

INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Sven Baumann  
aus Mannheim  
Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Molekulare Mechanismen der Regulation des  
Aktivierungs-Induzierten Zelltods (AICD) in  
peripheren T-Zellen**

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Krammer  
Dr. Ingrid Haas

Die vorliegende Arbeit wurde am Forschungsschwerpunkt Tumorimmunologie – Abteilung Immungenetik – des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg von August 1999 bis Dezember 2002 in der Abteilung von Prof. Dr. Peter H. Krammer durchgeführt.

Die Betreuung an der Universität Heidelberg erfolgte durch Dr. Ingrid G. Haas (Biochemie-Zentrum Heidelberg (BZH), jetzt MPI für Immunbiologie, Freiburg).

Zunächst einmal möchte ich meinen Eltern dafür danken, daß sie mich auf meinem Weg immer unterstützt und gefördert haben. Sehr dankbar bin ich auch Simone Stößer, die mir stets tatkräftig im Labor geholfen hat und auch außerhalb des Labors das Leben versüßt. Zu tiefem Dank verpflichtet bin ich Kerstin Florin, die mir seit über 12 Jahren in allen Situationen unterstützend zur Seite steht. Danken möchte ich auch Leo Gürtler und Peer Kruse für viele anregende Gespräche.

Für eine sehr intensive Betreuung danke ich Dr. Sabine Kirchhoff und Prof. Dr. Peter H. Krammer. Für die Übernahme der Betreuung durch die Universität Heidelberg danke ich Dr. Ingrid Haas.

Zudem bin ich Prof. Dr. Günther Schütz und seinen Mitarbeitern für eine sehr erfolgreiche Kooperation dankbar. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Wolfgang Schmid, Myriam Grüner, Dr. Anton Bauer und Ralf Klären. Für eine produktive Kooperation danke ich auch Prof. Dr. Peter Angel und seiner Abteilung, besonders Dr. Jochen Heß, Dr. Bettina Hartenstein und Dr. Hanna Bierbaum.

Dankbar bin ich auch für die schöne Arbeitsatmosphäre innerhalb der T-Zell-Gruppe. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Andreas Krueger, Steffi Fas, Dr. Min Li-Weber, Dr. Rüdiger Arnold und Cornelius Fritsch für anregende Diskussionen.

Für exzellente technische Hilfe, Ratschläge und eine schöne Zeit im Labor danke ich Pola Linzmayer, Sascha Wey, Christine Stumpf, Kathrin Kappes, Wolfgang Müller, Monika Walker und Marco Giaisi.

Auch danke ich den zahllosen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders erwähnt sei auch Dr. Henning Schulze-Bergkamen, durch dessen Hände unzählige Liter Blut flossen.

In Gedenken an Juan

„Wenn eine Erkenntnis frisch in uns aufsteigt, ist sie unwiderlegbar; wenn sie aber alt wird, verliert sie ihre Kraft, denn Gott bewegt sich unaufhaltsam vorwärts.“

Sri Aurobindo

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose spielt bei der Ontogenese und Homöostase mehrzelliger Organismen eine bedeutende Rolle. CD95 ist einer von bislang sechs identifizierten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können. CD95-vermittelte Apoptose ist unter anderem von entscheidender Bedeutung bei der Homöostase des Immunsystems. Fehlregulationen im CD95-System tragen zur Entstehung von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei.

CD95 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Die Expression des CD95-Liganden (CD95L) ist jedoch auf wenige Zellen beschränkt, wie z.B. aktivierte T-Zellen, Makrophagen und Zellen der immunprivilegierten Gewebe, und wird streng reguliert. Der CD95L ist nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert, er wird aber nach Stimulation des T-Zell-Rezeptor-(TCR)/CD3-Komplexes durch Antigen stark hochreguliert. Naïve T-Lymphozyten werden durch Stimulation des TCR aktiviert, was eine spezifische Immunantwort auslöst. Im Gegensatz dazu führt in zuvor aktivierten T-Zellen dasselbe Signal zu Aktivierungs-induziertem Zelltod (engl.: activation-induced cell death, AICD). *In vitro* führt die Reaktivierung von T-Zellen zur Expression von CD95L, mit der Konsequenz, daß benachbarte CD95-positive Zellen eliminiert werden, oder die T-Zellen Suizid begehen. AICD ist ein wichtiger Mechanismus, um die Anzahl der reaktiven T-Zellen zu reduzieren und die Immunreaktion zu beenden.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine kritische Rolle des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1, bestehend aus FosB und c-Jun, während des AICD primärer humaner T-Zellen gezeigt. Es konnte eine AP-1 Bindung an eine Sequenz im 5' UTR des humanen CD95L-Promotors nach TCR/CD3-Stimulation nachgewiesen werden. Mutationen in dieser FosB/c-Jun Bindestelle oder Expression von dominant-negativen Jun-Mutanten reduziert TCR/CD3-vermittelte Induktion der CD95L-Expression, und damit folglich den AICD.

Der molekulare Mechanismus der anti-apoptotischen Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) in peripheren T-Zellen wird kontrovers diskutiert. Die Signalübertragung durch den GR ist komplex und umfaßt unterschiedliche Signalwege, u.a. direkte Transaktivierung/Repression von Genen, Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und indirekte Gen-Regulation durch Induktion von Transkriptionsregulatoren. Die vorliegende Studie zeigt erstmals eine funktionelle Rolle für die direkte DNA-Bindung des GR an den CD95L-Promotor und einer daraus resultierenden Inhibition des AICD. Unter Verwendung von konditional GR-defizienten Mäusen und GR-Mutanten konnte in primären T-Zellen eine direkte transkriptionelle Regulation des CD95L-Gens durch den Glucocorticoid-Rezeptor demonstriert werden. Die reduzierte CD95L-Expression könnte somit zur entzündungshemmenden Funktion bei der Glucocorticoid-Therapie beitragen.

Bei einer typischen Primärantwort ist die weitreichende Eliminierung der Effektor T-Zellen am Ende der Immunreaktion unvollständig. Ein kleiner Anteil der T-Zellen überlebt und differenziert zu Gedächtniszellen. Der Mechanismus ist bisher unklar, durch welchen einige T-Zellen dem AICD entkommen. Um dies im humanen System zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Modell für Gedächtnis T-Zellen entwickelt, in dem Langzeit-Kulturen primärer humaner T-Zellen verwendet wurden. Gedächtnis T-Zellen sind trotz deutlicher CD95-Oberflächen-Expression resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose, was ihnen das Überleben während der Deletionsphase einer Immunreaktion sichert. Überraschenderweise sterben Gedächtnis T-Zellen jedoch nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors über einen alternativen, CD95-unabhängigen AICD-Mechanismus. Dabei bestimmt möglicherweise die Intensität des TCR-Signals, ob es zur Initiation einer sekundären Immunantwort oder zur Induktion von Apoptose kommt.

Stichworte: Aktivierungs-induzierter Zelltod / Gedächtnis T-Zellen / Glucocorticoid-Rezeptor / Transkriptionsfaktoren

## **2 INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Mechanismen der Apoptose.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Signaltransduktion der CD95-vermittelten Apoptose.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Biologische Funktion des CD95/CD95L-Systems .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4</b>	<b>Die T-Zell-Immunantwort und der Aktivierungs-induzierte Zelltod .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Regulation der Expression des CD95-Liganden in T-Zellen .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Gedächtnis T-Zellen .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Glucocorticoide .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8</b>	<b>Die Rolle des Glucocorticoid-Rezeptors in T-Lymphozyten.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9</b>	<b>Wissenschaftliche Fragestellungen.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Chemikalien .....	42
4.1.2	Häufig verwendete Puffer .....	42
4.1.3	Biologisches Material .....	45
4.1.3.1	Bakterienstämme .....	45
4.1.3.2	Eukaryontische Zellen .....	45
4.1.3.3	Mäuse.....	46
4.1.4	Nährmedien.....	46
4.1.4.1	Medien für die Zellkultur.....	46
4.1.4.2	Medien für Bakterien.....	47

4.1.5	Antikörper.....	47
4.1.6	Molekularbiologisches Material.....	51
4.1.6.1	Vektoren.....	51
4.1.6.2	Enzyme und Kits.....	51
4.1.6.3	Molekulargewichtsmarker.....	52
4.1.6.4	Membranen und Filter.....	52
4.1.6.5	Oligonukleotide und Primer.....	52
4.1.7	Geräte.....	53
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Zellkultur.....	55
4.2.1.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	55
4.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	56
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	56
4.2.2.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	56
4.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	56
4.2.2.3	Isolierung genomischer DNA.....	57
4.2.2.4	RNA-Isolierung und Reverse Transkription (RT).....	57
4.2.2.5	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	58
4.2.2.6	Restriktionsspaltung von DNA.....	59
4.2.2.7	Phosphatase-Reaktion.....	60
4.2.2.8	analytische Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	60
4.2.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel.....	60
4.2.2.10	Ligation von DNA.....	61
4.2.2.11	Transformation von Bakterien.....	61
4.2.2.12	Isolierung von Kernproteinen.....	61
4.2.2.13	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	61
4.2.2.14	Radioaktive Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden.....	62
4.2.2.15	Gelshift und Supershift Assay (EMSA).....	62
4.2.3	Zellbiologische Methoden.....	62
4.2.3.1	Präparation primärer humaner T-Zellen.....	62
4.2.3.2	Präparation primärer muriner T-Zellen und Thymozyten.....	63
4.2.3.3	Magnetisches Sortieren von primären T-Zellen.....	64
4.2.3.4	Fluoreszenzmarkierung von Zellen mit CFSE.....	64
4.2.3.5	FACScan-Analyse von Oberflächenmolekülen.....	64
4.2.3.6	Intrazelluläre FACScan-Analyse.....	65
4.2.3.7	Messung apoptotischer Zellen.....	65
4.2.3.8	[ <sup>3</sup> H]-dThymidin-Einbau test.....	66
4.2.3.9	Transiente Transfektion von T-Zelllinien.....	67
4.2.3.10	Transiente Transfektion von primären humanen T-Zellen.....	67
4.2.3.11	Gewinnung von LZ-CD95L.....	67
4.2.3.12	Radioaktives Markieren von Zellen.....	68

4.2.3.13	Luziferase Bestimmung .....	68
4.2.3.14	Intravenöse SEB-Injektion und Dexamethason-Behandlung von Mäusen.....	68
4.2.4	Proteinchemische Methoden.....	69
4.2.4.1	<i>In vitro</i> Translation von Protein.....	69
4.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	69
4.2.4.3	Western Blot .....	69
4.2.4.4	Immunpräzipitation.....	70
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>Eine neuartige Funktion für FosB in der Regulation des Aktivierungs-induzierten Zelltods primärer T-Zellen.....</b>	<b>71</b>
5.1.1	Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie sind am AICD beteiligt.....	71
5.1.2	c-Jun steuert zur Induktion des CD95L durch TCR/CD3-Stimulation bei.	73
5.1.3	c-Jun und FosB binden nach TCR/CD3-Stimulation an die AP-1 Bindestelle im CD95L 5' UTR.....	75
5.1.4	Die AP-1 Bindestelle im 5' UTR ist massgeblich an der Induktion des CD95L-Promotors nach TCR/CD3-Stimulation beteiligt .....	80
<b>5.2</b>	<b>Der Molekulare Mechanismus der anti-apoptotischen Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors im Aktivierungs-induzierten Zelltod .....</b>	<b>83</b>
5.2.1	Beschreibung der verwendeten Maus-Mutanten .....	83
5.2.2	Normale T-Lymphozyten-Entwicklung in konditional GR-defizienten Mäusen.....	84
5.2.3	Unveränderte Proliferation und Aktivierung von GR-defizienten T-Zellen .....	86
5.2.4	Untersuchungen zum AICD in GR-defizienten peripheren T-Zellen.....	88
5.2.5	Glucocorticoide inhibieren den Aktivierungs-induzierten Zelltod .....	89
5.2.6	Bindung an ein GRE ist für den Anti-apoptotischen Effekt von Dexamethason notwendig.....	96
5.2.7	Der Anti-apoptotische Effekt von Dexamethason ist unabhängig von Protein-Neusynthese .....	98
5.2.8	Der inhibitorische Effekt wird nicht über Beeinträchtigung des TCR-Signals vermittelt .....	99
5.2.9	Ein <i>in vivo</i> Modell zum AICD .....	100
<b>5.3</b>	<b>Mechanismus der Apoptose-Resistenz humaner Gedächtnis T-Zellen .....</b>	<b>103</b>
5.3.1	T-Zell-Deletion während des AICD ist unvollständig.....	104
5.3.2	Langzeit-kultivierte T-Zellen weisen phänotypische Merkmale von Gedächtnis T-Zellen auf .....	106
5.3.3	Gedächtnis T-Zellen sind trotz CD95-Expression resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose.....	107

---

5.3.4	Ein alternativer, CD95-unabhängiger Mechanismus des AICD in Gedächtnis T-Zellen .....	110
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>112</b>
6.1	Eine kritische Rolle für FosB im CD95-vermittelten Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) primärer T-Zellen.....	112
6.2	Die Inhibition des Aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD) durch Glucocorticoid-Hormone wird über eine direkte Transrepression des CD95L-Gens durch den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt.....	115
6.3	Mechanismen der Apoptose-Resistenz humaner Gedächtnis T-Zellen .....	124
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>156</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN .....</b>	<b>160</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>163</b>
<b>12</b>	<b>ERKLÄRUNGEN .....</b>	<b>165</b>

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 MECHANISMEN DER APOPTOSE

Apoptose, auch Programmierter Zelltod genannt, läuft in einer geordneten Reihenfolge morphologisch unterscheidbarer Phasen ab. Apoptose kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert werden, so z.B. durch UV- oder  $\gamma$ -Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika, sowie durch Stimulation sogenannter Todesrezeptoren. Apoptotische Zellen separieren sich zunächst von ihren benachbarten Zellen und zeigen eine charakteristische Kondensierung des Chromatins und des Zytoplasmas. Die DNA wird in oligonukleosomale Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon gespalten (Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie *et al.*, 1984). Apoptose wird begleitet von Membraninversion, Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, Schrumpfen und Abschnürungen der Plasmamembran (Zeiose), Bildung von Apoptotischen Körperchen, welche kondensierte Organellen und Chromatinfragmente enthalten. Apoptotische Körperchen werden von Phagozyten verschlungen (Krammer, 1999), so daß ihr Inhalt nicht in die Umgebung entlassen wird. Im Gegensatz zur Nekrose wird somit im umgebenden Gewebe keine Entzündungsreaktion hervorgerufen. *In vivo* werden apoptotische Zellen schnell durch Phagozytose beseitigt (Hengartner, 2001).

Zelltod durch Nekrose tritt normalerweise nach Gewebsverletzung auf und ist morphologisch durch irreversible osmotische Veränderungen gekennzeichnet, welche mit Anschwellen und unkontrollierter Lyse der Zellen einhergehen (Wyllie, 1997). Aufgrund der Zerstörung der Zellmembran wird der Zellinhalt freigesetzt und kann im umliegenden Gewebe Entzündungsreaktionen hervorrufen. Während der Nekrose kondensiert der Zellkern nicht, DNA-Fragmentierung ist nicht regelmäßig und wird durch andere Enzyme induziert als während der Apoptose (Dong *et al.*, 1997).

Apoptose ist zur Aufrechterhaltung der Homeostase von Geweben notwendig. Sie spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, insbesondere während der Entwicklung und im Immunsystem (Krammer, 1999; Vaux and Korsmeyer, 1999). Viele Krankheiten sind mit entweder erhöhter oder verminderter Apoptose assoziiert, so z.B. AIDS, Krebs und Autoimmunerkrankungen (Krammer, 1999).

Die wachsende Subfamilie der Todesrezeptoren gehört zu der TNF/NGF (**tumor necrosis factor/nerve growth factor**)-Rezeptor-Superfamilie. Charakteristisch für diese Superfamilie ist das Vorhandensein von zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die Todesrezeptoren, welche differenziell glykosylierte Typ-I Transmembranproteine sind, zeichnen sich durch eine intrazelluläre Todesdomäne (engl.: **death domain**, DD) aus. Diese ist zur Transduktion des Todessignals notwendig. Sechs Mitglieder dieser Subfamilie sind bis jetzt im humanen System bekannt, nämlich

TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) und DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1999; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Unter diesen ist CD95 der am besten untersuchte Rezeptor (Krammer, 1999; Schmitz *et al.*, 2000).

Todesrezeptoren werden durch ihre natürlichen Liganden aktiviert. Die Liganden haben sich parallel zu ihren Rezeptoren als eine Todes-Liganden-Familie, die TNF-Familie, entwickelt. Mit Ausnahme von LT $\alpha$  sind die Todesliganden Typ-II Transmembranproteine, von denen eine lösliche Form durch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen generiert werden kann. Einige Studien haben zytotoxische Aktivität des löslichen CD95 Liganden (CD95L) gezeigt (Krammer, 1999), wohingegen andere darauf hinweisen, daß die Zytotoxizität nicht signifikant ist, oder der lösliche CD95L gar Apoptose inhibiert (Schneider *et al.*, 1998; Suda *et al.*, 1997). Dies mag auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein, da beschrieben wurde, daß der humane lösliche Ligand in einigen CD95-exprimierenden Zellen effizient Apoptose auslöst (Suda *et al.*, 1997), nicht jedoch der murine lösliche CD95L (Suda *et al.*, 1996). Kürzlich wurde gezeigt, daß Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, mit löslichem CD95L interagieren und dabei seine pro-apoptotische Aktivität verstärken (Aoki *et al.*, 2001). Die Rolle des löslichen und des membrangebundenen CD95L *in vivo* bleibt genauer zu untersuchen.

Caspasen sind eine wachsende Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen, die für die Ausführung der Apoptose essentiell sind (Alnemri *et al.*, 1996). Bisher sind 12 humane Caspasen bekannt (Nicholson, 1999). Sie werden als Proenzyme (Zymogene) synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Das aktive Enzym ist ein heterotetramerer Komplex aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (Nicholson, 1999). Aktivierung von Caspasen wurde für eine Reihe von apoptotischen Stimuli berichtet, einschließlich der Signaltransduktion durch Todesrezeptoren (Krammer, 1999).

Eine wichtige Familie von Apoptose-regulierenden Proteinen ist die Bcl-2-Familie, deren Namensgeber das Onkogen *bcl-2* ist, welches als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist (Tsujimoto *et al.*, 1985). Mitglieder der Bcl-2-Familie werden in pro- (z.B. Bax, Bak) und anti-apoptotische (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) unterteilt (Gross *et al.*, 1999a; Vander Heiden and Thompson, 1999). Obgleich der Einfluß von Bcl-2 Proteinen auf Apoptose völlig offensichtlich ist, ist der biologische Mechanismus ihrer Funktion unklar. Das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wurde als entscheidend für das Schicksal der Zelle diskutiert (Gross *et al.*, 1999a). Einige besitzen eine Transmembrandomäne (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bak, Bax), welche die Proteine in intrazelluläre Membranen integrieren läßt, so z.B. in die Membran der Mitochondrien. Es wurde gezeigt, daß Bcl-2 Familienmitglieder die Öffnung sogenannter *permeability transition pore* (PT pore) inhibieren können (Aritomi *et al.*, 1997; Sattler *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1998). Jedoch ist die Verbindung zwischen PT pore, Verlust des mitochondrialen

Transmembranpotentials und Freisetzung apoptogener Faktoren, wie z.B. Cytochrom *c*, aus den Mitochondrien kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, daß tBid, die Caspasen-aktivierte Form des pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieds Bid (Huang and Strasser, 2000), die Homooligomerisierung der pro-apoptotischen Mitglieder Bak und Bax vermittelt, was zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* führt (Wei *et al.*, 2001). In gesunden Zellen ist Bax im Zytosol lokalisiert und ist als Monomer schwach mit den Mitochondrien assoziiert. Nach Induktion der Apoptose assoziiert Bax mit den Mitochondrien und integriert in die mitochondriale Membran. Bcl-2 verhindert die Bax-Oligomerisierung und die Insertion in die Membran (Antonsson *et al.*, 2001). Der Effekt von Bcl-2 auf CD95-induzierte Apoptose ist abhängig vom Zelltyp, wie im nächsten Kapitel diskutiert wird.

### 3.2 SIGNALTRANSDUKTION DER CD95-VERMITTELTEN APOPTOSE

Stimulation von CD95 durch agonistische Antikörper oder CD95L führt zur Bildung eines Multiproteinkomplexes von Proteinen, den man Tod-induzierenden-Signal-Komplex (engl.: **death inducing signaling complex**, DISC) nennt. Nach Stimulation wird das Serin-phosphorylierte Adaptermolekül FADD/Mort-1 (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995) zu oligomerisiertem, höchst wahrscheinlich trimerisiertem CD95-Rezeptor rekrutiert. In einem nächsten Schritt werden zusätzliche Moleküle in den DISC rekrutiert: Zwei Isoformen von Caspase-8, Caspase-8/a (FLICE/Mach- $\alpha$ 1/Mch5 $\beta$ ) und Caspase-8/b (Mach- $\alpha$ 2) (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996), Caspase-10 und CAP-3, ein Molekül, das die N-terminale DED-Domäne (siehe unten) von Caspase-8 enthält und einen bisher nicht charakterisierten C-Terminus (Kischkel *et al.*, 1995).

Die Stöchiometrie der Proteine des DISC ist ungeklärt, jedoch ist die Notwendigkeit ihrer Interaktion nachgewiesen. Ligandenbindung und Oligomerisierung von CD95 verändert die Konformation der intrazellulären DD, und ermöglicht es durch homophile Interaktionen den Adapter FADD/Mort-1 durch seine DD zu binden. Zusätzlich zur DD besitzt FADD eine N-terminale Todeseffektordomäne (engl.: **death effector domain**, DED), durch welche es Caspase-8/a, -8/b und CAP-3 bindet. Procaspase-8 wird im DISC in drei aufeinanderfolgenden Schritten gespalten, was zur Bildung von aktiver Caspase-8 führt, die aus zwei p10 und zwei p18 Untereinheiten besteht (Medema *et al.*, 1997). Die Prodomäne von Caspase-8 verbleibt am DISC, während die aktive Caspase-8 vom DISC dissoziiert und eine Kaskade von Caspasen induziert, welche die Exekutionsphase der Apoptose in Kraft setzt (Salvesen, 1999).

Es wurde berichtet, daß Todesrezeptoren vor ihrer Stimulation bereits über eine sogenannte *pre-ligand binding assembly domain* (PLAD) trimerisiert sind (Chan, 2000; Siegel *et al.*, 2000). In diesem Fall würde die Signalübertragung entweder durch eine Konformationsänderung trimerisierter Todesrezeptoren oder alternativ durch Bildung eines multimeren Komplexes nach Ligandenbindung herbeigeführt. Todesrezeptor-vermittelte Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Scaffidi *et al.*,

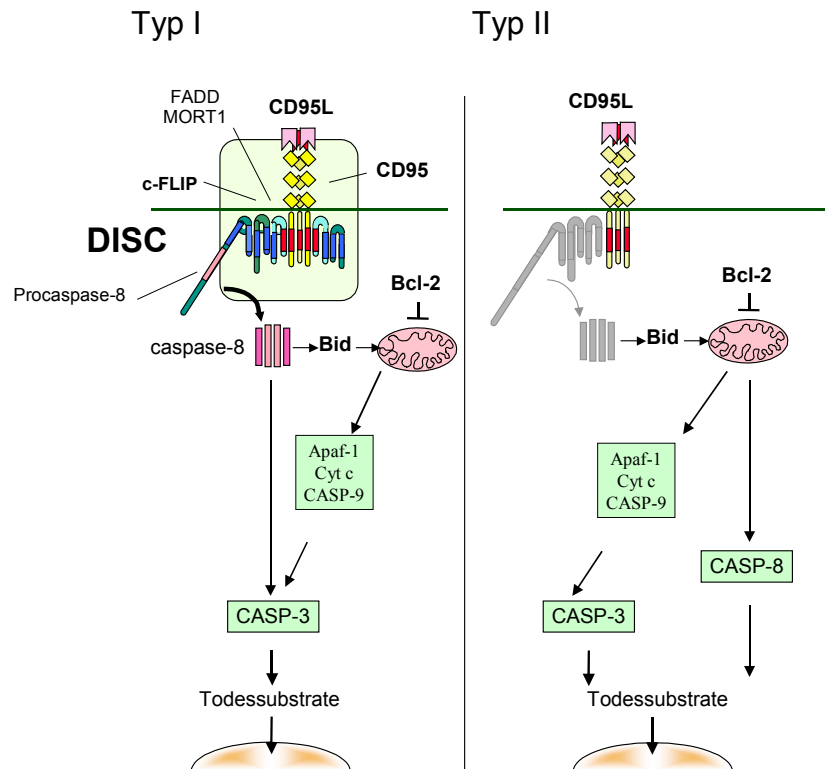
1999c). Zum Beispiel wurde gezeigt, daß der Glykosylierungszustand des CD95-Rezeptors den CD95-vermittelten Zelltod moduliert (Keppler *et al.*, 1999). Initiale Experimente zum murinen CD95 DISC unter Verwendung von 2D-Gelen zeigen auch für den CD95-Rezeptor der Maus unterschiedliche Glykosylierung (S. Baumann, unveröffentlichte Daten). Weiter kann Apoptose durch die Expression von Apoptosegenen auf der transkriptionellen Ebene moduliert werden. Zum Beispiel induziert der Tumorsuppressor p53 die CD95-Expression nach DNA-Schädigung (Muller *et al.*, 1998). Datenbankrecherche führte zur Identifizierung einer Familie von DED-enhaltenden Proteinen. Einige dieser Proteine gehören zur Klasse der  $\gamma$ -Herpes Viren wie Herpes Virus Saimiri (HVS), Humanes Herpes Virus 8 (HHV 8), ein Kaposi Sarcom assoziierter Herpes Virus und Moluscum Contagiosum Virus (MCV). Diese Proteine wurden viral FLICE-inhibitory proteins (v-FLIP) genannt. V-FILPs enthalten zwei DEDs. Sie binden den CD95 DISC und inhibieren dadurch die Aktivierung von Procaspase-8. V-FLIPs sind auch in der Lage, Apoptose zu inhibieren, die durch andere Todesrezeptoren induziert wurde (TNF-R1 and TRAIL-R1), was auf einen ähnlichen Signalübertragungsweg dieser Rezeptoren schließen läßt (Meinl *et al.*, 1998).

Das zelluläre Homolog zu v-FLIP wurde c-FLIP/FLAME-1/I-FLICE/Casper/CASH/MRIT/CLARP/Usurpin (Tschopp *et al.*, 1998) genannt. Mehrere Splicevarianten von c-FLIP mRNA wurden beschrieben, jedoch konnten bis jetzt nur zwei Formen von FLIP (c-FLIP<sub>S</sub> und c-FLIP<sub>L</sub>) auf Protein-Ebene gefunden werden (Scaffidi *et al.*, 1999b). Die lange Form c-FLIP<sub>L</sub> ist strukturell mit Caspase-8 verwandt, enthält aber ein enzymatisch inaktives Zentrum und interferiert mit der Bildung aktiver Caspase-8 Untereinheiten am Rezeptor. Die kurze Form ähnelt strukturell v-FLIP, enthält nur zwei DEDs und einen C-Terminus, der sich von Caspase-8 unterscheidet (Scaffidi *et al.*, 1999b).

Beim Vergleich unterschiedlich differenzierter Zellen und verschiedener Zell-Linien wurden im Hinblick auf die Signalübertragung nach CD95-Stimulation zwei Zelltypen identifiziert, CD95-Typ I und CD95-Typ II genannt (Abb. 1)(Scaffidi *et al.*, 1998). Der CD95-Typ II Signalweg ist abhängig von der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien, einem Prozeß, der bei vielen Apoptose-Signalwegen wichtig ist (Gross *et al.*, 1999a; Kroemer, 1997). Diese Erkenntnis klärt viele kontroverse Diskussionen auf, die um die Rolle der Mitochondrien während der CD95-vermittelten Apoptose geführt wurden. Es wird durch *in vitro* Studien mit primären T-Zellen (Scaffidi *et al.*, 1999c; Schmitz *et al.*, 1999) und durch *in vivo* Studien mit *knockout* Mäusen (Cecconi *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1998; Kuida *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1998) gestützt. In CD95-Typ I Zellen ist die Induktion der Apoptose von der Aktivierung großer Mengen an Caspase-8 am DISC begleitet. Diesem folgt eine rasche Spaltung von Caspase-3, noch vor dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ), was eine direkte Aktivierung der Caspasen-Kaskade vermuten läßt. Im Gegensatz dazu ist die DISC-Bildung in CD95-Typ II Zellen trotz ähnlicher CD95 Expression auf der Zelloberfläche schwach. Starke Aktivierung von Caspasen erfolgt erst nach Verlust von  $\Delta\psi_m$  (Scaffidi *et al.*, 1998). Daraus läßt sich

schließen, daß CD95-Typ II Zellen die Mitochondrien als Verstärker nutzen, um die Exekutionsphase der Caspasen-Kaskade einzuleiten. Die Aktivierung der Mitochondrien wird durch das pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bid vermittelt. Bid ist ein Substrat von Caspase-8. In CD95-Typ II Zellen spalten die geringen Mengen am DISC aktivierter Caspase-8 Bid. Gespaltenes Bid (tBid) transloziert zu den Mitochondrien und induziert den Verlust an  $\Delta\psi_m$  und die Freisetzung apoptogener Faktoren wie z.B. AIF (apoptosis inducing factor)(Susin *et al.*, 1996) und Cytochrom *c* (Gross *et al.*, 1999b; Liu *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998). Im Zytosol binden Cytochrom *c* und ATP das Cofaktorprotein Apaf-1, welches dann Procaspase-9 bindet (Zou *et al.*, 1997). In diesem Komplex, den man Apoptosom nennt, wird Procaspase-9 zum aktiven Enzym prozessiert und initiiert die Caspasen-Kaskade unterhalb der Mitochondrien (Zou *et al.*, 1999). Das Apoptosom wurde als Holoenzym beschrieben, wobei Caspase-9 die katalytische Untereinheit darstellt und Apaf-1 der allosterische Regulator (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

Es sollte erwähnt werden, daß die Mitochondrien nach CD95-Stimulation in CD95-Typ I und CD95-Typ II Zellen gleichermaßen in apoptotischer Weise aktiviert werden. In beiden Zelltypen wird die apoptogene Aktivität der Mitochondrien durch Bcl-2 Überexpression inhibiert. Jedoch nur in CD95-Typ II, nicht aber in CD95-Typ I Zellen blockiert Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder Caspase-8 und Caspase-3 Aktivierung, und damit Apoptose. Somit sind CD95-Typ II Zellen, nicht jedoch CD95-Typ I Zellen auf die apoptotische Aktivierung der Mitochondrien zu CD95-vermittelter Apoptose angewiesen (Schmitz *et al.*, 2000).



**Abbildung 1: Modell der zwei CD95-Signaltransduktionswege.** Schematische Darstellung der CD95-Signalwege in Typ I- und Typ II-Zellen. In Typ I-Zellen (links) führt CD95-Stimulation zu starker Caspase-8 Aktivierung direkt am DISC. Dies resultiert direkt in der Aktivierung weiterer Caspasen und damit in Apoptose. In Typ II-Zellen (rechts) hingegen führt eine schwache DISC-Bildung durch Spaltung von Bid zu einer apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien, was unterhalb der Mitochondrien in einer Spaltung von Caspase-8 und -3 resultiert. Deshalb inhibiert eine Blockierung der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien durch Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> nur in Typ II-Zellen die Apoptose nach CD95-Stimulation. Weitere Erläuterungen siehe Text.

### 3.3 BIOLOGISCHE FUNKTION DES CD95/CD95L-SYSTEMS

CD95 ist das am besten charakterisierte Mitglied der Todesrezeptor-Familie. Die Untersuchungen dieser Rezeptoren und deren Liganden unterstreichen die biologische Bedeutung dieses apoptotischen Systems innerhalb eines Organismus. In einem ausgereiften Organismus spielt Apoptose, induziert durch CD95, z.B. eine Rolle bei der Homeostase von Geweben. Alternde (seneszente) und beschädigte Zellen werden so

eliminiert. Darüber hinaus spielt Apoptose auch im Immunsystem eine entscheidende Rolle. Autoreaktive Zellen müssen beseitigt werden, um Autoimmunität zu verhindern. Am Ende einer Immunantwort wird die Zahl der aktivierten Lymphozyten reduziert, um die Immunhomöostase zu erhalten (Baumann *et al.*, 2002). Zusätzlich sind apoptotische Prozesse auch an der Immunüberwachung zur Entfernung von Tumorzellen involviert. Des Weiteren ist der CD95L für die außergewöhnliche Rolle im Immunsystem einiger Gewebe wie Hirn, Ovar, Testis, Uterus während der Schwangerschaft, Plazenta und Auge verantwortlich. Diese Gewebe sind von der normalen Immunantwort ausgenommen und werden daher als immunologisch privilegiert bezeichnet (Barker and Billingham, 1977). Innerhalb dieser Bereiche werden einwandernde Immunzellen durch Apoptose beseitigt, da die Zellen dieser Gewebe CD95L exprimieren. Nach Einbringen von Viren in die vordere Augenkammer von Mäusen infiltrieren Lymphozyten und Granulozyten diese Region. In diesen Zellen wird Apoptose ausgelöst, wahrscheinlich durch die CD95L-Expression auf den Epithelzellen (Griffith *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1996). Da das CD95/CD95L-System für immunprivilegierte Orte von Bedeutung ist, entstand die Idee, dieses System bei der Transplantation einzusetzen. Es ließ sich zeigen, daß die menschliche Cornea funktionellen CD95L exprimiert (Stuart *et al.*, 1997). Untersuchungen an Mäusen unterstützen die Hypothese, daß der CD95L das Molekül sein könnte, welches Cornea-Transplantate vor dem Immunsystem des Empfängers schützt. Andere Studien über die Beteiligung des CD95L bei der Akzeptanz von Spendergewebe sind weniger eindeutig und werden kontrovers diskutiert (Allison *et al.*, 1997; Bellgrau *et al.*, 1995; Lau *et al.*, 1996). Ein besseres Verständnis, wie diese privilegierten Orte ihren Status aufrecht erhalten, könnte zu Wegen führen, die Immunreaktion spezifisch zu unterdrücken.

Das Verständnis der biologischen Funktion des CD95/CD95L-Systems wurde durch die Beschreibung natürlicher Abberationen im CD95/CD95L-Systems gefördert. 1978 beschrieben Murphy und Rothes eine Mauslinie mit einem autosomal-rezessiven Gendefekt *lpr* (für **l**ympho**p**roliferation)(Andrews *et al.*, 1978). Bei Mäusen des Stamms MRL/MpJ führte diese Mutation zur starken Vergrößerung von Lymphknoten und Milz, die durch eine Akkumulation von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen hervorgerufen wurde. Die Entwicklung der Merkmale wurde dabei vom genetischen Hintergrund beeinflusst (Izui *et al.*, 1984). So entwickelten einige Mausstämme auch Autoimmunerkrankungen. Diese zeigen starke Ähnlichkeit mit den Symptomen, die beim humanen systemischen Lupus erythematoses (SLE) auftreten (Andrews *et al.*, 1978; Mysler *et al.*, 1994). Inzwischen ist bekannt, daß die *lpr*-Mutation auf den Einbau eines Retrotransposons im Gen für CD95 beruht, was zu einem veränderten mRNA-Transkripts führt. Dies hat eine stark verringerte Expression des Rezeptors zur Folge, so daß es zu einer erheblich verminderten Apoptose von aktivierten T-Zellen bei diesen Mäusen kommt (Adachi *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1993; Mariani *et al.*, 1994; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993).

