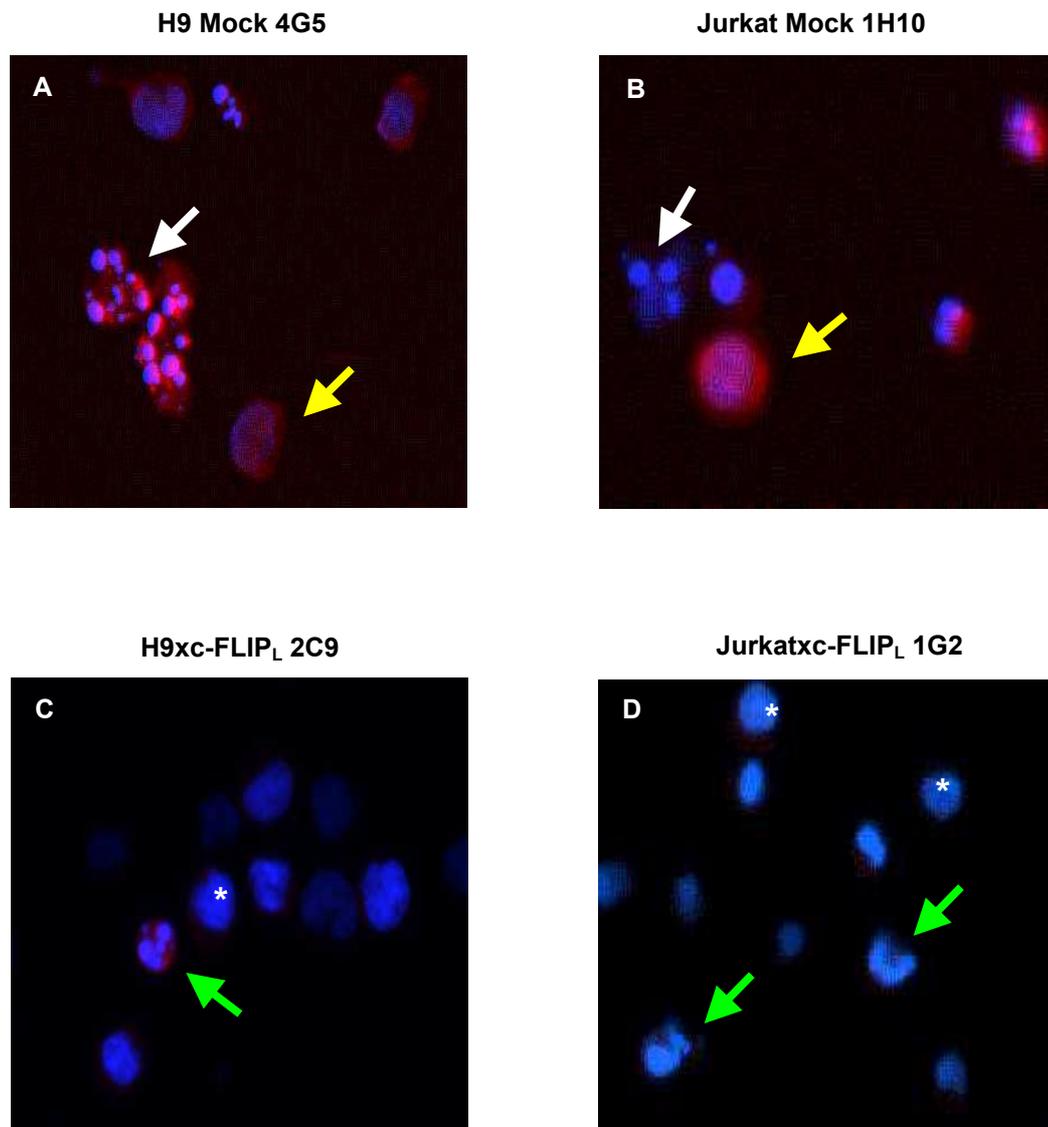


Abbildung 26: **Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Unterschieden in der Zellmorphologie apoptotischer Zellen in den Mock-Kontrollen im Vergleich zu Klonen mit starkem Expressionsgrad des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins**

A: Nachweis apoptotischer Zellen in der Mock-Kontrolle H9 Mock 4G5

B: Nachweis apoptotischer Zellen in der Mock-Kontrolle Jurkat Mock 1H10

C: Mikroskopaufnahme des Klons H9xc-FLIP_L 2C9

D: Mikroskopaufnahme des Klons Jurkatxc-FLIP_L 1G2

Je 1×10^6 Zellen wurden 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) inkubiert und anschließend mit $4 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342-Farbstoff und $2 \mu\text{g/ml}$ PI gefärbt. Die Zellen wurden in ‚Mounting-Medium‘ aufgenommen und ein Aliquot (5×10^5 Zellen) auf einem Objektträger mit Deckgläsern fixiert. Alle Aufnahmen erfolgten bei einer 100-fachen Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop.

blaue Fluoreszenz: Anfärbung mit H33342; **rote Fluoreszenz:** Anfärbung mit PI; **weiße Pfeile:** apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*); **gelbe Pfeile:** Anschwellen der Plasmamembran und Anfärbung mit PI; **grüne Pfeile:** beginnende Kernkondensation; *: lebende, nicht-apoptotische Zellen.

3.5.5 Rekombinanter CD95-Ligand als Apoptosestimulus

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Auslösung der Apoptose durch Bindung des CD95L-Proteins an CD95-Rezeptoren. Zellen exprimieren das CD95L-Protein entweder in membrangebundener Form (mCD95L) oder sezernieren das Protein von der Zelloberfläche (*soluble CD95L*=sCD95L) (vgl. 1.1.3). Das CD95L-Protein bildet Trimere und induziert so die Kreuzvernetzung der CD95-Rezeptormonomere. Um nun die Apoptosesensitivität der transduzierten T-Zellklone unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen, wurde lösliches, rekombinantes CD95L-Protein (im Folgenden mit rCD95L bezeichnet) verwendet. Rekombinante CD95L-Proteine enthalten einen anfusionierten „FLAG-tag“ (s. 2.2.4.1.2). Aufgrund dessen konnte durch Zugabe von ‚Anti-FLAG Antikörper‘ eine Multimerisierung und damit eine Apoptose-auslösende Wirkung des CD95L-Proteins erzielt werden.

3.5.5.1 Untersuchung der Apoptosesensitivität in untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen

Für die Apoptoseinduktion wurden je 1×10^6 Zellen der ausgewählten H9- und Jurkat-Transduktanden sowie untransduzierte H9- und Jurkat-Zellen mit 5 ng/ml-100 ng/ml rCD95L-Protein versetzt und über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert.

Die Abhängigkeit der Apoptoserate von der eingesetzten Konzentration an rCD95L-Protein nach einem Zeitraum von 24 h ist in Abbildung 27 dargestellt. Die Abbildung zeigt den Anteil apoptotischer Zellen in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen sowie den entsprechenden Mock-Kontrollen nach einer 24-stündigen Inkubation in Gegenwart von 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml rCD95L-Protein. Es zeigte sich, dass H9-Klone eine deutlich verminderte Apoptosesensitivität im Vergleich zu den untersuchten Jurkat-Zellen aufweisen. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml des CD95L-Proteins war in untransduzierten H9-Zellen ein Anteil von 14 % apoptotischer Zellen nachweisbar, während in untransduzierten Jurkat-Zellen bei dieser Konzentration die Gesamtfraktion apoptotischer Zellen 82 % ausmachte. Diese Unterschiede waren auch bei einer Konzentration von 10 ng/ml des CD95L-Proteins sehr offensichtlich. Bei einer höheren Dosierung waren ebenfalls deutliche Abweichungen in der Apoptosesensitivität der beiden Zelllinien festzustellen (vgl. Abbildung 28). Die Prozentanteile apoptotischer Zellen in den entsprechenden mocktransduzierten Zellen waren vergleichbar mit denen der untransduzierten Zellen.

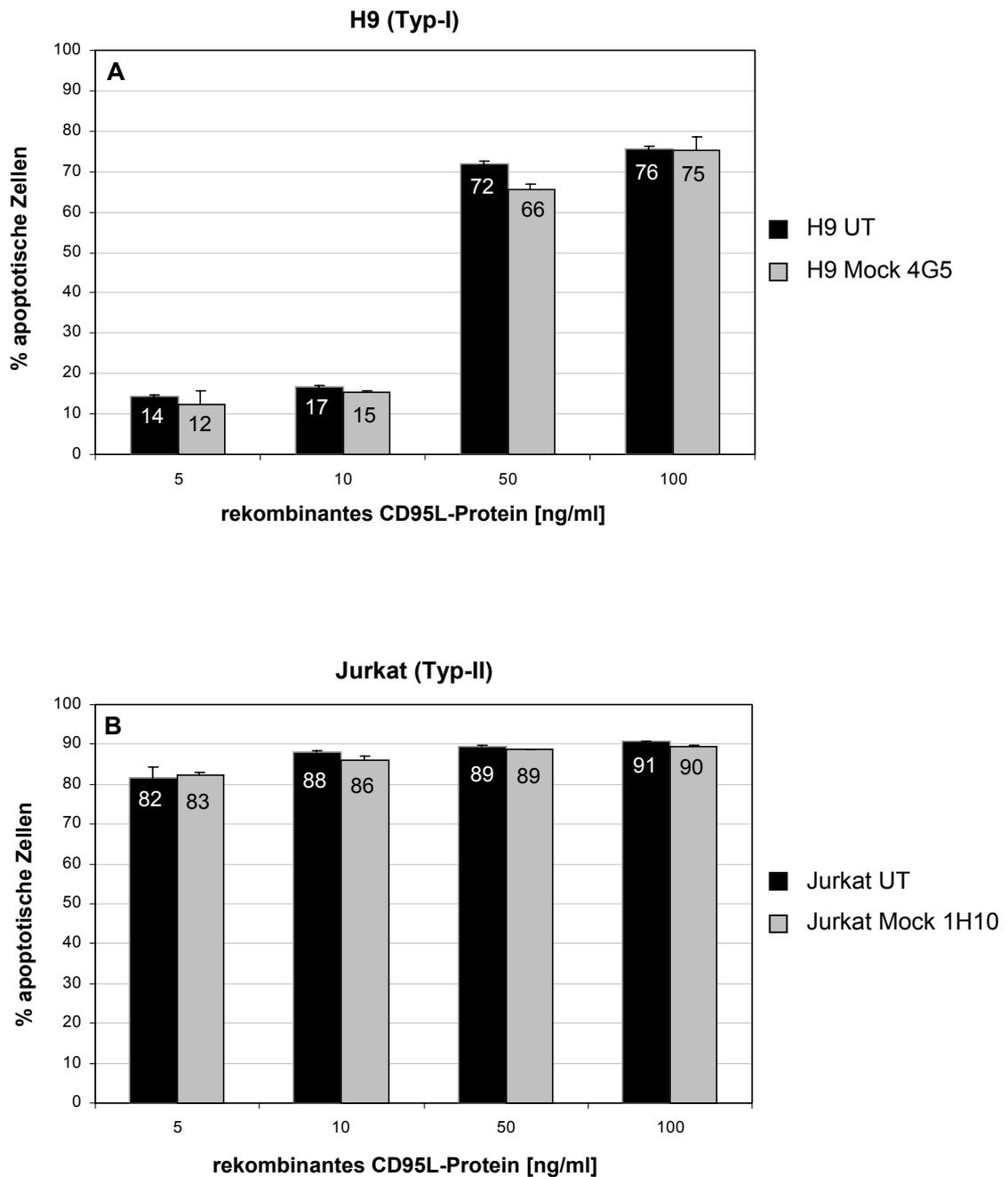


Abbildung 27: **Abhängigkeit der Apoptoserate in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den jeweiligen Mock-Kontrollen von der eingesetzten Konzentration an rekombinantem CD95L-Protein**

Je 1×10^6 untransduzierte H9- und Jurkat-Zellen (H9 UT bzw. Jurkat UT) und die entsprechenden Mock-Kontrollklone wurden 24 h in Gegenwart von 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml rekombinantem, löslichen rCD95L-Protein inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen die eingesetzte Konzentration an rCD95L-Protein (in ng/ml) aufgetragen.

Um den Apoptoseverlauf zu verfolgen, wurden die Zellen nach Zugabe des rCD95L-Proteins in einer Konzentration von 5 ng/ml-100 ng/ml nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h geerntet und die Anzahl apoptotischer Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in Gegenwart von 1 µg/ml Anti-FLAG-Antikörper inkubiert wurden. Für die Auswertung wurden die Diagramme wie unter 3.5.2.1 erläutert in die vier Quadranten UL, UR, OL und OR unterteilt. Der Prozentanteil apoptotischer Zellen wurde nach der unter 2.2.5 angegebenen Formel berechnet. Abbildung 28 und zeigt je eine repräsentative Messung in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen, die mit 100 ng/ml rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 24 h inkubiert wurden. Der Apoptoseverlauf der Mock-Kontrollklone entsprach dem der untransduzierten Zellen und ist daher hier nicht gesondert angeführt.

Die Apoptoseinduktion mit rCD95L-Protein zeigte in beiden untersuchten Zelllinien deutliche Unterschiede im Vergleich zu der Apoptoseauslösung mit agonistischem Antikörper (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19). Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit mit 100 ng/ml rCD95L-Protein wiesen 84,6 % der Jurkat-Zellen eine Anfärbung mit Annexin-V und PI (Quadrant OR) auf. Die Fraktion der Annexin-V-positiven Zellen machte 4 % aus (Quadrant OL). In der T-Zelllinie H9 hingegen zeigten nur 8,8 % der Zellen eine Anfärbung mit Annexin-V und PI (Quadrant OL). Nach 4 h betrug der Anteil Annexin-V-positiver Zellen durchschnittlich 45,8 % (Quadrant OL). Diese beobachteten Unterschiede wurden nach einem Inkubationszeitraum von 8 h und 24 h noch offensichtlicher. Nach 24 h enthielten Kulturen der Zelllinie Jurkat 85,5 % (Quadrant OR) Annexin-V- und PI-positive Zellen. Mit PI wurden 4,7 % der Zellen markiert (Quadrant UR). Zu diesem Zeitpunkt konnte nur noch ein Anteil von 0,5 % Annexin-V-positiver Zellen (Quadrant OL) nachgewiesen werden. In der Zelllinie H9 dagegen wurden nach 24 h noch 17,9 % der Zellen mit Annexin-V angefärbt (Quadrant OL). 55,2 % der Zellen zeigten eine Markierung mit Annexin-V und PI (Quadrant OR).

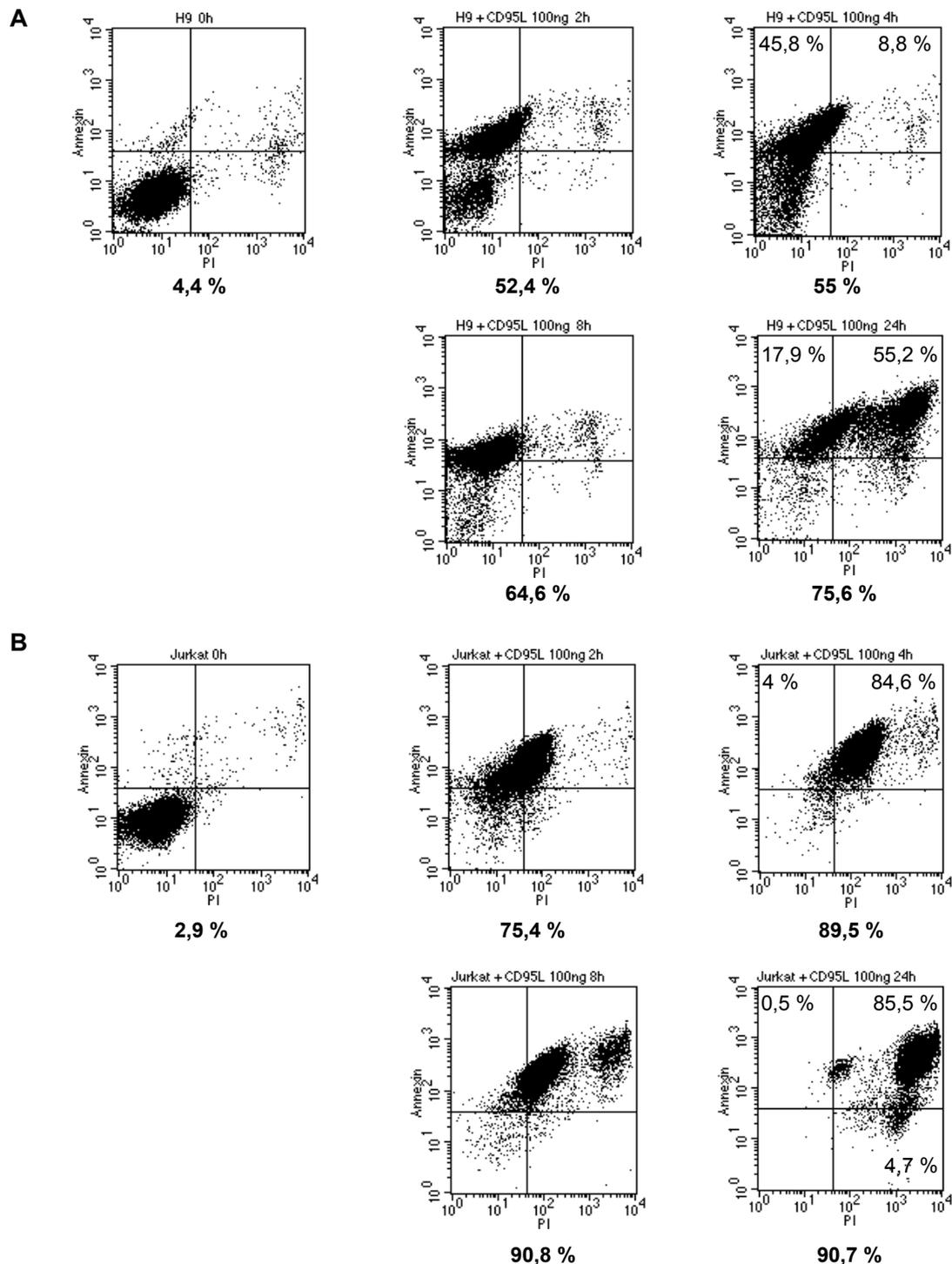


Abbildung 28: **Vergleich der Apoptosesensitivität untransduzierter H9- und Jurkat-Zellen nach 24-stündiger Stimulierung mit 100 ng/ml rCD95L-Protein mittels Annexin-V-Färbung und Analyse im Durchflusszytometer**

A: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in untransduzierten H9-Zellen

B: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in untransduzierten Jurkat-Zellen

Je 1×10^6 Zellen wurden mit 100 ng/ml rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Proben-gewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Anschließend wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur. Die Prozentangaben in den Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einzelner, im Text erläuteter Verteilungen Annexin-V- und PI-positiver Zellfraktionen aufgeführt.

Der zeitliche Ablauf der Apoptose in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen (H9 UT und Jurkat UT) sowie den entsprechenden Mock-Kontrollen ist in Abbildung 29 grafisch dargestellt.

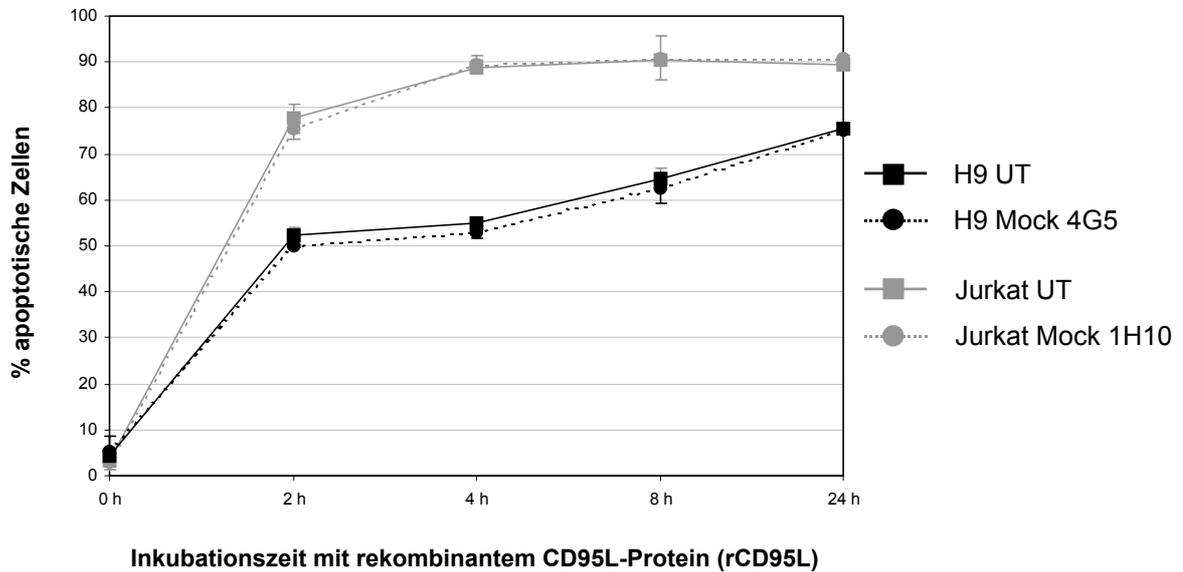


Abbildung 29: **Grafische Darstellung des Apoptoseverlaufs in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den jeweiligen Mock-Kontrollen nach Stimulierung mit rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-24 h**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit 100 ng/ml rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den Zeitpunkt der Zellernte (in h) aufgetragen.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Apoptoseverlaufs und der Apoptosesensitivität der T-Zelllinien H9 und Jurkat mit rCD95L-Protein stehen somit im Kontrast zu den Versuchsergebnissen, bei denen ein agonistischer Anti-CD95-Antikörper als Apoptosestimulus eingesetzt wurde (s. 3.5.2). Daher wurde vermutet, dass die Verwendung eines agonistischen Antikörpers für die Apoptoseinduktion nicht die physiologische Situation widerspiegelt.

3.5.5.2 Beeinflussung der Apoptosesensitivität durch rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins

Für die Bestimmung der Apoptosesensitivität in Klonen, die sich bezüglich ihrer Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins unterscheiden, wurden die Zellen mit 5 ng/ml-100 ng/ml rCD95L-Protein inkubiert. Die Zellernte erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen 1 µg/ml Anti-FLAG Antikörper zugesetzt wurde.

Für die Auswertung wurde die gleiche Quadranteneinteilung vorgenommen, wie bei den entsprechenden untransduzierten Zellen bzw. den Mock-Kontrollen.

Es zeigte sich, dass auch bei Verwendung von rCD95L-Protein alle untersuchten Klone der T-Zelllinien H9 und Jurkat eine deutlich geringere Apoptoseinduktionsrate aufwiesen im Vergleich zu untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen. In Abbildung 30 ist je eine repräsentative Messung des Verlaufs der Apoptose nach Zugabe von 100 ng/ml rCD95L in dem Klon H9xc-FLIP_L 2C9, der eine 11-fache Überexpression des c-FLIP_L-Proteins zeigt, und dem Klon Jurkatxc-FLIP_L 1G2, der eine 9-fache Überexpression des c-FLIP_L-Proteins aufweist (vgl. Tabelle 6), dargestellt.

Im Vergleich zu den untransduzierten Zellen (s. Abbildung 28) zeigten die Klone mit einer starken Expression des c-FLIP_L-Proteins eine deutlich verringerte Apoptosesensitivität. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit betrug der Gesamtanteil apoptotischer Zellen in dem Klon H9xc-FLIP_L 2C9 durchschnittlich 16,9 %. Mit Annexin-V (Quadrant OL) färbten sich 3,7 % der Zellen an. Die Fraktion der Annexin-V- und PI-positiven Zellen betrug 10 % (Quadrant OR). In dem Klon Jurkatxc-FLIP_L 1G2 lag der Anteil apoptotischer Zellen zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt bei 57,6 %. Der Teil der Zellen, der eine Anfärbung mit Annexin-V aufwies betrug 12,8 % (Quadrant OL). Die Fraktion der Annexin-V- und PI-positiven Zellen machte 41,7 % (Quadrant OR) aus.

Die Ergebnisse mit rCD95L als Apoptosestimulans bestätigen somit, dass die Klone der H9- und Jurkat-Zellen, die das c-FLIP_L-Protein exprimieren, eine stark verringerte Apoptosesensitivität aufweisen, die in einem verlangsamten Apoptoseverlauf im Vergleich zu den entsprechenden untransduzierten Zellen und dem Mock-Kontrollen resultiert. Auch nach 24-stündiger Inkubation mit rCD95L-Protein lag der Gesamtanteil apoptotischer Zellen deutlich unter dem der untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen.

In Abbildung 31 wurde der zeitliche Verlauf der Apoptose in den untersuchten Klonen über einen Zeitraum von 24 h dargestellt.

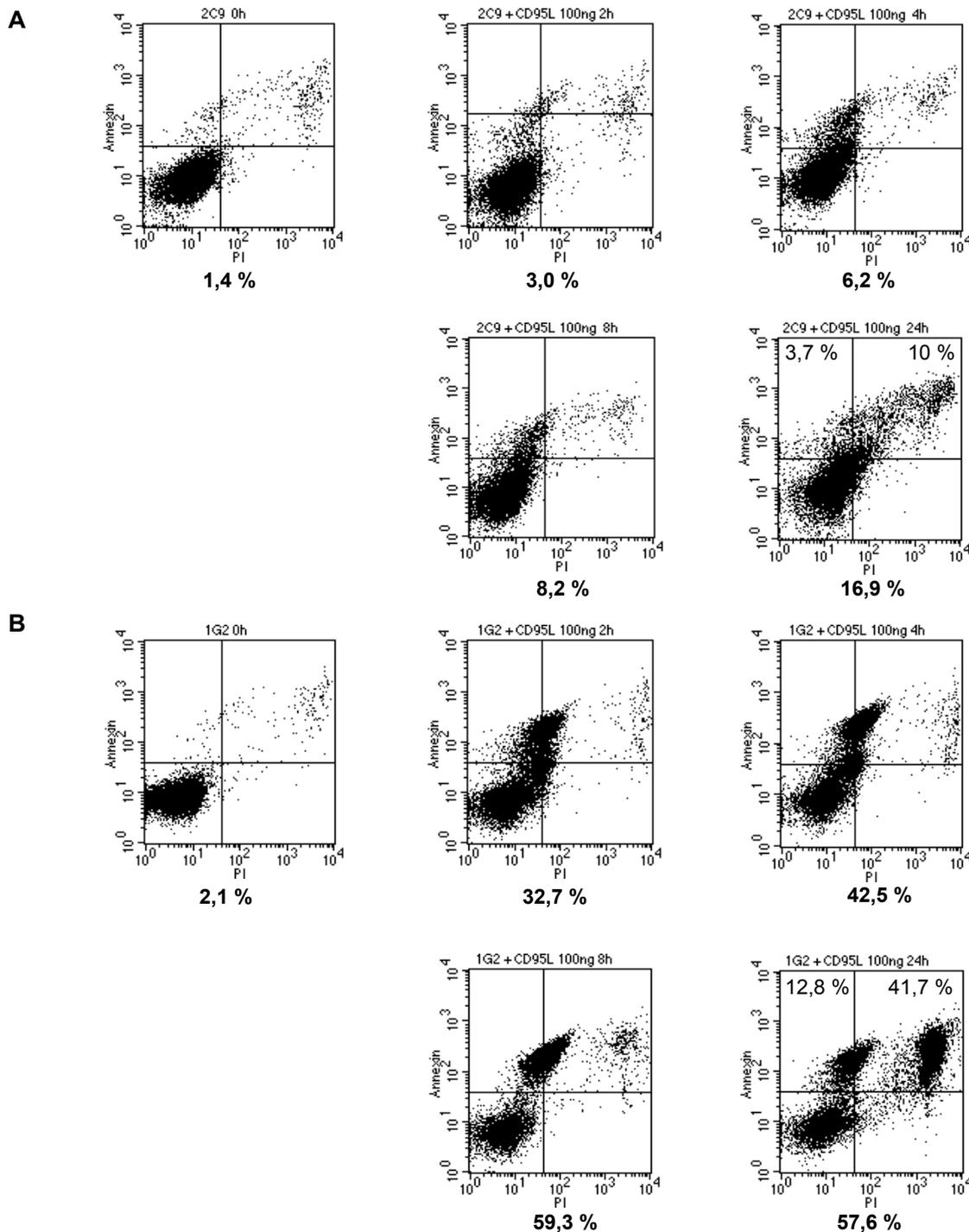


Abbildung 30: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptose in den Transduktanden H9xc-FLIP_L 2C9 und Jurkatxc-FLIP_L 1G2 nach Stimulierung mit rCD95L-Protein mittels Annexin-V-Färbung**

A: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in dem Klon H9xc-FLIP_L 2C9

B: Durchflusszytometrische Auswertung des Apoptoseverlaufs in dem Klon Jurkatxc-FLIP_L 1G2

Je 1×10^6 Zellen wurden mit 100 ng/ml rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur. Die Prozentangaben in den Abbildungen wurden zur Verdeutlichung einzelner, im Text erläuteter Verteilungen Annexin-V- und PI-positiver Zellfraktionen aufgeführt.

