

**Modulation von allogenen
Immunantworten durch das
CD95/CD95L System**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Holger J. Dulat

geboren am 16.07.1969 in Mönchengladbach

1999

**Modulation von allogenen
Immunantworten durch das
CD95/CD95L System**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Holger J. Dulat

geboren am 16.07.1969 in Mönchengladbach

1999

Referat: PD Dr. W. Müller

Koreferat: PD Dr. R. Schwinzer

Tag der Promotion: 25. Juni 1999

Datum der Veröffentlichung: 16. Juli 1999

Abstract

Binding of CD95 Ligand (CD95L) to its receptor (CD95) results in CD95 expressing T cells in the induction of apoptosis. Genetic modification of allo- or xenografts leading to ectopic expression of CD95L could therefore be a strategy to protect the graft from being destroyed by apoptosis-susceptible cytotoxic effector cells. Since there were contradicting reports in different *in vivo* models it was the aim of this work to analyze the protective capacities and limitation of this pair of molecules in an *in vitro* system. Therefore the CD95L negative cell line HEK293 was transfected with CD95L cDNA and a clone expressing high levels of CD95L on the cell surface was isolated (293h95L cells). The effects of cocultures of 293h95L and different populations of leukocytes in different states of activation were compared with those of mock-transfected 293 cells (293pcDNA cells).

Coculture of T cells with 293h95L cells for a short period (6-16 h) led to an induction of apoptosis in about 40 % resting and 60-70 % activated T cells. In line with the increasing susceptibility of activated T cells these cells expressed CD95 receptor in higher density on the cell surface. Cultivation of T cells from HLA disparate blood donors with irradiated 293 cells (HLA-A3-positive) plus IL-2 resulted in alloactivation of T cells after 2 days (IL-2 receptor expression). Such activation was independent of CD95L expression of the activating cells. Whereas alloactivation by CD95L⁻ 293pcDNA cells led to the development of specific cytotoxic effector cells (CTLs) no such lymphoblasts with cytotoxic activity could be demonstrated after 7 days when T cells were activated by 293h95L cells. To test the concept of protection of CD95L expressing target cells from destruction by cytotoxic effector cells alloactivated CTLs, IL-2 activated T cells and NK cells were used as effectors. It could be demonstrated that destruction of CD95L⁺ 293h95L cells by allospecific CTLs was markedly reduced compared to mock-transfected cells. The prediction of protection of target by CD95L expression and induction of apoptosis via CD95 receptor could be verified by the detection of massive cell death in the population of T cells. IL-2 activated T cells and NK cells were less susceptible for CD95L-mediated apoptosis and cytolysis of 293 transfectants therefore was not effected by the expression of CD95L.

These data suggest that ectopic expression of CD95L on cells and tissues might be a strategy to modulate allogeneic immune responses. By the expression of CD95L on cells with the capacity to alloactivate T cells (e.g. APCs) it should be possible to inhibit the differentiation of precursor-CTL into allospecific effector CTLs. Furthermore cells can be protected from cytolysis by transfected CD95L. However, before introducing such concept of protection into clinic transplantation it has to be considered that expression of CD95L is capable to inhibit the cytolysis of some but not all cytotoxic effector cells.

KEYWORDS:

apoptosis, Fas/FasL, transplantation immunology

Zusammenfassung

Die Bindung des CD95 Liganden (CD95L) an seinen Rezeptor (CD95) kann bei CD95-exprimierenden T-Zellpopulationen den Tod durch Apoptose auslösen. In der Transplantationssituation ist der CD95L damit ein potentiell protektives Molekül gegenüber zellulären Immunreaktionen. Mit Hilfe eines *in vitro* Modellsystems wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht, ob CD95L zur Modulation von allogenen Immunantworten in der Lage ist. Hierzu wurde die CD95L-negative, humane Nierenzelllinie HEK293 mit CD95L-cDNA transfiziert und ein Klon mit stabil hoher CD95L Expression isoliert (293h95L Zellen). Die Auswirkungen der Kokultur von 293h95L Zellen auf T-Zellen aus unterschiedlichen Aktivierungsstadien wurden verglichen mit den Effekten von 293 Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren (293pcDNA Zellen).

Die kurzzeitige Kultur (6-16 h) von T-Zellen mit 293h95L Zellen führte zur Apoptoseinduktion in ca. 40 % ruhender T-Zellen und in 60-70 % aktivierter T-Zellen. In Übereinstimmung damit exprimierten aktivierte T-Zellen den CD95 Rezeptor in höherer Dichte. Wurden T-Zellen von HLA-differenten Blutspendern mit bestrahlten 293 Zellen (HLA-A3-positiv) plus IL-2 kultiviert, kam es bei Verwendung von 293pcDNA und 293h95L Zellen nach zwei Tagen zunächst zur T-Zellaktivierung (IL-2R Expression). Während die durch 293pcDNA Zellen ausgelöste Alloaktivierung zur Bildung von spezifischen, zytotoxischen Effektorzellen (CTL) führte, konnten in Kulturen von 293h95L Zellen nach 7 Tagen weder Lymphoblasten noch CTL mit Spezifität für 293-Antigene nachgewiesen werden. Um festzustellen, welche Auswirkungen die Expression von CD95L auf die Zerstörung von Zielzellen durch unterschiedliche zytotoxische Effektorzellpopulationen hat, wurden 293h95L und 293pcDNA Zellen als Zielzellen von alloaktivierten CTL, IL-2 aktivierten T-Zellen und NK Zellen eingesetzt. Es zeigte sich, daß die CD95L⁺ 293h95L Transfektante von allospezifischen CTL deutlich schlechter lysiert wurde als 293pcDNA Zellen. Die Hypothese, daß der Schutz der CD95L-exprimierenden Zielzellen auf Apoptoseinduktion in der Effektorpopulation beruht, wurde dadurch bestätigt, daß in Kokulturen von 293h95L Zellen mit alloreaktiven CTL massiver apoptotischer Zelltod in der T-Zellpopulation auftrat. IL-2 aktivierte T-Zellen und NK Zellen waren weniger empfindlich für den CD95L-vermittelten Zelltod und lysierten demzufolge 293h95L und 293pcDNA Zellen in vergleichbarem Umfang.

Aus diesen Ergebnissen wird der Schluß gezogen, daß die gentechnisch erzeugte, ektopische Expression von CD95L auf Zellen und Geweben eine Strategie zur Modulation von allogenen Immunantworten sein kann. Durch Expression von CD95L auf Zellen, die eine Alloaktivierung auslösen können (z.B. Antigen-präsentierende Zellen), sollte es möglich sein, die Differenzierung von Vorläufer-CTL zu allospezifischen Effektor-CTL zu verhindern. Darüber hinaus können Zellen durch CD95L-Expression vor der Zerstörung durch zytotoxische Effektorzellen geschützt werden. Bei einer möglichen Verwendung dieses Konzepts zur Immunmodulation nach klinischer Organtransplantation ist jedoch zu beachten, daß die CD95L Expression anscheinend keinen Schutz vor IL-2 aktivierten T-Zellen und NK Zellen vermitteln kann.

Schlagerworte:

Apoptose, Fas/FasL, Transplantationsimmunology

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Der programmierte Zelltod (Apoptose).....	3
1.3 Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD).....	6
1.4 Der CD95 Rezeptor und sein physiologischer Ligand.....	7
1.5 Das Signal des CD95 Rezeptors.....	10
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Lösungen und Puffer.....	13
2.2 Geräte.....	15
2.3 Material.....	16
2.3.1 Antikörper.....	16
2.3.2 Verwendete Kits und Enzyme.....	20
2.3.3 Verbrauchsmaterial.....	20
2.4 Zellkultur.....	21
2.4.1 Zellkulturmedien.....	21
2.4.2 Zelllinien.....	21
2.4.2.1 293 Zellen.....	21
2.4.2.2 COS7 Zellen.....	21
2.4.2.3 Jurkat Zellen.....	21
2.4.2.4 L923 Zellen.....	22
2.4.2.5 Raji Zellen.....	22
2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	22
2.4.4 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	22
2.5 Isolierung von lymphoiden Zellen aus humanem Blut.....	23
2.5.1 Separation von T-Zellen durch Schaferythrozyten-Rosettierung.....	23
2.5.2 Isolierung von T-Zellsubpopulationen durch Panning.....	24
2.5.3 Isolierung von NK Zellen durch MACS.....	25

2.6	Stimulation von T-Zellen.....	25
2.6.1	Erzeugen von spezifischen Effektorzellen / Aktivierung durch Alloantigen.....	25
2.6.2	Polyklonale Aktivierung von T-Zellen.....	26
2.7	Induktion von Apoptose	27
2.7.1	Apoptoseinduktion durch Kreuzvernetzung von CD95 mAb	27
2.7.2	Apoptoseinduktion durch CD95L	27
2.8	Zytotoxizitätstestung.....	28
2.8.1	Propidiumiodidfärbung	28
2.8.2	Annexin V-Färbung.....	28
2.8.3	Nachweis von zytotoxischen Effektorzellen durch ⁵¹ Cr-Freisetzungstests.....	29
2.9	Proliferationsassay	30
2.10	Transfektion von Säugetierzellen mit der cDNA des CD95L	31
2.10.1	Verwendete Plasmidvektoren.....	31
2.10.2	Konstruktion des Leervektors pcDNA3	31
2.10.3	Konstruktion des Mx-h95L Plasmidvektors	31
2.10.4	Transfektion von 293 Zellen	32
2.10.5	Selektion von 293h95L Zellen, die den CD95L in hoher Dichte stabil an der Zelloberfläche exprimieren	33
2.11	RNA-Isolierung	34
2.12	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	34
2.13	Reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	35
2.13.1	Reverse Transkription	35
2.13.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.13.3	DNA-Agarosegelelektrophorese	38
2.13.4	Restriktionsverdau.....	39
2.14	Durchflußzytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen	39
2.15	Durchflußzytometrische Zellsortierung	40
2.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
2.17	Westernblots	41
2.18	Quantitative Bestimmung von löslichem CD95L im Kulturüberstand	42
2.19	Sonstige Methoden	42
2.19.1	Ligationsreaktion.....	42
2.19.2	Erzeugen kompetenter <i>E. coli</i>	43
2.19.3	Transformation von <i>E. coli</i>	43

2.19.4 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Induktion von Apoptoseempfindlichkeit in T-Zellen durch Aktivierung mit Alloantigen.....	44
3.2 Herstellung und Charakterisierung von Zellen, die den humanen CD95 Liganden überexprimieren	46
3.2.1 Transiente Expression des hCD95L in unterschiedlichen Zelltypen	46
3.2.2 Stabile Expression des hCD95L in der Zelllinie 293	51
3.3 Induktion von Zelltod in T-Zellen durch Kokultur mit CD95L ⁺ 293 Transfektanten	54
3.3.1 Kokultur von ruhenden T-Zellen mit 293 Transfektanten	54
3.3.2 Auswirkungen der Kokultur von aktivierten T-Zellen mit 293 Transfektanten	59
3.4 Modulation von allogenen Immunantworten durch CD95L.....	60
3.4.1 Aktivierung von T-Zellen durch 293 Zellen	61
3.4.2 CD95L in der Induktionsphase von T-Zellreaktionen.....	65
3.4.3 CD95L in der Effektorphase zytotoxischer Immunreaktionen.....	69
3.4.3.1 Zytolyse durch alloaktivierte T-Zellen.....	69
3.4.3.2 Zytolyse durch zytokinaktivierte Effektorzellen	74
3.4.3.3 Zytolyse durch natürliche Killer (NK) Zellen	79
3.5 Modulation von Immunreaktionen durch IFN- α induzierbare CD95L Expression ...	84
4 Diskussion	86
4.1 CD95L-vermittelte Induktion von Zelltod in T-Zellen.....	86
4.2 Auslösen von Alloimmunantworten durch 293h95L und 293pcDNA Zellen	88
4.3 CD95L als protektives Molekül zur Verhinderung von zellvermittelter Zytolyse	89
5 Zusammenfassung	96
6 Literatur	98
Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit.....	107
Lebenslauf.....	108
Danksagung.....	109
Eidesstattliche Versicherung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	Activation Induced Cell Death / aktivierungsabhängige Induktion von Zelltod
AP	Alkaline Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CD95R	Apoptoseinduzierender Rezeptor (Fas / APO-1)
CD95L	Ligand von CD95 (FasL / APO-1L)
Ci	Curie
cpm	Counts Per Minute / Zählimpulse pro Minute
ConA	Concanavalin A
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußzytometer (Fluorescence-Activated Cell Scanner)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G α M	Ziege anti Maus Antikörper
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-ethansulfonsäure
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex
[³ H]-TdR	Tritium-markiertes Thymidin
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	α -Kette IL-2 Rezeptor (CD25)
KM	Kulturmedium

mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Cell Sorting / Magnetische Zellsortierung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MLC	Gemischte Lymphozytenkultur
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
n.t.	nicht getestet
OD	Einheit optischer Dichte
PAGE	Polyacryamid Gelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline / Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sFasL	lösliche Form des CD95L (FasL / APO-1L)
SRBC	Schaferythrozyten
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	Tris -(hydroxymethyl-) aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling / Enzymtest zum Nachweis von DNA Fragmentierung
U	Unit / Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
X mAb	kreuzvernetzter mAb

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem. So werden z.B. Immunantworten dadurch begrenzt, daß nach Beseitigung eines antigenen Stimulus ein Großteil der Antigen-reaktiven Lymphozyten durch Apoptose eliminiert wird. Es bleiben nur die Zellen übrig, die in den „memory“-Pool übertreten. Darüber hinaus ist das Auslösen von Apoptose der Mechanismus mit dem bei intrathymischen Selektionsprozessen autoreaktive Zellen ausgeschaltet werden. Dieser bildet somit die Grundlage zur Erzeugung eines Selbst-toleranten T-Zellrepertoires.

Der CD95 Ligand (CD95L) ist ein Zelloberflächenmolekül, das bei Bindung an den CD95 Rezeptor apoptotischen Zelltod auslösen kann [1]. Für die Transplantationsimmunologie war der Befund, daß die konstitutive Expression eines funktionellen CD95L die molekulare Ursache dafür ist, daß die seit über 100 Jahren bekannten immunprivilegierten Gewebe [2] in einen fremden Organismus transplantiert werden können, ohne daß es zur Abstoßung kommt [3], von besonderem Interesse. T-Zellen eines entsprechenden Gewebeempfängers werden demnach zunächst aktiviert und exprimieren in der Folge den CD95 Rezeptor in hoher Dichte. Dringen diese hochgradig Apoptose-empfindlichen T-Zellen in das immunprivilegierte Gewebe ein, werden sie durch den Kontakt mit CD95L eliminiert [4].

Die Aufdeckung dieser Zusammenhänge führte zu Überlegungen, das CD95/CD95L System zur Immunmodulation bei Organtransplantationen zu nutzen. Das zugrundeliegende Konzept hierbei ist, in T-Zellen, die durch Antigen eines Transplantats aktiviert worden sind, Apoptose auszulösen und somit eine klonale Deletion von Transplantat-spezifischen T-Zellen zu erzielen. Damit bestünde auch die Möglichkeit durch gentechnisch erzeugte ektopische Expression von CD95L, Zellen und Gewebe zu schützen.

Dieses Konzept wurde bereits in verschiedenen *in vivo* Experimenten getestet und führte zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einem Mausmodell konnte eine verlängerte Akzeptanz von allogenen Inselzellen beobachtet werden, die mit CD95L⁺ Myoblasten als *Bystanderzellen* transplantiert wurden [5]. In einem Rattenmodell, in dem CD95L⁺ Sertolizellen als *Bystanderzellen* eingesetzt wurden, konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden [6]. Im Gegensatz dazu wurden Pankreas-Inselzellen, die den CD95L nach Transfektion exprimierten, bei Transplantation unter die Nierenkapsel von Empfängertieren

schneller abgestoßen als CD95L⁻ Inselzellen [7, 8]. Eine abschließende Einschätzung des therapeutischen Potentials von CD95L für die Transplantation ist daher noch nicht möglich.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein *in vitro* Modell zu etablieren, mit dem es möglich ist, die zellulären und molekularen Voraussetzungen für die Verwendung von CD95L zur Immunmodulation zu definieren. Bei der Bearbeitung dieses Problems waren folgende Teilaspekte und Fragestellungen von Bedeutung:

1. Herstellung von Zelllinien mit stabiler Überexpression von CD95L.

Hierzu wurde die CD95L-negative humane Nierenzelllinie 293 mit CD95L-cDNA transfiziert und ein Klon mit hoher CD95L Expression isoliert.

2. Welche Auswirkungen hat CD95L in der Induktionsphase einer Immunantwort?

Zur Bearbeitung dieser Frage wurden T-Zellen HLA-differenten Blutspendern mit bestrahlten CD95L⁺ 293 Zellen (HLA-A3-B7-C7) stimuliert. Es wurde analysiert, ob es zu einer Bildung von allospezifischen, zytotoxischen Effektorzellen kommt.

3. Schützt die Expression von CD95L Zielzellen vor der Zerstörung durch zytotoxische Effektorpopulationen?

Hierzu wurden in ⁵¹Cr-Freisetzungstests allospezifische T-Zellen (anti-293 Zellen aktivierte CTL), IL-2 aktivierte T-Zellen und NK Zellen als Effektoren und CD95L⁺ und CD95L⁻ 293 Zellen als Zielzellen eingesetzt.

Die Analyse des apoptotischen Zelltods im Immunsystem ist ein komplexes Forschungsgebiet, das sich in den letzten Jahren schnell weiterentwickelt hat. Im folgenden soll daher ein Überblick gegeben werden über den derzeitigen Wissensstand zur Bedeutung des CD95/CD95L Systems. Diese Darstellung fokussiert insbesondere auf die CD95 Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion.

1.2 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Für Zellen in mehrzelligen Organismen wurden zwei unterschiedliche Formen des Zelltods beobachtet. Der jeweilige Weg, auf dem eine Zelle zugrunde geht, hängt von der Art und der Ursache der Induktion des Zelltods ab (Tabelle 1.1).

Zu einer Nekrose, d.h. einem Zerfall von Zellen, kommt es bei physikalischen oder chemischen Verletzungen. Sauerstoffmangel, wie er im Herzmuskel während eines Herzinfarkts auftritt, Membranschädigungen durch Antikörper oder Komplement oder aber Reaktionen auf Toxine sind Beispiele für das Auslösen von nekrotischem Zelltod. Nekrotische Zellen schwellen an, lysieren und geben Bestandteile des Zytoplasmas und des Zellkerns an das interzelluläre Milieu ab. Eine Folge dieser Lyse ist eine Entzündungsreaktion. Im Rahmen dieser Reaktion wird das abgestorbene Gewebe durch Phagozytose abgebaut und eine Wundheilung ermöglicht. Nekrose war für lange Zeit die einzige bekannte Form von Zelltod.

Tabelle 1.1: Kennzeichen von Nekrose und Apoptose

	Nekrose	Apoptose
Auslöser	Toxine, Unterversorgung mit Sauerstoff oder Nährstoff	physiologische und pathologische Bedingungen ohne Nährstoffmangel
Energieabhängigkeit	nein	ATP-abhängig
Histologie	Anschwellen der Zellen, Zerstörung der Organellen, Zerstörung ganzer Zellverbände	Chromatinkondensation, Bildung apoptotischer Bläschen, Tod einzelner Zellen
DNA Fragmentierung	zufällige Fragmentgröße	DNA-Leiter mit Fragmenten in der Größe von Vielfachen von internukleosomer DNA ($n \times 185 \text{ bp}$)
Plasmamembran	lysiert	intakt, Bläschenbildung
Folge für das Gewebe	Entzündung	keine Entzündung

Bereits im Jahr 1859 hatte von Virchow in einem Seminar eine weitere Form von Zelltod von Nekrose unterschieden. In der folgenden Zeit wurde dieser spontane Zelltod als *Chromatolyse* zwar weiter von Pathologen beobachtet, konnte aber keinem physiologischen Mechanismus zugeordnet werden [zusammengefaßt in 9]. Im Jahre 1972 prägten Kerr et al. in einem Übersichtsartikel [10] den Begriff Apoptose für eine physiologische Form von Zelltod, die in verschiedenen Geweben beobachtet wurde. Dieser gesteuerte oder programmierte Zelltod spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Lebewesen. Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Herabfallen der Blätter von Bäumen (*apó* bedeutet weg, *ptósis* bedeutet fallen). Apoptose wurde als ein Vorgang definiert, in dessen Verlauf Zellen scheinbar kochen (*boiling*) und sich kleine, membranumschlossene Bläschen von der sterbenden Zelle abschnüren. Am Ende dieses Prozesses steht das Verklumpen der Zellreste. Die apoptotischen Bläschen und Zellreste werden schnell von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert und so eine Entzündungsreaktion in Geweben mit apoptotischen Zellen verhindert. Weitere Analysen dieser Form des Zelltods zeigten, daß es zu einer Kondensation der DNA in apoptotischen Zellen kommt und diese DNA fragmentiert wird. Die Fragmentgrößen entsprechen hierbei den Vielfachen von 186 bp. Die DNA wird bei diesem Prozeß nach der Chromatinkondensation zwischen den Nukleosomen zerschnitten [11]. Apoptotische Zellen exprimieren Phosphatidylserine an der Membranoberfläche, ein Zeichen für den Verlust der Asymmetrie der Phospholipidmembran [12]. Die Expression von Phosphatidylserinen an der Zelloberfläche wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und unterstützt die schnelle Phagozytose der toten Zellen, durch welche die Entwicklung einer Entzündungsreaktion verhindert wird.

Die Genetik und die molekularen Mechanismen, die dem Prozeß der Apoptose zugrunde liegen, konnten durch Untersuchungen mit *Caenorhabditis elegans*, einer Nematodenart, genauer aufgeklärt werden. Während der Entwicklung dieses Wurms werden durch die Aktivierung bestimmter Gene genau 131 Zellen eliminiert, 959 Zellen bilden das erwachsene Tier [13]. Das Modell des *C. elegans* ist ebenso relevant für höhere Tiere, da die an dem Prozeß der Apoptose beteiligten Gene hoch konserviert sind. Man hat durch diese Untersuchungen verschiedene Proteinfamilien entdeckt, die an dem Prozeß beteiligt sind und deren Homologe auch bei höheren Tieren gefunden wurden. Dies sind z.B. die Familie der Caspasen oder die Bcl-2 Familie [14]. Der Vorgang der Apoptose kann durch diese Untersuchungen in vier Schritte aufgeteilt werden: (1) Induktion von Zelltod, (2) Ausführen

des Programms des Zelltods nach Kontrolle der Rettungssignale, (3) Phagozytose apoptotischer Zellen und (4) Abbau der Zellen in den Lysosomen der phagozytierenden Zellen [15].

Apoptose wird in Zellen während der Embryonalentwicklung ebenso beobachtet wie in erwachsenen Organismen. Diese Form des Zelltods ist z.B. in der Entwicklung des Immunsystems für die Genese und Reifung sowohl von T- als auch B-Zellen von Bedeutung. Im lymphoiden System wird Apoptose im Knochenmark, in der Leber und im Thymus beobachtet. Sie dient der Elimination von Vorläuferzellen mit nicht rearrangierten oder nicht funktionell rearrangierten Antigenrezeptoren. Apoptose ist ebenso für die Depletion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus notwendig und damit an der Entwicklung der zentralen Toleranz beteiligt [16]. In peripheren lymphoiden Organen, wie den Lymphknoten und der Milz, findet man einen ähnlichen Mechanismus zur Elimination von autoreaktiven T- und B-Zellen. Die periphere Deletion durch Apoptose ist ein weiterer Sicherungsmechanismus des Immunsystems, um Selbsttoleranz sicherzustellen.

Apoptose im Immunsystem wird aber nicht nur im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz beobachtet. Diese Art der Induktion von Zelltod ist auch ein Effektormechanismus zur Elimination von Zielzellen durch das Immunsystem. Die Induktion von Apoptose wurde sowohl für aktivierte T-Zellen, als auch für NK Zellen beschrieben [17].

Des weiteren ist die Induktion von Zelltod ebenfalls Teil des Mechanismus, durch den Immunreaktionen beendet werden. Sowohl aktivierte T-Zellen [18], als auch aktivierte B-Zellen [19] sind empfindlich für Apoptose. Die Zellen können auf diesem Wege eliminiert werden, nachdem sie ihre Aufgabe erfüllt haben.

Apoptose ist ein Prozeß, der sehr schnell und irreversibel abläuft (innerhalb von 12 bis 24 Stunden) und unter anderem durch die Bindung von spezifischen Liganden an Zelltod-induzierende Rezeptoren (*death receptor* / DR) ausgelöst werden kann.

1.3 Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD)

Wenn ein fremdes Antigen durch eine Immunantwort erfolgreich bekämpft wurde, dann ist es im Rahmen dieser Reaktion zu einer Anreicherung spezifischer Zellen gekommen, die nun nicht mehr benötigt werden. Die Funktion dieser expandierten lymphoiden Zellpopulation muß dann kontrolliert in das Gedächtnis des Immunsystems eingefügt werden. Gleichzeitig muß aber auch die Zahl der aktivierten Zellen reduziert werden, um wieder ein Gleichgewicht (Homöostase) im System herzustellen. Wie oben beschrieben, ist die Induktion von Zelltod ein Mechanismus zur Terminierung einer Immunreaktion. Für T-Zellen wurde schon vor längerer Zeit beobachtet, daß die Stimulation dieser Zellen über den T-Zellrezeptor (TCR), sowohl Proliferation und Differenzierung als auch Zelltod in diesen Zellen induzieren kann. Es wurde gezeigt, daß die jeweilige Folge der Stimulation über den TCR abhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen war. In ruhenden Zellen führt die Stimulation über den TCR zu einer Aktivierung der Zellen, in bereits aktivierten T-Zellen kann über den TCR Zelltod induziert werden. Diese Form der Apoptose wurde als aktivierungsinduzierter Zelltod (*activation induced cell death* / AICD) beschrieben [20, 21].

Für das Ende einer Immunreaktion durch Elimination der aktivierten Zellen über AICD kann ein passiver und ein aktiver Mechanismus unterschieden werden. Während der passive Mechanismus auf eine Abnahme oder ein Fehlen der aktivierenden Stimuli zurückzuführen ist, benötigt der aktive Mechanismus die Neusynthese einer Reihe von Proteinen, deren Expression durch das T-Zellrezeptorsignal induziert wird [22, 23]. Die Synthese der dafür benötigten „Apoptosemaschinerie“, d.h. der Moleküle, die für die Induktion des Zelltodsignals in der Zellen notwendig sind, wird über Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Diese Transkriptionsfaktoren sind auch für die Induktion der Aktivierung von T-Zellen notwendig. Ihre Synthese wird ebenfalls durch solche Pharmaka blockiert, welche die Aktivierung von Zellen inhibieren [24, 25]. Steht die Apoptosemaschinerie allerdings zur Verfügung, dann haben aktivierungsinhibierende Pharmaka keinen Einfluß auf die Induktion von Zelltod [26, 27].

Für die Kontrolle der AICD und damit der Kontrolle des Immunprozesses sind über die Expression der für den Apoptosesignalweg notwendigen Proteine hinaus aber noch weitere kostimulatorische Signale relevant. Besonders das CD28 Signal, das durch Kreuzvernetzung mit den physiologischen Liganden des Rezeptors von Antigen-präsentierenden Zellen (APC)

induziert wird, scheint hier von Bedeutung zu sein. Solche Signale verhindern jedoch nicht die Induktion von Apoptose, sondern zögern sie hinaus [28].

Das Signal des CD95 Rezeptors, das im folgenden genauer beschrieben wird, gilt als ein entscheidendes für die Elimination aktivierter T-Zellen am Ende einer Immunreaktion. Dies zeigt sich sehr deutlich in Tieren, die entweder keinen funktionellen CD95 Rezeptor (*lpr*-Mäuse) oder CD95L (*gld*-Mäuse) exprimieren und in deren Lymphknoten und Milz sich B- und T-Zellen anhäufen [29-31; zusammengefaßt in 32]. In gesunden Tieren wird der Rezeptor sehr früh nach ihrer Aktivierung auf T-Zellen exprimiert [33]. Ebenso kommt es sehr früh im Rahmen der Aktivierung zu einer Expression des Signal-induzierenden Liganden (CD95L) [34], die jedoch nicht zu einer gegenseitigen Induktion von Zelltod führt [35]. Dieser „Brudermord“ scheint zu diesem frühen Zeitpunkt durch Kontrollmechanismen verhindert zu werden (siehe Abschnitt 1.5). Untersuchungen von Mäusestämmen mit mutiertem CD95 Rezeptor (*lpr*-Mäuse) oder mutiertem CD95L (*gld*-Mäuse) zeigten, daß der AICD der T-Zellen dieser Mäuse gestört ist [36-38]. Die Funktionalität des CD95 Signalwegs ist ebenso eine Voraussetzung für die besonderen Eigenschaften von immunprivilegiertem Gewebe [3]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell entworfen, nach dem fremdes Gewebe durch die Expression von CD95L vor einer Abstoßung durch T-Zellen geschützt wird, da die attackierenden T-Zellen durch ihre Empfindlichkeit für Apoptose eliminiert werden. Durch die spezifische Elimination der attackierenden Zellen könnte es möglich sein, Toleranz zu erzeugen, ohne die übrigen Funktionen des Immunsystems zu beeinflussen. Diese Form der Toleranzinduktion wurde als das Finden des *Heiligen Grals* der Transplantationsbiologie bezeichnet [39]. Durch eine solche Therapie käme es nämlich nicht zu der Inhibition aller Immunfunktionen, wie dies bei der pharmakologischen Immunsuppression der Fall ist, sondern zu einer spezifischen peripheren Toleranz des Immunsystems gegenüber dem transplantierten Organ.

1.4 Der CD95 Rezeptor und sein physiologischer Ligand

Der CD95 Rezeptor (APO-1 / Fas) wurde ursprünglich mit Hilfe von Antikörpern als ein Zelloberflächenmolekül beschrieben, das in transformierten Zellen Apoptose induzieren kann [40, 41]. Dieses Typ I Transmembranmolekül besitzt ein Molekulargewicht von 48 kDa und gehört zur Nerven-Wachstumsfaktor/Tumornekrosefaktor (NGF/TNF) Rezeptorsuperfamilie [42, 43]. Als ein Charakteristikum besitzen die Mitglieder dieser Rezeptorsuperfamilie etwa

40 Aminosäuren große, sich drei bis sechs mal wiederholende, cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne [44-46].

In der zytoplasmatischen Domäne zeigen dieser Superfamilie zugeordnete Rezeptoren im allgemeinen keine Sequenzhomologien. Einige haben aber eine konservierte Domäne aus bis zu 80 Aminosäuren nahe dem C-Terminus gemeinsam. Dieses Sequenzmotiv wird Todesdomäne (*death domain / DD*) genannt und wurde bis jetzt in den Sequenzen von TNF Rezeptor 1 (TNFR1) [47], CD95 Rezeptor [48], TRAMP/Apo-3 (DR3) [49-51], TRAIL-R1 (DR4) [52], TRAIL-R2 (DR5) [53, 54] und in der Sequenz von DR6 [55] gefunden (TRAIL=*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Das Sequenzmotiv ist für die Induktion von Zelltod über diese Rezeptoren essentiell [56]. In der Sequenz des Membranproteins TRUNDD (*TRAIL receptor with a truncated DD*) wurde zusätzlich eine nicht funktionelle, verkürzte Form einer DD entdeckt [57]. Dieser Rezeptor gehört zur Unterfamilie der TRAIL-Rezeptoren und ist als ein kompetitierendes Molekül (*decoy receptor*) beschrieben worden, daß TRAIL wegfängt und damit die Bindung an die Signal-induzierenden TRAIL-Rezeptoren verhindert.

Der CD95 Rezeptor wird von vielen Geweben und Zelllinien schwach exprimiert. Beispiele hierfür sind Thymus, Leber, Herz, Lunge, Niere und Ovarien [58]. Das Molekül wird ebenso auf peripheren Lymphozyten exprimiert. Auf ruhenden, CD45R0⁺ T-Zellen kann der CD95 Rezeptor in geringer Dichte nachgewiesen werden, auf aktivierten T- und B-Zellen wird eine hohe Expression beobachtet [59, 60]. Eine Expression des Moleküls konnte auch auf verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden.

Der physiologische Ligand des CD95 Rezeptors, der CD95 Ligand (FasL), wurde von Suda et al. in der Maus und der Ratte kloniert [61]. Kurz darauf wurde auch das humane Gen isoliert [1]. Der humane Ligand ist ein Typ II Membranmolekül mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Die Aminosäuresequenz des CD95L zeigt in der extrazellulären, C-terminalen Domäne deutliche Homologien zu anderen Proteinen der NGF/TNF Familie. Die größte Übereinstimmung in der Sequenz des CD95L mit anderen Familienmitgliedern wurde für TNF- α und TNF- β demonstriert [62]. Wie TNF- α [63, 64] kann CD95L proteolytisch durch membranständige Matrixmetalloproteinasen (MMP) prozessiert werden [65]. Diese lösliche Form des CD95L hat ein apparentes Molekulargewicht von 26 bzw. 29 kDa (unterschiedliche Größen durch unterschiedlichen Grad der Glykosylierung) und ist als Homotrimer, wie auch

TNF- α [66], in der Lage, Zelltod zu induzieren. Da auch die membranständige Form des CD95L als Homotrimer nachgewiesen wurde [67], ist es möglich, daß diese Struktur nicht nur für die Induktion von Apoptose in dafür empfindlichen Zellen notwendig ist, sondern auch die Voraussetzung für die Prozessierung durch die MMP sein könnte.

Der CD95L wird vor allem von NK Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert [68-70] und ist ein zytotoxisches Effektormolekül dieser Zellen. Für CD4⁺ T-Zellen ist es das einzige zytotoxische Effektormolekül [71]. Das Molekül wird auch von aktivierten B-Zellen exprimiert [19]. Die Expression des CD95L wurde außerdem in immunprivilegierten Geweben nachgewiesen. Für das Auge [4] und den Hoden [3] wurde demonstriert, daß die privilegierten Eigenschaften von der funktionellen Expression des CD95 Rezeptors und CD95L abhängen. Aus diesen Beobachtungen entstand die Überlegung, daß der CD95L zur Kontrolle von T-Zellimmunantworten nach Organtransplantationen als protektives Protein eingesetzt werden könnte.

Der CD95L ist zusätzlich in der Lage, ein Signal an die CD95L⁺ Zelle selbst zu geben. Versuche mit FasFc Fusionsproteinen, die aus der extrazellulären Domäne des CD95 Rezeptors und der konservierten Domäne von löslichem, humanem IgG bestanden [70], zeigten, daß der CD95L bei der Regulation der Zellteilung in CD4⁺ T-Zellen eine Rolle spielt [72]. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf die Bedeutung der relativ großen intrazellulären Domäne des CD95L, die besonders durch den hohen Anteil von Prolinresten auffällt.

Verschiedene Krankheiten sind Folge von Defekten oder Fehlregulationen der CD95 Rezeptor-vermittelten Apoptose. Bei der Hashimoto-Thyreoiditis wird z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion das proinflammatorische Zytokin IL-1 β freigesetzt. Dieses induziert in den Thyrozyten, die den CD95L exprimieren, die Expression des CD95 Rezeptors. Durch diese Koexpression kommt es zur Induktion von Apoptose in den Zellen [73]. Ebenso führt die Expression des CD95L auf Keratinozyten bei toxischer epidermaler Nekrolyse (*toxic epidermal necrolysis* / TEN oder Lyell's Syndrome) zu einer Induktion von CD95 Rezeptor-spezifischem Zelltod in diesen Zellen. Die Induktion von Apoptose in diesen Zellen kann durch Antikörper blockiert werden [74]. Das CD95 Rezeptor/Liganden System ist auch an der Zerstörung der Leber bei Hepatitis, sowohl nach Virusinfektion, als auch bei alkoholischer Leberzirrhose, beteiligt [75]. Bei Kindern mit humanem Autoimmun-Lymphoproliferativem Syndrom (ALS), einer Krankheit, die in ihrem Phänotyp den Beobachtungen bei *lpr*- und *gld*-

Mäusen entspricht, wurde gezeigt, daß eine Mutation im Gen des CD95 Rezeptors für einen Defekt des Apoptosemechanismus dieser Patienten verantwortlich ist [76, 77]. Der über den CD95 Rezeptor induzierte Zelltod ist auch an der Depletion von CD4⁺ T-Zellen in Folge einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) beteiligt. und stellt, wie schon vor dessen Beweis postuliert wurde [78], eine Form des AICD dar. Der CD95 Rezeptor wird von T-Zellen infizierter Patienten in erhöhtem Maße exprimiert [79]. Neben der Virus-induzierten Disregulation der CD95 Rezeptorexpression wird in infizierten T-Zellen, die empfindlich für Apoptose sind, auch die Expression des CD95L induziert [80]. Die Expression von Rezeptor und Liganden ermöglicht in diesen Zellen sowohl den „Brudermord“ als auch den „Selbstmord“.