Eine weitere Mutation *lpr*<sup>cg</sup> (für **l**ympho**p**roliferation-**c**omplementing **g**ld) ist allelisch mit *lpr* und führt zu sehr ähnlichen Symptomen (Matsuzawa *et al.*, 1990). Die

Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors von *lpr<sup>cg</sup>*-Mäusen ist nicht verändert (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992), jedoch ist eine Aminosäure innerhalb der DD von CD95 ausgetauscht (Ile<sub>262</sub> mit Asn<sub>262</sub>), was auf eine Punktmutation (T<sub>786</sub> nach A<sub>786</sub>) zurückzuführen ist. Diese Veränderung führt zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Später zeigte die CD95-defiziente Maus wesentlich stärkere Formen der Lymphadenopathie und Splenomegalie als die *lpr*-Maus (Adachi *et al.*, 1995). Dies ließ sich durch eine geringe Restaktivität des CD95/CD95L-Systems erklären. Zusätzlich konnte die Lymphoendopathie in der *lpr*-Maus durch Expression des CD95-Rezeptors als Transgen verhindert werden (Wu *et al.*, 1994). Damit wurde die Wichtigkeit von CD95 in der Apoptose von T-Lymphozyten bestätigt.

Die inaktivierende Punktmutation auf der Ligandenseite wird als *gld* (für **g**eneralized **l**ymphoproliferative **d**isease) bezeichnet. Doppelt-heterozygote (*lpr<sup>cg +/-</sup>*, *gld<sup>+/-</sup>*) Mäuse zeigten ähnliche Symptome, wie sie für die homozygoten *lpr<sup>-/-</sup>* Stämme beschrieben wurden (Roths *et al.*, 1984). Die *gld* Punktmutation führt zu einer Aminosäureveränderung (Phe<sub>272</sub> zu Leu<sub>272</sub>) im extrazellulären Bereich des CD95L (Lynch *et al.*, 1994; Ramsdell *et al.*, 1994). Diese Region in der Bindestelle des CD95L ist innerhalb der TNF-Familie hochkonserviert (Hahne *et al.*, 1995). Der Aminosäureaustausch führt zum Verlust der Zytotoxizität des CD95L (Lynch *et al.*, 1994; Ramsdell *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994).

Eine Reihe verschiedener muriner und humaner Tumoren, einschließlich vieler nicht-lymphoider Tumoren, zeigt eine konstitutive Expression von funktionellem CD95L (Hahne *et al.*, 1996; Niehans *et al.*, 1997; O'Connell *et al.*, 1996; Shiraki *et al.*, 1997; Strand and Galle, 1998; Strand *et al.*, 1996). So war z.B. ein CD95L-exprimierendes Melanom in der Lage, eine potente Antitumor-Immunität hervorzurufen, wenn das Wirtstier zugleich einen Defekt in der CD95-Expression hatte (Hahne *et al.*, 1996). Dies legt die Möglichkeit nahe, daß der Mechanismus, der für den Schutz des Gewebes vor einer Autoimmunerkrankung während einer Entzündungsreaktion oder während einer Abstoßung eines Transplantats auch von Tumoren benutzt werden kann, um der Immunüberwachung zu entgehen. Diese Deletion von tumor-reaktiven T-Lymphozyten durch CD95L-exprimierende Tumore wird als „tumor counterattack“ bezeichnet (Bennett *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1998). Allerdings wurden widersprüchliche Daten zu diesem Thema publiziert. So wurde über starke Entzündungsreaktionen, einschließlich einer Infiltration von Neutrophilen, durch CD95L-positive Tumore berichtet (Arai *et al.*, 1997). Injektion von syngen CD95L-positiven Tumorzellen in Mäuse führte so z.B. nicht zur Entwicklung von Tumoren (Igney *et al.*, 2000; Igney and Krammer, 2002), sondern zu einer starken Neutrophilen-vermittelten Immunantwort gegenüber den transplantierten Zellen (Seino *et al.*, 1997).

Zusätzlich ist bekannt, daß CD95L auch Gewebe schädigen kann. In Spender-gegenüber-Empfänger-Erkrankungen (engl.: graft versus host disease) trägt die Fähigkeit der Spender-Effektorzellen, funktionalen CD95L zu exprimieren, zum destruktiven Angriff bei (Baker and Reddy, 1996; Braun *et al.*, 1996). Anti-CD95-

Antikörper induzierten Apoptose in Hepatozyten *in vivo* (Ogasawara *et al.*, 1993), was zur Hypothese führte, daß die CD95L-induzierte Apoptose dieser Zellen zu einigen Formen von Hepatitis beiträgt (Galle *et al.*, 1995).

CD95L-induzierte Apoptose spielt auch eine Rolle in einigen Autoimmunerkrankungen. Normale Thyrozyten exprimieren konstitutiv funktionalen CD95L, aber normalerweise kein CD95. In Hashimoto-Thyroiditis-Patienten exprimieren die Thyrozyten CD95, was die Induktion von Apoptose in diesen Zellen zur Folge hat (Giordano *et al.*, 1997). Folglich führt bei Hashimoto-Thyroiditis die normalerweise schützende Funktion des CD95L auf Thyrozyten zur Zerstörung der Schilddrüse.

### 3.4 DIE T-ZELL-IMMUNANTWORT UND DER AKTIVIERUNGS-INDUZIERTE ZELLTOD

T-Lymphozyten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Frühe Vorläuferzellen wandern in den Thymus ein und entwickeln sich dort zu reifen T-Zellen (von Boehmer and Kisielow, 1993). Unreife T-Zellen, oder Thymozyten, durchlaufen unterschiedliche phänotypische Stadien, welche durch die Expression zahlreicher Oberflächen-Proteine unterscheidbar sind (Petrie *et al.*, 1990; Shortman and Wu, 1996). So exprimieren die Zellen zu Beginn weder CD4 noch CD8, sind in einer späteren Entwicklungsphase dagegen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Die T-Zell-Entwicklung beinhaltet somatische Rekombination der Antigen-Rezeptor-Gensegmente. Die Expression eines funktionellen T-Zell-Rezeptors (TCR) ist für das Überleben, die Reifung und die Selektion der T-Zellen essentiell. Die T-Zell-Selektion führt zu einem vielfältigen Repertoire von Antigen-Rezeptor-Spezifitäten.

Exprimieren T-Zellen ihren Antigen-Rezeptor auf der Zelloberfläche, durchlaufen sie eine negative und positive Selektion (Sebzda *et al.*, 1999). Die meisten der Thymozyten überleben diese Selektionsprozesse nicht (Baumann *et al.*, 2002; Strasser, 1995; von Boehmer *et al.*, 1999). Die Überlebenden Zellen reifen und differenzieren zu CD4<sup>+</sup>-Helfer T-Zellen oder CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen (Basson and Zamoyska, 2000). Schließlich treten sie in den Blutstrom ein und wandern in periphere lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten und Peyer's Patches), zwischen denen sie zirkulieren, bis sie auf Antigen treffen.

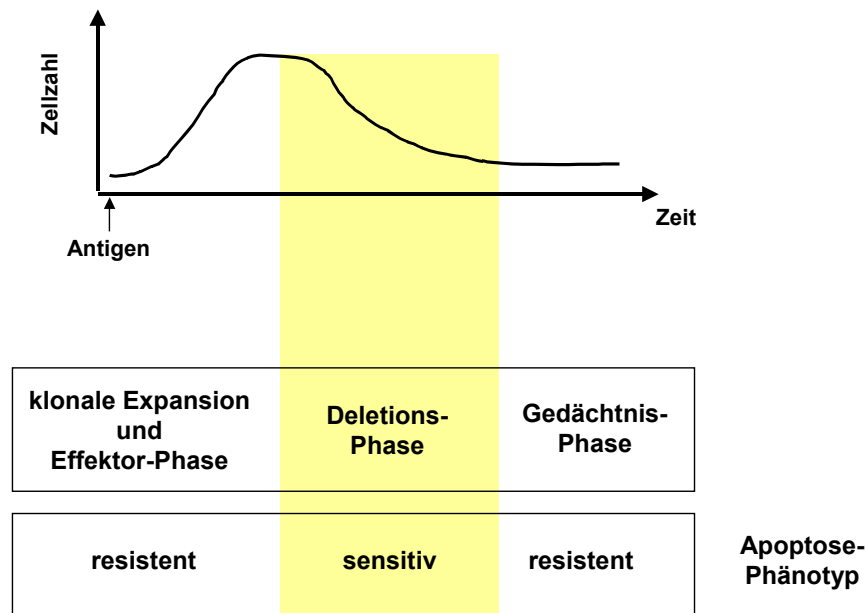
Da naïve T-Zellen Antigen nur in den T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe erkennen, ist die Einleitung der Immunantwort von dem Transport des Antigens vom Ort der Infektion in diese Zonen abhängig. Drei Zelltypen können als antigenpräsentierende Zellen fungieren: Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen. Unreife dendritische Zellen, die über den Körper verteilt sind, phagozytieren und prozessieren Antigen und wandern anschließend in die regionalen Lymphknoten ein, wobei sie dabei zu reifen dendritischen Zellen differenzieren (Liu *et al.*, 2001). Reife dendritische Zellen präsentieren Antigen als kurze Peptide, gebunden an MHC-Moleküle (engl.: **m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex), auf ihrer Zelloberfläche. Dabei

kann es sich um körpereigene oder fremde Proteine handeln, welche entweder von intrazellulären Parasiten (Viren), von internalisierten Mikroorganismen oder Toxinen stammen. MHC Klasse I Moleküle binden Peptide intrazellulärer Parasiten, die im Zytoplasma proliferieren, MHC Klasse II Moleküle dagegen Peptide extrazellulärer Parasiten und deren Produkte, welche internalisiert und in vesikulären Kompartimenten degradiert werden. Mit Peptid beladene MHC-Moleküle werden zur Zelloberfläche transportiert. Die differentielle Erkennung der MHC Moleküle durch den TCR wird durch die Corezeptoren CD4 auf T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ) und CD8 auf zytotoxischen T-Zellen ( $T_C$ ) unterstützt. MHC Klasse I Moleküle werden von zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen erkannt, welche die virusinfizierten Zellen bzw. Tumorzellen direkt zerstören.  $CD95L$ -positive zytotoxische T-Zellen töten dabei  $CD95$ -positive Zielzellen durch Auslösen von Apoptose. Alternativ permeabilisiert sezerniertes Perforin die Zellmembran, wodurch Granzyme in die Zelle gelangen können. Zusätzlich produzieren zytotoxische T-Lymphozyten Interferon-gamma ( $IFN-\gamma$ ), welches zum einen die virale Replikation hemmt und zum anderen Makrophagen aktiviert. MHC Klasse II Moleküle dagegen werden von  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen erkannt, welche B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und Makrophagen zur Zerstörung von intravesikulären Pathogenen anregen. MHC Klasse I Moleküle werden zur Erkennung von Tumorzellen und viraler Infektionen benötigt, und da nahezu jede Zelle von Viren infiziert werden kann, exprimieren alle kernhaltigen Zellen MHC Klasse I Moleküle, wobei sie auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs am stärksten exprimiert sind. MHC Klasse II Moleküle dagegen dienen der Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems. Ihre Expression ist auf Zellen limitiert, die der Aktivierung der Immunantwort dienen. Dies trifft sowohl auf B-Zellen und Makrophagen zu, die durch Effektor T-Zellen aktiviert werden, als auch auf professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC), welche die Immunantwort einleiten. Auch Stromazellen des Thymusepithels exprimieren MHC Klasse II Moleküle.

Näive T-Zellen reagieren nur dann auf ein präsentiertes Antigen, wenn dieselbe Zelle dem TCR das spezifische Antigen und gleichzeitig dem  $CD28$  Molekül den entsprechenden Liganden  $B7.1$  ( $CD80$ ) oder  $B7.2$  ( $CD86$ ) als costimulierenden Faktor präsentiert. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu ihrer Proliferation und zur Differenzierung ihrer Nachkommen zu Effektorzellen. Diese Vorgänge sind von der Produktion von Zytokinen wie Interleukin-2 ( $IL-2$ ) und deren Bindung an einen hochaffinen Rezeptor auf der aktivierten T-Zelle abhängig. Weil Pathogene sich oft sehr schnell replizieren, hat die klonale Expansion naïver T-Zellen und deren Differenzierung zu Effektorzellen schnell und effizient zu sein und muß fortgesetzt werden, bis das Pathogen eliminiert ist, was bei einer typischen Virusinfektion etwa 7 – 10 Tage dauert. T-Zellen können bis zu sieben Zellteilungen durchlaufen, nachdem sie stimuliert wurden (van Stipdonk *et al.*, 2001).

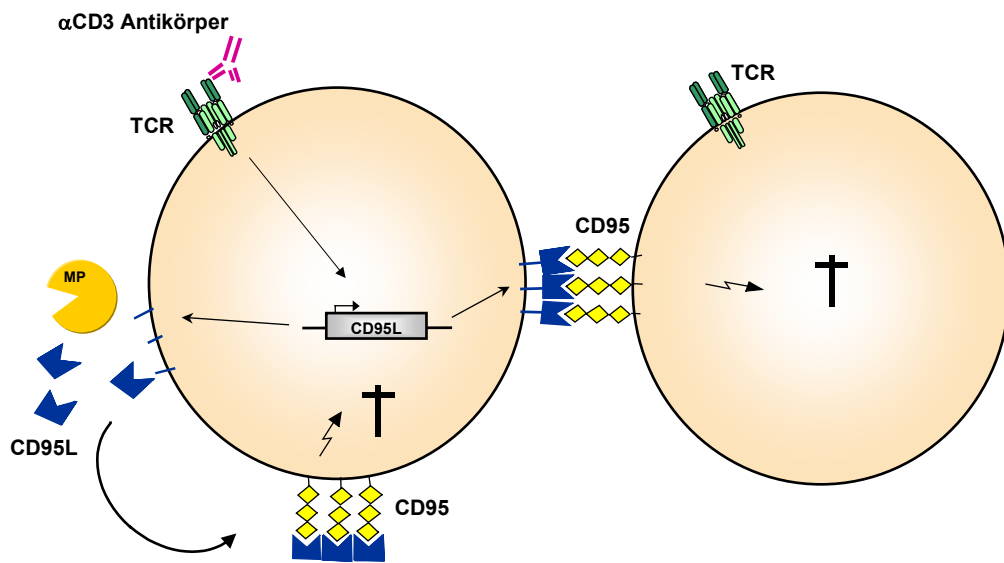
Näive T-Lymphozyten werden durch Stimulation des TCR aktiviert, was eine spezifische Immunantwort auslöst. Im Gegensatz dazu wird in zuvor aktivierten T-Zellen auf dasselbe Signal Aktivierungs-induzierter Zelltod (engl.: activation-induced

cell death, AICD) ausgelöst (Dhein *et al.*, 1995; Klas *et al.*, 1993; Nagata, 1997; Radvanyi *et al.*, 1993; Singer and Abbas, 1994). AICD ist ein wichtiger Mechanismus, um die Anzahl der reaktiven T-Zellen zu reduzieren und die Immunreaktion zu beenden (Freitas and Rocha, 1999; Krammer, 2000). Dies kann am Beispiel einer Infektion gezeigt werden: Wenn der Körper von der Infektion befreit ist, werden die während der Immunantwort generierten Effektorzellen überflüssig. Daher wird die große Mehrzahl der aktivierten T-Zellen am Ende der Immunreaktion durch AICD eliminiert. Dieser Prozeß kann auch als eine zweite Verteidigungslinie bei Autoimmunität wirken, indem durch ihn die autoreaktiven Zellen in der Peripherie deletiert werden. Die Sensitivität peripherer T-Zellen gegenüber AICD hängt vom Aktivierungszustand ab (Abb. 2). Die Entscheidung zwischen der proliferativen und der suizidalen Antwort der Zellen ist streng reguliert und beruht auf der Notwendigkeit zum Auslösen einer Immunreaktion oder zur Reduktion der aktivierten T-Zellen, die ihre Aufgabe erfüllt haben. Frisch aktivierte T-Zellen sind gegenüber Induktion von Apoptose über Stimulation des TCR resistent. Während dieser Initiationsphase werden die Gene für IL-2 und seinen hoch affinen Rezeptor (IL-2R  $\alpha$ -Kette/CD25) induziert. T-Zellen in der IL-2-abhängigen klonalen Expansions- und Effektorphase sind nicht, oder kaum, sensitiv gegenüber AICD durch TCR-Stimulation (Green *et al.*, 1992; Lenardo, 1991; Noel *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1991). Apoptose wird vermieden, um die Entwicklung einer schützenden Immunreaktion zu gestatten. Der anfänglichen Resistenz folgt eine Apoptose-sensitive Phase nach Kultivierung der Zellen mit IL-2 (Boehme and Lenardo, 1993; Peter and Krammer, 1999; Russell *et al.*, 1991; Scaffidi *et al.*, 1999a). Sobald T-Zellen proliferieren, werden sie empfänglich für Apoptose (Lissy *et al.*, 1998; Radvanyi *et al.*, 1996; Zhu and Anasetti, 1995);(Fournel *et al.*, 1996; Gonzalo *et al.*, 1994).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer T-Zell-Immunantwort.** Nach Erkennen des Antigens proliferieren Antigen-spezifische T-Zellen und differenzieren zu Effektorzellen. Nach Beseitigung des Antigens sterben T-Zellen über einen Mechanismus, den man Aktivierungs-induzierten Zelltod (engl.: activation induced cell death, AICD) nennt. Nur in dieser Deletionsphase sind T-Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Nur wenige Zellen überleben den AICD und differenzieren zu Gedächtniszellen.

Die Eliminierung von T-Zellen nach TCR-Stimulation kann über zwei verschiedene Signalwege erfolgen. Der Hauptweg von AICD wird durch das CD95 System vermittelt (Abb. 3), da der Zelltod fast vollständig durch Reagenzien verhindert werden kann, welche die CD95/CD95L-Interaktion verhindern (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995). Jedoch ist in Gegenwart dieser Reagenzien immer noch Zelltod beobachtbar, ein Hinweis darauf, daß es einen CD95-unabhängigen Weg geben muß (Dhein *et al.*, 1995). *In vitro* führt die Reaktivierung von T-Zellen zur Expression von CD95L und ermöglicht den Zellen, benachbarte CD95-positive Zellen zu eliminieren oder Suizid zu begehen (Janssen *et al.*, 2000; Kabelitz and Janssen, 1997; Klas *et al.*, 1993; Singer and Abbas, 1994). Die meisten Effektor-T-Zellen sterben innerhalb von etwa fünf Tagen, nur ein kleiner Anteil überlebt, um zu langzeit-überlebenden funktionellen Gedächtniszellen zu werden (Sprent and Miller, 1976).



**Abbildung 3: Modell für Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD).** Restimulation von primären T-Zellen über deren T-Zell-Rezeptor (engl.: T cell receptor, TCR) führt zur Induktion des CD95 Liganden (CD95L). Über den CD95-Rezeptor wird damit Apoptose durch Fratrizid oder Suizid eingeleitet. Matrix-Metalloproteasen (MP), welche den CD95L spalten, können eine lösliche Form von CD95L erzeugen, was zur Induktion der Apoptose in einer autokrinen oder parakrinen Weise führt.

Stimulations-induzierte und passive Formen der Apoptose unterliegen unterschiedlichen molekularen Mechanismen (Lenardo *et al.*, 1999). AICD benötigt die Induktion der Expression von Todesliganden, wie CD95L, durch TCR-Stimulation und wird unvollständig durch Bcl-2 inhibiert (Alderson *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1996; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1993; Russell and Wang, 1993; Takahashi *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu tritt passive Apoptose bei Zellen auf, die nicht ausreichend durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden (death by neglect) (Nelson and Willerford, 1998). Passive T-Zell-Apoptose benötigt funktionelle Protein-Synthese und wird durch verschiedene T-Zellen-Wachstumsfaktoren (Zytokine) wie z.B. IL-2, IL-4, IL-7 und IL-15 verhindert. Passive T-Zell-Apoptose wird stark durch Expression von Bcl-2 und verwandten Molekülen gehemmt, was darauf hinweist, daß der mitochondriale Signalweg der Apoptose beteiligt sein könnte. Bei passiver Apoptose sind keine Todesrezeptoren involviert, Grundlage ist eher die direkte zytoplasmische Aktivierung von Caspasen, eventuell als Ergebnis von Mitochondrien-Schädigung (Hildeman *et al.*, 1999; Hildeman *et al.*, 2002a; Hildeman *et al.*, 2002b; Kluck *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1997).

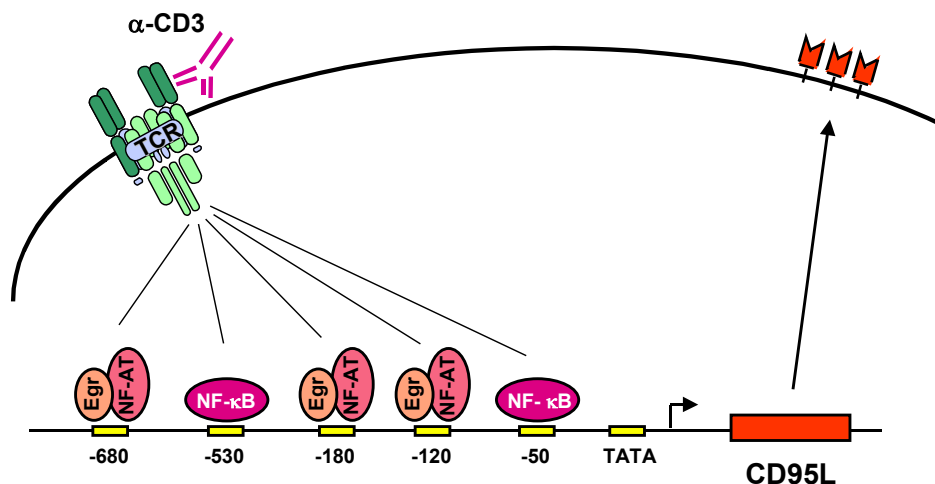
CD95-defiziente T-Zellen zeigen eine deutliche Reduktion der TCR-induzierten Apoptose, verbleibende Apoptose wird durch TNF-Inhibition blockiert (Tucek-Szabo *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1995). Obwohl kein offensichtlicher T-Zell-Phänotyp in TNF- oder TNF-R-defizienten Mäusen festgestellt werden konnte, kann TCR-induzierte Deletion peripherer T-Zellen *in vivo* und *in vitro* durch Blockierung des TNF-Systems reduziert werden (Alexander-Miller *et al.*, 1996; Marino *et al.*, 1997; Sarin *et al.*, 1995; Speiser *et al.*, 1996; Sytwu *et al.*, 1996). Während das CD95/CD95L-System bei der Anfangsphase des AICD wichtig zu sein scheint, scheint das TNF-R1/TNF- $\alpha$  System in der späteren Phase seine Rolle zu haben (Medema *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1996). Es wurde weiterhin berichtet, daß das CD95/CD95L-System hauptsächlich die Induktion der Apoptose in CD4<sup>+</sup> Helfer-Zellen, und das TNF-R1/TNF- $\alpha$  System hingegen in CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen vermittelt (Zheng *et al.*, 1995). Da T-Zellen in der Deletionsphase CD95-Typ-I sind (siehe Kapitel 3.2), spielen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> keine Rolle in der Regulation des AICD, was sich auch an der unveränderten Deletion in Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub> transgenen Mäusen zeigt (Petschner *et al.*, 1998; Razvi *et al.*, 1995; Strasser *et al.*, 1995).

### 3.5 REGULATION DER EXPRESSION DES CD95-LIGANDEN IN T-ZELLEN

CD95 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Die Expression des CD95-Liganden (CD95L) ist jedoch auf wenige Zellen beschränkt, wie z.B. aktivierte T-Zellen, Makrophagen und Zellen der immunprivilegierten Gewebe in Auge und Testis, und wird streng reguliert. Der CD95L wird nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert, wird aber nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes durch Antigen oder Reagenzien, welche das Antigen-Signal simulieren (anti-CD3-Antikörper bzw. PMA/Ionomycin), stark hochreguliert. Die ersten Signale nach TCR/CD3-Stimulation bestehen in der aufeinanderfolgenden Aktivierung von Tyrosin-Kinasen, u.a. Lck und ZAP-70. TCR-Stimulation führt initial zu einer Tyrosin-Phosphorylierung zytoplasmatischer Bereiche des TCR und des CD3-Komplexes, und zu einer Signaltransduktionskette, welche Phospholipase C (PLC)- $\gamma$ 1 (Siegel *et al.*, 1991), p21<sup>ras</sup>/RAF Kinase (Izquierdo Pastor *et al.*, 1995) und Phosphatidylinositol 3'-OH Kinase (PI3-K)/GDP-Rac-Signalweg (Cantrell *et al.*, 1998) umfaßt. PLC- $\gamma$ 1 Aktivierung resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Protein-Kinase C Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, daß ZAP-70 und Lck in der Induktion der CD95L-Expression während AICD involviert sind (Eischen *et al.*, 1997; Gonzalez-Garcia *et al.*, 1997). Sowohl Lck als auch ZAP-70 sind für Calcium-Mobilisierung in T-Zellen notwendig. Eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt zur Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>- und Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin und damit zur Aktivierung Calcineurin-abhängiger Transkriptionsfaktoren. ZAP-70 ist auch bei der Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) beteiligt. Die  $\theta$  Isoform von PKC wurde als essentiell bei der TCR/CD3-vermittelten T-Zell-Aktivierung beschrieben und spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Induktion des CD95L (Villalba *et al.*, 1999; Villunger *et al.*, 1999). Die Aktivierung von PKC bzw. die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung kann pharmakologisch durch PMA

(phorbol myristate acetate) und Ionomycin simuliert werden. Aktivierung von T-Zellen durch TCR/CD3-Stimulation führt auch zur Stimulation einer Ras-aktivierten Kaskade von Kinasen, wie z.B. Raf, MEK (MAPK-Kinase), ERK (extracellular signal-related kinase) und p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase). Der Ras-Signalübertragungsweg ist für optimale CD95L-Induktion essentiell (Hsu *et al.*, 1999; Latinis *et al.*, 1997).

Der CD95L-Promotor ist komplex und umfaßt Bindestellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. In Jurkat T-Zellen wurde nach TCR/CD3-Stimulation die Bindung von NF-AT (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Li-Weber *et al.*, 1998; Norian *et al.*, 1998), NF- $\kappa$ B (Kasibhatla *et al.*, 1999; Li-Weber *et al.*, 2000), Egr (early growth response protein) (Li-Weber *et al.*, 1999; Mittelstadt and Ashwell, 1998; Mittelstadt and Ashwell, 1999), IRF-1 (interferon regulatory factor-1) (Kirchhoff *et al.*, 2002) und IRF-2 (Chow *et al.*, 2000) an den CD95L-Promotor gezeigt (Abb. 4)(Li-Weber and Krammer, 2002).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des CD95L-Promotors.** T-Zell-Aktivierung durch Stimulation des multimeren TCR/CD3-Komplexes resultiert in einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege, welche zu Phosphorylierung oder Dephosphorylierung zytoplasmatischer Zielproteine führt. Dies bewirkt die Aktivierung und den nukleären Transport zahlreicher Transkriptionsfaktoren, wie NF-AT, NF- $\kappa$ B und Egr-1, welche durch Bindung an ihre Bindesequenzen im CD95L-Promotor zur Induktion der CD95L-Expression führen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die transkriptionelle Aktivierung des CD95L-Gens in T-Zellen erfolgt sehr rasch. CD95L-mRNA ist schon eine Stunde nach TCR/CD3-Stimulation zu detektieren und

erreicht ein Maximum nach etwa 4 Stunden (Li-Weber *et al.*, 2002b). Als Model für CD95-vermittelten AICD (Dhein *et al.*, 1995) und zur Untersuchung der *cis*-regulatorischen Regionen des humanen CD95L-Promotors wurden hauptsächlich Jurkat T-Zellen verwendet. Wie viele andere Gene steht das CD95L-Gen unter der Kontrolle einer großen Anzahl *cis*-regulatorischer Promotor-Elemente, welche zusammen die Feinregulation der transkriptionellen Aktivität des Gens gewährleisten.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß zusätzlich zu den oben beschriebenen Faktoren auch Mitglieder der Jun, Fos und ATF Proteine, die den Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein-1) bilden, an der Induktion des CD95L beteiligt sind. Der dimere Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1, der durch zahlreiche externe und interne Signale induziert wird, ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, so z.B. Proliferation, Differenzierung, Transformation, Tod und Überleben von Zellen. AP-1 ist ein Dimer aus den basischen Leuzin-Zipper (bZIP) Proteinen der Jun- (c-Jun, JunB, JunD), Fos- (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) und ATF-Subfamilien (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2), die das 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) response element (TRE, *consensus*: 5'-TGAG/CTCA-3') erkennen (Shaulian and Karin, 2002). Während die Fos-Proteine nur mit Mitgliedern der Jun-Familie über die carboxy-terminale Leuzin-Zipper Domäne heterodimerisieren können, können die Jun-Proteine homodimerisieren und mit Fos-Mitgliedern heterodimerisieren, um transkriptionell aktive Komplexe zu bilden (Angel and Karin, 1991). Auch einige Mitglieder der CREB-Familie (CREB, CREM und ATF-1) von Transkriptionsfaktoren können mit AP-1 Proteinen dimerisieren (Shaulian *et al.*, 2000). Unter Verwendung von *knockout*-Strategien konnte gezeigt werden, daß einige Komponenten, wie c-Fos, FosB und JunD für die Embryonalentwicklung entbehrlich sind, wohingegen andere, wie c-Jun, JunB und Fra-1 essentiell sind (Jochum *et al.*, 2001).

Direkte Hinweise auf die pro-apoptotische Funktion von AP-1 Transkriptionsfaktoren stammen aus transienten Überexpressionsexperimenten, in denen c-Fos und c-Jun in zahlreichen Zelllinien Apoptose induzieren konnten (Bossy-Wetzel *et al.*, 1997; Ham *et al.*, 1995; Preston *et al.*, 1996). Antisense-Oligonukleotide gegen *c-fos* und *c-jun* mRNA gerichtet erhöhen die Überlebensrate lymphoider Zellen, denen Wachstumsfaktoren entzogen wurden (Colotta *et al.*, 1992). Gleichermaßen kann die Inhibition der Aktivität von c-Jun durch Expression einer dominant-negativen c-Jun-Mutante neuronale Zellen vor Apoptose schützen (Whitfield *et al.*, 2001). Für AP-1 wurde erstmals eine Funktion in der Apoptose aufgrund der Beobachtung vermutet, daß *c-jun* und *c-fos* mRNAs schnell und transient in lymphoiden Zellen nach Entzug der Wachstumsfaktoren induziert wurden (Colotta *et al.*, 1992). Eine c-Jun-abhängige Induktion des CD95L wurde in mehreren experimentellen Systemen gezeigt (Eichhorst *et al.*, 2000; Shaulian and Karin, 2001). c-Jun<sup>-/-</sup> Fibroblasten sind resistent gegenüber den apoptotischen Effekten alkylirender Reagenzien, welche durch Induktion des CD95L vermittelt werden (Kolbus *et al.*, 2000). Während JunB pro-apoptotische und JunD anti-apoptotische Funktion zugeschrieben wurden (Passegue and Wagner, 2000;

Weitzman *et al.*, 2000), wurden für FosB *in vitro* und *in vivo* beide Funktionen beschrieben (Hafezi *et al.*, 1997; Ivanov *et al.*, 1997).

Die erhöhte *de novo* Synthese und Aktivierung neu synthetisierter oder vorhandener Proteine der AP-1 Familie durch Phosphorylierung ist für die Induktion zahlreicher Mechanismen zur Apoptose-Stimulation notwendig. JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase)-vermittelte Phosphorylierung von c-Jun ist für c-Jun-induzierte Apoptose essentiell. Expression von c-Jun, welches in der JNK-Phospho-Akzeptor-Stelle mutiert ist (c-Jun<sup>Ala63/73</sup>), kann Apoptose inhibieren (Niculescu *et al.*, 1999). JNKs werden nach TCR/CD3-Stimulation aktiviert, was zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von c-Jun führt (Su *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde beschrieben, daß p38 MAPK und JNK nach TCR/CD3-Stimulation im murinen System an der Induktion der CD95L-Expression beteiligt sind (Faris *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Unterstützt werden diese Daten durch die Beobachtung, daß die Phosphorylierung von c-Jun durch MEKK und JNK Kinasen nach genotoxischem Streß in humanen und murinen Zellen die CD95L-Expression induziert (Chang and Karin, 2001; Eichhorst *et al.*, 2000; Kasibhatla *et al.*, 1998; Kolbus *et al.*, 2000).

JNK1<sup>-/-</sup> JNK2<sup>-/-</sup> Mäuse weisen im Gehirn Regionen mit erhöhter und Regionen mit reduzierter Apoptose auf (Kuan *et al.*, 1999; Sabapathy *et al.*, 1999). *In vitro* Studien demonstrieren, daß JNK-Aktivierung nicht für TNF-induzierte Apoptose notwendig ist (Liu *et al.*, 1996). Weitere Experimente lassen vermuten, daß JNK Kinase 1 (SEK1) eine protektive Rolle bei CD95-induzierter Apoptose spielt (Nishina *et al.*, 1997) und daß TNF-induzierte JNK-Aktivierung anti-apoptotische Funktion hat (Natoli *et al.*, 1997). Somit ist das Resultat der AP-1 Aktivierung offensichtlich Zelltyp-spezifisch und hängt von post-translationalen Modifikation und der Gegenwart interagierender Faktoren ab. Es gibt Hinweise darauf, daß c-Jun und c-Fos die Hauptregulatoren der CD95L-Expression nach genotoxischem Streß sind (Eichhorst *et al.*, 2000; Kasibhatla *et al.*, 1998), jedoch ist die funktionelle Rolle und Zusammensetzung des AP-1 Dimers bei der CD95L-Induktion des Aktivierungs-induzierten Zelltods bisher unbekannt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei aktivierungs-induzierter CD95L-Expression in T-Zellen zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Jeder dieser Faktoren ist für eine vollständige Induktion nach TCR/CD3-Stimulation essentiell, so daß das Fehlen eines einzigen Transkriptionsfaktors zu einer deutlichen Reduktion der CD95L-Induktion führt, da die kooperative Wirkungsweise der Faktoren auf den Promoter nicht mehr gegeben ist.

### 3.6 GEDÄCHTNIS T-ZELLEN

Immunreaktionen enden normalerweise in immunologischem Gedächtnis in Form von persistierenden Gedächtnis T-Zellen. Die Existenz dieser Zellen erlaubt eine schnelle und starke Reaktion auf eine erneute Exposition mit dem Antigen (Sprent and Surh, 2002). Das Immungedächtnis wird durch antigen-spezifische T- und B-Zellen vermittelt

and bleibt oft ein Leben lang erhalten. Bei einer typischen Primärantwort ist die weitreichende Eliminierung der Effektor-T-Zellen am Ende der Immunreaktion unvollständig, so daß ein kleiner Anteil der T-Zellen überlebt und zu Gedächtnis- (engl.: memory) Zellen differenziert. Im Gegensatz zu B-Zellen gibt es keine Hinweise darauf, daß somatische Hypermutation während der Differenzierung naiver T-Zellen zu Gedächtnis T-Zellen beteiligt ist. Gedächtnis T-Zellen, die aus Vorläuferzellen stammen und unter polarisierenden Bedingungen zu Th1 und Th2 Effektorzellen *in vitro* stimuliert wurden, behalten ihre Polarität *in vivo* über längere Zeit hinweg (Dutton *et al.*, 1998). Gleichermaßen ist die Zytokin-Expression primärer Effektorzellen und Gedächtnis-Zellen sehr ähnlich. Solche Ergebnisse lassen auf einen größtenteils stochastischen Prozeß der Selektion von Th1- und Th2-Effektorzellen in Hinblick auf Tod oder Überleben schließen. Bis vor kurzem wurde spekuliert, daß Gedächtnis T-Zellen eine Subpopulation von Zellen repräsentieren könnten, die während der primären Immunantwort nicht in der Lage waren, zu Effektorzellen zu differenzieren. Diese Möglichkeit erscheint mittlerweile unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, daß die Vorläufer der Gedächtnis T-Zellen während der primären Antwort umfassende Proliferation durchlaufen und, zumindest zeitweise, Effektorfunktionen ausüben (Opferman *et al.*, 1999). Als ein alternativer Weg wurde vorgeschlagen, daß Gedächtnis T-Zellen von Vorläuferzellen abstammen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt der Immunantwort in Kontakt mit dem Antigen treten (z.B. wegen langsameren Einwanderns in die Lymphknoten von anderen Orten im Körper aus) (Kaech *et al.*, 2002). Diese Zellen mögen zwar proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren, jedoch könnte es sein, daß die Sensitivierung gegenüber Apoptose aufgrund eines kürzeren Kontakts mit Antigen unvollständig oder reversibel ist, und ihnen damit ein Überleben und die Differenzierung zu Gedächtnis T-Zellen ermöglicht (Sprent and Tough, 2001).