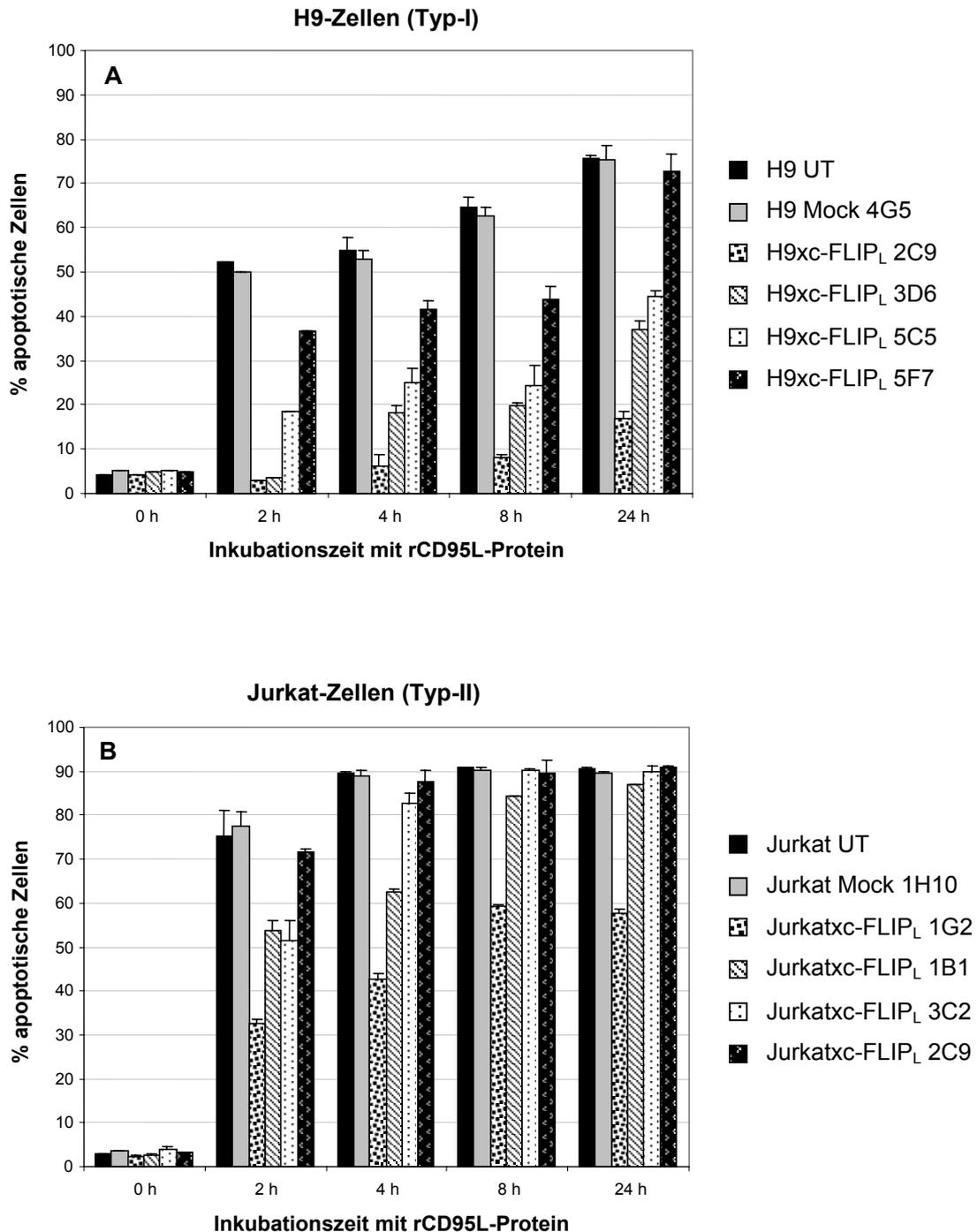


Abbildung 31: **Grafische Darstellung der Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Expressionsstärken des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins im Vergleich zu untransduzierten Zellen und dem Klon der Mock-Kontrolle nach Stimulierung mit rCD95L-Protein**

A: Apoptoseverlauf und -sensitivität in H9-Zellen

B: Apoptoseverlauf und -sensitivität in Jurkat-Zellen

Je 1×10^6 Zellen wurden mit 100 ng/ml löslichem rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-24 h inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und nach 24 h. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit dem 'Annexin-V-FLUOS Staining Kit' gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den Zeitpunkt der Zellernte (in h) aufgetragen.

Wie bereits mit der Verwendung des agonistischen Antikörpers gezeigt, korreliert auch bei der Stimulierung der Apoptose mit rCD95L-Protein die beobachtete Apoptosesensitivität der Klone mit deren relativen Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins (s. Abbildung 32). Hierbei zeigten die ausgewählten Klone der Zelllinie H9, die insgesamt einen stärkeren relativen Expressionsgrad des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins aufweisen (Faktor 5,3 bis 11,3; s. Tabelle 6) dementsprechend eine stärkere Apoptoseresistenz im Vergleich zu den untersuchten Jurkat-Klonen, deren relative c-FLIP_L-Expressionsstärke bei einem Faktor von 1,6 bis 9,8 liegt. Die Korrelationskoeffizienten (R), die das Ausmaß der linearen Abhängigkeit der spezifischen Apoptoserate von der Expressionsstärke des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins quantifizieren, wurden nach der unter 2.2.5 angegebenen Formel berechnet und liegen bei R=0,925 (H9-Klone) und R=0,743 (Jurkat-Klone).

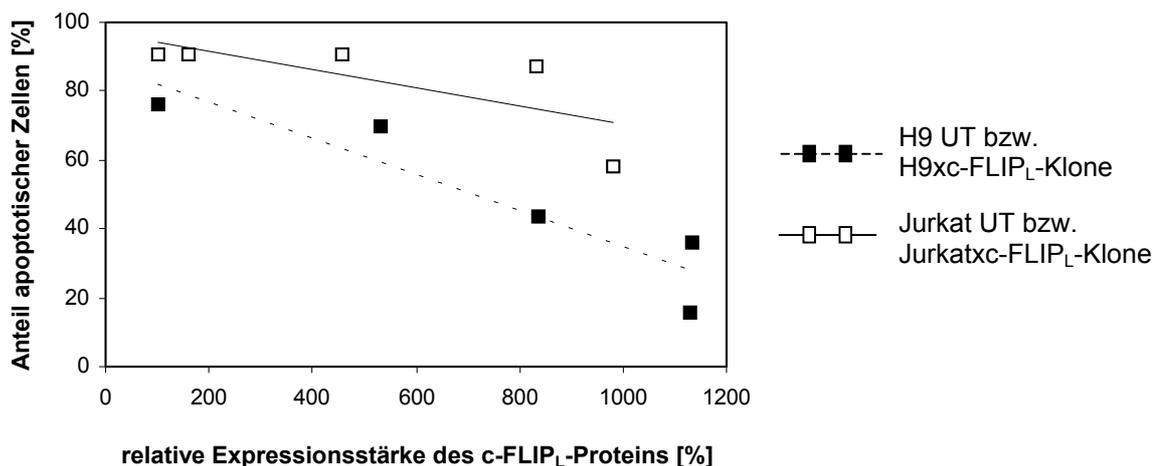


Abbildung 32: **Korrelation der Apoptosesensitivität mit der Stärke der Überexpression des c-FLIP_L-Proteins in H9- und Jurkat-Zellen**

Je 1×10^6 Zellen wurden mit 100 ng/ml rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurde die Apoptosesensitivität der Zellen mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ durchflusszytometrisch quantifiziert (vgl. Abbildung 31). Die Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins wurde mittels Chemilumineszenzintensitätsmessung mit dem Lumilmager quantifiziert (s. 3.4.3.3). Im oben gezeigten Diagramm ist der Anteil apoptotischer Zellen (in %) gegen den relativen Überexpressionsgrad des c-FLIP_L-Proteins (in %) in den 4 ausgewählten transduzierten H9- bzw. Jurkat-Klonen und den jeweiligen untransduzierten Zellen (Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins in untransduzierten Zellen = 100 %, s. Abbildung 16) aufgetragen.

3.6 Relevanz der Expression von CD95-Ligand in Kolonkarzinomzelllinien

3.6.1 Untersuchung der CD95L-mRNS-Expression in Kolonkarzinomzelllinien

Verschiedene Kolonkarzinomzelllinien wurden hinsichtlich der Expression von CD95L-mRNS untersucht. Aus je 1×10^6 Zellen aller Zelllinien wurde Gesamt-RNS extrahiert und je $1 \mu\text{g}$ in eine ‚Reverse Transkription‘ eingesetzt. Als Kontrolle für die Abwesenheit von DNS-Verunreinigungen in den RNS-Präparationen wurde je ein Ansatz ohne Zugabe der ‚Reversen Transkriptase‘ mitgeführt. Zusätzlich wurden alle verwendeten Primerpaare so ausgewählt, dass sie eine Exon-Intron-Grenze überspannen. Somit konnte sichergestellt werden, dass die erhaltenen PCR-Produkte der erwarteten Größe Amplifikate der hergestellten cDNS darstellen und nicht von der Amplifikation genomischer DNS-Verunreinigungen herrühren. Für die anschließende PCR-Reaktion wurden die CD95L-spezifischen Oligonukleotide CD95L f und CD95L r (s. 2.1.7) verwendet, die ein 344-bp-Amplifikat erzeugen. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94°C (1 min), einem Anlagerungsschritt bei 50°C (1 min) und einer Elongationsphase bei 72°C (1 min). Die Abschluss-Extension erfolgte bei 72°C (7 min). Neben der mRNS-Expression des CD95L-Gens wurde auch die Expression des TRAIL-Transkripts (s. 1.1.3) mit den Primerpaaren TRAIL f und TRAIL r untersucht. Die TRAIL-PCR wurde unter sonst gleichen Bedingungen bei einer Anlagerungstemperatur von 60°C durchgeführt. Resultierende Amplifikate hatten eine Größe von 717 bp. Des Weiteren wurde die Expression des CD95-Rezeptorgens (Primerpaare CD95 f und CD95 r) analysiert. Die Amplifikation erfolgte bei einer Anlagerungstemperatur von 65°C und erzeugte Amplifikate mit einer Größe von 682 bp. Für die Positivkontrolle wurde die cDNS aller Zelllinien in eine PCR mit den Oligonukleotiden β -Aktin f und β -Aktin r bei einer Anlagerungstemperatur von 50°C amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wiesen eine Größe von 237 bp auf. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne Zugabe von cDNS. Als Positivkontrolle für die Untersuchung der CD95L-mRNS-Expression wurden je 1×10^6 Zellen der T-Zelllinien H9 und Jurkat für 3 Tage mit $10 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PMA und $1 \mu\text{M}$ Ionomycin behandelt. Diese Stimulanzen induzieren eine Aktivierung der Zellen (Weiss *et al.*, 1986), die im Zuge dessen die Expression des CD95L-Proteins induzieren.

Die Ergebnisse der ‚RT-PCR‘-Versuche sind in Abbildung 33 dargestellt. CD95L-Transkripte konnten in den Kolonkarzinomzelllinien SW480, SW620, HCT15, HT29 und Colo205 nachgewiesen werden. SW480-, SW620- und Colo205-Zellen ergaben ein starkes Signal bei der Amplifikation der CD95L-cDNS, während in HCT15- und HT29-Zellen geringere mRNS-Spiegel nachgewiesen wurden. In KM12-Zellen wurde ein sehr schwaches CD95L-spezifisches Amplifikat nachgewiesen. HCT116-Zellen wiesen dagegen keine CD95L-mRNS auf. In aktivierten H9- und Jurkat-Zellen (Positivkontrolle) war im Vergleich zu unstimulierten Zellen ein sehr starkes Signal bei der Amplifikation mit den CD95L-spezifischen Primern festzustellen (Abbildung 33 A). In allen untersuchten Zelllinien war das TRAIL-Transkript und das CD95-Transkript nachweisbar

(Abbildung 33 B und C). Mit den β -Aktin-Primern (Positivkontrolle) konnte die cDNS von allen Zelllinien amplifiziert werden (Abbildung 33 D).

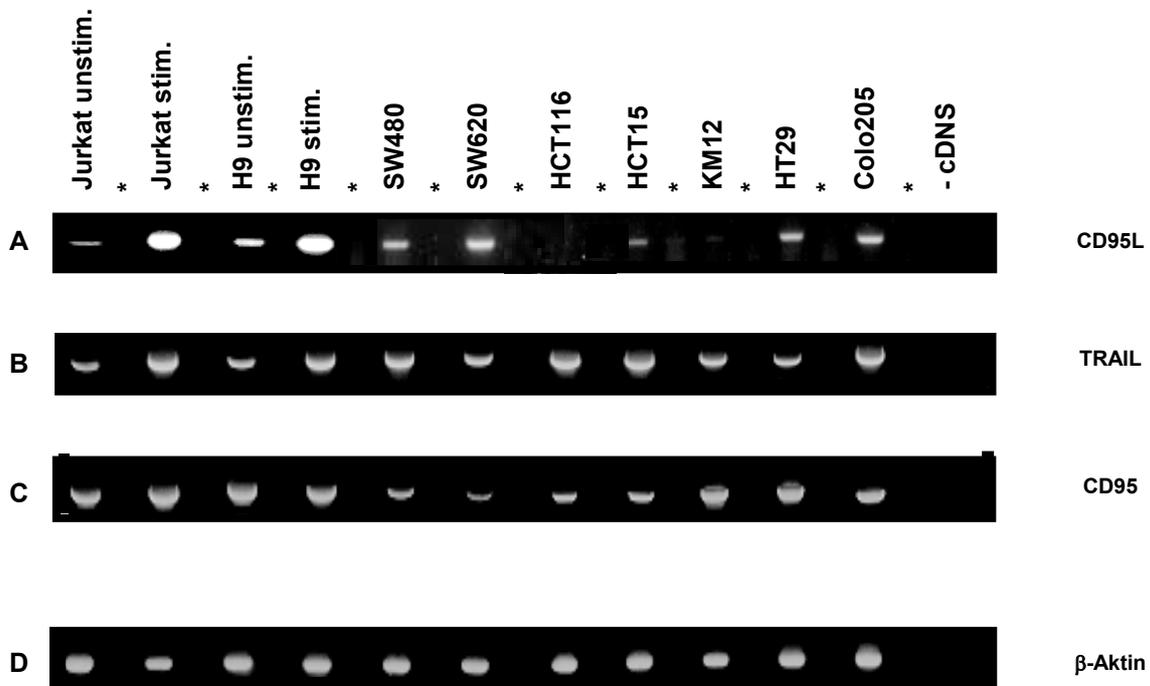


Abbildung 33: **Nachweis des CD95L-, TRAIL- und CD95-Transkripts in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien mittels ‚RT-PCR‘**

A: Expressionsmuster des CD95L-Transkripts (344 bp)

B: Expressionsmuster des TRAIL-Transkripts (717 bp)

C: Expressionsmuster des CD95-Transkripts (682 bp)

D: Expressionsmuster des β -Aktin-Transkripts (237 bp)

Jeweils 1 μ g Gesamt-RNS wurde in eine ‚RT-PCR‘ mit den Primerpaaren CD95L f/CD95L r, TRAIL f/TRAIL r, CD95 f/CD95 r und β -Aktin f/ β -Aktin r eingesetzt. Die PCR-Ansätze (Gesamtvolumen je 50 μ l) wurden auf einem 1,5 %-igen (für die gelelektrophoretische Auftrennung der CD95- und TRAIL-cDNS-Amplifikate) bzw. 2 %-igen (für die Auftrennung der CD95L- und β -Aktin-cDNS-Amplifikate) Agarosegel analysiert.

unstim.: unstimuliert; **stim.:** Positivkontrolle für CD95L-Expression. Die Stimulierung der Zellen erfolgte durch eine 3-tägige Zugabe von 10 μ g/ml Concanavalin A und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin; **- cDNS:** Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne Zugabe von cDNS); * : markiert die PCR-Resultate der ‚Reversen Transkriptions‘-Ansätze, denen keine ‚Reverse Transkriptase‘ zugefügt wurde (Kontrolle für genomische DNS-Verunreinigungen der RNS-Präparationen).

Die bei der Auftrennung des ‚Reversen Transkriptions‘-Ansatzes mit der cDNS der Zelllinie HCT115 ohne Zusatz von ‚Reverser Transkriptase‘ auftretende schwache Bande resultiert vermutlich aus einer schwachen Verunreinigung der RNS-Präparation dieser Zelllinie mit genomischer DNS. In weiteren, hier nicht gezeigten ‚RT-PCR‘-Analysen mit cDNS-Präparationen dieser Zelllinie konnte jedoch sichergestellt werden, dass die Bande, die bei der hier dargestellten PCR-Amplifikation der HCT115-cDNS mit Zusatz von ‚Reverser Transkriptase‘ zu sehen ist, nicht von DNS-Verunreinigungen herrührt.

3.6.2 Untersuchung der CD95L-Proteinexpression in Kolonkarzinomzelllinien

Von je 1×10^7 Zellen subkonfluenten Kulturen der Kolonkarzinomzelllinien wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt. 100 μg Gesamtprotein jeder Probe wurde anschließend unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ mit Anti-CD95L-Antikörper (G247-4) nachgewiesen (Abbildung 34 A). Proteinextrakte von 1×10^6 Jurkat-Zellen, die über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PMA und 1 μM Ionomycin stimuliert worden waren, dienten als Positivkontrollen. Als Nachweis für die Verwendung gleicher Gesamtproteinmengen (Ladekontrolle) wurde ein ‚Western Blot‘ mit Anti-ERK2-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 34 B).

Das CD95L-Protein mit einer Größe von 40 kD konnte in allen untersuchten Kolonkarzinomzelllinien in unterschiedlicher Expressionsstärke, sowie in aktivierten Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. Die stärkste Expression des Proteins zeigten die Zelllinien SW620 und Colo205. SW480-, HCT 116-, HCT115- und HT29-Zellen wiesen eine moderate Expression des Proteins auf. In KM-12-Zellen und unstimulierten Jurkat-Zellen war das Protein dagegen nur sehr schwach nachweisbar.

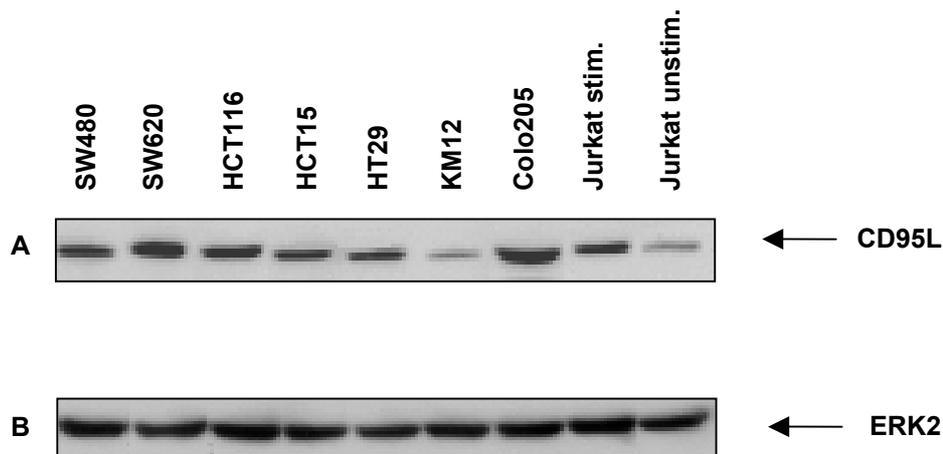


Abbildung 34: **Nachweis des CD95L-Proteins in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien mittels ‚Western Blot‘**

A: Expressionsverteilung des CD95L-Proteins (40 kD)

B: Expressionsverteilung des 42-kD-ERK2-Proteins (Ladekontrolle)

Jeweils 100 μg Gesamtproteinextrakt wurde gelelektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis des CD95L-Proteins erfolgte durch Über-Nacht-Inkubation des Blots mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-CD95L-Antikörper (Klon G247-4) bei 4°C. Zum Nachweis für die Verwendung gleicher Gesamtproteinmengen wurde ein ‚Western Blot‘ mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-ERK2-Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Detektionsantikörper wurde der AP-gekoppelte Anti-Maus Ig-Antikörper des ‚Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit‘ eingesetzt. Als Detektionsreagenz wurde die CDP*-Lösung des ‚Kits‘ verwendet.

stim.: Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Concanavalin A und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PMA und 1 μM Ionomycin stimuliert; **unstim.:** unstimuliert

Die Spezifität der ‚Western Blot‘-Ergebnisse konnte in Immunpräzipitationsversuchen bestätigt werden (Abbildung 35). Für die Immunpräzipitationen wurden je 500 µg Gesamtproteinextrakt mit 1 µg Anti-CD95L-Antikörper (Klon NOK-1) bzw. 1 µg Anti-ERK2-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) präzipitiert und anschließend mittels Protein-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘-Analyse untersucht. Der Proteinnachweis erfolgte mit Anti-CD95L-Antikörper (Klon G247-4).



Abbildung 35: **Verifizierung der CD95L-Proteinexpression in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien mittels Immunpräzipitation und anschließendem ‚Western Blot‘**

Jeweils 500 µg Gesamtproteinextrakt wurde mit 1 µg Anti-CD95L-Antikörper (Klon NOK-1) bzw. 1 µg Anti-ERK2-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) präzipitiert und anschließend unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auf 4-12 % Gradienten-NuPAGE-Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und mittels ‚Western Blot‘ auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis des CD95L-Proteins erfolgte durch Über-Nacht-Inkubation des Blots mit 1 µg/ml Anti-CD95L-Antikörper (Klon G247-4) bei 4°C. Als Detektionsantikörper wurde der AP-gekoppelte Anti-Maus Ig-Antikörper des ‚Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit‘ verwendet. Als Detektionsreagenz wurde die CDP*-Lösung des ‚Kits‘ eingesetzt.

Neben den Immunpräzipitationen mit dem spezifischen Anti-CD95L-Antikörper (NOK-1) sind die Immunpräzipitationen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper (Anti-ERK2) durchgeführt wurden aufgetragen.

stim.: Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 10 µg/ml Concanavalin A und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 10 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin stimuliert; **unstim.:** unstimuliert

3.6.3 Kokultivierung der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 mit den T-Zelllinien H9 und Jurkat

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Kolonkarzinomzellen funktionelles CD95L-Protein exprimieren und somit in der Lage sind, über den CD95-Rezeptor in T-Zellen Apoptose auszulösen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die Kolonkarzinomzelllinien SW480 (Primärtumorlinie) und SW620 (Metastase der Primärtumorlinie SW480) ausgewählt. In beiden Zelllinien konnten die Expression des CD95L-Proteins nachgewiesen werden (s. 3.6.2). Um die Funktionalität des Proteins zu überprüfen, wurden Koinkubationen der Kolonkarzinomzelllinien mit H9- und Jurkat-Zellen durchgeführt und die Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien nachfolgend analysiert.

3.6.3.1 Nachweis der Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien bei Kokultivierung mit den Kolonkarzinomzelllinien mittels ‚Annexin-V-Test‘

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die Apoptoseinduktion in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen bei Einsatz eines 10-fachen Überschusses der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 über einen Zeitraum von 0 h-56 h mittels ‚Annexin-V-Test‘ durchflusszytometrisch analysiert. Um Tumor- und T-Zellen voneinander unterscheiden zu können, wurden die Tumorzellen vor dem Ansetzen der Kokultivierungsexperimente mit dem aliphatischen Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 markiert (s. 2.2.3.9). Dieser Farbstoff lagert sich in die Lipidmembran der Zellen ein und erlaubte so im Durchflusszytometer eine Abgrenzung der Tumorzellen von den unmarkierten T-Zellen. Anschließend wurde die spezifische Anfärbung der T-Zelllinien mit Annexin-V und PI untersucht. Pro Kokultivierungsansatz wurden 1×10^6 Tumorzellen mit 1×10^5 H9- bzw. Jurkat-Zellen vermischt. Um den Anteil spontan in der Probe auftretender Apoptose (A_S) zu bestimmen (Negativkontrolle), wurden H9- und Jurkat-Zellen ohne Zusatz von Kolonkarzinomzellen inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen in den T-Zelllinien nach Koinkubation mit den Kolonkarzinomzelllinien (A_E) wurde wie unter 3.5.2.1 beschrieben mittels Einteilung der Diagramme in vier Quadranten analysiert. Der relative Anteil apoptotischer Zellen berechnete sich mit der unter 2.2.5 angegebenen Formel. Hierbei erwies sich ein Inkubationszeitraum von 36 h als geeignet, da sich zu diesem Zeitpunkt alle apoptotischen Zellen mit Annexin-V- und PI anfärben ließen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Ergebnisse der Kinetikbestimmungen des Apoptoseverlaufs wurden alle weiteren durchgeführten Kokultivierungen nach einem Inkubationszeitraum von 36 h geerntet und analysiert.

In weiterführenden Experimenten wurde die Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien bei verschiedenen Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen (0,5:1 bis 40:1) untersucht. Hierbei wurde die Zahl der eingesetzten Effektorzellen (Kolonkarzinomzelllinien) konstant gehalten und die Menge der Zielzellen (T-Zelllinien) entsprechend variiert. Für die Quantifizierung der Apoptose wurden die Zellen nach 36 h mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (s. 2.2.4.2.1). Jeder Koinkubationsversuch wurde

mindestens dreimal mit einer jeweiligen Dreifachbestimmung jeder Probe durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Apoptosesensitivität der T-Zellen diente jeweils ein Ansatz, bei dem die Zellen mit Anti-CD95-Antikörper inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Für die Bestimmung der spontan in einer Probe auftretenden Apoptose (A_S) (Negativkontrolle) wurden H9- und Jurkat-Zellen ohne Zusatz von Kolonkarzinomzellen inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen in den T-Zelllinien nach Koinkubation mit den Kolonkarzinomzelllinien (A_E) wurde wie unter 2.2.5 beschrieben mittels Einteilung der Diagramme in vier Quadranten bestimmt. Abbildung 36 zeigt einen Vergleich der spezifischen Apoptoseinduktion in Jurkat- und H9-Zellen in Gegenwart eines 0,5- bis 40-fachen Überschusses an SW480- und SW620-Zellen.

Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Apoptoserate von untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen und den entsprechenden Klonen der Mock-Kontrolle von dem eingesetzten Überschuss an SW480- bzw. SW620-Kolonkarzinomzellen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass untransduzierte H9-Zellen (H9 UT) und der Klon der Mock-Kontrolle im Vergleich zu untransduzierten Jurkat-Zellen (Jurkat UT) und dem entsprechenden Mock-Kontroll-Klon eine verringerte Sensitivität gegenüber der Apoptoseinduktion durch SW480- und SW620-Zellen zeigen. Bei einem 40-fachen Überschuss an SW480-Zellen war in untransduzierten Jurkat-Zellen eine Fraktion von 51 % apoptotischer Zellen (Mock-Kontrolle 49 %) nachweisbar, untransduzierte H9-Zellen wiesen dagegen nur einen Anteil von 42 % (Mock-Kontrolle 41 %) auf. In Kokultivierungsversuchen mit SW620-Zellen zeigten sich vergleichbare Unterschiede zwischen Jurkat- und H9-Zellen.

Des Weiteren konnte bei allen untersuchten Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen in beiden T-Zelllinien eine stärkere Apoptoseinduktion bei Koinkubation mit der Zelllinie SW620 im Vergleich zu Kokultivierungen mit SW480-Zellen festgestellt werden. Bei einem 40-fachen Überschuss an SW620-Zellen machte der Anteil apoptotischer Zellen 63 % (Jurkat UT) bzw. 51 % (H9 UT) aus. Im Vergleich dazu lag in Koinkubationen mit SW480-Zellen der Anteil apoptotischer Zellen in untransduzierten Jurkat-Zellen bei 51 %, in untransduzierten H9-Zellen bei 42 %. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in den Kokultivierungsversuchen, bei denen ein 0,5- bis 20-facher Überschuss an Tumorzellen eingesetzt wurde.

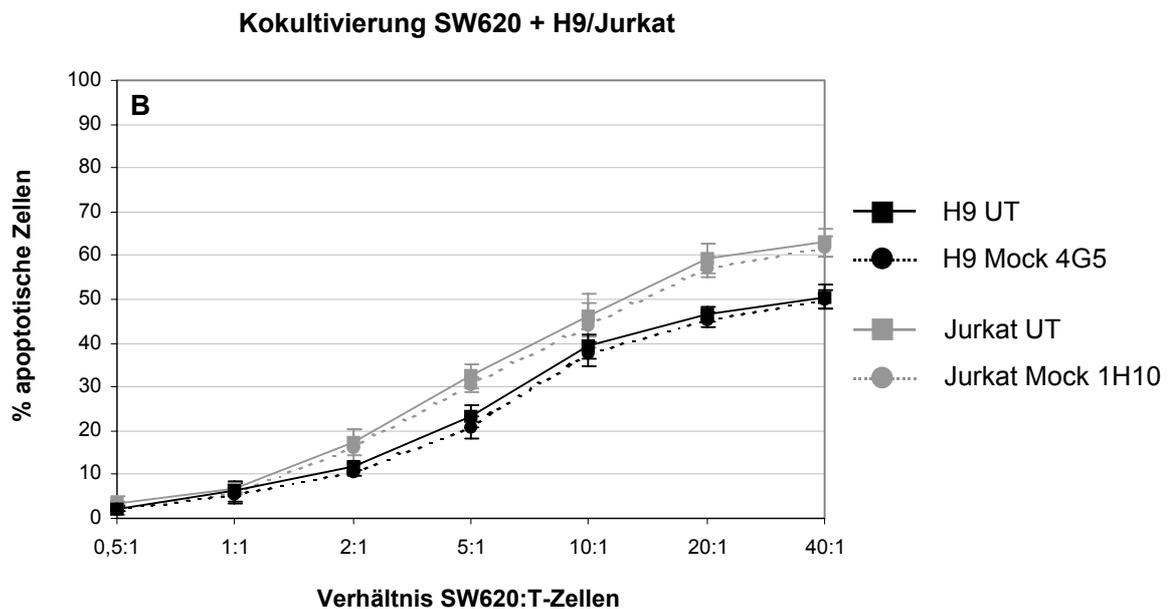
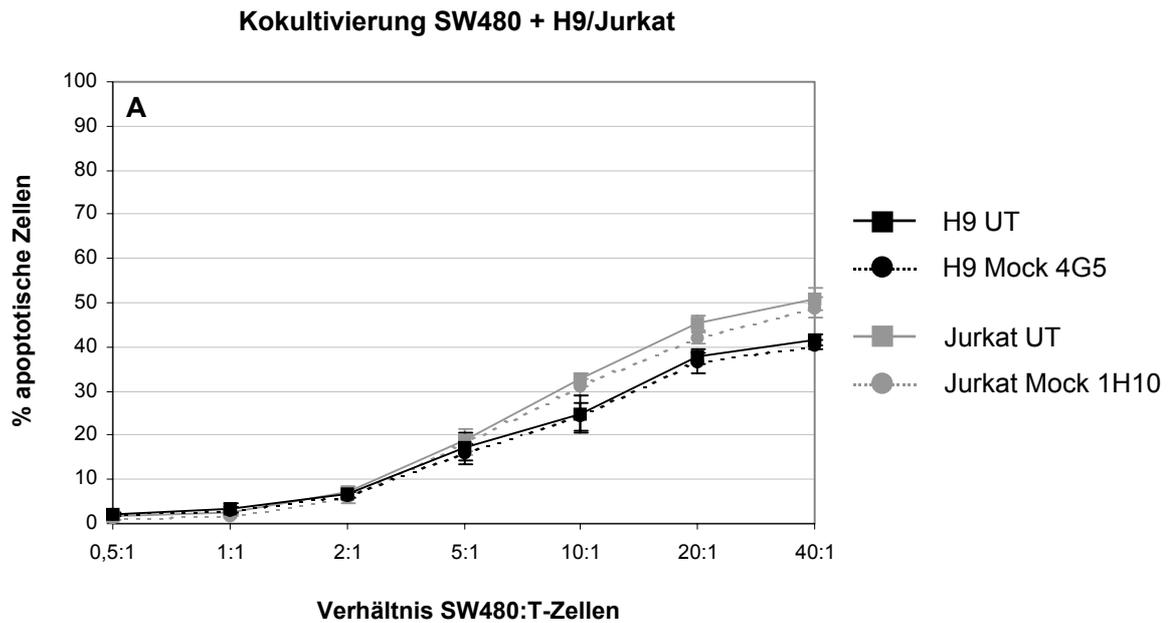


Abbildung 36: **Nachweis der Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien H9 und Jurkat bei Kokultivierung mit einem 0,5- bis 40-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 mittels Annexin-V-Färbung**

A: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen von H9- und Jurkat-Zellen mit SW480-Zellen

B: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen von H9- und Jurkat-Zellen mit SW620-Zellen

Pro Kokultivierungsansatz wurden die mit PKH-26 gefärbten SW480- bzw. SW620-Zellen mit H9- bzw. Jurkat-Zellen in den angegebenen Verhältnissen vermischt und bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit dem „Annexin-V-FLUOS Staining Kit“ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert.