1.5 Das Signal des CD95 Rezeptors

Die Bindung des CD95L (als Trimer) an den CD95 Rezeptor ermöglicht dessen Trimerisierung [81]. Diese ist für die Bildung des Todessignal-induzierenden-Komplexes (*death inducing signaling complex* / DISC) notwendig [82]. Über die nun zugänglichen Todesdomänen (*death domain* / DD) des Rezeptors wird die Assoziation des Proteins FADD (*Fas-associated death domain*) / Mort 1 ermöglicht [83, 84]. Das Molekül FADD besitzt ebenfalls eine Todesdomäne, die an jene DD des Rezeptorkomplexes bindet. Zusätzlich besitzt es auch eine Zelltod-Effektordomäne (*death effektor domain* / DED), die an eine analoge Tandemdomäne, d.h. ein sich wiederholendes Motiv, des Moleküls Caspase-8 / FLICE (*FADD-like ICE*) / MACH (hebräisches Wort für verschlechtern) bindet [85, 86]. Die DED der Caspase-8 ist ein typisches Beispiel für eine sehr verbreitete Proteinbindungsdomäne (*caspase recruitment domain* / CARD), die bei mehreren Caspasen gefunden wird (Caspase-2, -8, -9 und 10)[87]. Caspase-8 spaltet sich nach der Assoziation in den DISC selbst. Das Spaltprodukt ist als aktivierte Caspase-8 in der Lage, durch die proteolytische Spaltung weitere Caspasen zu aktivieren und das Signal zum Zelltod in einer Kaskade zu verstärken. Die aktivierte Caspase-8 wirkt zusätzlich auf die Mitochondrienmembran und setzt Cytochrom *c* frei [88]. Die Freisetzung verstärkt einerseits zusätzlich die Aktivierung weiterer Caspasen in der Kaskade und reduziert auf diesem Wege die für die Ausführung des Zelltodprogramms notwendige Schwellenkonzentration von aktivierter Caspase-8. Die Freisetzung des Cytochrom *c* führt aber zum anderen auch zu der Zerstörung der Elektronentransportkette und damit der ATP-Produktion in den Mitochondrien [89]. Bei Blockade der Cytochrom *c* Freisetzung ermöglicht eine höhere Konzentration aktivierter

Caspase-8 aber dennoch die Aktivierung der Caspasenkaskade. Die durch Spaltung aktivierten Caspasen setzen proteolytisch weitere Substrate um. Von diesen sind zur Zeit etwa 40 verschiedene identifiziert, nur von wenigen ist jedoch die Funktion im Ablauf des Zelltodprogramms bekannt [90].

Für die Induktion von Zelltod über den CD95 Rezeptor sind noch zwei weitere Signalwege beschrieben. Der eine führt zur Aktivierung der Caspasenkaskade durch Spaltung der Caspase-2. Diese Spaltung erfolgt nach Bindung der Procaspase-2 an den CD95 Rezeptorkomplex über die Proteine RIP (*receptor interacting protein*) [91] und RAIDD / CRADD (*RIP-associated CED-3-homologous protein with DD*) / (*caspase and RIP adaptor with DD*) [92, 93]. Diese beiden Proteine interagieren mit dem CD95 Rezeptor ebenfalls über die DD. Der zweite Weg wird durch die direkte Bindung des Proteins DAXX an den CD95 Rezeptor initiiert und führt zu der Caspasenkaskade über die Aktivierung von Jun N-terminalen Kinasen (JNK) [94]. Experimente mit FADD dominant negativen Zellen [95, 96] und Tieren [97] zeigten jedoch, daß die Aktivierung von Caspase-8 über FADD essentiell für einen funktionierenden Apoptoseapparat ist. Damit bleibt die genaue Bedeutung dieser FADD unabhängigen Signale noch unbekannt.

Da die Ausführung des Zelltodprogramms in der Apoptose endet und damit fatale Folgen für eine Zelle hat, gibt es eine Reihe von Kontrollmechanismen für diesen Signalweg. So ist die Expression des Zelltod induzierenden Liganden CD95L z.B. auf spezielle Gewebe beschränkt. In T-Zellen wird die Expression von einem Calcineurin und NFAT abhängigen Promotor reguliert. Sie ist somit an die Aktivierung der Zelle gekoppelt [98]. Ein weiterer, bereits *in vitro* untersuchter Kontrollmechanismus reguliert die Signalkaskade auf der Seite der Targetzellen. Das Protein cFLIP / Casper (*FLICE-inhibitory protein*) / (*Caspase-8-related-protein*) [99, 100] inhibiert z.B. die Aktivierung der Caspase-8. In T-Zellen wird die Expression von cFLIP nach Aktivierung über den TCR heraufreguliert. Dies geschieht über die Induktion der Expression des transmembranen Proteins TOSO [101]. Nach wenigen Tagen der Aktivierung ist cFLIP in T-Zellen nicht mehr nachweisbar und damit die Blockade des Signalwegs aufgehoben [99]. Weiter unterhalb in der Caspasenkaskade kann das Apoptosesignal durch Proteine der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis protein family*) moduliert werden. Beispiele für IAP's sind die Proteine XIAP [102] und Survivin [103], welche die Aktivität der terminalen Caspasen -3 und -7 inhibieren. Die antiapoptotischen Proteine der *Bcl-2*-Familie [zusammengefaßt in 104], die verschiedene Apoptosesignalwege

inhibieren, haben hingegen *in vitro* kaum eine Wirkung auf den CD95 Rezeptor-vermittelten Zelltod. Während unter bestimmten Umständen z.B. *Bcl-2* die Funktion des Cytochrom *c* für den Apoptoseprozeß blockieren kann [88], zeigen Experimente mit überexprimiertem *Bcl-2*, daß dieser inhibierende Effekt vom CD95 Rezeptorsignalweg umgangen werden kann und auch in diesem Modell Zelltod beobachtet wird [105-107]. Es ist also möglich, daß dieser Mechanismus vor der zufälligen Induktion von Zelltod schützt, den Signalweg des gezielten programmierten Zelltods aber nicht beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Puffer

Die angegebenen Lösungen und Puffer wurden alle, wenn nicht anders angegeben, mit H₂O (bidest) angesetzt.

Auftragspuffer (für RNA und DNA Agarosegele)

0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
0,25	% (w/v)	Xylol Cyanol
30	% (v/v)	Glycerol

Blocklösung (für Westernblot)

5	% (w/v)	Milchpulver
0,1	% (v/v)	Tween20 in PBS

Coomassie-Gebrauchslösung (zur Färbung von Protein SDS-PAGE)

1	g/l	Coomassie Brilliant Blue
3,6	% (v/v)	Methanol
7,2	% (v/v)	Essigsäure

Elektrodenpuffer (für SDS-PAGE)

25	mM	Tris pH 8,5
215	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS

Laemmli-Puffer (Auftragspuffer für SDS-PAGE)

62,5	mM	Tris pH 6,8
6	% (w/v)	SDS
30	% (v/v)	Glycerol
15	% (v/v)	β-Mercaptoethanol
3	mM	EDTA
0,05	% (w/v)	Bromphenolblau

Lysepuffer (zur Zellyse)

1	% (w/v)	NP-40
50	mM	Tris pH 7,4
50	mM	Natriumchlorid
10	mM	IAA
10	mM	NaF
1	mM	PMSF
5	mM	EDTA

MOPS-Puffer (10 x) (für RNA Agarosegelelektrophorese)

0,4	M	MOPS
0,05	M	Natriumacetat
0,01	M	EDTA

PBS

0,2	g/l	Kaliumchlorid
0,2	g/l	Kaliumdihydrogenphosphat
0,049	g/l	Magnesiumchlorid
8	g/l	Natriumchlorid
1,15	g/l	Natriumhydrogenphosphat in H ₂ O (pH 7,4)

Puffer I (für Westernblot)

0,4	% (w/v)	SDS
60	mM	Milchsäure
100	mM	Tris, pH 8,4

Puffer II (für Westernblot)

0,1	% (w/v)	SDS
15	mM	Milchsäure
100	mM	Tris, pH 8,4

Puffer III (für Westernblot)

20	% (v/v)	Methanol
60	mM	Milchsäure
20	mM	Tris, pH 3,8

Puffer IV (für Westernblot)

20	% (v/v)	Methanol
100	mM	Tris, pH 10,4

Sammelgel (für SDS-PAGE)

0,126	mol/l	Tris pH 6,8
5	% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 1 in 30 % Glycerol)
0,1	% (w/v)	SDS
0,25	% (v/v)	TEMED
0,1	% (w/v)	APS

Substrat (für AP-Färbung)

0,33	mg/ml	Nitroblautetrazolin (NBT)
0,13	mg/ml	5 Brom-4-chlor-3-indolphosphat
0,013	mg/ml	Phenanzinmethasulfat

Substratblocker (für AP-Färbung)

20	mM	EDTA
----	----	------

Substratpuffer (für AP-Färbung)

100	mM	Tris pH 9,55
25	mM	Diethanolamin
100	mM	Natriumchlorid
2	mM	Magnesiumchlorid
2	µM	Zinkchlorid

TAE-Puffer (für DNA Agarosegelelektrophorese)

0,04	M	Tris
0,11	% (v/v)	Essigsäure
1	mM	EDTA

TBE-Puffer (10 x) (für DNA PAGE)

0,9	M	Tris-borat
0,02	M	EDTA

Tfb1-Puffer (für kompetente Zellen)

30	mM	K-Acetat
50	mM	MnCl ₂
100	mM	RbCl
10	mM	CaCl ₂
15	% (v/v)	Glycerol

in H₂O mit HCl auf pH 5,8 einstellen

Tfb2-Puffer (für kompetente Zellen)

10	mM	MOPS
10	mM	RbCl
75	mM	CaCl ₂
15	% (v/v)	Glycerol

in H₂O mit HCl auf pH 6,8 einstellen

Trenngel (für SDS-PAGE)

0,375	M	Tris pH 8,8
7,5-12,5	% (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 1 in 30% Glycerol)
0,1	% (w/v)	SDS
0,15	% (v/v)	TEMED
0,06	% (w/v)	APS

2.2 Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer:	Wide Mini Sub Cell, Biorad (München) Horizon 58 und Horizon 20-25, Gibco BRL, (Karlsruhe)
Blotapparatur:	Multiphor II, Pharmacia, (Uppsala, Schweden)
Brutschrank:	Cytoperm, Heraeus (Hanau)
Durchflußzytometer:	FACScan und FACStar, Becton Dickinson (Heidelberg)
Magnetischer Zellseparator:	Vario MACS, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Scintillationsmeßgerät:	1205 Betaplate, LKB Wallac (Turku, Finnland)
SDS Gelelektrophoresekammer:	Mini ProteanII, Biorad (München)
Spektralphotometer:	Ultrospec II, Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Sterilwerkbank:	Lamin-Air, Heraeus (Hanau)

Thermocycler:	Mini Cycler, MJ Research (Watertown, MA, USA)
Thermostat:	Modell 5320, Eppendorf (Hamburg)
UV-Transilluminator:	BioDocII, Biometra (Göttingen) Eagle Eye II, Stratagene
Zellernteegerät:	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge RC5C, Sorvall (Newton, IL, USA) Biofuge 15,R Heraeus (Hanau) Biofuge 15, Heraeus (Hanau) Cyrofuge 6-4S, Heraeus (Hanau) Megafuge 1.0, Heraeus (Hanau) Varifuge 3.2RS: Heraeus (Hanau)

2.3 Material

2.3.1 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind folgendermaßen aufgeführt:

Name, Bezeichnung

- Spezifität
- Herkunft (Spezies); Isotyp (bei mAb)
- Quelle (Firma bzw. Herkunftslabor)
- Verwendungszweck in dieser Arbeit

3B5

- erkennt CD8 Antigen (human) (32 kDa)
- mAb aus der Maus, TRI-COLOR konjugiert; IgG_{2a}
- Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung

Anti-HLA-DR

- erkennt HLA-DR, MHC-Klasse II, monomorphe Determinante (28-34 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG_{2a}
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung und Zellsortierung (MACS)

AICD4.1 (9A4)

- erkennt CD4 Antigen (human) (59 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG₁
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms AICD4.1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S.C. Meuer, Heidelberg
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning)

AICD8.1 (ERI 8)

- erkennt CD8 Antigen (human) (32 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG₁
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms AICD8.1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S.C. Meuer, Heidelberg
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning)

APO-1-3

- erkennt CD95 Antigen (APO-1 / Fas) (48 kDa), induziert Apoptose
- mAb aus der Maus; IgG₃
- Bender MedSystems, Wien, Austria
- verwendet zur Zellfärbung und zur Induktion von Zelltod nach Kreuzvernetzung

B7 (L307.4)

- erkennt CD80 Antigen (B7.1 / BB-1) (60 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG₁
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung

BT 563

- erkennt CD25 Antigen (human), α -Kette des IL-2 Rezeptors (55 kDa)
- mAb der Maus; IgG₁
- Biotest, Dreieich
- verwendet zur Zellfärbung

CD4-PE

- erkennt CD4 Antigen (55 kDa)
- mAb aus der Maus, PE konjugiert; IgG₁
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung

G247-4

- erkennt CD95L (FasL), in der membranständigen (40 kDa) und löslichen Form (23 und 26 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG₁
- PharMingen, Hamburg
- verwendet zur Westernblot Analyse

HIS24

- erkennt CD45 Antigen der Ratte
- mAb der Maus; IgG_{2b}
- PharMingen, Hamburg
- verwendet als Isotypkontrolle

L 243

- erkennt HLA-DR (MHC-Klasse II)
- mAb der Maus; IgG_{2a}
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning und MACS)

Leu-2a-FITC

- erkennt CD8 Antigen (human) (32 kDa)
- mAb aus der Maus, FITC konjugiert; IgG₁
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung

Leu-18a-FITC

- erkennt CD45RA Antigen (human) (220 kDa und 205 kDa)
- mAb aus der Maus, FITC konjugiert; IgG₁
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung

MEM56

- erkennt CD45RA Antigen (human) (220 kDa und 205 kDa)
- mAb aus der Maus; IgG_{2b}
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms MEM56
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von V. Horejsi, Prag, Tschechien
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning)

NOK-1

- erkennt CD95L (FasL) (40 kDa)
- mAb aus der Maus, biotinyliert; IgG₁
- PharMingen, Hamburg
- verwendet zur Zellfärbung und Zellsortierung

OKT3

- erkennt CD3ε-Kette (21 kDa) des humanen TCR/CD3-Komplexes
- mAb aus der Maus; IgG_{2a}
- Ortho, Raritan, NJ, USA
- Stimulation von T-Zellen und Zellisolation (MACS)

SM 1/1

- erkennt CD95 Antigen (APO-1/Fas) (48 kDa), induziert Apoptose
- mAb aus der Maus; IgG_{2a}
- Bender MedSystems, Wien, Austria
- verwendet zur Zellfärbung und zur Induktion von Zelltod nach Kreuzvernetzung

SM 1/23

- erkennt CD95 Antigen (APO-1/Fas) (48 kDa), blockiert Apoptose
- mAb aus der Maus; IgG_{2b}
- Bender MedSystems, Wien, Austria
- verwendet zur Zellfärbung und zur Blockade von CD95 Rezeptor-vermittelten Zelltod

T199

- erkennt CD56 Antigen (human), NK Zellmarker
- mAb der Maus; IgG_{2b}
- AppliChem, Darmstadt
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning)

UCHL1

- erkennt CD45R0 Antigen (human) (180 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus; IgG_{2a}
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms UCHL1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. P.C.L. Beverley, Newbury, England
- verwendet zur Zellfärbung und Zellisolation (Panning)

W6/32

- erkennt HLA Klasse I, erkennt monomorphe Determinante auf HLA Klasse I Molekülen
- Ascites der Maus; IgG_{2a}
- Serotec, Oxford, GB
- Stimulation, Zellfärbung

Verwendete Sekundärreagenzien in der FACS-Analyse

G α M-FITC

- erkennt Immunglobulin der Maus: IgG und IgM (schwere und leichte Kette)
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluorescein konjugiert
- Dianova, Hamburg

SA-PE

- Streptavidin, Phycoerythrin konjugiert
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

SA-TRI-COLOR

- Streptavidin, TRI-COLOR konjugiert
- Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

Blockierungsreagenzien

OCTAGAM

- Immunglobulin G vom Menschen
- OCTAPHARMA, Langenfeld
- verwendet zur Blockade von FcR-vermittelter unspezifischer Ab-Bindung in der FACS-Analyse

Normales Maus Serum

- Normales Maus Serum
- Dianova, Hamburg
- verwendet zur Absättigung von freien Valenzen des G α M-FITC Ab in der FACS-Analyse

2.3.2 Verwendete Kits und Enzyme

Annexin V-FITC Kit:	Boehringer Ingelheim
Cytoscreen Human APO-1/Fas ELISA:	BioSource Europe SA,
DOTAP Transfection Reagent:	Boehringer Mannheim
Effectene Transfection Reagent:	Qiagen, Hilden
GeneClean II Kit:	BIO 101, La Jolla, CA, USA
Klenow-DNA-Polymerase:	Pharmacia, Freiburg
Neuraminidase:	Behringwerke AG, Marburg
Pfu DNA-Polymerase:	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K:	Boehringer Mannheim
Phosphatase, alkaline:	Boehringer Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit:	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmidpurification Kit:	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit:	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme:	Boehringer Mannheim
Reverse Transkriptase:	aus Moloney-Murine Leukemia Virus Stratagene, Heidelberg
sFas Ligand ELISA Kit:	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Taq DNA-Polymerase:	Qiagen, Hilden
T ₄ -DNA Ligase:	Boehringer Mannheim

2.3.3 Verbrauchsmaterial

FACS-Röhrchen:	Falcon / Becton Dickinson, NJ, USA
Gewebekulturschalen, 90 mm:	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen:	Corning Costar, Bodenheim
Mikrotiterplatten, 96well:	Rundboden: Nunc, Roskilde, Dänemark Flachboden: Nunc, Roskilde, Dänemark Spitzboden: Nunc, Roskilde, Dänemark
Multischalen, 24well, Flachboden:	Nunc, Wiesbaden
Multischalen, 6well, Flachboden:	Becton Dickinson, NJ, USA
Pipettenspitzen:	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5 ml:	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugationsröhrchen, 15 und 50 ml:	Falcon / Becton Dickinson, NJ, USA

2.4 Zellkultur

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sowie die meisten Stimulationsexperimente wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Partialdruck und 95 % gesättigter Wasserdampfatosphäre durchgeführt.

2.4.1 Zellkulturmedien

Als Standardkulturmedien wurden RPMI 1640 und DMEM verwendet. RPMI-Kulturen wurden bei einem CO₂-Partialdruck von 5 %, DMEM-Kulturen bei 10 % kultiviert. Die Medien wurden mit FCS, 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin supplementiert. Das FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C denaturiert. Als Waschmedien wurden das Hepes-gepufferte TC 199, pH 7,3 und PBS, pH 7,2 verwendet.

2.4.2 Zelllinien

2.4.2.1 293 Zellen

Die Zelllinie HEK293 ist eine humanen, embryonale Nierenzelle, die mit dem Adenovirus Type 5 (Ad 5) transformiert ist. Der HLA-Typ der 293 Zellen wurden durch PCR-Typisierung der Blutbank der MHH bestimmt (HLA A3 B7 C7). Diese Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und den oben angegebenen Supplementen kultiviert. Die fibroblastenartigen Zellen wachsen als Zellrasen. Die Zellen wurden mit PBS mit 0,02 % EDTA für die Versuche vom Boden der Kulturflaschen abgelöst.

2.4.2.2 COS7 Zellen

Die Zelllinie COS7 ist eine aus Affen (African green monkey) stammende, mit einer ori-defizienten SV-40 Mutante transformierte Nierenzelllinie. Sie wurde aus CV-1 Zellen etabliert. Diese Zellen wurden in DMEM mit 20 % FCS und den oben angegebenen Supplementen kultiviert. Die fibroblastenartigen Zellen wachsen als Zellrasen. Die Zellen wurden mit PBS mit 0,02 % EDTA für die Versuche vom Boden der Kulturflaschen abgelöst.

2.4.2.3 Jurkat Zellen

Die Zelllinie Jurkat ist eine humane, leukämische T-Zelllinie, die aus peripherem Blut isoliert worden ist. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und den oben angegebenen Supplementen kultiviert. Die Zellen wachsen in Suspension als Einzelzellen.

2.4.2.4 L923 Zellen

Die L923 Zellen sind murine Fibroblasten aus Bindegewebe. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und den oben angegebenen Supplementen kultiviert. Die Zellen wachsen als Zellrasen. Sie wurden mit PBS mit 0,02 % EDTA für die Versuche vom Boden der Kulturflaschen abgelöst.

2.4.2.5 Raji Zellen

Die Zelllinie Raji ist eine humane B-Zelllinie, die aus einem Burkitt Lymphom isoliert worden ist. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und den oben angegebenen Supplementen kultiviert. Die Zellen wachsen in Suspension als Einzelzellen.

2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 10^7 Zellen/ml Kulturmedium mit 20 % FCS in Eis auf 0°C gekühlt, mit einem gleich großen Aliquot von 20 % DMSO in Kulturmedium mit 20 % FCS versetzt (\Rightarrow final 5×10^6 Zellen/ml Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten Behälter mit einem Isopropanol/Butanol Gemisch über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen dem Stickstoffgefäß entnommen und im Kryoröhrchen bei Handwärme aufgetaut. Danach wurden sie sofort in 10 ml Medium resuspendiert und abzentrifugiert (8 min bei 1200 UpM, Raumtemperatur). Das Pellet wurde erneut in 10 ml Medium resuspendiert und abzentrifugiert. Hierauf wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und im Brutschrank inkubiert. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.4.4 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zellzahlbestimmungen erfolgten in einer Neubauer-Kammer. Hierzu wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,08 % in PBS) gemischt und nur die nicht gefärbten Zellen gezählt. Während lebende Zellen Trypanblau aktiv ausscheiden, sind tote oder geschädigte Zellen dazu nicht mehr in der Lage und färben sich blau.

2.5 Isolierung von lymphoiden Zellen aus humanem Blut

2.5.1 Separation von T-Zellen durch Schafererythrozyten-Rosettierung

Durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Ficoll-Paque[®]PLUS / Pharmacia Biotech) wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC = Lymphozyten und Monozyten) aus menschlichem Blut isoliert [108]. Für die Separation von B- und T-Zellen aus dieser Zellpopulation wurde die Rosettentechnik mit Schafererythrozyten (SRBC) angewandt. Die Rosettenbildung wird durch die Bindung von SRBC an das humane CD2 Antigen ermöglicht. Da das CD2 Molekül von allen T-Zellen, nicht aber von B-Lymphozyten an der Zelloberfläche exprimiert wird, und diese Rosetten durch eine erneute Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert werden können, ist es möglich, T-Zellen von anderen mononukleären Zellen des Blutes zu trennen [109].

Das Blut, das von der Blutbank der MHH in Form von Buffy Coats zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit 1 ml Liquemin (Na-Heparin / 500 I.E.) als Antigerinnungsfaktor versetzt und mit TC199 verdünnt (auf ca. 120 ml aufgefüllt). Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden jeweils 10 ml Ficoll in 50 ml Röhrchen mit der Blut-Mediumgemisch überschichtet. Nach einer Zentrifugation (400 x g, 30 min, RT) wurde die Phase oberhalb des Ficolls, in der sich die PBMC befinden, abgenommen und zweimal mit TC199 gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen auf eine Dichte von $6,6 \times 10^6$ Zellen/ml in TC199 mit 10 % FCS eingestellt. Die SRBC wurden 30 min bei 37°C mit Neuraminidase ($20 \text{ U}/10^9$ Zellen/ml TC199) behandelt, zweimal mit TC199 gewaschen und in einer Dichte von 10^9 Zellen/ml in TC199 aufgenommen. Auf 9 Teile der Lymphozytensuspension wurde 1 Teil der Neuraminidase-behandelten SRBC gegeben, die Mischung 10 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, bei RT zentrifugiert (15 min $200 \times g$) und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und mit 10 ml Ficoll unterschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (400 x g, 30 min, RT) befanden sich die rosettierten E⁺ Zellen im Sediment, während die E⁻ Zellen (B-Zellen und Monozyten) eine Bande an der Grenzschicht zwischen Ficoll und Medium bildeten. Der Überstand wurde abgenommen (non-T-Zellfraktion) und das Zellsediment in 10 ml auf 37°C erwärmten Lyseagenz (0,14 M NH₄Cl, 0,25 mM EDTA, 5 mM KHCO₃, pH 7,5) resuspendiert. Die osmotische Lyse der SRBC in der Zellsuspension konnte durch den

Umschlag von einer trüben (Schafhämoglobin in Erythrozyten gebunden) zu einer klaren Lösung (Schafhämoglobin durch Erythrozytenlyse freigesetzt) beobachtet werden. Die E⁺ Zellen wurden anschließend erneut zweimal in TC199 gewaschen und über Nacht in 30 ml RPMI 1640 im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂ Partialdruck und 95 % gesättigter Wasserdampf-atmosphäre) in Kulturflaschen inkubiert, um verunreinigende, plastikadhärente non-T-Zellen zu entfernen.

2.5.2 Isolierung von T-Zellsubpopulationen durch Panning

Zur Auftrennung von T-Zellen in Subpopulationen wurde die Panningtechnik [110] verwendet, welche die Depletion von Subpopulationen und damit eine negative Selektion ermöglicht. Nach Inkubation mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmarker wurden die Ag-positiven Zellsubpopulationen an eine mit Sekundärantikörpern beschichtete Plastikschaale gebunden. Die Ag-negativen Zellsubpopulationen sedimentierten zwar ebenfalls auf dem Schalenboden, konnten aber durch vorsichtiges Schwenken der Schale wieder resuspendiert werden.

Zur Beschichtung mit Sekundärantikörpern wurden die Kulturschalen (Ø 90 mm) mit 30 ml einer Ziege-anti-Maus Ig (GαM) Verdünnung (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert, dann zweimal mit PBS und einmal mit PBS + 1 % FCS gewaschen. Aus den T-Zellpopulationen wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ oder deren CD45RA⁺ bzw. CD45R0⁺ Subpopulationen angereichert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den entsprechenden mAb (siehe Abschnitt 2.3.1) bei einer Konzentration von 1 µg mAb/10⁷ Zellen/ml in TC199 + 10 % FCS 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TC199 gewaschen und in einer Dichte von 3x10⁶ Zellen/ml in PBS + 5 % FCS aufgenommen. 12,5 ml Zellsuspension wurden auf eine der mit GαM beschichteten Plastikschaalen gegeben und diese für 2h bei 4°C inkubiert. Nach vorsichtigem Schwenken der Schalen wurde der Überstand und die sich darin befindende, depletierte T-Zellpopulation abgenommen und die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen und die Zellzahl und Vitalität bestimmt. Die Separation der Zellpopulationen wurde durchflußzytometrisch überprüft. Die Anreicherung lag in der Regel bei über 95 %.

2.5.3 Isolierung von NK Zellen durch MACS

Mit Hilfe des MACS (Magnetic Cell Sorting) ist es möglich, Zellsubpopulationen aus Gesamtpopulationen anzureichern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden NK Zellen aus der E⁺ Population von PBMC Kulturen aus Blutkonserven in einer Negativselektion isoliert. Durch Depletion der CD3⁺ und HLA-DR⁺ Zellen aus dieser Kultur wurden NK Zellen angereichert. E⁺ Zellen wurden auf 5x10⁷ Zellen/ml in TC199 mit 5 % FCS eingestellt und mit 3 µg/ml OKT3 mAb und 10 µg/ml HLA-DR (anti-HLA-DR) für 30 min auf Eis vorinkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Dann wurden Zellen auf 10⁸ Zellen/ml in MACS-Puffer mit magnetischen GαM-beads (1:5 verdünnt) eingestellt und 15 min auf Eis kultiviert. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese durch eine G23 Nadel auf eine mit Puffer equilibrierte CS-Säule geladen. Während sich die Säule im MACS befand, wurden die CD3⁻/HLA-DR⁻ Zellen mit MACS-Puffer eluiert und wiederum gewaschen. Zur Separationskontrolle wurden die isolierten Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

2.6 Stimulation von T-Zellen

Isolierte T-Zellen wurden, abhängig von der Fragestellung, mit unterschiedlichen Stimuli aktiviert. Um die Zellen spezifisch mit Alloantigenen zu aktivieren, wurden diese entweder in gemischte Lymphozytenkulturen (MLC) mit bestrahlten non-T-Zellen inkubiert oder mit bestrahlten 293 Transfektanten als Stimulatorzellen kokultiviert. Für eine polyklonale Aktivierung der T-Zellen wurden diese in Anwesenheit von verschiedenen Reagenzien kultiviert.

2.6.1 Erzeugen von spezifischen Effektorzellen / Aktivierung durch Alloantigenen

Für eine Aktivierung von T-Zellen durch allogene Transfektanten wurden 293pcDNA Zellen (Vektorkontrollzellen) als Stimulatorzellen eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit TC199 gewaschen und von einer γ-Strahlenquelle mit einer Energie von 100 Gy bestrahlt. Nach erneutem Waschen wurden diese Zellen auf 2x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Ebenso wurden die isolierten T-Zellen auf 2x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Für die Kultur wurden die beiden Zelltypen zu gleichen Teilen gemischt und in aufrecht stehenden 25 cm² Gewebekulturflaschen mit IL-2 (20 U/ml) für sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Nach drei oder vier Tagen wurden 5-7 ml des Kulturüberstands abgenommen und durch frisches Kulturmedium mit IL-2 ersetzt. Aus diesen Kulturen wurden lebende Zellen durch

eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert und die Zellen anschließend zweimal mit TC199 gewaschen. Obwohl die 293 Zellen mit einer sehr hohen Dosis bestrahlt wurden, befanden sich in der Fraktion der lebenden Zellen immer noch, wenn auch in deutlich geringerer Zahl, 293 Zellen. Höhere Strahlendosen, um dieses Überleben der Stimulatorzellen auszuschließen, waren nicht möglich, da diese die stimulatorischen Eigenschaften der 293 Zellen negativ beeinflussten. Für die Aktivierung von T-Zellen mit bestrahlten 293 Zellen wurden nur T-Zellen von HLA-typisierten Blutspendern isoliert, deren MHC-Klasse I sich mindestens im HLA-A Locus von dem der 293 Zellen unterschied.

Für die Aktivierung der T-Zellen mit non-T-Zellen in einer MLC wurden die T-Zellen auf 10^6 Zellen/ml eingestellt und mit der gleichen Zellzahl bestrahlter non-T-Zellen (30 Gy) für sechs bis sieben Tage im Brutschrank kultiviert.

2.6.2 Polyklonale Aktivierung von T-Zellen

Als polyklonale Stimuli zur Aktivierung von T-Zellen wurden IL-2 und Phytohämagglutinin (PHA) verwendet. Entsprechend der MLC-Ansätze wurden die T-Zellen während der Aktivierung in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml Kulturmedium inkubiert. IL-2 wurde in einer Konzentration von 20 U/ml, PHA in einer Konzentration von 1 μ g/ml supplementiert. Ebenso wurde bei dieser Art der Stimulation nach drei oder vier Tagen ein Teil des Kulturüberstands abgenommen und durch frisches Kulturmedium mit den entsprechenden Supplementen ersetzt. Wurden die aktivierten Zellen für weitere Zellkulturexperimente benötigt, so wurden lebende Zellen aus diesen Kulturen durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert und die Zellen anschließend zweimal mit TC199 gewaschen.

2.7 Induktion von Apoptose

2.7.1 Apoptoseinduktion durch Kreuzvernetzung von CD95 mAb

Apoptose läßt sich in einigen CD95⁺ Zellen durch Kreuzvernetzung von Zelltod-induzierenden CD95 mAb auslösen. Hierfür wurden flachbödige Mikrotiterplatten mit GαM Ab (3 µg/ml PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert, dann anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zellen, in denen Apoptose induziert werden sollte, wurden mit TC199 gewaschen und mit dem Zelltod-induzierenden mAb SM1/1 (12,5 µg/ml TC199) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nach einem Zentrifugationsschritt (200 x g, 10 min RT) auf 10⁵ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und 2x10⁵ Zellen / Ansatz für 6 oder 16 h im Brutschrank inkubiert. Die Induktion von Zelltod wurde durchflußzytometrisch analysiert (siehe Abschnitt 2.8.1 für 16 h Ansätze und 2.8.2 für 6 h Ansätze).

2.7.2 Apoptoseinduktion durch CD95L

CD95 Rezeptor-vermittelte Apoptose wurden in humanen Zellen u.a. durch den CD95L induziert. Die Zielzellen wurden hierfür gewaschen und auf 2x10⁵ Zellen /ml Kulturmedium eingestellt. In einer Induktionsphase von 16 h wurden jeweils 2x10⁵ Zielzellen entweder mit 2x10⁵ Effektorzellen oder mit Kulturüberstand von transfizierten Zellen im Brutschrank inkubiert. Als Effektorzellen dienten die unterschiedlichen CD95L transfizierten Zelllinien und die jeweiligen Kontrollzelllinien. Die Induktion von Zelltod wurde durchflußzytometrisch analysiert (siehe Abschnitt 2.8.1 für 16 h Ansätze und 2.8.2 für 6 h Ansätze).

2.8 Zytotoxizitätstestung

Zur Testung von zytolytischer Aktivität von Effektorzellen, bzw. dem Schutz von Zielzellen vor Zytolyse durch Effektorzellen wurden verschiedene Testsysteme verwendet. Entsprechend des zu untersuchenden Mechanismus wurde das Testsystem gewählt.

2.8.1 Propidiumiodidfärbung

Sterbende Zellen verlieren in zunehmendem Maße ihre Membranintegrität. Diese Eigenschaft kann zur Detektion dieser Zellen genutzt werden. Propidiumiodid (PI) ist ein interkalierender Farbstoff, der in die DNA-Helix einlagert und nach Anregung durch einen Laser mit $\lambda=488$ nm Licht mit einer Wellenlänge 610 - 650 nm (rot) emittiert. In der FACS-Analyse entspricht dies der Wellenlänge, die in der Fluoreszenz 2 (FL2) detektiert wird. Über den Anteil toter (PI^+) Zellen kann in Zytotoxizitätstests die beobachtete spezifische Apoptose nach folgender Formel berechnet werden:

$$\% \text{ spezifische Apoptose} = \frac{(\% PI^+_{\text{exp}} - \% PI^+_{\text{spontan}})}{(100 - \% PI^+_{\text{spontan}})} \times 100$$

Zur Färbung wurden gewaschene Zellen in 190 μ l FACS Waschmedium und 10 μ l einer PI-Lösung (20 μ g/ml) für die Messung zugegeben. Daraus ergab sich eine finale PI-Konzentration von 1 μ g/ml. Bei der Messung im FACScan erschienen die toten Zellen als distinkte Population im PI^+ Bereich mit vermindertem Vorwärtsstreulicht im Vergleich zu den vitalen PI Zellen.

2.8.2 Annexin V-Färbung

Apoptotische Zellen zeigen, wie oben beschrieben, sehr schnell einen Verlust der Asymmetrie der Phospholipidmembran. Hierdurch kommt es zur Expression von Phosphatidylserinen an der Zelloberfläche. Das Protein Annexin V bindet an diese Phosphatidylserine. Diese Bindungseigenschaft wird bei dem Annexin V-FITC Kit ausgenutzt, um apoptotisch sterbende Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt durchflußzytometrisch zu detektieren.

Zur Messung wurden die Zellen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Bindungspuffer zweimal gewaschen und mit 2,5 μ l rekombinantem, FITC-markiertem Annexin V in 100 μ l Bindungspuffer für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die

Zellen in 200 µl Bindungspuffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit einem FACScan gemessen.

2.8.3 Nachweis von zytotoxischen Effektorzellen durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests

Dieses Testsystem beruht auf der Tatsache, daß ⁵¹Cr bei der Inkubation von geeigneten Zellen mit einer radioaktiven Natriumchromatlösung (Na₂[⁵¹Cr]O₄) an Membranproteine bindet. Durchlaufen so markierte Zellen einen apoptotischen Prozeß, verlieren diese ihre Membranintegrität und geben Membranvesikel an den Überstand ab. Aus der detektierten Radioaktivität des Überstands läßt sich eine spezifische Lyse errechnen.

10⁶ Zielzellen wurden dreimal mit TC199 gewaschen, um an der Oberfläche gebundenes FCS aus dem Kulturmedium zu entfernen. Die Zellen wurden mit 100 µCi ⁵¹Cr-Lösung für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellsuspensionen durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Nach dem Markierungsvorgang wurden die Zellen mit TC199, das 5 % FCS enthält, gewaschen, um nicht gebundenes ⁵¹Cr zu entfernen.