Obwohl Gedächtnis T-Zellen als Population nahezu lebenslang zu überleben scheinen, weisen sie eine erhebliche Heterogenität auf, was die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern, Gewebsverteilung und Aktivierungsstatus betrifft. Im Allgemeinen exprimieren Gedächtnis Zellen andere Marker als naive T-Zellen oder Effektorzellen. Jedoch scheinen einige Marker, die gelegentlich als Marker für Gedächtnis T-Zellen verwendet werden, wie z.B. niedrige Level an CD62L und CD45RA, nicht eindeutig (Rogers *et al.*, 2000). Derzeit gilt eine hohe Expression von CD44 als der verlässlichste Marker im murinen System für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, zumindest in Kombination mit geringer Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 (IL-2R  $\alpha$ -Kette) oder CD69. Anhand der Expression von Adhäsionsmolekülen (*homing* Rezeptoren) wie CD62L und CCR7 unterscheidet man zentrale Gedächtniszellen (engl.: central memory) und Effektor-Gedächtniszellen (engl.: effector memory). Zentrale Gedächtniszellen, die wie naive T-Zellen CCR7/CD62L-positiv sind, findet man im sekundären lymphatischen Gewebe, z.B. den Lymphknoten, wohingegen CCR7/CD62L-negative Effektor-Gedächtniszellen sich wie aktivierte T-Zellen im Blut und der Milz aufhalten und größtenteils von den Lymphknoten ausgeschlossen sind

(Sallusto *et al.*, 1999). Zentrale Gedächtniszellen weisen eine niedrigere Proliferation im Gegensatz zu Effektor-Gedächtniszellen auf. Die Beziehung zwischen zentralen und Effektor-Gedächtnis T-Zellen ist nicht eindeutig geklärt, jedoch ist es wahrscheinlich, daß aktivierte Effektor-Gedächtniszellen aus durch Zytokine oder geringe Mengen an Antigen stimulierten zentralen Gedächtniszellen entstehen (Lanzavecchia and Sallusto, 2000).

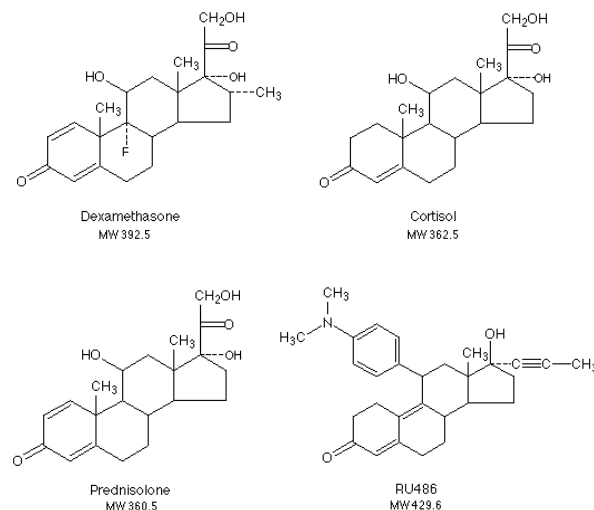
Der Hauptgrund für die erheblich stärkere sekundäre Immunantwort im Gegensatz zur primären ist die erhöhte Anzahl an antigen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zu antigen-spezifischen naiven T-Zellen. Zusätzlich wurde jedoch gezeigt, daß einzelne Gedächtnis T-Zellen reaktiver gegenüber Antigen sind als naive T-Zellen, was für eine Kombination aus quantitativen und qualitativen Ursachen für das immunologische Gedächtnis spricht (Rogers *et al.*, 2000).

Die absolute Anzahl von Gedächtnis T-Zellen bleibt über das gesamte Leben hinweg relativ konstant, ein Argument für eine strikte Regulation der Homeostase (Ge *et al.*, 2002). Vermutlich spiegelt dieses Gleichgewicht eine Balance zwischen lebenserhaltenden und pro-apoptotischen Signalen wieder (Hawkins and Vaux, 1997). Als anti-apoptotisches Signal wurden Zytokine diskutiert, vor allem IL-15 für CD8<sup>+</sup> Zellen. Es wurde gezeigt, daß Bcl-2 *in vitro* durch  $\gamma$ c-kontrollierte Zytokine (IL-2, -4, -7, -9, -15) hochreguliert wird, besonders durch IL-15 in CD8<sup>+</sup> Zellen (Zhang *et al.*, 2002), wohingegen Bcl-x<sub>L</sub> Hochregulation durch andere Zytokine bewirkt wird, z.B. Typ-I Interferone (Pilling *et al.*, 1999). *Ex vivo* Experimente zeigen eine hohe Expression von Bcl-2 in CD8<sup>+</sup> Gedächtnis Zellen (Grayson *et al.*, 2000) und relativ hohe Level an Bcl-x<sub>L</sub> in CD4<sup>+</sup> Gedächtnis Zellen (Garcia *et al.*, 1999). Es ist jedoch zu bedenken, daß CD4<sup>+</sup> Gedächtnis Zellen aus  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> Vorläuferzellen generiert werden können, was dafür spricht, daß  $\gamma$ c-kontrollierte Zytokine nicht wichtig sind (Nakajima *et al.*, 1997). Es handelt sich zudem bei aktivierten T-Zellen um CD95-Typ-I Zellen, was bedeutet, daß die Induktion der Apoptose über CD95 im Rahmen des Aktivierungs-induzierten Zelltods unabhängig vom mitochondrialen Signalweg, und damit nicht inhibierbar durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, ist (siehe Einleitung weiter oben).

### 3.7 GLUCOCORTICOIDE

Glucocorticoide (GC)(Cortisol im Menschen und Corticosteron in der Maus) werden, wie auch die anderen vier Hauptklassen an Steroidhormonen – Progesteron, Androgene, Östrogene und Mineralocorticoide – aus dem Vorläufer Cholesterol gebildet. Die Synthese findet in der Nebennierenrinde statt und wird durch die Aktivität der HPA-Achse (engl.: *hypothalamo-pituitary-axis*) kontrolliert. Die HPA-Achse ist ein organübergreifendes homöostatisches System, das die Gluconeogenese, angeborene und adaptive Immunität und Entzündungsreaktionen kontrolliert. Der Hypothalamus sekretiert die *Releasing*-Hormon Vasopressin (AVP) und *corticotropin releasing factor* (CRF) unter der Kontrolle des Hippocampus und der Amygdala. Diese Neuropeptide stimulieren die Adenohypophyse zur Synthese und zur Freisetzung des tropischen

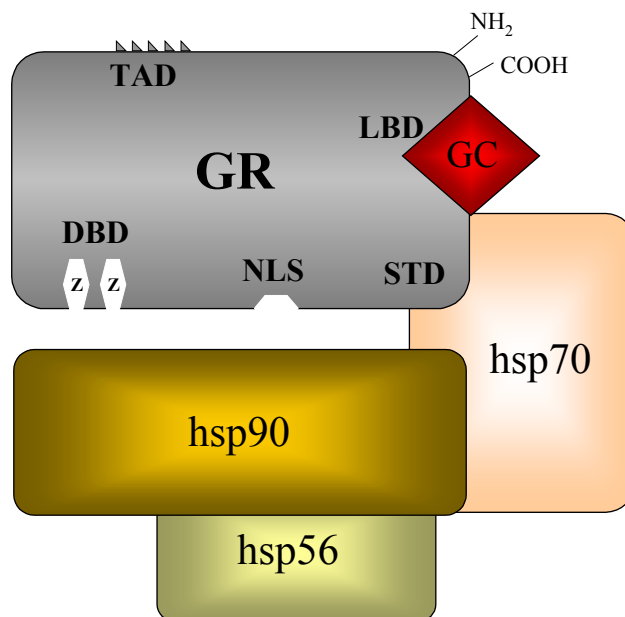
Hormons Adrenocorticotropin (ACTH). Mit dem Blutstrom erreicht ACTH die *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde und stimuliert die Synthese von Glucocorticoiden. Dieses System steht über eine negativen Rückkopplung im Gleichgewicht, wobei Glucocorticoide direkt die Synthese und Sekretion von ACTH und CRF inhibieren. Glucocorticoid-Produktion wurde auch von Nicht-T-Zellen im Thymus berichtet (Vacchio *et al.*, 1999; Vacchio *et al.*, 1994). Der Cortisol-Spiegel hat normalerweise ein Minimum um Mitternacht und ein Maximum um 9 Uhr morgens. Glucocorticoide werden ans Blut abgegeben und meist in Protein-gebunder Form transportiert; 80 % binden an das Glucocorticoid-spezifische Protein Transcortin (corticosteroidbindendes Globulin, CBG), 10 % an die Erythrozytenmembran und 10 % liegen in freier und damit biologisch aktiver Form vor. Das wichtigste und wirksamste der Glucocorticoide (Abb. 5) ist neben geringen Mengen an Cortison (inaktive Form des Cortisol) und Corticosteron das Cortisol (Hydrocortison), welches auch mineralocorticoide Wirkung hat. Für die Inaktivierung von Cortisol zu Cortison ist das Enzym 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) verantwortlich. Der Gehalt an Steroidhormonen in der Nebennierenrinde ist gering, jedoch wird Cortisol beim Menschen täglich in einer Menge von 5 – 30 mg produziert, was zu einer Konzentration im Blut zwischen 5 und 20  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  führt (Plasmakonzentration von 70 – 550 nM). Die Inaktivierung der Hormone erfolgt im wesentlichen in der Leber, wobei Endprodukte, zusammen mit geringen Mengen an unverändertem Cortisol, mit dem Harn ausgeschieden werden.



**Abbildung 5: Chemische Strukturformeln einiger Glucocorticoide.** Struktur von Cortisol, den synthetischen Glucocorticoiden Dexamethason und Prednisolon und des Glucocorticoid-Antagonisten RU486 (Mifepriston). Prednisolon und Dexamethason sind die am häufigsten verwendeten synthetischen Cortisol-Analoga in der Corticoid-Therapie, der Glucocorticoid-Antagonist RU486 wird teilweise als Abortivum benutzt. Weitere Erklärungen siehe Text.

Der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) ist ein Liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor. Seine nahezu ubiquitäre Expression läßt darauf schließen, daß er eine wichtige Rolle in vielen physiologischen sowie pathologischen Prozessen spielt. Der GR enthält eine DNA-Bindedomäne, eine Ligandenbindedomäne und zwei Transaktivierungsdomänen (Beato *et al.*, 1995), welche die Wechselwirkung des Steroid-Rezeptors mit anderen transkriptionellen Regulatoren vermittelt. Die Rolle der Hormon-Bindedomäne liegt darin, eine DNA-Bindung in Abwesenheit des Hormons zu verhindern.

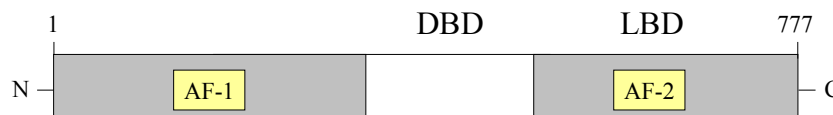
In Abwesenheit des Liganden wird der GR im inaktiven Zustand in einem Multiprotein-Komplex, welcher Chaperone wie hsp90, hsp70 und hsp56 beinhaltet, im Zytoplasma gehalten (Abb. 6). Da Glucocorticoide kleine hydrophobe Moleküle sind, können sie durch die Plasmamembran diffundieren, und an ihren zytoplasmatischen Rezeptor binden. Die Bindung des Glucocorticoids verursacht eine Veränderung der Rezeptor-Konformation, so daß der Rezeptor vom zytoplasmatischen Komplex dissoziiert und durch seine nicht mehr maskierte NLS (engl.: nuclear translocation sequence) in den Zellkern transloziert (Abb. 7).



**Abbildung 6: Modell des unaktivierten Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes.** In Abwesenheit des Liganden befindet sich der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) in einem zytosolischen Multiprotein-Komplex, welcher Chaperone wie hsp90, hsp70 und hsp56 beinhaltet. Nach Glucocorticoid-Bindung bewirkt eine Konformationsveränderung des GR die Exposition des nukleären Lokalisations-Signals (NLS), was in der Translokation des Rezeptors in den Zellkern und dortiger DNA-Bindung an GRE-Elemente resultiert. Weitere Erläuterungen siehe Text. GR, Glucocorticoid-Rezeptor; GC, Glucocorticoid Hormon; Z, Zink-Finger-Motiv; DBD, DNA-Bindedomäne; NLS, Nukleäres Lokalisations-Signal; STD, Signal-

Transduktions-Domäne zur Bindung an hsp90; LBD, Liganden-Bindedomäne; TAD, Transaktivierungs-Domänen; hsp90, Hitzeschockprotein 90 (heat shock protein 90); hsp 70 Hitzeschockprotein 70 (heat shock protein 70); hsp56, Hitzeschockprotein 56 (= FKBP59, FKBP52, HBI).

Der Glucocorticoid-Rezeptor reguliert die Transkription durch die hochaffine Bindung eines aktivierten Rezeptor-Dimers an spezifische DNA-Sequenzen, die man **Glucocorticoid Response Element (GRE)** nennt. Zusätzlich zur Verstärkung der Transkription kann der Glucocorticoid-Rezeptor durch Bindung an DNA-Sequenzen, die man nGRE (negative GRE) nennt, auch als transkriptioneller Repressor wirken (Drouin *et al.*, 1993; Pei, 1996). Dabei interagiert der GR mit anderen Transkriptionsfaktoren am Promotor oder bindet Elemente mit überlappender Bindesequenz für andere Transkriptionsfaktoren und verhindert damit deren transaktivierende Funktion (Diamond *et al.*, 1990; Hoepfner *et al.*, 1995). Mehrere Beispiele für eine solche Regulation zwischen GR und AP-1 wurden beschrieben (Kraemer *et al.*, 1992; Malkoski and Dorin, 1999). Das GRE ist ein Palindrom, bestehend aus einem Paar von 6 bp-Sequenzen, voneinander durch 3 bp getrennt (*consensus*: 5' AGAACANNNTGTTCT 3'). Der GR dimerisiert nach Bindung an die palindromische Sequenz.



**Abbildung 7: Vereinfachte Domänen-Struktur des Glucocorticoid-Rezeptors.** Die Liganden-Bindedomäne (LBD, 250 as) bindet das Glucocorticoid-Hormon, ist aber auch an der Rezeptor-Dimerisierung, transkriptionellen Regulation und - durch eine NLS - am Kerntransport beteiligt. Eine weitere NLS liegt direkt neben der DNA-Bindedomäne (DBD, ~68 as). Die DBD vermittelt die spezifische Interaktion mit dem GRE-Element, um über die Transaktivierungsdomänen (AF-1 & AF-2) die Transkription zu regulieren. Die Amino-terminale Domäne (439 as) ist an der Unterscheidung zwischen verschiedenen Zielgenen durch Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren beteiligt (Greenstein *et al.*, 2002). as, Aminosäuren; NLS, nukleäre Lokalisations-Domäne.

Zusätzlich zur direkten DNA-Bindung kann der Glucocorticoid-Rezeptor die Transkription als ein Monomer durch Protein-Protein-Interaktionen modulieren. In Interaktion mit Spi-1 (Gauthier *et al.*, 1993), AP-1 (Jonat *et al.*, 1990), NF- $\kappa$ B (Liden *et al.*, 1997), OCT-1 (Kutoh *et al.*, 1992), CREB (Imai *et al.*, 1993) und GATA-1 (Chang *et al.*, 1993) wirkt der GR als Repressor. Dies wurde für AP-1- und NF- $\kappa$ B-Aktivität

gezeigt (Gottlicher *et al.*, 1998). Dabei verhindert der GR entweder die DNA-Bindung anderer Transkriptionsfaktoren (Newton *et al.*, 1998; Ray and Prefontaine, 1994) oder reprimiert deren Aktivität, ohne ihre DNA-Bindung zu beeinträchtigen (De Bosscher *et al.*, 1997; Nissen and Yamamoto, 2000). Durch Interaktion mit STAT5 kann der GR zudem als positiver Transkriptionsfaktor wirken (Groner *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde die Konkurrenz für Coaktivator-Proteine als eventueller Mechanismus der GR-vermittelten Transrepression diskutiert (Kamei *et al.*, 1996; Sheppard *et al.*, 1998). Somit besitzt der GR zwei Funktionen, zum einen als ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor und zum anderen als ein Liganden-abhängiger negativer Regulator anderer Transkriptionsfaktoren. Letztere Funktion ist unabhängig von der DNA-Bindung des GR, und die Zink-Finger-Domäne ist hierfür nicht essentiell (Herrlich, 2001).

DNA-Bindung des GR führt zu einer veränderten Chromatin-Struktur, welche daraufhin die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an den Promotor erst ermöglicht (Deroo and Archer, 2001b). Im eukaryontischen Zellkern ist die DNA meist um Histone gewickelt, wobei verschieden dicht gepackte Regionen unterschieden werden können. Stark gepackte Regionen des Chromatins sind transkriptionell gehemmt (Elgin, 1988; Gross and Garrard, 1988), da Transkriptionsfaktoren nur beschränkten Zugang zu ihren entsprechenden Bindstellen in Promotorelementen haben (Wolffe and Hayes, 1999). Die Veränderung der nukleosomalen Architektur und der damit verbundenen höheren transkriptionellen Aktivität eines Promotors durch die Bindung des GR wurde am intensivsten am Beispiel des MMTV (mouse mammary tumor virus) Promotor untersucht (Deroo and Archer, 2001b), ist aber auch für den I $\kappa$ -B $\alpha$  Promotor beschrieben (Deroo and Archer, 2001a).

Eine regulative Wirkung von Glucocorticoiden auf die Stabilität von mRNA wurde z.B. für IL-8 und Cox-2 (Cyclooxygenase 2) gezeigt (Chang *et al.*, 2001; Lasa *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus der Regulation der mRNA-Stabilität durch Glucocorticoide ist nicht vollständig geklärt. Beschrieben wurde eine mögliche Rolle des sogenannten Destabilisierungsmotivs AUUUA im 3' UTR (engl.: 3' untranslated region, Region zwischen dem Stop-Codon der Translation und dem Start des Poly-A-Schwanzes der mRNA) der Transkripte. Jedoch kann dieser Effekt auch indirekt vermittelt werden. So können Glucocorticoide z.B. direkt die Proteinkinase p38 inhibieren, was zu einer Destabilisierung der IL-8 mRNA führt (Lasa *et al.*, 2001).

Manche Effekte von Glucocorticoid-Hormonen sind nach kurzer Zeit zu beobachten, was zusätzlich zur bisher bekannten Modulation durch Protein-Protein-Interaktion weitere nicht-genomische Regulationsmechanismen vermuten lässt. Diskutiert werden drei weitere Mechanismen Glucocorticoid-vermittelter Regulation. Nach Ligandenstimulation wird nicht nur der GR aus dem zytosolischen Multiproteinkomplex entlassen, sondern auch weitere Proteine, wie z.B. Src, was auch zu einer Signalübertragung führen könnte (Croxall *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde die teilweise Auflösung der Plasmamembran und damit verbundene Veränderungen der

physikochemischen Eigenschaften der Membran-assoziierten Proteine durch das Glucocorticoid Prednisolon diskutiert. Ergebnis hiervon könnte eine Inhibition des Calcium- und Natrium-Eintritts durch die Membran sein. Dieser Effekt ist nach wenigen Sekunden zu beobachten, jedoch nur bei sehr hohen Glucocorticoid-Dosen (Buttgereit *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 2000). Zusätzlich gibt es Publikationen, in welchen berichtet wird, daß der GR an die Plasmamembran gebunden vorliegen kann (Gametchu *et al.*, 1999; Gametchu *et al.*, 1993). Wie genau die Signalübertragung in diesem Fall aussehen könnte ist bisher nicht geklärt, jedoch ist festzuhalten, daß in T-Lymphozyten der GR nicht in Plasmamembran-gebundener Form vorkommt (Buttgereit and Scheffold, 2002).

Die physiologische Wirkung der Glucocorticoide besteht vor allem in einer Stimulation der Gluconeogenese durch die Neusynthese verschiedener Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels und der Gluconeogenese, sowie einer Hemmung der Glucose-Oxidation in den Zellen und einer damit verbundenen Erhöhung des Blutzucker-Spiegels. Da die zur Gluconeogenese verwendeten Aminosäuren einem verstärkten Proteinabbau in den peripheren Organen (Muskelgewebe, Knochenmatrix) zur Folge haben, kommt den Glucocorticoiden eine ausgesprochen katabole Wirkung zu. Glucocorticoide erlauben dem Organismus, auf Umweltveränderungen mit einer Anpassung ihrer Genexpression zu reagieren, um den aktuellen physiologischen Bedürfnissen zu entsprechen. Physischer (Infektionen, Verletzungen) oder emotionaler Streß (z.B. Anblick des Feindes) führt zu einer schnellen Aktivierung der HPA-Achse, was in einer Ausschüttung von Glucocorticoiden resultiert, welche dann das Immun-, Nerven- und endokrine System koordinieren. Somit sind Glucocorticoide an der Regulation der Energieversorgung des Körpers beteiligt, steuern Stoffwechselphasen und den Schlaf-Wachrhythmus, modulieren Funktionen des zentralen Nervensystems, den Fettmetabolismus sowie die Streß-Bereitschaft.

Weiterhin ist der Glucocorticoid-Rezeptor durch seine entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung ein wichtiger Modulator des Immunsystems. Deshalb werden Glucocorticoide häufig zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Entzündungserkrankungen, Allergien und zur Nachbehandlung von Organtransplantationen zum Schutz vor Abstoßungsreaktionen eingesetzt. Prednisolon und Dexamethason sind die am häufigsten verwendeten synthetischen Analoga von Cortisol. Dexamethason enthält ein zusätzliches Fluoratom, welches die Wirksamkeit des Medikaments erhöht, indem die Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor erhöht und zudem der Abbau der Substanz verlangsamt wird. Der pharmakologische Effekt von Corticosteroiden beruht auf Stimulation des GR durch supraphysiologische Konzentrationen des Liganden. Die abnormal starke Ligation des GR verursacht eine verstärkte Glucocorticoid-vermittelte Antwort, welche sowohl nützliche als auch toxische Effekte haben kann. Hält man sich die große Anzahl von GR-regulierten Genen vor Augen, so ist es nicht verwunderlich, daß die Effekte der Steroid-Therapie komplex sind. Neben erwünschten Reaktionen wie Immunsuppression und Induktion von Apoptose sind Nebenwirkungen wie der Mineralienverlust in den Knochen,

Verdünnung der Haut, Abbau von Muskelproteinen und Gewichtszunahme zu verzeichnen. Somit verlangt die Corticoid-Therapie ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen der Reduktion der Entzündungsreaktion und der Vermeidung des Schadens durch die toxischen Nebenwirkungen des Medikaments. Aus diesem Grund werden Glucocorticoide in der Behandlung von Transplantationsabstoßungen, Autoimmunerkrankungen und Allergien meist in Kombination mit weiteren Medikamenten eingesetzt. Der Glucocorticoid-Antagonist (Antiglucocorticoid) RU486 (auch als Mifepristone bekannt) wurde ursprünglich entwickelt, um den GR während einer eventuellen Tumor-Therapie zu blockieren (Ulmann *et al.*, 1990). Da RU486 neben dem GR auch den Progesteron-Rezeptor bindet und inhibiert, findet RU486 allerdings hauptsächlich als Abortivum Verwendung (sogenannte ‚Abtreibungspille‘) (Mahajan and London, 1997; Ulmann *et al.*, 1990). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine agonistische Funktion von RU486 auf den Progesteron-Rezeptor (Cairns *et al.*, 1993).

Die meisten genetischen Defekte in der Glucocorticoid Signalübertragung wurden für Mutationen beschrieben, welche die Steroid Synthese direkt betreffen oder die Glucocorticoid-Level indirekt modulieren, wie z.B. Effekte auf die HPA-Achse. Auch wenn mehrere Mutationen im GR-Gen beschrieben sind, die zu angeborener Glucocorticoid-Resistenz führen (Stratakis *et al.*, 1994), wurde nie ein kompletter Verlust der GR-Gen-Funktion beobachtet, was auf eine essentielle Rolle des GR schließen läßt. Die Funktion des GR *in vivo* wurde in mehreren Maus-Linien untersucht, die Mutationen im GR-Gen enthalten. Das GR-Gen besteht aus 9 Exons, welche einen Bereich von 110 kb ausmachen. Die Deletion des Exon 3, welches für die erste Zink-Finger-Domäne der DNA-Bindedomäne codiert, führt zu einer kompletten Inaktivierung des GR Gens. Diese GR-defizienten Mäuse (GR<sup>-/-</sup>) sterben in der ersten Minute nach der Geburt aufgrund einer defekten Entwicklung der Lunge (Tronche *et al.*, 1998). Die Induktion von Enzymen der Gluconeogenese ist in diesen Mäusen verhindert. Zudem zeigen diese Mäuse zusätzlich eine defekte Reifung der Haut, gestörte Proliferation von Erythrozyten-Vorläufern, und andere Defekte, was zu dem allgemeinen Schluß führte, daß Glucocorticoide für viele Aspekte der Mausentwicklung wichtig sind.

Um die Regulation physiologischer Prozesse durch GR in adulten Mäusen zu untersuchen, wurden Mäuse erzeugt, die eine Punktmutation im D-loop der zweiten Zink-Finger-Domäne der DNA-Bindedomäne enthalten (Ala<sub>458</sub> zu Thr<sub>458</sub>). Dieser D-loop ist essentiell für die Dimerisierung des GR nach DNA-Bindung (Dalman *et al.*, 1991; Luisi *et al.*, 1991). Diese Mutation führt zu einem Dimerisierungsdefekt des GR und verhindert damit die DNA-bindungsabhängige Transaktivierung, so daß GRE-vermittelte Geninduktion nach Glucocorticoid-Behandlung fehlt (Reichardt *et al.*, 1998b). Modulation der Genexpression durch Protein-Protein-Interaktion, wie z.B. die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB bleibt jedoch erhalten. Interessanterweise überleben diese Mäuse (GR<sup>dim</sup>) bis ins Erwachsenenalter (Reichardt *et al.*, 1998b). Die Lungen dieser Mäuse entwickeln sich normal, die Thymozyten sind

aber gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose resistent. Diese Studie zeigt, daß die Dimerisierung, d.h. damit auch die DNA-Bindung und die damit verbundene GRE-vermittelte Transkription, nicht für die Maus-Entwicklung notwendig ist. Weitere GR-Mutanten und deren T-Zell-Phänotyp werden im nächsten Kapitel ausführlicher besprochen.

### 3.8 DIE ROLLE DES GLUCOCORTICOID-REZEPTORS IN T-LYMPHOZYTEN

Glucocorticoid-Hormone üben ihre entzündungshemmende Wirkung hauptsächlich dadurch aus, daß sie die Expression von Zytokinen – wie z.B. TNF $\alpha$  (Crinelli *et al.*, 2000), IL-1 $\alpha$  (Amano *et al.*, 1993), IL-2 (Almawi *et al.*, 1991; Paliogianni and Boumpas, 1995), IL-4 (Chen *et al.*, 2000), IL-5 (Mori *et al.*, 1997), IL-6 (Amano *et al.*, 1993), IL-8 (Tobler *et al.*, 1992), IL-11 (Haynesworth *et al.*, 1996), IL-12 (Blotta *et al.*, 1997; Elenkov *et al.*, 1996), IL-16 (Arima *et al.*, 1999) and IFN- $\gamma$  (Kunicka *et al.*, 1993) - und die Synthese zahlreicher Zelloberflächenmoleküle inhibieren und damit die Aktivierung des Immunsystem effizient hemmen. Obwohl es noch am genauem Verständnis der entzündungshemmenden Funktion der Glucocorticoide fehlt, ist klar gezeigt, daß der GR Liganden-abhängig die Expression zahlreicher inflammatorischer Zytokine vermindert, was so die Immunantwort inhibiert (Herrlich, 2001; Vieira *et al.*, 1998). Zusätzlich kann der GR die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  induzieren, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, welcher ein Schlüsselfaktor für die Immunantwort ist (Auphan *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995). Thymozyten von Mäusen mit einer erhöhten Expression an GR nach Einführung eines YAC-(engl.: yeast artificial chromosome)-GR-Transgens zeigen nicht nur eine erhöhte Sensitivität gegenüber Steroiden, sondern auch eine erhöhte Resistenz gegenüber LPS-induzierten septischen Schock (Reichardt *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle der Glucocorticoide bei der Limitierung von Entzündungsreaktionen hin. Interessanterweise sind Glucocorticoide auch in GR<sup>dim</sup> Mäusen in der Lage, Entzündungen zu vermindern. GR<sup>dim</sup>-Mäuse weisen eine Punktmutation (A458T) in Exon 4 des GR auf, welches für einen Teil der DNA-Bindedomäne kodiert, die auch für die Dimerisierung des GR-Proteins notwendig ist. Somit ist das GR<sup>dim</sup>-Protein zwar noch zu Protein-Protein-Interaktionen, nicht jedoch zu DNA-Bindungs-abhängiger Transaktivierung in der Lage. Dies zeigt, daß GRE-Bindung und Aktivierung von Genen durch den GR für die Limitierung von Entzündungsreaktionen durch Glucocorticoide nicht nötig ist (Reichardt *et al.*, 2001). Jedoch zeigen GR<sup>dim</sup>-Mäuse eine erhöhte Letalität nach Applikation von anti-CD3-Antikörpern (A. Bauer, unveröffentlichte Daten). Vermutlich sind Reaktionen, die komplexere immunologische Regulationen implizieren, GRE-abhängig.

Zusätzlich zur Repression der Zytokin-Expression lösen Glucocorticoide in Thymozyten und einigen T-Zell-Hybridomen Apoptose aus, wohingegen periphere T-Zellen nur geringfügig sensitiv gegenüber Glucocorticoid-induzierter Apoptose sind (Greenstein *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu TCR-induzierter Apoptose ist die

Glucocorticoid-induzierte Apoptose unabhängig vom CD95-System (Ju *et al.*, 1995; Zacharchuk *et al.*, 1990). Obwohl sowohl Glucocorticoide als auch TCR-Stimulation Apoptose in T-Zell-Hybridomen induzieren können, ist der Zelltod in der Präsenz beider Stimuli überraschenderweise stark reduziert (Zacharchuk *et al.*, 1990). So wurde vermutet, daß sowohl endogene als auch exogene Glucocorticoide an der Regulation der Homeostase peripherer T-Zellen beteiligt sind (Gonzalo *et al.*, 1993). Für Thymozyten und T-Zell-Hybridome wurde gezeigt, daß das synthetische Glucocorticoid Dexamethason die TCR-induzierte Apoptose reduziert (Ashwell *et al.*, 2000a; Iwata *et al.*, 1991), und umgekehrt kann Glucocorticoid-induzierte Apoptose durch TCR-Stimulation, über Aktivierung des ERK Signalweges, inhibiert werden (Jamieson and Yamamoto, 2000). SEB-induzierte Apoptose in Thymozyten, T-Zell-Hybridomen und peripheren T-Zellen wird ebenfalls durch Dexamethason verringert (Ayroldi *et al.*, 1995). Unter Verwendung eines T-Zell-Hybridoms konnte gezeigt werden, daß sowohl TCR-induzierte Apoptose, als auch die CD95L-Expression durch Glucocorticoide inhibiert wird (Cui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995).

Unter den Genen, deren Expression durch Glucocorticoide induziert werden, befindet sich das anti-apoptotische „Leucine Zipper“-Protein GILZ (**G**lucocorticoid **I**nduced **L**eucine **Z**ipper). Die Expression dieses transkriptionellen Regulators ist auf lymphoide Zellen beschränkt (D'Adamio *et al.*, 1997). Die konstitutive Expression von GILZ in Thymozyten und reifen T-Lymphozyten wird durch Dexamethason-Behandlung weiter erhöht, durch Stimulation des TCR hingegen erniedrigt. Überexpression von GILZ schützt T-Zell-Hybridome vor TCR-induzierter Apoptose, nicht jedoch vor Zelltod durch andere Stimuli (D'Adamio *et al.*, 1997). Dies läßt darauf schließen, daß Glucocorticoid-vermittelter Schutz vor AICD, zumindest zum Teil, in der Inhibition der CD95L-Induktion aufgrund erhöhter GILZ-Expression begründet ist. Zusätzlich inhibiert GILZ-Überexpression die IL-2 und IL-2R Expression. Ein möglicher Mechanismus, über den GILZ seinen Effekt vermitteln könnte, ist die Inhibition der DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Ayroldi *et al.*, 2001). NF- $\kappa$ B induziert die CD95L-Expression nach TCR-Stimulation (Li-Weber *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 1998; Mittelstadt and Ashwell, 1998). Die Überexpression von GILZ konnte durch Interferenz mit dem Kerntransport und der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B die IL-2 Expression in einem T-Zell-Klon inhibieren (Ayroldi *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß GILZ auch mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 interferieren und ihn damit inhibieren kann (Mittelstadt and Ashwell, 2001). Ebenfalls kann durch Glucocorticoide der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ -B induziert werden, was wiederum zu einer indirekten Regulation des CD95L führen könnte (Scheinman *et al.*, 1995).

Die physiologische Rolle von Glucocorticoiden in der T-Zell-Entwicklung wird kontrovers diskutiert (Godfrey *et al.*, 2000; Jondal *et al.*, 2001). Obwohl Glucocorticoide Apoptose in unreifen Thymozyten induzieren - nicht jedoch in reifen T-Zellen - ist es unklar, ob endogene Corticosteroide eine Rolle in der T-Zell-Reifung

spielen. Da Glucocorticoide die TCR-induzierte Apoptose in T-Zell-Hybridomen inhibieren (Yang *et al.*, 1995), wurde vermutet, daß sie, von Nicht-Thymozyten innerhalb des Thymus produziert, eine Schlüsselrolle, oder zumindest die Feinregulation der Thymozyten-Selektion übernehmen (Ashwell *et al.*, 2000a; Vacchio *et al.*, 1999). Um dies genauer zu untersuchen wurden mehrere Mausmodelle verwendet. Die Insertion einer PGK-Neomycin-DNA-Cassette in Exon 2 des GR Gens führt zu einem hypomorphen Allel ( $GR^{hypo}$ ), da dadurch mRNA Varianten entstehen, welche für ein N-terminal verkürztes Protein kodieren, welches die DNA-Bindedomäne und Liganden-Bindedomäne enthalten (Cole *et al.*, 2001). Obwohl die Thymozyten dieser Mäuse resistent gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose sind, verläuft die Thymozyten-Differenzierung und Selektion im Thymus normal (Purton *et al.*, 2000).