Das Diagramm zeigt die spezifische Apoptoserate (in %) aufgetragen gegen die untersuchten Verhältnisse von Tumorzellen:T-Zellen. Es wurden die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

3.6.3.2 Überexpression des c-FLIP_L-Proteins beeinflusst die Apoptosesensitivität der T-Zelllinien bei Kokultivierung mit den Kolonkarzinomzelllinien

Um die Auswirkung des Expressionsgrads des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins in den T-Zelllinien auf die Apoptosesensitivität der Zellen zu untersuchen, wurden die in Abbildung 16 dargestellten Klone, die nach Behandlung mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper (s. 3.5.2.2), sowie rekombinatem CD95L-Protein (s. 3.5.5.2) eine deutlich reduzierte Apoptosesensitivität aufwiesen, in Kokultivierungsversuche mit SW480- und SW620-Zellen eingesetzt. Die Koinkubationen, sowie die durchflusszytometrische Analyse und die Quantifizierung der Apoptose mittels ‚Annexin-V-Test‘ erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bei den entsprechenden untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen. In Abbildung 37 und Abbildung 38 ist ein Vergleich der durchflusszytometrischen Auswertungen am Beispiel eines repräsentativen Kokultivierungsversuchs von H9- bzw. Jurkat-Zellen mit einem 5-fachen Überschuss der Primärtumorzelllinie SW480 dargestellt. Die Diagramme zeigen den Anteil apoptotischer Zellen in untransduzierten Zellen und mocktransduzierten Zellen im Vergleich zu den Klonen mit starker Expression des c-FLIP_L-Proteins (vgl. Tabelle 6).

Die untersuchten Klone der T-Zelllinien H9 und Jurkat, die das rekombinante c-FLIP_L-Protein in hoher Expressionsstärke bilden, wiesen einen deutlich reduzierten Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen auf. Die transduzierten Zellen mit niedrigerer c-FLIP_L-Überexpression waren entsprechend weniger Apoptose-resistent. Somit war der Prozentsatz apoptotischer Zellen in Klonen mit starker Expression des c-FLIP_L-Proteins (Jurkatxc-FLIP_L 1G2 und Jurkatxc-FLIP_L 1B1 bzw. H9xc-FLIP_L 2C9 und H9xc-FLIP_L 3D6) eindeutig geringer im Vergleich zu Klonen mit mittlerer Expressionsstärke (Jurkatxc-FLIP_L 3C2 bzw. H9xc-FLIP_L 5C5) und Klonen mit schwacher c-FLIP_L-Überexpression (Jurkatxc-FLIP_L 2C9 bzw. H9xc-FLIP_L 5F7). Aus den Ergebnissen geht hervor, dass T-Zellen mit starker, stabiler Expression des rekombinanten c-FLIP_L-Proteins in Koinkubationen mit Kolonkarzinomzelllinien eine deutlich reduzierte Apoptosesensitivität aufweisen. Es bestätigte sich, dass der Anteil apoptotischer Zellen und damit die Apoptosesensitivität der einzelnen Klone in direkter Abhängigkeit zu der Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins steht.

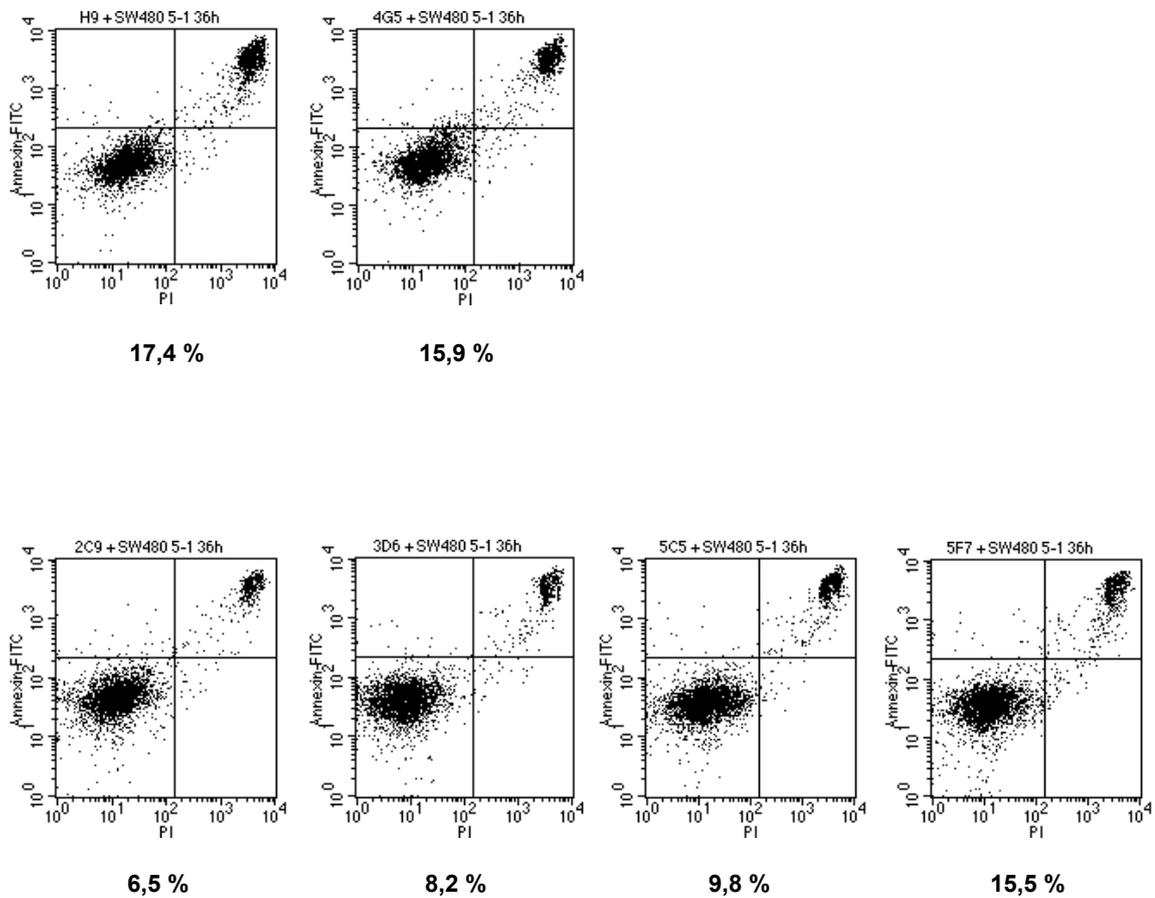


Abbildung 37: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in untransduzierten H9-Zellen und den hergestellten transduzierten Zellen in einem Kokultivierungsansatz mit einem 5-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinie SW480**

Dargestellt ist ein Vergleich der Apoptoseinduktion in untransduzierten H9-Zellen, dem Klon der Mock-Vektorkontrolle (H9 Mock 4G5) und den Transduktanden (bezeichnet mit der entsprechenden Klon-Koordinate), die einen unterschiedlichen Expressionsgrad des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins aufweisen. Pro Kokultivierungsansatz wurden 1×10^9 mit PKH-26-gefärbte SW480-Zellen mit 2×10^5 Zellen der T-Zelllinie vermischt und bei 37°C und 5% CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur.

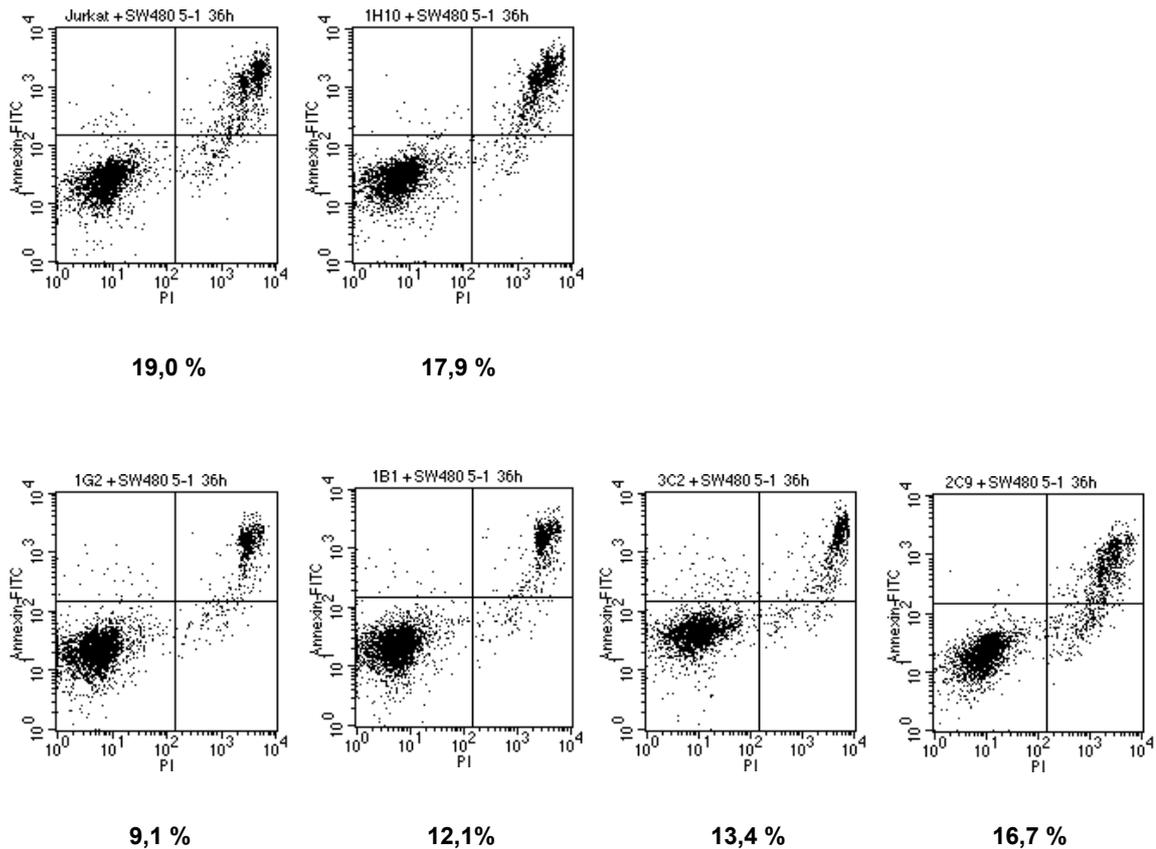


Abbildung 38: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseinduktion in untransduzierten Jurkat-Zellen und den hergestellten transduzierten Zellen in einem Kokultivierungsansatz mit einem 5-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinie SW480**

Dargestellt ist ein Vergleich der Apoptoseinduktion in untransduzierten Jurkat-Zellen, dem Klon der Mock-Vektorkontrolle (Jurkat Mock 1H10) und den Transduktanden (bezeichnet mit der entsprechenden Klon-Koordinate), die einen unterschiedlichen Expressionsgrad des rekombinant exprimierten c-FLIP_L-Proteins aufweisen. Pro Kokultivierungsansatz wurden 1×10^6 mit PKH-26-gefärbte SW480-Zellen mit 2×10^5 Zellen der T-Zelllinie vermischt und bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur.

Die Apoptoserate in den Klonen mit Überexpression des c-FLIP_L-Proteins wurde in Kokultivierungen mit verschiedenen Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen (0,5:1 bis 40:1) untersucht. Abbildung 39 zeigt einen Vergleich der spezifischen Apoptoseinduktion in untransduzierten H9- und Jurkat-Zellen, dem jeweiligen Klon der Mock-Kontrolle und den transduzierten Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins, die in Gegenwart eines 5- bis 40-fachen Überschusses der Kolonkarzinomzelllinien SW480 bzw. SW620 kultiviert wurden.

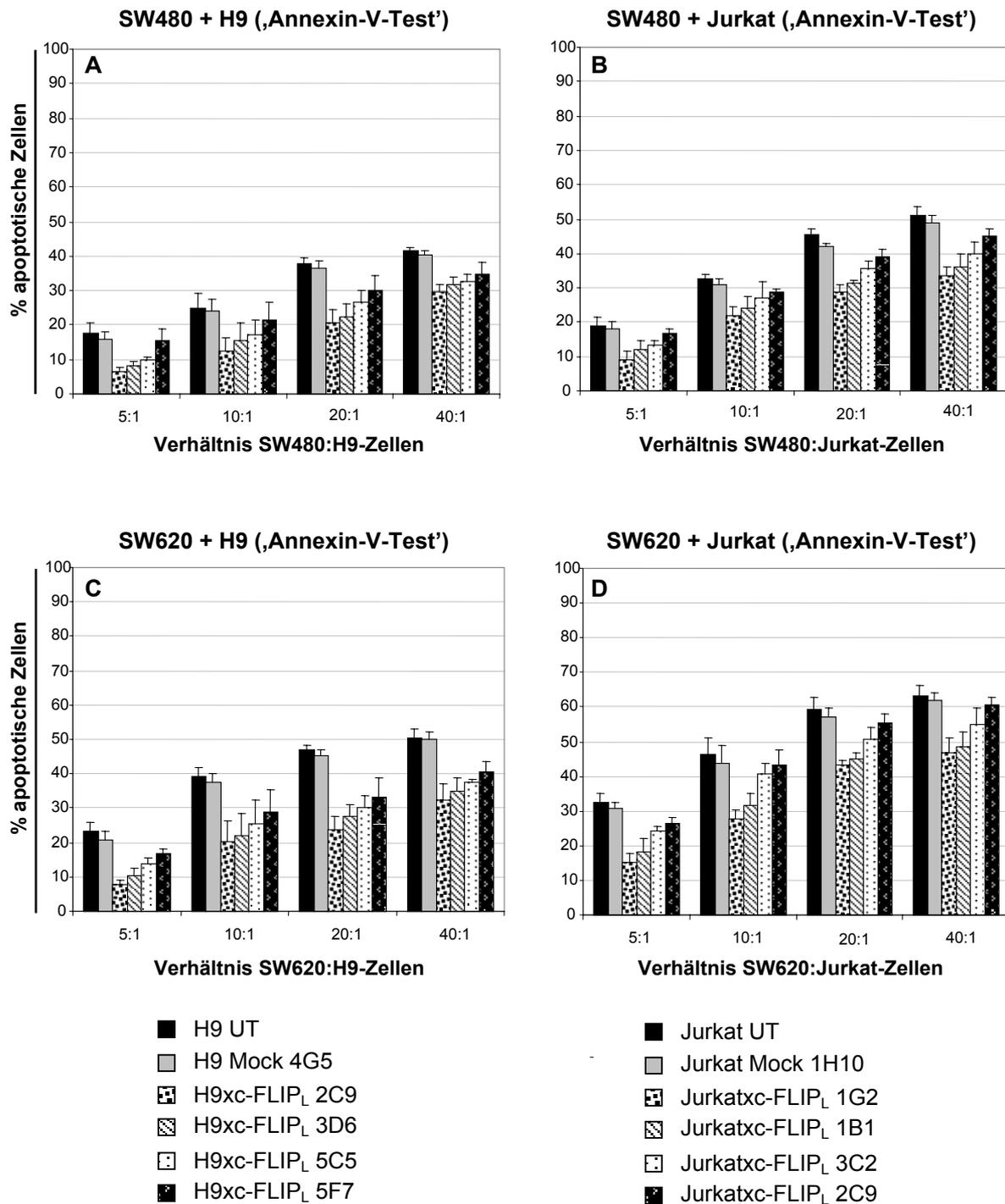


Abbildung 39: **Einfluss der Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins auf die Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen in Kokultivierungsversuchen mit einem 5- bis 40-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620**

- A:** Kokultivierungsversuche mit H9-Zellen und der Kolonkarzinomzelllinie SW480
B: Kokultivierungsversuche mit Jurkat-Zellen und der Kolonkarzinomzelllinie SW480
C: Kokultivierungsversuche mit H9-Zellen und der Kolonkarzinomzelllinie SW620
D: Kokultivierungsversuche mit Jurkat-Zellen und der Kolonkarzinomzelllinie SW620

Pro Kokultivierungsansatz wurden PKH-26-gefärbte SW480- bzw. SW620-Zellen mit H9- bzw. Jurkat-Zellen in den angegebenen Verhältnissen vermischt und bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Die Apoptoseinduktion wurde mit dem ,Annexin-V-FLUOS Staining Kit' und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Diagramme zeigen die spezifische Apoptoserate (in %) der untersuchten Klone aufgetragen gegen die analysierten Verhältnisse von Tumorzellen:T-Zellen. Es wurden die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

3.6.3.3 Bestätigung der Ergebnisse des ‚Annexin-V-Test‘ mittels Nachweis der DNS-Fragmentierung

Mit dem ‚Annexin-V-Test‘ werden frühe Apoptoseereignisse nachgewiesen (s. 1.1.1). Um die in den T-Zelllinien mittels ‚Annexin-V-Test‘ aufgezeigte dosisabhängige Apoptoseinduktion, sowie den Einfluss der rekombinanten Expression des c-FLIP_L-Proteins auf die Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen zu bestätigen, wurde der ‚Cellular DNA Fragmentation ELISA‘ zum Nachweis zytoplasmatischer DNS-Fragmente eingesetzt (s. 2.2.4.2.3). Dieser Test weist die „Exekutionsphase“ des Zelltodprogramms, während der es zur Fragmentierung der Kern-DNS kommt, nach. Für diesen Nachweis wurden exemplarisch Kokultivierungsversuche mit einem eingesetzten Verhältnis von Tumorzellen:T-Zellen von 5:1 und 40:1 untersucht (s. Abbildung 40). Als Negativkontrolle diente je ein Ansatz mit H9- und Jurkat-Zellen, die in Abwesenheit der Kolonkarzinomzelllinien inkubiert wurden (spontane Apoptose=A_S). Als Positivkontrolle für die Apoptosesensitivität der T-Zellen wurde jeweils ein Ansatz mitgeführt, bei dem die Zellen mit löslichem rCD95L-Protein (s. 2.2.4.1.2) inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Apoptoseinduktion wurde nach 36 h analysiert und mit der unter 2.2.5 angegebenen Formel bestimmt. Abbildung 40 zeigt die erhaltenen Absorptionmesswerte (A_{405 nm}), die ein Maß für die Apoptoserate in den untersuchten Proben darstellen. Die Messwerte und der in der Probe nachweisbare Anteil apoptotischer Zellen sind direkt proportional. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Die mit dem Nachweis der DNS-Fragmentierung erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen des ‚Annexin-V-Test‘. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass unter gleichen Inkubationsbedingungen in untransduzierten H9-Zellen und dem mocktransduzierten Klon 4G5 eine geringere Apoptoserate nachweisbar ist im Vergleich zu untransduzierten Jurkat-Zellen und der entsprechenden Mock-Kontrolle.

Die Ergebnisse bestätigen außerdem die Beobachtung, dass SW620-Zellen eine stärkere Apoptoseinduktion in beiden T-Zelllinien auslösen im Vergleich zu Kokultivierungen mit SW480-Zellen. Ebenso konnte in Klonen mit Überexpression des c-FLIP_L-Proteins eine deutlich reduzierte Apoptosesensitivität im Vergleich zu untransduzierten Zellen und den entsprechenden Mock-Kontrollen bestätigt werden.

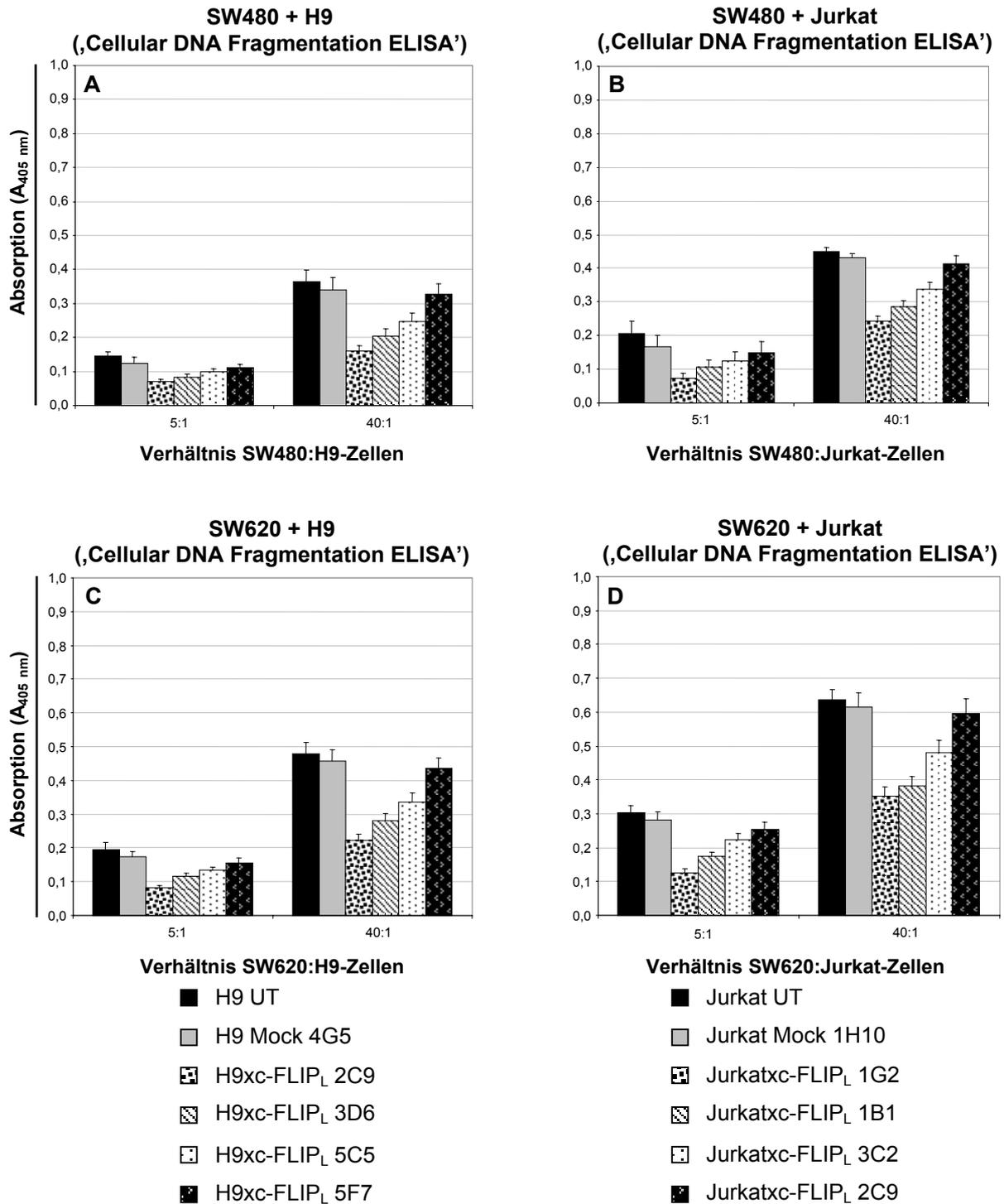


Abbildung 40: **Nachweis der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien H9 und Jurkat nach Kokultivierung mit einem 5- und 40-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 mittels Nachweis der DNS-Fragmentierung**

A: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen der T-Zelllinie H9 mit SW480-Zellen

B: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen der T-Zelllinie Jurkat mit SW480-Zellen

C: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen der T-Zelllinie H9 mit SW620-Zellen

D: Dosisabhängige Apoptoseinduktion in Kokultivierungen der T-Zelllinie Jurkat mit SW620-Zellen

Pro Kokultivierungsansatz wurden unmarkierte SW480- bzw. SW620-Zellen mit BrdU-markierten T-Zellen in den angegebenen Verhältnissen vermischt und bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Die Apoptoserate wurde mit dem ‚Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit‘ quantifiziert. Die erhaltenen Absorptionmesswerte ($A_{405 \text{ nm}}$) stellen ein Maß für die spezifische Apoptoseinduktion in einer Probe dar und sind der Apoptoserate in der untersuchten Probe direkt proportional. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

3.6.4 Blockierung der CD95-vermittelten Apoptose in den T-Zelllinien mit einem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper

Apoptose kann durch viele verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Um nachzuweisen, dass das von den Kolonkarzinomzelllinien exprimierte CD95L-Protein an der Apoptoseinduktion in H9- und Jurkat-Zellen beteiligt ist, wurden Blockierungsexperimente mit einem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper lagert sich an den extrazellulären Teil des CD95-Rezeptors und verhindert so die Bindung von CD95L-Molekülen. Auf diese Weise kann die Auslösung des apoptotischen Signals am CD95-Rezeptor gehemmt werden.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die antagonistische Wirkungsweise des verwendeten Anti-CD95-Antikörpers ZB4 untersucht. Es wurden je 1×10^6 H9- und Jurkat-Zellen für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen (1-10 $\mu\text{g/ml}$) des Antikörpers vorinkubiert. Anschließend wurde die Apoptoseinduktion mit rCD95L-Protein über einen Zeitraum von 0 h-36 h untersucht. Bei allen eingesetzten Konzentrationen des blockierenden Antikörpers konnte die Auslösung der Apoptose bis zu einem Zeitraum von 8 h in über 90 % der Zellen verhindert werden. Nach 36-stündiger Inkubation war der Anteil apoptotischer Zellen in beiden T-Zelllinien um ca. 40 % reduziert. Somit konnte eine Hemmung der Apoptose um ca. 60 % erzielt werden (vgl. Kontrollen Abbildung 42). Die Apoptose-inhibierende Wirkung des Antikörpers war bei allen untersuchten Antikörperkonzentrationen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Für die Untersuchung der Apoptose-inhibierenden Wirkung des Antikörpers in Kokultivierungsansätzen wurden je 1×10^6 H9- und Jurkat-Zellen 2 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ des antagonistischen Anti-CD95-Antikörpers ZB4 inkubiert und anschließend in Kokultivierungsversuche über einen Zeitraum von 36 h eingesetzt (s. 2.2.3.10). Als Kontrolle für die Spezifität des antagonistischen Antikörpers dienten Zellen, die 2 h mit den entsprechenden Konzentrationen des Antikörpers Anti-ERK2 (Isotyp-Kontrolle) behandelt wurden und anschließend ebenfalls für Kokultivierungen verwendet wurden. Die Apoptoseinduktion wurde bei verschiedenen Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen (5:1, 10:1, 20:1 und 40:1) untersucht. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit unbehandelten T-Zellen mitgeführt. Als Positivkontrolle diente jeweils eine Probe, bei der die mit dem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper bzw. dem Isotyp-Kontrollantikörper vorbehandelten T-Zellen in Gegenwart von 10 ng/ml rCD95L-Protein (s. 2.2.4.1.2) kultiviert wurden. Der Nachweis der Apoptose wurde mittels ‚Annexin-V-Test‘ und anschließender Quantifizierung der Apoptose im Durchflusszytometer durchgeführt.

In Abbildung 41 sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Auswertungen eines Kokultivierungsversuchs der beiden T-Zelllinien mit einem 5-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinie SW480 dargestellt. Die Diagramme zeigen die Apoptoseinduktion in H9- und Jurkat-Zellen, die mit 1 $\mu\text{g/ml}$ des antagonistischen Anti-CD95-Antikörpers ZB4 inkubiert wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden.

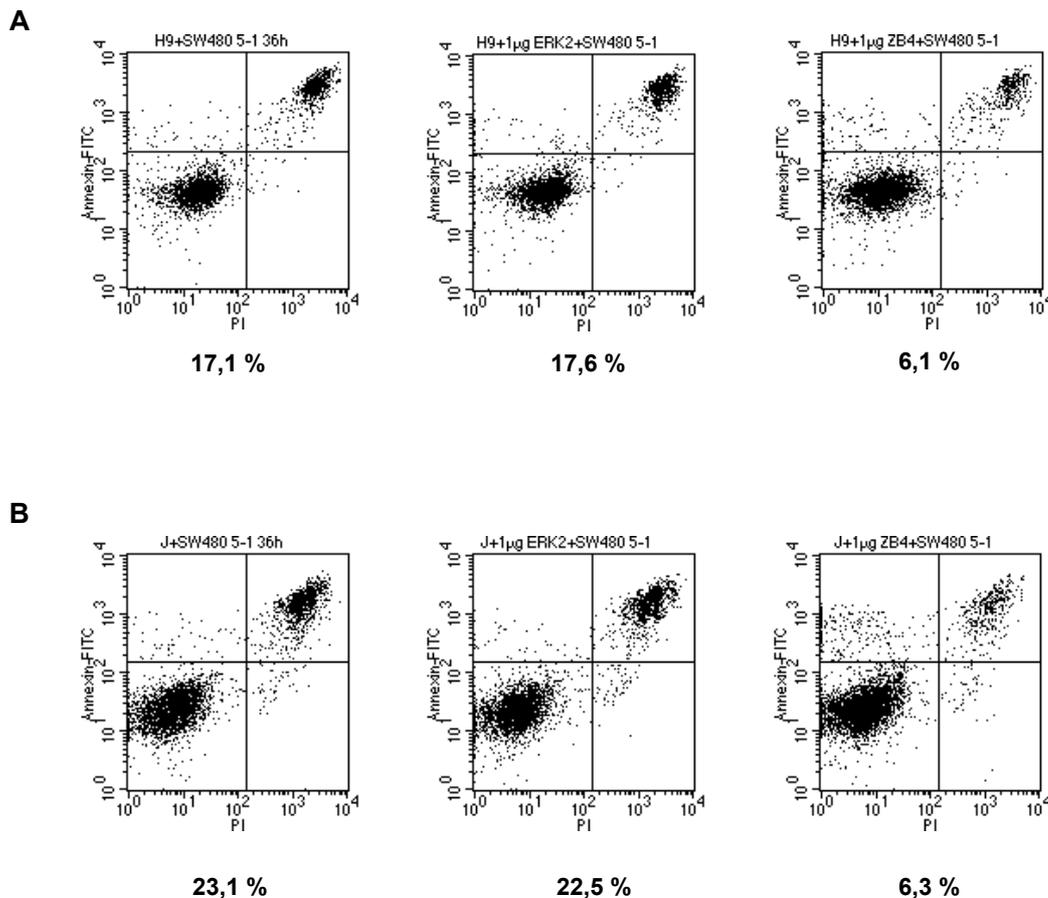


Abbildung 41: **Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseblockierung in Kokultivierungsversuchen mit H9- bzw. Jurkat-Zellen und SW480-Zellen (Verhältnis 5:1) nach Vorbehandlung der T-Zellen mit dem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper ZB4**

A: Nachweis der Apoptoseblockierung in einem Kokultivierungsansatz mit H9-Zellen und einem 5-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinie SW480 nach Vorbehandlung der T-Zellen mit dem Anti-CD95-Antikörper ZB4 im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper ERK2 inkubiert wurden

B: Nachweis der Apoptoseblockierung in einem Kokultivierungsansatz mit Jurkat-Zellen und einem 5-fachen Überschuss der Kolonkarzinomzelllinie SW480 nach Vorbehandlung der T-Zellen mit dem Anti-CD95-Antikörper ZB4 im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper ERK2 inkubiert wurden

Die T-Zellen wurden 2 h mit 1 µg/ml antagonistischem Anti-CD95-Antikörper (ZB4) bzw. der entsprechenden Menge Anti-ERK2-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) vorbehandelt. Je 2×10^5 Zellen wurden anschließend in Kokultivierungen mit 1×10^5 SW480-Zellen, die zuvor mit PKH-26 angefärbt wurden, eingesetzt. Die Kokultivierungen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum 36 h inkubiert. Ein Kokultivierungsansatz mit unbehandelten Zellen diente als Kontrolle. Die Apoptoserate wurde mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab). Jedes Diagramm wurde in die vier Quadranten UL („unten links“), UR („unten rechts“), OL („oben links“) und OR („oben rechts“) unterteilt. Die unter den Abbildungen aufgeführten Prozentangaben beziehen sich auf den relativen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur.