In Spitzboden-Mikrotiterplatten wurden 10⁴ Zielzellen mit Effektorzellen in 200 µl Medium im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 4 h und nach 20 h wurden jeweils Aliquots von 20 µl auf Filtermatten pipettiert. Die Matten wurden in einem Wärmeschrank getrocknet und mit Szintillatorflüssigkeit getränkt. Diese ermöglicht die Messung des β-Strahlenanteils des γ-Strahlers ⁵¹Cr mit einem Betaplate Szintillationszähler (Wallac). Die spezifische lytische Aktivität der Effektorzellen berechnet sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})}{(\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})} \times 100$$

Hierbei entspricht cpm_{exp} der gemessenen Isotop-Freisetzung in den Ansätzen mit Effektorzellen. Die maximale ⁵¹Cr-Freisetzung (cpm_{max}) entspricht der Aktivität des Überstands aus Ansätzen, in denen die Zielzellen durch das Detergenz Triton x-100 vollständig lysiert wurden. Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung ($\text{cpm}_{\text{spontan}}$) wurde der Überstand aus Ansätzen gemessen, in denen die Zielzellen nur mit Kulturmedium inkubiert wurden. Es wurden nur solche Versuch ausgewertet, in denen die Spontanfreisetzung bei maximal 20 % der Maximallyse lag.

2.9 Proliferationsassay

Die Proliferation von Zellen kann über die Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA gemessen werden. Das exogene, Tritium-markierte Thymidin wird von Zellen während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Inkorporierte Aktivität kann mit einem Betaplate Szintillationszähler (Wallac) bestimmt werden.

In Mikrotiterplatten werden 10⁵ T-Zellen in 200 µl Kulturmedium stimuliert und im Brutschrank kultiviert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate zu einem gewünschten Zeitpunkt wird zu den Zellen 1 µCi [³H]-TdR in 50 µl Kulturmedium gegeben und diese für weitere 16 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden die Zellen mit einem Zellerntegerät geerntet. Bei diesem Prozeß werden die Zellen mit destilliertem Wasser osmotisch aufgeschlossen und die Lysate mit einer Vakuumpumpe durch eine Glasfasermatte gesaugt. Die chromosomale DNA der Zellen bleibt an der Glasfasermatrix der Filtermatte haften und die Aktivität des eingebauten [³H]-TdR kann nach dem Trocknen der Matte und dem Einschweißen in einer Plastikhülle zusammen mit 10 ml Flüssigkeits-Szintillations-Analysator (LKB Beta-Plate) über die Zählimpulse pro Minute (cpm) der Proben bestimmt werden. Für Stimulationsansätze wurden die Mittelwerte der cpm aus 3 Einzelansätzen bestimmt.

2.10 Transfektion von Säugetierzellen mit der cDNA des CD95L

2.10.1 Verwendete Plasmidvektoren

Für die Expression der humanen CD95L in eukaryontischen Zelllinien wurden zwei unterschiedliche Plasmidvektoren verwendet.

Der eine Plasmidvektor, CMV-h95L, enthielt die klonierte cDNA des humanen CD95L unter der Kontrolle des CMV-Promotors und ist ein Derivat des Expressionsvektors pcDNA3 (Invitrogen). Dieser starke Promotor ermöglicht die konstitutive Überexpression von Genen in eukaryontischen Zellen. Das Vektorkonstrukt wurde von der Arbeitsgruppe von J. Tschopp (Lausanne) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der zweite Plasmidvektor, Mx-ORF, ist ein Derivat des Vektors Mx-c-fosD [111] und wurde von der Arbeitsgruppe U. Rüther (Hannover) zu Verfügung gestellt. Dieser Vektor ermöglichte die Überexpression von Genen unter der Kontrolle des IFN- α/β induzierbaren Mx-Promotors. Für die IFN- α/β induzierbare Expression des humanen CD95L wurde die cDNA des Liganden, wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben, in diesen Vektor kloniert.

2.10.2 Konstruktion des Leervektors pcDNA3

Der Leervektor pcDNA3 wurde aus dem Plasmid CMV-h95L generiert, indem das Insert, das Gen des humanen CD95L, aus diesem Vektor mit dem Restriktionsenzym EcoR I herausgeschnitten wurde. Die Fragmente der Restriktion wurden in einem *low melting* Agarosegel (0,8 %) aufgetrennt und die Vektor DNA aus der Agarose mit dem GeneClean II Kit (BIO 101) entsprechend der Vorschriften des Herstellers eluiert. Der Vektor wurde dann religiert (2.19.1) und in *E. coli* transformiert (2.19.3).

2.10.3 Konstruktion des Mx-h95L Plasmidvektors

Von der Arbeitsgruppe U. Rüther (Hannover) wurde das Plasmid Mx-ORF zur Verfügung gestellt. Zur Konstruktion des Mx-h95L Plasmidvektors wurde zunächst in einem Restriktionsverdau das ORF Gen aus dem Vektor mit dem Restriktionsenzym EcoR I geschnitten und anschließend die überhängenden Enden der DNA mit der Klenow Polymerase aufgefüllt. Die linearisierte DNA wurde mit dem QIAquick Kit aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzym Nhe I geschnitten und die Fragmente in einem *low melting* Agarosegel (0,8 %) aufgetrennt. Gleichzeitig wurde der CMV-h95L Vektor mit dem Restriktionsenzym

BamH I linearisiert, mit Klenow Polymerase aufgefüllt, nach der Aufreinigung mit dem QIAquick Kit mit dem Restriktionsenzym Xba I geschnitten und die gewonnenen Fragmente ebenfalls in einem *low melting* Agarosegel (0,8 %) aufgetrennt. Die DNA des Plasmids mit dem Mx-Promotor und der DNA des hCD95L Gens wurde aus der Agarose mit dem GeneClean II Kit (BIO 101) eluiert. Die Konzentrationen der DNA wurden photometrisch bestimmt [112] und auf 1 µg/ml eingestellt.

Die beiden DNA Fragmente wurden mit dem Enzym T₄-Ligase ligiert (2.19.1) und der Ansatz zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (2.19.3). Aus verschiedenen Klonen wurde nun in Minipreps [112] Plasmid DNA isoliert und nach Restriktionsanalyse ein Klon ausgesucht, der das Insert in der richtigen Orientierung für eine Expression enthielt.

2.10.4 Transfektion von 293 Zellen

293 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen) transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein nicht-Liposomen Lipidreagenz, das DNA besonders effizient kondensiert und diese in Micellen durch die Plasmamembran schleust.

Die zu transfizierenden Zellen wurden auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt und jeweils 4 ml in 6well Multischalen ausgesät. 1,25 µg DNA wurden in 100 µl Puffer gelöst und 3,2 µl Enhancer zugegeben. Nach dem kurzen Durchmischen der Lösung mit einem Vortex wurde die Suspension 5 min bei RT inkubiert. 10 µl Effectene-Transfektionsreagenz wurden zu der Lösung gegeben und diese wiederum mit dem Vortex durchmischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Gemisch in 60 µl Kulturmedium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden nach 72 h Kultur im Brutschrank für weitere Versuche verwendet.

Die Expression des CD95L in Mx-h95L Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mit 1000 U/ml humanem IFN- α (293 Transfektanten) oder murinem IFN- α/β (L929 Transfektanten) induziert und die Zellen ebenfalls nach 72 h für weitere Versuche verwendet.

2.10.5 Selektion von 293h95L Zellen, die den CD95L in hoher Dichte stabil an der Zelloberfläche exprimieren

Die Transfektionsstrategie zur Selektion von 293h95L Zellen, die den CD95L in hoher Dichte stabil an der Zelloberfläche exprimieren, ist in folgendem Flußdiagramm dargestellt:

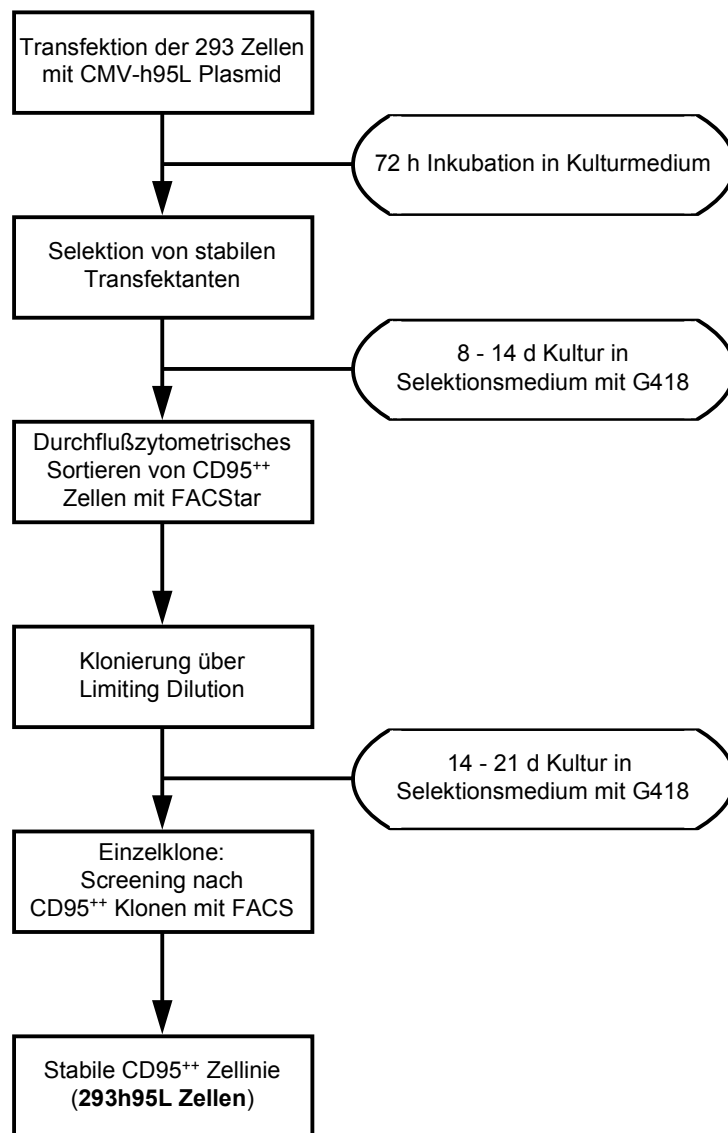


Abbildung 2.1: Klonierungsstrategie

Zur gleichen Zeit wurde eine Zelllinie etabliert, die stabil mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurde. Diese Vektorkontrollzellen wurden als 293pcDNA Zellen bezeichnet.

2.11 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (QIAGEN) isoliert. Für diese Isolierung wurden Zellen in PBS gewaschen, in einem mitgelieferten Puffer lysiert und mit dem QIAshredder (QIAGEN) homogenisiert. Die QIAshredder-Säulen enthalten ein Sieb, durch welches Zellysat zentrifugiert wurde. Das homogenisierte Lysat wurde auf eine mit einer RNA-bindenden Matrix gepackten Zentrifugationssäule gegeben. Die RNA wurde mit mitgelieferten Puffern gewaschen und in DEPC-behandeltem H₂O eluiert. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde zur Konzentrationsbestimmung photometrisch untersucht. Ein Aliquot von 5 µl wurde 1:250 verdünnt, und ein Extinktionsspektrum von 240 bis 300 nm aufgenommen. Aus der Extinktion bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration bestimmt (1 OD \approx 40 µg/ml bei einer Schichtdicke von 1 cm) [112]. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm dient zur Abschätzung von Proteinkontaminationen. Für die dargestellten Experimente wurden nur Präparationen eingesetzt, bei denen dieser Quotient größer als 1,7 war.

2.12 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Güte der RNA-Präparation wurde auf einem analytischen, denaturierenden Agarosegel (1,2 % Agarosegehalt) untersucht. Für 100 ml Agarosegel wurden 1,2 g Agarose, 10 ml 10 x MOPS und 73 ml DEPC-behandeltes H₂O zusammengegeben. Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 17 ml einer 37 % Formaldehydlösung (pH 7,0) zugegeben, das Gel gegossen und mindestens 30 min zum Gelieren stehengelassen.

Zur Probenvorbereitung wurden je 5 µg RNA, 2 µl 10 x MOPS, 5 µl 37 % Formaldehyd und 1,6 µl einer Ethidiumbromidlösung (0,2 mg/ml) gemischt, 15 min bei 55°C denaturiert, im Eisbad abgekühlt und nach Zugabe von 2 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 75 V in 1 x MOPS durchgeführt.

2.13 Reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Für die Amplifikation von RNA Transkripten in einer RT-PCR wird die isolierte RNA zunächst mit Hilfe des Enzyms Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transkriptase (Stratagene) in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA abhängige DNA Polymerase. Für den Start der Reaktion werden kurze DNA-Primer (*random hexamers*) eingesetzt. Die cDNA kann dann in der PCR mit spezifischen Primern amplifiziert werden. Diese Vorgehensweise wird als RT-PCR bezeichnet.

2.13.1 Reverse Transkription

Die verwendete Reverse Transkriptase ist eine gentechnisch hergestellte Variante des Wildtypenzym, die nach Herstellerangaben frei von RNase H Aktivität ist und daher auch besonders lange cDNA Transkripte zu synthetisieren vermag.

V [µl] pro Ansatz	Konzentration	finale Konzentration	Bestandteil
5	10 x	1 x	Stratagene RT-Puffer
32,5	-	-	DEPC-Wasser
5	10 mM	1 mM	dNTP's ¹
2,5	100 µM	5 µM	Random Hexamers
2,5	50 U/ml	2,5 U/ml	Stratascript RT (nicht bei Kontr.)
2,5	1 µg/µl	0,05 µg/µl	Template

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 50 µl. Für ein Experiment wurden jeweils Mastermixe hergestellt, d.h. für alle Proben wurden alle Reagenzien bis auf das Template zusammengegeben und dann in Aliquots auf 250 µl Reaktionsgefäße verteilt, in denen je 2,5 µl Template vorgelegt worden war. Zur Kontrolle auf DNA-Kontaminationen wurde für alle RNA-Proben je ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Vor der Reaktion wurden die Ansätze mit je ca. 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler für 60 min bei 37°C (Reaktion). Abschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 99°C denaturiert. Direkt im Anschluß wurde die PCR durchgeführt (2.13.2)

¹ Mischung aus ATP, CTP, GTP, TTP, je 10 mM

2.13.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde Taq-Polymerase von Qiagen eingesetzt. Das Enzym wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und zeichnet sich durch hohe Temperaturbeständigkeit aus. So liegt das Temperaturoptimum für die DNA-Polymerisation bei diesen Enzymen bei 72°C.

Die, wie unter 2.13.1 beschrieben, gewonnene cDNA wurde mit den jeweiligen spezifischen Primerpaaren untersucht. Die Sequenzen der Primer und der daraus resultierenden PCR-Produkte sind im folgenden dargestellt.

Aldolase A PCR-Produkt

Als Positivkontrolle der RT-Reaktion wurden Primer für einen 464 Basenpaare langen Abschnitt des Aldolase A Gens² als konstitutiv exprimiertes Gen (Housekeeping Gene) gewählt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, daß sowohl murine, als auch humane cDNA amplifiziert wird. In der PCR wurden für dieses Primerpaar Annealingtemperaturen von 55°C bis 70°C gewählt.

Aldolase, Senseprimer:

5' TTC CAT GAG ACA CTC TAC CAG AAG G 3'

Aldolase, Antisenseprimer:

5' ACC ATG TTG GGC TTC AGC AAG G 3'

CD95L1 PCR-Produkt

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 970 Basenpaare langen Abschnitt der CD95L cDNA. In der PCR wurde dieses Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 55°C verwendet.

CD95L₁, Senseprimer:

5' CTA CAG GAC TGA GAA GAA GT 3'

CD95L₁, Antisenseprimer:

5' ACA TTC TCG GTG CCT GTA AC 3'

CD95L2 PCR-Produkt

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 510 Basenpaare langen Abschnitt der CD95L cDNA. In der PCR wurde dieses Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 55°C verwendet.

CD95L₂, Senseprimer:

5' CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG G 3'

CD95L₂, Antisenseprimer:

5' AGA TTC CTC AAA ATT GAC CAG AGA GAG 3'

² EMBL accession number: Y00516, „Mouse mRNA for Aldolase A“

CD951 PCR-Produkt

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 579 Basenpaare langen Abschnitt der cDNA des CD95 Moleküls. In der PCR wurde dieses Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 59°C verwendet.

CD95₁, Senseprimer:

5' GTT ACT ACA GTT GAG ACT CAG ACC 3'

CD95₁, Antisenseprimer:

5' GAT ATA TTT ACT CAA GTC AAC 3'

CD952 PCR-Produkt

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 292 Basenpaare langen Abschnitt der cDNA des CD95 Moleküls. In der PCR wurde dieses Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 59°C verwendet.

CD95₂, Senseprimer:

5' TTT TCT TCC AAA TGC AGA AGA 3'

CD95₂, Antisenseprimer:

5' TTC CTT TCT CTT CAC CCA AAC 3'

T6-SP7 PCR-Produkt

Das Primerpaar amplifiziert die Klonierungssequenz (Multicloningsite / MCS) des pcDNA3 Plasmidvektors. Im Fall des Leervektors wird ein Produkt von 169 bp amplifiziert. Für den Plasmidvektor mit dem Gen für den humanen CD95L wird ein Produkt von 1136 bp erwartet. In der PCR wurde dieses Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 65°C verwendet.

T6, Senseprimer:

5' AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC CA 3'

SP7, Antisenseprimer:

5' GCG AGC TCT AGC ATT TAG GTG ACA CT 3'

PCR-Protokoll:

V [µl] pro Ansatz	Konzentration	Bestandteil
5	10 x	PCR Puffer
1	10 mM	dNTP's
28,8	-	DEPC-Wasser
0,2	5 U/µl	Taq Polymerase
5	10 µM	Primer 1
5	10 µM	Primer 2

Es wurden je 5 µl RT-Ansatz (Template) zu 45 µl PCR-Mastermix pipettiert; die Proben mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet und zur Reaktion in einen Thermocycler überführt.

Temperaturprogramm:

5 min Denaturierung bei 95°C
30 Zyklen mit jeweils 1 min 95°C (Schmelzen der DNA)
1 min Annealing
2 min 72°C (DNA-Polymerisation)
7 min Polymerisation bei 72°C

2.13.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch eine Elektrophorese auf einem 1,5 % Agarosegel. Die Detektion der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid. Diese Substanz interkaliert in die DNA und wird bei der Durchleuchtung des Gels auf einem UV-Tisch (312 nm) durch ihre rot-braune Fluoreszenz sichtbar.

Für die Gele wurde Agarose in 100 ml TAE durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden der Lösung 20 µl Ethidiumbromid (10 g/l) zugesetzt, das Gel gegossen und mindestens 30 min zum Gelieren stehen gelassen. Für die Elektrophorese wurden bis zu 25 µl PCR-Ansatz mit 3 µl Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 70 bis 100 V in TAE-Puffer getrennt. Die Abschätzung der Größe der detektierten DNA-Fragmente erfolgte nach der Beziehung:

$$\log(\text{Molekulargewicht}) \propto \text{Beweglichkeit}$$

Als Maß der Beweglichkeit dienten die Rf-Werte der detektierten Banden, statt des Molekulargewichtes wurde die Länge der Fragmente eingesetzt, die bei statistischer Verteilung der einzelnen Nukleotide proportional dem Molekulargewicht ist. Durch die Auftragung der Rf-Werte des bei der Elektrophorese mitlaufenden Längenstandards gegen den Logarithmus der Fragmentlängen lassen sich die Proportionalitätsfaktoren für die obige Beziehung ermitteln, mit denen sich wiederum die Länge der PCR-Fragmente berechnen läßt. Die gleiche Formel wurde auch zur Bestimmung der apparenten Molekulargewichte von Proteinen verwendet, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abschnitt 2.16).

2.13.4 Restriktionsverdau

Zur Verifikation der Spezifität der PCR Produkte wurden Restriktionskontrollen durchgeführt. Die PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Restriktionen in den für die verwendeten Enzyme vorgeschriebenen Puffern durchgeführt. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte in 12 % Polyacrylamidgelen. Für ein 10 ml Gel wurden 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % Lösung), 5 ml H₂O, 1 ml 10 x TBE, 15 µl Ammoniumperoxydisulfat (APS, 40 % in H₂O) und 15 µl TEMED zusammengegeben und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurden die Proben aufgetragen (je 30 µl Restriktionsverdau + 3 µl Auftragspuffer bzw. 14 µl ungeschnittenes PCR-Fragment + 3 µl Auftragspuffer als Kontrolle). Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE bei 100 V.

2.14 Durchflußzytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

Die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert. Zellen wurden hierfür mit direkt und indirekt markierten (über Zweitreagenz) mAb gefärbt. Es wurden 1 - 5x10⁶ Zellen pro Ansatz in Rundbodenmikrotiterplatten gefärbt. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation: 200 x g, 1 min, 4°C / Waschmedium: PBS + 0,5 % BSA + 0,1 % NaN₃) wurden die Zellen in 20 µl Intraglobin (humanes Immunglobulin G 10 mg/ml) resuspendiert und 1 min unter Schütteln inkubiert. Das Intraglobin wurde zum Abblocken von unspezifischen Antikörperbindungen an die Zellen verwendet. Zu dieser Zellsuspension wurde der spezifische mAb pipettiert und die Ansätze für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde zu den entsprechenden Proben das Sekundärreagenz gegeben und die Ansätze für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben in Waschmedium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Für einige Dreifachfluoreszenzfärbungen war es notwendig, die Zellen nach der Färbung mit GαM-FITC Ab als Zweitreagenz mit NMS für 15 min auf Eis in Dunkelheit zu inkubieren, um freie GαM Ab abzusättigen. Im Anschluß daran konnten solche Ansätze dann mit weiteren, direkt markierten, spezifischen mAb gefärbt werden. Auch diese Proben wurden nach erneutem Waschen in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit FACScan oder FACStar Geräten.

2.15 Durchflußzytometrische Zellsortierung

Mit dem FACStar-Durchflußzytometer ist es möglich, Zellen mit definierten Eigenschaften aus einer Zellpopulation anzureichern. Oberflächenmoleküle werden hierzu mit mAb fluoreszenzmarkiert. Zellen mit den gewünschten Eigenschaften können durch das Festlegen von entsprechenden Parametern (eines analytischen Fensters oder Gates) aus der Gesamtpopulation isoliert werden.

Zur Isolation von CD95⁺⁺ 293 Transfektanten wurden 3×10^7 stabil transfizierte Zellen mit NOK-1_{biot} gefärbt und in 4 ml TC199 mit 5 % FCS überführt. Zur Aufnahme der sortierten Zellen wurden sterile FACS-Röhrchen mit je 1 ml desselben Mediums vorbereitet. In einer Dotplot Darstellung (FL2 vs FSC) wurde ein Meßfenster auf die lebenden CD95⁺⁺ Zellen gesetzt. Die auf diese Weise getrennten Zellen wurden in vorbereiteten, sterilen FACS-Röhrchen gesammelt. Die angereicherten Zellen wurden gewaschen und ein Aliquot dieser Zellen ein zweites Mal zur Kontrolle der Auftrennung analysiert.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung von Proteingemischen wurden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine zunächst in einem β -Mercaptoethanol sowie Natriumdodecylsulfat (SDS) enthaltenden Puffer bei 95°C denaturiert. Das β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken, und das SDS, ein anionisches Detergens, unterbindet fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen eines Proteins. Das negativ geladene SDS bindet zudem in einem Verhältnis von einem Molekül SDS pro zwei Aminosäuren an das Protein, so daß netto eine große negative Ladung entsteht, die ungefähr proportional zur Masse des Proteins ist. Die Trennung erfolgte auf einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel nach Laemmli [113]. Die Molekülgrößen der aufgetrennten Proteine wurden entsprechend der in Abschnitt 2.13.3 angegebenen Formel bestimmt.

In der Gelelektrophoreseapparatur (Mini Protean II, Biorad) wurde zuerst das Trenngel gegossen, nach dem Auspolymerisieren darüber das Sammelgel mit den Probenaschen. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit Laemmlipuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die vollständig polymerisierten Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA (im Sammelgel) bzw. 30 mA (im Trenngel) in Elektrodenpuffer.

2.17 Westernblots

Bei einem Westernblot wird ein Proteingemisch, z.B. ein Zellysat, zunächst in einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) getrennt. Die im Gel enthaltenen Proteine werden dann in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Auf der Membran werden Proteine dann mit spezifischem mAb und AP-gekoppeltem Detektionsantikörper in einer AP-Reaktion gefärbt.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde, wie unter 2.16 beschrieben, durchgeführt. Im Anschluß wurden die Proteine im Semidry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Blottingapparatur wurde wie folgt aufgebaut:

Anode

2 Lagen Filterpapier (1,5 mm dick) in Puffer IV

1 Lage Filterpapier in Puffer III

Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll BA85; 0,45 µm)

Gel in Puffer II

1 Lage Filterpapier in Puffer II

2 Lagen Filterpapier in Puffer I

Kathode

Die Filterpapiere und das Gel wurden 5 min im angegebenen Puffer eingeweicht und dann feucht eingesetzt. Die Nitrocellulosemembranen wurden vor der Benutzung mit Wasser angefeuchtet. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,5 mA pro cm² Membran für 90 bis 120 min. Danach wurden die Membranen über Nacht mit 5 % Milchpulver in PBS/Tween (0,1 %) bei 4°C inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Am nächsten Tag wurde das Milchpulver durch fünfmaliges Waschen in PBS/Tween entfernt (je drei Minuten). Zur Detektion des CD95L in den aufgetrennten Zellysaten wurden die Membranen für 1h mit anti-CD95L mAb (1:250 in PBS/Tween) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte eine Inkubation der Membranen für 1h mit AP-gekoppeltem GαM Ab. Abschließend wurde nach dreimaligem Waschen und Equilibrieren der Membranen in AP-Substratpuffer mit AP-Substrat gefärbt (15 bis 30 min). Die Farbreaktion wurde mit 20 mM EDTA abgestoppt.

2.18 Quantitative Bestimmung von löslichem CD95L im Kulturüberstand

Mit Hilfe eines ELISA (sFasL ELISA Kit / MBL) wurde die Konzentration des CD95L in löslicher Form im Kulturüberstand der erzeugten Transfektanten bestimmt. Mit diesem Kit wird die lösliche Form des CD95L (sFasL) Proteins in einem Sandwich-ELISA nachgewiesen. Für den Assay wurden anti-FasL mAb's verwendet, die zwei unterschiedliche Epitope des Proteins erkennen. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde der erste mAb an Plastik gebunden und die zu messenden Proben, wie auch die Proteinstandards, in den Reaktionsgefäßen inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurden die Ansätze mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweit-mAb inkubiert und die Konzentration des sCD95L in einer Farbreaktion über die optische Dichte (OD) der Proben bestimmt.

2.19 Sonstige Methoden

2.19.1 Ligationsreaktion

Ligationsreaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

	Kontrolle	Ansatz
$V_{(\text{Vektor})}$ [μl]	1	1
$V_{(\text{Insert})}$ [μl]	-	5
$V_{(\text{H}_2\text{O})}$ [μl]	13	8
$V_{(5x \text{ Puffer})}$ [μl]	4	4
$V_{(\text{T4-Ligase})}$ [μl]	2	2

Die DNA wurde jeweils auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Die Ligase hat eine Konzentration von 1 U/ μl . Vektor und Insert werden in äquimolaren Mengen in der Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wird über Nacht bei 15°C durchgeführt. Im Anschluß an die Reaktion wird der Ansatz vor der Transformation 10 min auf 65°C erhitzt.

2.19.2 Erzeugen kompetenter *E. coli*

Um kompetente *E. coli* zu erzeugen, wurden 4 ml einer 20 ml über Nacht Vorkultur des *E. coli* Stamms DH5 α als Inoculum einer 400 ml Hauptkultur eingesetzt. Diese wurde etwa 2 h bei 37°C inkubiert (OD₆₀₀ <0,4). Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (6000 x g, 10 min, 4°C in Sorvall GSA Rotor). Das Bakterienpellet wurde in 30 ml gekühltem, sterilem Tfb1-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Bakterien wurde das Pellet in 4 ml Tfb2 Puffer aufgenommen und in Aliquots von 200 μ l eingefroren. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

2.19.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot von 200 μ l kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden 100 ng Plasmid DNA bzw. 20 μ l Ligationsansatz gegeben. Die Ansätze wurden 45 min auf Eis inkubiert, 1 min in einem Wasserbad auf 37°C erhitzt und dann erneut 2 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden anschließend mit 2 ml LB Medium verdünnt und 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In verschiedenen Verdünnungen wurden die Bakterien auf LB/Ampicillin Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden Bakterienkolonien in 3 ml LB/Ampicillin überführt und bei 37°C weiter inkubiert. Plasmid DNA wurde in einer Miniprep isoliert und in einem Restriktionsverdau analysiert.

2.19.4 Plasmid isolation aus *E. coli*

Mit einer über Nacht Kultur der Bakterien (1 bis 3 ml) wurden 100 bis 500 ml LB/Ampicillin angeimpft. Nach 20 h Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C in Sorvall GSA Rotor). Die Plasmid DNA wurde mit Qiagen Plasmid Midi- bzw. Maxikit zur Aufreinigung von Plasmiden nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Hierbei werden Bakterien mit einem im Kit enthaltenen Lysepuffer aufgeschlossen, Proteine aus dem Lysat gefällt und die DNA auf eine mit DNA-bindender Matrix gepackten Säule geladen. Die DNA wurde mit mitgelieferten Puffern gewaschen und eluiert. Nach Präzipitation der DNA mit Isopropanol wurde die Plasmid DNA in TE (pH 8,0) aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von Apoptoseempfindlichkeit in T-Zellen durch Aktivierung mit Alloantigen

Der CD95 Rezeptor ist ein transmembranes Zelloberflächenmolekül, über das ein Signal zur Apoptose in T-Zellen induziert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die Aktivierung von T-Zellen durch Alloantigen deren Empfindlichkeit für CD95 Rezeptor-vermittelten Zelltod beeinflusst. Die in Tabelle 3.1 dargestellten Versuche zeigen, daß durch Kreuzvernetzung von CD95 Rezeptoren mit Antikörpern in ruhenden T-Zellen kein Zelltod induziert werden kann. Der Anteil toter Zellen, der nach einer Färbung der Ansätze mit Propidiumiodid (PI) durchflußzytometrisch bestimmt wurde, lag bei 8 % (± 1 %). Wurden die Zellen jedoch durch Alloantigen für sechs Tage aktiviert, so konnte durch Inkubation mit kreuzvernetzendem Antikörper Zelltod in durchschnittlich 39,1 % ($\pm 10,1$ %) induziert werden. In Ansätzen mit Kontrollantikörpern wurde ein Anteil PI^+ Zellen bestimmt, der jenem in den nicht aktivierten Ansätzen entsprach (10 % $\pm 7,0$ %). Die beobachtete Induktion von Zelltod war demzufolge CD95 Rezeptor-spezifisch.

Tabelle 3.1: Induktion von Zelltod in T-Zellen mit unterschiedlichem Aktivierungsgrad durch kreuzvernetzte Antikörper ¹⁾

Experiment	kreuzvernetzender mAb	Aktivierungsgrad	
		ruhend	aktiviert
1	W6/32	3 ²⁾	18
	SM1/1	7	51
2	W6/32	6	7
	SM1/1	9	33
3	W6/32	4	5
	SM1/1	8	34

¹⁾ T-Zellen wurden *in vitro* mit non-T-Zellen eines allogenen Spenders für 6 d aktiviert. Die Zellen wurden mit CD95 mAb (SM1/1) oder Kontroll mAb (W6/32, anti-MHC-Klasse I) vorinkubiert und in G α M Ab beladenen Mikrotiterplatten kultiviert. Nach 16 h wurden die Zellen mit PI gefärbt (Abschnitt 2.7.1) und der Anteil toter (PI^+) Zellen im FACS analysiert.

²⁾ Anteil toter (PI^+) Zellen in Prozent

Durchflußzytometrische Analysen zur Expression des CD95 Rezeptors auf den T-Zellen zeigten, daß 40 - 50 % ruhender T-Zellen diesen an der Zelloberfläche exprimieren (linke Histogramm in Abb. 3.1). Nach einer *in vitro* Aktivierung von T-Zellen mit Alloantigen lag der Anteil der CD95⁺ Zellen bei etwa 70 % (mittleres Histogramm in Abb. 3.1). Die CD95⁺ Zellen in den *in vitro* aktivierten Ansätzen exprimierten den Rezeptor allerdings in einer höheren Dichte an der Zelloberfläche. Dieser Unterschied in der Expressionsdichte scheint den Untersuchungen zufolge für die Empfindlichkeit für Apoptose durch Kreuzvernetzung der CD95 Rezeptoren verantwortlich zu sein, da diese den Rezeptor in hoher Dichte exprimierende Population nach der Induktion von Zelltod eliminiert wurde (rechtes Histogramm in Abb. 3.1). T-Zellen werden demnach durch ihre Aktivierung empfindlich für CD95 Rezeptor-spezifische Apoptose.

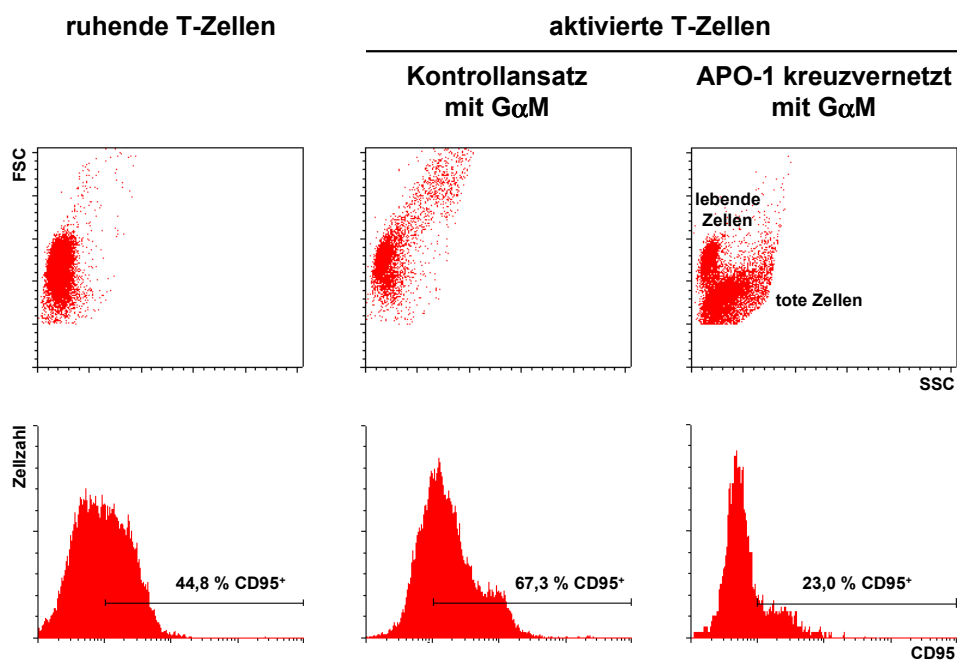


Abbildung 3.1: FACS-Analyse der CD95 Rezeptorexpression auf T-Zellen nach Kreuzvernetzung von CD95 mAb

T-Zellen wurden für 7 Tage mit bestrahlten non-T-Zellen aktiviert, mit CD95 mAb (APO-1) vorinkubiert und für 16 h in GαM Ab beladenen Mikrotiterplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PI und CD95 mAb (SM1/23) gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. In den Dotplots sind die Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften der Zellen dargestellt. Die Histogramme der unteren Reihe zeigen die Expression des CD95 Rezeptors der lebenden Zellpopulation (PI Zellen nach einer PI-Färbung). Zum Vergleich sind die Eigenschaften frisch isolierter, ruhender T-Zellen dargestellt (linke Spalte).

3.2 Herstellung und Charakterisierung von Zellen, die den humanen CD95 Liganden überexprimieren

Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Untersuchungen zur Apoptoseinduktion haben gezeigt, daß es *in vitro* möglich ist, spezifisch in aktivierten T-Zellen Zelltod durch Stimulation des CD95 Rezeptorsignalwegs zu induzieren. Zur Bearbeitung der Frage, ob der physiologische Ligand des CD95 Rezeptors, der CD95L (FasL), die gleichen Signal-induzierenden Eigenschaften wie CD95 Antikörper besitzt oder ob sich dessen Wirkungen von diesen unterscheidet, wurden Zelllinien mit der cDNA des Gens für den humanen CD95L transfiziert, um Zellen zu erzeugen, die den Liganden in hoher Dichte exprimieren. Es wurden transient und stabil das Transgen exprimierende Zellen hergestellt.

3.2.1 Transiente Expression des hCD95L in unterschiedlichen Zelltypen

Für die transiente Expression des humanen CD95L in verschiedenen Zelllinien wurden zwei unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet. Diese unterschieden sich vor allem in den verwendeten Promotoren. Das Konstrukt CMV-h95L ist ein Derivat des Plasmids pcDNA3 (Invitrogen) und ermöglicht die konstitutive Expression des CD95L in Eukaryonten unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Konstrukt Mx-h95L hingegen ist ein Derivat des Plasmids Mx-c-fosD [111] und enthält den IFN- $\alpha\beta$ induzierbaren Mx-Promotor.

