

Mechanisms of CD95-Clustering

Summary

In this thesis I characterized the clustering of the CD95 receptor and its mechanism.

Previous biochemical studies have shown the formation of SDS-stable aggregates with a weight of 45 to 200 kDa after induction of the receptor. Additionally, signaling protein oligomerization transduction structures (SPOTS) were observed after induction by imaging of a GFP-fusion of the receptor. Most of these studies were performed in so-called type I cells, that signal apoptosis via the extrinsic pathway. Moreover, the mechanisms of clustering were studied. Notably, receptor localization in lipid rafts and aggregation through the death domains of the receptor were shown to be essential for the clustering and apoptosis signaling. However, a consistent model combining all mechanisms is still lacking.

In this work I studied all these proposed clustering mechanisms by imaging CD95-GFP in the HeLa cell line using fluorescence confocal live cell microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). After induction with a trimerized form of the ligand (ILZ-sCD95L) I observed the formation of receptor aggregates. By quantitative image analysis, and using a GFP-calibration, I estimated that the majority of aggregates contain few receptors, with a mode of seven. This number corresponds to a weight simi-

lar to that of the SDS-stable aggregates observed in type I cells and indicates that these aggregates may correspond.

As the image analysis depends on the detection of spots over a certain threshold intensity, I measured the clustering by dynamics observation using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), since this technique constitutes a generally more robust and population-based measurement. I observed a drop in the diffusion coefficient after ligand induction, which confirms the receptor clustering previously observed by dot formation analysis. Both methods allow for a quantification of the clustering effect, making them suitable tools for the investigation of the different clustering mechanisms proposed. To study these mechanisms, two mutants were expressed in HeLa cells knocked down for the endogenous receptor. One of the mutants lacked the palmitoylation site which was shown to be responsible for the localization in lipid rafts, and the other one lacked the death domain, which is possibly crucial for clustering of the receptor. Upon induction, both mutants showed the same dot formation and drop in diffusion as the wild type receptor. This supports a crosslinking of the ligand as the only clustering mechanism in this cell type.

Furthermore, the size of the clusters as well as the death-inducing function were found to be dependent on the receptor concentration before induction.

Various models have been proposed for the oligomerization of the receptor before induction. Structural data of CD95 is still lacking, but studies on mutants of the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) have shown that the receptor is aggregated before induction via a pre-ligand assembly domain (PLAD). However, previous work did not include a study of the concentration dependence of pre-ligand assembly and most studies were performed with biochemical methods in overexpression.

Therefore, I characterized the receptor distribution before induction at physiological expression levels by imaging the plasma membrane of single cells. The receptor appeared as a dotted pattern on the plasma membrane. Dot segmentation using an image analysis tool implemented in our department allowed to quantify the dots.

The number of observed receptor dots depends not only on receptor clustering. Due to the resolution limits of confocal microscopy, receptors randomly located close to each other cannot be distinguished in the image. Therefore, I performed a simulation of the randomness of receptor location and the microscope features, such as limits of resolution and noise. Through a comparison of simulated images and experimental data, I could show that at physiological expression levels, an eminent part of the receptors is present as mono- or dimers at the plasma membrane. This is in contrast to the common assumption of a receptor trimer in the literature.

However, imaging of and the discrimination between a monomeric and a dimeric receptor scenario was still limited by the resolution. Therefore, in collaboration with the group of Stefan Hell, the receptor was imaged using stimulated emission depletion microscopy (STED). Again, by simulation of the microscopy features, a comparison of simulated images with experimental images could be performed. The comparison showed that on HeLa cells, the receptor is not constitutively monomeric at the plasma membrane. However in knockdown conditions the receptor appeared as monomeric. Therefore, I propose a model where the receptor is a dimer or higher oligomer at physiological expression levels and disassembles into monomers at very low concentrations. Upon induction, the trimeric ligand induces further clustering through the multivalency of the ligand and the receptor.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit habe ich das Clustern des CD95-Rezeptors und die dazu führenden Mechanismen charakterisiert.

In bisherigen Studien wurde mit biochemischen Methoden gezeigt, dass sich nach Induktion durch den Liganden SDS-resistente Aggregate von 45 bis 200 kDa bilden. In anderen Experimenten wurden an einem fluorophor-gekoppelten Rezeptor per Mikroskopie Rezeptoraggregate beobachtet, die ihrem Namen nach wesentlich für die Signalweitergabe sind (signaling protein oligomerization transduction structures - SPOTS). Die meisten dieser Untersuchungen wurden in sogenannten Typ-I-Zellen ausgeführt, die den extrinsischen Apoptosesignalweg nutzen. Desweiteren wurden Mechanismen aufgezeigt, die zur Aggregation führen. So spielen die Verlagerung des Rezeptors in cholesterinreiche Membrandomänen, sogenannte Lipid Rafts, und ein Zusammenlagern des Rezeptors über die sogenannte Death Domain eine wesentliche Rolle bei der Aggregation und der Weitergabe des Apoptosesignals. Trotzdem liegt noch kein einheitliches Modell vor, das alle diese Mechanismen für verschiedene Zelltypen vereinigt.