J: Jurkat

Die ‚FACS‘-Diagramme zeigen deutlich, dass in Koinkubationsansätzen mit Kolonkarzinomzellen in den T-Zellen, die mit dem antagonistischen Antikörper ZB4 inkubiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit dem Kontrollantikörper geeigneter Isotyp-Spezifität (Anti-ERK2) vorbehandelt wurden, ein eindeutig geringerer Anteil apoptotischer Zellen nachweisbar ist.

Die Resultate der durchgeführten Blockierungsversuche mit einem 10- und 40-fachen Überschuss an Tumorzellen sind in Abbildung 42 (Kokultivierungsversuche mit den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620) grafisch dargestellt. In Koinkubationen mit einem 5- und 20-fachen Überschuss der Tumorzelllinien konnte ebenfalls eine Hemmung der Apoptose beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte in Jurkat- als auch in H9-Zellen bei allen untersuchten Koinkubationsversuchen mit beiden Tumorzelllinien eine spezifische Blockierung der Apoptose mit dem Anti-CD95-Antikörper ZB4 induziert werden. Die Ergebnisse waren für alle eingesetzten Konzentrationen (1 µg/ml-5 µg/ml) des antagonistischen Antikörpers vergleichbar. In den Abbildungen sind daher nur die erhaltenen Messwerte der Versuche, in denen der antagonistische Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt wurde, dargestellt. Im Gegensatz dazu konnte bei den Proben, die mit der entsprechenden Konzentration des Isotyp-Kontrollantikörpers (Anti-ERK2-Antikörper) inkubiert wurden und den Kokultivierungen mit unbehandelten T-Zellen kein Einfluss auf deren Apoptosesensitivität festgestellt werden. Die Berechnung der Hemmung der Apoptose nach Inkubation mit dem neutralisierenden Anti-CD95-Antikörper erfolgte nach der unter 2.2.5 angegebenen Formel. In den Proben, die mit dem antagonistischen Antikörper behandelt wurden, konnte im Vergleich zu den mit Anti-ERK2-inkubierten Proben und den unbehandelten Zellen durchschnittlich eine Hemmung der Apoptose um 60-70 % erzielt werden. Die Kontroll-Versuche mit rCD95L bestätigten, dass die Apoptose in den T-Zelllinien spezifisch nach Präinkubation mit dem neutralisierenden Antikörper ZB4, nicht jedoch dem Isotyp-Kontrollantikörper Anti-ERK2 blockiert werden kann.

Die Ergebnisse weisen somit eine Beteiligung des von den Tumorzellen exprimierten CD95L-Proteins an der Auslösung der Apoptose in den Koinkubationsversuchen mit den T-Zelllinien H9 und Jurkat nach.

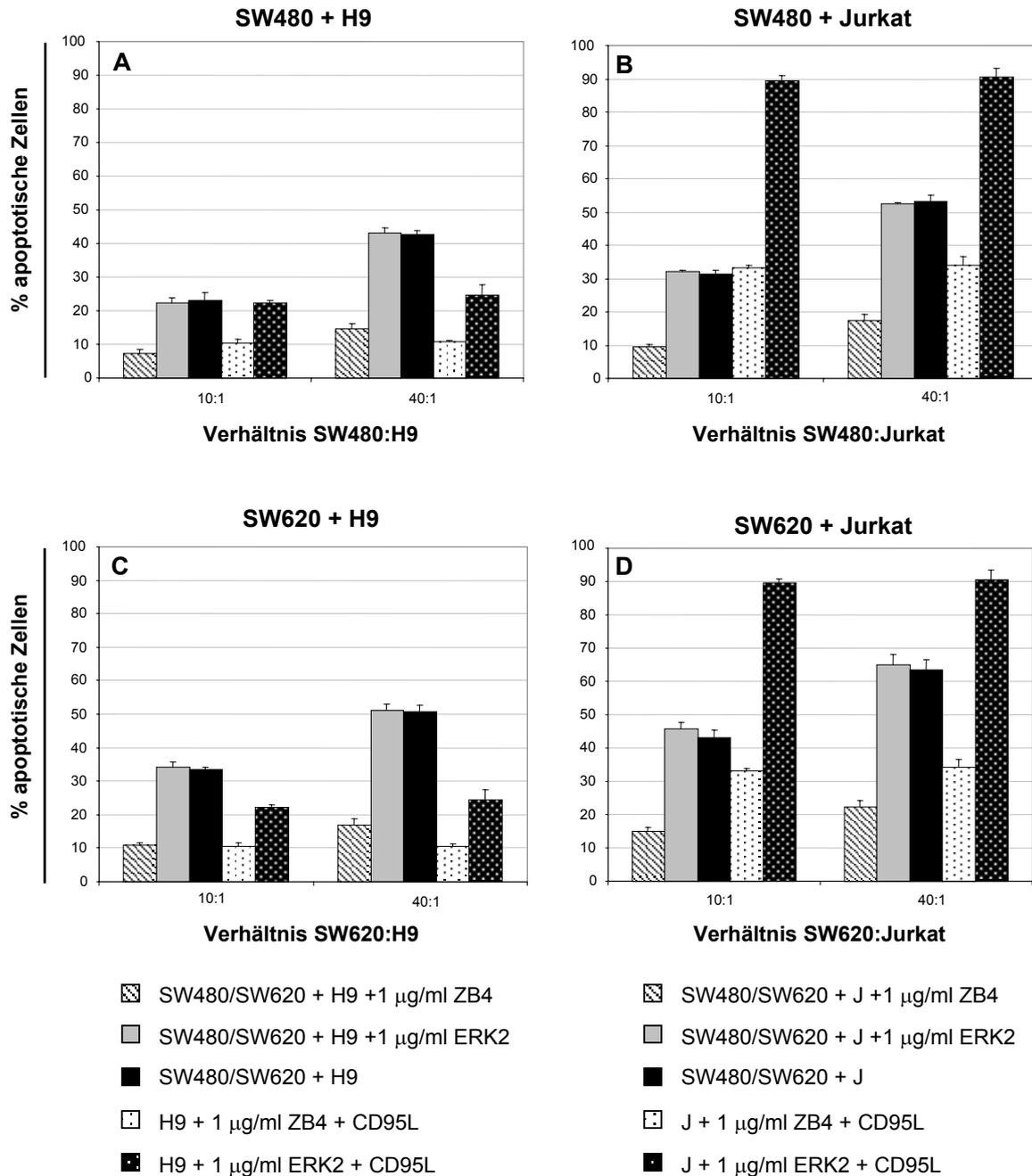


Abbildung 42: **Blockierung der Apoptose in Kokultivierungsversuchen mit H9- bzw. Jurkat-Zellen und SW480- bzw. SW620-Zellen nach Vorbehandlung der T-Zellen mit dem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper ZB4**

- A:** Apoptoseblockierung in Kokultivierungen von H9-Zellen mit der Kolonkarzinomzelllinie SW480
B: Apoptoseblockierung in Kokultivierungen von Jurkat-Zellen mit der Kolonkarzinomzelllinie SW480
C: Apoptoseblockierung in Kokultivierungen von H9-Zellen mit der Kolonkarzinomzelllinie SW620
D: Apoptoseblockierung in Kokultivierungen von Jurkat-Zellen mit der Kolonkarzinomzelllinie SW620

Die T-Zellen wurden 2 h mit 1 µg/ml des antagonistischen Anti-CD95-Antikörpers ZB4 bzw. der entsprechenden Menge Anti-ERK2-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) vorbehandelt und anschließend in Kokultivierungen eingesetzt oder mit 10 ng/ml rCD95L-Protein inkubiert. Pro Kokultivierungsansatz wurden die mit PKH-26 gefärbten SW480- bzw. SW620-Zellen mit den T-Zellen in den angegebenen Verhältnissen vermischt und bei 37°C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Ein Kokultivierungsansatz mit unbehandelten Zellen diente als Kontrolle. Die Apoptoseinduktion wurde mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ und anschließender Analyse im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Diagramme zeigen die spezifische Apoptoserate (in %) der untersuchten Proben aufgetragen gegen die untersuchten Verhältnisse von Tumorzellen:T-Zellen.

J: Jurkat

3.7 Vergleichende Untersuchungen der Primärtumorzelllinie SW480 und der Metastasenzelllinie SW620

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Eliminierung durch die Überwachungsfunktionen des Immunsystems zu entgehen (s. 1.3). Es konnte gezeigt werden, dass Kolonkarzinomzellen funktionelles CD95L-Protein exprimieren. Da viele Tumore auch CD95-Rezeptormoleküle exprimieren, wird häufig ein verminderter oder vollkommener Verlust der CD95-Rezeptorexpression und damit einhergehend eine Resistenzentwicklung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beobachtet. Während des Metastasierungsprozesses von Tumoren ist neben einer Vielzahl von Veränderungen in der Zelloberflächenexpression von Proteinen auch häufig ein verändertes Wachstumsverhalten zu beobachten. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die Expression des CD95-Rezeptors und die Apoptosesensitivität, sowie das Proliferationsverhalten verschiedener Kolonkarzinomzelllinien analysiert werden.

3.7.1 CD95-Expressionsstatus verschiedener Kolonkarzinomzelllinien

Der Expressionsstatus verschiedener Kolonkarzinomzelllinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt (s. 2.2.3.7). Je 1×10^6 Zellen der Kolonkarzinomzelllinien wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD95-Antikörper inkubiert. Die Isotyp-Kontrollfärbung erfolgte mit je $1 \mu\text{g/ml}$ Anti-Neurofilament-Antikörper. Als Detektionsantikörper wurde $1 \mu\text{g/ml}$ Anti-Maus Ig-FITC Antikörper eingesetzt. Der Anteil CD95-positiver Zellen wurde nach Ausgrenzung toter Zellen mittels Anfärbung mit PI bestimmt (Abbildung 43). Untransduzierte Jurkat- und H9-Zellen, in denen die Expression des CD95-Rezeptorproteins bereits nachgewiesen worden war (s. 3.5.1), dienten als Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Die Zelllinien SW480, HT29 und HCT15 wiesen eine starke Expression des CD95-Rezeptors auf (> 70 % CD95-positive Zellen), während HCT116-Zellen eine moderate Expression des CD95-Proteins zeigten (44 % CD95-positive Zellen). In den Zelllinien SW620, KM12 und Colo205 konnte nur eine sehr schwache Expression des Proteins nachgewiesen werden (< 10 % CD95-positive Zellen).

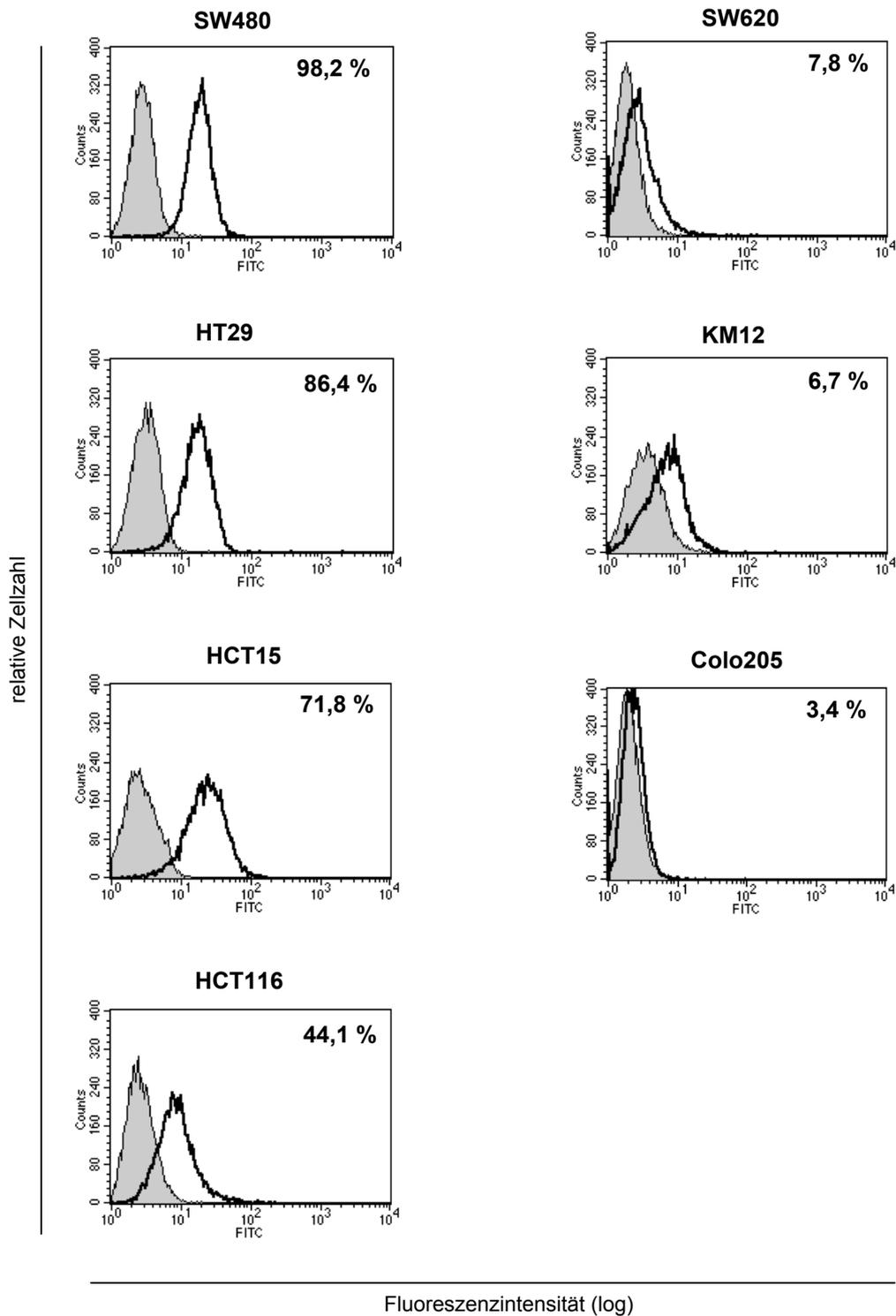


Abbildung 43: **Untersuchung der Zelloberflächenexpression des CD95-Rezeptors in Kolonkarzinomzelllinien mittels Durchflusszytometrie**

Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Primärantikörpers Anti-CD95 für 30 min bei 4°C gefärbt. Für die Kontrollfärbung (Isotyp-Kontrolle) wurde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-Neurofilament-Antikörper benutzt. Nach anschließender Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des sekundären Antikörpers Anti-Maus Ig-FITC wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. In den Histogrammen ist die relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. In jedem Diagramm wird die Färbung der unterschiedlichen Klone mit Anti-CD95-Antikörper (schwarze Linie) mit der Anfärbung durch den Isotyp-Kontrollantikörper (grau ausgefüllte Kurve) miteinander verglichen.

3.7.2 Beobachtungen in der Zellkultur

Weiterführende Untersuchungen erfolgten nur mit den Zelllinien SW480 und SW620, die in die Kokultivierungsversuche eingesetzt wurden. Obwohl sich die beiden Kolonkarzinomzelllinien hinsichtlich der Stärke der Expression des CD95L-Proteins nur geringfügig unterscheiden (s. Abbildung 34 und Abbildung 35), konnte in den durchgeführten Kokultivierungen bei allen untersuchten Verhältnissen von Tumorzellen:T-Zellen in beiden T-Zelllinien eine stärkere Apoptoseinduktion bei Koinkubation mit SW620-Zellen im Vergleich zu Kokultivierungen mit der Zelllinie SW480 festgestellt werden. Bei mikroskopischer Untersuchung der Kokultivierungsansätze wurde festgestellt, dass die Koinkubationen mit SW620-Zellen im Gegensatz zu denen mit SW480-Zellen nach dem 36-stündigen Inkubationszeitraum einen nahezu konfluenten Zellrasen der adhärent wachsenden Tumorzellen aufweisen. Infolgedessen wurden vergleichende Untersuchungen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Zellvitalität von SW480- und SW620-Zellkulturen durchgeführt.

Für den Vergleich des Wachstumsverhaltens der Primärtumor-Zelllinie SW480 und der Metastasenzelllinie SW620, wurden von jeder Zelllinie je 1×10^5 Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Entsprechend der gewählten Inkubationszeit der Kokultivierungen wurden die Zellen nach 36 h abgelöst und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt. SW620-Zellen zeigten hierbei eine durchschnittlich 2- bis 2,5-fach erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu SW480-Zellen (Abbildung 44 A).

Für die Untersuchung der Zellvitalität von 36-h-Kulturen der Zelllinien SW480 und SW620 wurden je 1×10^6 Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät und 36 h kultiviert. Anschließende Vitalfärbungen der konfluenten Zellkulturen mit Trypanblau-Lösung ergaben einen erhöhten Anteil toter Zellen in Kulturen der Zelllinie SW480 im Vergleich zu SW620-Zellkulturen (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen konnten mittels Annexin-V-Analyse bestätigt werden (Abbildung 44 B und Abbildung 44 C). Es zeigte sich, dass in Kulturen der Zelllinie SW480 im Durchschnitt ein Anteil von 16,7 % apoptotischer Zellen nachweisbar war im Vergleich zu Kulturen der Zelllinie SW620, bei der die Fraktion apoptotischer Zellen im Mittel 6,2 % ausmachte.

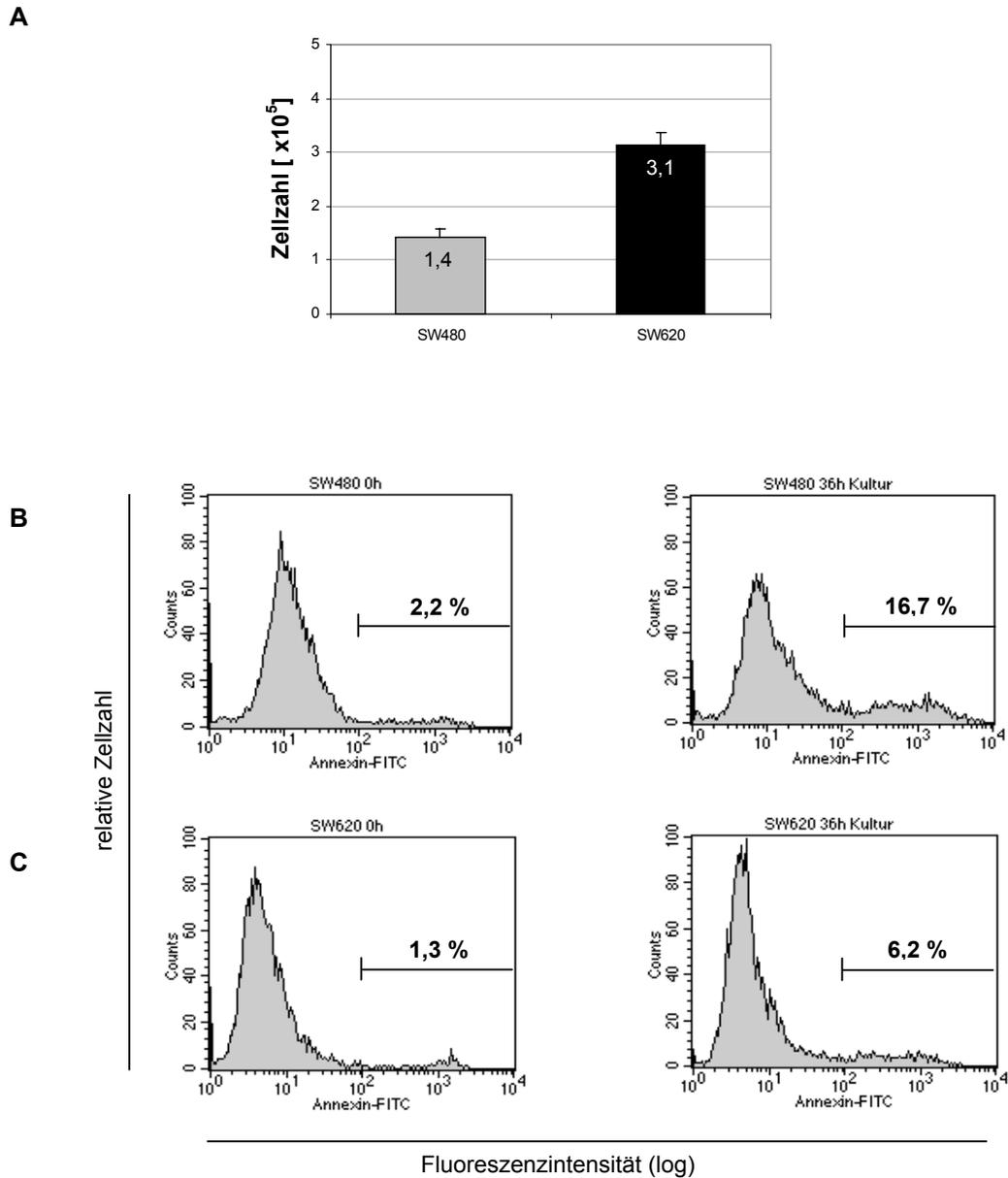


Abbildung 44: **Untersuchung des Wachstumsverhaltens von SW480- und SW620-Zellen und der Zellvitalität in 36-h-Kulturen**

A: Grafische Darstellung der ermittelten Zellzahlen von 36-h-Kulturen von SW480- und SW620-Zellen

B: Durchflusszytometrische Untersuchung von 36-h-Kulturen von SW480-Zellen

C: Durchflusszytometrische Untersuchung von 36-h-Kulturen von SW620-Zellen

Für die Untersuchung der Zellproliferation wurden je 1×10^5 Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und nach 36 h geerntet. Die Zellzahl wurde anschließend mit dem Zellzählgerät bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen und wurden mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte mittels ‚Annexin-V-Test‘. Je 1×10^6 Zellen wurden nach Abtrennung toter Zellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation in Lymphoprep-Trennmedium (s. 2.2.3.3) in eine 6-Loch-Platte ausgesät (0 h-Wert) und 36 h kultiviert. Die Zellen wurden dann mit dem ‚Annexin-V-FLUOS Staining Kit‘ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen gegen die Zellzahl. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Annexin-V-positiver Zellen der Kultur.

3.7.3 Untersuchung der Sensitivität der Kolonkarzinomzelllinien gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

Es sollte nun die Apoptosesensitivität der Primärtumorzelllinie SW480, die eine starke Expression des CD95-Rezeptors zeigt, und der Metastasenzelllinie SW620 mit einer schwachen Expression des CD95-Rezeptors (s. Abbildung 43) untersucht werden. Je 1×10^6 Zellen wurden wie bei den durchgeführten Kokultivierungen über einen Zeitraum von 36 h in Gegenwart von $1 \mu\text{g/ml}$ agonistischem Anti-CD95-Antikörper (IgG3) kultiviert. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde anschließend mittels ‚Annexin-V-Test‘ ermittelt (s. Abbildung 45).

In unbehandelten Zellen lag der Anteil apoptotischer Zellen bei 16,7 % (SW480) bzw. 6,2 % (SW620) (s. Abbildung 44). In der Zelllinie SW620, die eine schwache CD95-Rezeptorexpression zeigte (7,8 % CD95-positiven Zellen) machte der Anteil apoptotischer Zellen dementsprechend nur 6,9 % aus. Bei SW480-Zellen konnte apoptotischer Zelltod in 21,7 % der Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte trotz starker Expression des Rezeptors (98 % CD95-positiv Zellen) eine partielle Resistenz der Kolonkarzinomzelllinie SW480 gegenüber CD95-vermittelter Apoptose nachgewiesen werden.

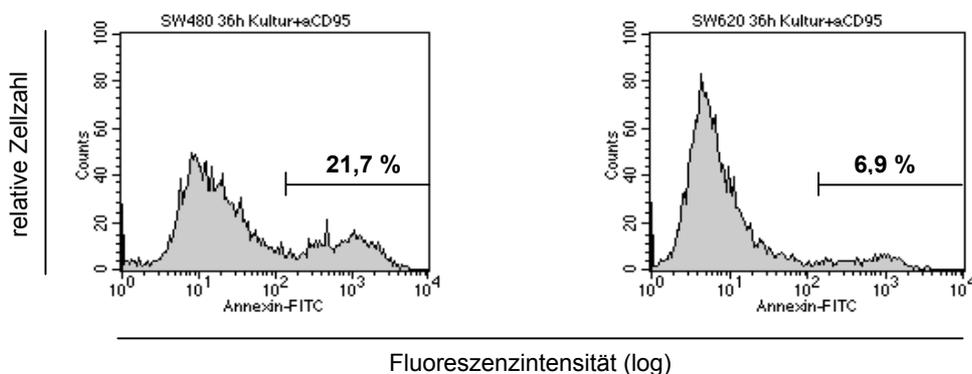


Abbildung 45: **Untersuchung der Apoptosesensitivität von SW480- und SW620-Zellen**

1×10^6 Zellen wurden über einen Zeitraum von 36 h in Gegenwart von $1 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD95-Antikörper (IgG3) kultiviert. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet (s. Abbildung 44 B und C jeweils rechtes Histogramm). Der Anteil apoptotischer Zellen wurde anschließend mittels ‚Annexin-V-Test‘ im Durchflusszytometer ermittelt. Je Probe wurden 10000 Zellen analysiert. Die Histogramme zeigen die Annexin-V-FITC-Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen gegen die Zellzahl. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Annexin-V-positiver Zellen der Kultur.

4 Diskussion

4.1 Effekte unterschiedlicher Apoptosestimulanzen

Für die Untersuchung von Apoptose-Signalkaskaden werden häufig agonistische Antikörper als experimentelle Werkzeuge eingesetzt, um an den entsprechenden Rezeptoren ein Apoptose-auslösendes Signal zu induzieren. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aggregation der CD95-Rezeptormonomere durch Bindung des natürlichen Liganden CD95L ausgelöst. *In vivo* konnte neben der membrangebundenen auch eine lösliche Form des Proteins nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1998).

Mit Verwendung eines agonistischen Anti-CD95-Antikörpers konnte bei vergleichenden Untersuchungen der T-Zelllinien H9 und Jurkat festgestellt werden, dass die beiden Zelllinien hinsichtlich der Kinetik der Apoptoseinduktion stark divergieren. Während bei H9-Zellen zunächst ein sigmoid ansteigender Apoptoseverlauf zu beobachten war, der nach 8 h ein Maximum erreichte, nahm die Apoptose in Kulturen der Jurkat-Zellen stetig zu (s. Abbildung 20). Nach einem Inkubationszeitraum von 24 h wiesen beide Zelllinien jedoch nur geringfügige Unterschiede in ihrer Apoptosesensitivität auf. Die festgestellten Abweichungen in der Apoptoseinduktion der beiden Zelllinien könnten zum einen auf die nachgewiesene dichtere Zelloberflächenexpression des CD95-Rezeptors auf H9-Zellen zurückzuführen sein (s. Abbildung 17). Zum anderen werden neueren Ergebnissen zufolge H9- und Jurkat-Zellen unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet, die sich hinsichtlich der Ausbildung eines „DISC“ und damit auch der Aktivierung des Schlüsselmoleküls Caspase-8 in der Signalkaskade des CD95-Rezeptors unterscheiden (s. 1.2.3.3). Somit wären in Typ-I- und Typ-II-Zellen verschiedene CD95-Signalkaskaden operativ, die das unterschiedliche Apoptoseverhalten der Zellen erklären könnten.

Im Gegensatz dazu wiesen H9-Zellen bei dem Einsatz verschiedener Konzentrationen des rekombinanten, löslichen CD95L-Proteins eine drastisch reduzierte Apoptosesensitivität im Vergleich zu Jurkat-Zellen auf (s. Abbildung 27). Diese Unterschiede wurden bei einer Konzentration von 5 ng/ml und 10 ng/ml des rCD95L-Proteins besonders deutlich. In diesem Konzentrationsbereich konnte in Jurkat-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation eine Sättigung der Apoptoseinduktion beobachtet werden (Gesamtanteil apoptotischer Zellen > 80-90 %). H9-Zellen hingegen wiesen zu diesem Zeitpunkt nur eine geringe Apoptoserate auf (10-20 % apoptotische Zellen). In dieser Zelllinie konnte eine Sättigung der Apoptoseinduktion erst bei Zugabe von 50 ng/ml und 100 ng/ml des rekombinanten CD95-Liganden erreicht werden. Selbst bei diesen hohen Dosierungen spiegelten sich die Unterschiede im Apoptoseverhalten der beiden Zelllinien in Verlaufsstudien über 24 h in den durchflusszytometrischen Untersuchungen der Kulturen nach Anfärbung mit Annexin-V und Propidiumiodid wider (s. Abbildung 28). Bei Stimulierung mit 100 ng/ml rCD95L wurde in der T-Zelllinie Jurkat eine sigmoide Zunahme des Anteils apopto-

tischer Zellen beobachtet. Das Maximum der Apoptoseinduktion wurde hier bereits nach einer Inkubationszeit von 4 h erreicht (s. Abbildung 29). In H9-Zellen hingegen zeigte sich nach 2 h ein starker Anstieg der Fraktion apoptotischer Zellen, nach diesem Zeitpunkt war jedoch nur eine lineare Zunahme bis zum Ende des Inkubationszeitraums (24 h) zu beobachten. Die Unterschiede in der Apoptosesensitivität waren bei geringeren Konzentrationen des CD95L-Proteins noch offensichtlicher (Daten nicht gezeigt).

Um das unterschiedliche Apoptoseverhalten der beiden Zelllinien in Reaktion auf die verschiedenen Apoptosestimulanzen zu erklären, kommen mehrere Interpretationsmöglichkeiten dieser Befunde in Betracht. Der für die Apoptoseinduktion verwendete Antikörper gehört zur Immunglobulin-Subklasse IgG3. Es wäre denkbar, dass sich die dreidimensionale Struktur des Rezeptor-gebundenen Antikörpers deutlich von der Konfiguration des Rezeptor-assoziierten rekombinanten Liganden und damit in der Generierung eines Apoptose-auslösenden Signals unterscheidet. Diese Vermutung wird durch Versuche anderer Arbeitsgruppen mit dem agonistischen Anti-CD95-Antikörper CH11 bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper und der natürliche Ligand an unterschiedliche Regionen des CD95-Rezeptors binden (Fadeel *et al.*, 1995). Der Nachweis der geringeren Apoptosesensitivität der T-Zelllinie H9 bei Stimulierung mit rCD95L steht im Widerspruch zu der nachgewiesenen höheren CD95-Rezeptordichte dieser Zelllinie und erklärt daher nicht das beobachtete Apoptoseverhalten. Es wäre jedoch denkbar, dass in H9-Zellen trotz stärkerer Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors aufgrund unterschiedlicher sterischer Konfigurationen der kreuzvernetzten Anti-CD95-Antikörpermoleküle und der oligomerisierten CD95L-Proteine die Bindung und Quervernetzung der CD95-Monomere und damit die Effektivität der Rezeptortrimerisierung beeinflusst wird. Ferner wurde von Schmitz *et al.*, 2000 postuliert, dass strukturelle Unterschiede im CD95-Rezeptor von Typ-I- und Typ-II-Zellen existieren. Derartige strukturelle Verschiedenheiten könnten ebenfalls zu der beobachteten verringerten Apoptosesensitivität von H9-Zellen beitragen. Darüber hinaus könnten die nachgewiesenen deutlichen Abweichungen im Apoptoseverlauf der untersuchten T-Zelllinien in Übereinstimmung mit ihrer Klassifizierung in Typ-I- und Typ-II-Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998) durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalübertragungswege des CD95-Rezeptors erklärt werden. Die Versuche, die der Zuordnung dieser Zelltypen zugrunde liegen, wurden jedoch mit dem agonistischen Antikörper der IgG3-Subklasse durchgeführt, der auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Dennoch konnten in diesen beiden Zelllinien bei Stimulierung mit rekombinatem CD95L Unterschiede in der Formierung des „DISC“ und der Rekrutierung des Adaptorproteins FADD belegt werden (Schmitz *et al.*, 2000). Die mit rCD95L im Vergleich zu agonistischem Anti-CD95-Antikörper festgestellte konträre Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen könnten daher die Annahme stützen, dass sich die beiden Zelllinien hinsichtlich ihres CD95-Signalübertragungswegs unterscheiden und damit die postulierte Existenz unterschiedlicher Zellarten untermauern.