Es wurden verschiedene Zelllinien für die Transfektion mit den beschriebenen Genkonstrukten ausgewählt. Diese waren alle zur Überexpression von Transgenen geeignet. Die Zelllinien wurden vor der Transfektion mit dem Gen des CD95L mit Hilfe der RT-PCR auf eine endogene Expression des zu transfizierenden Gens untersucht. Die transfizierten Zelllinien und die Analyse der Expression des CD95L auf RNA- und auf Proteinebene in diesen Transfektanten sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Tabelle 3.2: Charakterisierung von transient transfizierten Zelllinien ¹⁾

Zelllinie	Zellart	Transfektionsplasmid	Methoden der Expressionsanalyse			
			RT-PCR	Western	FACS	Funktion ²⁾
Raji	humanes Burkitt-lymphom	CMVh95L	+	+	-	+
L929	murine Fibroblastenlinie	CMVh95L	+	-	-	+
		Mx-h95L	+	n.t. ³⁾	-	+
COS	African green monkey Nierenzelle	CMVh95L	+	+	-	+
293	humane embryonale Nierenzelle	CMVh95L	+	+	+	+
		Mx-h95L	+	+	+	+

¹⁾ Die angegebenen Zelllinien wurden mit Liposomen-Transfektionsreagenzien transfiziert. Die Expression des CD95L wurde 72 h nach der Transfektion analysiert. Die Expression des CD95L in den Zellen, die mit dem Mx-h95L Genkonstrukt transfiziert wurden, 48 h nach der Transfektion mit exogenem IFN- α (1000 U/ml) induziert.

²⁾ Die Funktionalität des exprimierten CD95L wurde in ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstests über die Induktion von Zelltod in Jurkat Zellen analysiert.

³⁾ nicht getestet

Die Analyse der transfizierten Zellen zeigte, daß die Zelllinie 293 die besten Eigenschaften von den verwendeten Zelllinien für die Überexpression des CD95L besaß. Die Transfektanten zeigten in semiquantitativen Analysen nicht nur die stärksten Signale der getesteten Zelllinien in der RT-PCR, der Westernblotanalyse und in ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstests. Die 293 Zelllinie war auch die einzige der verwendeten Zelllinien, auf welcher der CD95L durchflußzytometrisch dargestellt werden konnte. Im folgenden werden die Expressionsanalysen des CD95L der transient transfizierten 293 Zellen Zelllinien dargestellt.

Eine semiquantitative RT-PCR mit spezifischen Primern für die cDNA des CD95L zeigte, daß in 293 Zellen, die mit dem Vektor pcDNA3 (Vektorkontrolle) transfiziert wurden (293 Zellen + pcDNA), keine Transkription des Gens des CD95L nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2). 293 Zellen, die mit dem CMV-h95L Konstrukt transfiziert wurden (293 Zellen + CMV-h95L), transkribierten das CD95L Gen unabhängig von der Zugabe von exogenem IFN- α . In 293 Zellen, die mit dem Mx-h95L Konstrukt transfiziert wurden (293 Zellen + Mx-h95L), konnte eine Basisexpression des Transgens gezeigt werden. Durch die

Inkubation der Zellen mit exogenem humanen IFN- α wurde diese Expression nachweisbar gesteigert.

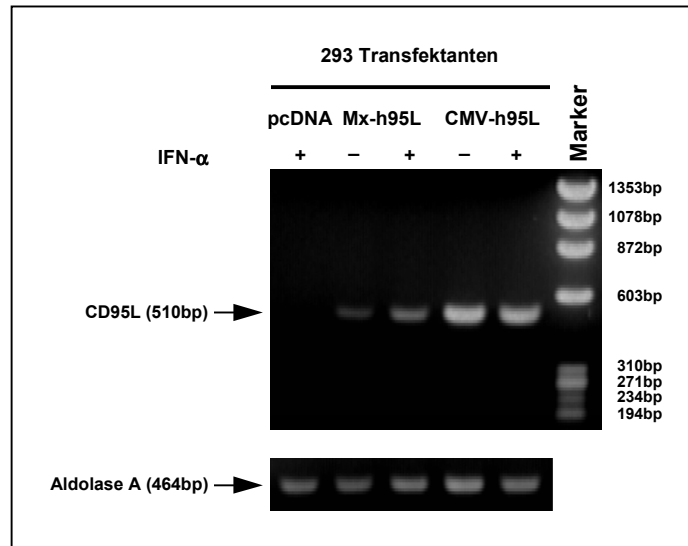


Abbildung 3.2: Semiquantitative RT-PCR mit RNA von transfizierten 293 Zellen

Die RT-Reaktion wurde mit isolierter Gesamt-RNA aus Zellysaten durchgeführt. Zur semiquantitativen Analyse der PCR wurden mehrere Reaktionen mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Die dargestellte PCR ist eine Reaktion mit 20 Reaktionszyklen. Zur Kontrolle der RT-PCR wurde das Aldolase A Gen amplifiziert.

Abbildung 3.3 zeigt eine Westernblotanalyse von Zellysaten der 293 Transfektanten. Der mAb G247-4 erkannte sowohl in den Proben der 293 Zellen + Mx-h95L, als auch in jenen der 293 Zellen + CMV-h95L ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 40 kDa. Innerhalb der Nachweisgrenzen ließ sich keine deutliche IFN- α abhängige Steigerung der Expression des CD95L in 293 Zellen + Mx-h95L zeigen. Der mAb detektierte in den Zellysaten der 293 Zellen + CMV-h95L zusätzliche Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 26 und 29 kDa. Diese Proteinbanden entsprechen in ihrer Größe den beschriebenen, unterschiedlich glykosylierten, löslichen Formen des CD95L (sCD95L) [65]. Der sCD95L wird durch Shedding des transmembranen Proteins durch Matrixmetalloproteasen (MMPs) erzeugt. Für den Nachweis von sCD95L in den Zellysaten gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Durch die massive Überexpression des Transgens könnten die Zellen die prozessierte Form des CD95L unspezifisch an der Zelloberfläche gebunden haben. Da 293 Zellen den CD95 Rezeptor exprimieren, ist es auch möglich, daß der sCD95L über die Bindung an die Rezeptoren in das Zellysat gelangte. Ein ähnlicher Effekt

wurde auch für die Überexpression des murinen CD95L in der Insektenzelllinie Sf9 [114] und des humanen TNF- α in der murinen Zelllinie 3T3 [115] beobachtet.

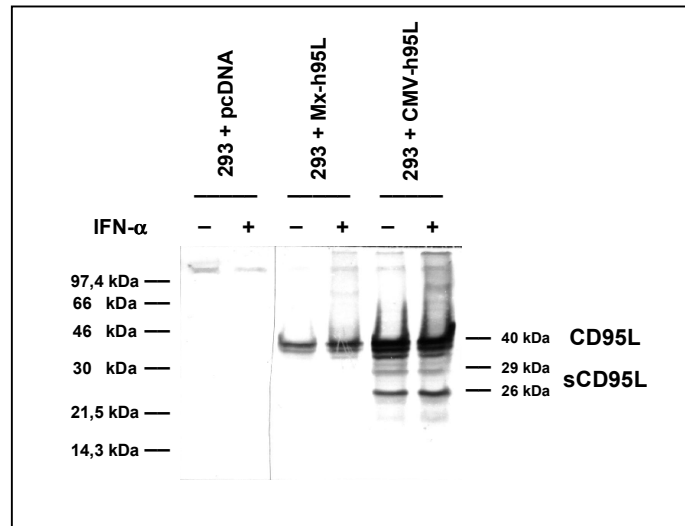


Abbildung 3.3: Westernblotanalyse der CD95L Expression in transfizierten 293 Zellen

Zellysate der transfizierten Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Diese Membran wurde mit einem CD95L spezifischen mAb (G247-4) inkubiert und der mAb in einer AP-Reaktion angefärbt.

Der CD95L ließ sich auf den 293 Transfektanten auch durchflußzytometrisch nachweisen (Abb. 3.4). Die FACS-Analyse der 293 Zellen + CMV-h95L ergab für diese eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität bei Kanal 472. Das dargestellte Histogramm zeigt, daß die Expressionsdichte der Transfektanten sehr heterogen war und nur ein geringer Anteil den CD95L in hoher Dichte exprimierte. Dennoch wurde eine Population am rechten Rand mit sehr hoher Expressionsdichte, die aus diesem Grund auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität nach oben beeinflusst, beobachtet. Für die 293 Zellen + Mx-h95L lag dieser Durchschnittswert nur bei 51,9. Für die 293 Zellen + Mx-h95L, deren Expression des CD95L durch exogenes IFN- α induziert wurde, verdoppelte sich dieser Wert auf über 100. In der Mehrzahl der Transfektionsexperimente mit dem Mx-h95L Konstrukt wurde keine Population beobachtet, die den hochexprimierenden 293 Zellen + CMV-h95L entsprach.

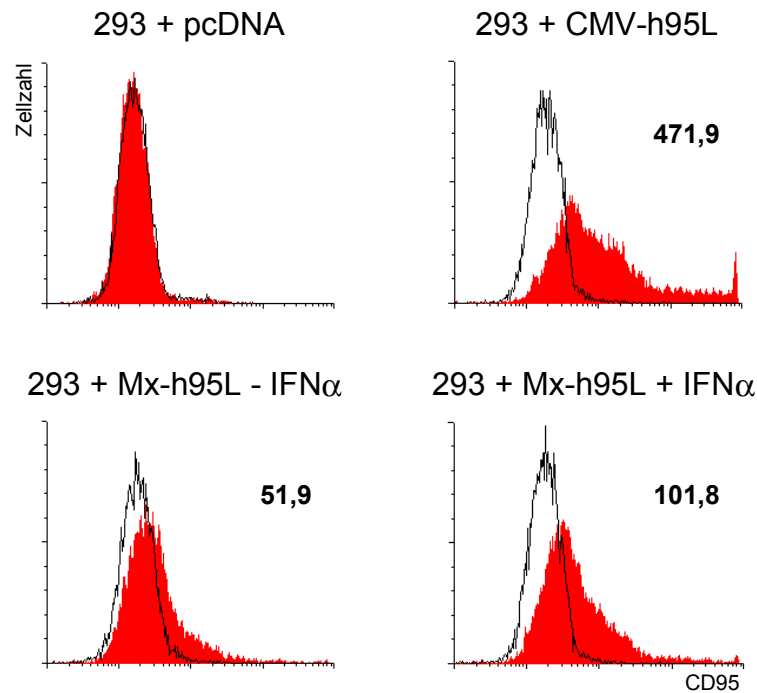


Abbildung 3.4: FACS-Analyse der Expression des CD95L auf transient transfizierten 293 Zellen

293 Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit einem biotinylierten CD95L mAb (NOK-1) und SA-PE gefärbt. Anschließend wurden die Proben durchflußzytometrisch analysiert. Zu einem Teil der Mx-h95L transfizierten 293 Zellen wurde 24 h vor der Messung IFN- α (1000 U/ml) gegeben. Die Expression des CD95L ist in ausgefüllten Histogrammen der Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten der Zweitreagenzkontrollen (SA-PE) sind als offene Histogramme dargestellt. Die Zahlen neben den Histogrammen geben den Kanal der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität als Maß für die Expressionsdichte wieder.

Um die Funktion des transgenen CD95L zu testen, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Als Testsystem diente hierbei, neben den oben erwähnten ^{51}Cr -Freisetzungstests (Tab. 3.2), auch ein Assay, in welchem Apoptose in Jurkat Zellen induziert und der Zelltod mit dem FACS detektiert wurde. Jurkat Zellen wurden für diesen Test für 16 h auf den 293 Transfektanten kultiviert und anschließend der Anteil toter Zellen in diesen Kulturen nach einer PI-Färbung durchflußzytometrisch bestimmt (Abb. 3.5). Die 293 Zellen konnten durch ihre charakteristischen Streulichteigenschaften von den Jurkat Zellen unterschieden werden, auf die ein analytisches Meßfenster gesetzt wurde („gating“). PI-Kontrollfärbungen von 293 Zellen zeigten zusätzlich, daß dieses Reagenz die Streulichteigenschaften der 293 Zellen nicht ungünstig für das System beeinflusste. Jurkat Zellen, die auf 293 Zellen + CMV-h95L kultiviert wurden, waren zu 76,5 % PI $^+$. Für die 293 Zellen + Mx-h95L lag der Anteil toter Jurkat Zellen bei 49 % (- IFN- α), bzw. bei 69 % (+ IFN- α). Diese Untersuchungen zeigten,

daß schon die geringe Konzentration von CD95L, die von den 293 Zellen + Mx-h95L ohne die Induktion der Expression durch exogenes IFN- α exprimiert wird (Abb. 3.4), ausreicht, um Zelltod in Jurkat Zellen auszulösen.

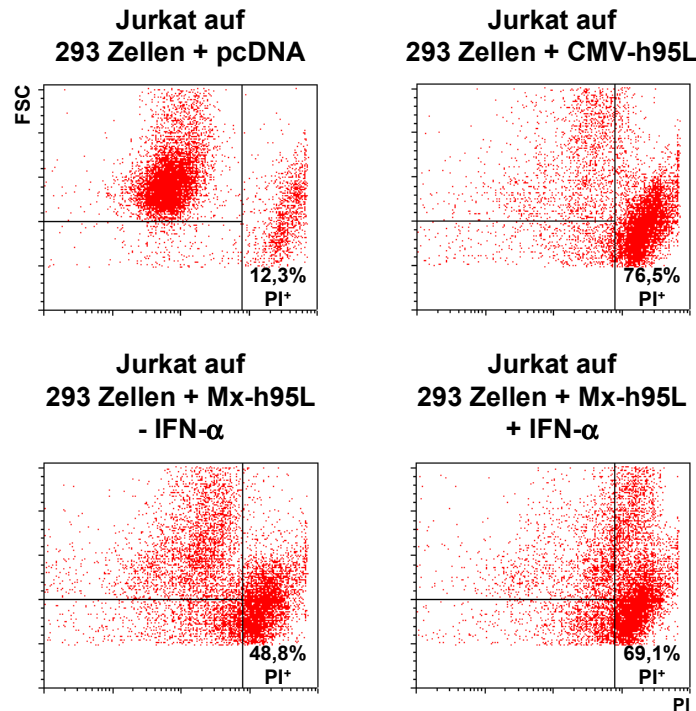


Abbildung 3.5: FACS-Analyse von Jurkat Zellen nach Kokultur mit 293 Transfektanten

Jurkat Zellen wurden für 16 h auf transfizierten 293 Zellen kultiviert. Der Anteil toter (PI^+) Jurkat Zellen wurde in einer PI-Färbung durchflußzytometrisch bestimmt. Durch das Setzen eines analytischen Meßfensters auf die Jurkat Zellen konnten die 293 Zellen in der Messung diskriminiert werden.

3.2.2 Stabile Expression des hCD95L in der Zelllinie 293

Um die Wirkungen des CD95L unter gleichbleibenden Bedingungen untersuchen zu können, wurden stabile Transfektanten hergestellt. Der oben dargestellten Klonierungsstrategie (Abschnitt 2.10.5) folgend, wurden 293 Zellen mit dem CMV-h95L Konstrukt transfiziert. Zur Selektion stabiler Transfektanten wurden die Zellen für etwa zwei Wochen in Selektionsmedium (enthielt das Antibiotikum Geneticin/G418) kultiviert. Die in FACS-Analysen ermittelten Expressionsdichten des CD95L auf den Transfektanten zeigte, daß in diesen Kulturen die Zellen mit den höchsten Expressionsdichten, die in den transient transfizierten Ansätzen beobachtet wurden, fehlten (Vergleich Abb. 3.4 und Abb. 3.6). Diese hohen Expressionsdichten könnten auf eine höhere Anzahl von Plasmiden in den Zellen

(Multicopy-Zellen) zurückgeführt werden. Die selektierten Zellen konnten hingegen nur durch Integration des Plasmids in ihr Genom überleben. Da dies ein Vorgang mit einer bestimmten, relativ geringen statistischen Wahrscheinlichkeit ist, fehlen vermutlich Multicopy-Zellen in den stabil exprimierenden Kulturen.

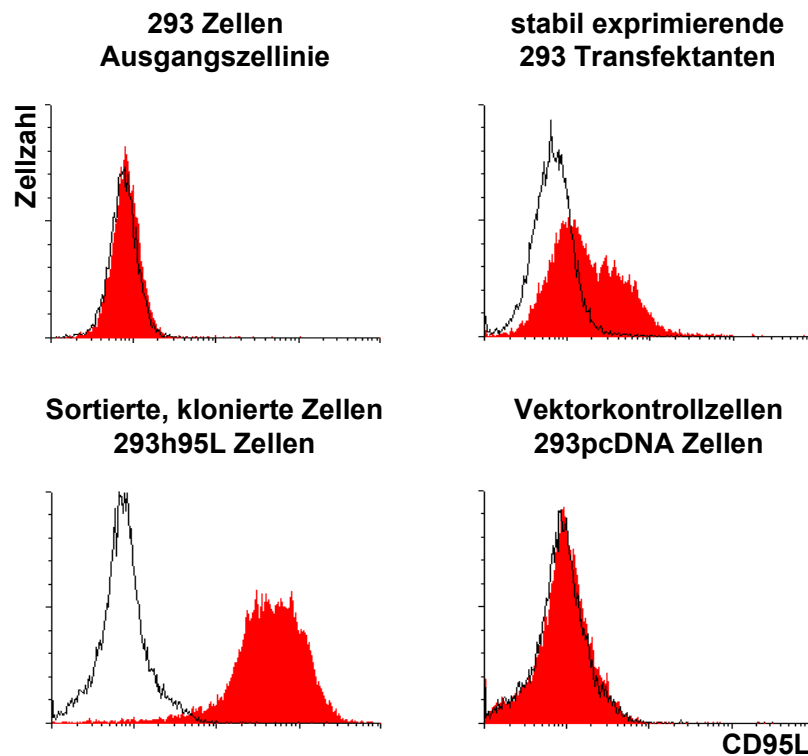


Abbildung 3.6: FACS-Analyse der CD95L Expression auf den stabil transfizierten 293 Zellen

293 Transfektanten wurden mit einem biotinylierten CD95L mAb (NOK-1) und SA-PE gefärbt. Anschließend wurden die Proben durchflußzytometrisch analysiert. Die Expression von CD95L ist als ausgefülltes Histogramm dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten der Zweitreagenzkontrollen (SA-PE) wurden als offene Histogramme gezeigt.

Aus der selektionierten Kultur wurden hoch exprimierende Zellen durch eine durchflußzytometrische Zellsortierung angereichert. Die Klonierung von Zellen aus dieser Zellpopulation durch *Limiting Dilution* lieferte Klone, die den CD95L in hoher Dichte exprimierten. Ein solcher Klon war der Klon 2B12. Zellen dieses Klons wurden für die weiteren Versuche verwendet und im folgenden als 293h95L Zellen bezeichnet.

Der CD95L kommt auch in einer löslichen Form vor. Wie oben bereits beschrieben, wird dieser sCD95L durch MMPs aus der membranständigen Form prozessiert. In ELISA-Experimenten wurde untersucht, ob die 293 Transfektanten ebenfalls sCD95L an den Kulturüberstand abgeben. Die in Tabelle 3.3 dargestellten Ergebnisse eines solchen ELISA

zeigen, daß 10^5 293h95L Zellen in 4 h ca. 3 ng/ml CD95L an den Kulturüberstand abgeben. Nach 20 h wurde im Überstand dieser Zellen 16,5 ng/ml CD95L nachgewiesen. Die für diesen ELISA gewählten Zellkonzentrationen und Inkubationszeiten entsprachen jenen, die für die Zytotoxizitätstests in den folgenden Kapiteln verwendet wurden.

Tabelle 3.3: Konzentrationen von CD95L im Kulturüberstand der 293 Transfektanten in Abhängigkeit von der Zeit ¹⁾

293 Zellen	Inkubation	Konzentration von CD95L im Kulturüberstand [ng/ml]
293pcDNA	4 h	n.d. ²⁾
	20 h	n.d.
293h95L	4 h	3,3
	20 h	16,5

¹⁾ Konzentration des CD95L im Kulturüberstand von 10^5 Zellen/ml wurde nach 4 h und 20 h in einem ELISA bestimmt.

²⁾ nicht detektierbar

In Zytotoxizitätstests mit Jurkat Zellen als Indikatorzellen wurde demonstriert, daß der sCD95L im Kulturüberstand der 293h95L Zellen biologische Aktivität besaß. Nach 16 h Kultur der Jurkat Zellen in Kulturmedium mit ca. 20 ng/ml sCD95L wurde in den Jurkat Zellen durch FACS-Analyse einer PI-Färbung eine Induktion spezifischer Apoptose von 87,5 % gemessen ($\pm 9,3$ %). Versuche mit frisch isolierten, ruhenden T-Zellen und ebenso mit sechs Tage durch Alloantigen aktivierten T-Zellen zeigten, daß diese Zellen nicht empfindlich für Apoptose bei diesen sCD95L Konzentrationen waren. Die im folgenden beobachteten und beschriebenen Effekte des CD95L auf isolierte T-Zellen sind entsprechend dieser Ergebnisse überwiegend auf die membranständige Form des CD95L zurückzuführen.

3.3 Induktion von Zelltod in T-Zellen durch Kokultur mit CD95L⁺ 293 Transfektanten

Um festzustellen, welche Auswirkungen die Konfrontation von T-Zellen mit dem CD95L hat, wurden T-Zellen mit 293pcDNA und 293h95L Transfektanten kokultiviert. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung des Liganden sowohl auf ruhende, als auch auf aktivierte T-Zellen untersucht. Hierbei war von Interesse, ob für CD95L ein ähnliches Wirkungsfenster besteht, wie für die Induktion von Zelltod durch Kreuzvernetzung der CD95 Rezeptoren mit Antikörpern.

3.3.1 Kokultur von ruhenden T-Zellen mit 293 Transfektanten

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, löste die Kreuzvernetzung von CD95 Rezeptoren durch mAb keinen Zelltod von ruhenden T-Zellen aus. Um festzustellen, ob dies auch für das durch den CD95L induzierte Signal gilt, wurden ruhende T-Zellen mit 293h95L Zellen für 16 h kokultiviert. In einer PI-Färbung wurden tote Zellen markiert. Gleichzeitig wurden die Zellen auch mit CD95 mAb (SM1/23) und G α M-FITC Ab gefärbt und die Kulturen durchflußzytometrisch betrachtet. Die Analyse der Streulichteigenschaften dieser Zellen zeigte, daß eine Teilpopulation nach Kokultur mit 293h95L Zellen kleiner und granulärer wurde (Abb. 3.7). Durch die Streulichteigenschaften ließen sich auch die 293 Zellen von den T-Zellen unterscheiden, so daß es möglich war durch das Setzen eines analytischen Meßfensters auf die T-Zellen nur diese zu analysieren.

In der Kokultur von ruhenden T-Zellen mit 293pcDNA Zellen waren 44 % der T-Zellen CD95⁺ (Abb. 3.7). Tote Zellen waren in diesen Kulturen kaum vorhanden. Im Gegensatz dazu führte die Kokultur dieser T-Zellen mit 293h95L Zellen zu einer deutlichen Veränderung. In diesen Kulturen war der Anteil der CD95⁺ Zellen in der Population der lebenden T-Zellen deutlich reduziert (5,3 % CD95⁺ T-Zellen entsprechen 8,6 % der PI⁻, lebenden T-Zellen). Im gleichen Verhältnis konnte in diesen Kulturen eine Zunahme toter Zellen (PI⁺ Zellen) beobachtet werden (38,4 % gegenüber 4,3 % in den Ansätzen mit 293pcDNA Zellen). Die Kokultur ruhender T-Zellen mit den CD95L⁺ 293 Transfektanten führte demnach zu einer Elimination der T-Zellpopulation, die den CD95 Rezeptor exprimiert.

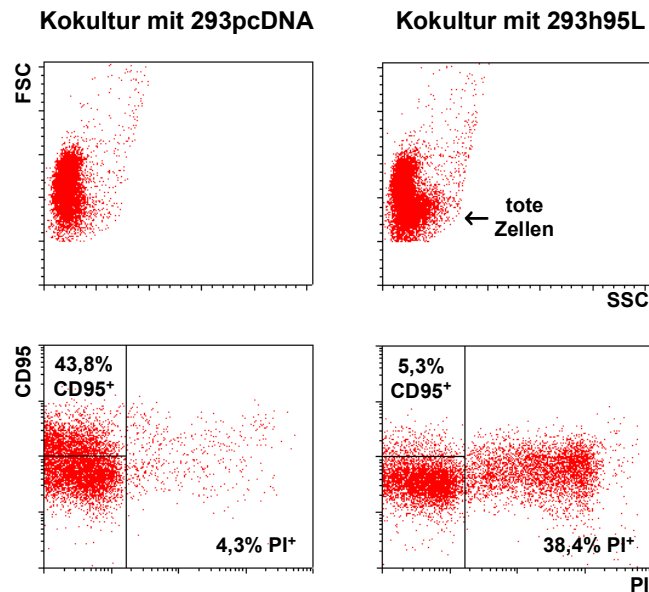


Abbildung 3.7: FACS-Analyse ruhender T-Zellen nach Kokultur mit 293 Transfektanten

Frisch isolierte, ruhende T-Zellen wurden für 16 h mit 293pcDNA bzw. 293h95L Zellen kokultiviert. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit CD95 mAb (SM1/23 und G α M-FITC) und PI gefärbt. Es wurden nur die T-Zellen betrachtet (Meßfenster auf T-Zellen). Die oberen Dotplots zeigen die Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuungseigenschaften (SSC) der T-Zellen. In den unteren Dotplots ist die Expression des CD95 Rezeptors gegen die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids aufgetragen. Letztere ist ein Maß für den Anteil toter Zellen in der Kultur.

Dieser überraschende Befund wurde in weiteren Versuchen näher analysiert. Untersuchungen zum Dosis/Wirkungsspektrum der CD95L-induzierten Apoptose zeigten, daß unterschiedliche Zellzahlen von 293pcDNA Zellen keinen Einfluß auf die Vitalität der T-Zellen hatten (Abb. 3.8). Die Induktion von Apoptose in ruhenden T-Zellen war hingegen abhängig vom Effektor/Target Verhältnis der 293h95L Zellen und T-Zellen. Dies zeigt, daß der Anteil apoptotischer T-Zellen abhängig von der Konzentration des CD95L in diesem System war.

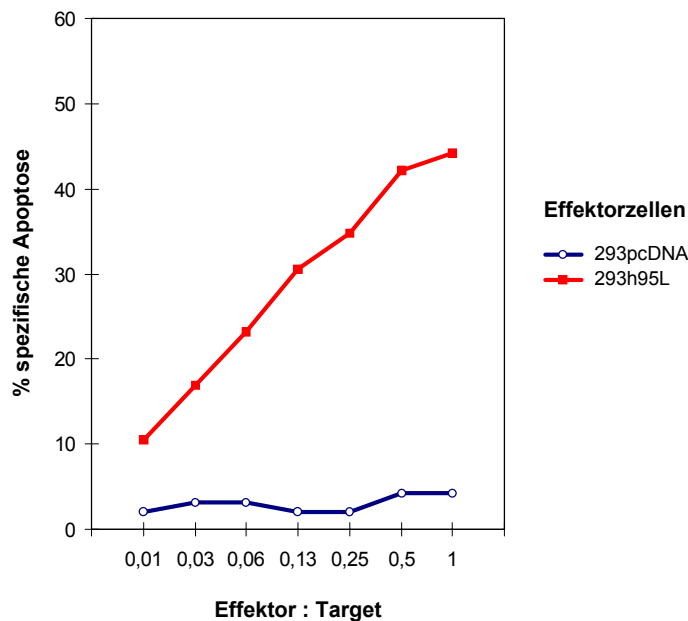


Abbildung 3.8: Induktion spezifischer Apoptose in ruhenden T-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl 293h95L Zellen

2×10^5 ruhende T-Zellen wurden für 16 h mit unterschiedlichen Zellzahlen von 293 Transfektanten kokultiviert und anschließend mit PI gefärbt. In einer FACS-Analyse wurde der Anteil toter T-Zellen in diesen Kulturen bestimmt. Über die Zahl der toten Zellen (PI^+ Zellen) wurde der Anteil spezifischer Apoptose berechnet und die Werte im Graphen gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen.

In Inhibitionsexperimenten wurde geprüft, ob die beobachtete Induktion von Apoptose in einer Teilpopulation ruhender T-Zellen durch 293h95L Zellen ausschließlich CD95 Rezeptorvermittelt ist. In den in Abbildung 3.9 dargestellten Experimenten zeigte sich, daß durch Blockade der Bindungsstelle des CD95L auf T-Zellen mit nichtstimulierendem CD95 mAb (SM1/23) die Induktion von Zelltod inhibiert wird. Um sicherzustellen, daß dieser Effekt Folge einer spezifischen Bindung des mAb ist, wurde mit Kontrollantikörpern untersucht, ob schon die Inkubation mit Antikörpern allein die Induktion von Apoptose inhibiert. Zu diesem Zweck wurden die T-Zellen mit einem mAb inkubiert, der ein anderes Molekül als CD95 auf T-Zellen erkennt (mAb CD4.1 erkennt das CD4 Antigen). Diese Inkubation hatte ebenso keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen, wie die Inkubation mit einem nicht spezifisch bindenden Isotypkontroll-mAb (mAb HIS24 hat wie mAb SM1/23 den Isotyp IgG_{2b}). Eine solche Isotypkontrolle würde Inhibitionen durch Bindungen über den Fc-Teil des mAb zeigen.

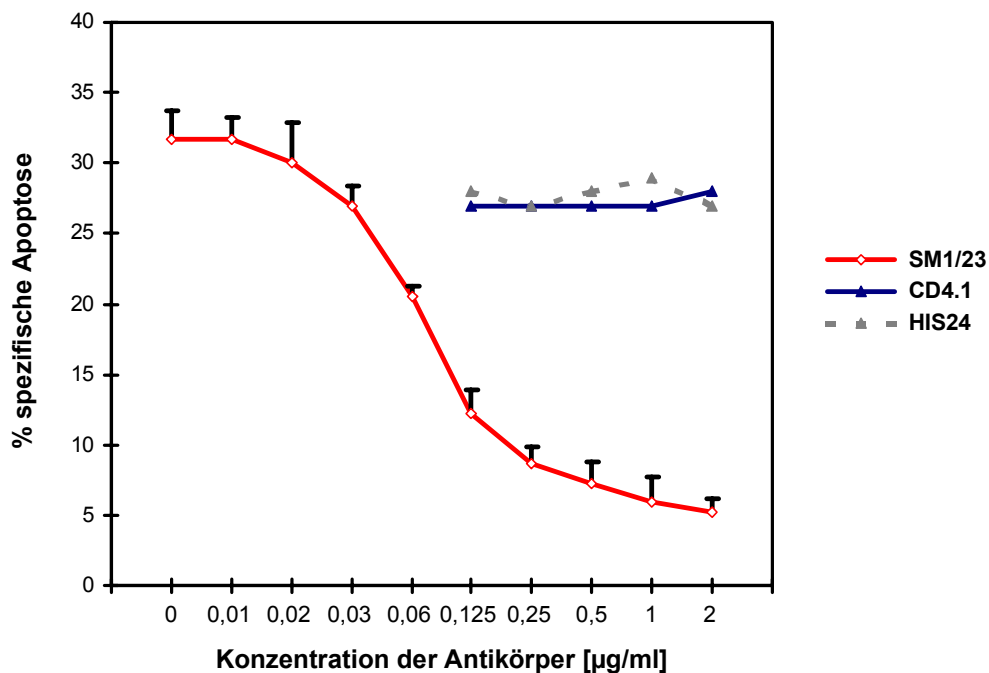


Abbildung 3.9: Inhibition der 293h95L-vermittelten Apoptose durch CD95 mAb

Ruhende T-Zellen wurden mit SM1/23, CD4.1 und HIS24 in den angegebenen Konzentrationen für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Zu den Ansätzen wurden dann 293h95L Zellen gegeben und diese für 16 h im Brutschrank kultiviert. Nach einer PI-Färbung wurde der Anteil toter Zellen durchflußzytometrisch bestimmt und aus den Meßwerten der Anteil spezifischer Apoptose berechnet (siehe Abschnitt 2.8.1). Die Werte der spezifischen Apoptose der Ansätze mit SM1/23 resultieren aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Kontrollantikörper wurden nur in den höchsten Konzentrationen eingesetzt.

Es stellte sich die Frage, welcher Subpopulation die CD95⁺ Zellen angehören, die während der Kokultur mit 293h95L Zellen eliminiert wurden. Hierfür wurden Zwei-Farben-Analysen der T-Zellpopulation durchgeführt. Es zeigte sich, daß der CD95 Rezeptor von CD45R0⁺ Zellen exprimiert wird. Die CD45RA⁺ Subpopulation ruhender T-Zellen war hingegen CD95⁻ (nicht im Bild dargestellt). Dieses Ergebnis konnte durch CD95 Färbungen von isolierten T-Zellsubpopulationen bestätigt werden. Der in Abbildung 3.10 dargestellte Versuch zeigt, daß die Gesamtpopulation isolierter, ruhender T-Zellen aus zwei Subpopulationen mit charakteristischen CD95 Expressionen besteht. Während die CD45RA⁺ T-Zellen keine signifikante Expression des CD95 Rezeptors zeigten, waren die CD45R0⁺ T-Zellen CD95⁺. Demzufolge sollte die CD45R0⁺ T-Zellsubpopulation, die als vormals aktivierte „memory“ Zellpopulation beschrieben wurde [60], die für CD95 Rezeptor-vermittelte Apoptose empfindliche Population sein.

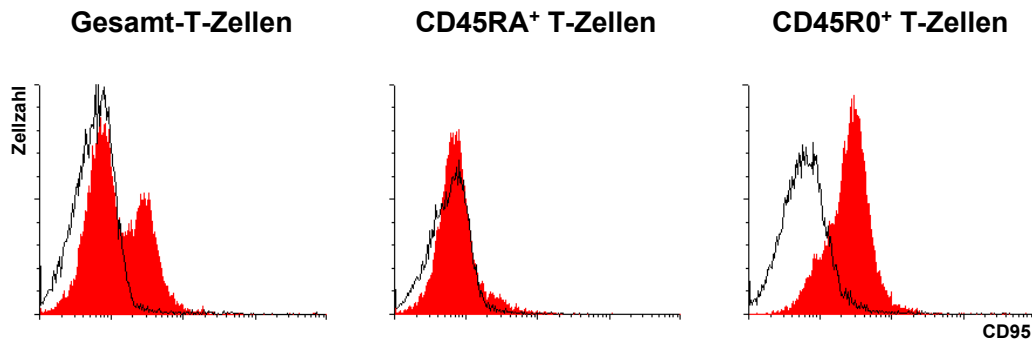


Abbildung 3.10: FACS-Analyse separierter ruhender T-Zellsubpopulationen

Ruhende T-Zellen wurden isoliert und mit der Panningtechnik in CD45RA⁺ und CD45R0⁺ Zellen aufgereinigt. Die Zellen wurden mit CD95 mAb (SM1/23) und GαM-FITC gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Die Expressionen des CD95 Rezeptors der Ausgangspopulation (links) und der separierten T-Zellpopulationen sind in Histogrammen der Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Fluoreszenzsignale der Isotypkontrollfärbungen (Ox40 und GαM-FITC) sind als offene Histogramme dargestellt.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde gefragt, ob sich innerhalb der CD45R0⁺ Zellen durch 293h95L Transfektanten mehr Zelltod induzieren läßt als bei CD45RA⁺ Zellen. Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob es hierbei auch Unterschiede zwischen der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulation von T-Zellen gibt.

Tabelle 3.4: Induktion von Apoptose in ruhenden T-Zellen nach Kokultur mit 293 Transfektanten¹⁾

T-Zellpopulation	% spezifische Apoptose nach Kokultur mit 293 Zellen ²⁾	
	293pcDNA	293h95L
Gesamtpopulation	1,0 (±1,6)	40,6 (±10,9)
CD4 ⁺ /CD45RA ⁺	0,0 (±0,0)	32,5 (±7,8)
CD4 ⁺ /CD45R0 ⁺	0,6 (±0,8)	79,1 (±2,8)
CD8 ⁺ /CD45RA ⁺	1,6 (±2,2)	19,4 (±2,0)
CD8 ⁺ /CD45R0 ⁺	0,0 (±0,0)	52,2 (±1,7)

¹⁾ Ruhende T-Zellen bzw. durch Panning isolierte T-Zellsubpopulationen wurden für 16h mit 293pcDNA bzw. 293h95L Zellen in flachbödigen 96well Mikrotiterplatten kokultiviert. Die spezifische Induktion von Apoptose in den T-Zellen wurden durchflußzytometrisch nach Färbung mit PI bestimmt.

²⁾ Die Mittelwerte für die Gesamtpopulation wurden aus fünf, die für die T-Zellsubpopulationen aus jeweils zwei Experimenten gebildet. Die Werte in den Klammern entsprechen den berechneten Standardabweichungen

Die in Tabelle 3.4 zusammengefaßten Experimente zeigten, daß sowohl in der Population der CD4⁺, als auch der CD8⁺ T-Zellpopulation die CD45R0⁺ Zellen die für CD95 Rezeptorvermittelte Apoptose empfindlichen Zellen waren. Die CD45RA⁺ Zellen waren dagegen weniger sensitiv für diesen Stimulus.