In dieser Arbeit habe ich diese Mechanismen der Cluster-Bildung in lebenden Zellen an einem GFP-Rezeptorkonstrukt in der Zelllinie HeLa mit Konfokalmikroskopie und Diffusionsmessungen unter Benutzung einer Bleichtechnik (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP) untersucht. Diese Zelllinie des Typ II wurde nach Induktion des Liganden zeitaufgelöst mikroskopiert und somit wurde die Aggregatbildung beobachtet. Durch eine Intensitätskalibration konnte berechnet werden, dass die meisten aggregierten Punkte ungefähr sieben fluoreszenzierende Moleküle enthalten. Diese Zahl entspricht einem Gewicht in der Größenordnung der bereits biochemisch in Zellen des Typ I beobachteten SDS-resistenten Aggregate.

Da die Bildanalysetechnik auf der präzisen Detektion einzelner Punkte basiert, wurde das Clustern zusätzlich mit einer Messung der Diffusionskoeffizienten untersucht, welche eine robustere Methode zur Messung aller Moleküle der Population darstellt. Dabei konnte ein deutlicher Abfall des Diffusionskoeffizienten nach Induktion durch den Liganden gemessen werden, was das Rezeptor-Clustern bestätigt, das bereits vermittels Mikroskopie beobachtet wurde, bestätigt.

Beide Methoden, die Diffusionsmessung und die Bildauswertung der Aggregate, sind quantitative Methoden und eignen sich daher zum Vergleich verschiedener Bedingungen und somit zur Untersuchung der Cluster-Mechanismen. Dazu wurden zwei Rezeptorkonstrukte in HeLa exprimiert, eines, das keine Death Domain hat, und ein weiteres am Cystein 199 mutiertes, das nicht palmitoyliert und somit nicht in die Lipid Rafts verlagert werden kann. Nach Induktion konnte mit beiden Mutanten die gleiche Aggregation und das gleiche Abfallen des Diffusionskoeffizienten beobachtet werden wie vorher beim Wild-Typ- Rezeptor. Dies weist darauf hin, dass die Vernetzung durch den Liganden der einzige relevante Aggregationsmechanismus in diesen Zellen ist.

Desweiteren zeigte sich eine Abhängigkeit der Clustergröße und der Rezeptorfunktion von der Konzentration. In Ermangelung von Proteinstrukturdaten, wurden durch Vergleich mit anderen TNF-Rezeptoren Modellbeschreibungen für den Oligomerisationszustand des Rezeptors vor Induktion aufgestellt. Studien an den Rezeptormutanten der Autoimmunkrankheit ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome) zeigen, dass der Rezeptor schon vor Induktion durch den Liganden über die sogenannte Pre-Ligand-Assembly-Domain (PLAD) multimerisiert. Allerdings basierten bisherige Studien meist auf qualitativen biochemischen Methoden und untersuchten auch keine Konzentrationsabhängigkeit des Oligomerisationszustands.

Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Rezeptorverteilung an der Zellmembran einzelner Zellen ohne Induktion bei physiologischen Rezeptorkonzentrationen charakterisiert. Der Rezeptor erscheint als ein Punktmuster auf der Membran. Bildsegmentierung, die auf einem Programm von S. Wörz in unserer Abteilung basiert, ermöglichte eine Quantifizierung dieser Punkte. Die sichtbare Punktzahl wird durch die Auf-

lösungsstärke des Bildes eingeschränkt. Daher wurden in dieser Arbeit sowohl die Mikroskop-Eigenschaften, wie Auflösung und Rauschen, als auch die zufällige Verteilung der Rezeptoren in künstlichen Bildern simuliert. Ein Vergleich dieser Bilder mit den Daten der Experimente zeigte, dass in diesen Zellen bei physiologischer Konzentration die Rezeptoren zu einem großen Teil als Monomere und Dimere vorliegen, konträr zu dem sehr gängigen Modell von Rezeptotrimeren.

Zwischen reinen Monomeren, Dimeren oder einer Mischung ist aufgrund der durch das Abbe-Gesetz begrenzten Auflösung nicht zu unterscheiden. Daher habe ich CD95 Rezeptoren in Kollaboration mit Matthias Reuss in der Abteilung Optische Nanoskopie (von Prof. Stefan Hell) mit der hochauflösenden Technik STED (Stimulated Emission Depletion) mikroskopiert. In gleicher Weise wie zuvor wurden wieder künstliche Bilder in Simulationen erstellt und mit dem Experiment verglichen. Dadurch konnte bestätigt werden, dass der Rezeptor auf HeLa-Zellen nicht ausschließlich monomerisch vorliegt, sondern größere Oligomere bildet. In Zellen, bei denen die Rezeptorexpression unterdrückt wurde, konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor monomerisch vorliegt.

Daher schlage ich ein Modell vor, in dem CD95 bei physiologischen Konzentrationen vor der Induktion als Dimere oder höhere Multimere vorliegt und bei niedrigen Konzentrationen in Monomere zerfällt. Bei Induktion erzeugt der Ligand ein Clustern sowohl durch die Multivalenz des Liganden als auch die des Rezeptors.