Des Weiteren könnten das unterschiedliche Apoptoseverhalten von H9- und Jurkat-Zellen auch durch die Expression intrazellulärer Moleküle, welche die Signalkaskade des CD95-Rezeptors

modulieren, erklärt werden. Hierbei könnte Caspase-8 eine wichtige Rolle spielen. Es gibt Hinweise darauf, dass Caspase-8 in einigen Zellen an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt ist, dem auch eine Apoptose-inhibierende Funktion zugeschrieben wird (Reuther und Baldwin, 1999). Ferner könnten sich die beiden T-Zelllinien beispielsweise im Expressionsstatus der FAP-1 (*Fas-associated phosphatase-1*) unterscheiden, welche die Signalweiterleitung des CD95-Rezeptors durch Dephosphorylierung einzelner Aminosäuren der D-Domäne blockiert (Sato *et al.*, 1995; Yanagisawa *et al.*, 1997). Derartige Modulatoren der CD95-Signalkaskade könnten sich auch synergistisch mit der Aktivierung unterschiedlicher Signalübertragungswege am Rezeptor auf die unterschiedliche Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen auswirken.

Zusammenfassend zeigten die mit den verschiedenen Apoptosestimulanzen erzielten Resultate, dass der agonistische Antikörper im Vergleich zu dem rekombinanten Liganden ein gegensätzliches Apoptoseverhalten von Zellen hervorruft und sich daher wahrscheinlich nur bedingt für die Aufklärung von Rezeptor-Signalkaskaden eignet.

4.2 Nachweis der anti-apoptischen Wirkung von c-FLIP_L

4.2.1 Korrelation der Apoptosesensitivität mit der relativen Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins

In Viren konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, welche die Sensitivität dieser Pathogene gegenüber den Eliminierungsmechanismen des Immunsystems modulieren. Zu diesen gehört die Familie der v-FLIPs (*viral FLICE inhibitory proteins*), die mit den Caspase-Effektormolekülen der Signalkaskade des CD95-Rezeptors interferieren.

Die Rolle des zellulären Homologs der v-FLIPs, das als c-FLIP bezeichnet wurde, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch ungeklärt. Die lange Variante des Proteins, c-FLIP_L, ist strukturell analog zu Caspase-8, besitzt jedoch keine proteolytische Funktion. Einigen Berichten zufolge wurde das c-FLIP_L-Protein als anti-apoptisches Protein klassifiziert (Irmeler *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998), andererseits existierten auch einige Hinweise auf eine mögliche pro-apoptische Wirkungsweise (Shu *et al.*, 1997; Goltsev *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997). Diese könnte auf eine starke Überexpression des Proteins zurückzuführen sein, die eine Komplexierung der DE-Domänen auslösen und in der Aktivierung von Caspasen resultieren könnte (Siegel *et al.*, 1998).

Um die zellbiologische Wirkungsweise von c-FLIP_L aufzuklären, wurden verschiedene retrovirale Expressionsvektoren hergestellt, welche die vollständige c-FLIP_L-cDNS-Sequenz enthalten (s. 3.3.1 und 3.3.2). Diese retroviralen Konstrukte wurden für eine dauerhafte Einbringung der c-FLIP_L-cDNS in die T-Zelllinien H9 und Jurkat genutzt. In der Verpackungszelllinie HSRBM01 und den beiden T-Zelllinien konnte unabhängig von dem eingesetzten Vektorkonstrukt eine stabile Expression des Reporterproteins LNGFR nachgewiesen werden (s. Abbildung 12 und

Abbildung 14). Die Expression des c-FLIP_L-Proteins variierte jedoch. Mit den Konstrukten, in denen die c-FLIP_L-cDNS unter der Transkriptionskontrolle des CMV-Promotors exprimiert wird (pLMCF-Konstrukte), konnte in der Verpackungszelllinie und den T-Zellen eine sehr starke konstitutive Expression des Proteins erzielt werden (s. Abbildung 13 und Abbildung 15). Im Gegensatz dazu wiesen alle untersuchten Klone, in die das pLFCM-Konstrukt eingebracht worden war, nur eine moderate bis schwache c-FLIP_L-Expression auf. Somit erwies sich das pLMCF-Konstrukt am geeignetsten, um eine starke c-FLIP_L-Expression zu erzielen.

Um nun den Effekt einer Überexpression des c-FLIP_L-Proteins in den Zelllinien H9 und Jurkat zu untersuchen, wurden Klone beider Zelllinien, die das rekombinante Protein unterschiedlich stark exprimieren (s. Abbildung 16 und Tabelle 6), hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose untersucht. Sowohl bei der Verwendung des agonistischen Antikörpers als auch des rekombinanten CD95L-Proteins konnte in allen untersuchten Klonen eine Apoptose-inhibierende Funktion des c-FLIP_L-Proteins belegt werden (s. Abbildung 22 und Abbildung 31). Es zeigte sich, dass die anti-apoptotische Wirkung von c-FLIP_L in den Klonen in direkter Abhängigkeit zu der relativen Expressionsstärke des Proteins steht (s. Abbildung 23 und Abbildung 32).

Allerdings fällt auf, dass in den Apoptoseverlaufsstudien, in denen agonistischer Anti-CD95-Antikörper eingesetzt wurde (s. Abbildung 22), der Anteil apoptotischer Zellen in den ausgewählten Klonen der T-Zelllinie H9 nach einem 24-stündigen Inkubationszeitraum sogar geringfügig höher ist als bei den untersuchten Klonen der T-Zelllinie Jurkat (H9xc-FLIP_L Klon 2C9: 17 % und H9xc-FLIP_L Klon 3D6: 21 % im Vergleich zu Jurkatxc-FLIP_L Klon 1G2: 12 % und Jurkatxc-FLIP_L Klon 1B1: 16 %), obwohl diese im Vergleich zu den H9-Klonen eine schwächere rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins zeigen (s. Tabelle 6). Dies könnte durch die nachgewiesene dichtere Zelloberflächenexpression des CD95-Rezeptors auf H9-Zellen und einer damit stärkeren Apoptosesensitivität der Zellen erklärt werden. Die relative Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins unterscheidet sich in diesen Klonen jedoch nur geringfügig. Die restlichen untersuchten H9-Klone unterscheiden sich von den entsprechenden Jurkat-Klonen dagegen stark im Grad der Überexpression des c-FLIP_L-Proteins. Die Expressionsstärke variiert bei dem Klon H9xc-FLIP_L 5C5 im Vergleich zu dem Klon Jurkatxc-FLIP_L 3C2 um Faktor 2, bei den Klonen H9xc-FLIP_L 5F7 und Jurkatxc-FLIP_L 2C9 um Faktor 4. Die relative Abweichung im Anteil apoptotischer Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h liegt jedoch nur bei 7 % (Vergleich H9xc-FLIP_L 5C5 und Jurkatxc-FLIP_L 3C2) bzw. 15 % (H9xc-FLIP_L 5F7 und Jurkatxc-FLIP_L 2C9). Alle Klone mit einer starken bis moderaten Expression des c-FLIP_L-Proteins wiesen im Vergleich zu untransduzierten Zellen und den entsprechenden Mock-Kontrollen eine deutliche Apoptoseresistenz auf. Dies trifft auch auf den Klon H9xc-FLIP_L 5F7 mit 5-facher c-FLIP_L-Überexpression zu. Der Klon Jurkatxc-FLIP_L 2C9 hingegen, dessen relative Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins bei Faktor 1,6 liegt, zeigte im Vergleich zu dem Klon der Mock-Kontrolle keine Apoptoseresistenz. Aus den Ergebnissen mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper lässt sich somit schlussfolgern, dass in Relation zur endogen gebildeten Anzahl an c-FLIP_L-Molekülen eine mindestens um das 2- bis 5-

fache erhöhte Menge an c-FLIP_L-Proteinen notwendig ist, um eine effiziente Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose zu erzielen.

Bei der Analyse der Apoptosesensitivität der ausgewählten Klone mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten CD95L-Proteins zeigte sich, dass selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration des Apoptosestimulans (100 ng/ml) alle untersuchten Klone der Zelllinie H9 eine eindeutige Apoptoseresistenz aufweisen (s. Abbildung 31). Beim Vergleich der H9-Klone mit starker Expression des c-FLIP_L-Proteins ergab sich nach einer 24-stündigen Apoptosestimulation mit rCD95L ein Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen (H9xc-FLIP_L 2C9: 17 % und H9xc-FLIP_L 3D6: 37 % im Vergleich zu Jurkatxc-FLIP_L 1G2: 58 % und Jurkatxc-FLIP_L 1B1: 87 %). Dieser apparente Unterschied bestätigte sich auch in den anderen untersuchten Klonen. In Zellkulturen des Klons H9xc-FLIP_L 5C5 wiesen 44 % der Zellen einen apoptotischen Phänotyp auf, Zellen des Klons Jurkatxc-FLIP_L 3C2 hingegen zeigten im Vergleich zu untransduzierten Zellen und dem Klon der Mock-Kontrolle bereits keine Apoptoseresistenz mehr, ebenso wie die Klone mit der schwächsten Überexpression des c-FLIP_L-Proteins (H9xc-FLIP_L 5F7 und Jurkatxc-FLIP_L 2C9). Somit kann abgeleitet werden, dass unabhängig vom eingesetzten Apoptosestimulans eine mindestens um das 5-fache erhöhte Zahl an c-FLIP_L-Proteinen im Verhältnis zur Anzahl der endogen exprimierten c-FLIP_L-Moleküle notwendig ist, um einen ausgeprägten Schutz der Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose zu erreichen.

Die Untersuchung der Klone, die das c-FLIP_L-Protein überexprimieren, ergab, dass in Abhängigkeit vom verwendeten Apoptosestimulans deutliche Unterschiede im Apoptoseverhalten der Klone zu beobachten waren. Die Ursache hierfür könnte auf der Auslösung unterschiedlicher Signaltransduktionswege des CD95-Rezeptors beruhen. Da mit der Überexpression des c-FLIP_L-Proteins unabhängig vom eingesetzten Apoptosestimulans eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose erzielt werden konnte, müsste dann jedoch angenommen werden, dass sich die möglicherweise unterschiedlichen Signalkaskaden erst nach der Aktivierung von Caspase-8 gabeln. Denkbar wäre dagegen auch, dass die beobachtete Diskrepanz in der Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen auf die Expression intrazellulärer Moleküle zurückzuführen ist, welche die CD95-Signaltransduktion nach der Spaltung der Initiator-Caspase-8 modulieren. Hierbei könnten beispielsweise Mitglieder der Familie der IAPs (*apoptosis inhibitory proteins*) oder Inhibitoren der IAPs eine Rolle spielen, welche die Aktivität von Caspasen und damit die Weiterleitung des Apoptosesignals regulieren (Rothe *et al.*, 1995; Deveraux *et al.*, 1998; Duckett *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1997). In Lymphozyten gibt es auch Hinweise darauf, dass die Wirkung von c-FLIP_L durch ein weiteres Protein, Toso, reguliert sein könnte, dessen Expression durch die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Antigenerkennung induziert wird (Hitoshi *et al.*, 1998).

Mit der Verwendung des agonistischen Antikörpers als auch des rekombinanten Liganden wurde deutlich, dass die c-FLIP_L-vermittelte Apoptoseresistenz in den Klonen direkt mit der relativen Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins korreliert (s. Abbildung 23 und Abbildung 32).

4.2.2 Einfluss des c-FLIP_L-Proteins auf die Spaltung von Caspase-8

Die Auslösung und Weiterleitung des apoptotischen Signals über den CD95-Rezeptor resultiert in der Autoproteolyse von zytoplasmatischen Caspase-8-Molekülen. Somit stellt die Spaltung von Caspase-8 einen zentralen Schritt in der Apoptoseinduktion dar.

Die Untersuchung der Caspase-8-Aktivierung in den Zelllinien H9 und Jurkat zeigte, dass durch die rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins in den untersuchten Klonen die proteolytische Spaltung der Caspase-8-Moleküle beeinflusst wird. In Klonen beider T-Zelllinien, die eine starke Überexpression von c-FLIP_L aufweisen, konnte die Bildung der aktiven Spaltprodukte p10 und p18, welche die aktiven Untereinheiten der Caspase-8-Isomoleküle bilden, erst nach einem 8- bis 24-stündigen Inkubationszeitraum nachgewiesen werden (s. Abbildung 25). Im Vergleich dazu wurden diese Protein-Untereinheiten in untransduzierten Zellen und den entsprechenden Mock-Kontrollen bereits nach 1 h nachgewiesen (s. Abbildung 24). Für die Untersuchung der Aktivierung von Caspase-8 wurde die Apoptose mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper induziert, da der Nachweis des unterschiedlichen Apoptose-stimulierenden Effekts von rekombinantem CD95L erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit erfolgte. Mit diesem Antikörper zeigten untransduzierte H9-Zellen im Vergleich zu Jurkat-Zellen eine geringfügig schnellere Anhäufung der aktiven Caspase-Untereinheiten p10 und p18. Da die Analyse der Apoptose-sensitivität zeigte, dass eine starke Expression des c-FLIP_L-Proteins den Zellen unabhängig vom verwendeten Apoptose-stimulierenden Agens eine Apoptoseresistenz verleiht, kann die Beobachtung, dass c-FLIP_L die Spaltung von Caspase-8-Molekülen blockiert, dennoch als repräsentativ für die zellbiologische Wirkungsweise des Proteins betrachtet werden. Es konnte also deutlich belegt werden, dass c-FLIP_L in Zellen, in denen die Apoptose über den CD95-Rezeptor ausgelöst wird, eine anti-apoptotische Funktion übernimmt, indem es die Spaltung von Caspase-8 verhindert.

Obwohl in nahezu allen Zellarten eine endogene Expression des c-FLIP_L-Proteins nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 13 und Abbildung 15 und Scaffidi *et al.*, 1999), zeigen diese Zellen keine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die endogenen c-FLIP_L-Proteinmengen lediglich ausreichen, um einen kleinen Anteil der „DISC“-Moleküle zu blockieren. Folglich könnte eine ausreichende Anzahl von Procaspase-8-Molekülen an den verbleibenden „DISC“-Molekülen aktiviert werden und somit die Apoptose-sensitivität der Zellen aufrechterhalten werden. Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und stützt somit die Erkenntnis, dass eine starke Überzahl an c-FLIP_L-Molekülen in einer Zelle notwendig ist, um auch im Rahmen einer therapeutischen Anwendung eine effektive Blockierung der Apoptose zu erzielen.

Die Apoptose-inhibierende Funktion des c-FLIP_L-Proteins konnte in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verifiziert werden (s. Abbildung 26). Nach Behandlung der Zellen mit agonistischem Anti-CD95-Antikörper konnte in den Mock-Kontrollen die Ausbildung der „apoptotischen Körperchen“ nachgewiesen werden, die ein Indiz für apoptotischen Zelltod darstellen. Darüber

hinaus war die erfolgte Zerstörung der Zelle durch die Anfärbung mit Propidiumiodid deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu wurde in Klonen beider T-Zelllinien mit einer starker Überexpression des c-FLIP_L-Proteins lediglich bei einigen Zellen eine beginnende Kondensation der Zellkerne beobachtet, die Zellen wiesen ansonsten jedoch keine Apoptose-typischen Veränderungen auf.

Anhand aller durchgeführten Analysen konnte eindeutig eine Apoptose-blockierende Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins bewiesen werden. Somit eigneten sich die hergestellten Klone, die eine stabile Überexpression des Proteins aufweisen, für weiterführende Analysen in Koinkubationsversuchen mit Kolonkarzinomzellen.

4.3 Nachweis der CD95L-mRNS und des CD95L-Proteins in Kolonkarzinomen

Die Expression des CD95-Liganden, CD95L, ist normalerweise auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Neueren Studien zufolge wird das CD95L-Protein auch von nicht-lymphozytären Zellen gebildet. Hierzu gehören Zellen der vorderen Augenkammer und Sertoli-Zellen (Griffith *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1995; Stuart *et al.*, 1997), die als sogenannte „immunprivilegierte Organe“ bezeichnet werden, da infiltrierende proinflammatorische Zellen durch Auslösung des CD95-vermittelten Zelltodprogramms eliminiert werden (O'Connell *et al.*, 1997; Strand und Galle, 1998). Somit könnte der Expression von CD95L eine wichtige Bedeutung bei der Aufrechterhaltung dieses Immuntoleranzstatus zukommen. Des Weiteren konnte die Expression von CD95L in einer Reihe von Tumorzellen nachgewiesen werden (s. 1.3.2). Um die Transkription des CD95L-Gens in Kolonkarzinomzellen detaillierter zu analysieren, wurden vergleichende RT-PCR-Untersuchungen mit 7 verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt.

CD95L-Transkripte konnten in 6 von 7 Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (s. Abbildung 33). Dabei wiesen die Metastasenzelllinien SW620 und Colo205 eine starke Expression der CD95L-mRNS auf. In den Positivkontrollen (stimulierte H9- und Jurkat-Zellen) waren im Vergleich zu den jeweiligen unstimulierten Zellen hohe mRNS-Spiegel nachweisbar. Lediglich in der Primärtumorzelllinie HCT116 konnte das CD95L-Transkript nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die Expression des TRAIL-Gens, das neben CD95L zu der TNF-Familie gehört, untersucht. Es zeigte sich, dass das Gen in allen untersuchten Kolonkarzinomzelllinien transkribiert wird. Die Rezeptoren für TRAIL (DR4, DR5) werden auf Lymphozyten exprimiert (Zhang *et al.*, 2000). Es wäre somit denkbar, dass in Tumorzellen die gleichzeitige Expression von CD95L und TRAIL die Eliminierung von Tumor-spezifischen Effektorzellen bewirken könnte (s. 4.4.1). In allen Kolonkarzinomzellen konnte außerdem die Expression von CD95-mRNS nachgewiesen werden.

Da der Nachweis der mRNS jedoch keinen sicheren Beweis für die tatsächliche Expression des CD95L-Proteins darstellt, wurde diese nachfolgend analysiert. Das CD95L-Protein konnte in allen

untersuchten Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (s. Abbildung 34). Die größte Menge an CD95L-Proteinen zeigten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ‚RT-PCR‘ die Metastasenzelllinien SW620 und Colo205. Im Gegensatz zu den ‚RT-PCR‘-Ergebnissen wird das Protein auch von den Primärtumorzelllinien HCT116 und KM12, in denen kein bzw. nur ein schwaches Signal in der ‚RT-PCR‘-Analyse nachgewiesen wurde, gebildet. Diese Diskrepanz könnte auf einer Instabilität des CD95L-Transkripts beruhen, das in diesen Zelllinien möglicherweise sofort nach Initiation der Translation abgebaut wird. Die Spezifität der ‚Western Blot‘-Nachweise wurde durch Immunpräzipitation des CD95L-Proteins und anschließenden Nachweis im ‚Western Blot‘ sichergestellt (s. Abbildung 35). Das Protein konnte auch hier in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Aktivierte Jurkat-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, wiesen einen starken Anstieg des CD95L-Proteinspiegels im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf. In KM12-Zellen war nur ein sehr schwaches Signal feststellbar. Es bestätigte sich außerdem, dass das Protein in hohem Maße von den Metastasenzelllinien SW620 und Colo205 gebildet wird. Im Vergleich zu SW620-Zellen wies die Primärtumorzelllinie SW480, die aus dem gleichen Patienten stammte, einen geringfügig niedrigeren CD95L-Proteinspiegel auf. Mit diesen Versuchen konnte somit die konstitutive Expression des CD95L-Proteins in verschiedenen Tumorstadien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen deshalb dafür, dass die Expression des CD95L-Proteins möglicherweise schon sehr früh während der Tumorgenese initiiert wird.

Neben der in Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesenen Expression der membranständigen Form des CD95L-Proteins scheint die Produktion des löslichen Proteins *in vivo* eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen. Erhöhte CD95L-Spiegel konnten im Serum von Tumorpatienten mit Melanomen und bei Leukämiepatienten nachgewiesen werden (Hahne *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996). Zwar gibt es Hinweise darauf, dass die lösliche Form des Proteins eine stark verringerte Apoptose-auslösende Wirkung zeigt, jedoch konnte die Funktionalität dieses Moleküls in CD95-sensitiven Zellen belegt werden. Dabei könnte lösliches CD95L-Protein über para- und endokrine Mechanismen an der Apoptoseinduktion in umgebenden Zellen beteiligt sein. Somit könnten einzelne Tumorzellen, die konstitutiv membrangebundenes oder lösliches CD95L-Protein synthetisieren, ähnlich wie die Zellen der vorderen Augenkammer und die Sertoli-Zellen ein „immunprivilegiertes“ Gewebe darstellen, das eine Immuntoleranz induziert. Damit wäre eine ungehinderte Proliferation der Zellen und somit die Entwicklung von Tumoren möglich.

4.4 Kolonkarzinomzellen können in T-Zellen Apoptose induzieren

4.4.1 Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion

Tumore sind in der Regel klonalen Ursprungs, d.h. sie entstehen aus einer einzigen maligne entarteten Zelle. Die Fähigkeit des Immunsystems, derartige abnorme Zellen aufzuspüren und zu zerstören wird als Immunüberwachung (*immune surveillance*) bezeichnet (Burnet, 1970). Paradoxerweise liegt der Ursprung der Tumorgenese darin, dass Tumorzellen nicht einfach durch das immunologische Abwehrsystem beseitigt werden. Tumorzellen verfügen über ein breites Repertoire an Mechanismen, um sich der Eliminierung durch das Immunsystem zu entziehen. Diese umfassen zum einen defensive Mechanismen, die hauptsächlich auf einer inadäquaten Auslösung einer Tumor-spezifischen T-Zell-Antwort aufgrund fehlender Immunogenität der Tumorzellen beruhen.

Andererseits zählen hierzu auch offensive Mechanismen, mit denen die Tumorzellen direkt gegen die Effektorzellen des Immunsystems vorgehen. Ein bislang unbekannter Mechanismus, der Tumorzellen erlauben könnte, sich vor der zellulären Immunantwort zu schützen, könnte die konstitutive Expression von membrangebundenem oder löslichem CD95L-Protein darstellen. Durch die Expression von funktionellem CD95-Ligand könnten die Tumorzellen in der Lage sein, aktiv gegen die Effektorzellen des Immunsystems vorzugehen und diese abzutöten. Die Expression des CD95L-Proteins wurde bei einer Vielzahl verschiedener Tumore nachgewiesen, die *in vitro* in T-Zelllinien oder peripheren Blutlymphozyten (PBL) Apoptose induzieren konnten (s. 1.3.2). Hierbei stellten sich die bisherigen Untersuchungen von Kolonkarzinomzelllinien kontrovers dar. O'Connell *et al.*, 1996 wiesen nach, dass die Metastasenzelllinie SW620 in koinkubierten Jurkat-Zellen Apoptose auslösen kann. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von Shiraki *et al.*, 1997 mit der Primärtumorzelllinie SW480 bestätigt. Andere Arbeitsgruppen konnten keine Apoptose-auslösende Wirkung dieser Kolonkarzinomzelllinien auf CD95-exprimierende Zellen, sondern stattdessen sogar eine verstärkte Proliferation der koinkubierten Jurkat-Zielzellen beobachten (Böhm *et al.*, 1998; Favre-Felix *et al.*, 2000).

Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit Kokultivierungsversuche mit den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 mit untransduzierten Zellen und den Mock-Kontrollen der T-Zelllinien H9 und Jurkat durchgeführt. Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass diese Kolonkarzinomzelllinien in den CD95-sensitiven Zielzellen Apoptose auslösen können. Hierbei erwies sich für die Analyse ein Inkubationszeitraum von 36 h am geeignetsten. Dieser relativ lange Inkubationszeitraum könnte dadurch zu erklären sein, dass das Protein möglicherweise in geringer Dichte an der Zelloberfläche exprimiert wird. Diese Vermutung konnte in Untersuchungen der CD95L-Zelloberflächenexpression mittels ‚FACS-Analyse‘ bestätigt werden. Das Protein war nur in sehr geringem Maß (< 5 % CD95L-positive Zellen) auf der Zelloberfläche nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Durch Vorinkubation der Zellen mit dem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor KB8301, der die Abspaltung des Proteins von der Zellober-

fläche durch Matrix-Metalloproteinasen verhindert (s. 1.1.3), wurde ebenfalls keine Steigerung der Oberflächenexpression des Proteins erzielt (ohne Abbildung). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein von der Zelloberfläche abgespalten wird. Hingegen konnte eine schwache Expression des Proteins an der Zelloberfläche von Jurkat- und H9-Zellen nach Stimulierung der Zellen mit Concanavalin A, PMA und Ionomycin beobachtet werden (ohne Abbildung). Diese Stimulanzen induzieren eine Aktivierung der Zellen, die im Zuge dessen die Expression des CD95L-Proteins induzieren. *In situ*-Untersuchungen von Tumorgewebeproben zeigten außerdem häufig eine heterogene Verteilung von CD95L-positiven Zellen und Zellen, die keine Expression des Proteins aufweisen (O'Connell *et al.*, 1999). Der Nachweis des Proteins in ‚Western Blot‘-Versuchen und die Bestätigung dieser Ergebnisse durch Immunpräzipitationsanalysen zeigten jedoch deutlich, dass Kolonkarzinomzellen CD95L-Protein exprimieren.

Mit den durchgeführten Koinkubationsversuchen konnte eine Abhängigkeit der Apoptoserate in den T-Zelllinien von dem eingesetzten Verhältnis von Tumorzellen:T-Zellen (0,5:1 bis 40:1) nachgewiesen werden (s. Abbildung 36). Aus den Untersuchungen der Koinkubationsansätze mittels ‚Annexin-V-Test‘ ging hervor, dass in beiden T-Zelllinien der Anteil apoptotischer Zellen linear mit steigendem Überschuss an Tumorzellen zunimmt. Dahingegen konnte in Kokultivierungen mit einem Überschuss der T-Zellen (Verhältnis Tumorzellen:T-Zellen 0,5:1) keine signifikante Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen somit dafür, dass aufgrund des Kontakts zwischen den Kolonkarzinomzellen und den T-Zelllinien in letzteren apoptotischer Zelltod ausgelöst wird. Weitere Hinweise darauf, dass hierbei direkte Zellkontakte notwendig sind, gaben Vorversuche, in denen festgestellt wurde, dass durch Zentrifugation des Kokultivierungsansatzes vor der Inkubation eine effizientere Apoptoseinduktion in den Zielzellen erreicht werden kann. Auffällig ist, dass in den Koinkubationsansätzen der beiden Kolonkarzinomzelllinien mit der T-Zelllinie H9 bei allen untersuchten Zellzahlverhältnissen ein geringerer Anteil apoptotischer Zellen nachweisbar war als in den entsprechenden Versuchsansätzen mit Jurkat-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten der Versuche mit rekombinantem CD95L-Protein als Stimulans für die Apoptoseinduktion (s. Abbildung 29). Auch hier wiesen H9-Zellen eine deutlich verringerte Apoptosesensitivität im Vergleich zu Jurkat-Zellen auf. Daher könnte der beobachtete geringere Anteil apoptotischer Zellen in den Koinkubationen mit H9 ein Indiz für die CD95-vermittelte Apoptoseauslösung in den T-Zelllinien darstellen.

In Kokultivierungen beider T-Zelllinien mit der Metastasenzelllinie SW620 konnte bei allen untersuchten Zellzahlverhältnissen ein höherer Anteil apoptotischer Zellen festgestellt werden als in Koinkubationen mit der Primärtumorzelllinie SW480. Demgemäß wurde in Versuchen mit SW480-Zellen in beiden T-Zelllinien erst bei einem 5-fachen Überschuss der Tumorzelllinie eine signifikante Zunahme der Apoptoserate beobachtet. Im Vergleich dazu konnte bereits bei einem 2-fachen Überschuss von SW620-Zellen in beiden T-Zelllinien eine deutliche Apoptoseinduktion (> 10 %) nachgewiesen werden. Für diese Unterschiede gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Der Nachweis des CD95L-Proteins in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien zeigte,

dass SW620-Zellen im Vergleich zu der Zelllinie SW480 eine geringfügig stärkere Expression des CD95L-Proteins aufweisen (s. Abbildung 34 und Abbildung 35). Diese höhere Präsenz des Moleküls in SW620-Zellen könnte somit zu den beobachteten Abweichungen in der Apoptoseinduktion der T-Zelllinien beitragen. Darüber hinaus konnte bei mikroskopischer Bewertung der Koinkubationsansätze festgestellt werden, dass die Koinkubationsansätze mit SW620-Zellen nach dem 36-stündigen Inkubationszeitraum einen nahezu konfluenten Zellrasen der adhären wachsenden Tumorzellen aufweisen. Im Gegensatz dazu waren Ansätze mit SW480-Zellen deutlich subkonfluent. Somit könnte auch eine geringere Zellzahl und damit einhergehend eine niedrigere Expressionsrate des CD95L-Proteins diese apparenten Unterschiede erklären.