Wird dagegen das Modell einer Maus verwendet, die T-Lymphozyten-spezifisch Antisense-Transkripte des GR exprimiert, so zeichnen sich Defekte im Überleben und in der Reifung von Thymozyten ab (King *et al.*, 1995). Ebenso wie bei pharmakologischer Inhibition der GR-Funktion, ist die Anzahl  $CD4^+CD8^+$  Thymozyten reduziert und das T-Zell-Repertoire verändert. Thymozyten, die normalerweise die positive Selektion durchlaufen, gehen stattdessen in Apoptose - wahrscheinlich, weil das normalerweise schwache Signal zur positiven Selektion zu stark wird (negative Selektion), wenn der inhibitorische Effekt des GR reduziert ist. Allerdings werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert, zum einen weil die Spezifität des Antisense-Ansatzes ein Problem darstellen könnte. Eine andere Gruppe stellte unter Verwendung einer unabhängigen Maus-Linie mit dem selben Promotor (*lck* proximaler Promotor) eine Erhöhung der Thymozytenzahl fest (Jondal *et al.*, 2001). Expression von GR-antisense mRNA führt zu einer nur etwa 40–60%-igen Reduktion der GR-Proteinmenge, was diesen Ansatz limitiert (Pepin *et al.*, 1992), zumal der exakte Grad an GR-Reduktion auf zellulärer Ebene schwer zu bestimmen ist. Zudem sind die absolute Zahl an Thymozyten und die  $CD4^+CD8^-$  und  $CD4^-CD8^+$  Populationen in  $GR^{+/-}$  und  $GR^{dim}$  Mäusen normal (Reichardt *et al.*, 1998b). Kürzlich wurde berichtet, daß T-Zell-Entwicklung, Zellzahl und die Fähigkeit der Thymozyten zur negativen Selektion als Antwort auf CD3/CD28-Stimulation oder Superantigen in  $GR^{hypo}$  Embryonen normal verläuft (Purton *et al.*, 2000). Da sowohl  $GR^{hypo}$  als auch  $GR^{-/-}$  Thymozyten vollkommen resistent gegenüber Glucocorticoid-induzierter Apoptose sind, kann man ausschließen, daß ein weiterer Rezeptor mit redundanter Funktion existiert. Diese Daten lassen Zweifel an der wichtigen Rolle des GR in der Thymozyten-Entwicklung aufkommen. Allerdings wäre es möglich, daß in den  $GR^{dim}$  Mäusen der GR einen entwicklungsspezifischen Effekt vermittelt, der unabhängig von der Induktion von Apoptose und unabhängig von der Transaktivierungsfunktion des GR ist, dafür aber als Monomer in Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren einen Effekt vermittelt.

Um dies letztlich genau zu untersuchen, ist die Verwendung von Mäusen notwendig, die eine Thymozyten-spezifische Mutation bzw. T-Lymphozyten-spezifische GR-Defizienz aufweisen ( $GR^{lckCre}$ ). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mäuse zur

Untersuchung der Rolle des GR im AICD peripherer T-Zellen verwendet. Die konditionale Mutation des GR Gens wurde mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems (Gu *et al.*, 1994; Sauer and Henderson, 1988) erzeugt. Cre ist eine prokaryontische Rekombinase, welche DNA-Fragmente ausschneidet, die von zwei 34 bp langen DNA-Sequenzen, *loxP* genannt, flankiert werden. Im Falle des GR Gens wurde das Exon 3 von *loxP* Sequenzen flankiert ( $GR^{loxP}$ ). In jeder Zelle, die Cre Rekombinase exprimiert, wird Exon 3 deletiert und damit das GR-Gen inaktiviert. Allein die Anwesenheit der *loxP* Sequenzen beeinflusst weder die Expression noch die Funktionalität des GR. Die Deletion des GR spezifisch in T-Lymphozyten (in unreifen Thymozyten und reifen peripheren T-Zellen) erfolgte durch Kreuzung der  $GR^{loxP}$  Mäuse mit transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des proximalen *lck*-Promotors exprimieren. Das Allel bleibt in anderen Zellen des Organismus intakt, was zu einer T-Lymphozyten-spezifischen Inaktivierung des GR führt. (Weitere Erklärungen in Kapitel 5.2.1)..

### 3.9 WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNGEN

Apoptose spielt bei der Ontogenese und Homöostase mehrzelliger Organismen eine bedeutende Rolle. CD95 ist einer von bislang sechs identifizierten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können. CD95-vermittelte Apoptose ist unter anderem von entscheidender Bedeutung bei der Homöostase des Immunsystems. Fehlregulationen im CD95-System tragen zur Entstehung von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei.

CD95 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert. Die Expression des CD95-Liganden (CD95L) ist jedoch auf wenige Zellen beschränkt, wie z.B. aktivierte T-Zellen, Makrophagen und Zellen der immunprivilegierten Gewebe, und wird streng reguliert. Der CD95L ist nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert, er wird aber nach Stimulation des T-Zell-Rezeptor-(TCR)/CD3-Komplexes durch Antigen stark hochreguliert. Naïve T-Lymphozyten werden durch Stimulation des TCR aktiviert, was eine spezifische Immunantwort auslöst. Im Gegensatz dazu führt in zuvor aktivierten T-Zellen dasselbe Signal zu Aktivierungs-induziertem Zelltod (engl.: activation-induced cell death, AICD). *In vitro* führt die Reaktivierung von T-Zellen zur Expression von CD95L, mit der Konsequenz, daß benachbarte CD95-positive Zellen eliminiert werden, oder die T-Zellen Suizid begehen. AICD ist ein wichtiger Mechanismus, um die Anzahl der reaktiven T-Zellen zu reduzieren und die Immunreaktion zu beenden.

In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Regulation des AICD in primären T-Zellen untersucht werden. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß Mitglieder der Jun, Fos und ATF Proteine, die den Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein-1) bilden, an der Induktion des CD95L beteiligt sind. Daher stellte sich die Frage nach der Rolle des AP-1-Komplexes in der Regulation des AICD. Zahlreiche Studien weisen auf eine kritische Rolle von Glucocorticoid-Hormonen in der Thymozyten-Entwicklung und der Regulation des Überlebens peripherer T-Zellen hin.

---

Dabei war vor allem die Frage zu klären, wie der molekulare Mechanismus der anti-apoptotischen Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors in peripheren T-Zellen vermittelt wird. Ferner sollte in einem *in vitro*-Modell untersucht werden, wie einige Effektor T-Zellen dem AICD entgehen können, um zu Gedächtnis T-Zellen zu differenzieren. Dabei war vor allem die Frage nach der Sensitivität und Resistenz dieser Zellen gegenüber Induktion der Apoptose durch Stimulation des CD95- oder des T-Zell-Rezeptors zu klären.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 CHEMIKALIEN

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München) Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen). Radioaktive Reagenzien wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

#### 4.1.2 HÄUFIG VERWENDETE PUFFER

Western Blot Lysepuffer:	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	PMSF
	10 % (w/v)	Glyzerol
	1 % (w/v)	Triton X-100
	10 mM	NaF
	1 mM	Na-orthovanadat
	20 Stück auf 1 Liter	SPI Proteasen Inhibitor Cocktail Tabletten Complete (Boehringer)
PBS:	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
TBE (10x):	0,45 M	Tris
	0,45 M	Borsäure

---

	10 mM	EDTA, pH 8.3
TE:	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA, pH 7,5
Probenpuffer reduz. (5x):	50 % (v/v)	Glyzerol
	10 % (v/v)	SDS
	50 mM	Tris, pH 6,8
	25 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau
APS-Lösung:	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
Sammelgel (5%) :	24 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	5 % (w/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	APS
	0,1 % (w/v)	TEMED
Trenngel (12 %):	37,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	12 % (w/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,03 % (w/v)	APS
	0,1 % (w/v)	TEMED
EMSA-Gel:	12 ml	38 % Acrylamid, 1,5 % Bisacrylamid
	6 ml	TBE 10 x
	1 ml	Glycerin
	60 $\mu$ l	TEMED
	600 $\mu$ l	APS
	41 ml	H <sub>2</sub> O

---

Laufpuffer:	25 mM	Tris-Base
	0,19 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
Fixierlösung:	20 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Transferpuffer:	25 mM	Tris
	0,19 M	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,037 % (w/v)	SDS
Stripping Puffer:	62,5 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	2 % (w/v)	SDS
	100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
Puffer A (Kernextrakte):	10 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	0,5 mM	DTT
	0,2 mM	PMSF
Puffer C (Kernextrakte):	20 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
	1,5 mM	Gyzerol
	420 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,2 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	0,2 mM	PMSF

5 x EMSA-Puffer:	50 mM	HEPES, pH 7,5
	2,5 mM	EDTA
	500 mM	KCl
	10 mM	DTT
	20 % (v/v)	Ficoll
	2,5 % (v/v)	NP-40
	0,025 % (w/v)	Bromphenolblau

Lyse-Puffer: (für DNA-Präparation)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,2
	400 mM	NaCl
	2 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

Nicolettipuffer:	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat
	0,1 % (w/v)	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

### 4.1.3 BIOLOGISCHES MATERIAL

#### 4.1.3.1 BAKTERIENSTÄMME

E.coli Stamm DH5α (Clontech) zur Vermehrung von Plasmiden.

#### 4.1.3.2 EUKARYONTISCHE ZELLEN

Jurkat J16	humane T-Zell-Leukämie-Linie
Jurkat J16/77	humane T-Zell-Leukämie-Linie (Subklon von J16)
Jurkat J16/145	humane T-Zell-Leukämie-Linie (Subklon von J16)
Jurkat J27	humane T-Zell-Leukämie-Linie (Subklone von J16/77)

DC27.1 murine T-Zell-Leukämie-Linie

#### 4.1.3.3 MÄUSE

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
GR <sup>lckCre</sup>	Konditional GR-defizient (T-Zell-spezifisch)	Günther Schütz (DKFZ), unveröffentlicht
GR <sup>dim</sup>	Dimerisierungs-defekter GR	Günther Schütz (DKFZ), (Reichardt <i>et al.</i> , 1998b)

Weitere Erläuterungen siehe Ergebnis-Teil, Kapitel 5.2.1

Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierstall des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg gehalten.

#### 4.1.4 NÄHRMEDIEN

##### 4.1.4.1 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Pulverisiertes Zellkulturmedium RPMI 1640 wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen und nach Herstellerangaben in pyrogenfreiem Wasser gelöst. Das Medium wurde sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen supplementiert:

10 %	FCS	BRL, Eggenstein
10 mM	HEPES	BRL, Eggenstein
50 µg/ml	Gentamycin	BRL, Eggenstein oder
50 µg/ml	Penicillin/Streptomycin	BRL, Eggenstein

Fetales Kälberserum (FCS) wurde vor der Zugabe zu den Medien für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Zellkulturmedium für primäre humane T-Zellen wurde mit 25 U/ml IL-2 supplementiert (humanes T-Zellmedium). Das Zellkulturmedium für primäre murine T-Zellen wurde zusätzlich mit folgenden Zusätzen supplementiert (murines T-Zellmedium):

50 $\mu$ M	$\beta$ -Mercaptoethanol
2 mM	L-Alanyl-L-Glutamin
100 $\mu$ M	Natriumpyruvat

Einfriermedium für T-Zelllinien enthielt 20 % DMSO (v/v) in RPMI 1640 Medium.

#### 4.1.4.2 MEDIEN FÜR BAKTERIEN

LB-Medium: 10 g/l Caseinhydrolysat  
 5 g/l Hefeextrakt  
 10 g/l NaCl  
 eingestellt auf pH 7,2 mit 1 N NaOH

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) hinzugefügt.

#### 4.1.5 ANTIKÖRPER

##### Antikörper für FACScan

##### Human

Name <sup>1</sup>	Serum/Isotyp	Antigen	Quelle/Referenz
Anti-APO-1	IgG3	CD95	Trauth et al., 1989
B-10	IgG1	CD95	Santa Cruz
FII23c	IgG3	unbekannt	Trauth et al., 1989
N-19	Kanninchen	Bcl-2	Santa Cruz
44	IgG1	Bcl-x	Transduction Lab
polyclonal	Kanninchen	Bcl-x	Transduction Lab
UCHT1-FITC	IgG1	CD3	Pharmingen

RPA-T4-FITC	IgG1	CD4	Pharmingen
RPA-T8-FITC	IgG1	CD8	Pharmingen
RPA-T8-PE	IgG1	CD8	Pharmingen
HIB19-PE	IgG1	CD19	Pharmingen
M-A251-PE	IgG1	CD25	Pharmingen
G44-26-FITC	IgG2b	CD44	Pharmingen
HI100-FITC	IgG2a	CD45RA	Pharmingen
UCHL1-PE	IgG2b	CD45RO	Pharmingen
Dreg 56-FITC	IgG1	CD62L	Pharmingen
FN50-PE	IgG1	CD69	Pharmingen
2C101	IgG1	CD95L	Alexis
5G51	IgG1	CD95L	Alexis
Alf-2.1a	IgG1	CD95L	Ancell
NOK-1-biotin	IgG1	CD95L	Pharmingen
MuIgG-PE	Ziege polyklonal	muIgG	Dianova

### Murin

Name <sup>1</sup>	Serum/Isotyp	Antigen	Quelle/Referenz
Jo2-FITC	Hamster	CD95	Pharmingen
MFL-3-biotin	Hamster	CD95L	Pharmingen
H57-597-FITC	Hamster	TCR beta	Pharmingen
RA3-6B2-PE	Rat IgG2a	B220/CD45R	Pharmingen
A19-3	Hamster	unbekannt	Pharmingen
L3T4-FITC/PE	Rat IgG2a	CD4	Pharmingen
Ly2-PE	Rat IgG2a	CD8	Pharmingen
7D4-PE	Rat IgM	CD25	Pharmingen
H1.2F3-FITC	Hamster	CD69	Pharmingen
RR4-7-FITC	Rat IgG2b	V $\beta$ 6 TCR	Pharmingen
F23.1-FITC	IgG2a	V $\beta$ 8 TCR	Pharmingen

<sup>1</sup> Konjugiert mit: FITC (Fluorescein-Isothiocyanat  $\lambda_{\text{Ex/Em}}/\text{max}$  488/514 nm), PE (R-Phycoerythrin  $\lambda_{\text{Ex/Em}}/\text{max}$  488/575 nm), Cy (CyChrome  $\lambda_{\text{Ex/Em}}/\text{max}$  488/669 nm), bio (Biotin)

#### Weitere fluoreszenzmarktierte Moleküle

Basisprotein	Farbstoff	Antigen	Quelle/Referenz
Streptavidin	PE	Biotin	Pharmingen
Streptavidin	Cy	Biotin	Pharmingen

#### Antikörper für Western Blot

##### Human

Name	Serum/Isotyp	Antigen	Quelle/Referenz
N-19	Kaninchen polyklonal	Bcl-2	Santa Cruz
C4	IgG1	$\beta$ -Actin	Boehringer
B22630	Kaninchen polyklonal	Bcl-x	Transduction Lab

#### Peroxidase-konjugierte Antikörper

Name	Serum/Isotyp	Antigen	Quelle/Referenz
muIgG1-HRP	Ziege polyklonal	muIgG1	Southern Biotech.
muIgG2a-HRP	Ziege polyklonal	muIgG2a	Southern Biotech.
muIgG2b-HRP	Ziege polyklonal	muIgG2b	Southern Biotech.
muIgG3-HRP	Ziege polyklonal	muIgG3	Southern Biotech.
Ziege-IgG-HRP	Kaninchen polyklonal	Ziege IgG	Santa Cruz

#### Antikörper für EMSA Supershifts

Name	Serum/Isotyp	Antigen	Quelle/Referenz
102	Kaninchen polyklonal	FosB	Santa Cruz
H-75	Kaninchen polyklonal	FosB	Santa Cruz

4	Kaninchen polyklonal	c-Fos	Santa Cruz
D	Kaninchen polyklonal	c-Jun/AP-1	Santa Cruz
H-79	Kaninchen polyklonal	c-Jun	Santa Cruz
R-20	Kaninchen polyklonal	Fra-1	Santa Cruz
Q-20	Kaninchen polyklonal	Fra-2	Santa Cruz

### Antikörper für Apoptose-Assay

#### Human

Name	Serum/Isotyp	Antigen	Funktion	Quelle/Referenz
Anti-APO-1	IgG3	CD95	agonist	Trauth et al., 1989
NOK-1	IgG1	CD95L	antagonist	Pharmingen
OKT3	IgG2a	CD3	agonist	Kung et al., 1979
Goat anti Mouse Ig	Ziege polyklonal	murine Ig (H+L)	crosslinker	Southern Biotechnology

#### Murin

Name	Serum/Isotyp	Antigen	Funktion	Quelle/Referenz
Jo2	Hamster	CD95	agonist	Pharmingen
MFL-3	Hamster	CD95L	antagonist	Pharmingen
145-2C11	Hamster	CD3	agonist	Pharmingen
500A2	Hamster	CD3	agonist	Pharmingen
37.51	Hamster	CD28	agonist	Pharmingen

### Weitere Reagenzien für Apoptose-assay

Name	Funktion	Quelle/Referenz
zVAD.fmk	Pan-Caspasen-Inhibitor	Bachem
BD.fmk	Pan-Caspasen-Inhibitor	Bachem

APO-Fc	CD95L-Inhibitor	Dhein et al. 1995
--------	-----------------	-------------------

#### 4.1.6 MOLEKULARBIOLOGISCHES MATERIAL

##### 4.1.6.1 VEKTOREN

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
RSV	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pGL3	Luziferase Vektor	Promega
pEGFP-spectrin	Spectrin-EGFP-Fusionsplasmid	Kalejta et al., 1997
5xTRE-tata pGL3	5xTRE-Site Luziferase Vektor	Peter Angel, DKFZ

##### 4.1.6.2 ENZYME UND KITS

Enzyme	Bezugsquelle
RNase (DNase-frei)	Roche
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Polynukleotid Kinase	Roche
<i>Hind</i> III Restriktionsenzym	MBI Fermentas
<i>Bgl</i> II Restriktionsenzym	MBI Fermentas
calf intestinal phosphatase	Roche

Für die *in vitro*-Translation von Proteinen wurde das TNT(C) gekoppelte Reticulozytenlysatsystem von Promega verwendet.

**4.1.6.3 MOLEKULARGEWICHTSMARKER**

Proteinmarker: Rainbow-Marker RPN756	Amersham-Buchler
DNA-Marker: GeneRuler 100 bp ladder	MBI Fermentas
GeneRuler 1 kb ladder	MBI Fermentas

**4.1.6.4 MEMBRANEN UND FILTER**

ECL-Protein-Transfer-Membran Hybond C	Amersham-Buchler
3MM-Blottingpapier	Schleicher & Schüll
Sterilfilter CentrX MF	Schleicher & Schüll
Nylon-Zellsieb 40 µm Maschendichte	Falcon

**4.1.6.5 OLIGONUKLEOTIDE UND PRIMER****Oligonukleotide für EMSA**

Name	Sequenz 5' → 3'
TRE consensus	CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT
+76/+95	GAT CCG GCT GGC CTG ACT CAC CAG CA GAT CTG CTG GTG AGT CAG GCC AGC CG
+76/+95 mutiert	GAT CCG GCT GGC CTA <u>A</u> <u>ATT</u> <u>AAC</u> CAG CA GAT CTG CTG GTT <u>AAT</u> <u>TAG</u> GCC AGC CG

**Primer für genomische PCR bzw. RT-PCR**

human

Name	Sequenz 5' → 3'
β-Actin	TGA CGG GGT CAC CCA CAA TGT GCC CAT CTA CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG
CD95L	ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG A CCA GAG AGA GCT CAG ATA CGT TGA C

murin

Name	Sequenz 5' → 3'
β-Actin	ATT GTT ACC AAC TGG GAC GAC ATG CTT CAT GAG GTA GTC TGT CAG GTC
GILZ	CTC TCA ACC CCA TTC TAT GTA GGC AGA GAT GGG AGA GAT TG
CD95L	TTC ACT CCA GAG ATC AGA GCG G CAG CAG TGC CAC TTC ATC TTG G
C-FLIP	CTG ATG GAG ATT GGT GAG AGC GAG CGA AGC CTG GAG AGT ATT
Bcl-2	CGA CTT CGC CGA GAT GTC CAG CCA G ACT TGT GGC CCA GAT AGG CAC CCA G
CD95L Promotor Klonierung UP	CCT GAA GCT TGG CAC CCA GCC CCA GGA AAG G
CD95L Promotor Klonierung „500“	CCT GAG ATC TCA GGG GAA GTG GGA TGG ATA G
CD95L Promotor Klonierung „1500“	CCT GAG ATC TTG ATA TTT TGA ATC CTC TAT G
CD95L Promotor Klonierung „3000“	CCT GAG ATC TAT GGT GGT GAA CAT CTG TAA T

Die verwendeten DNA-Oligos und Primer wurden von Sigma-ARK im Auftrag synthetisiert.

#### 4.1.7 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Autoradiographiehüllen	Rego
Autoradiographiekassetten	Suprema
1205 Betaplate Counter	Wallac
Blotapparatur Semi-Dry 20 x 25 cm	CTI

Brutschrank Stericult 200 Inkubator	Forma Scientific
Steril Guard Hood	The Baker Company
Durchflußzytometer FACScan	Becton Dickinson
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Micro Cell Harvester	Skatron
Pipetten: P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Electronics
Elektoporationsgerät Gene Pulser II	Biorad
Nucleofector Elektroporator	Amaya
Gefrierschränke -20°C	Liebherr
Gefrierschränke -80°C	Forma Scientific
Gelelektrophoresekammer Horizon 11.14	Gibco BRL
Gelelektrophoresekammer SDS-PAGE	CTI
Heizbad	Köttermann
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Mikroskope:	
Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
Phasenkontrastmikroskop	Leitz
Mikrowellengerät HMG730B	Bosch
Mini-Gelelektrophoresekammer	Biorad
Netzgerät Electrophoresis Power	Renner
pH-Meter Calimatic	LHD Labortechnik
Photoeinheit:	
UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
Kamera RA1	Kaiser
Video Graphic Printer UP-860 CE	Sony
Photometer U-1100	Hitachi
Quarzküvetten Suprasil	Hellma
DuoLumat LB9507	EG&G Berthold
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160	Agfa-Gevaert
Schüttelinkubator Certomat HK	Braun
Szintillationszähler	LHD Labortechnik

Gene Amp PCR system 9700	PE Applied Biosystems
Vakuumentrifuge 100H	Bachofer
Sterilarbeitsplatz SG600	Baker Company
Analysenwaage AE 240	Mettler
Präzisionswaage PE 3600	Mettler
Neubauer Zählkammer	HBG
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus
Biofuge Fresco	Heraeus
Megafuge 1.0R	Heraeus
Omnifuge 2.0RS	Heraeus
Centrifuge 5402	Eppendorf
Sorvall RC 3B Plus, 5C Plus	DuPont

## 4.2 METHODEN

### 4.2.1 ZELLKULTUR

#### 4.2.1.1 KULTIVIERUNG EUKARYONTISCHER ZELLEN

Alle Arbeiten zur Kultivierung höherer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder anderen Pilzen zu vermeiden, und wurden daher in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Renner, Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet. Die verwendeten Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

RPMI 1640 Medium: Jurkat Klone

Humanes T-Zellmedium: primäre humane T-Zellen

Murines Zellmedium: primäre murine T-Zellen; DC27.1

Es wurde darauf geachtet, daß die Dichte von primären T-Zellen etwa bei  $2 \times 10^6$  Zellen/ml und von T-Zelllinien etwa bei  $3 \times 10^5$  Zellen/ml lag. Suspensionskulturen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:6 mit frischem Kulturmedium versehen.

#### 4.2.1.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Um in flüssigen Stickstoff gelagerte Zellen (Jurkat und DC27.1) zu rekultivieren, wurden die tiefgefrorenen Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut, in 50 ml Medium überführt und pelletiert. Zweimaliges Wiederholen des Waschvorgangs reduziert den Anteil an Einfriermedium auf ein nichttoxisches Maß. Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesäht und am darauffolgenden Tag umgesetzt.

Zum Aufbewahren von Zellen in flüssigen Stickstoff wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen in exponentieller Wachstumsphase in 0,5 ml FCS aufgenommen und in vorgekühlte Einfrierröhrchen gegeben. Nach Zugabe des gleichen Volumens kalten Einfriermediums, wurde die Zellsuspension unmittelbar bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren. Nach 24 Stunden wurde das Einfrierröhrchen bis zur Rekultivierung der Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Die hohe Dielektrizitätskonstante von DMSO verhindert die Bildung zerstörerischer Eiskristalle bei tiefen Temperaturen, bewirkt jedoch oberhalb und im Bereich des Gefrierpunkts die Solubilisierung der Zellmembran. Um die toxischen Eigenschaften von DMSO zu minimieren, muß bis zum Zeitpunkt des Einfrierens ständig gekühlt werden und zusätzlich sehr rasch gearbeitet werden.

#### 4.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

##### 4.2.2.1 KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Das Absorptionsspektrum von doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren hat sein Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde deshalb mittels eines Spektralphotometers deren Extinktion (Optische Dichte, OD) bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt und wie folgt errechnet:

$$\begin{aligned} \text{OD}_{260} (\text{dsDNA}) \times 50 \times \text{Verdünnung} &= c_{(\text{dsDNA})} [\text{mg/ml}] \\ \text{OD}_{260} (\text{ssDNA}) \times 33 \times \text{Verdünnung} &= c_{(\text{ssDNA})} [\text{mg/ml}] \\ \text{OD}_{260} (\text{RNA}) \times 40 \times \text{Verdünnung} &= c_{(\text{RNA})} [\text{mg/ml}] \end{aligned}$$

Verunreinigungen in Nukleinsäurepräparationen stellen neben den Fällungsreagenzien vornehmlich zelluläre Proteine dar. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt, ergibt sich aus dem Quotienten der Extinktionen bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm ein Parameter für die Reinheit der Nukleinsäurelösung: Üblicherweise liegt der  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotient bei 1,8 für DNA- und 1,6 für RNA-Präparationen.

##### 4.2.2.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

###### Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, 20°C) und das Pellet in 500 µl STET-Puffer (8 % Sucrose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µl Lysozym-Lösung (50 mg/ml) wurden die Bakterien 3 min bei RT lysiert. Danach wurde für 90 s bei 95°C inkubiert, um Proteine zu denaturieren, und der Debris abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das

Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 0,5 ml Isopropanol und 50 µl Ammoniumacetat (8 M) präzipitiert und sofort abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und danach in 30 µl TE oder sterilem Wasser gelöst. Um RNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurde 1 µl (500 µg/ml) DNase-freie RNase zugegeben.

### **Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab**

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Dafür wurden 400 ml LB-Medium in einem 1 l-Fernbachkolben mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit 500 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur oder einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (Sorvall GS-3, 10 min, 5000 rpm, 4°C) und die Bakterien in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 10 ml des Lysepuffers P2 zugegeben, und das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 wurden Proteine und chromosomale DNA gefällt, 20 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (Sorvall SS-34, 30 min, 20000 x g und 4°C). Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule (Qiagen-tip 500) aufgegeben, die zuvor mit 15 ml Puffer QBT äquilibriert worden war, wobei die Plasmid-DNA unter den gegebenen pH- und Salzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden blieb (1,6 M Salz, pH = 7,0). Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml-Röhrchen eluiert und mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (Heraeus Varifuge, 30 min, 6000 rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet in 5 ml eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend im Vakuum getrocknet und in 200 µl TE gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde diese durch Zugabe von TE auf 1 mg/ml eingestellt und die DNA bei -20°C gelagert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde nach Maxi-Präparation mittels Sequenzierung analysiert (SeqLab, Göttingen).

### **4.2.2.3 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA**

Zur Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen wurden  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen in 1,5 ml Lyse-Puffer mit 100 µl 10 % SDS und 0,5 mg Proteinase K bei 37°C über Nacht zur Lyse inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml 5 M NaCl hinzugegeben, 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und Proteine für 15 min bei 2500 rpm sedimentiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde mit 2 Volumen Ethanol für 20 min bei -80°C gefällt. Im nächsten Schritt wurde die DNA für 10 min bei 3000 rpm sedimentiert.

### **4.2.2.4 RNA-ISOLIERUNG UND REVERSE TRANSKRIPTION (RT)**

Die Isolierung von Gesamt-RNA eukaryontischer Zellen erfolgte unter Verwendung der TRIZOL-Methode (Gibco BRL), beruhend auf der Phenol-Chloroform-Methode, nach Angaben des Herstellers. Die Reverse Transkription (RT) eukaryontischer mRNA

erfolgte unter Verwendung des GeneAmp-Kits von Perkin Elmer nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2.2.5 DNA-AMPLIFIKATION DURCH POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) läßt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen zur Verfügung stellen. Im ersten Schritt hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer) mit der hitzedenaturierten einzelsträngigen DNA zu einem doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche dann im zweiten Schritt doppelsträngige DNA aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisiert. Durch Hitzeeinwirkung trennen sich die komplementären Einzelstränge im dritten Schritt und können schließlich erneut mit den Primern hybridisieren, so daß sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Verwendet wurde die PCR zur Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte zwecks Klonierung und zur Quantifizierung der mRNA-Expression mittels der RT-PCR.

Die RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) dient dazu, die Expression eines bestimmten Gens semiquantitativ zu bestimmen. Zunächst wurde die zelluläre Gesamt-RNA isoliert, anschließend wurde der mRNA-Anteil aufgrund seines charakteristischen polyA-RNA-Endes mit Hilfe der reversen Transkription (RT) in einzelsträngige DNA (ssDNA) übersetzt. Im dritten Schritt wurde die ssDNA mit Hilfe zweier spezifischer Primer amplifiziert und die qualitative Zu- oder Abnahme eines bestimmten Genprodukts untersucht.

Verwendet wurde das High Fidelity PCR Master Kit von Roche. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

---

300 nM	Sense-Primer
300 nM	Antisense-Primer
10 – 500 ng	Template DNA
25 µl	High Fidelity PCR Master
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

---

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

PCR zur Amplifikation von cDNA humanen Ursprungs:

Start		4 min bei 94°C
25-30	Denaturierung	30 s bei 94°C
Zyklen	Annealing	45 s bei 57°C
	Elongation	30 s bei 72°C
Termination		5 min bei 72°C

PCR zur Amplifikation von cDNA murinen Ursprungs:

Start		5 min bei 94°C
25-30	Denaturierung	1 min bei 94°C
Zyklen	Annealing	1 min bei 60°C
	Elongation	1 min bei 72°C
Termination		5 min bei 72°C

PCR zur Klonierung aus muriner genomischer DNA:

Start		4 min bei 94°C
38 Zyklen	Denaturierung	1 min bei 94°C
	Annealing	1 min bei 60°C
	Elongation	3,5 min bei 72°C
Termination		10 min bei 72°C

#### 4.2.2.6 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA

Es wurden etwa 1 - 2 µg Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Maxipräparation oder PCR-Produkte von genomischer PCR mit 2 U einer Restriktionsendonuklease im vom Hersteller angegebenen enzyspezifischen Puffer für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Wurden Doppelspaltungen mit zwei Restriktionsendonukleasen durchgeführt, wurde ein Puffersystem gewählt, in welchem beide Enzyme laut Herstellerangaben 100 % ihrer Aktivität, oder sofern dies in der gewählten Enzym-Kombination nicht möglich ist, höchstmögliche Aktivität aufwiesen. Die erhaltenen Fragmente konnten anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Folgende Restriktionsendonukleasen wurden eingesetzt:

Enzym	Spaltstelle	Firma
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	MBI Fermentas
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT	MBI Fermentas

#### 4.2.2.7 PHOSPHATASE-REAKTION

Um die monomolekulare Rückligation eines mit Restriktionsenzymen linearisierten Vektors beim Ligationsansatz zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen abgespalten. Dazu wurde zu den letzten 30 min des Restriktionsverdaus nach Angaben des Herstellers eine Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, CIP, Roche) gegeben.

#### 4.2.2.8 ANALYTISCHE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

PCR-Produkte und durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente können im analytischen Agarosegel (TBE/0,8 - 2 % Agarose/0,00001 % Ethidiumbromid) mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Dazu wurden sie mit DNA-Probenpuffer versehen, in Geltaschen pipettiert und 30 -120 min bei 80 – 120 V aufgetrennt. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben die zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch (GeneRuler 100 bp oder 1 kb ladder, MBI Fermentas) aufgetragen.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung ( $\lambda = 254$  nm) sichtbar gemacht und photographiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle und führt so durch Anregung mit UV-Licht zu violetter Fluoreszenz (Emissionswellenlänge  $\lambda = 605$  nm).

#### 4.2.2.9 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS EINEM AGAROSE-GEL

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Gel zum Zwecke der weiteren Klonierung wurde der Gel-Extraction-Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde das zu extrahierende DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit drei Volumenanteilen des Puffers QG für 10 min bei 50°C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde 1 Volumen 2-Propanol zugegeben, gemischt, die Probe auf eine QIAquick-Säule gegeben und für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule durch Zentrifugation (1 min, 10000 rpm) mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule durch erneute Zentrifugation (1 min, 10000 rpm) getrocknet. Das DNA-Fragment wurde mit 30 µl des Puffers EB (Tris-HCl, pH 8,5) eluiert, indem die Säule hiermit für 1 min inkubiert und anschließend abzentrifugiert wurde (1 min, 10000 rpm).

#### 4.2.2.10 LIGATION VON DNA

Für die Ligation wurde die geschnittene Vektor-DNA mit der zu inserierenden DNA gemischt, so daß eine etwa dreifach höhere Konzentration der Insertions-DNA vorlag. Dieses Gemisch wurde in Ligationspuffer mit 2 U T4-DNA-Ligase für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder für 16 Stunden bei 14°C inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten Bakterien verwendet.

#### 4.2.2.11 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Um Bakterien zu transformieren, ist es notwendig, ihnen die entsprechende Kompetenz zu verleihen. Hierzu wurden 2 bis 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 1000 ml LB-Medium versetzt und bis zu einer Zelldichte von 0,5 bis  $1 \times 10^8$  Zellen/ml (turbidimetrisch bestimmt, entsprechend einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 bis 1) inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Bakterien 15 min bei 4000 rpm und 4°C (Sorvall GS-3 oder Beckman JLA 10,500) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mehrmals mit eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde nach dem letzten Waschschrift mit 2 ml 10 % Glycerol resuspendiert und in Aliquots zu 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden Bakterien des *E.coli*-Stammes DH5α verwendet. Jeweils 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 1-100 ng Plasmid DNA gemischt. Die Transformation erfolgte im Gene Pulser (Biorad) bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF. Dann wurden die Bakterien 1 h bei 37°C in LB-Medium inkubiert und anschließend auf mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Agar über Nacht kultiviert.

#### 4.2.2.12 ISOLIERUNG VON KERNPROTEINEN

Zur Präparation von nukleären Proteinen (unter anderem Transkriptionsfaktoren) zur Verwendung im EMSA wurden  $2 \times 10^6$  Zellen zur Lyse in 400 µl Puffer A für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach 10 s Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Zellkernenthaltende Pellet in 100 µl Puffer C zur Lyse der Zellkerne resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand für EMSA-Experimente verwendet (Andrews and Faller, 1991).

#### 4.2.2.13 HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN

Die Hybridisierung kurzer, komplementärer Oligonukleotide dient der Herstellung kurzer Fragmente doppelsträngiger DNA zur Verwendung im EMSA. Hierzu wurden je 250 pmol jedes Oligonukleotid-Einzelstrangs mit 8,3 µl 3 M NaCl und 91,7 µl H<sub>2</sub>O für 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### 4.2.2.14 RADIOAKTIVE ENDMARKIERUNG VON DNA-OLIGONUKLEOTIDEN

Um die Bindung von Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) an DNA im EMSA-Gel sichtbar zu machen, wurden die verwendeten Oligonukleotide an ihren Enden radioaktiv markiert und per Autoradiographie nachgewiesen. Die radioaktive Markierung erfolgte mittels der T4-terminalen Polynukleotid-Kinase, die 5'-OH Enden von Nukleotiden mit einem Phosphatrest markiert.