3.3.2 Auswirkungen der Kokultur von aktivierten T-Zellen mit 293 Transfektanten

Die oben gezeigten Versuche zur Induktion von Zelltod durch kreuzvernetzten CD95 mAb (Abschnitt 3.1) hatten gezeigt, daß *in vitro* aktivierte T-Zellen sensitiver für Apoptose als ruhende T-Zellen sind. Um das Wirkungsspektrum des von den 293 Transfektanten exprimierten CD95L weiter zu analysieren, wurden ebenso die Effekte in Kokulturen von *in vitro* aktivierten T-Zellen und 293 Transfektanten untersucht.

Tabelle 3.5: Induktion von Apoptose in T-Zellen mit unterschiedlichem Aktivierungsgrad¹⁾

T-Zelltyp	% spezifische Apoptose nach Kokultur mit 293 Zellen	
	293pcDNA	293h95L
ruhend (n=5)	1,0 (±1,6)	40,6 (±10,9)
7d mit Alloantigen aktiviert (n=4)	2,9 (±4,7)	76,4 (±12,4)
6d mit PHA aktiviert (n=3)	2,3 (±3,9)	70,8 (±9,6)

¹⁾ Isolierte T-Zellen wurden entweder als ruhende oder als *in vitro* aktivierte Zellen (7 d in einer MLC zur Aktivierung mit Alloantigen / 6 d mit PHA [1 µg/ml] und IL-2 [20 U/ml]) eingesetzt. Nach 16 h Kokultur der T-Zellen mit 293 Transfektanten wurden die Zellen mit PI gefärbt und der Anteil toter T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Aus den gemessenen Werten wurde die induzierte spezifische Apoptose berechnet (Formel in Abschnitt 2.8.1). Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus n Experimenten.

Die in Tabelle 3.5 zusammengefaßten Experimente zeigten, daß die *in vitro* aktivierten T-Zellen empfindlicher für CD95L-induzierte Apoptose sind als die frisch isolierten, ruhenden T-Zellen. Während in ruhenden T-Zellpopulationen durchschnittlich in 40,6 % der Zellen Apoptose induziert wurde, lag dieser Wert in T-Zellpopulationen, die für sieben Tage mit bestrahlten, allogenen Zellen aktiviert wurden, bei 76,4 %. Demgegenüber wurde durch die Kreuzvernetzung der Zelltod induzierenden Antikörper nach einer Aktivierung mit Alloantigen nur in einem Drittel der T-Zellen Apoptose ausgelöst (Tab. 3.1). Der physio-

logische Ligand des CD95 Rezeptors, der von den 293h95L Zellen exprimiert wird, induzierte hingegen in drei Viertel der in einer MLC aktivierten T-Zellen Apoptose (Tab. 3.5). In diesen Ansätzen wurden neben den ruhenden CD45R0⁺ „memory“ Zellen auch die durch Inkubation mit dem Antigen aktivierten und so für Apoptose sensibilisierten T-Zellen eliminiert. T-Zellen, die für sechs Tage mit dem Mitogen PHA aktiviert wurden (1 µg/ml und IL-2 20 U/ml), waren ebenfalls empfindlicher für die Induktion von Zelltod durch den CD95L.

Die Ergebnisse der Kokultorexperimente lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß ruhende CD45R0⁺ T-Zellen, die aufgrund eines vormals durchlaufenen Aktivierungsprozesses den CD95 Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren, empfindlich für die Induktion von Apoptose durch den von 293h95L Zellen exprimierten CD95L sind. Diese CD95⁺ Zellen ließen sich jedoch nicht durch CD95 Antikörper eliminieren, was den Schluß zuläßt, daß der physiologische Ligand des CD95 Rezeptors ein anderes Wirkungsspektrum besitzt, als die kreuzvernetzen CD95 mAb's. In aktivierten T-Zellen ist es möglich, sowohl durch Kreuzvernetzung der Rezeptoren mit CD95 mAb als auch durch den CD95L Zelltod zu induzieren.

3.4 Modulation von allogenen Immunantworten durch CD95L

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Kokultur von CD95⁺ T-Zellen mit CD95L exprimierenden Transfektanten Apoptose in der T-Zellpopulation auslöst, stellte sich die Frage, ob allogene Immunantworten durch CD95L moduliert werden können. Um die Wirkungen von CD95L in unterschiedlichen Phasen einer Immunantwort analysieren zu können, wurde zunächst untersucht, ob bei der Verwendung von 293pcDNA und 293h95L Zellen als Stimulatoren für allogene T-Zellen Unterschiede sichtbar werden. Danach wurde gefragt, ob die Expression des CD95L Zielzellen vor einer Zerstörung durch verschiedene zytotoxische Effektorzellen schützen kann.

3.4.1 Aktivierung von T-Zellen durch 293 Zellen

Um die Modulation einer Immunantwort von T-Zellen gegen 293 Zellen in Abhängigkeit von der Expression des CD95L beurteilen zu können, wurde zunächst untersucht, ob diese Zelllinie in der Lage ist, eine T-Zell-Immunantwort auszulösen. Hierfür wurde zunächst durchflußzytometrisch geprüft, ob 293 Zellen die molekularen Voraussetzungen für die Induktion einer solchen T-Zellreaktion haben.

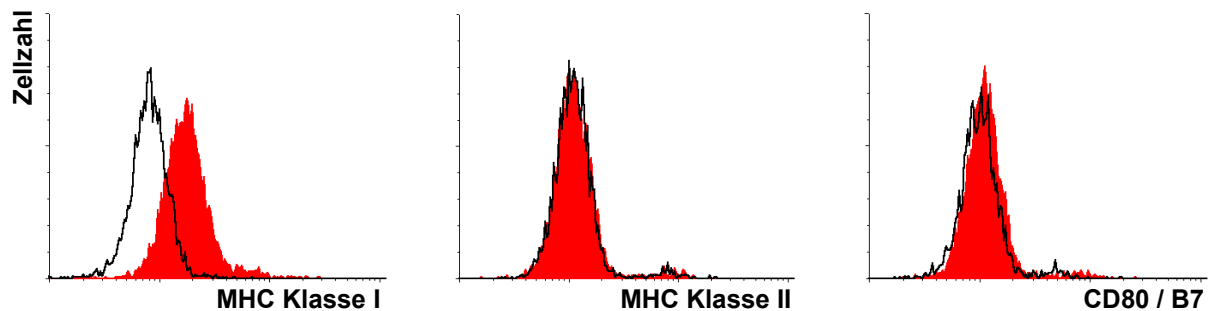


Abbildung 3.11: FACS-Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen durch 293pcDNA Zellen

293pcDNA Zellen wurden mit anti-MHC-Klasse I mAb (W6/32), anti-MHC-Klasse II mAb (L243/HLA-DR) und CD80 mAb markiert und mit α M-FITC Ab gefärbt. Die Proben wurden mit dem FACS analysiert und die Meßergebnisse als ausgefüllte Histogramme dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Zweitregenzkontrolle (α M-FITC Ab) wird als offene Histogramme gezeigt.

Die Untersuchungen zeigten, daß 293pcDNA Zellen MHC Moleküle der Klasse I exprimieren. MHC Moleküle der Klasse II konnten ebensowenig auf dieser Zelllinie nachgewiesen werden, wie das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD80. Die detaillierte Analyse des MHC Haplotyps der 293 Zelllinie (PCR-Typisierung, durchgeführt vom DNA-Labor der Blutbank der MHH) ergab folgendes homozygotes Muster:

HLA-A: 3 HLA-B: 7 HLA-C: 7 Bw: 6

Zur Untersuchung der Frage, ob die 293 Zelllinie in der Lage ist, als Stimulatorzelle eine allogene Immunantwort auszulösen, wurden T-Zellen von Blutspendern verwendet, die sich mindestens im HLA-A Locus vom HLA-A3 Haplotyp der 293 Zellen unterschieden. Solche Blutspender mit HLA-Differenz zu den 293 Zellen werden im folgenden als geeignete Blutspender bezeichnet. Der exakte Haplotyp der verwendeten T-Zellen wird bei den jeweiligen Experimenten mit alloaktivierten T-Zellen angegeben. Aufgrund des Fehlens von kostimulatorischen und MHC-Klasse II Molekülen, erschien es wahrscheinlich, daß

Wachstumsfaktoren wie IL-2 in solchen allogenen Kulturen limitierend sein würden. IL-2 wurde daher stets exogen in sättigenden Konzentrationen dazugegeben.

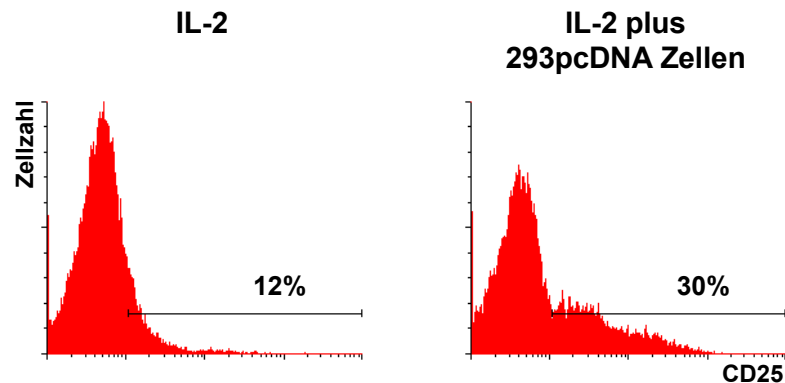


Abbildung 3.12: FACS-Analyse der IL-2 Rezeptorexpression (CD25) auf kultivierten T-Zellen

Ruhende T-Zellen wurden für 2 d in Anwesenheit von IL-2 und +/- 293pcDNA Zellen kultiviert und anschließend mit CD25 mAb (BT563 und G α M-FITC) gefärbt. Die Zellen wurden mit dem FACS analysiert und die IL-2 Rezeptorexpression in Histogrammen dargestellt. Die Zahlen geben den Anteil CD25⁺ Zellen wieder. HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 1/8; B: 8/35; C: 4/7

Zunächst wurde die Expression des IL-2 Rezeptors (CD25) nach Stimulation von HLA-A3 negativen T-Zellen durch die HLA-A3 positiven 293 Zellen untersucht. Der in Abbildung 3.12 dargestellte Versuch zeigt, daß in solchen Kulturen eine Population von CD25⁺ Zellen nachgewiesen werden konnte. Der Anteil CD25⁺ Zellen entsprach etwa 30% der Gesamtpopulation.

Eine charakteristische Eigenschaft von voll aktivierten T-Zellen ist ihre blastoide Morphologie. Diese kann durchflußzytometrisch über die, im Vergleich zu ruhenden Zellen, veränderten Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften nachgewiesen werden. Es wurde untersucht, ob die Kultur von T-Zellen von geeigneten HLA-differenten Spendern für sieben Tage mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 zu einer Entwicklung von blastoiden T-Zellen führt. Die Analyse zeigte, daß sich in diesen Kulturen eine blastoide T-Zellpopulation entwickelt, deren Anteil in der Regel bei etwa 30 % lag (Abb. 3.13). Dies entsprach in der Größenordnung auch dem Anteil von T-Zellen, die den IL-2 Rezeptor nach zwei Tagen Aktivierung durch 293pcDNA Zellen und IL-2 an der Zelloberfläche exprimierten.

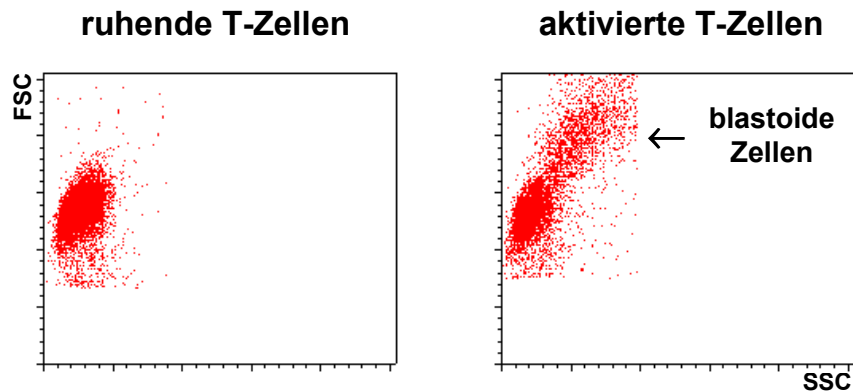


Abbildung 3.13: FACS-Analyse der Streulichteigenschaften von T-Zellen

T-Zellen wurden für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 kultiviert. Die Streulichteigenschaften der T-Zellen wurden im FACS bestimmt und als Dotplot dargestellt. Links ist die Analyse von frisch isolierten, ruhenden Zellen gezeigt. HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 25/30; B: 38/18; C: -/-

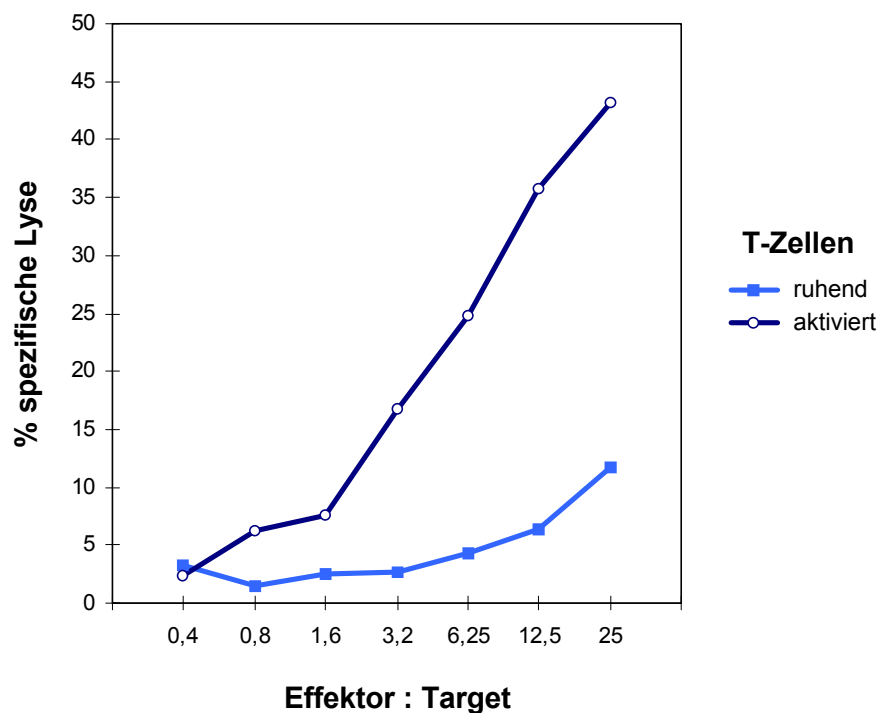


Abbildung 3.14: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit ruhenden und aktivierten T-Zellen als zytotoxische Effektorzellen

T-Zellen wurden für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA Zellen als Alloantigen und IL-2 kultiviert und als Effektoren zur Lyse von ^{51}Cr -markierte 293pcDNA Zellen eingesetzt (offene Kreise). Als Kontrolle dienten ruhende T-Zellen (geschlossene Quadrate). Nach 20 h wurde freigesetztes ^{51}Cr in Aliquots des Überstands bestimmt, der Mittelwerte aus Dreifachansätzen gebildet und die spezifische Lyse berechnet. HLA-Haplotyp der ruhende T-Zellen: A: 1/3; B: 8/35; C: 4/7 HLA-Haplotyp der aktivierte T-Zellen: A: 1/2; B: 7/35; C: 4/7

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Aktivierung allogener T-Zellen durch 293 Stimulatorzellen zur Bildung von Effektorzellen mit lytischem Potential für 293 Zellen führt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden ^{51}Cr -Freisetzungstests durchgeführt. 293pcDNA Zellen dienten hierbei als Zielzellen, ruhende T-Zellen bzw. aktivierte T-Zellen (7 d Stimulation mit 293pcDNA Zellen und IL-2) wurden als Effektoren eingesetzt. Abbildung 3.14 zeigt, daß die aktivierten T-Zellen nach sieben Tagen Kultur mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 ein Effektorpotential zur Zytolyse von 293pcDNA Zellen entwickelten. Diese T-Zellen sind in der Lage, 293pcDNA Zellen in Abhängigkeit vom Effektor/Target Verhältnis zu lysieren. Die ruhenden T-Zellen besaßen demgegenüber kein Effektorpotential

Ausgehend von der Vorstellung, daß aufgrund der fehlenden MHC-Klasse II Expression der 293 Zellen die allogene T-Zellantwort gegen diese überwiegend von CD8^+ Zellen vermittelt wird, wurden Zellkulturexperimente mit isolierten CD4^+ und CD8^+ T-Zellen als Responder durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß die CD8^+ Populationen sehr starkes zytotoxisches Potential gegen die Stimulatorzellen entwickelten. CD4^+ Zellen waren deutlich weniger zytotoxisch (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Induktion spezifischer Lyse von 293pcDNA Zellen durch CD4^+ und CD8^+ T-Zellen ¹⁾

Effektorzelltyp	% spezifische Lyse ²⁾	Haplotyp
CD4^+	33	A: 1/8; B: 8/18; C: 2/7
	42	A: 1/11; B: 7/8; C: -
CD8^+	71	A: 1/11; B: 35/60; C: 3/4
	80	A: 11/28; B: 55/35; C: 3/4
	62	A: 2/25; B: 44/60; C: 3/5

¹⁾ CD4^+ und CD8^+ T-Zellen von geeigneten Blutspendern wurden durch Panning separiert, für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 kultiviert und als Effektorzellen auf ^{51}Cr -markierte 293pcDNA Zellen titriert. Nach 20 h wurde die Freisetzung von ^{51}Cr bestimmt und der Anteil spezifischer Lyse berechnet.

²⁾ % spezifische Lyse nach 20 h bei einem Effektor/Target Verhältnis von 25:1

Zusammengefaßt ergaben diese Experimente, daß es möglich ist, allogene T-Zellen durch Stimulation mit 293 Zellen zu aktivieren. Hierbei kam es zur Expression des IL-2 Rezeptors, zur Bildung von blastoiden Zellen und zur Differenzierung von zytotoxischen Effektorzellen mit dem Potential zur Lyse der 293 Stimulatorzellen.

3.4.2 CD95L in der Induktionsphase von T-Zellreaktionen

Nachdem gezeigt wurde, daß T-Zellen von geeigneten Blutspendern durch 293pcDNA Zellen plus IL-2 aktiviert werden können, sollte analysiert werden, wie der Aktivierungsprozeß sich darstellt, wenn allogene T-Zellen statt mit 293pcDNA Zellen mit der CD95L exprimierenden 293h95L Zelllinie stimuliert werden.

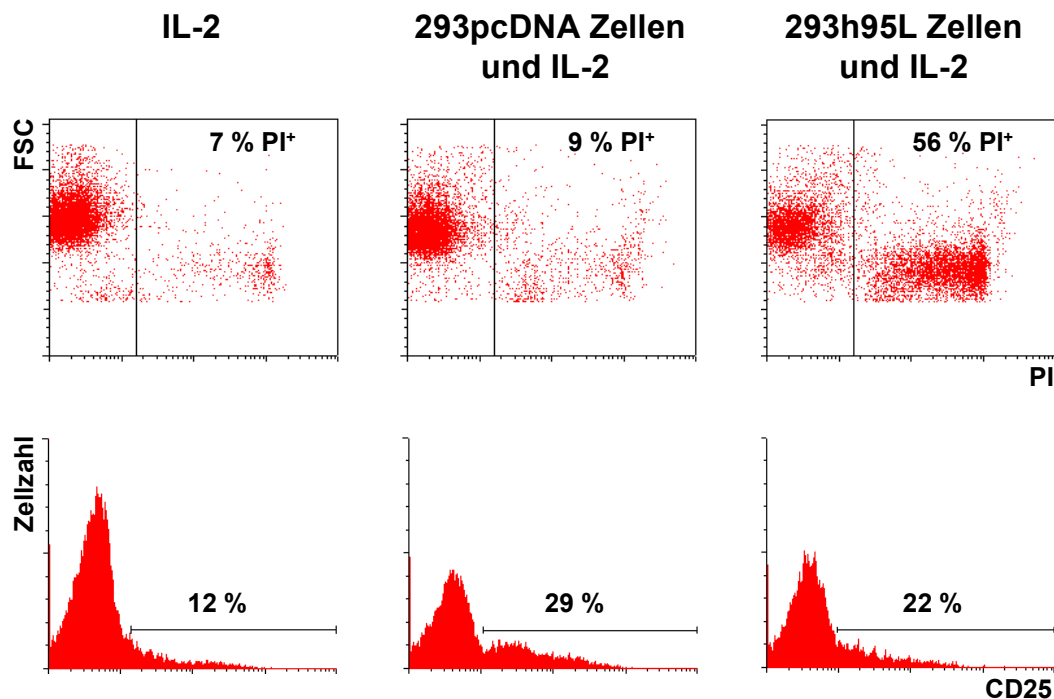


Abbildung 3.15: FACS-Analyse von T-Zellen nach 2 Tagen Aktivierung durch 293 Transfektanten

Frisch isolierte T-Zellen wurden mit IL-2 (links), mit IL-2 und 293pcDNA Zellen (Mitte) oder mit IL-2 und 293h95L Zellen (rechts) kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit PI und CD25 mAb (BT563 und G α M-FITC) gefärbt. In den Dotplots sind die Vorwärtsstreuungseigenschaften gegen die PI-Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Expression des IL-2 Rezeptors auf den lebenden (PI) T-Zellen ist in den Histogrammen dargestellt. 293 Zellen konnten aufgrund ihrer Größe diskriminiert werden (analytisches Fenster auf T-Zellen). HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 1/32; B: 7/35; C: 4/7

Wie erwartet, führte die Stimulation von T-Zellen mit bestrahlten 293pcDNA Zellen zu einer Induktion der IL-2 Rezeptorexpression in der T-Zellpopulation (Abb. 3.15). Tote Zellen waren in diesen Kulturen kaum vorhanden (9 % PI⁺ Zellen). Im Gegensatz dazu fanden sich in den Kokulturen mit 293h95L Zellen mehr als 50 % tote T-Zellen. Dennoch kam es auch in diesen Ansätzen zur T-Zellaktivierung, was sich durch die erhöhte Expression des IL-2 Rezeptors auf den vitalen Zellen zeigen ließ (22 % im Vergleich zu 12 % auf Kontroll-T-Zellen).

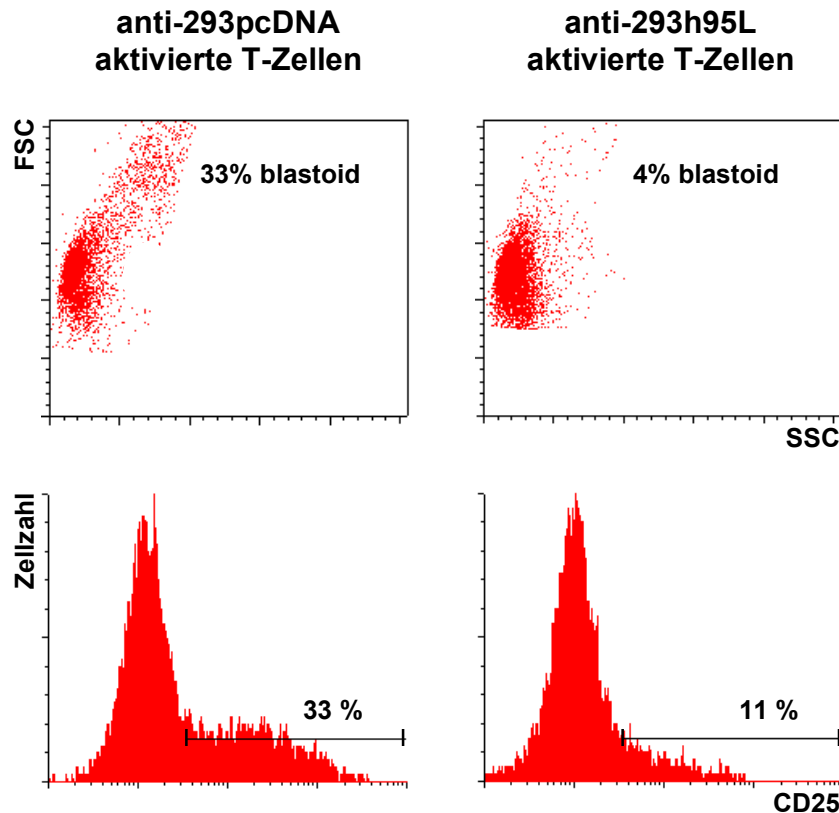


Abbildung 3.16: FACS-Analyse von T-Zellen nach 7 Tagen Aktivierung durch 293 Transfektanten

T-Zellen wurden 7 d mit IL-2 und bestrahlten 293pcDNA bzw. 293h95L Zellen als Alloantigen kultiviert. Lebende Zellen wurden aus diesen Kulturen durch Ficollseparation isoliert und die Zellen mit PI und CD25 mAb (BT563 und G α M-FITC) gefärbt und im FACS analysiert. Die Vorwärts- (Größe) und Seitwärtsstreulichteigenschaften (Granularität) der PI T-Zellen sind in Dotplots, die IL-2 Rezeptorexpression dieser Zellen als Histogramm dargestellt. HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 1/32; B: 7/35; C: 4/7

Mit dem Befund, daß auch 293h95L Zellen T-Zellen von HLA-differenten Blutspendern aktivieren können, stellte sich die Frage, ob sich aus dieser aktivierten Zellpopulation in Anwesenheit des CD95L auch voll aktivierte, blastoide Effektorzellen entwickeln können. Der in Abbildung 3.16 dargestellte Versuch zeigte, daß nach sieben Tagen Kultur von T-Zellen mit bestrahlten 293h95L Zellen und IL-2 keine blastoiden Zellen nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu lag der Anteil blastoider Zellen im Kontrollansatz mit bestrahlten 293pcDNA Zellen als Stimulatorzellen bei über 30 %. Ein ähnliches Bild zeigte die Analyse der IL-2R Expression in diesen Populationen. Während in den Kontrollansätzen 33 % CD25⁺ Zellen detektiert wurden war deren Anteil in den 293h95L-Ansätzen reduziert (11 %). Diese Befunde weisen daraufhin, daß die Konfrontation von allogenen T-Zellen mit der den CD95L exprimierenden 293h95L Zelllinie zunächst zur Elimination der CD95⁺ „memory“ T-Zellen

führt. Danach scheint es zu einer Aktivierung der überlebenden T-Zellen zu kommen (Induktion der IL-2R-Expression, Abb. 3.15). Die Beobachtung, daß an Tag sieben in diesen Kulturen weder blastoide noch CD25⁺ Zellen gefunden werden (Abb. 3.16), ist ein Hinweis darauf, daß die initial aktivierten T-Zellen einen Apoptose-empfindlichen Reaktionszustand erreichen und durch die CD95L⁺ Transfektanten eliminiert werden.

In ⁵¹Cr-Freisetzungstests wurde die Frage untersucht, ob die überlebenden T-Zellen, die mit 293h95L Zellen als allogene Stimulatorzellen kultiviert wurden, dennoch in der Lage sind, ein zytotoxisches Potential gegen 293pcDNA Zellen zu entwickeln. Das in Abbildung 3.17 dargestellte Ergebnis eines ⁵¹Cr-Freisetzungstests zeigt, daß die T-Zellen, die durch bestrahlte 293h95L Zellen aktiviert wurden, kein zytotoxisches Potential zur Lyse von 293pcDNA Zellen entwickelt haben. Durch 293pcDNA Zellen aktivierte T-Zellen waren demgegenüber dazu in der Lage. Dieser Befund wurde in fünf weiteren Experimenten bestätigt (nicht gezeigt).

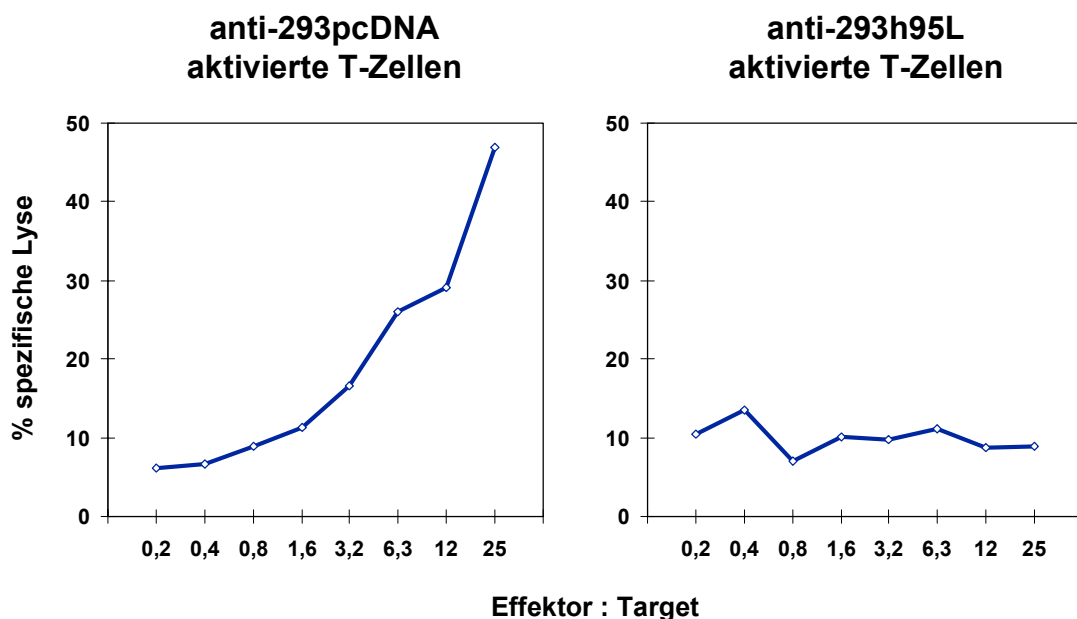


Abbildung 3.17: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit 7 Tage gegen 293 Transfektanten aktivierte T-Zellen

T-Zellen wurden für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA und 293h95L Zellen kultiviert. Diese T-Zellen dienen in ⁵¹Cr-Freisetzungstests als Effektorzellen, deren zytotoxisches Potential zur Lyse von ⁵¹Cr-markierten 293pcDNA Zellen nach Standardprotokoll berechnet wurde. Die Zytolyse durch anti-293pcDNA Zellen aktivierte T-Zellen ist im linken Graphen dargestellt, die von anti-293h95L Zellen aktivierten rechts. HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 29/31; B: 51/60; C: 3/5

Um auszuschließen, daß diese Abwesenheit von zytotoxischem Potential nicht die Folge einer unspezifischen Suppression jeglicher biologischen Reaktion der Zellen ist, wurden die T-Zellen, die sieben Tage mit bestrahlten 293 Transfektanten kultiviert wurden, in weiteren Ansätzen mit PHA restimuliert. Das in Abbildung 3.18 dargestellte Experiment zeigt, daß diese T-Zellen auf das Mitogen PHA mit der Bildung von blastoiden Zellen reagierten, die den IL-2 Rezeptor an der Zelloberfläche exprimierten. Die Kokultur von allogenen T-Zellen mit 293h95L Zellen scheint demnach nicht zu einem kompletten Auslöschen von T-Zellreaktivität zu führen, sondern eher zu einer Elimination von Zellen mit Reaktivität gegen 293-Alloantigenen.

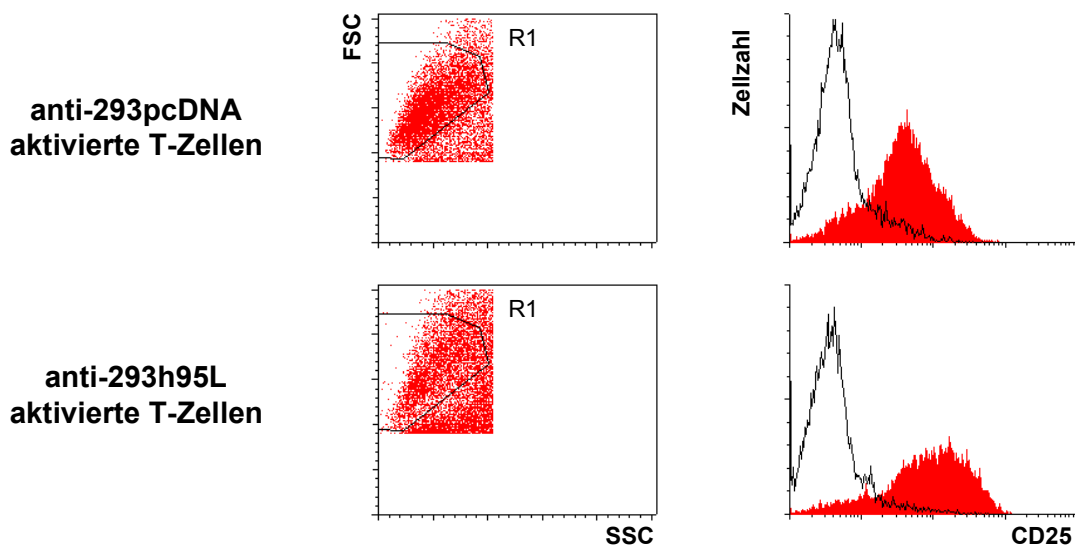


Abbildung 3.18: FACS-Analyse der anti-293 Transfektanten aktivierten T-Zellen nach Restimulation mit PHA

T-Zellen wurden für 6 d mit bestrahlten 293pcDNA bzw. 293h95L Zellen und IL-2 kultiviert. Lebende Zellen wurden durch Ficollseparation isoliert und für weitere 2 d mit dem Mitogen PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) restimuliert. Die Zellen wurden mit CD25 mAb (BT563 und G α M-FITC) gefärbt und im FACS analysiert. Die Streulichteigenschaften sind in Dotplots, die IL-2 Rezeptorexpression der T-Zellen (Gate R1) als ausgefüllte Histogramme dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Zweitreakgenzkontrolle (G α M-FITC Ab) wird als offene Histogramme gezeigt.

3.4.3 CD95L in der Effektorphase zytotoxischer Immunreaktionen

3.4.3.1 Zytolyse durch alloaktivierte T-Zellen

Es sollte die Frage analysiert werden, ob die ektopische Expression des CD95L Zielzellen vor der Zerstörung durch alloaktivierte T-Zellen schützen kann. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen von geeigneten Blutspendern für sieben Tage mit bestrahlten 293pcDNA Zellen in Anwesenheit von IL-2 aktiviert und dann als Effektorzellen in Zytotoxizitätstests eingesetzt. Gefragt wurde, in welchem Umfang diese Effektorzellen 293 pcDNA und 293h95L Zielzellen lysieren können. Als Testsystem dienten ^{51}Cr -Freisetzungstests. Nach 4 h und 20 h wurde der Anteil spezifischer Lyse in diesem System über die an den Überstand freigesetzte Aktivität berechnet. In Abbildung 3.19 sind vier repräsentative Versuche aus dieser Serie von Experimenten dargestellt. Nach 4 h Inkubation von 293pcDNA Zellen mit den alloaktivierten Effektorzellen konnte in den Ansätzen eine schwache Zytolyse der Zellen beobachtet werden, die nach 20 h Inkubationszeit deutlich gesteigert war. Für die 293h95L Zellen wurden nach 4 h Inkubation vergleichbare Lyseraten wie für die 293pcDNA Zellen bestimmt. Diese Lyseraten wurden aber im weiteren Verlauf der Experimente bis zum 20 h Zeitpunkt nicht weiter gesteigert. Die CD95L⁺ Zellen schienen demnach im Sinne einer nicht fortschreitenden Zerstörung geschützt.

Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen auch bei der Verwendung von isolierten CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden kann, wurden Versuche mit aktivierten CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen durchgeführt. Der in Abbildung 3.20 dargestellte Versuch ist repräsentativ für eine Serie von drei unabhängigen Experimenten. Bei der Verwendung von 293pcDNA Zellen als Zielzellen wurde nach 4 h eine spezifische Lyserate bestimmt, die deutlich höher war, als die in den Versuchen mit Gesamt-T-Zellen als Effektorpopulation. Diese Beobachtung läßt sich durch den hohen Anteil von zytotoxischen Vorläuferzellen innerhalb der CD8⁺ Zellen und einem sich daraus ergebenden relativ höheren Effektor/Target Verhältnis erklären. Die Lyserate wurde im Versuchsverlauf bis zum Zeitpunkt nach 20 h Inkubation weiter gesteigert. 293h95L Zellen ließen sich durch die alloaktivierten CD8⁺ T-Zellen nach 4 h ähnlich gut lysieren wie 293pcDNA Zellen. Wie in den Versuchen mit Gesamt-T-Zellen wurde diese Zytolyserate im weiteren Verlauf des Experiments jedoch nicht mehr gesteigert. Die Zytolyse der 293h95L Zellen kam also auch bei Verwendung von CD8⁺ Effektorzellen nach einer initialen Phase der Zerstörung zum Stillstand.