Des Weiteren könnte in Betracht kommen, dass in Kulturen der Zelllinie SW480, die neben CD95L auch den CD95-Rezeptor exprimiert (s. Abbildung 33 und Abbildung 43), in einem gewissen Umfang eine gegenseitige Apoptoseinduktion in den Tumorzellen („*self-killing*“) stattfinden kann. Einen Hinweis darauf gibt auch die Beobachtung, dass SW480-Kulturen im Vergleich zu SW620-Zellen einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen enthalten (s. Abbildung 44). Das verminderte Apoptose-auslösende Potential der Zelllinie SW480 könnte somit auch auf der geringeren Zahl an CD95L-exprimierenden Zellen und der niedrigeren Anzahl an Zellkontakten zwischen den Tumorzellen und den T-Zellen aufgrund der niedrigeren Zelldichte beruhen. Des Weiteren könnte die Metastasenzelllinie SW620 neben CD95L weitere Zelloberflächenproteine exprimieren, die das Absterben der T-Zellen mitverursachen. Hierbei könnten weitere Mitglieder der TNF-Familie eine Rolle spielen. Bei den ‚RT-PCR‘-Untersuchungen konnten in allen Kolonkarzinomzelllinien TRAIL-Transkripte nachgewiesen werden (s. Abbildung 33). Dementsprechend könnte in Tumorzellen neben der Expression von CD95L auch die Synthese von TRAIL zur Etablierung einer Immuntoleranz gegenüber Tumoren beitragen (Phillips *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse der Annexin-V-Untersuchungen konnten mit dem Nachweis der DNS-Fragmentierung in den T-Zelllinien bestätigt werden (s. Abbildung 40). Auch hier wurde eine Korrelation der Apoptoseinduktion mit dem eingesetzten Überschuss an Tumorzellen beobachtet. Darüber hinaus konnten die geringere Apoptosesensitivität der T-Zelllinie H9 im Vergleich zu Jurkat-Zellen sowie das stärkere Apoptose-induzierende Potential der Metastasenzelllinie SW620 im Vergleich zu der Primärtumorzelllinie SW480 verifiziert werden.

4.4.2 c-FLIP_L blockiert die Apoptoseinduktion

Mit dem Nachweis einer anti-apoptotischen Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins bestand eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit darin, ob in T-Zellen durch die stabile, rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins eine Apoptoseresistenz vermittelt werden kann, wenn diese Zellen in Gegenwart von Tumorzellen inkubiert werden, die das CD95L-Protein exprimieren. Um dies zu untersuchen, wurden die bezüglich ihrer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose charakterisierten Klone (s. Abbildung 22 und Abbildung 31) in Koinkubationsversuche eingesetzt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Klone der T-Zelllinien H9 und Jurkat mit einer rekombinanten, starken Expression des c-FLIP_L-Proteins im Vergleich zu den jeweiligen untransduzierten Zellen und den Klonen der Mock-Kontrollen eine eindeutig geringere Apoptosesensitivität aufweisen (s. Abbildung 37 und Abbildung 38). Es bestätigte sich außerdem, dass die relative Apoptoseresistenz der Klone in direkter Abhängigkeit zu der Expressionsstärke des c-FLIP_L-Proteins steht (s. Abbildung 39). Die Ergebnisse der Analyse der DNS-Fragmentierung belegen die Resultate des ‚Annexin-V-Test‘ (s. Abbildung 40). Die im Vergleich zu den entsprechenden Klonen der T-Zelllinie Jurkat deutlich stärkere Apoptoseresistenz der H9-Klone, die in den Versuchen mit rekombinantem CD95L aufgezeigt wurde (s. Abbildung 31), konnte in den Kokultivierungsversuchen nicht beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die Kolonkarzinomzelllinien möglicherweise weitere Zelloberflächenmoleküle, beispielsweise TRAIL, synthetisieren, die einen additiven Effekt auf die Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien ausüben könnten.

Die vorliegenden Daten weisen dennoch eindeutig nach, dass T-Zellen beider Kategorien durch die rekombinante, konstitutive Expression des c-FLIP_L-Proteins vor einer Apoptoseinduktion durch CD95L auf Kolonkarzinomzellen geschützt werden können. Somit könnte eine stabile Expression des c-FLIP_L-Proteins einen neuen Therapieansatz ermöglichen, um T-Zellen gegen den Angriff durch Tumorzellen, die das CD95L-Protein exprimieren, resistent zu machen. Dieser Punkt wird unter 5.3 näher erläutert. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass c-FLIP_L nicht nur die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beeinflusst, sondern auch bei der Blockierung der Signaltransduktionswege anderer Mitglieder der Subfamilie der „Todesrezeptoren“, beispielsweise der Rezeptoren für TRAIL, eine wichtige Rolle spielt (Kataoka *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass das Protein einen wichtigen Regulationsfaktor innerhalb der Signalkaskaden der „Todesrezeptoren“ darstellt.

4.4.3 CD95L ist an der Apoptoseinduktion beteiligt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass T-Zellen in Gegenwart von CD95L-exprimierenden Kolonkarzinomzellen absterben, blieb nachzuweisen, dass das CD95/CD95L-System bei der Auslösung der Apoptose eine Rolle spielt. Um dies zu überprüfen, wurden die T-Zelllinien mit einem antagonistischen Antikörper behandelt, der an den CD95-Rezeptor anlagert und diesen für die Bindung durch das CD95L-Protein auf den Tumorzellen unzugänglich macht. In einer Reihe von Vorversuchen in Abwesenheit von Kolonkarzinomzellen wurde die Spezifität des Antikörpers

und seine Apoptose-inhibierende Wirkung sichergestellt. Nach einem 24-stündigen Inkubationszeitraum in Gegenwart von rCD95L-Protein konnte in Zellen, die mit dem Antikörper behandelt wurden im Vergleich zu Zellen, die mit dem Kontrollantikörper gleicher Isotyp-Spezifität inkubiert worden waren, ein deutlich verminderter Anteil an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (vgl. Kontrollen in Abbildung 42). Durchschnittlich wurde mit allen eingesetzten Konzentrationen des CD95-neutralisierenden Antikörpers der Anteil apoptotischer Zellen reduziert und damit eine Blockierung der Apoptose um ca. 60-70 % erreicht (s. Abbildung 42). Hierbei wurden keine Unterschiede in der Apoptosehemmung in Abhängigkeit vom Verhältnis von Tumorzellen:T-Zellen beobachtet. Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass die Apoptoseinduktion in den T-Zellen durch den CD95-Rezeptor vermittelt wird und in Gegenwart von CD95L-exprimierenden Tumorzellen durch den antagonistischen Antikörper effizient blockiert werden kann. Anhand dieser Untersuchungen konnte eindeutig belegt werden, dass das CD95/CD95L-System an der nachgewiesenen Auslösung der Apoptose in den T-Zellen beteiligt ist.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass Kolonkarzinomzellen konstitutiv funktionelles CD95L-Protein synthetisieren und *in vitro* direkt die Abtötung CD95-sensitiver T-Zellen auslösen können. Dieser Prozess scheint im Gegensatz zu Untersuchungen an Melanomzellen (Zaks *et al.*, 1999) unabhängig von einer Erkennung Tumor-spezifischer Zelloberflächenantigene durch den T-Zell-Rezeptor möglich zu sein (vgl. Abbildung 7).

In vivo-Untersuchungen mit Tumorzellen, die CD95L auf natürliche Weise oder nach Transfektion exprimieren, liefern bis dato sehr kontroverse Ergebnisse. Eine Reihe von Studien gibt Hinweise darauf, dass auch *in vivo* ein derartiger Gegenangriff der Tumorzellen gegen Effektorzellen des Immunsystems stattfindet. So konnte ein apoptotisches Absterben von TIL in Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren beobachtet werden (Strand *et al.*, 1996, Bennett *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999). In primären Kolonkarzinomen nimmt in Abhängigkeit vom klassifizierten Tumorstadium (Duke's Stadium) die Zahl der TIL stark ab. (Kubota *et al.*, 1992). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass TIL häufig einen Funktions- oder Expressionsverlust der T-Zell-Rezeptor-CD3-Zeta-Kette aufweisen, die für die Weiterleitung des aktivierenden Signals nach Erkennung des Tumor-spezifischen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor essentiell ist. Untersuchungen von Rabinowich *et al.*, 1998 zufolge existieren Anhaltspunkte, dass der Expressionsverlust der T-Zell-Rezeptor-CD3-Zeta-Kette im Zusammenhang mit der Apoptoseauslösung durch das CD95L-Protein auf Tumorzellen steht.

Darüber hinaus konnte in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden, dass CD95L, das von Tumorzellen gebildet wird, die zelluläre Immunantwort beeinflussen kann. Erste Hinweise auf eine direkte immunsupprimierende Auswirkung der CD95L-Expression wurden in allogenen Mäusen erbracht, die nach der Injektion der mit CD95L-transfizierten Kolonkarzinomzelllinie CT26 aus der Maus eine deutlich verringerte Population der allospezifischen zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen aufwiesen. Nach subkutaner Injektion der CD95L-exprimierenden Melanomzelllinie B16F10 aus der Maus konnte in Mäusen mit einer Mutation im Gen für den

CD95-Rezeptor (*lpr*-Mutation, s. 1.2.2) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen oder Tieren mit einer Mutation im CD95L-Gen (*gld*-Mutation) ein verzögertes Tumorstadium beobachtet werden (Hahne *et al.*, 1996). Dies könnte auf die fehlende CD95-Expression und der daraus resultierenden Insensitivität der Lymphozyten von *lpr*-Mäusen zurückzuführen sein. Darüber hinaus konnte infolge einer intraperitonealen Injektion der Dermatofibromzelllinie AK-5 in Ratten eine transient verstärkte Expression des CD95L-Proteins einhergehend mit einer Verringerung der intraperitonealen NK-Zell-Population nachgewiesen werden. Die Tumoren zeigten ein rapides Wachstum. Bei subkutaner Injektion der Zelllinie war keine Expression des CD95L-Proteins und in Übereinstimmung damit eine Regression des Tumors durch die Auslösung eines Immunangriffs zu beobachten (Khar *et al.*, 1998).

Dahingegen gibt es ebenfalls Anhaltspunkte, dass Tumorzellen, die das CD95L-Protein exprimieren, eine massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten und damit eine Entzündungsreaktion auslösen können, die in einer raschen Eliminierung des Tumors resultiert (Seino *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1999). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Auswirkung der Expression von CD95L auf Tumorzellen durch eine Reihe von Faktoren in der direkten Umgebung des Tumors beeinflusst werden kann. In diesem Zusammenhang scheint die Zytokinproduktion am Ort des Tumors eine maßgebliche Rolle zu spielen. Einer Studie zufolge könnte der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) eine wichtige Kofunktion bei der Etablierung einer immunologischen Toleranz übernehmen, da durch TGF- β unter anderem die lytischen Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen inhibiert werden können (Wojtowicz-Praga, 1997). Nach subkutaner Injektion von CD95L-exprimierenden Tumorzellen der Maus wurden diese durch die Auslösung einer Entzündungsreaktion eliminiert. Bei simultaner Verabreichung von TGF- β hingegen konnte keine Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1998).

Es wäre somit denkbar, dass *in vivo* durch die Expression von CD95L auf Tumorzellen nur durch die synergistische Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen eine lokale Eliminierung von TIL und damit die Etablierung einer systemischen Immuntoleranz ausgelöst wird (Griffith *et al.*, 1996; Ferguson und Griffith, 1997). In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten Piancatelli *et al.*, 1999 in 83 % aller Kolonkarzinompatienten die Produktion von IL-6 nachweisen. Es existieren Anhaltspunkte, dass dieses Zytokin eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sekretion der immunaktivierenden Zytokine IL-2 und IL-4 und damit der Auslösung einer Immunantwort spielt (Frassanito *et al.*, 2001).

4.5 Kolonkarzinomzellen entwickeln eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose und zeigen ein verändertes Proliferationsverhalten

Einhergehend mit der Tumorprogression und der Einleitung des Metastasierungsprozesses weisen neoplastische Zellen häufig ein gesteigertes Proliferationsverhalten auf. In kolorektalen Karzinomen resultiert beispielsweise die induzierte Transkription des *c-myc*-Protoonkogens in einer gesteigerten Zellproliferation (Spencer und Groudine, 1991; Green, 1997). Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien SW480 und SW620 stellte sich heraus, dass Kulturen der Metastasenzelllinie SW620 im Vergleich zu Kulturen der Primärtumorlinie SW480 ein deutlich schnelleres Zellwachstum zeigten (s. Abbildung 44). Dies bestätigte sich auch in den mikroskopischen Betrachtungen der Kokultivierungsansätze (ohne Abbildung).

Der CD95-Rezeptor wird nicht nur von Lymphozyten, sondern auch von einer Reihe von Zellen epithelialen Ursprungs gebildet. Bei den vergleichenden Untersuchungen verschiedener Kolonkarzinomzelllinien konnte mit Ausnahme von KM12-Zellen in allen Primärtumorzelllinien eine moderate bis starke Expression des Zelloberflächenmoleküls nachgewiesen werden. Dahingegen fiel auf, dass beide Metastasenzelllinien (SW620 und Colo205) den Rezeptor nur noch äußerst schwach exprimieren (s. Abbildung 43). Die Untersuchung der Apoptosesensitivität der in den Kokultivierungsversuchen verwendeten Primärtumorzelllinie SW480 zeigte jedoch, dass diese Zellen trotz starker CD95-Rezeptorexpression eine ausgeprägte Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose aufweisen (s. Abbildung 45).

Eine Vielzahl von Untersuchungen mit Zelllinien und frisch isolierten Tumorzellen belegen, dass die meisten Tumorzellen durch eine verminderte Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose oder eine fehlende Expression des CD95-Rezeptors gekennzeichnet sind. Die Zellen des entsprechenden Normalgewebes hingegen exprimieren den Rezeptor und weisen keine Apoptoseresistenz auf (Leithauser *et al.*, 1993; Moller *et al.*, 1994).

Diese Ergebnisse lassen somit die Folgerung zu, dass eine veränderte Apoptosesensitivität in entarteten Zellen nicht nur zur Entstehung, sondern auch zur Progression und Metastasierung von Tumoren beitragen könnte.

5 Hypothesen und Ausblick

5.1 Entwicklung einer Modellvorstellung für die Entstehung und Progression von CD95L-exprimierenden Tumoren am Beispiel des Kolonkarzinoms

Die Entstehung und Progression von Tumoren setzt voraus, dass Tumorzellen dem immunologischen Abwehrsystem, das entartete Zellen erkennt und abtötet, entkommen. In einer klassischen Immunantwort werden Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen tumor-spezifischen, CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert. Diese werden nach erfolgter Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor aktiviert und sezernieren daraufhin ein Spektrum von Zytokinen, die für die Vermittlung der T-Zell-Effektorfunktionen eine wichtige Rolle spielen. CD8-positiv zytotoxische TIL verfügen über zwei Mechanismen für die Eliminierung von entarteten Zellen. Die Aktivierung der Perforin-vermittelten Einschleusung von Proteasen in die Zielzellen erfordert eine Erkennung antigenen Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, durch den T-Zell-Rezeptor. Ein davon unabhängiger, zweiter Tötungsmechanismus der T-Zellen besteht in der Quervernetzung der CD95-Rezeptormoleküle auf der Zielzelloberfläche durch CD95L, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Tumorzellen könnten sich somit dann der Immunüberwachung entziehen, wenn einer oder beide Eliminierungsmechanismen der Immuneffektorzellen nicht aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass Kolonkarzinomzellen funktionelles CD95L-Protein exprimieren. Die Untersuchungen mit zwei Kolonkarzinomzelllinien ergab, dass diese Zellen durch die Interaktion mit dem CD95-Rezeptor auf aktivierten T-Zellen in letzteren den programmierten Zelltod auslösen können. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die hier untersuchte Primärtumorzelllinie eines kolorektalen Karzinoms einen Resistenzmechanismus entwickelt hat, um sich vor der CD95-vermittelten Induktion der Apoptose zu schützen. Die Untersuchung zweier Metastasenzelllinien von kolorektalen Karzinomen hingegen zeigte eine starke Herabregulierung der CD95-Rezeptorexpression. Basierend auf diesen Untersuchungen könnten die in Abbildung 46 dargestellten Prozessabfolgen zur Entwicklung von kolorektalen Karzinomen beitragen. Um die im Rahmen der Ergebnisse dieser Arbeit postulierte Modellvorstellung für die Entstehung und Progression kolorektaler Tumore zu überprüfen, sind jedoch zusätzliche vergleichende Untersuchungen mit weiteren Primärtumor- und Metastasenzelllinien notwendig.

Durch die Etablierung einer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose könnten entartete Zellen überleben, die normalerweise von dem Immunüberwachungssystem eliminiert würden. Derartige Zellen gewinnen dadurch Zeit, weitere Mutationen zu akkumulieren. In diesem Stadium könnten die Tumorzellen immer noch von den TIL, die TAA erkennen, durch den Perforin/Granzym B-Tötungsmechanismus eliminiert werden (Boon *et al.*, 1997). Durch Mutationen, welche die Expression von TAA und damit die Immunogenität der Tumoren beeinflussen, bei-

spielsweise eine verminderte Expression oder der Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen und/oder funktionellem β 2-Mikroglobulin oder Defekte in den Komponenten des Antigenprozessierungsapparats (Moller *et al.*, 1994), könnten sich die Tumorzellen zusätzlich auch der Erkennung durch den T-Zell-Rezeptorkomplex von zytotoxischen T-Zellen entziehen. Da der Kontakt des T-Zell-Rezeptorkomplexes mit Antigenen, die von MHC-Molekülen präsentiert werden, das Signal für die Freisetzung der zytotoxischen Effektormoleküle ist, wäre somit auch der zweite Tötungsmechanismus dieser Zellen wirkungslos. Darüber hinaus exprimieren einige Tumorzellen mutierte Peptide, die eine alternative oder nur teilweise ausgeführte T-Zell-Antwort, z.B. den Verlust der Perforin-vermittelten Zytotoxizität, induzieren (Cao *et al.*, 1995; Brossart und Bevan, 1996).

Die schlimmste Konsequenz des Verlusts der CD95-Expression auf Tumorzellen ist jedoch die sich daraus ergebende Möglichkeit, CD95L zu exprimieren. Somit stellt die Entwicklung einer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose eine notwendige Voraussetzung für die Expression von CD95L auf den Tumorzellen dar. Tumorzellen, die CD95L exprimieren, könnten nun der Eliminierung der TIL vollständig entgehen, indem sie sich aktiv gegen die Effektorzellen der Immunantwort behaupten und somit eine Immuntoleranz induzieren könnten. Dies könnte möglicherweise durch die Sezernierung immunregulatorischer Zytokine, welche die Effektorfunktionen der Immunzellen blockieren, verstärkt werden. Ein weiterer synergistischer Mechanismus könnte auf der zusätzlichen Expression von Zelloberflächenmolekülen der TNF-Familie (beispielsweise TRAIL) beruhen. Die Abtötung der zytotoxischen Effektorzellen würde dann eine weitgehend ungehinderte Proliferation der Tumorzellen erlauben und könnte in der Etablierung einer lokalen Tumormunität resultieren. Es wäre darüber hinaus denkbar, dass die Expression von CD95L auf Tumorzellen auch an der Bildung von Tumormetastasen in sekundären Organen, z.B. in der Leber, beteiligt sein könnte. Shiraki *et al.*, 1997 konnten beispielsweise in allen untersuchten Lebermetastasen von Kolonkarzinompatienten eine starke Expression des CD95L-Transkripts nachweisen, dahingegen wurde CD95L-mRNS in nur 30 % aller untersuchten Primärtumore nachgewiesen. Derartige CD95L-exprimierende Tumorzellen könnten sich in Geweben, die den CD95-Rezeptor exprimieren, durch Abtötung umliegender Zellen und Etablierung eines Immuntoleranzstatus ansiedeln. Somit könnte der postulierte offensive „Gegenangriff-Mechanismus“ der Tumorzellen eine wichtige Rolle bei der Tumorphoresis und der Auslösung des Metastasierungsprozesses spielen.

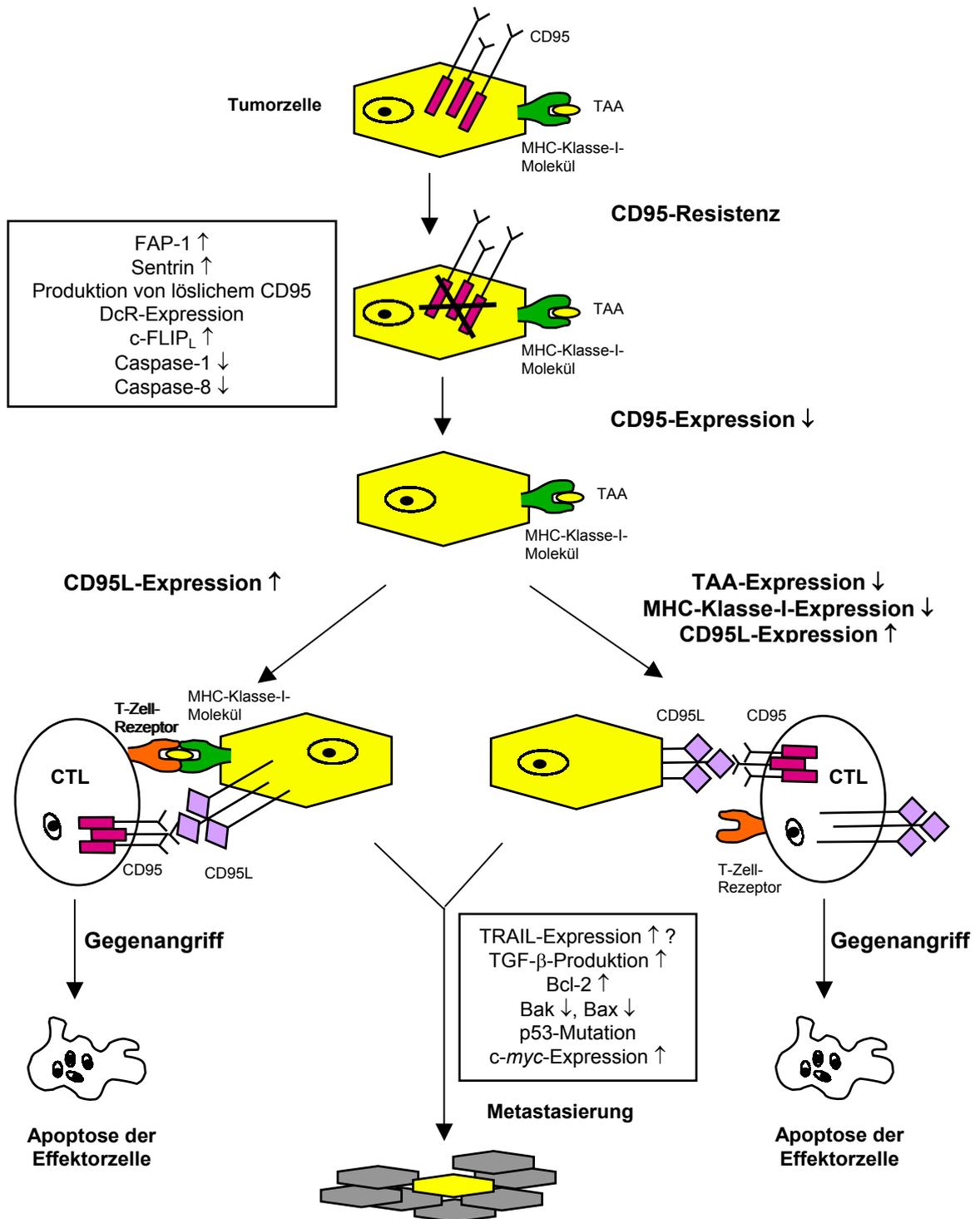


Abbildung 46: **Hypothetisches Modell der Etablierung, Progression und Metastasierung von Tumoren mit CD95L-Proteinexpression**

Durch die Entwicklung einer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose und anschließende Herunterregulierung oder nachfolgenden Verlust der CD95-Rezeptorexpression können sich Tumorzellen einem der beiden Tötungsmechanismen zytotoxischer T-Zellen entziehen. Die Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose könnte ferner eine notwendige Voraussetzung für die konstitutive Expression des CD95L-Proteins darstellen, mit dem die Tumorzellen direkt gegen die Effektorzellen vorgehen könnten. Einhergehend mit einem möglichen Verlust der Immunogenität könnten Tumorzellen auch dem Perforin-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus der T-Effektorzellen entkommen. Die Anhäufung weiterer Mutationen und die synergistische Produktion immunmodulatorischer Zytokine könnten für die Etablierung einer immunologischen Toleranz und damit einhergehend für die Tumorentwicklung und Absiedelung der Zellen in sekundäre Organe verantwortlich sein.

TAA: Tumor-assoziierte Antigene; **MHC:** Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*)

Für die häufig zu beobachtende Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose in Tumorzellen kommen im Wesentlichen zwei verschiedene Arten der Fehlregulation in Betracht. Hierzu gehören die Modulation der Rezeptorexpression und die Beeinflussung des Rezeptor-Signalübertragungswegs. Bei ca. 39 % aller kolorektalen Neoplasien wurde eine Herunterregulierung oder der Verlust der CD95-Rezeptorexpression nachgewiesen (Moller *et al.*, 1994). Bei einer Reihe anderer Tumore kann eine Spleißvariante des CD95-Rezeptors, die zur Bildung einer löslichen Form des Rezeptors führt, nachgewiesen werden (Cheng *et al.*, 1994; Midis *et al.*, 1996). Die kompetitive Bindung dieser antagonistischen Rezeptorvariante an das von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen gebildete CD95L-Protein könnte somit bewirken, dass CD95-sensitive Tumorzellen nicht mehr durch CD95L-exprimierende Effektorzellen eliminiert werden können. Darüber hinaus weisen einige Kolonkarzinome eine Expression des „Köderrezeptors 3“ (*decoy receptor*, DcR3) auf, der CD95L auf zytotoxischen Effektorzellen neutralisiert (Pitti *et al.*, 1998). Des Weiteren exprimieren einige Tumorzellen die Protein-Tyrosin-Phosphatase FAP-1, welche die Signalweiterleitung des CD95-Rezeptors inhibiert (Li *et al.*, 2000), oder das Sentrin-Protein, das mit der D-Domäne des CD95-Rezeptors und dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UBC9 assoziiert und so möglicherweise CD95-Rezeptormoleküle der Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasomen-System zuführt (Okura *et al.*, 1996.; Gong *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit der Deregulation der CD95-Rezeptorkaskade besteht in einer reduzierten oder induzierten Synthese einzelner Regulatormoleküle der CD95-Signalkaskade. Beispielsweise konnte in Kolonkarzinomen eine Herabregulierung der Caspase-1- oder Caspase-8-Expression und eine verstärkte Expression des c-FLIP_L-Proteins nachgewiesen werden (Jarry *et al.*, 1999; Ozoren *et al.*, 2000). Somit wird deutlich, dass Tumorzellen eine breite Palette von Mechanismen entwickelt haben, um der CD95-vermittelten Eliminierung durch Immunzellen zu entkommen, die auch die Expression von Proteinen umfasst, die in normalen Zellen für die Regulation der Apoptosesensitivität verantwortlich sind. Darüber hinaus produzieren Kolonkarzinome und eine Vielzahl anderer Tumore TGF- β (Coffey *et al.*, 1986). Die Syntheserate dieses Zytokins nimmt mit der Tumorprogression zu (Moretti *et al.*, 1997). Die Wirkungsweise von TGF- β beruht auf der Inhibition der Granzym- und Perforin-mRNS-Synthese und damit der Produktion der lytischen Effektormoleküle zytotoxischer T-Zellen (Smyth *et al.*, 1991). Granzym A und B weisen eine Caspase-1-ähnliche Aktivität auf (Irmiler *et al.*, 1995; Quan *et al.*, 1995). Daher wäre es möglich, dass sich Tumorzellen selbst nach erfolgter Ausschüttung dieser Zytokine durch eine fehlende oder abnorme Expression von Komponenten der Signalkaskade, die durch Caspase-1 aktiviert werden, vor den zytotoxischen „Waffen“ des Immunsystems schützen könnten.

Aus diesen Überlegungen geht hervor, dass Tumorzellen, die sich den initialen Eliminierungsmechanismen des Immunsystems entziehen konnten, infolge ihrer fortschreitenden Entartung weitere Mutationen anhäufen könnten. Kolorektale Karzinome und eine Vielzahl anderer Tumore weisen eine verstärkte Expression des Apoptose-hemmenden Bcl-2-Onkoproteins auf (Hague *et al.*, 1994). Dies geht häufig einher mit einer Herabregulierung der Expression der Apoptose-

induzierenden Mitglieder der Bcl-2-Familie Bax oder Bak (Krajewska *et al.*, 1996; Rampino *et al.*, 1997), welche die Aktivität der anti-apoptotischen Familienmitglieder regulieren. Folglich spielt das molekulare Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Molekülen dieser Familie eine wichtige Rolle bei der Determinierung der Apoptosesensitivität der Tumorzelle.

Bei mindestens 50 % aller Krebserkrankungen beim Menschen liegt außerdem eine Mutation im p53-Gen vor. Dieser Verlust der p53-Funktion geht mit einer ausgeprägten Metastasierungsd disposition einher (als Übersichtsartikel s. Levine, 1997). Dieses Protein akkumuliert normalerweise infolge von DNS-Schädigungen und löst ein Anhalten des Zellzyklus in der späten G₁-Phase aus. Verläuft die DNS-Reparatur erfolgreich, kann die Zelle den Zellzyklus fortsetzen. In Tumorzellen mit mutiertem p53-Protein unterbleibt eine Arretierung des Zellzyklus und damit die Möglichkeit zur Reparatur der DNS-Schäden. Darüber hinaus spielt das p53-Protein, das als Transkriptionsfaktor die Expression einer Reihe von Genen kontrolliert, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, auch eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion. So wird beispielsweise die Transkription des pro-apoptotischen Bax-Gens der Bcl-2-Familie direkt durch p53 reguliert (Goldwasser *et al.*, 1996). Es existieren auch Hinweise darauf, dass p53 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression der Proteine spielen könnte, welche die Funktion der IAPs (*inhibitors of apoptosis*) kontrollieren (Brodsky *et al.*, 2000). Letztere wiederum regulieren die Aktivität der Caspasen. Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte, dass p53 in die Auslösung der Apoptose über den CD95-Rezeptor involviert ist, da eine Mutation des p53-Proteins mit der Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose korreliert. Durch die Transfektion von Wildtyp-p53 in Kolonkarzinomzellen mit mutiertem p53 konnte die Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose wiederhergestellt werden (Tamura *et al.*, 1995). In kolorektalen Neoplasien wird zudem häufig beobachtet, dass eine anfänglich erhöhte Expressionsrate des Bcl-2-Proteins im Verlauf der Tumorprogression abnimmt, einhergehend mit dem Auftreten von p53-Mutationen (Watson *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in kolorektalen Karzinomen und einer Reihe anderer Tumore eine deregulierte Expression des *c-myc*-Protoonkogens im direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten Zellproliferationsrate steht (Spencer und Groudine, 1991; Green, 1997).