Es wurden 5 pmol hybridisiertes Oligonukleotid mit 2.5000 Ci/mmol [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 10 U T4-TPK und dem mitgelieferten Puffer in einem Volumen von 25  $\mu$ l gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Freie Nukleotide wurden mit Hilfe von MicroSpin G-25 Säulen (Amersham) von den nicht eingebauten radioaktiven Oligonukleotiden getrennt. Anschließend konnten die Oligonukleotide direkt im EMSA eingesetzt werden.

#### 4.2.2.15 GELSHIFT UND SUPERSHIFT ASSAY (EMSA)

Es wurden 2,5 - 5  $\mu$ g Protein (bzw. 0,5  $\mu$ g *in vitro* translatiertes Protein) mit 6  $\mu$ l 5 x EMSA-Puffer, 1  $\mu$ l Glycerin, 0,1  $\mu$ l DTT, 2  $\mu$ l poly [d(I-C)] (Roche) und  $^{32}$ P-markierten DNA-Oligonukleotiden in einem Volumen von 30  $\mu$ l inkubiert (30 min, Raumtemperatur). Im Falle des Supershifts mit Antikörpern (1  $\mu$ g) bzw. Kompetition mit nicht-radioaktivem Oligonukleotid (50 – 200-facher Überschuß) wurden die Proteine zuvor mit dem Antikörper bzw. dem nicht-radioaktiven Oligonukleotid für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit EMSA-Puffer versetzt und auf einem nativen 6 %-Polyacrylamidgel aufgetrennt (140 V, 1 –3 h). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 90 min bei 80°C unter Vakuum getrocknet und die Komplexe über Autoradiographie detektiert.

### 4.2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

#### 4.2.3.1 PRÄPARATION PRIMÄRER HUMANER T-ZELLEN

Alle Waschschrte wurden mit sterilem PBS oder RPMI ohne FCS durchgeführt. 500 ml Vollblut von gesunden Spendern wurden mit 1 ml Heparin (Braun, Melsungen) versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu vermeiden. Je 15 ml Ficoll Trennlösung (Separating Solution, Biochrom, Berlin) wurden mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen (1000 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 6 und 900 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2) und in 200 ml RPMI/FCS aufgenommen. Anschließend wurden Monozyten und Makrophagen, d.h. adhärenente Zellen, depletiert, indem die Zellen auf 2 große Kulturflaschen verteilt und mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Nicht-adhärenente Zellen, d.h. die Lymphozyten, wurden abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm/10 min/20°C). Die Lymphozyten wurden mit RPMI/FCS auf  $8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit 2% AET-Erythrozyten (s.u.) gemischt (Rosettierung). Das Gemisch wurde zentrifugiert (1000 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2), der Überstand bis auf 20 ml abgenommen und das Pellet (Rosetten) vorsichtig wieder resuspendiert. Die Rosetten wurden auf 15 ml Ficoll geschichtet und

zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Das Pellet aus T-Zellen und Erythrozyten wurde gewaschen (1200 rpm/10 min/20°C), und dann mit dem vierfachen Volumen (bezogen auf das Pellet) an ACK-Puffer (frisch verdünnt aus 10 x Puffer: 41,45g NH<sub>4</sub>Cl, 5g KHCO<sub>3</sub>, 0.186g EDTA, pH 7,27 ad 500 ml Wasser) lysiert. Dazu wurden Pellet und ACK-Puffer durch Pipettieren bis zur Lyse vermischt. Die Lyse der Erythrozyten zeigt sich durch einen Farbumschlag von trüb hellrot nach klar dunkelrot. Nach einem Waschschrift wurde dann mit RPMI/FCS auf 50 ml aufgefüllt, und die T-Zellen mit RPMI/FCS auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde mit 1 µg/ml des Lectins PHA über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und mit 25 U/ml IL-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

### **AET-Erythrozyten**

Alle Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 20°C durchgeführt. 0.5 g 2-Aminoethylisothiuroniumbromid (AET, Sigma) wurden in 12,5 ml pyrogenfreiem Wasser bei pH 9,0 (mit 2N NaOH einstellen) gelöst und sterilfiltriert. 25 ml eines 1:1 Gemisches aus Hammelblut und Alsever-Lösung (GibcoBRL) wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, zur AET-Lösung zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde viermal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich eine 2 %ige Suspension in RPMI/FCS hergestellt, die bis zu 3 Tagen haltbar war.

### **4.2.3.2 PRÄPARATION PRIMÄRER MURINER T-ZELLEN UND THYMOZYTEN**

#### **T-Zellen**

Die Tötung der Mäuse erfolgte entweder durch Genickbruch oder durch Asphyxie in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Milz und die mesenterialen Lymphknoten wurden mit sterilem Präparierbesteck entnommen und in 4°C kaltes RPMI-Kulturmedium überführt. Nach Reinigung der Organe von Fettgewebe mit kleinen Pinzetten wurden diese durch ein Zellsieb (40 µm Maschendichte, Falcon) gedrückt. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde mit RPMI-Kulturmedium gewaschen (1500 rpm, 5 min). Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation in ACK-Puffer, welcher die Erythrozyten durch osmotischen Schock zum Platzen bringt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die adhärenen Zellen depletiert, indem die Zellen in einem Volumen von 50 ml Kulturmedium in einer liegenden 250 ml-Zellkulturflasche für eine Stunde im Brutschrank (37°C) inkubiert wurden. Die adhärenen Zellen haften an der Wand der Plastikflasche, wohingegen die nicht-adhärenen Zellen weiter verwendet wurden. Die B-Zell-Depletion erfolgte durch eine Inkubation für 2 Stunden in einer Kulturflasche, die zuvor mit 10 µg/ml Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper in PBS für 3 Stunden im Brutschrank beschichtet wurde. B-Zellen binden an den an die Flasche gekoppelten Antikörper, wohingegen die nicht-haftenden Zellen nach einem Waschschrift mit einer Dichte von 2x10<sup>6</sup> Zellen / ml in Maus-T-Zell-Medium aufgenommen wurden. Die Reinheit der T-Zellen wurde per anti-TCRαβ-Antikörperfärbung im FACS überprüft. Anschließend wurde mit 5 µg/ml ConA über

Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 25 U/ml IL-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

### **Thymozyten**

Der Thymus wurde der getöteten Maus mit sterilem Präparierbesteck entnommen und in 4°C kaltes RPMI-Kulturmedium überführt. Nach Reinigung von Fettgewebe wurden diese durch ein Zellsieb (40 µm Maschendichte, Falcon) gedrückt. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde mit RPMI-Kulturmedium gewaschen (1500 rpm, 5 min).

#### **4.2.3.3 MAGNETISCHES SORTIEREN VON PRIMÄREN T-ZELLEN**

Subpopulationen primärer humaner und muriner T-Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Beads separiert. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern, welche an super-paramagnetische Micro-beads gekoppelt sind. Dazu wurde das MACS-System von Miltenyi bzw. das Dynabeads-System von Dynal nach Angaben der Hersteller verwendet.

#### **4.2.3.4 FLUORESCENZMARKIERUNG VON ZELLEN MIT CFSE**

Wurden unterschiedlich behandelte Zellen für einen *in vitro* Versuch gemischt, so wurde eine der Populationen zur späteren Identifikation im FACS mit einem Fluorochrom markiert. Dazu wurde das nicht-toxische Fluorochrom CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) gewählt, welches nach Eindringen in die Zelle durch eine nicht-spezifische Esterase gespalten wird und danach im Zytoplasma der Zelle für Tage verbleibt. Proliferiert die Zelle, so wird die Menge an CFSE bei jeder Teilung in den Tochterzellen halbiert. Dieser Verlust an Fluoreszenzintensität kann im FACS detektiert werden. Zum Markieren wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 µM CFSE in 1 ml PBS resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 1 ml FCS gestoppt und die Zellen anschließend mindestens 3 mal mit je 50 ml Zellkulturmedium gewaschen.

#### **4.2.3.5 FACSCAN-ANALYSE VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN**

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung im Durchflußzytometer (FACScan bzw. FACSCalibur, Becton Dickinson) bestimmt. Dazu wurden  $3 - 5 \times 10^5$  Zellen durch fünfminütige Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Megafuge 3.OR) pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die in 50 µl resuspendierten Zellen 15 min mit monoklonalem Erstantikörper bei 4°C inkubiert. Dabei wurden gereinigte monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 1-10 µg/ml eingesetzt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einmalige Zugabe von 1 ml PBS, anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm und Dekantieren des Überstandes entfernt. Die eigentliche Fluoreszenzfärbung erfolgte durch 15 minütige Inkubation bei 4°C mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten

Zweitantikörper (1-10 µg/ml). Alternativ wurde ein direkt fluoreszenzmarkierter Erstantikörper verwendet. Nach Abschluß der Färbereaktion wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und im FACScan gemessen. Zweimaliges Waschen mit PBS und Fixierung der gebundenen Antikörper mit 300 µl PBS/1 % Formaldehyd ermöglichten eine Aufbewahrung der markierten Proben über mehrere Wochen bei 4°C im Dunkeln.

Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden durch eine Kapillare in das Durchflußzytometer FACScan eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge  $\lambda = 488$  nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts war dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wurde von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe (forward scatter, FSC), Granularität (side scatter, SSC) oder Fluoreszenz (fluorescence detector, FL) gaben.

#### **4.2.3.6 INTRAZELLULÄRE FACSCAN-ANALYSE**

Um Proteine zu analysieren, die intrazellulär exprimiert bzw. gespeichert werden, wurden Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert bevor sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen zentrifugiert, in 100 µl PBS aufgenommen und in ein 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch getropft, das auf -20°C gekühlt war. Darin wurden die Zellen für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, mit 0,5 ml PBS/1% BSA/0,1% Saponin gewaschen, in 100 µl PBS/1% BSA/0,1% Saponin mit 1 µg/ml spezifischem Antikörper resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 0,5 ml PBS/1% BSA/0,1% Saponin gewaschen und in 100 µl eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweitantikörpers (10 µg/ml) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und im FACScan analysiert.

#### **4.2.3.7 MESSUNG APOPTOTISCHER ZELLEN**

Mit Hilfe zahlreicher unterschiedlicher Methoden lassen sich verschiedene Veränderungen während des Zelltodes detektieren und der Anteil lebender bzw. toter Zellen in einer Population bestimmen. Im folgenden sind drei Methoden beschrieben, die während der Arbeit verwendet wurden, wobei die FSC/SSC-Analyse die am häufigsten verwendete war, teilweise in Kombination mit Propidiumiodid-Ausschluß.

##### **Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderungen (FSC/SSC-Analyse)**

Das Schrumpfen von Zellen während der Apoptose aufgrund veränderter Membranorganisation, Zerstörung von Komponenten des Zytoskeletts und aufgrund von Zellmassenverlust durch Abschnürung von Apoptotischen Körperchen (Kerr et al., 1972) ist ein morphologisches Charakteristikum des apoptotischen Zelltods. Von lebenden Zellen lassen sich apoptotische Zellen daher im FACS aufgrund ihres geringeren FSC-Signals, d.h. Größe, unterscheiden. Darüber hinaus weisen apoptotische Zellen eine modifizierte Organisation von Kern und Zytoplasma auf. Kondensiertes

Zytoplasma wird aufgrund der erhöhten Granularität als vergrößertes SSC-Signal im FACS sichtbar. Der Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation ließ sich daher mittels FACS bestimmen: das FSC-Signal wurde gegen das SSC-Signal aufgetragen (FSC/SSC) und die Zellen ober- und unterhalb der sich ergebenden Diagonale zwischen den Populationen ausgewertet.

#### **Ausschluß von Propidiumiodid**

Der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid – als Propidiumiodid-Salz verwendet – wird unspezifisch von toten Zellen aufgenommen. Das Propidium-Kation ist nicht in der Lage, die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen zu überwinden und reichert sich daher nur in Zellen an, welche die Integrität der Plasmamembran bereits verloren haben (Tanke *et al.*, 1982). Zur Bestimmung per FACS wurden Zellen in 100 µl PBS kurz vor der Messung mit 100 µl Propidiumiodid-Lösung (5 µg/ml in PBS) versetzt. Anregung des Propidiumions erfolgte bei 535 nm. Die Emmission erfolgte über ein breites Spektrum um 617 nm und wurde daher im FL2 und FL3-Detektor gemessen.

#### **Bestimmung von Zellkernen mit subdiploidem DNA-Gehalt (Nicoletti-Methode)**

Mit Hilfe einer von Nicoletti *et al.* (1991) etablierten Methode lassen sich die unterschiedlichen Größen der polymeren genomischen DNA in apoptotischen und nichtapoptotischen Zellkernen detektieren. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 250 µl Nicoletti-Puffer über Nacht bei 4°C unter Lichtabschluß lysiert. Die Pufferbedingungen erlaubten die Zellyse ohne Zerstörung der Kerne und die Interkalation des roten Fluoreszenzfarbstoffes Propidium in die genomische DNA (Waring *et al.*, 1965). Propidium bildet mit den Basenpaaren der DNA einen *charge transfer*-Komplex aus, der in Abhängigkeit der Anzahl der Propidium-Basenpaar-Interaktionen zu einer bis zu 30fachen Fluoreszenzverstärkung führt (Arndt-Jovin *et al.*, 1989). Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen ließen sich daher im FL-2-Detektor des FACS die apoptotischen Zellkerne als subdiploider DNA-Peak ausmachen.

Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet:  $[(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose})] \times 100$ .

#### **4.2.3.8 [<sup>3</sup>H]-dTHYMIDIN-EINBAU TEST**

Proportional zur Proliferation von Zellen erfolgt die DNA-Verdopplung. Der Einbau von Tritium-markiertem Desoxythymidin in neusynthetisierte DNA ermöglicht daher die Bestimmung der Zellproliferation über die Messung der eingebauten Radioaktivität. Jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und mit den gewünschten Stimuli inkubiert. Nach Abschluß der Inkubationszeit wurde 10 µl [<sup>3</sup>H]-dThymidin-Lösung (5 µCi/Ansatz) zu den Ansätzen gegeben und die Zellen durch Einbau von [<sup>3</sup>H]-dThymidin in neusynthetisierte DNA über 16 h radioaktiv markiert. Die Platten wurden im Micro Cell harvester (Skatron, Norwegen) geerntet und die Radioaktivität anschließend im 1205 Betaplate Counter (Wallac, Finnland) bestimmt.

#### 4.2.3.9 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON T-ZELLINIEN

Für die transiente Transfektion von Jurkat und DC27.1 Zellen wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm), in je 400  $\mu$ l Kulturmedium resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe von 10 bis 30  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde kurz gemischt und mit 960  $\mu$ F und 240 V (Jurkat) bzw. 280 V (DC27.1) elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension zügig in 24-Loch Zellkulturplatten überführt, in die 1,6 ml Kulturmedium vorgelegt waren. Um die Transfektionseffizienz und die Überlebensrate zu erhöhen wurden die Zellen direkt vor und nach der Transfektion für 5 min auf Eis inkubiert.

#### 4.2.3.10 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON PRIMÄREN HUMANEN T-ZELLEN

Zur transienten Transfektion von primären humanen T-Zellen wurde die Nucleofector Technologie von Amaxa verwendet. Diese beruht auf nicht-viralem Gen-Transfer in stimulierte, aber auch unstimulierte humane T-Zellen mittels einer modifizierten Elektroporation. Dabei wird mit Hilfe einer Zelltyp-spezifischen Lösung und Pulsfolge während der Elektroporation die Plasmid-DNA unabhängig vom Zellzyklus direkt in den Zellkern transferiert. Dies ermöglicht eine schnelle (4 – 8 Stunden) Detektion der Genexpression. Lösung und Puls sind für jeden Zelltyp und Stimulationszustand optimiert. Es wurden  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen in PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l Transfektionslösung aufgenommen, mit 1 – 5  $\mu$ g DNA versetzt und im Nucleofector elektroporiert. Für frisch präparierte und kurzzeit stimulierte T-Zellen wurde die T cell solution und der Puls U14 verwendet, für T-Zellen, die seit 5 Tagen stimuliert waren, wurde die solution 3059 und der Puls T14 verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde ein GFP-Plasmid cotransfiziert. Nach 5 bzw. 16 h wurde die Effizienz im FACS bestimmt. Bei frisch präparierten und kurzzeit stimulierten T-Zellen lag sie bei ca. 60 %, bei T-Zellen, die seit 5 Tagen stimuliert waren bei 30 – 40 % der lebenden Zellen. Da 10 - 40 % der Zellen durch die Transfektion starben, wurde vor weiteren Experimenten zur Separation der überlebenden Zellen eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

#### 4.2.3.11 GEWINNUNG VON LZ-CD95L

Zur Gewinnung von LZ-CD95L (Walczak et al., 1999) wurden CV-1/EBNA Zellen durch die DEAE-Dextran Methode transient transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $3 \times 10^6$  Zellen pro 150  $\text{cm}^3$  Flasche ausgesät ( $10^5$  Zellen/ml). Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-85 % erreicht, wurde die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden pro 150  $\text{cm}^3$  Flasche 15  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA mit 187,5  $\mu$ l DEAE-Dextran (4 mg/ml in TBS; Sigma) in DMEM-F12/FCS/75  $\mu$ M Chloroquin (Stammlösung 10 mM in PBS; Sigma) in einem finalen Volumen von 1,5 ml gemischt. Das Kulturmedium wurde von den Zellen entfernt, durch DMEM-F12/FCS/Chloroquin ersetzt und das DNA-Dextran-Gemisch zugegeben. Nach Inkubation für 4,5 h im Brutschrank wurde das Chloroquin-Medium entfernt und die Zellen mit

DMEM/FCS/10% DMSO für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DMSO-Medium abgenommen und die Zellen in DMEM-F12 kultiviert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und damit auch abgestorbene Zellen entfernt. Die Zellen wurden 7 Tage kultiviert und der Überstand gesammelt. Die Konzentration an LZ-CD95L in der Stocklösung betrug 5 µg/ml.

#### 4.2.3.12 RADIOAKTIVES MARKIEREN VON ZELLEN

Für die Markierung von neusynthetisierten Proteinen durch die radioaktiven Aminosäuren [<sup>35</sup>S] Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein wurden exponentiell wachsende Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Methionin/Cystein-Mangelmedium aufgenommen. Nach einer Stunde bei 37°C wurde 0,5 mCi [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (Pro Mix, Amersham) pro 3 x 10<sup>7</sup> Zellen zugegeben und die Zellen für 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach standen die Zellen für weitere Versuche zur Verfügung.

#### 4.2.3.13 LUZIFERASE BESTIMMUNG

Für Luziferase-Experimente wurden Jurkat bzw. DC27.1 Zellen mit 5 - 10 µg Luziferase-Reporter-Plasmid und 5 µg eines Plasmids, das für das zu untersuchende Effektorprotein kodiert oder Leervektor transient transfiziert. Nach 24 h wurden Aliquots für 12 - 16 h unterschiedlich stimuliert bzw. unstimuliert kultiviert. Um die Transfektionseffizienz zu vergleichen, wurden 3 µg eines Plasmids kotransfiziert, das für nicht-induzierbare Renilla-Luziferase kodiert. Die Zellen wurde im Lyse-Puffer des dual luciferase assay system (Promega, Heidelberg, Germany) lysiert. Luziferase Experimente wurden mit Hilfe des DuoLumat LB9507 (Berthold, Wildbach, Germany) gemessen.

#### 4.2.3.14 INTRAVENÖSE SEB-INJEKTION UND DEXAMETHASON-BEHANDLUNG VON MÄUSEN

Es wurden 100 µg SEB (staphylococcal enterotoxin B, Sigma) in 250 µl PBS gelöst und intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Superantigene wie SEB binden an bestimmte TCR Vβ Moleküle und stimulieren damit eine große Anzahl von T-Zellen zur Proliferation. SEB führt *in vivo* zu einer Expansion der Vβ8<sup>+</sup> T-Zellen (mit einem *peak* etwa an Tag 3-4) und einer anschließenden Deletions-Phase (Tag 5-14). Die Vβ8-T-Zell-Population wird auf 30-40% der ursprünglichen relativen Zellzahl reduziert, kehrt jedoch nach etwa 3 Wochen zur normalen Populationsgröße zurück (Bonfoco *et al.*, 1998; Hildeman *et al.*, 2002a). Die Dexamethason-Behandlung von Mäusen erfolgte ab Tag 3 nach der SEB-Injektion über die Verabreichung der wasserlöslichen Form von Dexamethason (Dexamethason-21-Phosphat, Sigma) im Trinkwasser (20 mg/l). Dexamethason-21-Phosphat wird im Serum der Maus in die aktive Komponente Dexamethason umgewandelt und hat dort eine Halbwertszeit von etwa 5 Stunden (Clarke's Isolation and Identification of drugs, 2nd ed., p.518, 1986).

#### 4.2.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

##### 4.2.4.1 *IN VITRO* TRANSLATION VON PROTEIN

Die *in vitro*-Transkription/Translation von Proteinen wurde mit Hilfe des TNT T7 gekoppelten Transkriptions/Translations-System von Promega durchgeführt. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet:

10- 40 µl	TNT T7 Quick Master Mix
2 µl	[ <sup>35</sup> S]-Methionin (10 mCi/ml)
0,5 – 4 µg	Template-DNA

Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend in EMSA-Experimenten verwendet. Kontrolliert wurde die *in vitro* Translation durch Auftrennung der Proben per SDS-PAGE und Autoradiographie des getrockneten Gels.

##### 4.2.4.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen (Laemmli, 1970) mit 7,5-15 % (w/v) Acrylamid-Trenngel und einem 5 % (w/v) Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Die Gele hatten folgende Dimensionen:

Große Gele:

Sammelgel: 233 mm x 12 - 27 mm x 1,5 mm

Trenngel: 233 mm x 203 mm x 1,5 mm.

Mini-Gele:

Sammelgel: 85 mm x 20 mm x 1,5 mm

Trenngel: 85 mm x 70 mm x 1,5 mm

Die Gelzusammensetzung ist in Kapitel 4.1.2. aufgeführt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt, die Geloberfläche durch Tupfen mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation (10 min) wurden die Gele beladen. Proteinlösungen wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95°C inkubiert. Zylindergele aus der isoelektrischen Fokussierung wurden auf die Sammelgele gelegt und mit Agaroselösung (0,169M Tris/HCl, pH 8,8, 0,9 % (w/v) SDS, 9 % Glycerol, 1 % (w/v) Agarose, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) fixiert, die zuvor durch Aufkochen gelöst und mit DTT (Endkonzentration 50 mM) versetzt wurde. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 Volt für 12-20 Stunden. Bei radioaktiven Proben wurden die Gele getrocknet und autoradiographiert.

##### 4.2.4.3 WESTERN BLOT

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde ein "Semidry"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Pharmacia,

Freiburg) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und fünf Lagen befeuchtete Filterpapiere geschichtet. Der Transfer erfolgte bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  90 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS-T (0,05% Tween-20 in PBS) oder 2 – 5 % (w/v) BSA in TBS-T (0,05% Tween-20 in TBS) bei Raumtemperatur abgesättigt. Waschschritte wurden stets mit PBS-T oder TBS-T durchgeführt. Der Blot wurde zunächst dreimal gewaschen. Der Primärantikörper wurde in PBS-T oder TBS-T verdünnt (Hybridomüberstand: 1:5 - 1:20 Verdünnung und aufgereinigte Antikörper: 0,1-1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) und der Blot unter Schütteln für 16 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min gewaschen. Anschließend wurde ein Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20 000 in PBS-T mit 1 % Milchpulver oder TBS-T mit 2 – 5 % BSA) für 90 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend der Blot dreimal je 10 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die ECL-Methode (*enhanced chemiluminescence*). Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (Chemiluminescence-Kit, Amersham-Buchler) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert. Zur mehrmaligen Verwendung von Western Blots wurde der zur Detektion verwendete Antikörper durch Inkubation der Membran für 20 min bei  $56^\circ\text{C}$  mit Stripping-Puffer entfernt. Nach mehrmaligem Waschen wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt und der Blot anschließend mit weiteren Antikörpern analysiert.

#### 4.2.4.4 IMMUNPRÄZIPITATION

Für die Immunpräzipitation wurden behandelte oder unbehandelte Zellen in Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne und unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ). Das so geklärte Lysat wurde dann für die Immunpräzipitation verwendet. Dazu wurden 2  $\mu\text{g}$  Antikörper durch eine Inkubation von mehr als 1 h bei Raumtemperatur an 30  $\mu\text{g}$  Protein A- oder G-Sepharose (Roche) gekoppelt. Die Immunpräzipitationen erfolgte für mehr als 1 Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  auf einem Überkopfschüttler. Anschließend wurde die Sepharosematrix durch Zentrifugation (3000 g, 30 s,  $4^\circ\text{C}$ ) entfernt und mehrfach in Lysepuffer gewaschen.

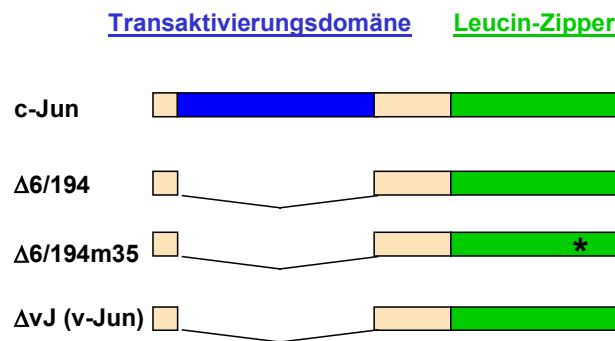
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 EINE NEUARTIGE FUNKTION FÜR FOSB IN DER REGULATION DES AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN ZELLTODS PRIMÄRER T-ZELLEN

Die Eliminierung reaktiver T-Zellen nach Beendigung der Immunreaktion erfolgt durch die Induktion von Apoptose über die Restimulation des TCR. Dieser als Aktivierungs-induzierte Zelltod (engl.: **activation-induced cell death**, AICD) bezeichnete Prozeß ist ein wichtiger Mechanismus, um die Anzahl reaktiver T-Zellen zu reduzieren, und wird hauptsächlich über das CD95-System vermittelt. Der CD95L ist nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert, wird aber nach TCR/CD3-Restimulation stark hochreguliert. Es gibt zahlreiche Hinweise, daß der Transkriptionsfaktor AP-1, bestehend aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Proteinfamilien, an der Induktion des CD95L während des AICD beteiligt ist (Kasibhatla *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2000).

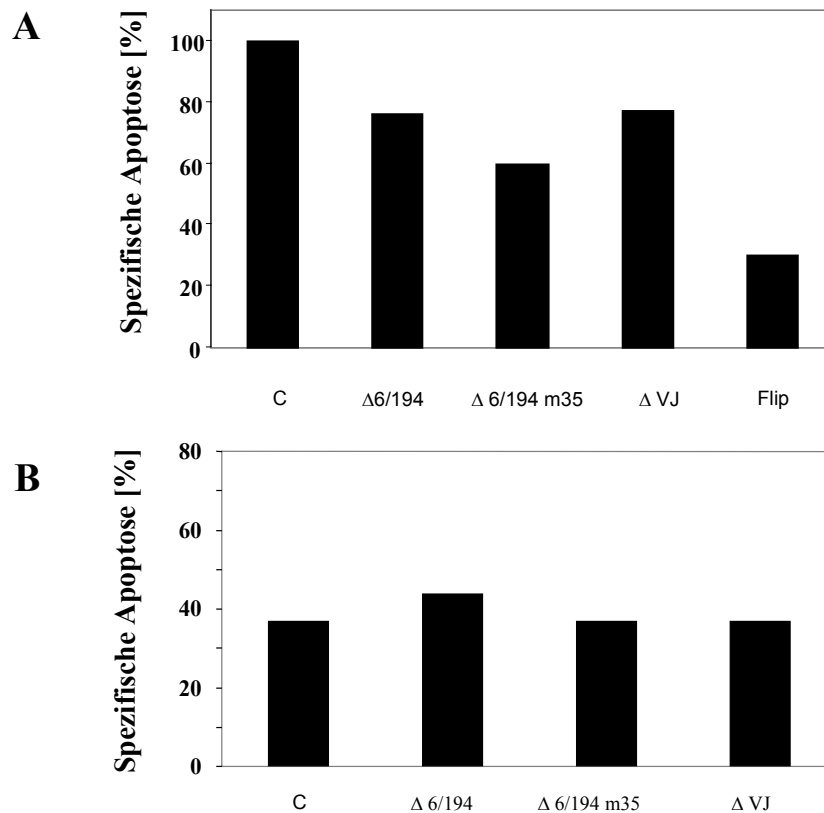
#### 5.1.1 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER AP-1 FAMILIE SIND AM AICD BETEILIGT

Um zu untersuchen, ob der AP-1 Transkriptionsfaktor am AICD von T-Zellen beteiligt ist, wurden Jurkat T-Zellen transient mit dominant-negativen (DN)-Mutanten von Jun (Abb. 8), c-FLIP<sub>s</sub> oder Leervektor zusammen mit einem GFP-(green fluorescent protein)-Expressionsplasmid transfiziert. Die Apoptoserate GFP-positiver Zellen wurde nach 36 h CD3-Stimulation ermittelt. Als Positiv-Kontrolle diente die Überexpression von c-FLIP<sub>s</sub> (Krueger *et al.*, 2001), welches die Signalübertragung von Todesrezeptoren nahezu vollständig inhibiert. c-FLIP-Überexpression resultiert in einer Inhibition des AICD (Abb. 9A). Die Expression von dominant-negativen Jun-Mutanten führt zu einer reduzierten TCR/CD3-vermittelten Apoptose (Abb. 9A).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der verwendeten dominant-negativen Jun-Konstrukte.** Die Mutanten enthalten die basische Leucin-Zipper-Domäne von c-Jun ( $\Delta 6/194$ ) oder v-Jun ( $\Delta vJ$ ), jedoch fehlt ihnen die Transaktivierungs-Domäne (Stein *et al.*, 1993). Die Mutante  $\Delta 6/194m35$  enthält zusätzlich einen Aminosäureaustausch in der Leucin-Zipper-Domäne, was zu einer verstärkten Hetero- und Homodimerisierung führt (H. van Dam, S. Müller und P. Angel, unveröffentlichte Daten). Somit heterodimerisieren die transfizierten Jun-Mutanten mit endogenen AP-1 Proteinen und inhibieren damit deren Aktivität.

Da TCR/CD3-induzierte Apoptose über das CD95/CD95L-System vermittelt wird, ist der Einfluß dominant-negativer Jun-Mutanten auf die Regulation des CD95L und/oder auf die Signalübertragung nach CD95-Stimulation zurück zu führen. Um den Mechanismus der Apoptose-Regulation durch Jun näher einzugrenzen, wurde ein Aliquot der transfizierten Zellen für 16 Stunden mit löslichem, trimerisiertem CD95L (LZ-CD95L) inkubiert. Die Expression dominant-negativer Jun-Mutanten zeigte keinen Einfluß auf die Apoptose in Anwesenheit von exogenem CD95L, und damit keinen Effekt auf die Signalübertragung unterhalb des CD95-Rezeptors (Abb. 9B).



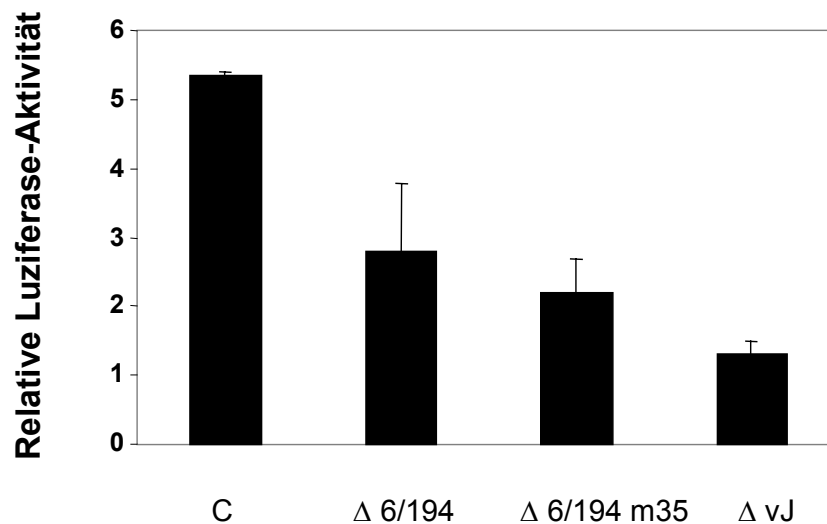
**Abbildung 9: Dominant-negatives Jun reduziert AICD, hat jedoch keinen Einfluß auf den CD95-vermittelten Signalweg.** (A) Jurkat T-Zellen wurden transient mit einem Expressionsplasmid, das für GFP kodiert, und dominant-negativen Jun-Konstrukten, c-FLIP<sub>s</sub> oder Leervektor (C) transfiziert. TCR/CD3-Stimulation erfolgte 24 h nach der Transfektion für 36 h. Die Messung der Apoptose GFP-positiver Zellen erfolgte durch FSC/SSC-Analyse im FACS. (B) Ein Aliquot der transient transfizierten Zellen aus (A) wurde für 16 h mit 500 ng/ml LZ-CD95L inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose GFP-positiver Zellen per FSC/SSC-Analyse im FACS ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß c-Jun oder einer seiner Dimerisierungspartner der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie in der TCR/CD3-induzierten T-Zell-Apoptose involviert ist und dieser Einfluß in der Signalkette vor der Aktivierung des CD95-Rezeptors zu finden ist.

### 5.1.2 C-JUN STEUERT ZUR INDUKTION DES CD95L DURCH TCR/CD3-STIMULATION BEI

Da in Gegenwart von dominant-negativem Jun der AICD reduziert ist, wurde getestet, ob dies auf eine verminderte CD95L-Expression nach TCR/CD3-Stimulation zurück zu

führen ist. Dies würde auf die Beteiligung einer AP-1-Aktivierung an der CD95L-Induktion nach TCR/CD3-Stimulation hindeuten. Jurkat T-Zellen wurden transient mit einem Luziferase-Reporter-Konstrukt transfiziert, welches ein 1204 bp-Fragment 5' vom Transkriptionsstart und 100 bp des 5' UTRs (5' untranslatierte Region zwischen Transkriptions- und Translationsstart)(-1204/+100) des humanen CD95L-Gens enthielt. Dieses Reporter-Konstrukt wurde durch TCR/CD3-Stimulation in Kontroll-Transfektionen 5-fach induziert (Abb. 10). Koexpression von dominant-negativem Jun reduzierte die CD95L-Induktion im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle um das 2 - 4-fache.



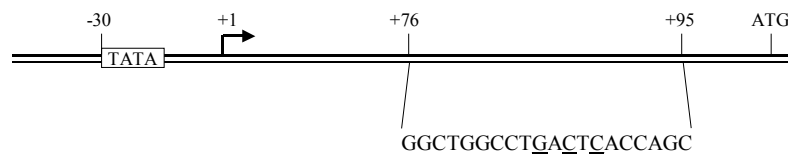
**Abbildung 10: Dominant-negatives Jun reduziert die CD3-vermittelte CD95L-Induktion.** Jurkat T-Zellen wurden mit einem (-1204/+100) CD95L-Luziferase-Reporter-Konstrukt und dominant-negativen Jun-Mutanten bzw. Leervektor (C) transient kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Dauer von 12 h mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert und anschließend die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die Zeitspanne zwischen transients Transfektion, der Bestimmung der Apoptoserate (60 h) und der Luziferase-Messung (40 h) weichen aus technischen Gründen voneinander ab. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß die drei DN-Jun-Konstrukte die Apoptose und die CD95L-Induktion unterschiedlich stark reduzieren.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß c-Jun oder einer seiner Dimerisierungspartner in der CD95L-Promoter-Aktivierung nach TCR/CD3-Stimulation involviert ist.