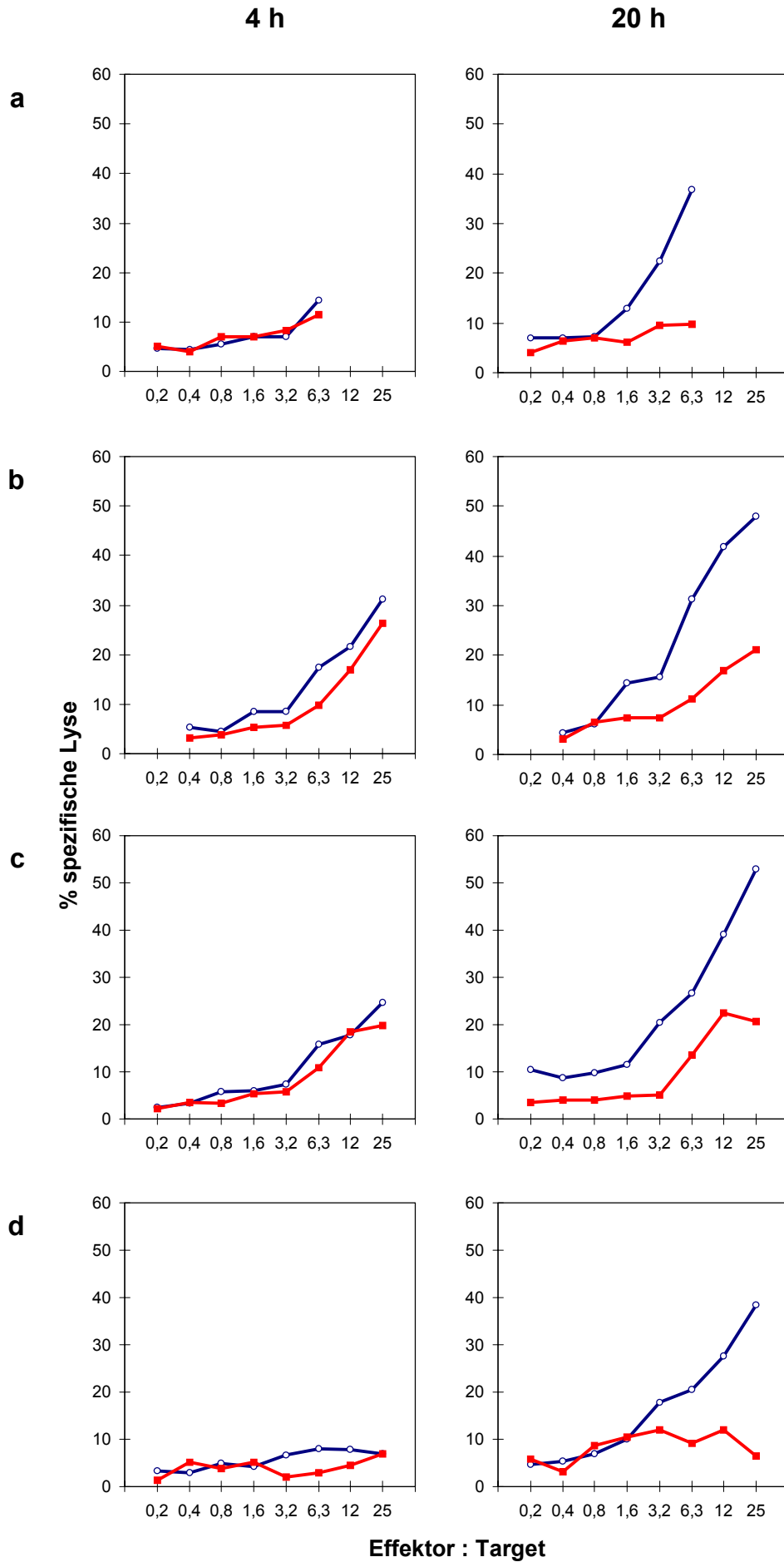


Abbildung 3.19: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit 293 Transfektanten als Target- und alloaktivierten T-Zellen als Effektorzellen

T-Zellen von Blutspendern, die sich im MHC-Klasse I Haplotyp von 293 Zellen unterschieden, wurden isoliert und für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 kultiviert. Lebende Zellen wurden durch Ficollseparation isoliert und als Effektoren auf ^{51}Cr -markierte 293pcDNA (offene Kreise) und 293h95L (geschlossene Quadrate) Zielzellen titriert. Die spezifische Lyse wurde nach Standardprotokoll nach 4 h (linke Spalte) und 20 h (rechte Spalte) bestimmt und gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen. HLA-Haplotyp der T-Zellen: a) A:2/11; B:7/8; C:7/- b) A:1/8; B:8/35; C:4/7 c) A:1/32; B:7/35; C:4/7 d) A:8/24; B: 7/27; C: 1/-

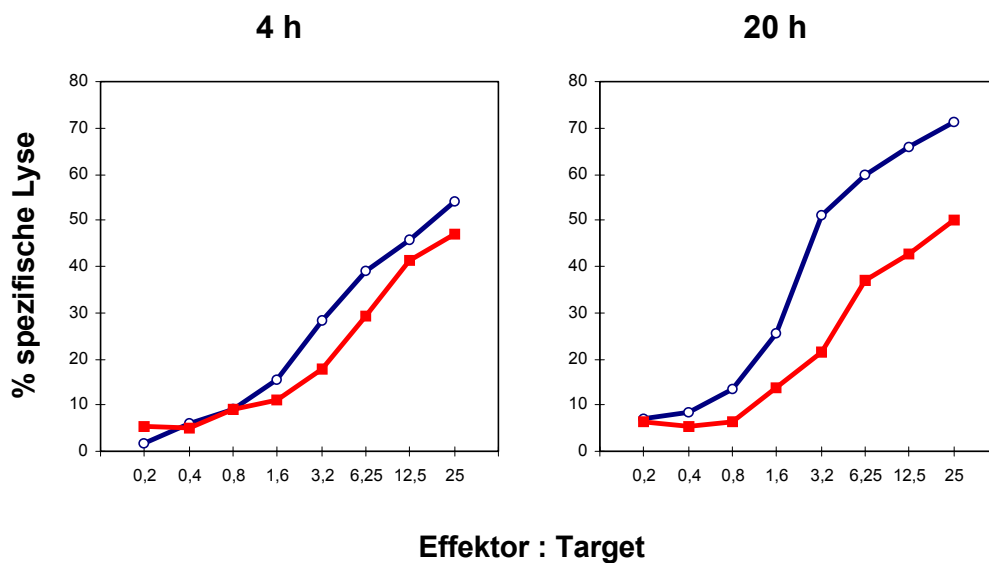


Abbildung 3.20: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit 293 Transfektanten als Target- und alloaktivierten CD8^+ T-Zellen als Effektorzellen

CD8^+ T-Zellen wurden von einem geeigneten Blutspender isoliert, für 7 Tage mit 293pcDNA Zellen aktiviert und als Effektorzellen in einem ^{51}Cr -Test eingesetzt. Der Anteil spezifischer Lyse der 293pcDNA Zellen (Kurven mit offenen Kreisen) und 293h95L Zellen (geschlossene Quadrate) wurde nach 4 h und 20 h nach Standardprotokoll bestimmt und gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen. HLA-Haplotyp der T-Zellen: A: 1/11; B: 35/60; C: 3/4

Aufgrund der Zelltod-induzierenden Kapazität von 293h95L Zellen schien es wahrscheinlich, daß die beobachtete Reduktion der spezifischen Zytolyse dieser Zellen im Vergleich zu 293pcDNA Zellen auf einer apoptotischen Elimination von Effektor-T-Zellen zurückzuführen ist. Zur Überprüfung dieses Konzepts wurden T-Zellen von geeigneten Blutspendern isoliert und für sieben Tage mit bestrahlten 293pcDNA und IL-2 kultiviert. Die so generierten Effektorzellen wurden mit 293 Transfektanten kokultiviert und nach 16 h durchflußzytometrisch analysiert. Der in Abbildung 3.21 dargestellte Versuch zeigt, daß die Inkubation von alloaktivierten T-Zellen mit 293pcDNA Zellen keinen Einfluß auf den Anteil

blastoider Zellen in der Kokultur hat (mittlere Spalte). In diesen Kokulturen wurden keine toten T-Zellen gefunden. Der Anteil $CD95^+$ Zellen lag in diesen Kulturen bei über 60 %. Die Kokultur von 293h95L Zellen mit alloaktivierten Effektorzellen führte dagegen zu einem Verlust der blastoiden T-Zellpopulation (rechte Spalte). Diese Elimination ging einher mit dem Auftreten eines hohen Anteils toter (PI^+) Zellen (82 %). In der überlebenden (PI^-) Zellpopulation fanden sich nur noch 14 % $CD95^+$ Zellen. Die in diesem Versuch verwendeten Effektorzellen entsprachen jenen, die für das Experiment (c) aus Abbildung 3.19 verwendet wurden. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß $CD95L^+$ Zielzellen Apoptoseempfindliche, alloaktivierte Effektor-T-Zellen eliminieren und damit vor der Zerstörung geschützt sind.

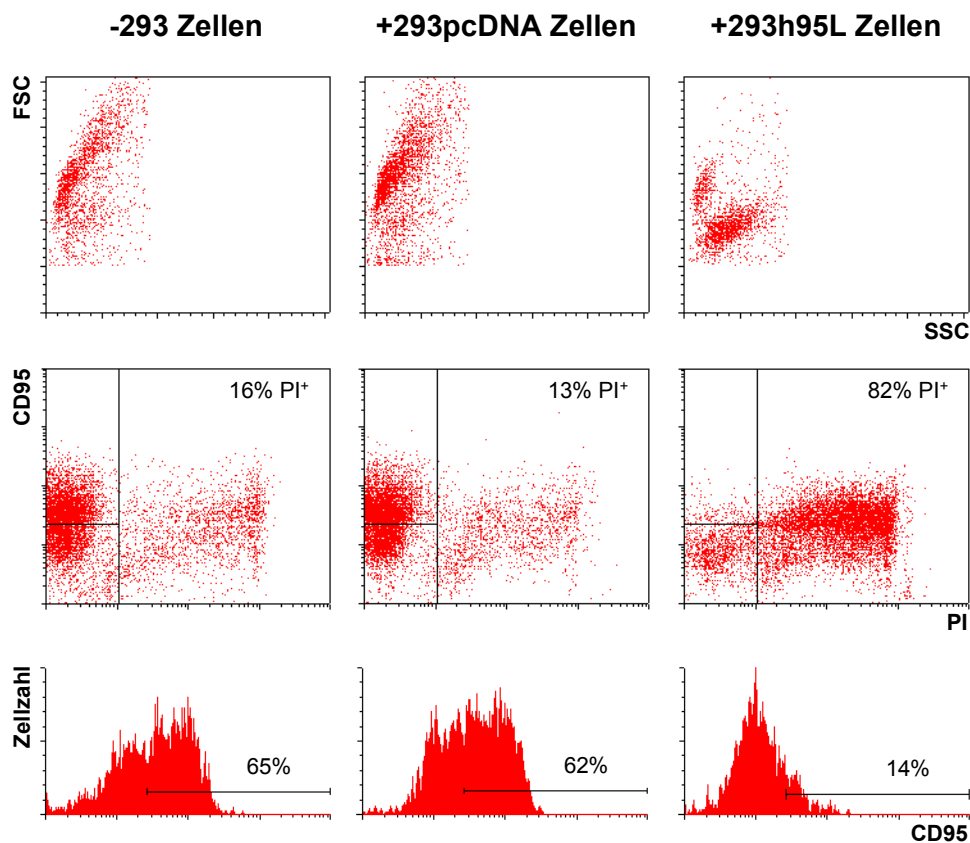


Abbildung 3.21: FACS-Analyse alloaktivierter T-Zellen nach Kokultur mit 293 Transfektanten

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 16 h +/- 293 Transfektanten kultiviert. Zellen wurden mit PI und CD95 mAb (SM1/23 und GoM-FITC) gefärbt und durch „gating“ nur die T-Zellen mit dem FACS analysiert. Die Streulichteigenschaften der T-Zellen in den verschiedenen Ansätzen sind in den oberen Dotplots dargestellt. In den unteren Dotplots wurde die Fluoreszenz der CD95 Rezeptor Färbung gegen die der PI-Färbung aufgetragen. Die Histogramme zeigen die CD95 Rezeptor Expression der lebenden (PI^-) T-Zellen in den Kulturen.

Die Beobachtung, daß bei der Kokultur von 293h95L Zielzellen mit Effektor-T-Zellen trotz der massiven Induktion von Zelltod in der Effektorpopulation eine gewisse Zerstörung von 293h95L Zellen auftrat (Abb. 3.19; rechte Spalte), deutet auf das Auftreten von gleichzeitigen Zelltod in beiden Zelltypen hin. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden Versuche durchgeführt, welche gleichzeitig die Detektion apoptotischer Zellen in beiden Zelltypen ermöglichten. Hierzu wurden alloaktivierte T-Zellen mit 293 Transfektanten für 6 h kokultiviert und anschließend mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC gefärbt. Durch die charakteristischen Streulichteigenschaften konnten separate Meßfenster auf T-Zellen (R1) und 293 Zellen (R2) gesetzt werden. Das Annexin V Molekül bindet an Phosphatidylserine, die von sterbenden Zellen sehr früh im Verlauf der Apoptose durch den Verlust der Membranasymmetrie an der Zelloberfläche präsentiert werden. Der in Abbildung 3.22 dargestellte Versuch, der repräsentativ für eine Serie von drei Experimenten ist, zeigte, daß in Kokulturansätzen mit alloaktiverter T-Zellen und 293pcDNA Zellen Apoptose nur in den 293 Zellen detektiert wurde (obere Reihe). Der Anteil Annexin V⁺ T-Zellen (25 %) entsprach in der Größenordnung jenem in Kontrollansätzen gemessenen Wert (32 %). In den Ansätzen mit 293h95L Zellen (mittlere Reihe) waren dagegen über 80 % der alloaktivierten T-Zellen Annexin V⁺. Ebenso wurde in der Population der 293h95L Zellen dieser Ansätze eine Induktion von Zelltod beobachtet. Der Anteil Annexin V⁺ 293h95L Zellen (20 %) war jedoch etwas geringer als der Anteil Annexin V⁺ 293 Zellen (26 %) in den Ansätzen mit den Vektorkontrollzellen.

Diese Versuche geben einen weiteren Hinweis darauf, daß der Schutz von Zielzellen durch die Oberflächenexpression des CD95L auf die Elimination der für CD95 Rezeptor-vermittelte Apoptose empfindlichen Effektor-T-Zellpopulation zurückgeführt werden kann. Die gezeigten Experimente legen weiterhin den Schluß nahe, daß die Oberflächenexpression von CD95L die Zerstörung von Zellen durch alloaktivierte Effektor-T-Zellen nicht verhindern kann, da die Effektorzellen, auch wenn in diesen bereits das Programm zur Apoptose gestartet wurde, bis zu einem gewissen Zeitpunkt noch in der Lage sind, Zielzellen zu zerstören.

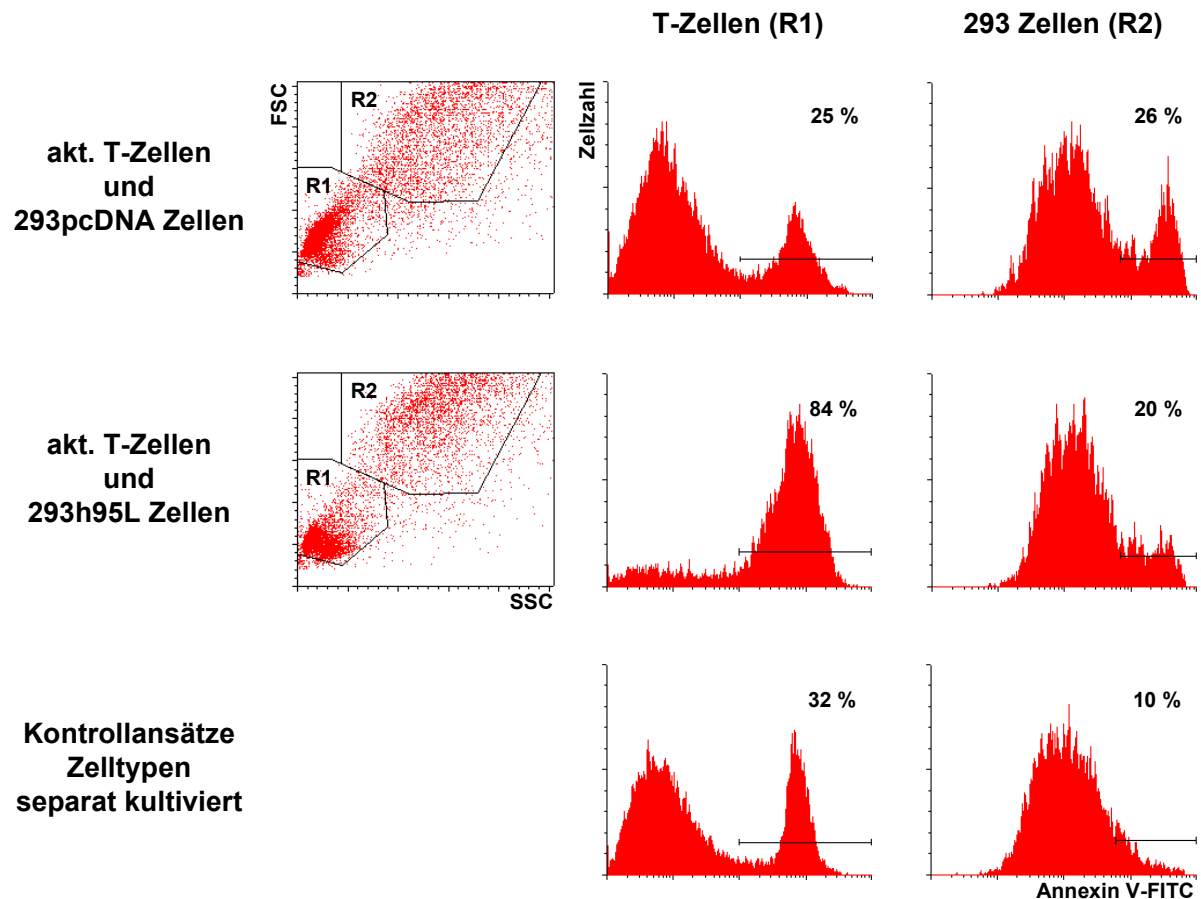


Abbildung 3.22: FACS-Analyse von Kokulturansätzen nach Annexin V-FITC-Färbung

Alloaktivierte T-Zellen wurden für 6 h mit 293pcDNA Zellen und 293h95L Zellen kultiviert. Die Zellen wurden mit PI und Annexin V-FITC gefärbt und im FACS analysiert. In den Dotplots sind die Streulichteigenschaften der PI Zellen der Kokulturansätze dargestellt. Die T-Zellen (R1) und 293 Zellen (R2) konnten über diese Eigenschaften unterschieden werden. Die Histogramme zeigen den Anteil Annexin V⁺ Zellen in den Ansätzen. In den Histogrammen der unteren Zeile ist das Hintergrundsignal der Annexin V Färbung der separat kultivierten Kontrollansätze dargestellt.

3.4.3.2 Zytolyse durch zytokinaktivierte Effektorzellen

Zusätzlich zu den lytischen Effekten alloaktivierter T-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob zytokinaktivierte, zytotoxische Effektorzellen in der Lage sind, 293 Zellen zu lysieren und ob es möglich ist, eine solche Zytolyse durch die Expression des CD95L auf Zielzellen zu beeinflussen. Hierfür wurden IL-2 aktivierte T-Zellen (sieben Tage mit IL-2 kultiviert) als Effektoren verwendet.

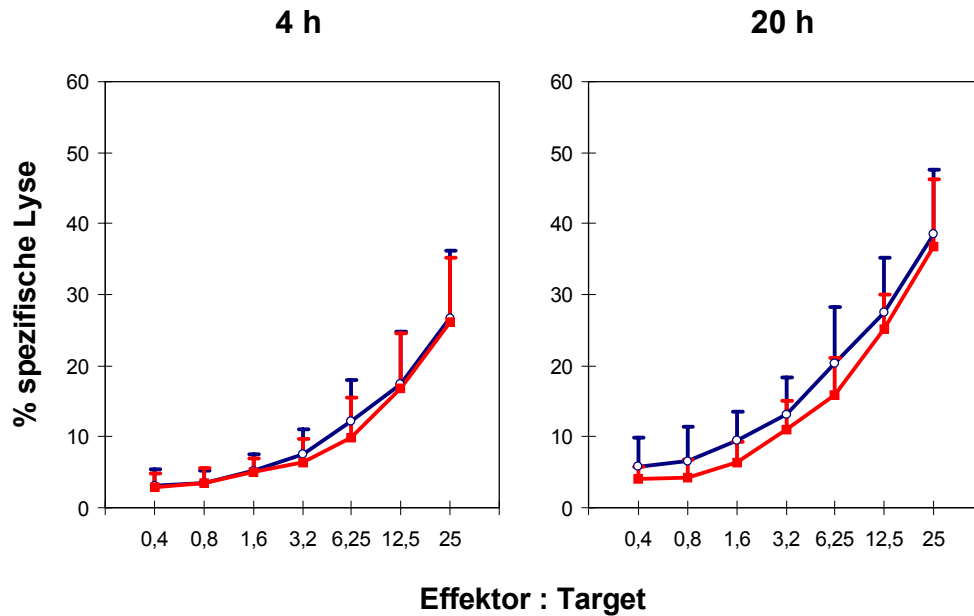


Abbildung 3.23: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit 293 Transfektanten als Target- und IL-2 kultivierten T-Zellen als Effektorzellen

T-Zellen wurden 7 d in Anwesenheit von IL-2 (20 U/ml) kultiviert und als Effektorzellen in ^{51}Cr -Freisetzungstests zur Lyse von 293pcDNA (offene Kreise) und 293h95L Zellen (geschlossene Quadrate) eingesetzt. Die Werte für den Anteil spezifischer Lyse sind Mittelwerte aus sieben unabhängigen Experimenten; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Auch für diese Zellen wurde zunächst in ^{51}Cr -Freisetzungstests untersucht, ob diese zytotoxisches Potential zur Zerstörung von 293 Zellen besitzen. Die in Abbildung 3.23 dargestellten sieben Experimente zeigten, daß die mit IL-2 kultivierten T-Zellen in der Lage sind, 293pcDNA Zellen in Abhängigkeit vom Effektor/Target Verhältnis zu lysieren. Die nach 4 h bestimmten Werte für die Zytolyse der 293pcDNA Zellen wurden im weiteren Verlauf der Experimente noch gesteigert (von 27 % auf 39 % bei einem Effektor/Target Verhältnis von 25/1). Für die 293h95L Zellen wurden sowohl nach 4 h als auch nach 20 h fast identische Werte wie für die CD95L- 293pcDNA Zellen berechnet (26 % nach 4 h und 37 % nach 20 h bei einem Effektor/Target Verhältnis von 25/1). Die Expression des CD95L schien demnach die Zytolyse der 293 Zellen durch die IL-2 aktivierten T-Zellen nicht zu beeinflussen.

Es stellte sich nun die Frage, ob es in der Population der IL-2 aktivierten T-Zellen überhaupt zu einer Induktion von CD95 Rezeptor-spezifischer Apoptose durch die Kokultur mit 293h95L Zellen kommt. Die T-Zellen wurden hierfür, wie die alloaktivierten Zellen, mit den 293 Transfektanten für 16 h kokultiviert und der Anteil toter T-Zellen nach Färbung mit PI durchflußzytometrisch bestimmt. Die in Abbildung 3.24 dargestellte FACS-Analyse zeigt,

daß die Kokultur der IL-2 aktivierten T-Zellen mit 293pcDNA Zellen die Vitalität der T-Zellen nicht beeinflusst (linker und mittlerer Dotplot). Wurden IL-2 kultivierte T-Zellen mit CD95L⁺ 293h95L Zellen kokultiviert, so kam es zu einer Induktion von Zelltod in einer Teilpopulation (rechter Dotplot). In diesen Ansätzen waren über 30 % der Zellen PI⁺. Gleichzeitig wurde der Anteil CD95⁺ Zellen von etwa 30 % auf unter 5 % reduziert. Der Anteil toter Zellen war jedoch deutlich geringer, als in den Versuchsansätzen mit alloaktivierten T-Zellen (über 80 %, siehe Abb. 3.21). IL-2 aktivierte T-Zelle waren demzufolge zu einem geringeren Teil empfindlich für die CD95L induzierte Apoptose.

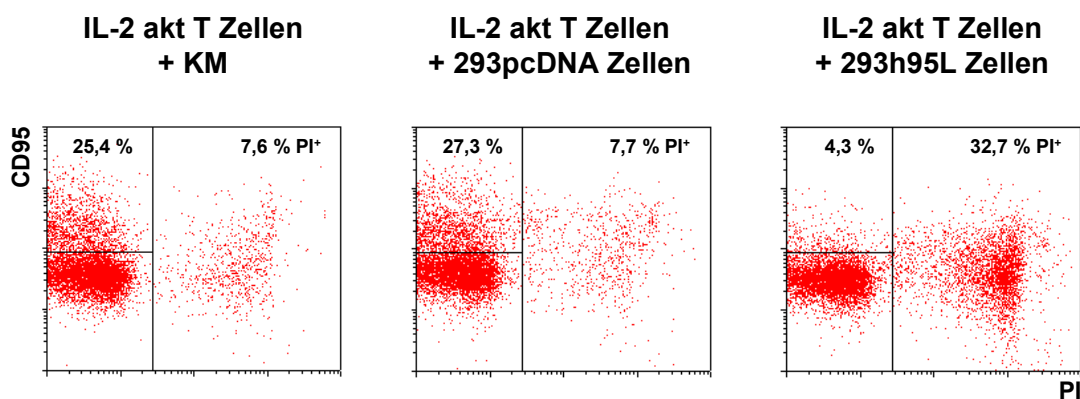


Abbildung 3.24: FACS-Analyse von Kokulturen mit 293 Transfektanten und IL-2 aktivierten T-Zellen

T-Zellen wurden 7 d mit IL-2 kultiviert, für 16 h mit Kulturmedium (KM), 293pcDNA Zellen oder 293h95L Zellen inkubiert und anschließend mit CD95 mAb (SM1/23 und GαM-FITC) und PI gefärbt. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Dotplots dargestellt, in denen die PI-Fluoreszenz gegen die CD95 Rezeptorexpression aufgetragen ist.

Eine einfache Erklärung für die geringere Apoptoseempfindlichkeit der mit IL-2 kultivierten T-Zellen ist eine reduzierte Expression des CD95 Rezeptors im Vergleich zu den durch Alloantigen aktivierten T-Zellen. Die durchflußzytometrische Analyse der CD95 Rezeptorexpression (Abb. 3.25) zeigte, daß die mit IL-2 kultivierten T-Zellen den Rezeptor in höherer Dichte exprimieren als frisch isolierte, ruhende T-Zellen. Im Vergleich zu den alloaktivierten T-Zellen ist der Anteil der Zellen, die den Rezeptor in hoher Dichte exprimieren, aber stark reduziert. Der Anteil CD45R0⁺ und blastoider Zellen war ebenfalls geringer als bei der alloaktivierten T-Zellpopulation.

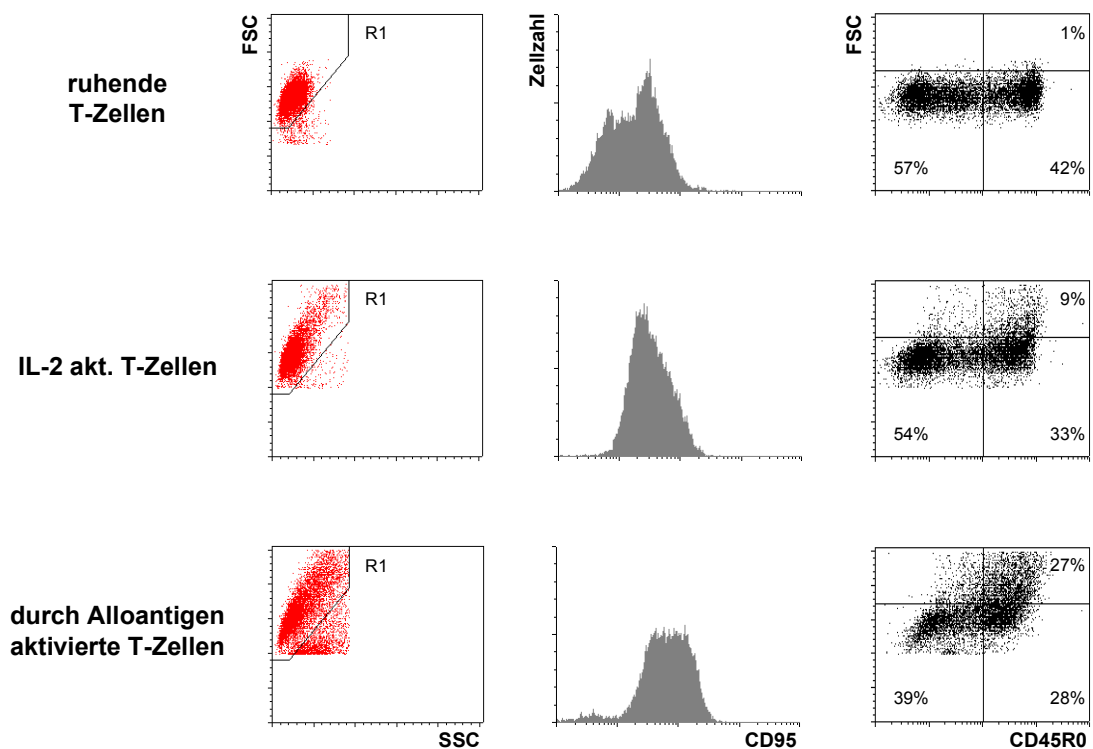


Abbildung 3.25: FACS-Analyse von T-Zellen mit verschiedenem Aktivierungsgrad

Ruhende (obere Reihe), 7 Tage in Anwesenheit von IL-2 kultivierte (mittlere Reihe) und mit bestrahlten 293pcDNA Zellen als Alloantigen aktivierte T-Zellen (untere Reihe) wurden mit CD95 mAb (SM1/23 und G α M-FITC) und CD45R0 mAb (UCHL1 und G α M-FITC) gefärbt und im FACS analysiert. Die Streulichteigenschaften sind in Dotplots, die CD95 Rezeptorexpression der T-Zellen (Meßfenster R1) in Histogrammen dargestellt. In den Dotplots in der rechten Spalte ist die CD45R0 Expression dieser T-Zellen gegen deren Vorwärtsstreulichteigenschaften aufgetragen.

Die Frage der gleichzeitigen Induktion von Apoptose in der Effektor- und in der Zielzellpopulation wurde auch für die IL-2 aktivierten T-Zellen getestet. Abbildung 3.26 zeigt, daß in den Ansätzen mit 293pcDNA Zellen (obere Reihe) etwa 50 % der 293 Zellen Annexin V⁺ waren. In der T-Zellpopulation dieser Ansätze wurde kaum eine Induktion von Apoptose beobachtet. In der 293 Zellpopulation der Ansätze mit 293h95L Zellen (untere Reihe) wurde ebenfalls eine Induktion von Zelltod beobachtet (etwa 40 % Annexin V⁺ Zellen). In diesen Ansätzen wurde hingegen zusätzlich, wie nach dem in Abbildung 3.24 gezeigten Versuch zu erwarten war, eine Induktion von Apoptose in der T-Zellpopulation beobachtet. Der Anteil Annexin V⁺ Zellen in dieser Population war jedoch geringer, als in den Ansätzen mit alloaktivierten T-Zellen (über 80 %).

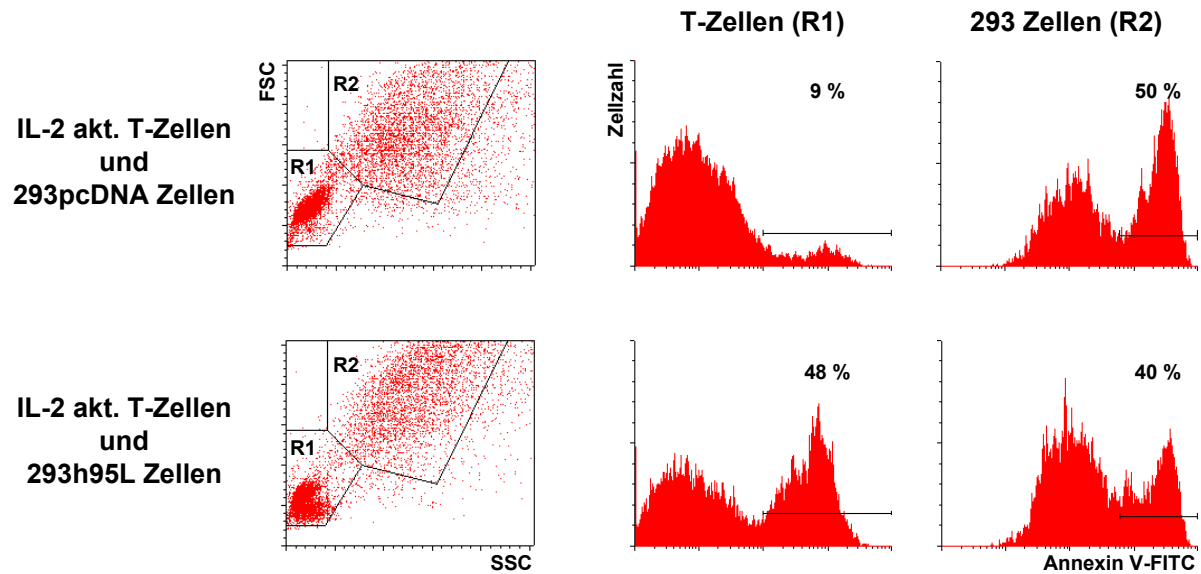


Abbildung 3.26: FACS-Analyse von Kokulturansätzen nach Annexin V-FITC-Färbung

7 Tage mit IL-2 kultivierte T-Zellen wurden mit 293 Transfektanten für 6 h kokultiviert. Die Zellen wurden mit PI und Annexin V-FITC gefärbt und im FACS analysiert. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften der PI Zellen der Kokulturansätze sind in Dotplots dargestellt. T-Zellen (R1) und 293 Zellen (R2) wurden über diese Eigenschaften unterschieden und der Anteil Annexin V⁺ Zellen in den Ansätzen in Histogrammen dargestellt. Die verwendeten isolierten T-Zellen entsprachen jenen, die für den Versuch aus Abb. 3.22 auch mit Alloantigen aktiviert wurden.

Die Untersuchungen mit IL-2 aktivierten T-Zellen zeigten, daß die CD95L Expression die 293h95L Zellen nicht vor der Zerstörung durch diese zytotoxische Effektorpopulation schützt. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund kann die Beobachtung liefern, daß diese Effektorzellen den CD95 Rezeptor in einer geringeren Dichte als die alloaktivierten T-Zellen exprimieren. Die geringere Expressionsdichte ging einher mit einer geringeren Induktion von Zelltod in Populationen von IL-2 aktivierten T-Zellen im Vergleich zu den alloaktivierten Zellen. Wenig Elimination von Zellen mit zytotoxischen Potential sollte, der für die alloreaktiven T-Zellen vorgeschlagenen Argumentationskette folgend, das Ausbleiben von Schutzeffekten der CD95L Expression vor Zytolyse erklären.

3.4.3.3 Zytolyse durch natürliche Killer (NK) Zellen

Neben den bisher untersuchten alloreaktiven, zytotoxischen T-Zellen und den IL-2 aktivierten Effektorzellen sind NK Zellen eine weitere zytotoxische Effektorpopulation des Immunsystems mit zytotoxischem Potential. Auch für diesen Effektorzelltyp stellte sich die Frage, ob die ektopische Expression des CD95L Zielzellen vor einer Zerstörung durch diese Effektoren schützt. NK Zellen wurden durch MACS-Separation aus E^+ Zellen ($CD2^+$) von Blutspendern isoliert. Hierbei wurden $CD3^+$ und $HLA\ DR^+$ Zellen aus der PBL Population depletiert. Der Anteil $CD56^+$ NK Zellen lag in der isolierten Zellpopulation in der Regel bei etwa 90 %.