5.2 Konventionelle Chemotherapie und das CD95/CD95L-System: ein zweiseitiges Schwert

Die derzeitige Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen umfasst vor allem adjuvante, d.h. im Anschluss an eine chirurgische Entfernung des Primärtumors einschließlich der regionalen Lymphknoten durchgeführte Chemotherapie. Die Überlebensrate der Patienten kann vor allem durch die Behandlung mit dem Antimetabolit 5-Fluorurazil (5-FU) erhöht werden, der daher in Kombination mit Leukovorin oder Levamisol regulär für die Therapie von kolorektalen Neoplasien eingesetzt wird. Das Pyrimidin-Analog 5-FU wird *in vivo* in Fluordesoxyuridylat (5-F-dUMP) umgewandelt und hemmt die Aktivität des Enzyms Thymidylat-Synthase irreversibel. Dieses Enzym katalysiert normalerweise die Umwandlung der Pyrimidin-Vorstufe Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), einer Nukleotidvorstufe des Thymidintriphosphat (dTTP), das für die DNS-Synthese essentiell ist. Als Substrat für die Synthese von dTMP dient Desoxyuridinmonophosphat (dUMP). 5-F-dUMP ist ein Analogon des dUMP und verhindert durch die Hemmung der Thymidylat-Synthase den Nukleotid-Stoffwechsel und damit die DNS-Synthese. Chemotherapeutika lassen sich nach ihrer Wirkungsweise in DNS-schädigende Substanzen (Zyklophosphamid, Cisplatin, Doxorubizin, Bleomycin), Antimetabolite (Methotrexat, 5-FU), Inhibitoren der mitotischen Funktionen (Vinkristin), Nukleotid-Analoga (6-Merkaptopurin) oder Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid) einteilen. Ein Großteil dieser Substanzen besitzt sekundär auch eine Apoptose-induzierende Wirkung, die in den meisten Fällen auf einer Induktion der Expression des CD95-Rezeptors und des CD95L-Proteins auf den Tumorzellen beruht (Dive *et al.*, 1992). Beispielsweise führen Bleomycin, Doxorubizin und Cisplatin zu einer starken Induktion der CD95L-Expression (Muller *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1997). Ebenso wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die im Verlauf von nekrotischem Zelltod entstehen, für eine Induktion der CD95L-Expression verantwortlich gemacht (Hug *et al.*, 1997). Somit kann die chemotherapeutisch induzierte Expression des CD95/CD95L-Systems ein Absterben der Tumorzellen durch die gegenseitige CD95/CD95L-Interaktion zwischen den Krebszellen auslösen.

Allerdings können Tumore Resistenzen gegen Chemotherapeutika ausbilden, an denen die Expression von „*multiple drug resistance (MDR)*“-Genen (Baldini, 1997) oder die Entwicklung einer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beteiligt sind. In diesem Fall unterbleibt eine gegenseitige Eliminierung der Tumorzellen, die jedoch infolge der induzierten Expression des CD95L-Proteins dann über eine „Waffe“ verfügen würden, mit der sie im Sinne des postulierten Gegenangriff-Mechanismus aktiv Immuneffektorzellen eliminieren und auf diese Weise eine Immuntoleranz gegenüber Krebszellen hervorrufen könnten. Somit zeigt sich, dass konventionell zur Behandlung maligner Tumore eingesetzte Chemotherapeutika neben einer erwünschten, Tumor-eliminierenden Wirkung, auch einen konträren Effekt, der die Tumorphase fördert, hervorrufen können.

5.3 Ausblick und Entwicklung eines Therapieansatzes mit dem anti-apoptotischen Protein c-FLIP_L

Die anti-apoptotische Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden und gilt infolge der Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mittlerweile als gesichert. Die Untersuchungen von Kolonkarzinomzelllinien und die Ergebnisse der Kokultivierungsstudien deuten *in vitro* auf eine Beteiligung des CD95L-Proteins an einer direkten Abtötung von T-Zellen hin und konnten zeigen, dass T-Zellen durch eine starke konstitutive Expression des c-FLIP_L-Proteins vor der Abtötung durch die Kolonkarzinomzellen geschützt werden können. Aufgrund der bisher kontroversen Ergebnisse von *in vivo*-Versuchen müssten fortführende Untersuchungen mit einem geeigneten Tiermodell zunächst eindeutig klären, inwieweit der postulierte Mechanismus eines „Gegenangriffs“ des Tumors auf TIL auch *in vivo* eine Rolle spielt. Einen ersten Aufschluss über die *in vivo*-Situation könnte eine Untersuchung der Expression des CD95L-Proteins in frischen Tumorsektaten geben.

In weiteren Arbeiten muss außerdem überprüft werden, ob die Etablierung eines effektiven Schutzes von T-Zellen durch eine rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins auch *in vivo* bestätigt werden kann. Um dies aufzuklären, müsste der Effekt einer rekombinanten, starken Überexpression des humanen c-FLIP_L-Proteins, das eine starke Homologie zu dem c-FLIP_L-Protein der Maus zeigt, in einer T-Zelllinie der Maus mit einem geeigneten Tiermodell mit einer Tumorzelllinie, die das CD95L-Protein exprimiert, analysiert werden. Für die Transduktion der Zellen könnten die in dieser Arbeit hergestellten amphotropen retroviralen Verpackungszelllinien genutzt werden.

Erste Hinweise auf eine mögliche Expression zusätzlicher Moleküle der TNF-Familie in Kolonkarzinomzellen gab der Nachweis des TRAIL-Transkripts in der ‚RT-PCR‘-Analyse. Interessant wäre es daher aufzuklären, ob Tumorzellen auch weitere Moleküle der TNF-Familie für eine direkte Abtötung von T-Zellen nutzen. Da bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass c-FLIP_L auch die Signalkaskade der TRAIL-Rezeptoren blockieren kann, könnte eine rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins möglicherweise eine wichtige Interventionsmöglichkeit darstellen, mit der die Apoptoseinduktion in T-Effektorzellen blockiert werden kann.

Bisherige immuntherapeutische Ansätze zielen vor allem auf eine Verstärkung der Immunogenität von Tumoren ab, um eine effiziente Eliminierung der Tumorzellen durch T-Effektorzellen zu induzieren. Des Weiteren werden Versuche unternommen, die CD95-Sensitivität in Tumorzellen wiederherzustellen. Aus der entwickelten Modellvorstellung der Tumorentstehung und -progression geht hervor, dass die Expression von CD95L auf Tumorzellen einen bisher unbekanntem Einfluss auf den Dialog zwischen dem Tumor und dem Immunsystem ausüben könnte. Daher wird das Resultat eines möglichen „Gegenangriffs“ der Tumorzellen gegen die Tumorspezifischen Effektorzellen durch das relative Verhältnis von Tumorzellen:T-Zellen bestimmt werden. Ziel einer Immuntherapie muss es also sein, eine gezielte Vermehrung zytotoxischer T-Zellen zu erzielen. Da nachgewiesen werden konnte, dass aktivierte T-Zellen zunächst Apop-

tose-resistent sind, dann jedoch einen Apoptose-sensitiven Phänotyp zeigen, der mit einer herabregulierten Expression des c-FLIP_L Proteins korreliert (s. 1.2.4), könnte es Ziel einer Immuntherapie sein, Tumor-spezifische T-Zellen zu generieren und anzureichern, die das c-FLIP_L-Protein in stabiler Weise und hoher Expressionsstärke bilden. Ein Problem könnte hierbei jedoch das Risiko der Entwicklung von T-Zell-Lymphomen darstellen, da das CD95/CD95L-System auf aktivierten T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Beendigung einer Immunreaktion durch die Eliminierung aktivierter, überschüssiger T-Zellen spielt (s. 1.2.2). T-Zellen hingegen, die eine konstitutive Expression des c-FLIP_L-Gens aufweisen, wären gegen diesen Eliminierungsmechanismus resistent und könnten proliferieren. Somit könnte sich ein gentherapeutischer Ansatz auf eine transiente Blockierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen, beispielsweise durch eine regulierbare Expression des c-FLIP_L-Proteins, fokussieren. Um dies zu erzielen, wäre es denkbar, Vektoren zu benutzen, die neben der c-FLIP_L-cDNS die kodierenden Sequenzen für das Enzym Thymidin-Kinase (TK) tragen. Durch die Einschleusung derartiger Vektoren in T-Zellen von Tumorpatienten könnten im Falle einer möglichen Lymphomentwicklung durch die Verabreichung der Substanz Ganzyklovir alle modifizierten T-Zellen, die zusätzlich das TK-Gen tragen, abgetötet werden. Derartige gentherapeutische Ansätze mit einer viralen Einschleusung des TK-Gens werden bereits für die induzierte Abtötung von Krebszellen und bei Transplantationen zur Vermeidung einer Transplantationsabstoßungsreaktion („*Graft-versus-Host-Disease*“) erfolgreich eingesetzt (Bordignon *et al.*, 1995 ; Engelmann *et al.*, 1999).

Dabei gilt jedoch zu bedenken, dass ein derartiger immuntherapeutischer Ansatz sich nicht auf die Behandlung solider Tumore richten kann, sondern auf die Eliminierung metastatischer Absiedelungen von Krebszellen sowie von Tumorzellen, die nach der operativen Entfernung des Primärtumors im Körper verblieben sind („*minimal residual disease*“) und potentiell zu einem möglicherweise weitaus aggressiveren Sekundärtumor auswachsen könnten.

6 Zusammenfassung

CD95 ist ein Zelloberflächenrezeptor, der zur Subfamilie der „Todesrezeptoren“ der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie gehört. Durch extra- oder intrazelluläre Todessignale wird die Zusammenlagerung der einzelnen Rezeptormoleküle in der Zellmembran induziert. Diese Aggregation der CD95-Monomere mündet in die Ausbildung eines Zelltod-induzierenden Signalkomplexes („DISC“) und aufeinanderfolgende Aktivierungen von Caspasen, die letztendlich in der Vollstreckung des intrinsischen Zelltodprogramms resultieren. Zellen können möglicherweise unterschiedlichen Zelltypen (Typ-I und Typ-II) zugeordnet werden, die sich hinsichtlich der Ausbildung eines „DISC“ und damit der Aktivierung des Schlüsselmoleküls Caspase-8 in der Signalkaskade des CD95-Rezeptors unterscheiden. Typ-I-Zellen sind durch die Formierung eines „DISC“ und die Aktivierung von Caspase-8 am CD95-Rezeptor charakterisiert. Typ-II-Zellen hingegen weisen einen Defekt in der Ausbildung des „DISC“ auf. In diesem Zelltyp wird die Apoptose möglicherweise durch die Aktivierung eines mitochondrialen Signalübertragungswegs eingeleitet, der in einer verzögerten Aktivierung von Caspase-8 und der nachfolgenden Caspasen resultiert. Demzufolge weisen Zellen der beiden Kategorien deutliche Abweichungen im zeitlichen Verlauf der Apoptose auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die lange Variante des zellulären ‚*FLICE-inhibitory proteins*‘, c-FLIP_L, eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der CD95-vermittelten Apoptose übernimmt, indem es die Aktivierung der Initiator-Caspase der CD95-Signalkaskade, Caspase-8, blockiert. Die rekombinante Expression des c-FLIP_L-Proteins in den T-Zelllinien H9 und Jurkat, die als Typ-I-Zellen (H9) und Typ-II-Zellen (Jurkat) klassifiziert werden, zeigte, dass die Apoptosesensitivität der T-Zellen in direkter Abhängigkeit zu der relativen Expressionsstärke des Proteins steht. Somit konnte eine anti-apoptotische Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins bewiesen werden.

Um experimentell ein apoptotisches Signal in den T-Zelllinien zu induzieren, wurde ein agonistischer Anti-CD95-Antikörper und rekombinantes CD95L-Protein eingesetzt. In Studien mit dem Antikörper konnte in H9-Zellen eine direkte Induktion der Apoptose in Übereinstimmung mit der postulierten Rezeptor-nahen Aktivierung von Caspase-8 beobachtet werden. Im Unterschied dazu wiesen Jurkat-Zellen einen verzögerten Apoptoseverlauf auf. Bei Stimulierung der Zellen mit rekombinantischem, löslichem CD95L-Protein hingegen wurde im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem agonistischen Antikörper ein konträres Apoptoseverhalten der beiden Zelllinien beobachtet. Darüber hinaus wurden mit dem rekombinanten CD95L-Protein drastische Unterschiede in der Apoptosesensitivität von H9- und Jurkat-Zellen festgestellt, die möglicherweise auf unterschiedliche Signaltransduktionswege des CD95-Rezeptors in diesen T-Zelllinien hindeuten könnten. Es zeigte sich jedoch, dass in Typ-I- und Typ-II-T-Zelllinien unabhängig vom eingesetzten Apoptosestimulans die Apoptosesensitivität durch die Überexpression des c-FLIP_L-Proteins beeinflusst werden kann.

In Untersuchungen der CD95L-Proteinexpression in Kolonkarzinomzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass Primärtumor- und Metastasenzelllinien konstitutiv funktionelles CD95L-Protein synthetisieren. Die Ergebnisse der Koinkubationsversuche mit der Primärtumorzelllinie SW480 und der Metastasenzelllinie SW620 lassen die Schlussfolgerung zu, dass Kolonkarzinomzellen *in vitro* die Abtötung CD95-sensitiver T-Zellen induzieren können. Es konnte ferner in Versuchen mit einem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper gezeigt werden, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression des CD95L-Proteins durch die Kolonkarzinomzellen und der CD95-vermittelten Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien besteht.

Dieses Fazit wird durch folgende Resultate untermauert, die für die Beteiligung von CD95L an der Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien H9 und Jurkat sprechen:

1. H9-Zellen weisen in Kokultivierungen mit den Kolonkarzinomzelllinien eine geringere Apoptosesensitivität auf als Jurkat-Zellen. Dieses Apoptoseverhalten konnte auch in Versuchen beobachtet werden, in denen die Apoptose mit rekombinantem CD95L-Protein stimuliert wurde.
2. Die rekombinante, starke Expression des c-FLIP_L-Proteins in T-Zellen verleiht diesen in Gegenwart der Kolonkarzinomzelllinien eine deutliche Resistenz gegenüber Apoptose.
3. Durch Vorbehandlung der T-Zellen mit einem antagonistischen Anti-CD95-Antikörper wird in anschließenden Kokultivierungen mit den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 eine verringerte Apoptosesensitivität der T-Zellen erzielt.

Darüber hinaus konnte bei vergleichenden Untersuchungen der kolorektalen Primärtumorzelllinie SW480 und der Metastasenzelllinie SW620 festgestellt werden, dass die Metastasenzelllinie neben einem gesteigerten Proliferationsverhalten durch eine stark herabregulierte Expression des CD95-Rezeptors charakterisiert ist. Die Primärtumorzelllinie hingegen weist trotz starker Expression des Rezeptors nur eine geringe Apoptosesensitivität auf. Somit könnte die Etablierung einer Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose gefolgt von einer Herunterregulierung bzw. dem Verlust der CD95-Rezeptorexpression eine Voraussetzung für die anschließende Induktion der konstitutiven Expression des CD95L-Proteins darstellen und einhergehend mit der Akkumulation weiterer Mutationen eine wichtige Rolle bei der Progression und Metastasierung von Kolonkarzinomen spielen. Mit dem Nachweis der anti-apoptotischen Wirkungsweise des c-FLIP_L-Proteins könnte sich ein gentherapeutischer Ansatz für die Behandlung von Kolonkarzinomen, die das CD95L-Protein exprimieren, auf die Blockierung der Apoptosesensitivität von T-Zellen durch eine rekombinante Überexpression des c-FLIP_L-Proteins fokussieren.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, M., Suematsu, S., Kondo, T., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N. and Nagata, S., (1995):** Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet.* **11**: 294-300.
- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S., (1993):** Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 1756-1760.
- Algeciras-Schimmich, A., Griffith, T. S., Lynch, D. H. and Paya, C. V., (1999):** Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **162**: 5205-5211.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M., (1998):** Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.
- Baldini, N., (1997):** Multidrug resistance--a multiplex phenomenon [news; comment]. *Nat. Med.* **3**: 378-380.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H. and Lesslauer, W., (1993):** Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**: 431-445.
- Becker, K., Schneider, P., Hofmann, K., Mattmann, C. and Tschoop, J., (1997):** Interaction of Fas(Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway. *FEBS Lett.* **412**: 102-106.
- Bennett, M. W., O'Connell, J., O'Sullivan G. C., Roche, D., Brady, C., Kelly, J., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1999):** Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* **44**: 156-162.
- Bennett, M. W., O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Brady, C., Roche, D., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1998):** The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J. Immunol.* **160**: 5669-5675.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al., (1997):** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**: 729-733.
- Böhm, C., Hanski, M. L., Gratchev, A., Mann, B., Moyer, M. P., Riecken, E. O. and Hanski, C., (1998):** A modification of the JAM test is necessary for a correct determination of apoptosis induced by FasL+ adherent tumor cells. *J. Immunol. Methods* **217**: 71-78.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. and Thompson, C. B., (1995):** CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**: 87-98.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D., (1996):** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803-815.
- Boon, T., Coulie, P. G. and Van den Eynde, B., (1997):** Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* **18**: 267-268.
- Bordignon, C., Bonini, C., Verzeletti, S., Nobili, N., Maggioni, D., Traversari, C., Giavazzi, R., Servida, P., Zappone, E., Benazzi, E., et al., (1995):** Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor Anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum. Gene Ther.* **6**: 813-819.
- Bradford, M. M., (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bremner, T. A., Chatterjee, D., Han, Z., Tsan, M. F. and Wyche, J. H., (1999):** THP-1 monocytic leukemia cells express Fas ligand constitutively and kill Fas-positive Jurkat cells. *Leuk. Res.* **23**: 865-870.
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. and Abrams, J. M., (2000):** Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* **101**: 103-113.
- Brossart, P. and Bevan, M. J., (1996):** Selective activation of Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity by a self peptide. *J. Exp. Med.* **183**: 2449-2458.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F., et al., (1995):** Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**: 441-444.

- Burnet**, F. M., (1970): The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**: 1-27.
- Burnette**, W. N., (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- Cao**, W., Tykodi, S. S., Esser, M. T., Braciale, V. L. and Braciale, T. J., (1995): Partial activation of CD8+ T cells by a self-derived peptide. *Nature* **378**: 295-298.
- Chen**, J. J., Sun, Y. and Nabel, G. J., (1998): Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* **282**: 1714-1717.
- Cheng**, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J. and Mountz, J. D., (1994): Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**: 1759-1762.
- Chinnaiyan**, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M., (1995): FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- Chinnaiyan**, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M., (1996): FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**: 4961-4965.
- Coffey**, R. J., Jr., Shipley, G. D. and Moses, H. L., (1986): Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res.* **46**: 1164-1169.
- Contreras**, D. N., Krammer, P. H., Potkul, R. K., Bu, P., Rossi, J. L., Kaufmann, A. M., Gissmann, L. and Qiao, L., (2000): Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunother.* **23**: 67-74.
- Crawford**, L. V., Lane, D. P., Denhardt, D. T., Harlow, E. E., Nicklin, P. M., Osborn, K. and Pim, D. C., (1980): Characterization of the complex between SV40 large T antigen and the 53K host protein in transformed mouse cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **44 Pt 1**: 179-187.
- Daniel**, P. T., Oettinger, U., Mapara, M. Y., Bommert, K., Bargou, R. and Dorken, B., (1997): Activation and activation-induced death of human tonsillar B cells and Burkitt lymphoma cells: lack of CD95 (Fas/APO-1) ligand expression and function. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1029-1034.
- Deveraux**, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C., (1998): IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* **17**: 2215-2223.
- Dhein**, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P. and Krammer, P. H., (1992): Induction of apoptosis by monoclonal antibody Anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* **149**: 3166-3173.
- Dhein**, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M. and Krammer, P. H., (1995): Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1(Fas/CD95). *Nature* **373**: 438-441.
- Dive**, C., Evans, C. A. and Whetton, A. D., (1992): Induction of apoptosis--new targets for cancer chemotherapy. *Semin. Cancer Biol.* **3**: 417-427.
- Drappa**, J., Vaishnav, A. K., Sullivan, K. E., Chu, J. L. and Elkon, K. B., (1996): Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *New Engl. J. Med.* **335**: 1643-1649.
- Duckett**, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M. and Thompson, C. B., (1996): A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* **15**: 2685-2694.
- Duke**, R. C., Chervenak, R. and Cohen, J. J., (1983): Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**: 6361-6365.
- Eck**, M. J., Beutler, B., Kuo, G., Merryweather, J. P. and Sprang, S. R., (1988): Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J. Biol. Chem.* **263**: 12816-12819.
- Eck**, M. J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A. M. and Sprang, S. R., (1992): The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J. Biol. Chem.* **267**: 2119-2122.
- Eischen**, C. M., Schilling, J. D., Lynch, D. H., Krammer, P. H. and Leibson, P. J., (1996): Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* **156**: 2693-2699.

- Engelmann, C., Panis, Y., Bolard, J., Diquet, B., Fabre, M., Nagy, H., Soubrane, O., Houssin, D. and Klatzmann, D., (1999):** Liposomal encapsulation of ganciclovir enhances the efficacy of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy against hepatic tumors in rats. *Hum. Gene Ther.* **10**: 1545-1551.
- Fadeel, B., Thorpe, J. and Chiodi, F., (1995):** Mapping of the linear site on the Fas/APO-1 molecule targeted by the prototypic Anti-Fas mAb. *Int. Immunol.* **7**: 1967-1975.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M., (2000):** A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**: 85-90.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M., (1992):** Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**: 2207-2216.
- Favre-Felix, N., Fromentin, A., Hammann, A., Solary, E., Martin, F. and Bonnotte, B., (2000):** The tumor counterattack hypothesis revisited: colon cancer cells do not induce T cell apoptosis via the Fas (CD95, APO-1) pathway. *J. Immunol.* **164**: 5023-5027.
- Ferguson, T. A. and Griffith, T. S., (1997):** Cell death and the immune response: a lesson from the privileged. *J Clin. Immunol.* **17**(1): 1-10.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., *et al.*, (1996):** In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 7464-7469.
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J. and Puck, J. M., (1995):** Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**: 935-946.
- Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G. and Dammacco, F., (2001):** Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* **97**: 483-489.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K. M., (1997):** The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **57**: 3823-3829.
- Galle, P. R., Hofmann, W. J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Runkel, L., (1995):** Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.* **182**: 1223-1230.
- Gastman, B. R., Atarshi, Y., Reichert, T. E., Saito, T., Balkir, L., Rabinowich, H. and Whiteside, T. L., (1999):** Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res.* **59**: 5356-5364.
- Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R. and Galluzzo, A., (1997):** Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**: 960-963.
- Goldwasser, F., Bae, I., Fornace, A. J., Jr. and Pommier, Y., (1996):** Differential GADD45, p21CIP1/WAF1, MCL-1 and topoisomerase II gene induction and secondary DNA fragmentation after camptothecin-induced DNA damage in two mutant p53 human colon cancer cell lines. *Oncol. Res.* **8**: 317-323.
- Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M. and Wallach, D., (1997):** CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.* **272**: 19641-19644.
- Gong, L., Kamitani, T., Fujise, K., Caskey, L. S. and Yeh, E. T., (1997):** Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. *J. Biol. Chem.* **272**: 28198-28201.
- Gratas, C., Tohma, Y., Van Meir, E. G., Klein, M., Tenan, M., Ishii, N., Tachibana, O., Kleihues, P. and Ohgaki, H., (1997):** Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain. Pathol.* **7**: 863-869.
- Green, D. R., (1997):** A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* **278**(5341): 1246-1247.
- Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R. and Ferguson, T. A., (1995):** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**: 1189-1192.
- Griffith, T. S., Yu, X., Herndon, J. M., Green, D. R. and Ferguson, T. A., (1996):** CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* **5**: 7-16.

- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S. J., (1999):** Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* **274**: 1156-1163.
- Gruss, H. J. and Dower, S. K., (1995):** The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol. Ther.* **1**: 75-105.
- Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M. and Paraskeva, C., (1994):** BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* **9**: 3367-3370.
- Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H. R. and Tschopp, J., (1996):** Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur. J. Immunol.* **26**: 721-724.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornard, T., Fontana, A., Lienard, D., et al., (1996):** Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**: 1363-1366.
- Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M. and 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**: 11333-11338.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. and Sasada, M., (1998):** Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **187**: 587-600.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S. and Nolan, G. P., (1998):** Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* **8**: 461-471.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J., (1997):** The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 155-156.
- Horan, P. K. and Slezak, S. E., (1989):** Stable cell membrane labelling. *Nature* **340**(6229): 167-168.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V. M., (1997):** I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 17255-17257.
- Hug, H., Strand, S., Grambihler, A., Galle, J., Hack, V., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R., (1997):** Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95-Ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 28191-28193.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G., (1997):** CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 10717-10722.
- Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H. R., Sadoul, R., Becherer, J. D., Proudfoot, A., Solari, R. and Tschopp, J., (1995):** Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J. Exp. Med.* **181**: 1917-1922.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al., (1997):** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S., (1993):** A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**: 10932-10937.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y. and Nagata, S., (1993):** Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* **151**: 621-627.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S., (1991):** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243.
- Jarry, A., Vallette, G., Cassagnau, E., Moreau, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Letessier, E., Le Neel, J. C., Galmiche, J. P. and Labois, C. L., (1999):** Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer. *Gut* **45**: 246-251.
- Janeway, A. and Travers, P. (1997):** Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. *Current Biology Ltd., Garland Publishing Inc.*
- Jones, E. Y., Stuart, D. I. and Walker, N. P., (1992):** Crystal structure of TNF. *Immunol. Ser.* **56**: 93-127.
- Jones, H. W., Grogono, J. and Hoare, A. M., (1988):** Surveillance in ulcerative colitis: burdens and benefit. *Gut* **29**: 325-331.

- Kayagaki, N.,** Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H., (1995): Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* **182**: 1777-1783.
- Kataoka, T.,** Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J. and Tschopp, J., (1998): FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* **161**: 3936-3942.
- Kerr, J. F.,** Wyllie, A. H. and Currie, A. R., (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Khar, A.,** Varalakshmi, C., Pardhasaradhi, B. V., Mubarak Ali, A. and Kumari, A. L., (1998): Depletion of the natural killer cell population in the peritoneum by AK-5 tumor cells overexpressing fas-ligand: a mechanism of immune evasion. *Cell. Immunol.* **189**: 85-91.
- Kim, Y. S.,** Kim, K. H., Choi, J. A., Lee, J. H., Kim, H. K., Won, N. H. and Kim, I., (2000): Fas (APO-1/CD95) ligand and Fas expression in renal cell carcinomas: correlation with the prognostic factors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**: 687-693.
- Kischkel, F. C.,** Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**: 5579-5588.
- Kojima, H.,** Shinohara, N., Hanaoka, S., Someya-Shirota, Y., Takagaki, Y., Ohno, H., Saito, T., Katayama, T., Yagita, H., Okumura, K., *et al.*, (1994): Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **1**: 357-364.
- Koopman, G.,** Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. H., (1994): Annexin-V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-1420.
- Kozak, M.,** (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- Krajewska, M.,** Moss, S. F., Krajewski, S., Song, K., Holt, P. R. and Reed, J. C., (1996): Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* **56**: 2422-2427.
- Kroemer, G.,** Zamzami, N. and Susin, S. A., (1997): Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**: 44-51.
- Kubota, Y.,** Sunouchi, K., Ono, M., Sawada, T. and Muto, T., (1992): Local immunity and metastasis of colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* **35**: 645-650.
- Kume, T.,** Oshima, K., Yamashita, Y., Shirakusa, T. and Kikuchi, M., (1999): Relationship between Fas-ligand expression on carcinoma cell and cytotoxic T-lymphocyte response in lymphoepithelioma-like cancer of the stomach. *Int. J. Cancer* **84**: 339-343.
- Lacronique, V.,** Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., *et al.*, (1996): Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an Anti-Fas antibody in mice. *Nat. Med.* **2**: 80-86.
- Leithauser, F.,** Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and 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**: 415-429.
- Levine, A. J.,** (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3): 323-331.
- Li, F.,** Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J. and Fritz, L. C., (1997): Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **272**: 30299-30305.
- Li, H.,** Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J., (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Li, P.,** Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X., (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Li, Y.,** Kanki, H., Hachiya, T., Ohyama, T., Irie, S., Tang, G., Mukai, J. and Sato, T., (2000): Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int. J. Cancer* **87**: 473-479.

- Lichter, P., Walczak, H., Weitz, S., Behrmann, I. and Krammer, P. H., (1992):** The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19. *Genomics* **14**: 179-180.
- Liles, W. C., Kiener, P. A., Ledbetter, J. A., Aruffo, A. and Klebanoff, S. J., (1996):** Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* **184**: 429-440.
- Liu, Q. A. and Hengartner, M. O., (1999):** The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann. N Y Acad. Sci.* **887**: 92-104.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C. and Tschopp, J., (1994):** Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* **370**: 650-652.
- Machl, A. W., Planitzer, S. A. and Kubbies, M., (1997):** I-NGFR receptor is a new flow cytometric tool for rapid cell cycle-correlated gene therapy complementation studies in viable cells. *Cytometry* **29**: 371-374.
- Mandal, M., Maggirwar, S. B., Sharma, N., Kaufmann, S. H., Sun, S. C. and Kumar, R., (1996):** Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 30354-30359.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. and Ferrone, S., (2000):** Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* **74**: 181-273.
- McLeod, H. L., McKay, J. A., Collie-Duguid, E. S. and Cassidy, J., (2000):** Therapeutic opportunities from tumour biology in metastatic colon cancer. *Eur. J. Cancer* **36**: 1706-1712.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (1997):** FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **16**: 2794-2804.
- Memon, S. A., Moreno, M. B., Petrak, D. and Zacharchuk, C. M., (1995):** Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J. Immunol.* **155**: 4644-4652.
- Midis, G. P., Shen, Y. and Owen-Schaub, L. B., (1996):** Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer Res.* **56**: 3870-3874.
- Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. and Thompson, C. B., (1997):** Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**: 353-357.
- Moller, P., Koretz, K., Leithauser, F., Bruderlein, S., Henne, C., Quentmeier, A. and Krammer, P. H., (1994):** Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer* **57**: 371-377.
- Montel, A. H., Bochan, M. R., Hobbs, J. A., Lynch, D. H. and Brahmi, Z., (1995):** Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell. Immunol.* **166**: 236-246.
- Moreno, M. B., Memon, S. A. and Zacharchuk, C. M., (1996):** Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **157**: 3845-3849.
- Moretti, S., Pinzi, C., Berti, E., Spallanzani, A., Chiarugi, A., Boddi, V., Reali, U. M. and Giannotti, B., (1997):** In situ expression of transforming growth factor beta is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and beta 3 integrin expression. *Melanoma Res.* **7**: 313-321.
- Mullauer, L., Mosberger, I. and Chott, A., (1998):** Fas ligand expression in nodal non-Hodgkin's lymphoma. *Mod. Pathol.* **11**: 369-375.
- Mullauer, L., Mosberger, I., Grusch, M., Rudas, M. and Chott, A., (2000):** Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. *J. Pathol.* **190**: 20-30.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R., (1997):** Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* **99**: 403-413.
- Muzio, M., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M., (1997):** FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* **272**: 2952-2956.
- Nagata, S., (1997):** Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365.
- Nagata, S. and Golstein, P., (1995):** The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456.