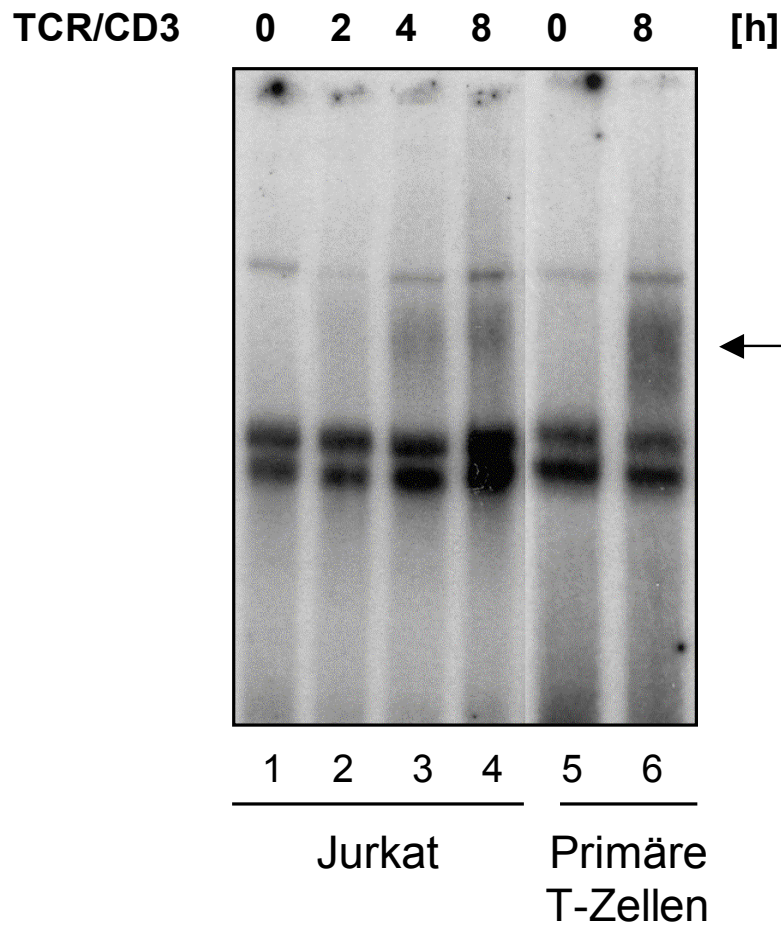
### 5.1.3 C-JUN UND FOSB BINDEN NACH TCR/CD3-STIMULATION AN DIE AP-1 BINDESTELLE IM CD95L 5' UTR

Behandlung von humanen Leberzellen mit Chemotherapeutika induziert die AP-1 (c-Jun/c-Fos) Bindung an eine AP-1 Bindestelle im 5' UTR des CD95L-Gens, welche für die CD95L-Induktion in diesem System notwendig ist (Abb. 11 und (Eichhorst *et al.*, 2000)).



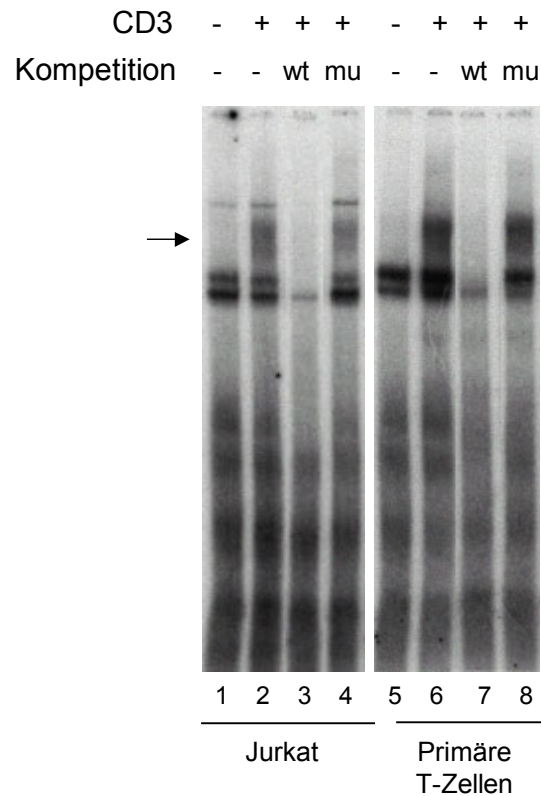
**Abbildung 11: Schematische Darstellung des CD95L 5' UTR.** Sequenz der AP-1 Bindestelle im humanen CD95L 5' UTR (Eichhorst *et al.*, 2000). Position +1 stellt den Transkriptionsstart dar, ATG markiert die Stelle des Translationsstarts, unterstrichen ist die AP-1 Bindestelle und die Nukleotide, welche in den Oligonukleotiden der EMSA-Experimente und den Konstrukten der Luziferase-Experimente mutiert sind. Weitere Erklärungen siehe Text und Anhang.

Es wurde getestet, ob diese AP-1 Bindestelle auch für die TCR/CD3-vermittelte CD95L-Induktion in T-Zellen verantwortlich ist. EMSAs mit einem Oligonukleotid, dessen Sequenz die AP-1 Erkennungsstelle im 5' UTR enthält (+75/+96), resultierten in der Induktion eines Protein/DNA-Komplexes mit Kernextrakten von Jurkat T-Zellen (Abb. 12, Spur 1-4) und restimulierten primären T-Zellen (Abb. 12, Spur 5-6) 8 Stunden nach TCR/CD3-Stimulation. Dieses Resultat deutet auf eine Bindung von AP-1 an diese Sequenz auch nach TCR/CD3-Stimulation hin.



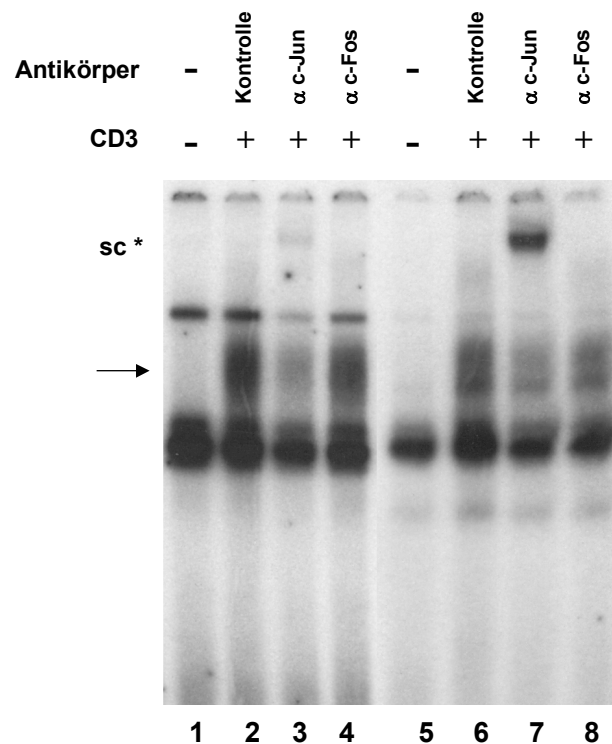
**Abbildung 12: Kinetik der stimulations-abhängigen Induktion des Protein/DNA-Komplexes.** EMSA mit dem +76/+95 Oligonukleotid des CD95L 5' UTRs. Spur 1-4: Verwendung von Kernextrakten von Jurkat T-Zellen, unstimuliert bzw. TCR/CD3 stimuliert für 2, 4 oder 8 h. Spur 5 und 6: Verwendung von Kernextrakten von primären Tag 6 T-Zellen, unstimuliert bzw. TCR/CD3 stimuliert für 8 h. Der Pfeil markiert die stimulations-abhängige Bande.

Kompetition mit 50-fachem molarem Überschuss an nicht-radioaktivem Oligonukleotid, welches die Wildtyp AP-1-Bindestelle enthält, führte zur Hemmung der Bildung dieses Protein/DNA-Komplexes (Abb. 13, Spur 3 und 7) nach TCR/CD3-Stimulation von Jurkat T-Zellen und primären humanen T-Zellen. Die Verwendung eines Oligonukleotids mit mutierter AP-1 Bindestelle führte zu keiner Veränderung in der Komplexbildung (Abb. 13, Spur 4 und 8). Diese Daten zeigen, daß es sich bei dem stimulations-abhängigen Komplex um eine spezifische Bindung von Proteinen der AP-1 Transkriptionsfaktor-Familie handelt, da eine Inhibition der Komplex-Bildung durch Kompetition nicht möglich ist, sofern das nicht-radioaktive Oligonukleotid eine Veränderung in der AP-1 Erkennungssequenz enthält.



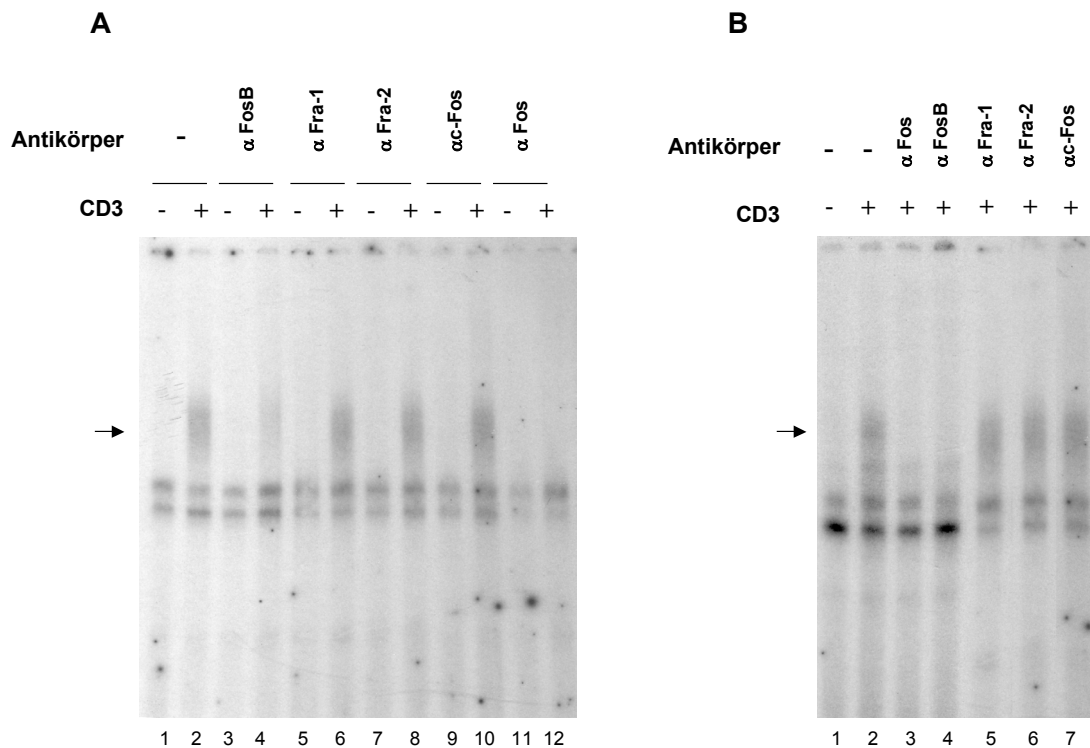
**Abbildung 13: TCR-induzierte Proteine binden an die AP-1 Stelle im 5' UTR.** Kompetition des Protein/DNA-Komplexes mit Wildtyp- (wt) oder mutiertem (mu) +76/+95 Oligonukleotid bei 50-fachem Überschuß. Spur 1-4: Kernextrakte von 8 h TCR/CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen, Spur 5-8: Kernextrakte von 8 h TCR/CD3-restimulierten primären Tag 6 T-Zellen. Der Pfeil markiert die stimulations-abhängigen Komplexe.

Zur weiteren Analyse wurde in *supershift*-Experimenten die Zusammensetzung dieses AP-1 Komplexes untersucht. Die Zugabe von c-Jun-spezifischen Antikörpern resultierte in einem Komplex, welcher zusätzlich zum Oligonukleotid und die daran gebundenen Transkriptionsfaktoren nun noch die an diese Proteine gebundenen Antikörper enthält, und deswegen eine höheres Molekulargewicht aufweist und im Gel mit geringerer Geschwindigkeit migriert (Abb. 14, Spur 3 und 7). Dagegen führte ein c-Fos-spezifischer Antikörper weder in Kernextrakten von Jurkat T-Zellen noch von primären T-Zellen zu einem *shift* (Abb. 14, Spur 4 und 8). Dies zeigt, daß es sich im Gegensatz zum AP-1 Komplex in humanen Leberzellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika (Eichhorst *et al.*, 2000) nicht um ein Dimer aus c-Jun und c-Fos handelt.



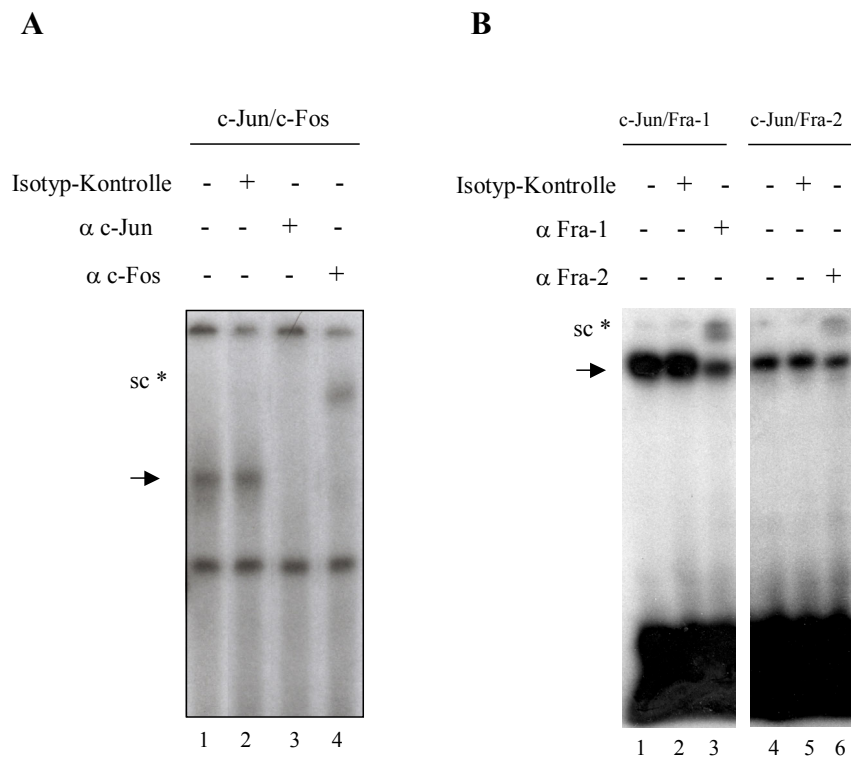
**Abbildung 14: Der TCR/CD3-induzierte AP-1 Komplex am 5' UTR beinhaltet c-Jun, nicht jedoch c-Fos.** EMSA-supershift mit Kernextrakten von TCR/CD3-stimulierten (8 h) Jurkat T-Zellen (Spur 1-4) und primären Tag 6 T-Zellen (Spur 5-8) in der Gegenwart spezifischer Antikörper bzw. einer Isotyp-Kontrolle. Der Pfeil markiert die stimulationsabhängige Bande, sc\* markiert den durch Antikörper *geshifteten* Komplex.

Um den Dimerisierungspartner von c-Jun im Komplex zu identifizieren, wurde ein Antiserum verwendet, welches alle bekannten Mitglieder der Fos-Unterfamilie von AP-1 erkennt. Sowohl in Kernextrakten von Jurkat T-Zellen als auch von primären T-Zellen führte dies zu einem Verlust des induzierten Komplexes im EMSA (Abb. 15A Spur 12 und Abb. 15B, Spur 3). Dieses Experiment zeigt, daß es sich bei dem Dimerisierungspartner von c-Jun in diesem Komplex um ein Mitglied der Fos-Familie handelt.



**Abbildung 15: Supershift zur Identifikation des Dimerisierungspartners von c-Jun im AP-1 Komplex des CD95L 5' UTR.** EMSA mit dem +76/+95 Oligonukleotid in der Gegenwart von spezifischen Antikörpern mit Kernextrakten von CD3-stimulierten (8 h) **(A)** Jurkat T-Zellen und **(B)** primären Tag 6 T-Zellen.

Um die Identität des Dimerisierungspartners von c-Jun weiter einzugrenzen, wurden Antikörper verwendet, welche einzelne Mitglieder der Fos-Familie individuell erkennen. Nur die Zugabe eines FosB-spezifischen Antikörpers reduzierte die Bildung des Komplexes in Gelshift-Experimenten sowohl mit Extrakten von Jurkat T-Zellen (Abb. 15A, Spur 4) als auch mit primären T-Zell-Extrakten (Abb. 15B, Spur 4).



**Abbildung 16: Spezifität und Funktionalität der verwendeten Antikörper.** *Supershift*-Experiment mit einem *consensus* TRE-Oligonukleotid. **(A)** EMSA mit *in vitro* translatiertem c-Jun und c-Fos mit bzw. ohne spezifischen Antikörpern gegen c-Jun oder c-Fos bzw. Isotyp-Kontroll-Antikörper. **(B)** EMSA mit *in vitro* translatiertem c-Jun und Fra1 (links) oder c-Jun und Fra2 (rechts) mit bzw. ohne spezifischen Antikörpern gegen Fra1, Fra2 bzw. Isotyp-Kontroll-Antikörper. Der Pfeil markiert die spezifische Bande, sc\* markiert den *supershift*-Komplex.

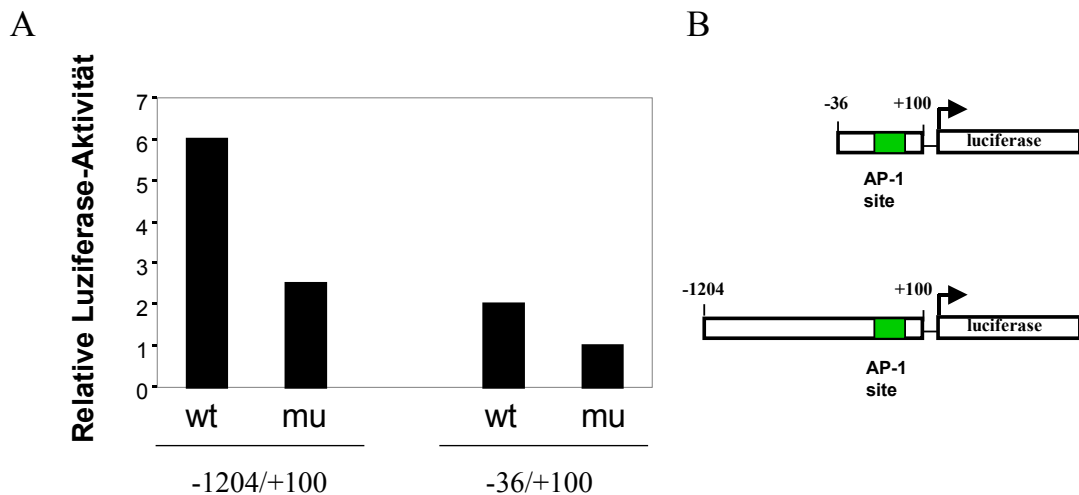
Zum gleichen Ergebnis kam man unter Verwendung eines weiteren FosB-spezifischen Antikörpers (Clone H-75, Santa Cruz, Daten nicht gezeigt). Deutlich veränderte elektrophoretische Mobilität von *in vitro* translatierten Proteinen zeigen die Spezifität und Funktionalität der verwendeten Antikörper (Abb. 16).

Diese Resultate demonstrieren, daß nach TCR/CD3-Stimulation ein Dimer aus c-Jun und FosB an die AP-1 Bindestelle des 5' UTR des CD95L-Gens bindet.

#### 5.1.4 DIE AP-1 BINDESTELLE IM 5' UTR IST MASSGEBLICH AN DER INDUKTION DES CD95L-PROMOTORS NACH TCR/CD3-STIMULATION BETEILIGT

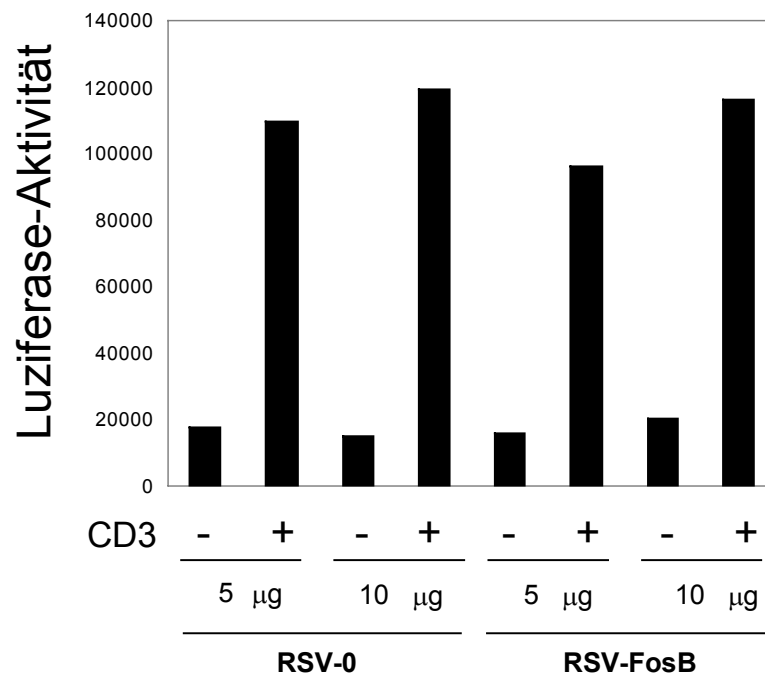
Um die Rolle der im CD95L 5' UTR identifizierten AP-1 Bindestelle in einem funktionellen Experiment zu bestätigen, wurde die Induzierbarkeit von Luziferase-Reporter-Konstrukten verglichen, die entweder die AP-1 Bindestelle als Wildtyp oder in

einer mutierten Form enthielten. Dazu wurden zwei unterschiedlich lange Promotor-Konstrukte (Abb. 17B) verwendet. Wie in Abb. 17A gezeigt wird, war die TCR/CD3-vermittelte Induktion des  $-1204/+100$  Konstruktes (6-fach) signifikant reduziert, wenn die AP-1 Bindestelle mutiert vorlag (2,5-fach). GleichermäÙen war die 2-fache Induktion des  $-36/+100$  minimalen Promoters in seinem mutierten Gegenstück vollständig inhibiert.



**Abbildung 17: Mutation in der AP-1 Bindestelle des 5'UTR führt zu reduzierter Promotor-Aktivierung nach TCR/CD3-Stimulation.** (A) Jurkat T-Zellen wurden transient mit Wildtyp bzw. mutierten  $-1204/+100$  bzw.  $-36/+100$  Luziferase-Konstrukten transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für eine Dauer von 12 h mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert und anschließend die relative Luziferase-Aktivität bestimmt. (B) Schematische Darstellung der verwendeten Luziferase-Konstrukte. wt, Wildtyp; mu, mutierte 5'UTR AP-1 Bindestelle.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die AP-1 (c-Jun/FosB) Bindestelle im 5' UTR des CD95L-Gens zu dessen vollständiger Induktion nach TCR/CD3-Stimulation beiträgt.



**Abbildung 18: FosB Überexpression führt nicht zur Verstärkung der CD95L-Induktion.** Kotransfektion eines FosB Expressionsplasmids bzw. Leervektors (RSV-0) und Luziferase-Reporter-Konstrukt (-1204/+100) in Jurkat T-Zellen und anschließender CD3-Stimulation für 16 h.

Obwohl FosB für die vollständigen Induktion des CD95L essentiell ist, ist FosB allein jedoch nicht in der Lage, den Promoter in einem Überexpressions-System zu aktivieren (Abb. 18). Die transiente Transfektion mit unterschiedlichen Mengen eines FosB-Expressionsplasmids führt im Luziferase-Experiment auch nicht nach TCR/CD3-Stimulation zu einer zusätzlichen CD95L-Promotor-Aktivität. Dies läßt vermuten, daß FosB in der Zelle zu jeder Zeit vorliegt, und die Aktivierung von c-Jun, als der Dimerisierungspartner, limitierend wirkt.

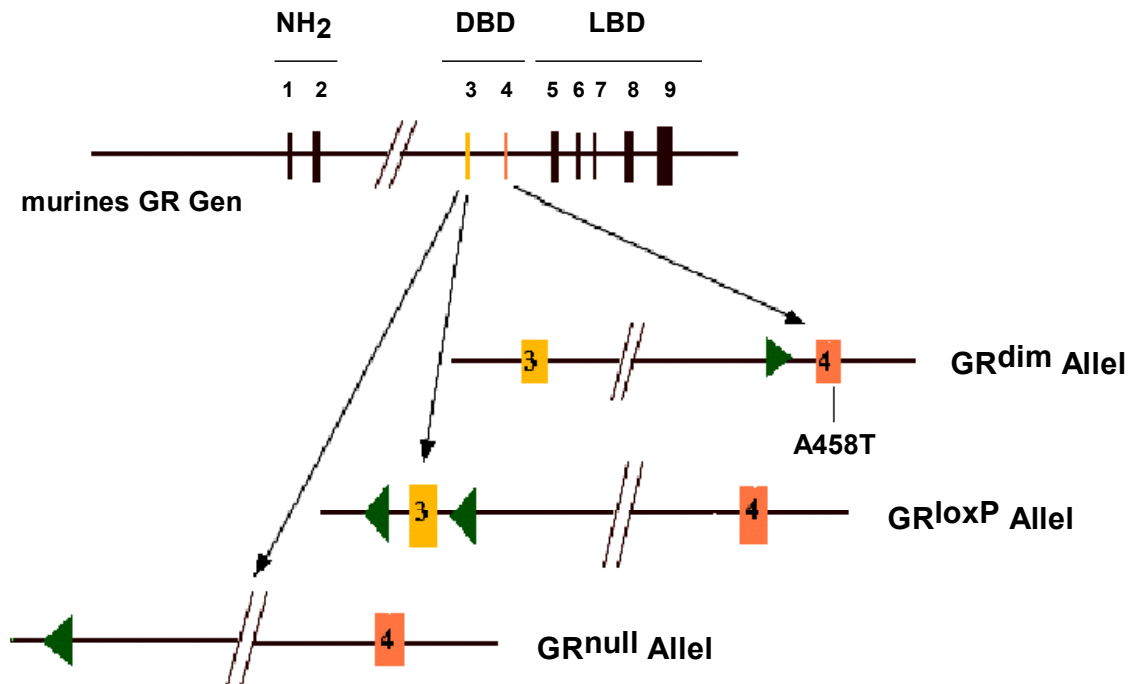
Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die AP-1 Bindestelle im 5' UTR des humanen CD95L-Gens und die daran bindenden Proteine (c-Jun und FosB) eine entscheidende Rolle in der TCR/CD3-vermittelten Induktion des CD95L hat und somit wichtig für die Auslösung des AICD ist.

## 5.2 DER MOLEKULARE MECHANISMUS DER ANTI-APOPTOTISCHEN FUNKTION DES GLUCOCORTICOID-REZEPTORS IM AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN ZELLTOD

Zahlreiche Studien weisen auf eine wichtige Rolle von Glucocorticoid-Hormonen in der Thymozyten-Entwicklung und der Regulation des Überlebens peripherer T-Zellen hin. In transgenen Mäusen, die ein Glucocorticoid-Rezeptor (GR) antisense-Konstrukt T-Lymphozyten-spezifisch exprimieren, wurden Defekte in der Thymozyten-Reifung beobachtet (King *et al.*, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, daß das synthetische Glucocorticoid Dexamethason den AICD in T-Zell-Hybridomen durch Beeinträchtigung der CD95L-Induktion nach TCR/CD3-Stimulation inhibieren kann (Cui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995).

### 5.2.1 BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN MAUS-MUTANTEN

Um die Mechanismen der Glucocorticoid-vermittelten Regulation in T-Lymphozyten zu untersuchen wurde der GR mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems spezifisch in T-Zellen inaktiviert ( $GR^{lckCre}$ ). Des weiteren wurden zur Untersuchung des GR-Signalweges Maus-Mutanten mit einem Dimerisierungs-defekten GR ( $GR^{dim}$ ) (Reichardt *et al.*, 1998b) verwendet. Abb. 19 zeigt eine schematische Darstellung des murinen GR-Gens und der Konstrukte, welche für die Generierung der mutanten Mäuse verwendet wurden. Die Mäuse wurden im Labor von Prof. Dr. Günther Schütz, DKFZ Heidelberg, erzeugt. Exon 3 des GR-Gens, welches für einen Teil der DNA-Bindedomäne kodiert, wurde mit *loxP*-Sequenzen flankiert. Die dieses Konstrukt homozygot enthaltenden Mäuse ( $GR^{loxP}$ ) wurden wie zuvor beschrieben (Bleckmann *et al.*, 2002; Mantamadiotis *et al.*, 2002; Tronche *et al.*, 1998) durch homologe Rekombination in ES-Zellen (embryonic stem cells) erzeugt. *lckCre* transgene Mäuse, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des T-Lymphozyten-spezifischen *lck*-Promoters exprimieren, wurden durch Oozyten-Injektion generiert (Orban *et al.*, 1992). Um konditional GR-defiziente Mäuse ( $GR^{lckCre}$ ) zu schaffen, wurden heterozygote *lckCre* transgene Mäuse ( $GR^{lckCre/+}$ ) mit homozygoten  $GR^{loxP}$  Mäusen ( $GR^{lox/lox}$ ) gekreuzt, was in  $GR^{lox/lox;lckCre}$  Mäusen ( $GR^{lckCre}$ ) resultierte (Abb. 19). Diese Mäuse weisen eine vollständige Rekombination des GR-Gen-Lokus in Thymozyten und peripheren T-Zellen auf (Southern Blot Analyse, durchgeführt von Anton Bauer, DKFZ Heidelberg, Daten nicht gezeigt). Der GR ist auf Protein-Ebene in T-Lymphozyten dieser Mäuse nicht nachweisbar. Als Kontrolle dienten in den Experimenten  $GR^{lox/lox}$  Mäuse.



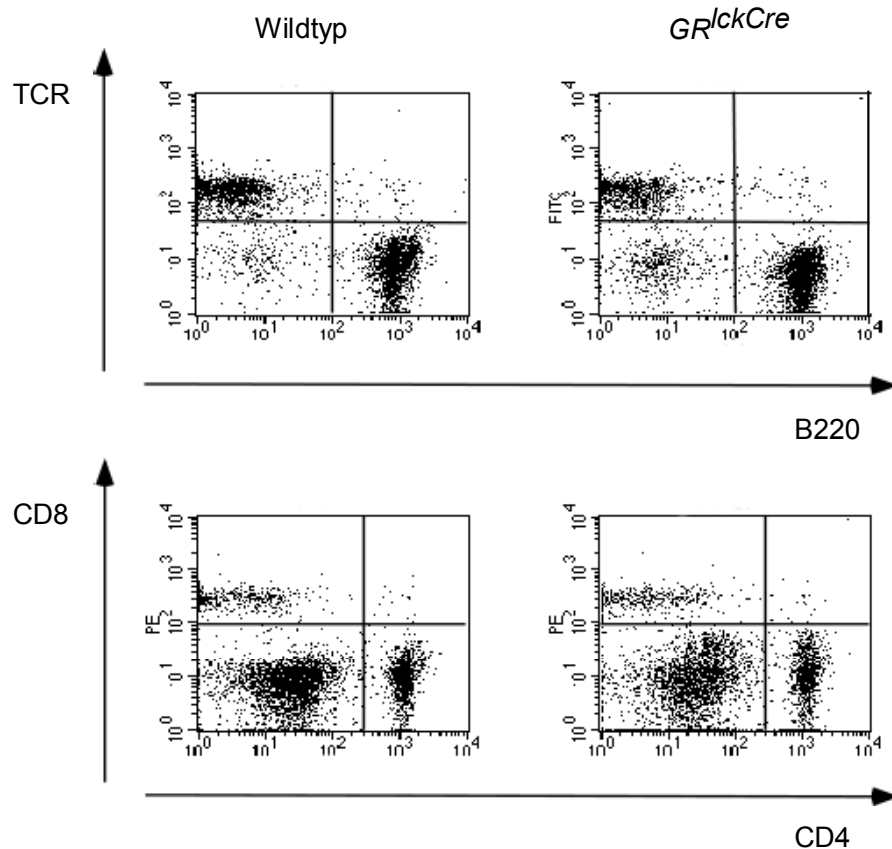
**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Genotyps der verwendeten Maus-Mutanten.** Zur Generierung von GR-defizienten bzw. konditional GR-defizienten Mäusen wurde Exon 3 des GR-Gens von *loxP* Sequenzen flankiert (GR<sup>loxP</sup>, GR<sup>floxed</sup>). Die Kreuzung dieser Mäuse mit transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des T-Lymphozyten-spezifischen *lck* Promotors exprimieren, resultierte in T-Zell-spezifischen GR-defizienten Mäusen (GR<sup>lckCre</sup>). Eine Punktmutation in Exon 4 bewirkt die Expression eines Dimerisierungsdefekten GR-Proteins, welches nicht zur Transaktivierung, jedoch zur Gen-Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen in der Lage ist. Weitere Erklärungen siehe Einleitung und (Reichardt *et al.*, 1998b).

Mäuse mit einer Punktmutation (A458T) in Exon 4, welches für einen Teil der DNA-Bindedomäne kodiert, welche auch für die Dimerisierung des GR-Proteins notwendig ist, erzeugt ein GR-Protein (GR<sup>dim</sup>), welches zwar noch zu Protein-Protein-Interaktionen, nicht jedoch zu DNA-Bindungs-abhängiger Transaktivierung in der Lage ist (Reichardt *et al.*, 1998b).

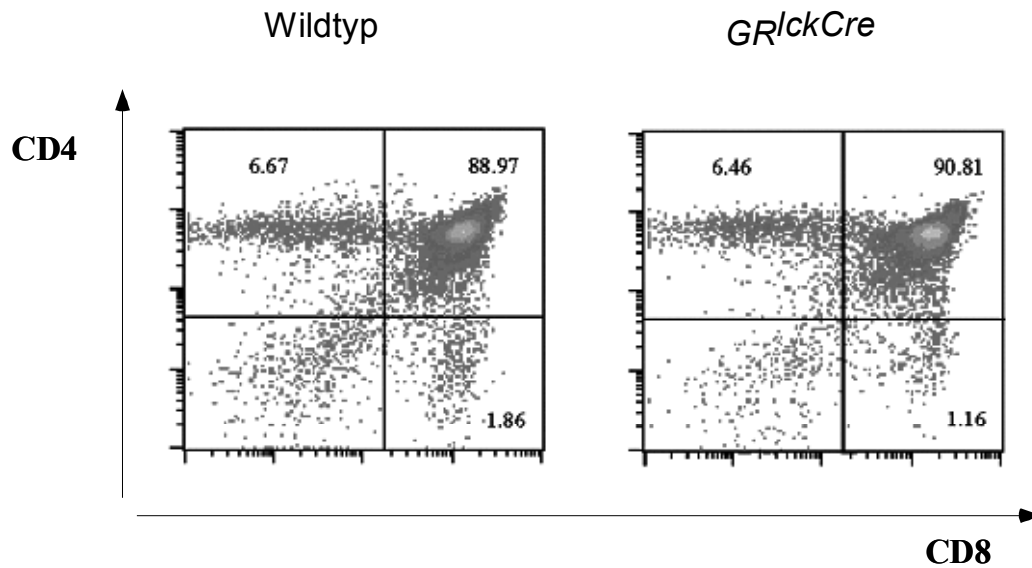
### 5.2.2 NORMALE T-LYMPHOZYTEN-ENTWICKLUNG IN KONDITIONAL GR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Konditional GR-defiziente Mäuse, denen der GR spezifisch in T-Lymphozyten fehlt, zeigen auf den ersten Blick keinen veränderten Phänotyp, sind gesund und fertil. Obwohl in Mäusen, die ein GR-antisense-Konstrukt spezifisch in T-Zellen exprimieren, Defekte in der T-Zell-Entwicklung festgestellt wurden (King *et al.*, 1995), zeigten die durchflußzytometrische Untersuchung der Lymphozyten-Populationen der peripheren

lymphatischen Organe wie Milz (Abb. 20), mesenterialer Lymphknoten (Daten nicht gezeigt) sowie des Thymus (Abb. 21) in  $GR^{lckCre}$  Mäusen keinerlei Unterschiede zu Kontrolltieren. Das Verhältnis von T- zu B-Zellen, sowie von  $CD4^+$  T-Helfer- zu  $CD8^+$  cytotoxischen T-Zellen ist durch das Fehlen des GR nicht beeinträchtigt. Die Größe und Zellzahl der lymphatischen Organe ist ebenfalls nicht verändert (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20: FACS-Analyse mit primären Lymphozyten der Milz.** Suspensionen homogenisierter Milzen wurden nach Erythrozyten-Lyse mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen den T-Zell Rezeptor (TCR) und einen B-Zell-Marker (B220) bzw. die Corezeptoren CD4 und CD8 gefärbt und im FACS analysiert.