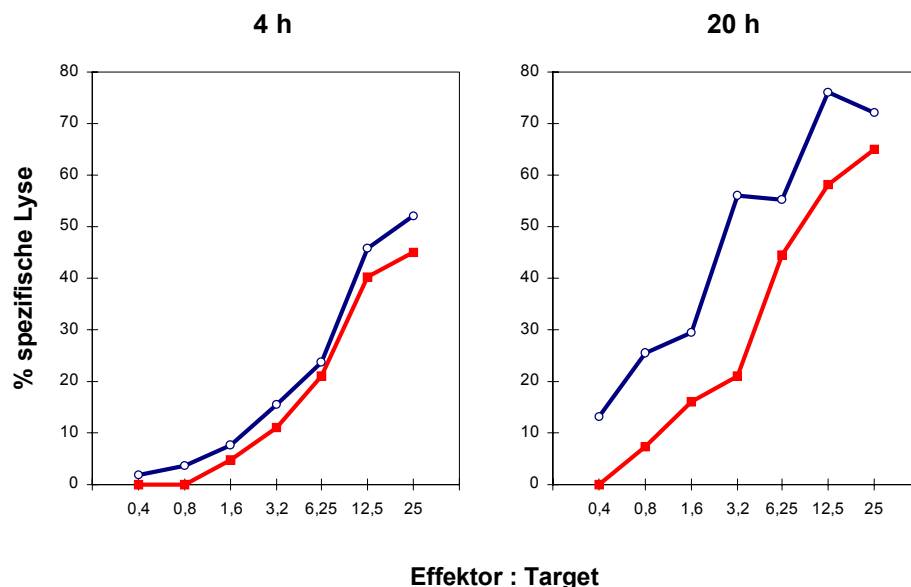


Abbildung 3.27: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit 293 Transfektanten als Target- und NK Zellen als Effektorzellen

293pcDNA Zellen (offene Kreise) und 293h95L Zellen (geschlossene Quadrate) wurden ^{51}Cr -markiert und als Zielzellen in Zytotoxizitätstests eingesetzt. Frisch isolierte NK Zellen wurden als Effektorzellen auf diese titriert und der Anteil spezifische Lyse nach 4 h und 20 h nach Standardprotokoll bestimmt. Die berechneten Werte wurden in den Graphen gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen.

Mit ^{51}Cr -Freisetzungstests wurde zunächst untersucht, ob diese Zellen das Potential zur Zytolyse von 293 Zellen besitzen. Der in Abbildung 3.27 dargestellte Test zeigt, daß NK Zellen in der Lage waren, sowohl die 293pcDNA Zellen als auch die $CD95L^+$ 293h95L Zellen zu lysieren. Für beide Zielzelltypen wurden bereits nach 4 h Inkubation relativ hohe Lyseraten bestimmt. Dies zeigt, daß NK Zellen eine sehr effektive zytotoxische Zellpopulation sind. Nach 20 h waren im dargestellten Experiments die Lyseraten für beide Zielzelltypen weiter

gesteigert. Hierbei kam es zu einer geringfügigen Reduktion der Zytolyse von 293h95L Zellen. Weitere Experimente mit NK Zellen als zytotoxische Effektorzellen, die in Tabelle 3.7 zusammengefaßt sind, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Lyse von CD95L⁺ Zielzellen, was zu dem Schluß führte, daß Expression von CD95L keinen effektiven Schutz vor der Zerstörung durch NK Zellen ermöglicht.

Tabelle 3.7: NK Zellyse von 293 Transfektanten ¹⁾

Experiment	% spezifische Targetzellyse ²⁾	
	293pcDNA	293h95L
1	57,2	55,6
2	48,1	46,5
3	41,1	33,9
4	45,5	64,0

¹⁾ NK Zellen wurden präpariert und als Effektorzellen in Zytotoxizitätstests zur Lyse von ⁵¹Cr-markierten 293 Transfektanten eingesetzt. Der Anteil spezifischer Lyse wurde nach Standardprotokoll bestimmt.

²⁾ % spezifische Zellyse nach 20 h bei einem Effektor/Target Verhältnis von 25/1

Es stellte sich die Frage, ob es in der NK Zellpopulation überhaupt zu einer Induktion von Apoptose durch die Inkubation mit 293h95L Zellen kommt. Zur Klärung dieser Frage wurden die NK Zellen mit 293 Transfektanten kokultiviert und nach 16 h der Anteil PI⁺ NK Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Während die Kokultur mit 293pcDNA Zellen keinen Einfluß auf die Vitalität der NK Zellen hatte, wurden für die mit 293h95L Zellen kultivierten NK Zellen in fünf unabhängigen Experimenten nach 16 h ein Anteil von PI⁺ Zellen zwischen 5 % und maximal 25 % detektiert (ohne Abbildung). Die NK Zellen waren demnach weniger empfindlich für die CD95 Rezeptor-vermittelte Apoptose als die untersuchten T-Zellpopulationen.

Eine naheliegende Erklärung für die geringere Empfindlichkeit für Apoptose wäre eine fehlende oder geringe Expression von CD95 Rezeptor auf NK Zellen. Um diese zu untersuchen, wurden NK Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Beim Vergleich von NK Zellen verschiedener Blutspender wurden unterschiedliche Expressionsdichten gefunden (Abb. 3.28). Bei einigen Probanden fielen extrem geringe CD95-Dichten auf (Exp. 1, mittlere Fluoreszenzintensität bei Kanal 9) während andere Dichten zeigten, die in etwa der von

ruhenden „memory“ Zellen entsprach (Exp. 2, mittlere Fluoreszenzintensität bei Kanal 27). Im Vergleich dazu wurden für die besonders Apoptose-empfindlichen durch Alloantigen aktivierten T-Zellen Fluoreszenzintensitäten von über 60 bestimmt.

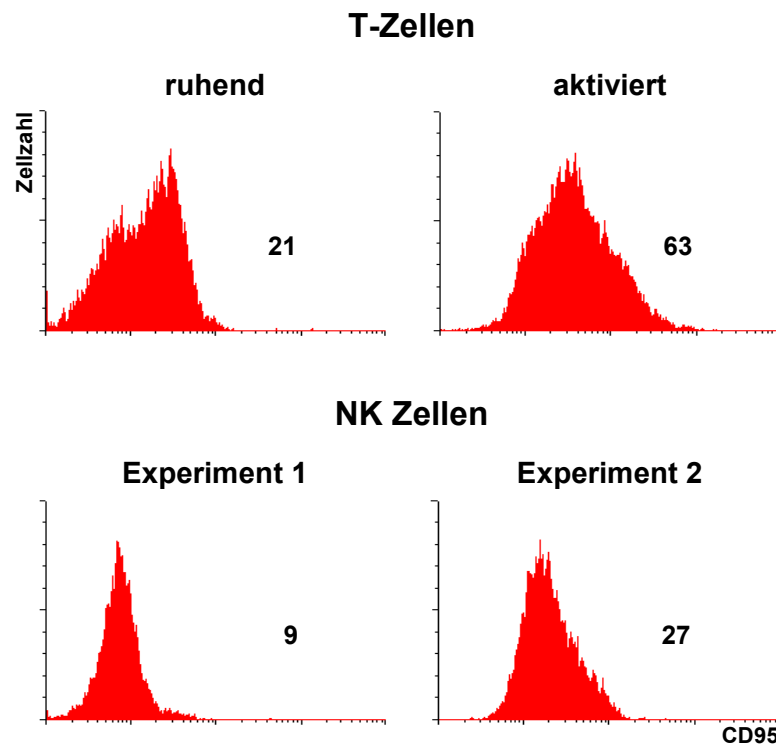


Abbildung 3.28: FACS-Analyse der CD95 Rezeptorexpression isolierter NK Zellen

NK Zellen wurden isoliert und mit CD95 mAb (APO-1) und GαM-FITC gefärbt. Die durchflußzytometrische Analyse der Expression des CD95 Rezeptors wurde mit den Expressionsmustern von ruhenden und alloaktivierten T-Zellen (Histogramme in der oberen Reihe) verglichen. Die Zahlen geben den Kanal mit der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der dargestellten Histogramme an.

Neben den ruhenden NK Zellen sollten auch aktivierte NK Zellen in ihrer lytischen Kapazität gegenüber 293h95L und 293pcDNA Zielzellen untersucht werden. Die geringe Anzahl NK Zellen, die aus einem Buffy coat isoliert werden konnte, machte es jedoch schwierig, diese durch bestrahlte 293pcDNA Zellen zu aktivieren und eine ausreichende Zahl von Effektorzellen zu generieren. Durch die Identifikation von Blutspendern mit ungewöhnlich hohem Anteil von NK Zellen konnte dieses Problem überkommen werden. Der Anteil CD56⁺ Zellen in der E⁺ Population dieser Spender lag bei etwa 25 % (Abb. 3.29), während normalerweise maximal 10 % CD56⁺ Zellen gefunden werden.

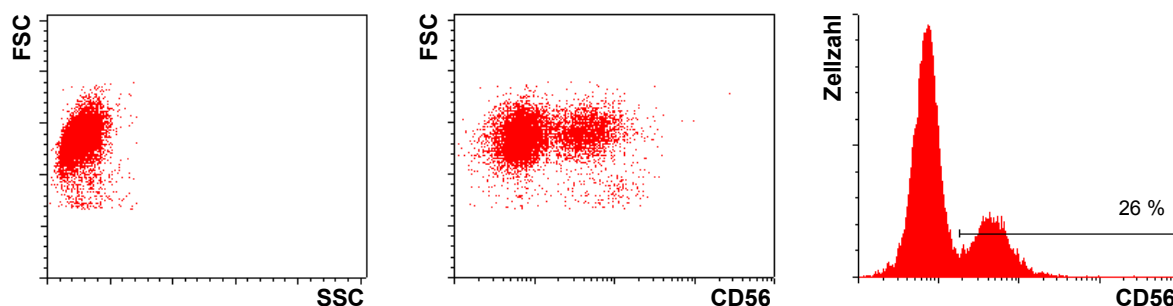


Abbildung 3.29: FACS-Analyse frisch isolierter E⁺ Zellen von Spendern mit hohem Anteil CD56⁺ Zellen

Frisch isolierte E⁺ Zellen wurden zur FACS-Analyse mit CD56 mAb (T199 und GαM-FITC) gefärbt. Die Ergebnisse der FACS-Messungen sind als Dotplots (CD56 Fluoreszenz gegen Vorwärtsstreulichteigenschaften) und als Histogramm dargestellt. HLA-Haplotyp des Blutspenders: A: 25/30; B: 38/18; C: -/-

Wurden diese NK-reichen Zellpopulationen mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 kultiviert, zeigte es sich, daß alle CD56⁺ Zellen blastoid wurden und den CD95 Rezeptor hochregulierten. Demnach liegt der Schluß nahe, daß es in diesen Kulturen zu einer Aktivierung der NK Zellen kam.

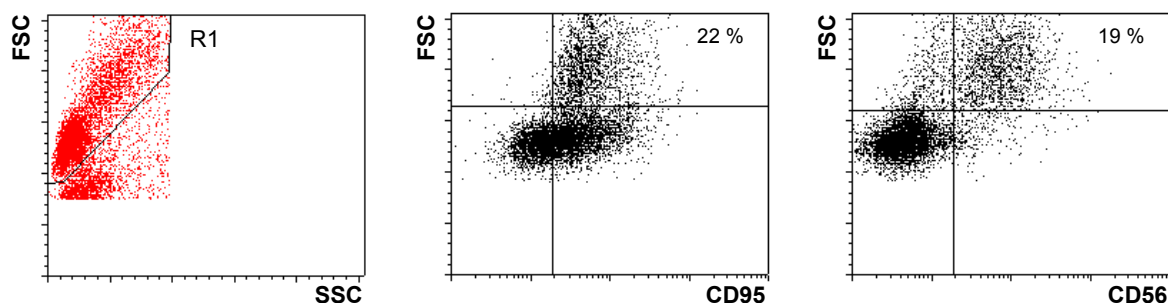


Abbildung 3.30: FACS-Analyse von 7 Tage mit 293pcDNA Zellen aktivierten E⁺ Zellen

E⁺ Zellen des Blutspenders aus Abb. 3.29 wurden für 7 d mit bestrahlten 293pcDNA Zellen und IL-2 kultiviert. Durchflußzytometrisch wurde die Entwicklung blastoider Zellen (linker Dotplot) und die Expression von CD95 und CD56 auf den blastoiden Zellen nach Färbung mit CD95 mAb (SM1/23 und GαM-FITC) und CD56 mAb (T199 und GαM-FITC) analysiert. Die gemessenen Fluoreszenzen der Lymphozyten (analytisches Fenster R1) wurden in Dotplots gegen deren Vorwärtsstreulichteigenschaften aufgetragen.

In ⁵¹Cr-Freisetzungstests wurde nun die Frage untersucht, ob die CD95L Expression auf Zielzellen einen Einfluß auf die Zytolyse dieser Zellen durch aktivierte CD95⁺ NK Zellen hat. Es konnte gezeigt werden, daß diese Effektorpopulation in der Lage war, 293pcDNA Zellen

zu lysieren (Abb. 3.31). Die Kurve für die Zytolyse von 293h95L Zellen verlief nach 4 h Inkubation nahezu identisch. Die Expression des CD95L hatte in diesem Zeitraum demnach keinen Einfluß auf die Zielzellyse. Für die Zytolyse nach 20 h Inkubation ergab sich jedoch ein uneinheitliches Bild. Während die Zytolyse der 293h95L Zellen bei geringen Effektor/Target Verhältnissen (bis zu 3,2:1) unterhalb der für 293pcDNA Zellen berechneten lag, wurden für höhere Verhältnisse (6,25:1 und 12,5:1) wieder Werte bestimmt, die mit der Zytolyse von 293pcDNA Zellen vergleichbar waren. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte in der Heterogenität der Lymphozytenpopulation in diesen Ansätzen zu suchen sein. Da alle blastoiden Zellen als CD56⁺ Zellen identifiziert wurden, ist es unwahrscheinlich, daß sich in diesen Kulturen alloaktivierte Effektor-T-Zellen entwickelt haben. IL-2 aktivierte T-Zellen können hingegen in diesen Kulturen eine Rolle spielen. Das zytotoxische Potential zur Lyse von 293 Zellen dieser Zellpopulation wird durch die Expression von CD95L nicht beeinflusst (Abschnitt 3.4.3.2) und sie könnten bei hohen Effektorzellzahlen für die bei beide Targetzelltypen vergleichbar hohen Lyseraten verantwortlich sein. Die bei geringen Effektorzellzahlen auftretende Lyse wäre dementsprechend den aktivierten NK Zellen zuzuordnen, die durch ihre CD95 Rezeptorexpression selbst Apoptose-empfindlich sind und in den Ansätzen mit 293h95L Zellen eliminiert werden.

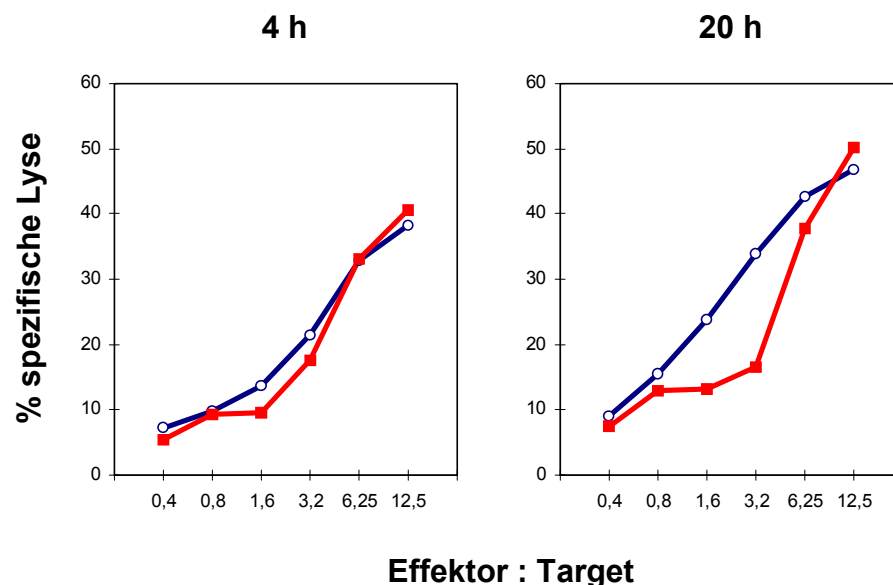


Abbildung 3.31: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit 293 Transfektanten als Target- und aktivierten NK Zellen als Effektorzellen

293pcDNA (offene Kreise) Zellen und 293h95L (geschlossene Quadrate) Zellen wurden ⁵¹Cr-markiert und die aktivierten NK Zellen als Effektoren auf diese titriert. Der Anteil spezifischer Zellyse wurde nach 4 h und 20 h dem Standardprotokoll entsprechend berechnet und im Graphen gegen des Effektor/Target Verhältnis aufgetragen.

3.5 Modulation von Immunreaktionen durch IFN- α induzierbare CD95L Expression

Die in Abschnitt 3.3 gezeigte Induktion von Apoptose in der CD95⁺, ruhenden „memory“ Zellpopulation macht deutlich, daß eine konstitutive Expression des CD95L Zelltod auch in Zellen auslöst, die nicht durch Alloantigen aktiviert wurden. Die konstitutive Expression des CD95L auf einem transplantierten Organ könnte demnach das Immunsystem eines Empfängers kontinuierlich beeinflussen, ohne die im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen beobachteten Empfindlichkeit für Apoptose auszunutzen. Eine Möglichkeit, die Wirkung des CD95L auf einen definierten Zeitraum zu beschränken, ist die induzierte Expression dieses Moleküls durch einen exogenen Stimulus. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob in einem Zellsystem, in dem die Expression des transgenen CD95L exogen induziert wird, ähnliche Wirkungen des Liganden auf die Zytolyse von Zielzellen durch aktivierte T-Zellen beobachtet werden können. Für diese Experimente wurden 293 Zellen verwendet, die transient mit dem Mx-Promotorkonstrukt transfiziert wurden und deren CD95L Expression durch humanes IFN- α induziert werden kann (siehe Abschnitt 3.2.1)

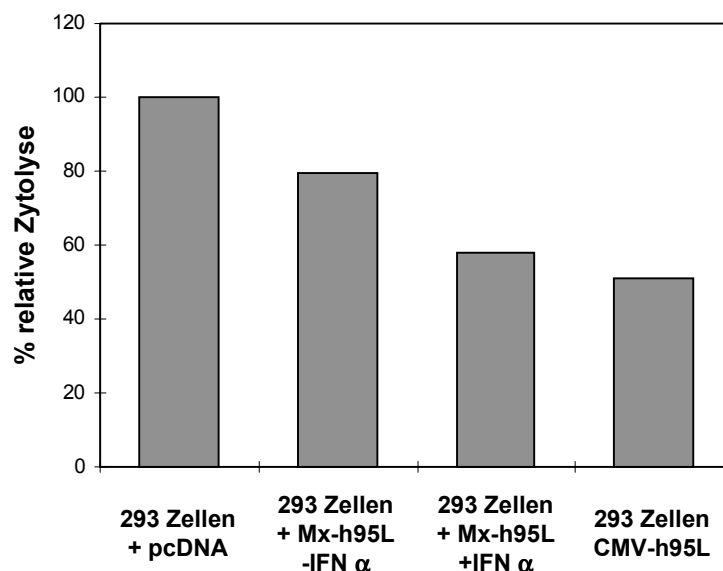


Abbildung 3.32: Zytolyse von 293 Transfektanten durch PHA aktivierte CD8⁺ T-Zellen

Transient transfizierte ⁵¹Cr-markierte 293 Zellen wurden als Zielzellen verwendet und PHA aktivierte CD8⁺ T-Zellen als Effektoren eingesetzt. Nach 20 h wurde die Aktivität des ⁵¹Cr im Überstand bestimmt. Die spezifische Lyse der 293 Zellen + pcDNA bei einem Effektor/Target Verhältnis von 100:1 wurde gleich 100 % gesetzt. Die Lyse der anderen Zielzelltypen wurde zu diesem Wert in Bezug gesetzt.

Für den in Abbildung 3.32 dargestellten ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden als Effektorzellen CD8^+ T-Zellen verwendet, die mit PHA und IL-2 aktiviert worden waren. Im Vergleich zu den 293 Zellen + pcDNA wurde schon bei nicht-induziertem Mx-h95L Konstrukt eine verminderte Zytolyse der Zielzellen beobachtet. Dies entsprach der geringen CD95L Expression auf diesen Zellen (Abb. 3.4). Die Induktion des Mx-Promotors durch IFN- α führte zu einer weiteren Verminderung der Zytolyse, was im Einklang steht mit einer gesteigerten CD95L Expression auf den induzierten Zellen (Abb. 3.4). Dieses Experiment ist repräsentativ für eine Serie von vier Experimenten und zeigt, daß die Reduktion der Zielzellyse abhängig von der Expressionsdichte des transgenen CD95L war. Zusätzlich wurde demonstriert, daß die exogene Induktion der CD95L Expression eine Zunahme der Reduktion von Zielzellyse ermöglicht.

4 Diskussion

Der CD95L ist ein Zelloberflächenmolekül, welches durch Bindung an den CD95 Rezeptor einer Zielzelle apoptotischen Zelltod induzieren kann. T-Zellen exprimieren den CD95 Rezeptor nach einer Aktivierung in hoher Dichte und sind in diesem Stadium besonders empfindlich für dieses Apoptosesignal. Die Induktion von Apoptose in T-Zellen, die durch Antigene eines Transplantats aktiviert worden sind, könnte eine Strategie zur klonalen Deletion und für eine daraus resultierende Toleranzentwicklung nach Allo- oder Xenotransplantation sein. Dieses Konzept eröffnet auch die Möglichkeit, durch gentechnisch erzeugte, ektopische Expression von Zelltod-auslösenden Molekülen, Zellen und Gewebe zu schützen. In aktivierten, zytotoxischen T-Zellen würde der apoptotische Zelltod ausgelöst, sobald sie mit „geschützten“ Zellen in Kontakt treten. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Konzepte mit Hilfe eines *in vitro* Modellsystems geprüft. Hierzu wurden nach Transfektion der humanen CD95L-negativen Nierenzelllinie 293 mit CD95L-cDNA Zellen mit hoher CD95L Expression isoliert. Mit dem Ziel, detaillierte Hinweise auf das immunmodulatorische Potential des CD95L zu bekommen, wurde gefragt, welche Auswirkungen die Konfrontation von CD95L-exprimierenden Transfektanten und Kontrollzellen mit T-Zellen aus unterschiedlichen Aktivierungsstadien hat. In der folgenden Diskussion der Befunde wird zunächst darauf eingegangen, in welchem Umfang Zelltod in den verschiedenen Stadien beobachtet werden konnte und welche Ursachen für unterschiedliche Apoptose-Empfindlichkeiten von T-Zellen in Frage kommen könnten. Danach wird ein Block von Experimenten besprochen, in denen CD95L-exprimierende und CD95L-negative Zellen als Stimulatoren zum Auslösen von Immunantworten verwendet worden sind. Zum Schluß wird die Möglichkeit diskutiert, CD95L als protektives Molekül zur Verhinderung von zellvermittelter Zytolyse einzusetzen.

4.1 CD95L-vermittelte Induktion von Zelltod in T-Zellen

Bei der Kokultur von 293h95L Zellen mit ruhenden T-Zellen kam es zur Induktion von Apoptose in einer Teilpopulation, die den CD95 Rezeptor in nachweisbarer Dichte exprimierte (Abb. 3.1). Die Induktion von CD95-vermitteltem Zelltod in ruhenden T-Zellen widerspricht dem ursprünglich für das CD95 Rezeptor/Ligandensystem entworfenen Wirkschema. Dieses ging davon aus, daß frisch isolierte, nicht-aktivierte T-Zellen resistent gegen Apoptose-vermittelnde Signale durch den CD95 Rezeptor sind und erst im Rahmen

einer Aktivierung empfindlich für diesen Stimulus werden [59, 60, 116]. Hieraus ergibt sich die Frage nach der Ursache für die unterschiedlichen Befunde. In den Versuchen, die zur Entwicklung dieses Modells führten, wurden CD95 Antikörper für die Induktion von Apoptose verwendet. Nach Kreuzvernetzung waren diese zwar imstande, Zelltod in aktivierten T-Zellen auszulösen, ruhende T-Zellen konnten jedoch, anders als bei Kokultur mit den CD95L-exprimierenden 293h95L Zellen, nicht eliminiert werden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von CD95 Antikörpern und dem CD95L könnte in der unterschiedlichen Bildung des Zelltod-induzierenden Rezeptorsignaltransduktionskomplexes (DISC) liegen. Für das Antikörper-induzierte Signal wurde beschrieben, daß drei Rezeptoren für die Signalinduktion ein Homotrimer formieren, an dem sich der DISC bildet [82]. In ruhenden T-Zellen scheint eine solche Trimerisierung für die Induktion des Apoptosesignals nicht ausreichend zu sein, da die Zellen auch Schutzproteine zur Blockade dieses Signalwegs exprimieren (z.B. cFLIP [99]). Es ist denkbar, daß die Bindung des CD95L an die CD95 Rezeptoren von nicht-aktivierten T-Zellen diese Blockade überkommen kann. Die Zellen könnten in diesem Fall einen anderen DISC bilden, der es ihnen ermöglicht, auch in diesem Aktivierungsstadium apoptotisch zugrunde zu gehen. Suda et al. [67] haben Hinweise darauf gefunden, daß die membranständige Form des CD95L zu einer Oligomerisierung von CD95 Rezeptoren führen könnte, deren Komplexität die von Homodecameren überschreitet. Ein solcher Rezeptorkomplex sollte demnach über seine Todesdomäne die Ausbildung eines DISC ermöglichen, dessen Signal in ruhenden T-Zellen nicht blockiert werden kann und so die Aktivierung der Caspasenkaskade ermöglicht.

In aktivierten T-Zellen ließ sich die Apoptose sowohl mit CD95 Antikörpern als auch mit CD95L-exprimierenden 293h95L Zellen auslösen (Tab. 3.1 und 3.4). Diese Zellen exprimierten CD95 in höherer Dichte als ruhende Zellen. Der Befund führte zu der Überlegung, daß aktivierte T-Zellen durch die Aktivierungs-induzierte Neusynthese (gleiche Transkriptionsfaktoren) von Proteinen der Apoptosesignalkaskade [98], den Signalweg zum Zelltod für geringe Stimuli freigeben. Ruhende CD95⁺ T-Zellen besitzen demnach zwar alle notwendigen Elemente der Apoptosesignalkaskade, jedoch in einer geringeren Konzentration. Der Signalweg kann für schwache Apoptosestimuli, wie z.B. den kreuzvernetzten CD95 Antikörpern, durch Schutzproteine (z.B. cFLIP [99]) blockiert werden. Starke Stimuli, wie der von 293h95L Zellen exprimierte CD95L können diese Blockade überkommen.

4.2 Auslösen von Alloimmunantworten durch 293h95L und 293pcDNA Zellen

Um die Auswirkungen von CD95L in der Induktionsphase von Alloimmunantworten zu untersuchen, wurden HLA-A3-negative T-Zellen mit den HLA-A3-exprimierenden 293h95L und 293pcDNA Zellen stimuliert. Hierbei zeigte sich, daß die Expression des CD95L zunächst keinen Einfluß auf die Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen hat. Trotz des primären Zelltods der CD95⁺ T-Zellen in den 293h95L Kulturen, kam es in der überlebenden Population, ebenso wie in der 293pcDNA Kultur, zur Expression des IL-2R und somit zu einem Aktivierungsprozeß. Da sich in den 293h95L Kulturen jedoch keine blastoiden Effektor-T-Zellen (CTL) entwickelten, liegt der Schluß nahe, daß der Aktivierungsprozeß die überlebenden Zellen in einen Apoptose-empfindlichen Zustand versetzte, so daß sie bei Kontakt mit dem CD95L der 293h95L Zellen eliminiert werden, bevor es zur Differenzierung von CTL kommt.

Die Beobachtung, daß T-Zellen über den CD95 Rezeptorsignalweg eliminiert werden können, bevor sie voll aktiviert sind, steht zunächst im Gegensatz zu der Beobachtung, daß T-Zellen gerade in dieser Phase der Aktivierung die Expression von Proteinen induzieren, die vor Apoptose schützen (z.B. cFLIP Induktion durch TCR und TOSO). Die Untersuchungen, die zu diesem Modell der induzierten Signalwegblockade führten, wurden jedoch entweder mit Zelltod-induzierenden CD95 Antikörpern [99-101] oder mit löslichem CD95L [35] durchgeführt. Für beide Stimuli ist aber gezeigt worden, daß diese weniger effizient Apoptose induzieren als der membranständige Ligand (CD95 mAb's siehe Abschnitt 4.1; sCD95L siehe [67, 117]). Dies bedeutet zum einen, daß T-Zellen für eine Elimination über den CD95 Rezeptorsignalweg nicht vollständig aktiviert werden müssen, sondern schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Verlauf eines Aktivierungsprozesses durch die Bindung von membranständigen CD95L an ihre CD95 Rezeptoren apoptotisch werden. Zum anderen läßt sich aus dieser Beobachtung aber auch ein Anforderungsprofil für potentielle CD95L⁺ Modulatorzellen ableiten, die eine Entwicklung von allospezifischen CTL als Reaktion auf eine Aktivierung verhindern können. Solche Zellen müßten zum einen die Voraussetzung für die Aktivierung von T-Zellen erfüllen. Hierfür ist die Interaktion von T-Zellrezeptoren (TCR) und MHC-Molekülen der Klasse I bzw. der Klasse II erforderlich. Zusätzlich zu diesem stimulatorischen Signal wird von den T-Zellen auch ein kostimulatorisches Signal benötigt. Dieses kann z.B. durch die Bindung des CD28 Moleküls der T-Zellen an das CD80/B7

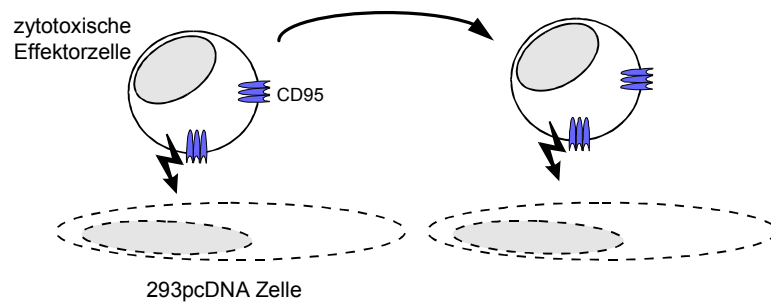
Antigen der stimulierenden Zelle geliefert werden. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) entsprechen diesem Anforderungsprofil. Durch ektopische Expression von CD95L auf allogenen APC's sollte es demnach möglich sein, die Alloaktivierung und die Differenzierung von allospezifischen CTL zu unterdrücken.

Ausgehend von diesem Konzept sind kürzlich Untersuchungen publiziert worden, die zeigen, daß bei einer entsprechenden Vorgehensweise die Deletion von allospezifischen Klonen und damit T-Zelltoleranz erzeugt werden konnte [118]. In den entsprechenden Experimenten wurden CD95L-transfizierte Makrophagen eines Mäusestamms regelmäßig über einen Zeitraum von vier Wochen in Mäuse eines allogenen Stamms gespritzt. Isolierte Milzzellen der Empfängertiere zeigten eine Nichtreaktivität gegenüber dem Spenderalloantigen, die in Kontrolltieren nicht beobachtet wurde.

4.3 CD95L als protektives Molekül zur Verhinderung von zellvermittelter Zytolyse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit allospezifischen, zytotoxischen Effektor-T-Zellen zeigten, daß diese Zellen in der Lage sind, 293 Zellen effektiv zu lysieren. CD95L exprimierende 293h95L Zellen wurden jedoch zu einem geringeren Anteil lysiert (Abb. 3.19). Die Arbeitshypothese zur Erklärung dieses Schutzeffektes besagt, daß die alloaktivierten CTL sehr empfindlich für CD95L-vermittelten Zelltod sind und bei Konfrontation mit CD95L-exprimierenden Zielzellen eliminiert werden, bevor sie diese zerstören können. Diese Hypothese konnte dadurch bestätigt werden, daß die alloaktivierten T-Zellen den CD95 Rezeptor in besonders hoher Dichte exprimierten. Weiterhin fand sich in den Kokulturen aus alloaktivierten CTL und 293h95L Zellen ein sehr hoher Anteil toter T-Zellen. Diese Befunde zeigen, daß es grundsätzlich möglich sein sollte, durch ektopische Expression von CD95L einen Schutz von Zellen und Geweben vor der Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen zu erreichen.

Fortlaufende Induktion von Zelltod



Attaque simultan 

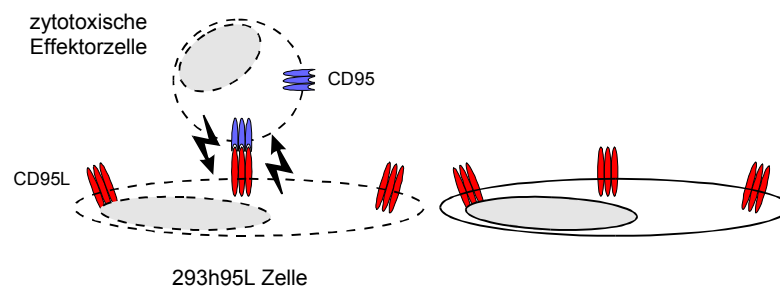


Abbildung 4.1: Modell der gleichzeitigen Induktion von Zelltod (*Attaque simultan *)

Zytotoxische Effektorzellen, die eine Zielzelle lysiert haben, sind in der Lage Zelltod in weiteren Zielzellen zu induzieren (oben). Trifft eine Apoptose-empfindliche Effektorzelle auf eine $CD95L^+$ Zielzelle (unten), so kommt es in beiden Zellen gleichzeitig zur Induktion von Zelltod. Die Effektorzelle tötet in diesem Fall zwar ihre Zielzelle, wird aber ebenfalls durch die *Attaque simultan * eliminiert und kann keine weiteren Zielzellen lysieren.

Eine gewisse Einschränkung des Schutzkonzepts ergibt sich aus der Beobachtung, daß es bei den 293h95L Zielzellen zwar zu einer deutlich verminderten Lyse kam, eine ^{51}Cr -Freisetzung aber dennoch gemessen werden konnte. Das bedeutet, daß auch die 293h95L Zellen, wenn auch nur in geringem Umfang, zerstört werden können. Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der Tatsache, daß in den 293h95L/CTL-Kokulturen beide Zelltypen das Potential zur Lyse der jeweiligen anderen haben. Beim Aufeinandertreffen der beiden Populationen kommt es daher in der Initialphase zur Induktion von Apoptose in beiden Effektorzelltypen. Dieser Zustand kann mit einem Begriff aus dem Fechtsport umschrieben werden. Beide Zelltypen „setzen gleichzeitig einen zählbaren Treffer“, es kommt zu einer *Attaque simultan * (Abb. 4.1). Dadurch dürfte auch die beobachtete schwache Lyse der 293h95L Zellen in der Anfangsphase (4 h) der Reaktion zu erklären sein.

Während also in diesen Ansätzen in der primären Phase der Versuche die T-Zellen gleichzeitig mit der Induktion ihres Effektorsignals ebenso ein Todessignal empfangen, sind die T-Zellen, die auf die CD95L⁻ 293pcDNA Zellen treffen, in der Lage sich von den Zielzellen zu lösen und weitere Zellen zu eliminieren (Abb. 4.1). In den 293h95L Kulturen kommt die Reaktion zum Stillstand, wenn eine der beiden Effektorpopulationen vollständig eliminiert ist. In den durchgeführten Experimenten war dies jeweils die Population der alloaktivierten T-Zellen. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß die schwache Lyse der 293h95L Zellen bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 h nicht gesteigert wurde, während die Lyse von 293pcDNA Zellen nach 20 h deutlich höher war als nach 4 h. Diese Versuche legen den Schluß nahe, daß die Expression des CD95L auf allogenen Zellen eine Zerstörung durch alloaktivierte T-Zellen nicht vollständig verhindern kann. Die Expression des CD95L bedeutet für solche Zellen vielmehr, daß eine initial auftretende Zerstörung nicht weiter fortschreitet.