- Niehans, G. A., Brunner, T., Frizelle, S. P., Liston, J. C., Salerno, C. T., Knapp, D. J., Green, D. R. and Kratzke, R. A., (1997):** Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* **57**: 1007-1012.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1997):** The Fas counterattack: a molecular mechanism of tumor immune privilege. *Mol. Med.* **3**: 294-300.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1999):** Resistance to Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis and expression of Fas ligand in esophageal cancer: the Fas counterattack. *Dis. Esophagus* **12**: 83-89.
- O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1999):** Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**: 457-463.
- O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K. and Shanahan, F., (1996):** The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* **184**: 1075-1082.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., et al., (1992):** Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **267**: 10709-10715.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M. and Yeh, E. T., (1996):** Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J. Immunol.* **157**: 4277-4281.
- Ozoren, N., Kim, K., Burns, T. F., Dicker, D. T., Moscioni, A. D. and El-Deiry, W. S., (2000):** The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [In Process Citation]. *Cancer Res.* **60**: 6259-6265.
- Pan, G., O'Rourke, K. and Dixit, V. M., (1998):** Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 5841-5845.
- Peter, M. E., Kischkel, F. C., Scheuerpflug, C. G., Medema, J. P., Debatin, K. M. and Krammer, P. H., (1997):** Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1207-1212.
- Phillips, T. A., Ni, J., Pan, G., Ruben, S. M., Wei, Y. F., Pace, J. L. and Hunt, J. S., (1999):** TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J. Immunol.* **162**(10): 6053-6059.
- Piancatelli, D., Romano, P., Sebastiani, P., Adorno, D. and Casciani, C. U., (1999):** Local expression of cytokines in human colorectal carcinoma: evidence of specific interleukin-6 gene expression. *J. Immunother.* **22**: 25-32.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., et al., (1998):** Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**: 699-703.
- Plumas, J., Jacob, M. C., Chaperot, L., Molens, J. P., Sotto, J. J. and Bensa, J. C., (1998):** Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis. *Blood* **91**: 2875-2885.
- Quan, L. T., Caputo, A., Bleackley, R. C., Pickup, D. J. and Salvesen, G. S., (1995):** Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J. Biol. Chem.* **270**: 10377-10379.
- Que, F. G., Phan, V. A., Phan, V. H., Celli, A., Batts, K., LaRusso, N. F. and Gores, G. J., (1999):** Cholangiocarcinomas express Fas ligand and disable the Fas receptor. *Hepatology* **30**: 1398-1404.
- Rabinowich, H., Reichert, T. E., Kashii, Y., Gastman, B. R., Bell, M. C. and Whiteside, T. L., (1998):** Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **101**: 2579-2588.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C. and Perucho, M., (1997):** Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**: 967-969.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al., (1998):** Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* **5**: 271-288.

- Ray**, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. and Pickup, D. J., (1992): Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* **69**: 597-604.
- Reed**, J. C., (1995): Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.* **7**: 541-546.
- Refaeli**, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J. and Abbas, A. K., (1998): Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**: 615-623.
- Reuther**, J. Y. and Baldwin, A. S., Jr., (1999): Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of I κ B α that functions as a stable inhibitor of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **274**: 20664-20670.
- Rieux-Laucat**, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A. and de Villartay, J. P., (1995): Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**: 1347-1349.
- Rothe**, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M. and Goeddel, D. V., (1995): The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**: 1243-1252.
- Roy**, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C., (1997): The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**: 6914-6925.
- Saas**, P., Walker, P. R., Hahne, M., Quiquerez, A. L., Schnuriger, V., Perrin, G., French, L., Van Meir, E. G., de Tribolet, N., Tschopp, J., *et al.*, (1997): Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J. Clin. Invest.* **99**: 1173-1178.
- Saleh**, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R. and Alnemri, E. S., (1999): Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **274**: 17941-17945.
- Sanger**, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-5467.
- Sato**, T., Irie, S., Kitada, S. and Reed, J. C., (1995): FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**: 411-415.
- Savill**, J., Dransfield, I., Hogg, N. and Haslett, C., (1990): Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**: 170-173.
- Savill**, J., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, C., (1993): Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* **14**: 131-136.
- Scaffidi**, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**: 1675-1687.
- Scaffidi**, C., Medema, J. P., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (1997): FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J. Biol. Chem.* **272**: 26953-26958.
- Scaffidi**, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (1999): The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 1541-1548.
- Schendel**, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J. C., (1997): Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 5113-5118.
- Schlossmann**, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harkan, J. M., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, R., Springer, T., Tedder, T. F. and Todd, R. F., (1995) Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. *Proceedings of the Fifth International Workshop and Conference* **1**, Oxford Univ. Press, London
- Schmitz**, I., Walczak, H., Krammer, P. H. and Peter, M. E., (2000): The two CD95 apoptosis signaling pathways may be a way of cells to respond to different amounts and/or forms of CD95-Ligand produced in different tissues. *Cell Death Differ.* **7**: 756-758.
- Schneider**, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. and Tschopp, J., (1998): Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* **187**: 1205-1213.
- Schneider**, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. and Tschopp, J., (1997): TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* **7**: 831-836.

- Schulze-Osthoff**, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M. E., (1998): Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**: 439-459.
- Seino**, K., Kayagaki, N., Okumura, K. and Yagita, H., (1997): Antitumor effect of locally produced CD95-Ligand. *Nat. Med.* **3**: 165-170.
- Shimizu**, M., Fontana, A., Takeda, Y., Yagita, H., Yoshimoto, T. and Matsuzawa, A., (1999): Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected neuroblastoma neuro-2a cells. *J. Immunol.* **162**: 7350-7357.
- Shiraki**, K., Tsuji, N., Shioda, T., Isselbacher, K. J. and Takahashi, H., (1997): Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 6420-6425.
- Shu**, H. B., Halpin, D. R. and Goeddel, D. V., (1997): Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**: 751-763.
- Siegel**, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J. and Lenardo, M. J., (1998): Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J. Cell Biol.* **141**: 1243-1253.
- Smyth**, M. J., Strobl, S. L., Young, H. A., Ortaldo, J. R. and Ochoa, A. C., (1991): Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* **146**: 3289-3297.
- Spencer**, C. A. and Groudine, M., (1991): Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* **56**: 1-48.
- Srinivasula**, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. and Alnemri, E. S., (1996): Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 14486-14491.
- Srinivasula**, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., *et al.*, (1997): FLAME-1, a novel FADD-like Anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 18542-18545.
- Strand**, S. and Galle, P. R., (1998): Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol. Med. Today* **4**: 63-68.
- Strand**, S., Hofmann, W. J., Grambihler, A., Hug, H., Volkmann, M., Otto, G., Wesch, H., Mariani, S. M., Hack, V., Stremmel, W., *et al.*, (1998): Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat. Med.* **4**: 588-593.
- Strand**, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R., (1996): Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* **2**: 1361-1366.
- Strasser**, A., O'Connor, L. and Dixit, V. (2000): Apoptosis-Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 217-245.
- Stuart**, P. M., Griffith, T. S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X. and Ferguson, T. A., (1997): CD95-Ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest.* **99**: 396-402.
- Suda**, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S., (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**: 1169-1178.
- Takahashi**, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. and Nagata, S., (1994): Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976.
- Takahashi**, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. and Nagata, S., (1994): Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* **6**: 1567-1574.
- Tamura**, T., Aoyama, N., Saya, H., Haga, H., Futami, S., Miyamoto, M., Koh, T., Ariyasu, T., Tachi, M., Kasuga, M., *et al.*, (1995): Induction of Fas-mediated apoptosis in p53-transfected human colon carcinoma cells. *Oncogene* **11**(10): 1939-1946.
- Tan**, K. O., Tan, K. M. and Yu, V. C., (1999): A novel BH3-like domain in BID is required for intramolecular interaction and autoinhibition of pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 23687-23690.
- Tanaka**, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S., (1998): Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* **4**: 31-36.

- Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., et al.**, (1996): Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* **2**: 317-322.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. and Goeddel, D. V.**, (1993): A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**: 845-853.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meink, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., et al.**, (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. and Krammer, P. H.**, (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301-305.
- Ungefroren, H., Voss, M., Bernstorff, W. V., Schmid, A., Kremer, B. and Kalthoff, H.**, (1999): Immunological escape mechanisms in pancreatic carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **880**: 243-251.
- Ungefroren, H., Voss, M., Jansen, M., Roeder, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B. and Kalthoff, H.**, (1998): Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* **58**: 1741-1749.
- Vanhaesebroeck, B., Reed, J. C., De Valck, D., Grooten, J., Miyashita, T., Tanaka, S., Beyaert, R., Van Roy, F. and Fiers, W.**, (1993): Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene* **8**: 1075-1081.
- Vaux, D. L.**, (1997): CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* **90**: 389-390.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C.**, (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin-V. *J. Immunol. Methods* **184**: 39-51.
- Villunger, A., Egle, A., Marschitz, I., Kos, M., Bock, G., Ludwig, H., Geley, S., Kofler, R. and Greil, R.**, (1997): Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood* **90**: 12-20.
- Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., et al.**, (1994): Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**: 343-352.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. and Itakura, K.**, (1979): Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* **6**: 3543-3557.
- Wallach, D., Kovalenko, A. V., Varfolomeev, E. E. and Boldin, M. P.**, (1998): Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 279-288.
- Walsh, C. M., Glass, A. A., Chiu, V. and Clark, W. R.**, (1994): The role of the Fas lytic pathway in a perforin-less CTL hybridoma. *J. Immunol.* **153**(6): 2506-2514.
- Wang, J., Lobito, A. A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A. and Lenardo, M. J.**, (2000): Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur. J. Immunol.* **30**: 155-163.
- Wang, R., Rogers, A. M., Rush, B. J. and Russell, J. H.**, (1996): Induction of sensitivity to activation-induced death in primary CD4⁺ cells: a role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **26**: 2263-2270.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S.**, (1992): Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**: 314-317.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S.**, (1992): The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* **148**: 1274-1279.
- Watson, A. J., Merritt, A. J., Jones, L. S., Askew, J. N., Anderson, E., Beccioli, A., Balzi, M., Potten, C. S. and Hickman, J. A.**, (1996): Evidence of reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Br. J. Cancer* **73**: 889-895.
- Weiss, A., Manger, B. and Imboden, J.**, (1986): Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells. *J. Immunol.* **137**: 819-825.

- Wels**, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B. and Hynes, N. E., (1992): Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res.* **52**: 6310-6317.
- Wojtowicz-Praga**, S., (1997): Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J. Immunother.* **20**: 165-177.
- Wyllie**, A. H., (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Wyllie**, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R., (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Wyllie**, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. and Dunlop, D., (1984): Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142**: 67-77.
- Yagita**, H., Hanabuchi, S., Asano, Y., Tamura, T., Nariuchi, H. and Okumura, K., (1995): Fas-mediated cytotoxicity—a new immunoregulatory and pathogenic function of Th1 CD4+ T cells. *Immunol. Rev.* **146**: 223-239.
- Yanagisawa**, J., Takahashi, M., Kanki, H., Yano-Yanagisawa, H., Tazunoki, T., Sawa, E., Nishitoba, T., Kamishohara, M., Kobayashi, E., Kataoka, S., *et al.*, (1997): The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 8539-8545.
- Yonehara**, S., Ishii, A. and Yonehara, M., (1989): A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **169**: 1747-1756.
- Yu**, K. Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R. and Kwon, B. S., (1999): A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 13733-13736.
- Yuan**, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R., (1993): The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**: 641-652.
- Zaks**, T. Z., Chappell, D. B., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P., (1999): Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J. Immunol.* **162**: 3273-3279.
- Zamzami**, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Marse, B. and Kroemer, G., (1996a): Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* **384**: 53-57.
- Zamzami**, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G., (1996b): Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**: 1533-1544.
- Zhang**, X. D., Nguyen, T., Thomas, W. D., Sanders, J. E. and Hersey, P., (2000): Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett.* **482**: 193-199.
- Zhao**, S., Asgary, Z., Wang, Y., Goodwin, R., Andreeff, M. and Younes, A., (1999): Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells. *Br. J. Haematol.* **106**: 827-832.
- Zou**, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X., (1997): Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**: 405-413.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Absorption
AICD	durch Aktivierung induzierter Zelltod (<i>activation-induced cell death</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Bisacrylamid (Bis)	N,N'-Methylenbisacrylamid
BrdU	Brom-2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD95L	CD95-Ligand
cDNS (cDNA)	komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
CDP*	Disodium-2-Chloro-5-(4-Methoxyspiro[1,2-Dioxetan-3,2'(5'-Chloro)-Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan]-4-yl-Phenylphosphat
c-FLIP	<i>cellular FLICE (FADD-like interleukin-1β converting enzyme)-inhibitory protein</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRD	Cystein-reiche Domäne
CTL	zytotoxische(r) T-Lymphozyt(en) (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
D-Domäne (DD)	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DE-Domäne (DED)	<i>death effector domain</i>
DISC	Zelltod-induzierender Signalkomplex (<i>death-inducing signaling complex</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with a death domain</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS (FCS)	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1β converting enzyme</i>
xg	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LNGFR	Niedrig-affiner Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptors (<i>low-affinity nerve growth factor receptor</i>)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MoMLV	Moloney Maus Leukämievirus
mRNS (mRNA)	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
Neo	Neomycinphosphotransferase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethansulfonyl-Fluorid
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rCD95L	rekombinantes CD95-Ligand-Protein
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Rothwell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkription oder Raumtemperatur
SV40	Simianvirus 40
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten (<i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>)
TK	Thymidin-Kinase
TNF(-R)	Tumor-Nekrose-Faktor(-Rezeptor)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-Benziden
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Enzymeinheit (Unit)
UT	untranslatierte Region oder untransduziert
UV	Ultraviolett
x	mal oder transduziert mit

8.2 Vergleich der Protein-Sequenzen von FLIP-Proteinen und Caspase-8

Dargestellt ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen c-FLIP-Proteins (hc-FLIP) und des c-FLIP-Proteins der Maus (mc-FLIP) mit dem v-FLIP des Pferdeherpesvirus 2 (EHV2) und Caspase-8. Aminosäure-Identitäten von > 50 % sind schwarz unterlegt. Nicht-homologe Aminosäurebereiche sind durch einen Punkt (.) dargestellt.

Die Aminosäuren, die das katalytische Zentrum des Caspase-8-Proteins bilden (Histidin: Aminosäureposition 317; Glycin: Aminosäureposition 318; Cystein: Aminosäureposition 360), wurden eingerahmt und mit einem Stern gekennzeichnet. Im Gegensatz zu Caspase-8 besitzt c-FLIP_L keine proteolytische Aktivität. Dies beruht auf dem Austausch der Aminosäuren Histidin und Cystein der katalytischen Triade des Caspase-8-Proteins durch die Aminosäuren Arginin

(Aminosäureposition 117 in hc-FLIP) bzw. Leucin (Aminosäureposition 117 mc-FLIP) und Tyrosin (Aminosäureposition 360 in hc-FLIP und mc-FLIP). Der Beginn und das Ende der DE-Domänen und der Untereinheiten (UE) der Caspasen-Domäne sind gekennzeichnet.

	----- DE-Domäne I -----	
v-FLIP (EHV2)MSHYSMIDTYFSLEDEDEFTYLYLCRDLLKKN..GEFQCTRDFAKFLSDYACLSAAN...QMELLEFRVGR	65
hc-FLIP _LMSAEVIHQVEEALDTEDEKEMLLFLCRDVAIDV...VPPNVRDLDLIRERGLKLSVGD...LAELLYRVRR	64
mc-FLIP _L	MAQSPVSAEVIHQVEECLDEDEKEMMLFLCRDVTENL...AAPNVRDLDLSLSEKGLSIFAT...LAELLYRVRR	69
Caspase-8	...MDFSRNLYDIGEQLDSEDLASLKFSLSDYIPQRKQEPKIDALMDFQRLOEKRMLESNLSFLKELLEFRINR	71
	----- DE-Domäne II -----	
v-FLIP (EHV2)	LDLIRRFQGWTPDSCPR..YMPICSPFRCLMALVNDFLSDKEVEEMYFLCAPRLESHLEPGSKKSFRLRLAS	137
hc-FLIP _L	FDLLKRILKMDRKAVETHLL..RNPHLVSDYRVLMAETGEDLDKSDVSSLIFLMKDYMGGR.GKISKEKSFDDLIVV	136
mc-FLIP _L	FDLLKRILKTDKATVEDHLR..RNPHLVSDYRVLMEIGESLDQNDVSSLVFLTRDYTGR.GKIAKDKSFLDLVI	141
Caspase-8	LDDLITVLRNT.RKEEMERELQTPGRAQISAYRVMLYQISEEVSRSELRSFKFLQEEISK.CKLDLDDMNLDDIFI	144

v-FLIP (EHV2)	LLEDLELGGDKLTFRLRHLTTGRADLVKNLQV	171
hc-FLIP _L	ELEKLNIVAPDQDLLEKCLKNTHRIDTKTKIQYKQSVQGAGTSYRNVLQAAIQK SLKDPSNFRHLHNGRSKE	210
mc-FLIP _L	ELEKLNIVASDQNLLEKCLKNTHRIDNTKIQYKQSSQGA.RSNMNTLQASLPKLSIK...YNSRLQNGRSKE	212
Caspase-8	EMEKRVILGEGKLDILKRVCAQINK.SILKIINDYEEFS.....KERSSLEGGSPD	194

hc-FLIP _L	QRLKEQLGAQQEPVKKSIQSEAFLPQSIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNE.....TELLRDTFTSLG	275
mc-FLIP _L	PRFVEYRDSQRTLVKTSIQESGAFPPHIREETRYMQSKPLGICLIIDCIGND.....TKYLQETFTSLG	277
Caspase-8	EFSNGEELCGVMTISDSPREQDSESQ..TLDKVMQMKSKPRGYCLIIINHNFAKAREKVPKLHSIRDRNGTHLDA	267
	----- große UE der Caspasen-Domäne -----	
hc-FLIP _L	YEVQKFLH.....LSMHGISQLGQFACMPHRDYDSEFVQVLSVSRGGSQSVYGVQDTHSGLPLHHIRRM	339
mc-FLIP _L	YHIQLFLF.....PKSHDITQIVRRYASMAHQDYDSFACVLVSLGGSQSMGGRDQVHSGFSLDHVKNM	341
Caspase-8	GALTTTTFEELHFEIKPHDDCTVEQIYELKIYQL MDHSNMDCHICILSHGDKGIYVETDGGQEP..PIYELTSQ	339

hc-FLIP _L	FMCDSCPYLAGKPKMFFIQNYVVSEGLDSSLEVDGPMKNVEFKAQKRGGLCTVHREADFFWSLCTADMSLLE	414
mc-FLIP _L	FTGDTCPSLRGGPKLFFIQNYESLGSQLEDSS.LEVDGPSIKNVDSKPLQPRHCTTHPEADIFWSLCTADVSHLE	415
Caspase-8	FTGLKCPSLAGKPKVFFIQACQGDN..YQKGIPEVETDSEEQPYLEMDLSSPQTRYIPDEADFFLLGMATVNNCVSY	412
	----- kleine UE der Caspasen-Domäne -----	
hc-FLIP _L	QSHSSPSLYLQCTISOKLRQERKRPLLDLHIELNGMYDWNRSVSAK..EKYYVWLQHTLRKKLILSYT	480
mc-FLIP _L	KPSSSSSVYLQKLSQQLKQGRRLPLVDLHVELMDKVYAWNSGVSSK..EKYLSLQHTLRKKLILAPT	481
Caspase-8	RNPAEGTWYIQSLMOSLRERCR.GDDLTLITLFEVNYEVSNKDDKKNMGKQMPQPTFTLRKKLVFSPD	479

8.3 cDNS- und Protein-Sequenz der klonierten c-FLIP_L-cDNS

In der Sequenz sind die eingeführten *Sal* I- und *Bgl* II-Restriktionsenzymerspezifische Sequenzen kursiv dargestellt. Die Konsensussequenz der Kozak-Translationsinitiationsstelle wurde fett gedruckt. Das Start- und Stop-Kodon wurde schwarz umrahmt. Die am 3' Ende des offenen Leserahmens von c-FLIP_L angefügte *c-myc*-Peptidsequenz wurde schwarz, die für die Klonierung verwendeten Primer grau unterlegt.

1	GTC GAC GCC ACC ATG	TCT GCT GAA GTC ATC CAT CAG	GTT GAA GAA GCA CTT GAT ACA GAT	60
1	M S A E V I H Q	V E E A L D T D		16
61	GAG AAG GAG ATG CTG CTC TTT TTG TGC CGG GAT GTT GCA ATA GAT GTG GTT CCA CCT AAT			120
17	E K E M L L F L C R D V A I D V V P P N			36
121	GTC AGG GAC CTT CTG GAT ATT TTA CGG GAA AGA GGT AAG CTG TCT GTC GGG GAC TTG GCT			180
37	V R D L L D I L R E R G K L S V G D L A			56
181	GAA CTG CTC TAC AGA GTG AGG CGA TTT GAC CTG CTC AAA CGT ATC TTG AAG ATG GAC AGA			240
57	E L L Y R V R R F D L L K R I L K M D R			76
241	AAA GCT GTG GAG ACC CAC CTG CTC AGG AAC CCT CAC CTT GTT TCG GAC TAT AGA GTG CTG			300
77	K A V E T H L L R N P H L V S D Y R V L			96
301	ATG GCA GAG ATT GGT GAG GAT TTG GAT AAA TCT GAT GTG TCC TCA TTA ATT TTC CTC ATG			360
97	M A E I G E D L D K S D V S S L I F L M			116
361	AAG GAT TAC ATG GGC CGA GGC AAG ATA AGC AAG GAG AAG AGT TTC TTG GAC CTT GTG GTT			420
117	K D Y M G R G K I S K E K S F L D L V V			136
421	GAG TTG GAG AAA CTA AAT CTG GTT GCC CCA GAT CAA CTG GAT TTA TTA GAA AAA TGC CTA			480
137	E L E K L N L V A P D Q L D L L E K C L			156
481	AAG AAC ATC CAC AGA ATA GAC CTG AAG ACA AAA ATC CAG AAG TAC AAG CAG TCT GTT CAA			540
157	K N I H R I D L K T K I Q K Y K Q S V Q			176
541	GGA GCA GGG ACA AGT TAC AGG AAT GTT CTC CAA GCA GCA ATC CAA AAG AGT CTC AAG GAT			600
177	G A G T S Y R N V L Q A A I Q K S L K D			196
601	CCT TCA AAT AAC TTC AGG CTC CAT AAT GGG AGA AGT AAA GAA CAA AGA CTT AAG GAA CAG			660
197	P S N N F R L H N G R S K E Q R L K E Q			216
661	CTT GGC GCT CAA CAA GAA CCA GTG AAG AAA TCC ATT CAG GAA TCA GAA GCT TTT TTG CCT			720
217	L G A Q Q E P V K K S I Q E S E A F L P			236
721	CAG AGC ATA CCT GAA GAG AGA TAC AAG ATG AAG AGC AAG CCC CTA GGA ATC TGC CTG ATA			780
237	Q S I P E E R Y K M K S K P L G I C L I			256
781	ATC GAT TGC ATT GGC AAT GAG ACA GAG CTT CTT CGA GAC ACC TTC ACT TCC CTG GGC TAT			840
257	I D C I G N E T E L L R D T F T S L G Y			276
841	GAA GTC CAG AAA TTC TTG CAT CTC AGT ATG CAT GGT ATA TCC CAG ATT CTT GGC CAA TTT			900
277	E V Q K F L H L S M H G I S Q I L G Q F			296
901	GCC TGT ATG CCC GAG CAC CGA GAC TAC GAC AGC TTT GTG TGT GTC CTG GTG AGC CGA GGA			960
297	A C M P E H R D Y D S F V C V L V S R G			316
961	GGC TCC CAG AGT GTG TAT GGT GTG GAT CAG ACT CAC TCA GGG CTC CCC CTG CAT CAC ATC			1020
317	G S Q S V Y G V D Q T H S G L P L H H I			336
1021	AGG AGG ATG TTC ATG GGA GAT TCA TGC CCT TAT CTA GCA GGG AAG CCA AAG ATG TTT TTT			1080
337	R R M F M G D S C P Y L A G K P K M F F			356
1081	ATT CAG AAC TAT GTG GTG TCA GAG GGC CAG CTG GAG GAC AGC AGC CTC TTG GAG GTG GAT			1140
357	I Q N Y V V S E G Q L E D S S L L E V D			376
1141	GGG CCA GCG ATG AAG AAT GTG GAA TTC AAG GCT CAG AAG CGA GGG CTG TGC ACA GTT CAC			1200
377	G P A M K N V E F K A Q K R G L C T V H			396
1201	CGA GAA GCT GAC TTC TTC TGG AGC CTG TGT ACT GCG GAC ATG TCC CTG CTG GAG CAG TCT			1260
397	R E A D F F W S L C T A D M S L L E Q S			416
1261	CAC AGC TCA CCA TCC CTG TAC CGG CAG TGC CTC TCC CAG AAA CTG AGA CAA GAA AGA AAA			1320
417	H S S P S L Y R Q C L S Q K L R Q E R K			436
1321	CGC CCA CTC CTG GAT CTT CAC ATT GAA CTC AAT GGC TAC ATG TAT GAT TGG AAC AGC AGA			1380
437	R P L L D L H I E L N G Y M Y D W N S R			456
1381	GTT TCT GCC AAG GAG AAA TAT TAT GTC TGG CTG CAG CAC ACT CTG AGA AAG AAA CTT ATC			1440
457	V S A K E K Y Y V W L Q H T L R K K L I			476
1441	CTC TCC TAC ACA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TAA	AGA TCT		1494
477	L S Y T E Q K L I S E E D L I			491

8.4 Vektorkarte und cDNS-/Protein-Sequenz der klonierten LNGFR-cDNS

Als Ausgangsvektor für die Amplifikation des niedrig-affinen Nerven-Wachstumsfaktor-Rezeptors (*low affinity nerve growth factor receptor*, LNGFR) wurde das Plasmid pLDNS-TK-*opa*, das auf dem retroviralen Moloney Maus Leukämie Virus-Vektor pLXSN basiert, eingesetzt.

Das LNGFR-Gen kodiert für eine verkürzte Form des LNGF-Rezeptors (Machl *et al.*, 1997), dessen zytoplasmatische Domäne deletiert wurde, und eignet sich somit als Reporter gen für eine erfolgte Transfektion und Transduktion von Zellen. Der pLDNS-TK-*opa*-Expressionsvektor enthält neben dem viralen Promotor in der 5' LTR (*long terminal repeat*)-Region den SV40-Promotor. In den Vektor wurde zusätzlich die kodierende Sequenz des Thymidin-Kinase (TK)-Gens einkloniert.

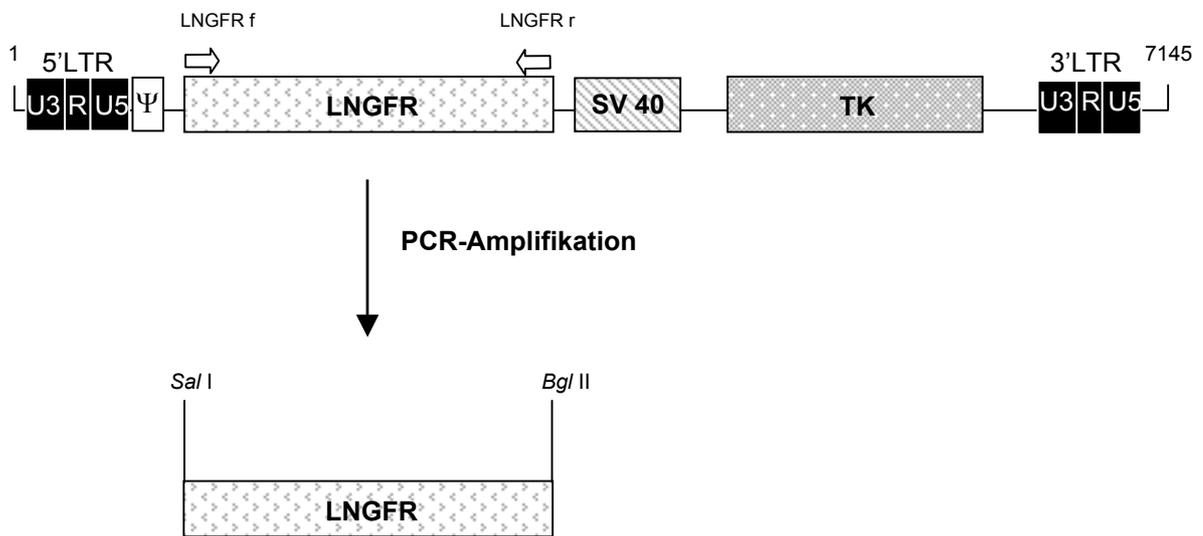


Abbildung 47: Vektorkarte des retroviralen Expressionsvektors pLDNS-TK-*opa* mit einklonierter LNGFR-cDNS-Sequenz

LTR: *long terminal repeat*; **U:** untranslatierte Region; **R:** *repeat*; **Ψ:** Verpackungssignal; **LNGFR:** *low affinity nerve growth factor receptor*-cDNS; **TK:** Thymidin-Kinase-cDNS

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, 18. April 2001

(Unterschrift)

Publikationen und Vorträge

Gansneder, B., Woelle, S.: ‚c-FLIP blocks diverse apoptosis responses mediated by agonistic antibody and CD95L‘ (zur Publikation eingereicht)

Gansneder, B., Woelle, S.: ‚Rescue of T-cells from apoptosis induced by CD95L-expressing colon cancer cells expressing functional CD95 ligand through c-FLIP‘ (zur Publikation eingereicht)

Vortrag: First European Workshop on Cell Death, 21.-25.10.1998, Gran Sasso, Italien

Danksagung

Frau Prof. E. H. Weiß danke ich sehr für die Übernahme des Erstgutachtens, für ihre Betreuung und ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. C. N. David gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats.

Bei den Mitarbeitern der Roche Diagnostics GmbH möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. S. Wölle für die Bereitstellung des interessanten Themas, ihre Anregungen und ihr Interesse am Erfolg des Projekts bedanken. Ich danke ihr auch herzlich dafür, dass mir im Labor alle theoretischen und praktischen Mittel zur Verfügung standen.

Vielen Dank auch an Dr. A. Hekele, der mich besonders in den praktischen Arbeiten betreute und durch sein Interesse und seine Bereitschaft zur Diskussion wesentlich zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat.

Ich danke auch Herrn Prof. M. Kubbies und Herrn Goller aus der Abteilung „TR-BY“, die ein stetes Interesse an meiner Arbeit zeigten und mir durch ihre konstruktive Kritik und ihren fachlichen Rat in Sachen „ Apoptose“ und in zellbiologischen Fragen stets hilfreich zur Seite standen.

Besonders möchte ich mich auch bei allen, zum Teil ehemaligen Laborkolleg(inn)en G. Dietmann, K. Dettmar, P. Heiden, B. Kirchner, L. Lipponer, T. Schnitzer, A. Schmid und natürlich meinen Mitdoktoranden für das gute Arbeitsklima und ihr Interesse an meiner Arbeit bedanken. Es hat mir großen Spaß gemacht, in einem so freundschaftlichen Team zu arbeiten!

Lebenslauf

Geburtstag: 18.06.1970
Geburtsort: Bochum
Familienstand: verheiratet, geb. Dierl

Schulbildung

1977 – 1981 Grundschole, Hösbach
1981 – März 1985 Hanns-Seidel-Gymnasium, Hösbach
03/1985 – 08/1988 Deutsche-Schule-London, London
09/1988 – 1990 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

11/1990 – 03/1996 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
04/1996 – 01/1997 Diplomarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik, Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. E.H. Weiß
Thema der Diplomarbeit:
„Die humane Komplementfaktor H-Genfamilie: Expression, strukturelle und serologische Charakterisierung“
02/1997 – 12/2000 Dissertation an der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. E.H. Weiß zum Thema:
„Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP_L verhindert die CD95-vermittelte Abtötung von T-Zellen durch Tumorzellen mit konstitutiver CD95L-Expression: Ein neuer Ansatz für die Immuntherapie des Kolonkarzinoms “
Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Forschung Penzberg, unter Anleitung von Dr. S. Wölle