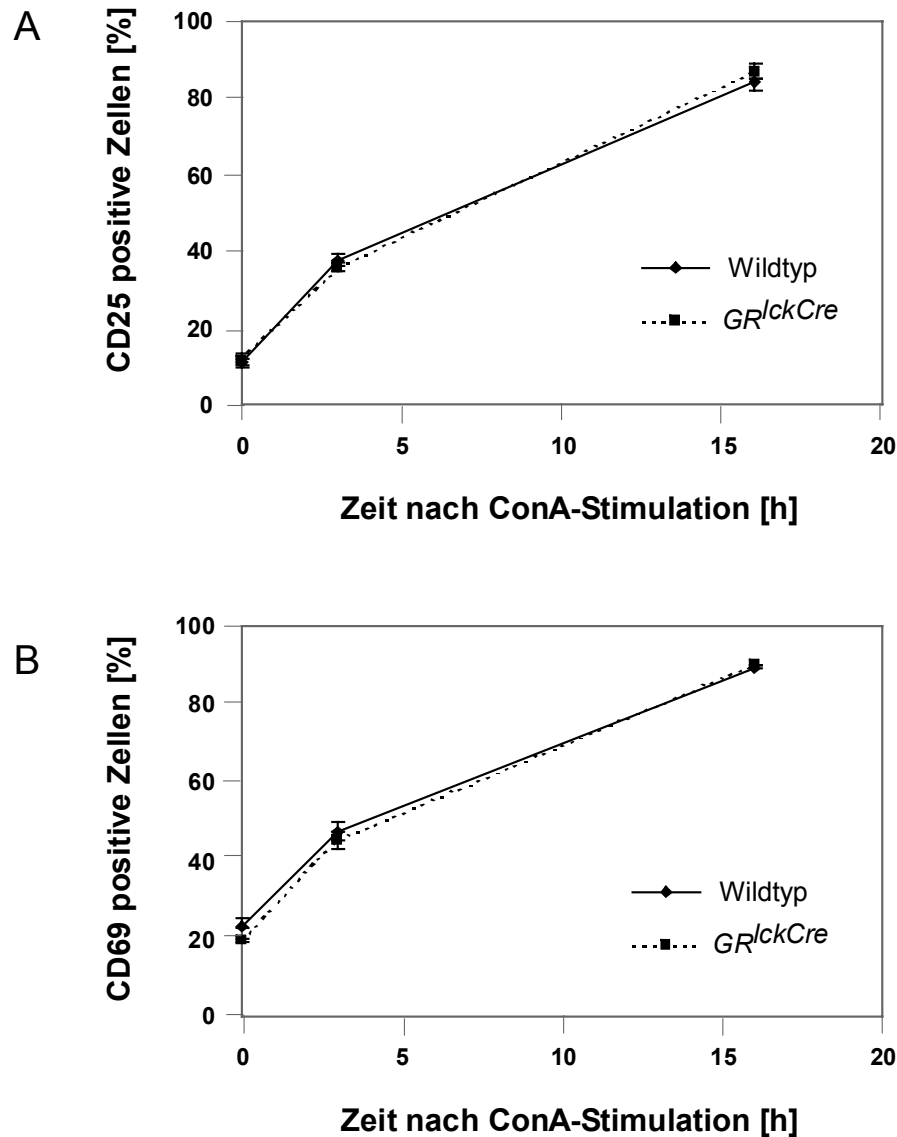


**Abbildung 21: FACS-Analyse frisch präparierter Zellsuspensionen des Thymus.** Suspensionen homogener Thymi von adulten Mäusen wurden mit spezifischen fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und im FACS analysiert.

Diese Resultate zeigen, daß der Glucocorticoid-Rezeptor für die Thymozyten-Entwicklung nicht essentiell ist. Weitergehende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Rolle des GR in der Thymozyten-Selektion wurden von Anton Bauer und Wolfgang Schmid, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Günther Schütz, DKFZ Heidelberg durchgeführt. Die vorliegende Studie befaßt sich im weiteren dagegen mit der Funktion des GR in peripheren T-Zellen.

### 5.2.3 UNVERÄNDERTE PROLIFERATION UND AKTIVIERUNG VON GR-DEFIZIENTEN T-ZELLEN

Synthetische Glucocorticoide werden als effiziente entzündungshemmende Medikamente eingesetzt, da sie die Expression zahlreicher Zytokine inhibieren und damit die Aktivierung des Immunsystems hemmen. Um die Rolle des GR in der Proliferation und Aktivierbarkeit von peripheren T-Zellen zu untersuchen, wurden primäre T-Lymphozyten der Milz mit dem Lektin ConA stimuliert. Die IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) und CD69 (*very early activation marker*) dienen als Marker für die Aktivierung von peripheren T-Zellen, da diese Moleküle auf ruhenden T-Zellen nicht exprimiert sind, jedoch nach TCR/CD3-Stimulation stark induziert werden. Sowohl T-Zellen von Wildtyp- als auch  $GR^{lckCre}$  Mäusen zeigten wenige Stunden nach ConA-Stimulation eine deutlich vermehrte Oberflächenexpression von CD25 und CD69 (Abb. 22).

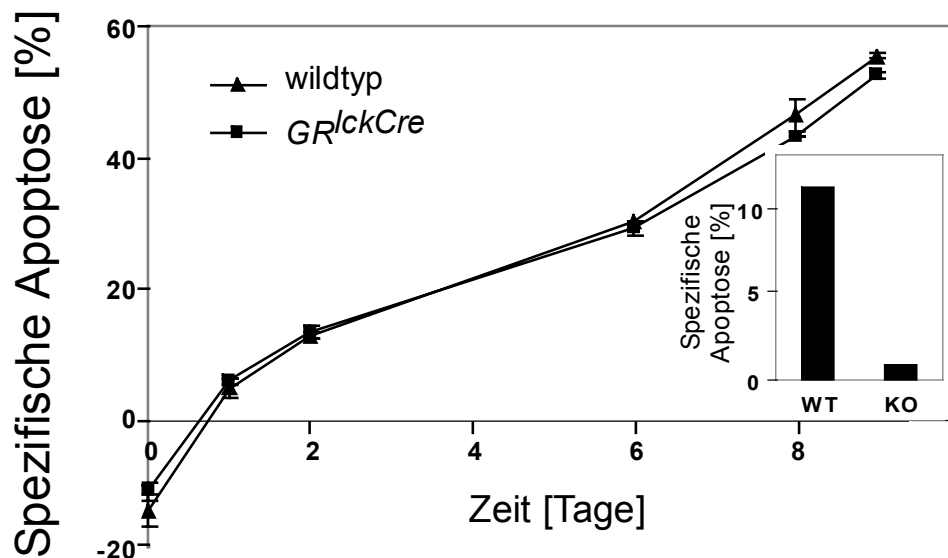


**Abbildung 22: Unveränderte Aktivierbarkeit von GR-defizienten T-Zellen.** Kinetik der CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (A) und CD69 Expression (B) auf primären T-Zellen von Wildtyp und  $GR^{lckCre}$  Mäusen per FACS-Analyse nach ConA-Stimulation.

Die Analyse von  $GR^{dim}$  Mäusen ergab vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen der Zellzahl nach mehreren Tagen Stimulation, Zellzyklus-Bestimmung durch Propidium-Iodid-Färbung der Nuklei, Messung der Größenzunahme der T-Zellen nach Stimulation per FSC/SSC-Analyse und [ $H^3$ ]-Thymidin-Einbau ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und GR-mutanten Mäusen (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde zeigen, daß, obwohl exogene Glucocorticoid-Gabe die T-Zell-Aktivierung inhibiert (Herrlich, 2001; Vieira *et al.*, 1998), das Fehlen des GR keinen Einfluß auf die Aktivierbarkeit und Proliferation von T-Zellen hat.

#### 5.2.4 UNTERSUCHUNGEN ZUM AICD IN GR-DEFIZIENTEN PERIPHEREN T-ZELLEN

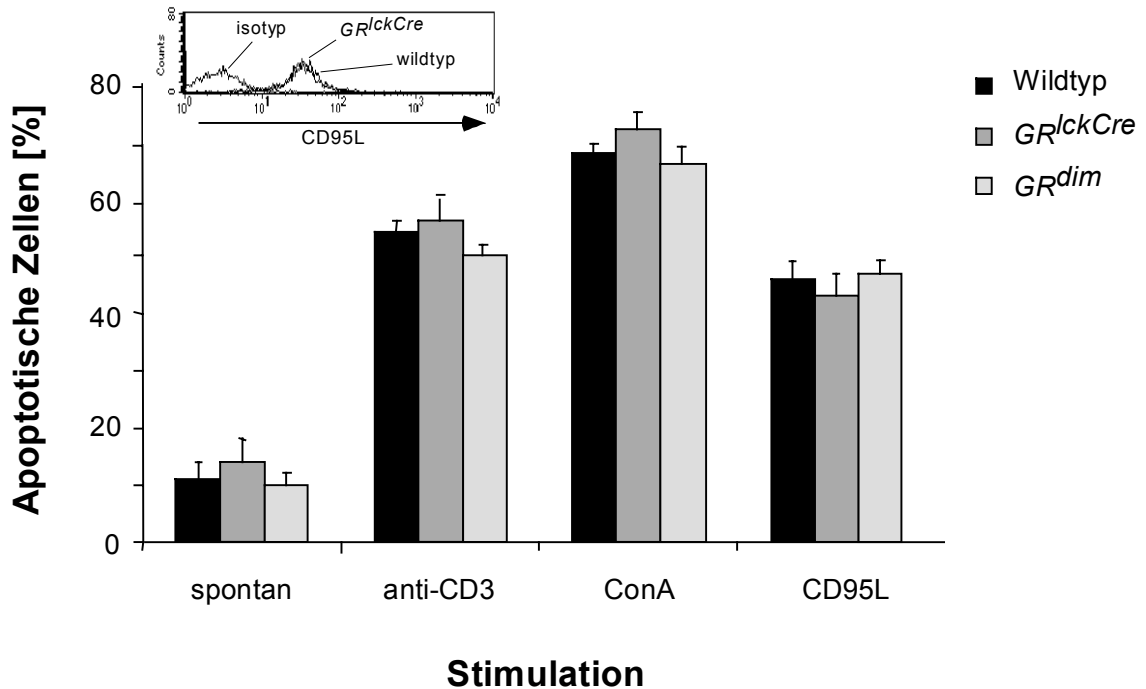
Neben der Repression der Zytokin-Expression lösen Glucocorticoide in Thymozyten und einigen T-Zell-Hybridomen Apoptose aus (Daten nicht gezeigt). Periphere T-Zellen sind nur gegenüber sehr hohen Glucocorticoid-Konzentrationen (Behandlung mit  $> 10^{-5}$  M Dexamethason für 18 Stunden, Abb. 23 rechts) sensitiv. Naïve periphere T-Zellen sind resistent gegenüber TCR/CD3-induzierter Apoptose. ConA-Stimulation und anschließende Expansion der Zellen für 5 Tage in IL-2-haltigem Medium sensitiviert die Zellen gegenüber TCR/CD3-vermittelter Apoptose. In  $GR^{lckCre}$  Mäusen sieht man keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivierung primärer T-Zellen gegenüber AICD (Abb. 23). Da TCR/CD3-Stimulation naïver T-Zellen zu Proliferation führt, erscheint die spezifische Apoptose an Tag 0 negativ.



**Abbildung 23: Unveränderte Sensitivierung primärer T-Zellen nach ConA-Stimulation gegenüber TCR/CD3-vermittelter Apoptose.** Primäre T-Zellen der Milz von Wildtyp- und  $GR^{lckCre}$ -Mäusen wurden über Nacht mit ConA stimuliert und in IL-2-haltigem Medium weiter kultiviert. An den angegebenen Tagen wurde ein Aliquot für 18 h mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert und anschließend die Apoptose über FSC/SSC-Analyse quantifiziert. Kleines Balkendiagramm rechts: Spezifische Apoptose nach Inkubation primärer Tag 5 T-Zellen für 18 h mit  $10^{-5}$  M Dexamethason. WT: Wildtyp; KO:  $GR^{lckCre}$ .

Zur weiteren Untersuchung des Apoptose-Phänotyps wurden Tag 5 T-Zellen für 18 Stunden mit anti-CD3-Antikörper, LZ-CD95L oder ConA behandelt. Weder die spontane Apoptose, noch Zelltod durch TCR/CD3- bzw. ConA-Restimulation oder durch direkte Stimulation des CD95-Rezeptors sind in  $GR^{lckCre}$  bzw.  $GR^{dim}$  Mäusen

beeinträchtigt (Abb. 24). Ebenso ist die Expression von CD95 bei Tag 5 T-Zellen von Wildtyp- und  $GR^{lckCre}$  Mäusen vergleichbar (Abb. 24 oben links).



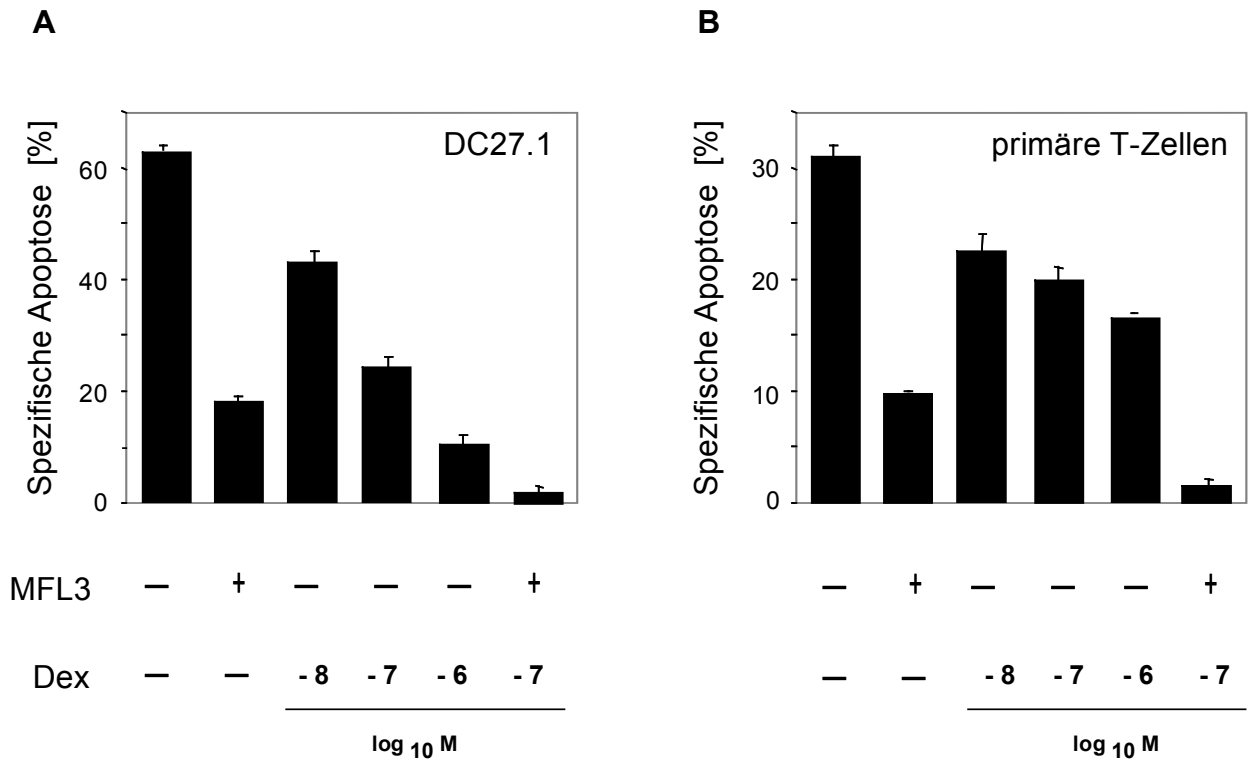
**Abbildung 24: Normale Apoptose von T-Zellen mit mutiertem GR oder ohne GR.** Primäre T-Zellen der Milz wurden für 16 h mit ConA stimuliert und anschließend in IL-2-haltigem Medium kultiviert. Die Zellen wurden für 16 h mit 5  $\mu$ g/ml ConA, 500 ng/ml LZ-CD95L behandelt, mit anti-CD3-Antikörper-beschichteten Platten stimuliert oder unbehandelt gelassen (Spontan-Apoptose). Apoptose-Bestimmung erfolgte durch FSC/SSC-FACS-Analyse. Bestimmung der CD95-Expression von Tag 5 T-Zellen von Wildtyp und  $GR^{lckCre}$  Mäusen (oben links).

Diese Resultate demonstrieren, daß der GR im AICD peripherer T-Zellen und im Signaltransduktionsweg nach CD95-Stimulation keine entscheidende Rolle spielt.

### 5.2.5 GLUCOCORTICOIDE INHIBIEREN DEN AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN ZELLTOD

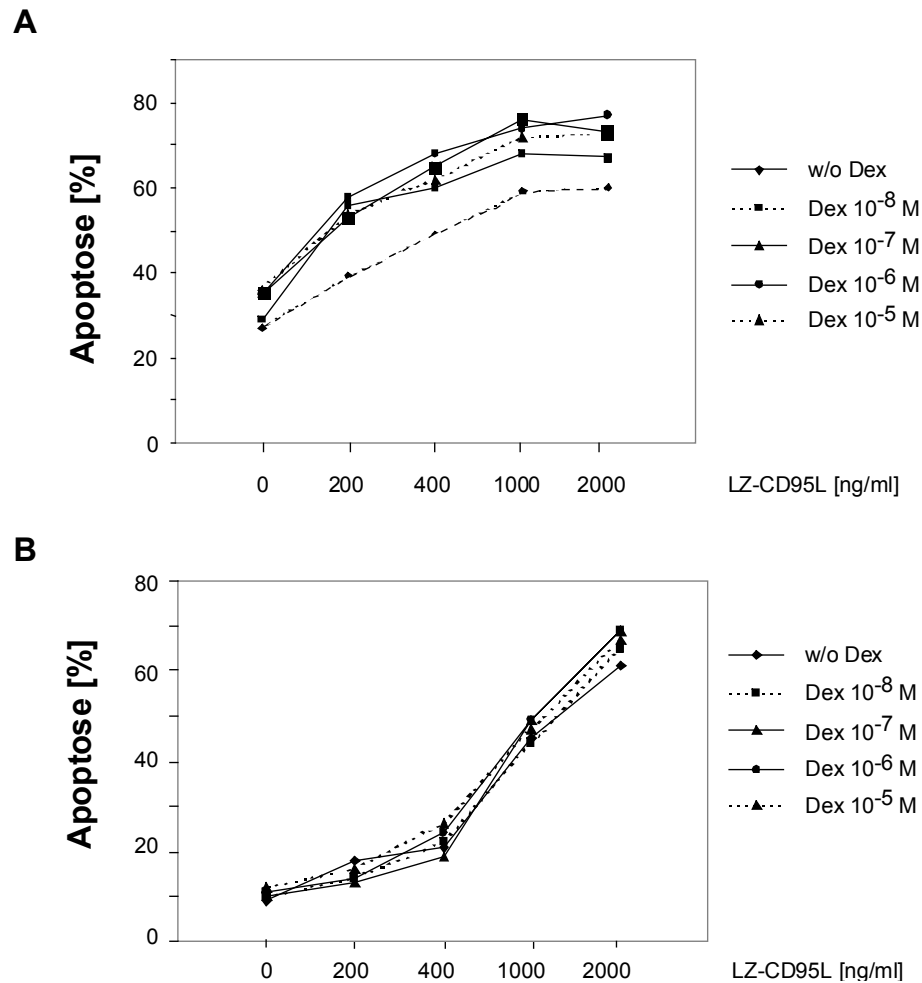
Obwohl in der Abwesenheit des GR kein Defekt in der Apoptose peripherer T-Zellen zu beobachten ist, können Glucocorticoide möglicherweise den AICD durch Kontrolle von Proteinen, die am AICD beteiligt sind, modulieren. Dazu wurden primäre voraktivierte T-Zellen bzw. das T-Zell-Hybridom DC27.1 in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dexamethason-Dosen, welche in den Zellen selbst keine Apoptose auslösen (subtoxisch), über TCR/CD3 (re-)stimuliert. Abbildung 25 zeigt, daß TCR/CD3-induzierte Apoptose durch Dexamethason signifikant reduziert wird. Die Inhibition des

AICD durch den CD95L-antagonistischen Antikörper MFL3 bestätigt die Beteiligung des CD95-Systems bei diesem Prozeß. Somit können Glucocorticoide, welche in einer Vielzahl von Zelltypen zur Induktion von Apoptose in der Lage sind, in subtoxischen Dosen die TCR/CD3-vermittelte Apoptose inhibieren.



**Abbildung 25: Dexamethason inhibiert AICD.** Primäre murine Tag 5 T-Zellen (B) bzw. DC27.1 Zellen (murine T-Zell-Linie, A) wurden 16 h auf mit anti-CD3-Antikörper beschichteten Platten in der Gegenwart des CD95L-antagonistischen Antikörpers MFL3 (10 µg/ml) bzw. subtoxischer Dosen Dex ( $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M für gleichzeitige Behandlung mit MFL3) stimuliert. Apoptose wurde per FSC/SSC-Analyse im FACS quantifiziert.

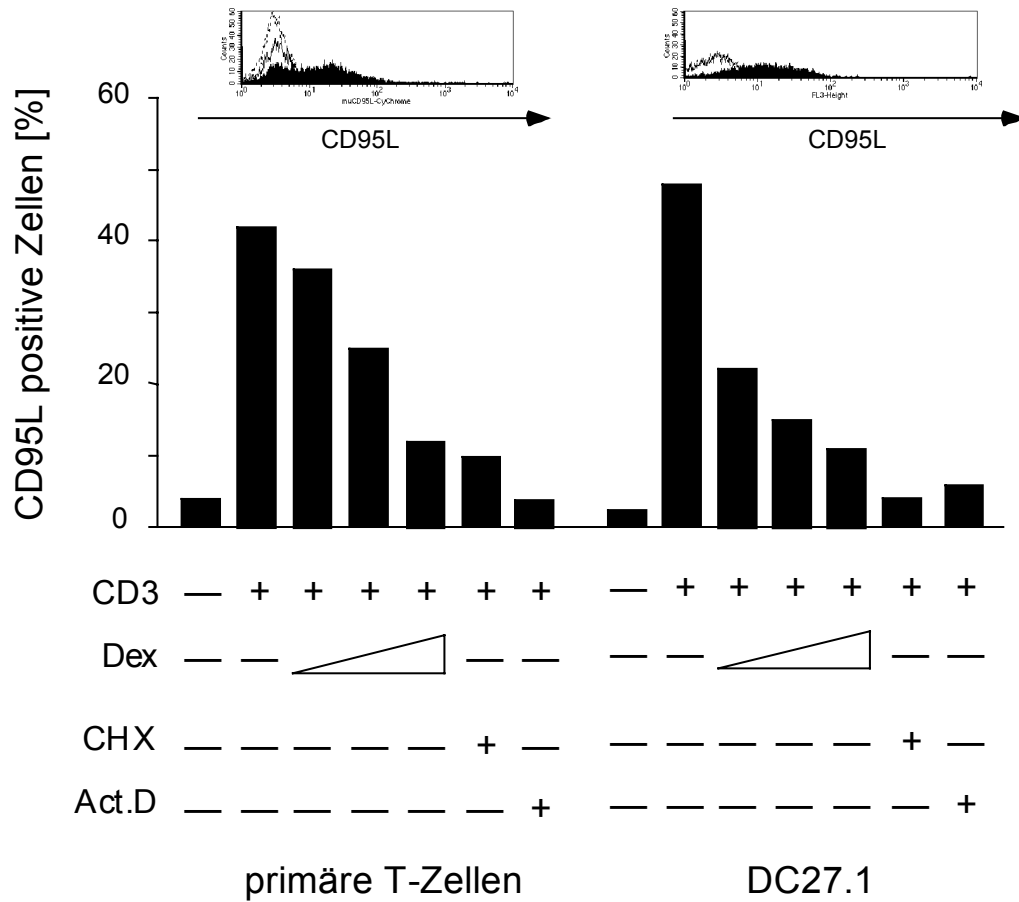
Um zu untersuchen, wo Dexamethason bei der TCR/CD3-vermittelten Apoptose eingreift, wurde in primären murinen und humanen T-Zellen Apoptose direkt über Stimulation des CD95-Rezeptors induziert. Man erkennt keinerlei Einfluß von Glucocorticoiden auf die CD95-vermittelte Apoptose (Abb. 26). In primären T-Zellen wurde keine veränderte Expression von Bcl-2 nach Dexamethason-Behandlung beobachtet (Abb. 32B), was klar mit der unveränderten Apoptose-Induktion durch den CD95L bei unterschiedlichen Dexamethason-Konzentrationen (Abb. 26) korreliert. Diese Daten lassen darauf schließen, daß der anti-apoptotische Effekt von Dexamethason auf AICD oberhalb des CD95-Rezeptors zu finden ist.



**Abbildung 26: Dexamethason hat keinen Einfluß auf CD95-induzierte Apoptose.** Titration des CD95-Liganden und Dexamethason. Apoptose-Bestimmung nach 18 h Stimulation. **(A)** Primäre murine Tag 5 T-Zellen, **(B)** primäre humane Tag 6 T-Zellen.

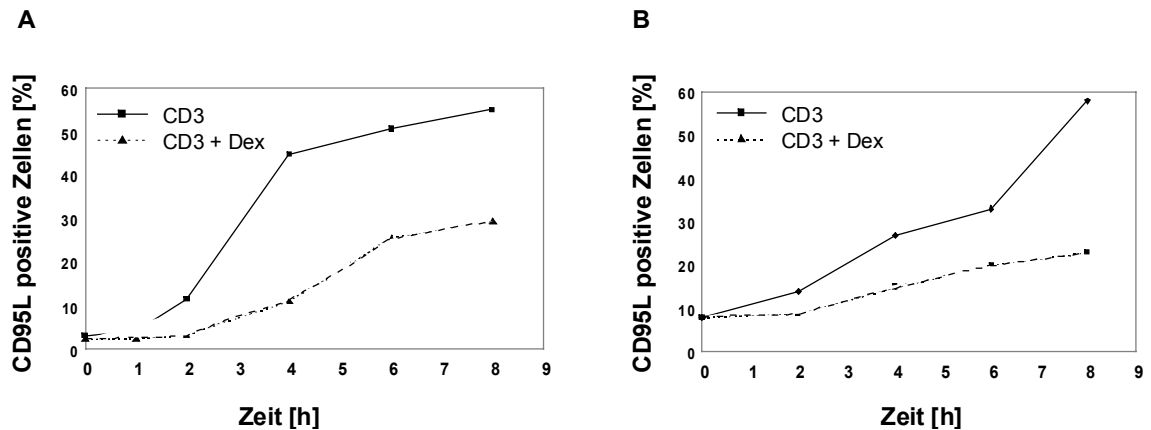
Glucocorticoide können die TCR/CD3-induzierte CD95L-Expression in T-Zell-Hybridomen inhibieren (Cui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995). Abb. 27 zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibition der CD95L-Protein-Expression auf der Zelloberfläche primärer T-Zellen bzw. dem T-Zell-Hybridom DC27.1 nach TCR/CD3-Stimulation. Sowohl die Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) als auch Behandlung mit dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D (Act.D) führte wie erwartet zu einer Inhibition der CD95L-Induktion. Die Expression des TCR bzw. von CD95 wird nicht durch Dexamethason moduliert (Daten nicht gezeigt). Humane T-Zell-Linien wie Jurkat, CEM, H9 oder Molt4 sind gegenüber Dexamethason nicht responsiv, d.h. auch sehr hohe Dosen lösen hier keine Apoptose aus (Daten nicht gezeigt). Deshalb

wurden Experimente im humanen System ausschließlich mit primären T-Zellen durchgeführt.



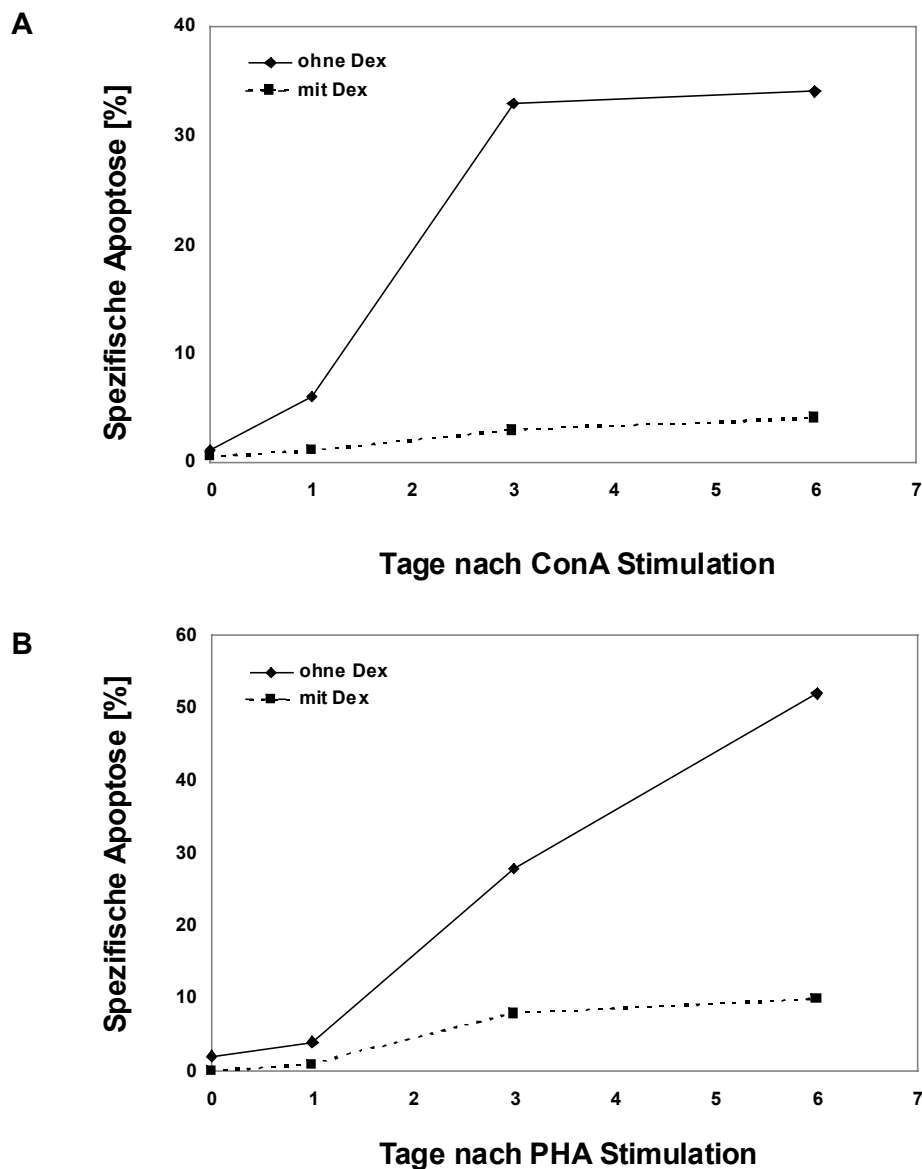
**Abbildung 27: Dexamethason inhibiert CD3-induzierte CD95L-Expression.** Primäre murine Tag 5 T-Zellen (links) bzw. die DC27.1 Zellen (murine T-Zell-Linie, rechts) wurden 8 h auf mit anti-CD3-Antikörper beschichteten Platten in der Gegenwart oder Abwesenheit subtoxischer Dosen Dex ( $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M) bzw. Cycloheximid (CHX; 10  $\mu$ g/ml) oder Actinomycin D (Act.D; 2  $\mu$ g/ml) stimuliert. Oben: Histogramme zeigen CD95L-Färbung im FACS. Gefüllte Histogramme: Für 6 h TCR/CD3-stimulierte Zellen. Offene Histogramme: Unstimulierte Zellen und Isotyp-Kontrolle.

Eine Kinetik der TCR/CD3-Stimulation zeigte, daß die Oberflächen-Expression des CD95L schon zu frühen Zeitpunkten verringert ist (Abb. 28). Dieser schnelle Einfluß von Dexamethason läßt einen direkten Effekt auf die CD95L-Transkription vermuten.



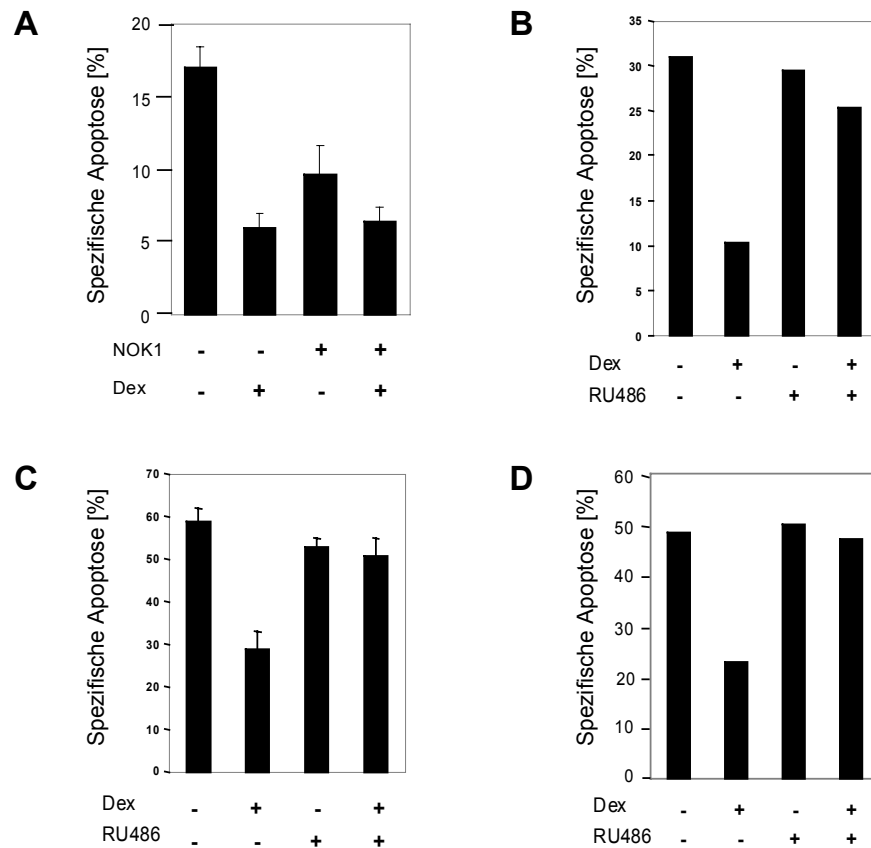
**Abbildung 28: Dexamethason inhibiert die CD95L-Induktion zu einem frühen Zeitpunkt der Stimulation.** Kinetik der CD95L-Induktion nach CD3-Stimulation bestimmt auf Proteinebene per FACS-Analyse. DC27.1 Zellen (A) bzw. primäre Tag 5 T-Zellen (B) wurden auf mit anti-CD3-Antikörper beschichteten Platten stimuliert. Die subtoxische Dosis ( $10^{-7}$  M) Dex bzw. Kontroll-Lösemittel (DMSO) wurde zu Anfang der Stimulationsphase zugegeben.