Bei der Verwendung von IL-2 aktivierten T-Zellen und frisch isolierten NK Zellen als Effektorpopulationen konnte keine Reduktion einer Zerstörung von 293 Zellen durch die Expression des CD95L beobachtet werden (Abb. 3.23 und Tab. 3.7). Für die IL-2 aktivierten Zellen war dieser Befund zunächst überraschend, da mit IL-2 inkubierte T-Zellen von Owen-Schaub et al. als sehr empfindlich für CD95 Rezeptor-vermittelte Apoptose nach fünf bis sechs Tagen Kultur beschrieben wurden [59]. Es war demnach zu erwarten, daß auch für diese Effektorpopulation zunächst eine Phase gleichzeitiger Induktion von Zelltod in beiden Zellpopulationen beobachtet wird (*Attaque simultanée*). Im weiteren Verlauf der Reaktion sollte es dann jedoch nach der Elimination der T-Zellen zu einer Reduktion der Zerstörung von 293h95L Zellen im Vergleich zu CD95L⁻ 293pcDNA Zellen kommen. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer solchen CD95L vermittelten Reduktion der 293h95L Zytolyse ist eine unterschiedliche Aktivierung der IL-2 kultivierten T-Zellen und einer damit zusammenhängenden CD95 Rezeptorexpression. Owen-Schaub et al. verwendeten eine 60fach höhere Konzentration von IL-2 und beobachteten auf den von ihnen untersuchten Zellen vergleichsweise höhere CD95 Rezeptorexpressionen. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten war die CD95 Expressionsdichte auf den IL-2 aktivierten T-Zellen deutlich geringer als die von alloaktivierten CTL (Abb. 3.25). In Übereinstimmung damit wurde bei Inkubation von IL-2 aktivierten T-Zellen mit 293h95L Zellen ein geringerer Teil toter T-Zellen beobachtet (Abb. 3.24) als bei der Kokultur von alloaktivierten T-Zellen

und 293h95L Zellen (Abb. 3.21). Es ist daher wahrscheinlich, daß die fehlende Schutzfunktion von CD95L bei der Verwendung von IL-2 aktivierten T-Zellen darauf zurückzuführen ist, daß diese einen geringeren Grad von Apoptoseempfindlichkeit aufweisen.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen CD95L Auswirkungen bei alloaktivierten und IL-2 aktivierten T-Zellen könnte darin bestehen, daß in den beiden Populationen die eigentlichen lytischen Effektorzellen unterschiedliche TCR-Spezifitäten aufweisen. Während es in der alloaktivierten Population zur Anreicherung von Effektorzellen mit TCR-Spezifität für HLA-A3 Moleküle kommt, führt die IL-2 Aktivierung nicht zu einer Anreicherung, sondern eher zu einer gleichmäßigen Expansion unterschiedlicher Spezifitäten. Da auch die Stimulation des TCR ein Zelltodsignal vermitteln kann [119], könnte es bei dem hohen Anteil HLA-A3 spezifischer Effektorzellen in den alloreaktiven Populationen zu einer Verstärkung des CD95L Signals der 293h95L Zellen kommen. Obwohl die Frage nach den unterschiedlichen Wirkungen der CD95L Expression auf alloaktivierte und IL-2 aktivierte zytotoxische Effektorzellen nicht abschließend beantwortet werden kann, lassen die Befunde den Schluß zu, daß in der alloaktivierten Population die Zellen mit lytischem Potential auch sehr empfindlich für CD95L-vermittelten Zelltod sind. Da es bei der IL-2 aktivierten Population zur Lyse von 293h95L Zellen kommt, überlappen sich hier Zellen mit lytischem Potential und Apoptose-empfindlichen Zellen nicht komplett.

Für frisch isolierte NK Zellen wurde gezeigt, daß diese zytotoxische Effektorzellpopulation ebenfalls wenig empfindlich für die durch Kokultur mit 293h95L Zellen induzierte Apoptose ist (Abb. 3.27 und Tab. 3.7). Analysen der CD95 Rezeptorexpression auf NK Zellen führten zu dem Schluß, daß dies vor allem auf eine geringe Expression des Zelltod-auslösenden Rezeptors zurückgeführt werden könnte (Abb. 3.28). Diese Beobachtung könnte auch das Ausbleiben einer CD95L vermittelten Reduktion der 293h95L Zytolyse erklären.

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei der Verwendung von Effektorpopulationen mit einem hohen Anteil von aktivierten NK Zellen. Diese alloaktivierten NK Zellen waren blastoid und exprimierten den CD95 Rezeptor in hoher Dichte an der Zelloberfläche. Für eine solche Population wurde bei geringen Effektor/Target Verhältnissen eine Reduktion der Zytolyse von 293h95L Zellen gegenüber den CD95L⁻ 293pcDNA Zellen beobachtet. Bei hohen Verhältnissen wurden hingegen für beide Zielzelltypen vergleichbar hohe Lyseraten bestimmt (Abb. 3.31). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte in der Heterogenität der Lymphozytenpopulation in diesen Ansätzen zu suchen sein. Da alle aktivierten, blastoiden

Zellen das CD56 (NK) Antigen exprimierten, ist es unwahrscheinlich, daß in diesen Kulturen alloreaktive T-Zellen vorhanden waren. Neben den aktivierten NK Zellen könnten somit nur zytotoxische IL-2 aktivierte T-Zellen eine Rolle spielen. Da bei diesen, wie oben diskutiert, die CD95L Expression keinen Einfluß auf ihre lytische Kapazität hat, dürften die bei hohen Effektorzellzahlen beobachteten vergleichbaren Lyseraten der 293h95L und 293pcDNA Zellen auf die Wirkung von IL-2 aktivierten Zellen zurückzuführen sein. Unter diesen Voraussetzungen ist es wahrscheinlich, daß die bei geringen Effektorzellzahlen auftretende Lyse den aktivierten NK Zellen zuzuordnen ist. Die in diesem Bereich demonstrierte reduzierte Lyse der 293h95L Zellen spricht dafür, daß CD95L Schutz vor einer Zerstörung durch aktivierte NK Zellen vermitteln kann.

Die hier beschriebenen Befunde unterstützen das Konzept, daß Zellen und Gewebe durch die Überexpression von CD95L vor einer Zerstörung durch alloaktivierte T- und NK Zellen geschützt werden können. Unter der Voraussetzung, daß Zellen mit ektopischer CD95L Expression stimulatorisches Potential haben, kann auch die Differenzierung alloreaktiver zytotoxischer Effektor-T-Zellen verhindert werden. Die bisherigen *in vivo* Befunde zur Nutzung des CD95 Rezeptor/Ligandensystems zur Kontrolle von Immunreaktionen nach Transplantationen sind noch kontrovers. Verlängertes Überleben von allogenen Zellen konnte für unter die Nierenkapsel transplantierte, CD95L-exprimierende Sertolizellen [3, 6] und Inselzellen, die zusammen mit CD95L transfizierten Myoblasten transplantiert wurden [5], gezeigt werden. An diesen Ort transplantiertes, mit dem Gen des CD95L transfiziertes Gewebe wurde in Versuchen, die von anderen Gruppen durchgeführt wurden, jedoch auch abgestoßen [7, 8, 120]. Mit den beobachteten Abstoßungsreaktionen ging immer eine Infiltration des transplantierten Gewebes mit neutrophilen Granulozyten einher. Denkbar ist, daß die verwendeten Zelltypen unterschiedliche Konzentrationen von CD95L exprimierten und dadurch unterschiedliche Effekte bei Kontakt mit dem Immunsystem der Empfängerorganismen auslösten. Die in dieser Arbeit analysierten Effekte der 293h95L Zellen exprimierten den CD95L in extrem hoher Dichte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß hohe Konzentrationen erforderlich sind, um einen solchen protektiven Effekt zu erzielen. Eine mögliche Erklärung für diese Infiltration könnte die chemotaktische Wirkung des CD95L auf neutrophile Granulozyten geben [121]. Ein solcher schädigender Effekt könnte aber z.B. durch Koexpression von TGF- β unterdrückt werden, da beobachtet wurde, daß die Injektion von TGF- β eine Abstoßung durch neutrophile Granulozyten verhindern kann [122].

Offen bleibt weiter die Frage, wie ein oder mehrere protektive Gene im oder in der Nähe von Gewebe eines transplantierten Organs zur Expression gebracht werden könnten. Hierfür wurden bereits verschiedene Modelle vorgeschlagen. Für allogene Organtransplantationen wurde eine Transfektion des Organs mit einer Gene Gun untersucht [123]. Für diese, wie auch für eine adenovirale Gentherapie [124] werden jedoch noch geeignete Vektorsysteme gesucht, die eine gewebespezifische Expression mit ausreichender Expressionsdichte und Transfektionseffizienz ermöglichen. In der xenogenen Transplantationssituation besteht die Möglichkeit, ein Transplantat durch Einschleusen von CD95L gentechnisch zu verändern oder transgene Spendertiere zu erzeugen. Da bei xenogener Differenz die molekularen Interaktionen und Kompatibilitäten zwischen Effektorzellen und Zielzellen anders sein könnten als in der allogenen Situation, ist nicht von vornherein klar, ob die Expression des humanen CD95L z.B. auf Schweinezellen protektive Effekte gegenüber xenoreaktiven zytotoxischen T-Zellen ausüben kann. In diesem Zusammenhang ist ein kürzlich erhobener Befund von besonderem Interesse, in dem gezeigt werden konnte, daß auch transfizierte CD95L⁺ Rinderzellen Zelltod in humanen T-Zellen auslösen können [125]. In der xenogenen Transplantationssituation ist es zusätzlich notwendig die hyperakute Abstoßung durch präformierte xenogene Antikörper und das Komplementsystem zu kontrollieren. Eine Lösungsmöglichkeit hierfür existiert bereits in Form von transgenen Schweinen, die ein humanes Komplementregulationsprotein (CD55) exprimieren [126]. Nach der Entdeckung von auf den Menschen übertragbaren porcinen Retroviren [127, 128] ist vor einer klinischen Nutzung der Xenotransplantation das möglicherweise hiermit verbundene Infektionsrisiko für den einzelnen oder sogar die Bevölkerung zu prüfen und kritisch zu diskutieren.

Zusammengenommen kann aus den in dieser Arbeit erhobenen Befunden der Schluß gezogen, daß die gentechnisch erzeugte ektopische Expression von CD95L auf Zellen und Geweben eine Strategie zur Modulation von allogenen Immunantworten ist. Eine Expression von CD95L auf Zellen, die eine Alloaktivierung auslösen können (z.B. Antigen-präsentierende Zellen), scheint geeignet zu sein, die Differenzierung von alloreaktiven, naiven T-Zellen zu alloaktivierten, zytotoxischen Effektor-T-Zellen zu verhindern. Durch die Expression des CD95L werden darüber hinaus auch Zellen vor Zerstörung durch zytotoxische Effektor-T-Zellen und aktivierte NK Zellen geschützt. Protektion vor einer Zerstörung durch IL-2 aktivierten T-Zellen und NK Zellen vermittelt dieses Oberflächenprotein nicht. Der

CD95L scheint demzufolge nicht *Der Heilige Gral* der Organtransplantation zu sein [39], könnte aber dennoch Teil einer zukünftigen Therapie werden.

5 Zusammenfassung

Die Bindung des CD95 Liganden (CD95L) an seinen Rezeptor (CD95) kann bei CD95-exprimierenden T-Zellpopulationen den Tod durch Apoptose auslösen. In der Transplantationssituation ist der CD95L damit ein potentiell protektives Molekül gegenüber zellulären Immunreaktionen. Mit Hilfe eines *in vitro* Modellsystems wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht, ob CD95L zur Modulation von allogenen Immunantworten in der Lage ist. Hierzu wurde die CD95L-negative, humane Nierenzelllinie 293 mit CD95L-cDNA transfiziert und ein Klon mit stabil hoher CD95L Expression isoliert (293h95L Zellen). Die Auswirkungen der Kokultur von 293h95L Zellen auf T-Zellen aus unterschiedlichen Aktivierungsstadien wurden verglichen mit den Effekten von 293 Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren (293pcDNA Zellen).

Die kurzzeitige Kultur (6-16 h) von T-Zellen mit 293h95L Zellen führte zur Apoptoseinduktion in ca. 40 % ruhender T-Zellen und in 60-70 % aktivierter T-Zellen. In Übereinstimmung damit exprimierten aktivierte T-Zellen den CD95 Rezeptor in höherer Dichte. Wurden T-Zellen von HLA-differenten Blutspendern mit bestrahlten 293 Zellen (HLA-A3-positiv) plus IL-2 kultiviert, kam es bei Verwendung von 293pcDNA und 293h95L Zellen nach zwei Tagen zunächst zur T-Zellaktivierung (IL-2R Expression). Während die durch 293pcDNA Zellen ausgelöste Alloaktivierung zur Bildung von spezifischen, zytotoxischen Effektorzellen (CTL) führte, konnten in Kulturen von 293h95L Zellen nach 7 Tagen weder Lymphoblasten noch CTL mit Spezifität für 293-Antigene nachgewiesen werden. Um festzustellen, welche Auswirkungen die Expression von CD95L auf die Zerstörung von Zielzellen durch unterschiedliche zytotoxische Effektorzellpopulationen hat, wurden 293h95L und 293pcDNA Zellen als Zielzellen von alloaktivierten CTL, IL-2 aktivierten T-Zellen und NK Zellen eingesetzt. Es zeigte sich, daß die CD95L⁺ 293h95L Transfektante von allospezifischen CTL deutlich schlechter lysiert wurde als 293pcDNA Zellen. Die Hypothese, daß der Schutz der CD95L-exprimierenden Zielzellen auf Apoptoseinduktion in der Effektorpopulation beruht, wurde dadurch bestätigt, daß in Kokulturen von 293h95L Zellen mit alloreaktiven CTL massiver apoptotischer Zelltod in der T-Zellpopulation auftrat. IL-2 aktivierte T-Zellen und NK Zellen waren weniger empfindlich für den CD95L-vermittelten Zelltod und lysierten demzufolge 293h95L und 293pcDNA Zellen in vergleichbarem Umfang.

Aus diesen Ergebnissen wird der Schluß gezogen, daß die gentechnisch erzeugte, ektopische Expression von CD95L auf Zellen und Geweben eine Strategie zur Modulation von allogenen Immunantworten sein kann. Durch Expression von CD95L auf Zellen, die eine Alloaktivierung auslösen können (z.B. Antigen-präsentierende Zellen), sollte es möglich sein, die Differenzierung von Vorläufer-CTL zu allospezifischen Effektor-CTL zu verhindern. Darüber hinaus können Zellen durch CD95L-Expression vor der Zerstörung durch zytotoxische Effektorzellen geschützt werden. Bei einer möglichen Verwendung dieses Konzepts zur Immunmodulation nach klinischer Organtransplantation ist jedoch zu beachten, daß die CD95L Expression anscheinend keinen Schutz vor IL-2 aktivierten T-Zellen und NK Zellen vermitteln kann.

6 Literatur

1. Takahashi, T., M. Tanaka, J. Inazawa, T. Abe, T. Suda, and S. Nagata; 1994; Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity; *Int Immunol* 6:1567.
2. Van Dooremaal, J. C.; 1873; Die Entwicklung der in fremden Grund versetzten lebenden Gewebe; *Albrecht von Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 19:359.
3. Bellgrau, D., D. Gold, H. Selawry, J. Moore, A. Franzusoff, and R. C. Duke; 1995; A role for CD95 ligand in preventing graft rejection; *Nature* 377:630.
4. Griffith, T. S., T. Brunner, S. M. Fletcher, D. R. Green, and T. A. Ferguson; 1995; Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege; *Science* 270:1189.
5. Lau, H. T., M. Yu, A. Fontana, and C. J. Stoeckert, Jr.; 1996; Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice; *Science* 273:109.
6. Korbitt, G. S., J. F. Elliott, and R. V. Rajotte; 1997; Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression; *Diabetes* 46:317.
7. Allison, J., H. M. Georgiou, A. Strasser, and D. L. Vaux; 1997; Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts; *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3943.
8. Kang, S.-M., D. B. Schneider, Z. Lin, D. Hanahan, D. A. Dichek, P. G. Stock, and S. Baekkeskov; 1997; Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction; *Nat Med* 3:738.
9. Majno, G., and I. Joris; 1995; Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death; *Am J Pathol* 146:3.
10. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie; 1972; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; *Br J Cancer* 26:239.
11. Duke, R. C., R. Chervenak, and J. J. Cohen; 1983; Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis; *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6361.
12. Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson; 1992; Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages; *J Immunol* 148:2207.
13. Ellis, R. E., J. Y. Yuan, and H. R. Horvitz; 1991; Mechanisms and functions of cell death; *Annu Rev Cell Biol* 7:663.
14. Steller, H.; 1995; Mechanisms and genes of cellular suicide; *Science* 267:1445.
15. Hetts, S. W.; 1998; To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease; *Jama* 279:300.
16. von Boehmer, H.; 1992; Thymic selection: a matter of life and death; *Immunol Today* 13:454.

17. Kägi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein; 1994; Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity; *Science* 265:528.
18. Ogasawara, J., T. Suda, and S. Nagata; 1995; Selective apoptosis of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by the anti-Fas antibody; *J Exp Med* 181:485.
19. Hahne, M., T. Renno, M. Schroeter, M. Irmeler, L. French, T. Bornand, H. R. MacDonald, and J. Tschopp; 1996; Activated B cells express functional Fas ligand; *Eur J Immunol* 26:721.
20. Ashwell, J. D., R. E. Cunningham, P. D. Noguchi, and D. Hernandez; 1987; Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen; *J Exp Med* 165:173.
21. Kabelitz, D., T. Pohl, and K. Pechhold; 1993; Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes; *Immunol Today* 14:338.
22. Ucker, D. S., J. D. Ashwell, and G. Nickas; 1989; Activation-driven T cell death. I. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation; *J Immunol* 143:3461.
23. Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K. M. Debatin, and P. H. Krammer; 1995; Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95); *Nature* 373:438.
24. Shi, Y. F., B. M. Sahai, and D. R. Green; 1989; Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes; *Nature* 339:625.
25. Anel, A., M. Buferne, C. Boyer, A. M. Schmitt-Verhulst, and P. Golstein; 1994; T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A; *Eur J Immunol* 24:2469.
26. Brunner, T., N. J. Yoo, D. LaFace, C. F. Ware, and D. R. Green; 1996; Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506; *Int Immunol* 8:1017.
27. Cui, H., D. H. Sherr, M. el-Khatib, K. Matsui, D. J. Panka, A. Marshak-Rothstein, and S. T. Ju; 1996; Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of FasL- but not Fas-mediated function; *Cell Immunol* 167:276.
28. Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten, and C. B. Thompson; 1995; CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL; *Immunity* 3:87.
29. Allen, R. D., J. D. Marshall, J. B. Roths, and C. L. Sidman; 1990; Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules; *J Exp Med* 172:1367.
30. Matsuzawa, A., T. Moriyama, T. Kaneko, M. Tanaka, M. Kimura, H. Ikeda, and T. Katagiri; 1990; A new allele of the lpr locus, lpreg, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse; *J Exp Med* 171:519.
31. Watanabe, F. R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata; 1992; Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis; *Nature* 356:314.

32. Nagata, S., and T. Suda; 1995; Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations; *Immunol Today* 16:39.
33. Nishimura, Y., A. Ishii, Y. Kobayashi, Y. Yamasaki, and S. Yonehara; 1995; Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells; *J Immunol* 154:4395.
34. Alderson, M. R., T. W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K. A. Schooley, R. G. Goodwin, C. A. Smith, F. Ramsdell, and D. H. Lynch; 1995; Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes; *J Exp Med* 181:71.
35. Suda, T., M. Tanaka, K. Miwa, and S. Nagata; 1996; Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand; *J Immunol* 157:3918.
36. Russell, J. H., B. Rush, C. Weaver, and R. Wang; 1993; Mature T cells of autoimmune *lpr/lp* mice have a defect in antigen-stimulated suicide; *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4409.
37. Bossu, P., G. G. Singer, P. Andres, R. Ettinger, A. Marshak-Rothstein, and A. K. Abbas; 1993; Mature CD4⁺ T lymphocytes from MRL/*lpr* mice are resistant to receptor-mediated tolerance and apoptosis; *J Immunol* 151:7233.
38. Russell, J. H., and R. Wang; 1993; Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells; *Eur J Immunol* 23:2379.
39. Green, D. R., and C. F. Ware; 1997; Fas-ligand: privilege and peril; *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5986.
40. Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin, and P. H. Krammer; 1989; Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis; *Science* 245:301.
41. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara; 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.
42. Oehm, A., I. Behrmann, W. Falk, M. Pawlita, G. Maier, C. Klas, M. Li-Weber, S. Richards, J. Dhein, B. C. Trauth, h. Ponstingl, and P. H. Krammer; 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.
43. Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata; 1991; The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis; *Cell* 66:233.
44. Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin; 1994; The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death; *Cell* 76:959.
45. Baker, M., N. H. Altman, E. R. Podack, and R. B. Levy; 1996; The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice; *J Exp Med* 183:2645.
46. Ware, C. F., S. VanArsdale, and T. L. VanArsdale; 1996; Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families; *J Cell Biochem* 60:47.

47. Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel; 1993; A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death; *Cell* 74:845.
48. Itoh, N., and S. Nagata; 1993; A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen; *J Biol Chem* 268:10932.
49. Kitson, J., T. Raven, Y. P. Jiang, D. V. Goeddel, K. M. Giles, K. T. Pun, C. J. Grinham, R. Brown, and S. N. Farrow; 1996; A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis; *Nature* 384:372.
50. Marsters, S. A., J. P. Sheridan, C. J. Donahue, R. M. Pitti, C. L. Gray, A. D. Goddard, K. D. Bauer, and A. Ashkenazi; 1996; Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B; *Curr Biol* 6:1669.
51. Bodmer, J. L., K. Burns, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schroter, K. Becker, A. Wilson, L. E. French, J. L. Browning, H. R. MacDonald, and J. Tschoopp; 1997; TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95); *Immunity* 6:79.
52. Pan, G., O. R. K, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V. M. Dixit; 1997; The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL; *Science* 276:111.
53. Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V. M. Dixit; 1997; An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL; *Science* 277:815.
54. Chaudhary, P. M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, and L. Hood; 1997; Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD- dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway; *Immunity* 7:821.
55. Pan, G., J. H. Bauer, V. Haridas, S. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B. B. Aggarwal, J. Ni, and V. M. Dixit; 1998; Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor; *FEBS Lett* 431:351.
56. Cascino, I., G. Papoff, R. De Maria, R. Testi, and G. Ruberti; 1996; Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis; *J Immunol* 156:13.
57. Pan, G., J. Ni, G. Yu, Y. F. Wei, and V. M. Dixit; 1998; TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling; *FEBS Lett* 424:41.
58. Watanabe, F. R., C. I. Brannan, N. Itoh, S. Yonehara, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata; 1992; The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen; *J Immunol* 148:1274.
59. Owen-Schaub, L. B., S. Yonehara, W. L. d. Crump, and E. A. Grimm; 1992; DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement; *Cell Immunol* 140:197.
60. Miyawaki, T., T. Uehara, R. Nibu, T. Tsuji, A. Yachie, S. Yonehara, and N. Taniguchi; 1992; Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood; *J Immunol* 149:3753.
61. Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata; 1993; Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family; *Cell* 75:1169.

62. Peitsch, M. C., and J. Tschopp; 1995; Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family; *Mol Immunol* 32:761.
63. Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, T. M. Leber, M. Mangan, K. Miller, P. Nayee, K. Owen, S. Patel, W. Thomas, G. Wells, L. M. Wood, and W. K.; 1994; Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases; *Nature* 370:555.
64. McGeehan, G. M., J. D. Becherer, R. C. Bast Jr, C. M. Boyer, B. Champion, K. M. Connolly, J. G. Conway, P. Furdon, S. Krap, S. Kidao, A. B. McElroy, J. Nichols, K. M. Pryzwansky, F. Schoenen, L. Sekut, A. Truesdale, M. Verghese, J. Warner, and J. P. Ways; 1994; Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor; *Nature* 370:558.
65. Tanaka, M., T. Suda, T. Takahashi, and S. Nagata; 1995; Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes; *Embo J* 14:1129.
66. Smith, R. A., and C. Baglioni; 1987; The active form of tumor necrosis factor is a trimer; *J Biol Chem* 262:6951.
67. Suda, T., H. Hashimoto, M. Tanaka, T. Ochi, and S. Nagata; 1997; Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing; *J Exp Med* 186:2045.
68. Montel, A. H., M. R. Bochan, J. A. Hobbs, D. H. Lynch, and Z. Brahmi; 1995; Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells; *Cell Immunol* 166:236.
69. Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware, and D. R. Green; 1995; Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas; *Nature* 373:441.
70. Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein; 1995; Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation; *Nature* 373:444.
71. el-Khatib, M., B. Z. Stanger, H. Dogan, H. Cui, and S. T. Ju; 1995; The molecular mechanism of FasL-mediated cytotoxicity by CD4⁺ Th1 clones; *Cell Immunol* 163:237.
72. Desbarats, J., R. C. Duke, and M. K. Newell; 1998; Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4⁺ T cells; *Nat Med* 4:1377.
73. Stassi, G., M. Todaro, F. Bucchieri, A. Stoppacciaro, F. Farina, G. Zummo, R. Testi, and R. De Maria; 1999; Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis; *J Immunol* 162:263.
74. Viard, I., P. Wehrli, R. Bullani, P. Schneider, N. Holler, D. Salomon, T. Hunziker, J. H. Saurat, J. Tschopp, and L. E. French; 1998; Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin; *Science* 282:490.
75. Galle, P. R., W. J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel, P. H. Krammer, and L. Runkel; 1995; Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage; *J Exp Med* 182:1223.

76. Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo, and J. M. Puck; 1995; Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome; *Cell* 81:935.
77. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer, and J. P. de Villartay; 1995; Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity; *Science* 268:1347.
78. Ameisen, J. C., and A. Capron; 1991; Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis; *Immunol Today* 12:102.
79. Debatin, K. M., A. Fahrig-Faissner, S. Enenkel-Stoodt, W. Kreuz, A. Benner, and P. H. Krammer; 1994; High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children; *Blood* 83:3101.
80. Westendorp, M. O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, and P. H. Krammer; 1995; Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120; *Nature* 375:497.
81. Huang, B., M. Eberstadt, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, and S. W. Fesik; 1996; NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain; *Nature* 384:638.
82. Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer, and M. E. Peter; 1995; Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor; *Embo J* 14:5579.
83. Chinnaiyan, A. M., O. R. K. M. Tewari, and V. M. Dixit; 1995; FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis; *Cell* 81:505.
84. Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, Z. Pancer, I. L. Mett, J. H. Camonis, and D. Wallach; 1995; A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain; *J Biol Chem* 270:7795.
85. Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, O. R. K. A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, and V. M. Dixit; 1996; FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex; *Cell* 85:817.
86. Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev, and D. Wallach; 1996; Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death; *Cell* 85:803.
87. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp; 1997; The CARD domain: a new apoptotic signalling motif; *Trends Biochem Sci* 22:155.
88. Kuwana, T., J. J. Smith, M. Muzio, V. Dixit, D. D. Newmeyer, and S. Kornbluth; 1998; Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c; *J Biol Chem* 273:16589.
89. Adachi, S., A. R. Cross, B. M. Babior, and R. A. Gottlieb; 1997; Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis; *J Biol Chem* 272:21878.
90. Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik; 1998; Caspases: enemies within; *Science* 281:1312.

91. Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, and B. Seed; 1995; RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death; *Cell* 81:513.
92. Duan, H., and V. M. Dixit; 1997; RAIDD is a new 'death' adaptor molecule; *Nature* 385:86.
93. Ahmad, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, R. V. Talanian, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri; 1997; CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP; *Cancer Res* 57:615.
94. Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, and D. Baltimore; 1997; Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis; *Cell* 89:1067.
95. Ting, A. T., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed; 1996; RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis; *Embo J* 15:6189.
96. Juo, P., C. J. Kuo, J. Yuan, and J. Blenis; 1998; Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas- induced apoptotic cascade; *Curr Biol* 8:1001.
97. Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra, and A. Winoto; 1998; Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1; *Nature* 392:296.
98. Holtz-Heppelmann, C. J., A. Algeciras, A. D. Badley, and C. V. Paya; 1998; Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region; *J Biol Chem* 273:4416.
99. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp; 1997; Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP; *Nature* 388:190.
100. Shu, H. B., D. R. Halpin, and D. V. Goeddel; 1997; Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis; *Immunity* 6:751.
101. Hitoshi, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita, and G. P. Nolan; 1998; Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells; *Immunity* 8:461.
102. Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and J. C. Reed; 1998; A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases; *J Biol Chem* 273:7787.
103. Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D. A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf, and J. C. Reed; 1998; IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs; *Cancer Res* 58:5315.
104. Adams, J. M., and S. Cory; 1998; The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival; *Science* 281:1322.
105. Strasser, A., A. W. Harris, D. C. Huang, P. H. Krammer, and S. Cory; 1995; Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis; *Embo J* 14:6136.
106. Memon, S. A., M. B. Moreno, D. Petrak, and C. M. Zacharchuk; 1995; Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma; *J Immunol* 155:4644.

107. Chinnaiyan, A. M., K. Orth, O. R. K, H. Duan, G. G. Poirier, and V. M. Dixit; 1996; Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases; *J Biol Chem* 271:4573.
108. Bøyum, A.; 1964; Separation of white blood cells; *Nature* 4960:793.
109. Madsen, M., H. E. Johnsen, P. W. Hansen, and S. E. Christiansen; 1980; Isolation of human T and B lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation. Characterization of the isolated subpopulations; *J Immunol Methods* 33:323.
110. Schraven, B., M. Roux, B. Hutmacher, and S. C. Meuer; 1989; Triggering of the alternative pathway of human T cell activation involves members of the T 200 family of glycoproteins; *Eur J Immunol* 19:397.
111. Imoto, S., L. Hu, Y. Tomita, J. Phuchareon, U. Ruther, and T. Tokuhisa; 1996; A regulatory role of c-Fos in the development of precursor B lymphocytes mediated by interleukin-7; *Cell Immunol* 169:67.
112. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis; 1989; Molecular cloning - a laboratory manual; *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
113. Laemmli, U. K.; 1970; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227:680.
114. Mariani, S. M., B. Matiba, C. Baumler, and P. H. Krammer; 1995; Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases; *Eur J Immunol* 25:2303.
115. Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S. D. Lu; 1988; A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF; *Cell* 53:45.
116. Klas, C., K. M. Debatin, R. R. Jonker, and P. H. Krammer; 1993; Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells; *Int Immunol* 5:625.
117. Stöckmann, C. 1999. Induktion von apoptotischem Zelltod durch die membranständige und lösliche Form des humanen CD95-Liganden. Universität Hannover.
118. Zhang, H., X. Su, D. Liu, W. Liu, P. Yang, Z. Wang, C. K. Edwards, H. Bluethmann, J. D. Mountz, and T. Zhou; 1999; Induction of specific T cell tolerance by fas ligand- expressing antigen-presenting cells [In Process Citation]; *J Immunol* 162:1423.
119. Wesselborg, S., O. Janssen, and D. Kabelitz; 1993; Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells; *J Immunol* 150:4338.
120. Seino, K., N. Kayagaki, N. Tsukada, K. Fukao, H. Yagita, and K. Okumura; 1997; Transplantation of CD95 ligand-expressing grafts: influence of transplantation site and difficulty in protecting allo- and xenografts; *Transplantation* 64:1050.
121. Seino, K., K. Iwabuchi, N. Kayagaki, R. Miyata, I. Nagaoka, A. Matsuzawa, K. Fukao, H. Yagita, and K. Okumura; 1998; Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes; *J Immunol* 161:4484.
122. Chen, J. J., Y. Sun, and G. J. Nabel; 1998; Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L); *Science* 282:1714.

123. Guo, Z., D. Mital, Y. Y. Mo, Y. Tian, J. Shen, A. S. Chong, P. Foster, H. Sankary, L. McChesney, S. C. Jensik, and J. W. Williams; 1998; Effect of gene gun-mediated CTLA4IG and Fas ligand gene transfection on concordant xenogeneic islet graft rejection; *Transplant Proc* 30:589.
124. Ferry, N., and J. M. Heard; 1998; Liver-directed gene transfer vectors; *Hum Gene Ther* 9:1975.
125. Tran, T. H., S. Grey, J. Anrather, F. Steinhauslin, F. H. Bach, and H. Winkler; 1998; Regulated and endothelial cell-specific expression of Fas ligand: an in vitro model for a strategy aiming at inhibiting xenograft rejection; *Transplantation* 66:1126.
126. White, D. J., and N. Yannoutsos; 1996; Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man; *Res Immunol* 147:88.
127. Patience, C., Y. Takeuchi, and R. A. Weiss; 1997; Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs; *Nat Med* 3:282.
128. Le Tissier, P., J. P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R. A. Weiss; 1997; Two sets of human-tropic pig retrovirus; *Nature* 389:681.

Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

Publikationen

SCHWINZER, R., DULAT, H.J., KYAS, U., WONIGEIT, K.
(1998) The CD95/CD95L system as target for modulation of
allogeneic immune responses. *Langenbecks Arch. Chir.* Forumband
98, 655-658

SCHWINZER, R., DULAT, H.J., BAARS, W., WONIGEIT, K.
(1999) CD95 Ligand as protective molecule to prevent T cell-
mediated cytolysis. *Tx Med.* **11**, 193-195

Publizierte Abstracts

DULAT, H.J., BAARS, W., WONIGEIT, K., SCHWINZER, R.
(1998) Immunomodulatory capacities of transfectants
overexpression the human CD95L. *Immunbiol.* **199**, 525
29. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie
Freiburg, 23.-26. September 1998

Vorträge/Poster- präsentationen

DULAT, H.J., SCHWINZER, R., KYAS, U., WONIGEIT, K.
Inhibition of alloimmune responses by modulator cells
overexpressing the human CD95 Ligand
13. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie,
Binz auf Rügen, 6.-8. März 1997 (Vortrag)

DULAT, H.J., KYAS, U., WONIGEIT, K., SCHWINZER, R.,
Modulator cells overexpressing the human CD95-Ligand can
inhibit alloimmune responses *in vitro*
Fifth Basic Science Symposium of the Transplantation Society
Chautauqua, New York (USA), 06.-11. September 1997 (Poster)

DULAT, H.J., KYAS, U., WONIGEIT, K., SCHWINZER, R.
Inhibition von allogenen Immunantworten durch Modulatorzellen
mit Überexpression des humanen CD95-Liganden
6. Jahrestagung der Deutschen Transplantations-Gesellschaft
Köln, 27.-29. November 1997 (Vortrag)

DULAT, H.J., KYAS, U., BAARS, W., RÜTHER, U.,
WONIGEIT, K., SCHWINZER, R.,
A model system for the analysis of inducible expression of the
human CD95L
Current State and Perspectives of Organ Transplantation
-A Symposium dedicated to Rudolf Pichlmayr-
Hannover, 30.-31. März 1998 (Poster)

Lebenslauf

Name	<u>Holger Joachim Dulat</u>
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburt	16.07.1969 in Mönchengladbach
Einschulung	im Sommer 1976 in die Grundschule Wickrath/Mönchengladbach
Schulwechsel	seit dem Schuljahr 1980/81 Besuch des Gymnasiums an der Gartenstraße in Mönchengladbach/Rheydt
Schulabschluß	am 22.05.1989 Abschluß des Gymnasiums mit der Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Dienstpflicht	vom 01.06.1989 bis 30.10.1990 Zivildienst im Rettungsdienst der Berufsfeuerwehr Mönchengladbach
Studium	vom 01.10.1990 bis 30.03.1992 Grundstudium des Faches Biologie an der RWTH Aachen Diplomvorprüfung am 13.04.1992 vom 01.04.1992 bis 28.02.1996 Hauptstudium des Faches Biologie an der Universität Hannover
Diplom	Mündliche Diplomprüfungen im April 1995 in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Immunologie Diplomarbeit von 03.06.1995 bis 28.02.1996 in der Abteilung für Klinische Molekularpharmakologie an der Medizinischen Hochschule Hannover, Betreuung Prof. Dr. M. U. Martin
Dissertation	seit dem 15.04.1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Transplantationslabor der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover im Rahmen des SFB 265 mit dem Ziel der Promotion zum Dr. rer. nat. Betreuung PD Dr. Reinhard Schwinzer

Danksagung

An meine Eltern: Danke für alles

Herrn PD Dr. R. Schwinzer danke ich recht herzlich für die intensive theoretische und experimentelle Betreuung dieser Arbeit, die er mit hilfreichen Denkanstößen motivierend unterstützt hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft hat das Gelingen dieser Arbeit wesentlich gefördert.

Bei Herrn PD Dr. W. Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referats.

Des weiteren möchte ich Herrn Dr. K. Wonigeit für die Möglichkeit danken, diese inhaltlich und methodisch interessante Arbeit im Transplantationslabor der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie zu bearbeiten.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schwinzer, W. Baars, A. Brinkmann, L. Andresen, C. Pissin und C. Stöckmann für ihre all Unterstützung bei der praktischen Durchführung. Danke Euch!

Bei B. Bortfeldt, T. Ebensen, A. Kiefeld und Dr. U. Kyas aus dem Transplantationslabor, Dr. H. Wesche von Tularik Inc. (South San Francisco) und A. Garbe und Dr. M. Zierke aus dem Institut für Molekularpharmakologie möchte ich mich für Tips und Tricks, hilfreiche Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Probleme und Motivation bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. M. U. Martin aus dem Institut für Molekularpharmakologie zum einen für die freundliche Bereitstellung von Reagenzien und zum anderen für seine wissenschaftliche Begleitung.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Transplantationslabors möchte ich mich für die herzliche Atmosphäre bedanken, die das gemeinsame Arbeiten immer leicht machte. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Molekularpharmakologie. Sie haben mich in den drei Jahren nach meiner Diplomarbeit immer wieder als Gast empfangen.

Prof. Dr. J. Tschopp vom Institut für Biochemie der Universität Lausanne und PD Dr. M. Hoffmann aus dem Transplantationslabor danke ich für die Bereitstellung der cDNA des CD95L. Prof. Dr. U. Rüter vom Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Universität Düsseldorf danke ich für den Expressionsvektor mit Mx-Promotor

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Mara Bönitz für die intensive Unterstützung während dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereich 265.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die dem Fachbereich Biochemie der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Modulation von allogenen Immunantworten durch das CD95/CD95L System“

im Transplantationslabor der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von PD Dr. R. Schwinger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 06.05.1999