Wie in Abb. 23 gezeigt, sind frisch präparierte T-Zellen resistent gegenüber TCR/CD3-induzierter Apoptose, werden jedoch durch Stimulation mit einem Lektin (ConA bei murinen und PHA bei humanen T-Zellen) und anschließender Kultivierung in IL-2-haltigem Medium gegenüber TCR/CD3-vermittelter Apoptose sensitiviert. Dexamethason reduziert AICD auch schon in früheren Stimulations-Phasen, in denen periphere T-Zellen nur teilweise Apoptose-sensitiv sind (Abb. 29). Einen Tag nach Stimulation frisch präparierter T-Zellen mit einem Lektin sind die Zellen nur geringfügig gegenüber TCR/CD3-induzierter Apoptose sensitiv. Dexamethason ist in der Lage, den geringen Grad an Apoptose schon in dieser frühen Stimulationsphase zu reduzieren (Abb. 29).



**Abbildung 29: Dexamethason inhibiert AICD in primären murine und humanen T-Zellen.** Primäre murine (A) und humane (B) T-Zellen wurden an den angegebenen Tagen nach primärer Lektin-Stimulation für 18 h in der Gegenwart oder Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dexamethason mit anti-CD3-Antikörper stimuliert. Bestimmung der Apoptose erfolgte per FSC/SSC-Analyse im FACS.

Glucocorticoide regulieren zelluläre Prozesse durch Aktivierung des GR. Um einen eventuellen GR-unabhängigen Mechanismus durch Dexamethason auszuschließen, wurde der GR-Antagonist RU486 (Mifepriston) verwendet. RU486 bindet an die Liganden-Bindestelle des GR, stabilisiert dadurch den hsp90-enthaltenden heterooligomeren GR-Komplex im Zytosol und inhibiert somit dessen Aktivierung durch Glucocorticoide (Cadepond *et al.*, 1997).



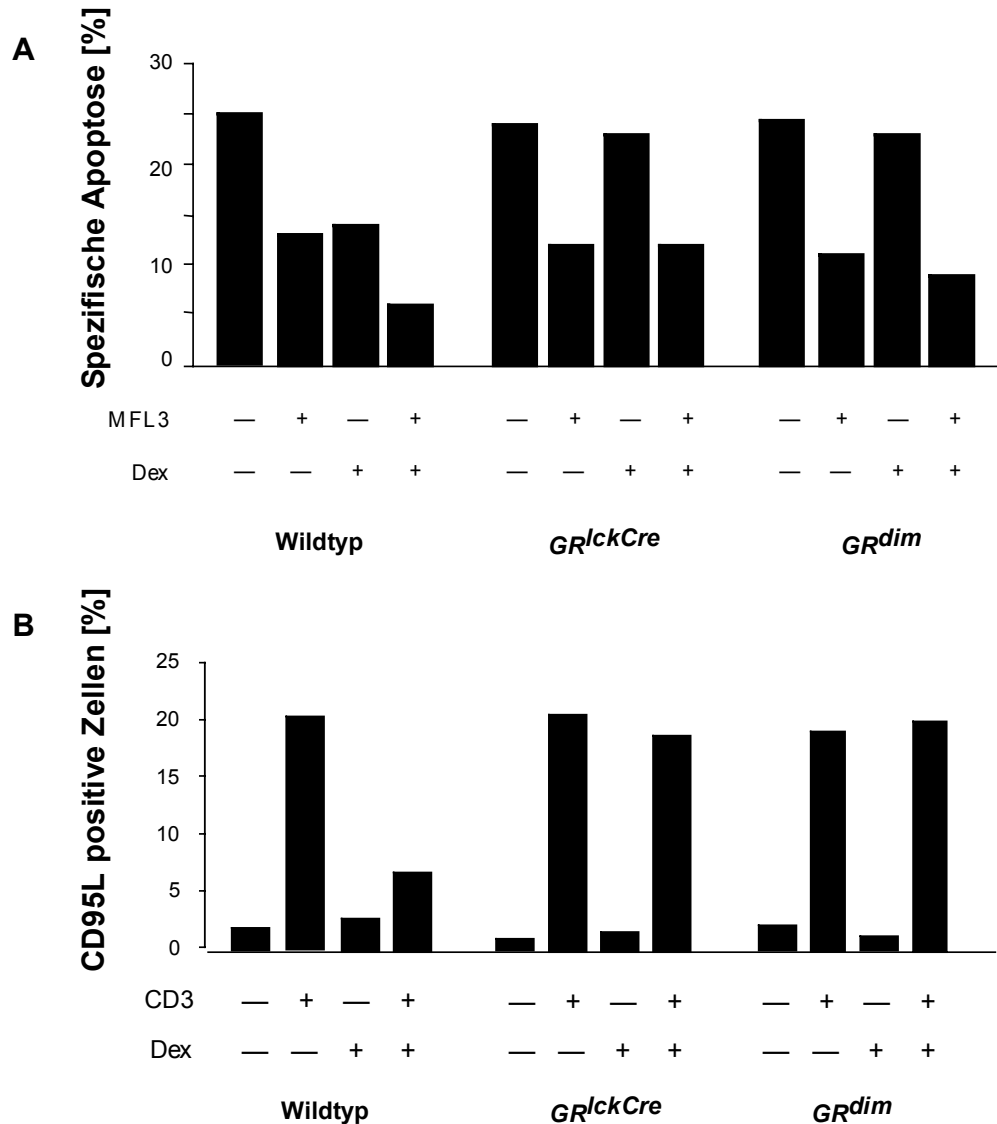
**Abbildung 30: Der anti-apoptotische Effekt von Dexamethason wird durch den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt. (A)** Dex inhibiert AICD in humanen T-Zellen. Primäre humane Tag 6 T-Zellen wurden für 16 h über CD3-Antikörper in der Gegenwart oder Abwesenheit von antagonistischen CD95L-Antikörper (NOK1) und mit/ohne Dex ( $10^{-7}$  M) stimuliert und die Apoptoserate ermittelt. Primäre murine Tag 5 T-Zellen **(B)**, DC27.1 Zellen **(C)** und primäre humane Tag 6 T-Zellen **(D)** wurden für 16 h in der Gegenwart oder Abwesenheit von Dex ( $10^{-7}$  M) und mit/ohne 5  $\mu$ M RU486 stimuliert und anschließend die Apoptose per FACS quantifiziert.

T-Zellen wurden mit RU486 vorinkubiert und anschließend in der Gegenwart oder Abwesenheit von Dexamethason mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert. Der anti-apoptotische Effekt subtoxischer Dexamethason-Dosen auf TCR/CD3-induzierte Apoptose läßt sich durch eine subtoxische Dosis RU486 inhibieren (Abb. 30B-D). Dies zeigt, daß es sich um einen GR-abhängigen Mechanismus handelt. Sowohl in primären humanen und murinen T-Zellen als auch in der murinen T-Zelllinie DC27.1 ist die Inhibition des Dexamethason-Effekts durch RU486 zu beobachten.

Diese Resultate zeigen einen anti-apoptotischen Effekt von Glucocorticoiden während des AICD primärer T-Zellen murinen und humanen Ursprungs, welcher auf einer Reduktion der CD95L-Induktion nach TCR/CD3-Stimulation beruht.

### **5.2.6 BINDUNG AN EIN GRE IST FÜR DEN ANTI-APOPTOTISCHEN EFFEKT VON DEXAMETHASON NOTWENDIG**

Der GR kann einerseits in Form eines Homodimers als ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor fungieren und andererseits in Form eines Monomers durch direkte Interaktionen mit anderen Proteinen (wie z.B. AP-1 und NF- $\kappa$ B) die Transkription regulieren. Um zu untersuchen, welcher dieser beiden Mechanismen in der Modulation des AICD durch Dexamethason involviert ist, wurden primäre T-Zellen von GR<sup>lckCre</sup> und GR<sup>dim</sup> Mäusen verwendet. GR<sup>dim</sup> Mäuse weisen eine Mutation im GR auf, welche die Homodimerisierung und damit die direkte Transaktivierung verhindert. DNA-Bindungs-abhängige Transkriptionskontrolle durch den GR ist in GR<sup>dim</sup> Mäusen somit nicht möglich, so daß GRE-vermittelte Gen-Induktion als Antwort auf Glucocorticoide fehlt. Die Modulation der Genexpression durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- $\kappa$ B ist jedoch funktionell (Reichardt *et al.*, 2001).



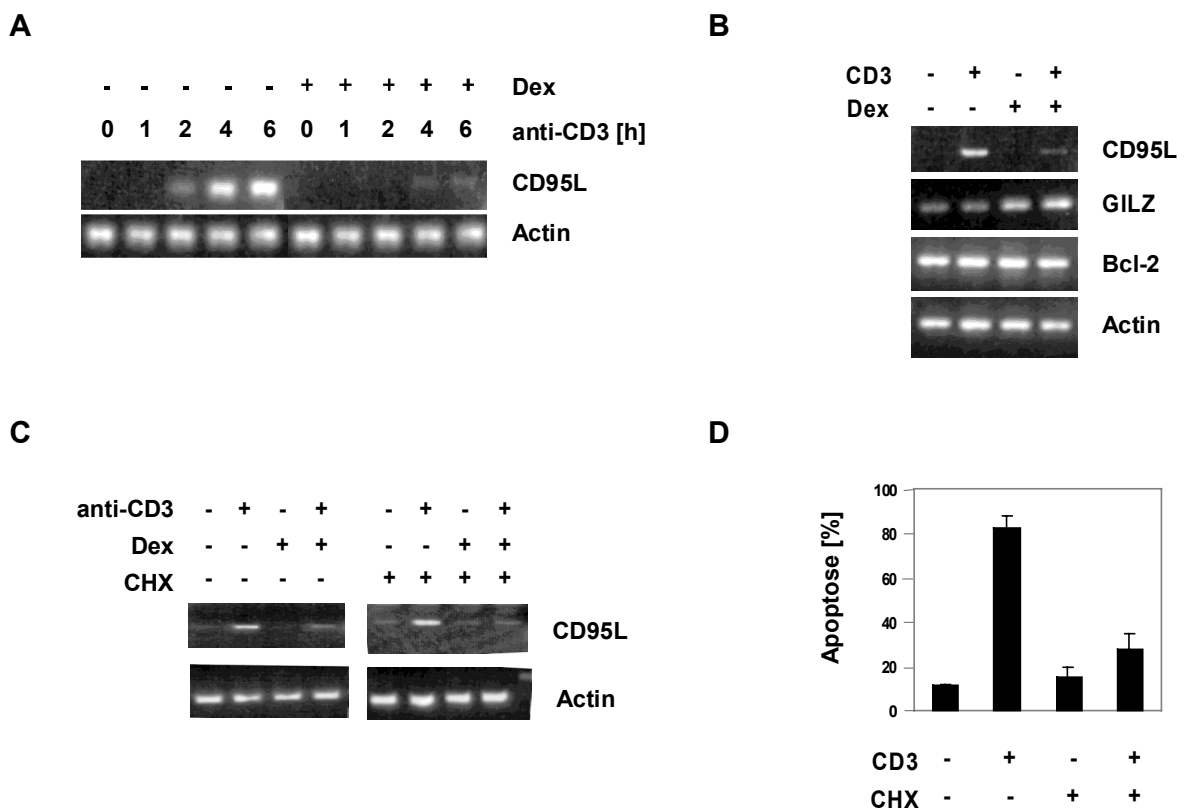
**Abbildung 31: Der anti-apoptotische Effekt von Dexamethason auf AICD wird durch direkte DNA-Bindung des GR vermittelt.** Primäre murine Tag 5 T-Zellen von Wildtyp,  $GR^{lckCre}$  und  $GR^{dim}$  Mäusen wurden 16 h (A) bzw. 8 h (B) auf mit anti-CD3-Antikörper beschichteten Platten in der Gegenwart oder Abwesenheit von Dex ( $10^{-7}$  M) stimuliert. (A) Bestimmung der Apoptose durch FSC/SSC-Analyse im FACS, (B) Bestimmung der CD95L-Protein-Expression auf der Zelloberfläche per FACS.

Die Analyse zeigt, daß sowohl die komplette Inaktivierung des GR ( $GR^{lckCre}$ ), als auch eine Mutation, bei der selektiv die Bindung an ein GRE gestört ist, Protein-Protein-Interaktionen jedoch erhalten bleiben ( $GR^{dim}$ ), die Dexamethason-induzierte Inhibition des AICD (Abb. 31A) und die Reduktion der CD95L-Induktion (Abb. 31B) verhindert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß für die Signalübertragung des anti-apoptotischen Effekts ein GR-Dimer benötigt wird, und somit eine Regulation über Protein-Protein-Interaktionen mit AP-1 oder NF- $\kappa$ B als Mechanismus auszuschließen ist.

### 5.2.7 DER ANTI-APOPTOTISCHE EFFEKT VON DEXAMETHASON IST UNABHÄNGIG VON PROTEIN-NEUSYNTHESE

Der CD95L wird kurze Zeit nach TCR/CD3-Stimulation exprimiert, was durch die Gegenwart von Dexamethason inhibiert wird, und in einer Stimulations-Kinetik auf mRNA-Ebene zu sehen ist (Abb. 32A). In früheren Studien wurde gezeigt, daß die Überexpression von GILZ (**glucocorticoid induced leucine zipper**) T-Zell-Hybridome von TCR/CD3-vermittelter Apoptose schützen kann, was mit einer reduzierten CD95L-Induktion korreliert (D'Adamio *et al.*, 1997). GILZ ist in T-Zellen durch Dexamethason induzierbar (Abb. 32B). GILZ kann ebenso wie der GR mit Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 direkt interagieren und dadurch deren Aktivität inhibieren (Ayroldi *et al.*, 2001; Mittelstadt and Ashwell, 2001).



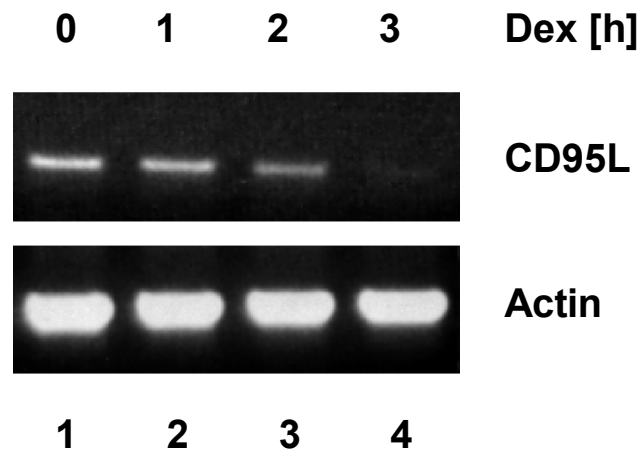
**Abbildung 32: Der anti-apoptotische Effekt von Glucocorticoiden ist unabhängig von der Protein-Neusynthese.** (A) DC27.1 Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dex für die angegebenen Zeitspannen mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert. RT-PCR für CD95L und  $\beta$ -Actin. (B) Primäre murine Tag 5 T-Zellen wurden in der Gegenwart oder Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dex für 5 h mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. RT-PCR für CD95L, GILZ, Bcl-2 und  $\beta$ -Actin. (C) Primäre murine Tag 5 T-Zellen wurden für 2 h mit 5  $\mu$ g/ml CHX bzw. DMSO als Lösemittel-Kontrolle vorinkubiert und anschließend in der

Gegenwart oder Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dex für 5 h mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. RT-PCR für CD95L und  $\beta$ -Actin. **(D)** Je ein Aliquot der in (C) mit CHX vorbehandelten Zellen wurde für 16 h anti-CD3 Antikörpern stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. Bestimmung der Apoptose per FSC/SSC-Analyse.

Zum Ausschluß eines indirekten Effekts über Neusynthese von Proteinen wie GILZ oder I $\kappa$ B wurden primäre Tag 5 T-Zellen mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid (CHX) vorinkubiert, und anschließend in der Gegenwart oder Abwesenheit von Dexamethason über TCR/CD3 stimuliert. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen eine signifikante Inhibition der TCR/CD3-vermittelten CD95L-Induktion durch Dexamethason (Abb. 32C). Jedoch hat die Blockierung der Protein-Neusynthese durch CHX keinen Einfluß auf diese Inhibition. Die Wirksamkeit von CHX wurde in einem Apoptose-Experiment überprüft; TCR/CD3-induzierte Apoptose ist in der Gegenwart von CHX aufgrund veränderter CD95L-Protein-Synthese inhibiert (Abb. 32D). Da durch die Blockierung der Protein-Synthese durch CHX die Reduktion der CD95L-mRNA-Induktion nach TCR/CD3-Stimulation nicht beeinträchtigt ist, zeigen diese Daten, daß der anti-apoptischen Effekt von Glucocorticoiden nicht auf einer Protein-Neusynthese (so z.B. von GILZ und I $\kappa$ B) beruht.

### **5.2.8 DER INHIBITORISCHE EFFEKT WIRD NICHT ÜBER BEEINTRÄCHTIGUNG DES TCR-SIGNALS VERMITTELT**

Eine Modulation des frühen TCR-Signals durch Glucocorticoide wurden für Thymozyten und T-Zell-Hybridomen berichtet (Baus *et al.*, 1996; Van Laethem *et al.*, 2001). Daher wurde überprüft, ob Dexamethason auch nach vollendeter TCR/CD3-Stimulation zu einer Reduktion der CD95L-mRNA-Expression führt.



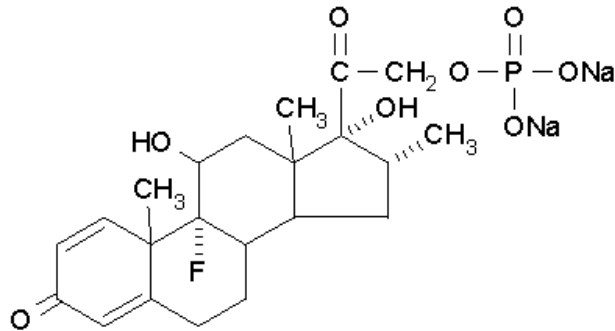
**Abbildung 33: Der anti-apoptotische Effekt von Dexamethason wird nicht über Beeinträchtigung des TCR-Signals vermittelt.** RT-PCR-Analyse der CD95L- und  $\beta$ -Actin-mRNA-Expression. DC27.1 Zellen wurden für 5 h über anti-CD3-beschichtete Platten stimuliert und anschließend in neue, unbeschichtete Platten transferiert. Während einer weiteren drei-stündigen Inkubation wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen (Spur 1), oder es wurde für die letzten 3 (Spur 4), 2 (Spur 3) bzw. 1 (Spur 2) Stunde(n) Dexamethason ( $10^{-7}$ M) hinzugegeben.

Die murine T-Zelllinie DC27.1 wurde für 5 Stunden über anti-CD3-Antikörper beschichtete Platten stimuliert. Das führte zu einer Induktion der CD95L-Expression (Abb. 33, Spur 1). Nach Transfer auf eine neue Platte wurde während einer darauffolgenden dreistündigen Inkubation für die jeweils letzten 3, 2 oder 1 Stunde(n) Dexamethason hinzugegeben. Man erkennt eine deutliche Reduktion der CD95L-mRNA-Expression durch eine Behandlung mit Dexamethason (Abb. 33, Spur 4). Somit sind Glucocorticoide in der Lage, die TCR/CD3-induzierte CD95L-Expression selbst nach vollendeter Stimulation des TCR negativ zu modulieren, was zeigt, daß es sich nicht um eine Beeinträchtigung des TCR-Signals selbst handeln kann, sondern vermutlich eine direkte transkriptionelle Regulation des CD95L-Promotors vorliegt.

### 5.2.9 EIN *IN VIVO* MODELL ZUM AICD

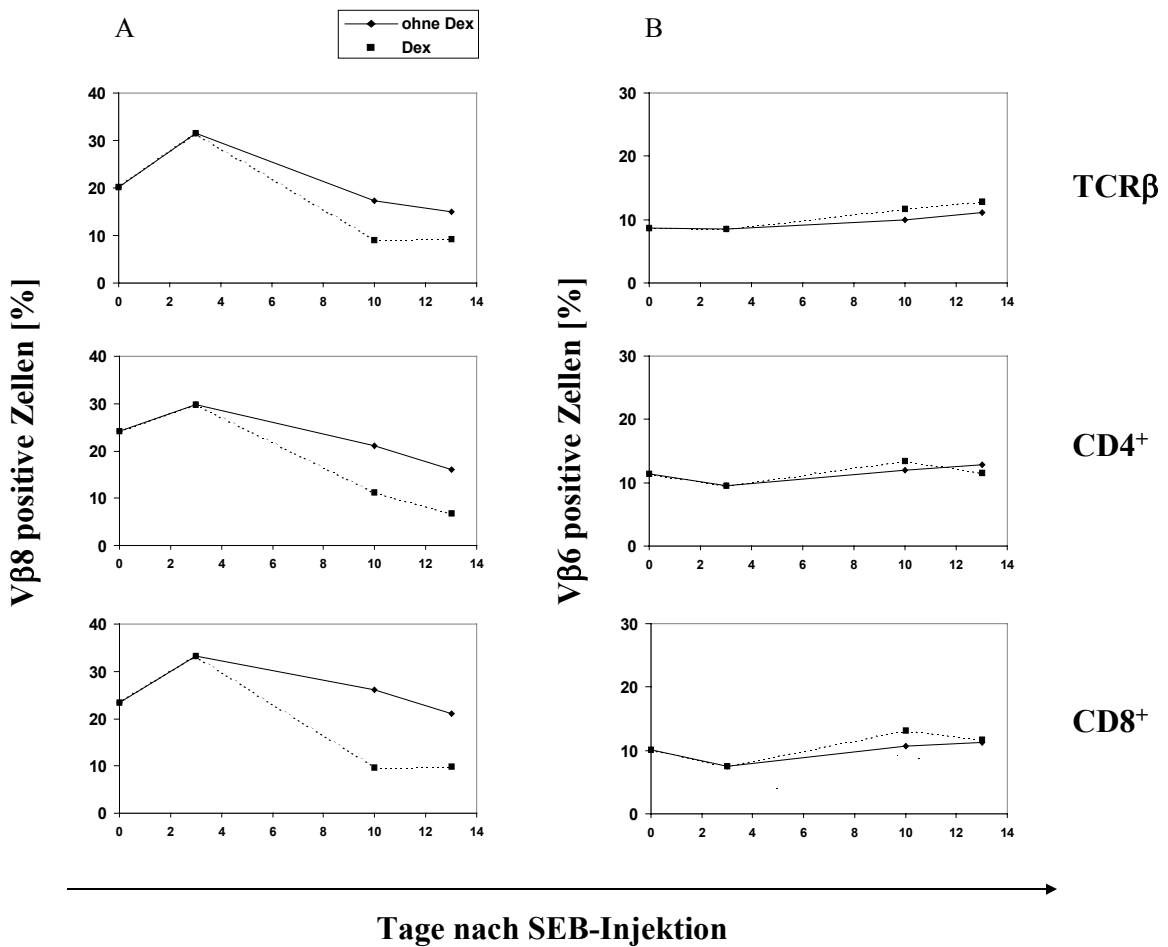
Die Experimente demonstrieren einen anti-apoptotischen Effekt von Glucocorticoiden auf TCR/CD3-induzierten CD95-vermittelten AICD peripherer T-Zellen *in vitro*. Die nahezu ubiquitäre Expression des GR läßt vermuten, daß die Glucocorticoid-Behandlung *in vivo* weitaus kompliziertere physiologische Auswirkungen hat. Um die Resultate der *in vitro* Experimente in einem *in vivo* AICD-Modell zu untersuchen, wurden das Modell der SEB- (staphylococcal enterotoxin **B**) Injektion verwendet

(Bonfoco *et al.*, 1998; Hildeman *et al.*, 2002a). SEB bindet als Superantigen an die V $\beta$ 8-Region des TCR und führt darüber zur Stimulation einer großen Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Gonzalo *et al.*, 1992; Kawabe and Ochi, 1991; White *et al.*, 1989). Als Kontrolle dienen V $\beta$ 6 T-Zellen, die durch eine SEB-Injektion nicht aktiviert werden.



**Abbildung 34: Struktur von Dexamethason 21-Phosphat.** Wasserlösliche Form des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason, welches *in vivo* in die wirksame Form überführt wird. Die Verabreichung erfolgte durch Gabe im Trinkwasser der Mäuse.

Die einmalige intravenöse Injektion von SEB führt zu einer Expansion der V $\beta$ 8 T-Zellen, die nach etwa 3 Tagen ihr Maximum erreicht (Abb. 35A). Dies gilt gleichermaßen für CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die V $\beta$ 6-positiven Zellen bleiben von der SEB-Injektion unbeeinträchtigt (Abb. 35B). Ab dem dritten Tag nach der SEB-Stimulation kann man eine Abnahme der V $\beta$ 8-T-Zellen beobachten, was der T-Zell-Deletion während des AICD entspricht. Ab Tag 3 der Stimulation bekamen die Mäuse entweder normales Wasser zu Trinken oder die Mäuse wurden einer Dexamethason-Behandlung ausgesetzt. Dazu wurde ihnen die wasserlösliche Form von Dexamethason (Dexamethason 21-Phosphat, Abb. 34), welche *in vivo* in Dexamethason konvertiert wird (Kroin *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1998), im Trinkwasser verabreicht (20 mg/l). *In vivo* besitzt Dex-Phosphat eine Halbwertszeit von etwa 5 Stunden (Clarke's Isolation and Identification of drugs, 2nd ed., p.518, 1986).

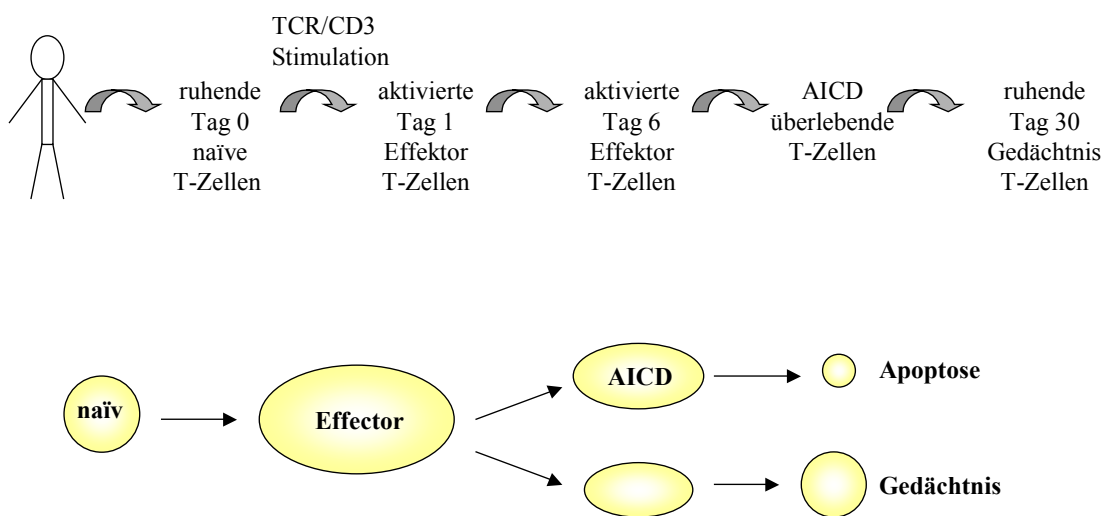


**Abbildung 35: Der *in vivo*-Effekt von Dexamethason auf den AICD im SEB-Modell.** Mäuse wurden intravenös mit 100 µg SEB in die Schwanzvene injiziert. Nach 3 Tagen bekamen sie entweder normales Wasser oder mit Dexamethason-21-Phosphat versetztes Wasser zu Trinken. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Gesamt-T-Zell-Population der Milz sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen auf die Expression von Vβ8 (A) und Vβ6 (B) im FACS getestet.

Überraschenderweise sieht man keine reduzierte Deletion durch Dexamethasonbehandlung, sondern im Gegenteil eine beschleunigte Abnahme der Vβ8-Population (Abb. 35A). Dies betrifft sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> Zellen. Die Milzen der Dexamethason-behandelten Mäuse waren stark verkleinert. Ebenso war auch die Zahl der T-Zellen stark reduziert (Daten nicht gezeigt), was auf einen apoptotischen Effekt der verwendeten Dexamethason-Konzentration (20 mg/l im Trinkwasser) auf Zellen der Milz hindeutet.

### 5.3 MECHANISMUS DER APOPTOSE-RESISTENZ HUMANER GEDÄCHTNIS T-ZELLEN

Bei einer typischen Primärantwort ist die weitreichende Eliminierung der Effektor T-Zellen am Ende der Immunreaktion unvollständig, so daß ein kleiner Anteil der T-Zellen überlebt und zu Gedächtniszellen differenziert. Unklar ist bisher der Mechanismus, durch welchen einige T-Zellen dem Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) entkommen. Um dies im humanen System zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Modell für Gedächtnis T-Zellen entwickelt, in welchem Langzeit-Kulturen primärer humaner T-Zellen verwendet wurden.



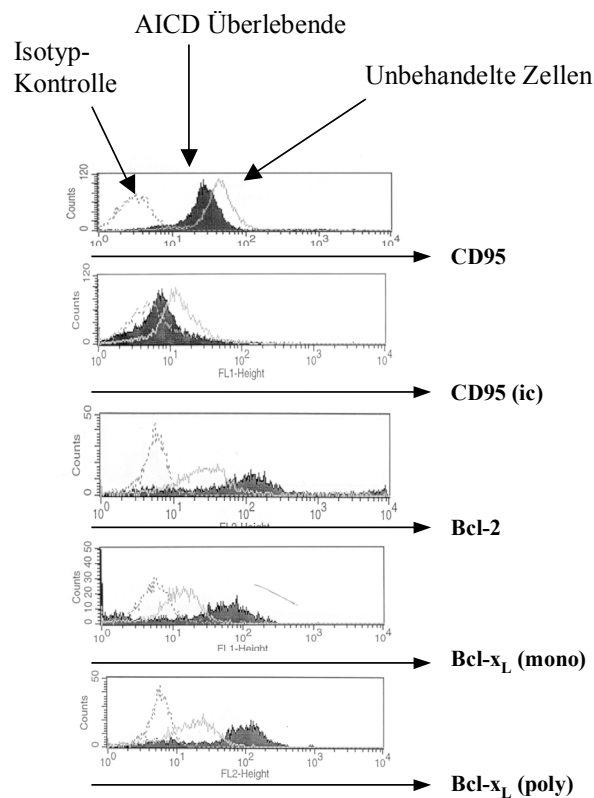
**Abbildung 36: Langzeit-Kultur primärer humaner T-Zellen als *in vitro*-Modell für Gedächtnis T-Zellen.** Humane T-Zellen wurden aus Spenderblut gewonnen, mit dem Lektin PHA über Nacht stimuliert und anschließend in IL-2-haltigem Medium kultiviert. Langzeit-überlebende Zellen dienten als Modell für Gedächtnis T-Zellen. Dieser Ansatz beruht auf der Beobachtung, daß T-Zellen nach Stimulation und einigen Tagen Kultur gegenüber Apoptose sensitiviert werden. Jene Zellen, die diesen Prozeß *in vitro* überleben, könnten eventuell den Zellen entsprechen, die *in vivo* die Deletionsphase am Ende einer Immunantwort überleben, um zu Gedächtnis T-Zellen zu differenzieren. Weitere Erklärungen siehe Text.

Dazu wurde das bisherige *in vitro*-Modell zum AICD (Klas *et al.*, 1993) weiterentwickelt (Abb. 36). Primäre T-Zellen wurden aus Spenderblut präpariert (Tag 0 T-Zellen), über Nacht mit dem Lektin PHA stimuliert (Tag 1 T-Zellen), und anschließend in IL-2-haltigem Medium weiter kultiviert. Die Zellen sind unter diesen Bedingungen nach etwa 6 Tagen (Tag 6 T-Zellen) gegenüber TCR/CD3- und CD95-induzierter Apoptose sensitiviert (Klas *et al.*, 1993). Die Frage war, ob Zellen, die diese Kultivierung über längere Zeit überleben (die Maximaldauer des Überlebens betrug 83

Tage), den Phänotyp von Gedächtnis T-Zellen aufweisen und somit als *in vitro*-Modell hierfür dienen können (Abb. 36).

### **5.3.1 T-ZELL-DELETION WÄHREND DES AICD IST UNVOLLSTÄNDIG**

Während der Deletionsphase der Immunantwort stirbt die Mehrzahl der Effektorzellen, jedoch überleben einige, die zu Gedächtniszellen differenzieren können. Die molekulare Ursache für das Überleben dieser Zellen ist bisher nicht geklärt. Um dies zu untersuchen wurden Apoptose-sensitive Tag 6 T-Zellen für 16 Stunden mit LZ-CD95L behandelt und anschließend die überlebenden Zellen über einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Diese CD95-resistenten Tag 6 Effektor T-Zellen wurden mit unbehandelten Tag 6 T-Zellen verglichen. Unbehandelte Zellen stellen ein Gemisch aus Apoptose-sensitiven und resistenten Zellen dar. Nach 16 h LZ-CD95L-Behandlung waren etwa noch 20 % der Zellen am Leben (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich zwischen resistenten und unbehandelten Zellen erfolgte durch FACS-Analyse auf Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine (Abb. 37). Man erkennt eine Reduktion der CD95-Expression in AICD-überlebenden Zellen, sowohl in einer CD95-Oberflächen-Färbung (Abb. 37, erstes Histogramm) als auch in einer intrazellulären FACS-Färbung (Abb. 37, zweites Histogramm).



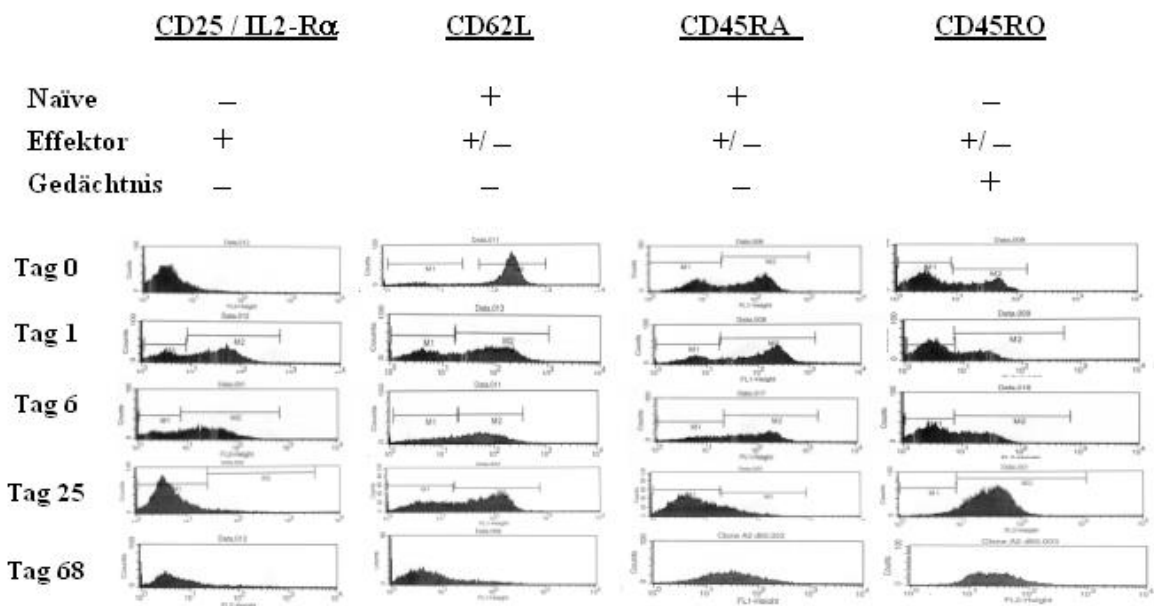
**Abbildung 37: Differentielle Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine in AICD-überlebenden Effektor T-Zellen.** Primäre Tag 6 Effektor T-Zellen wurden für 16 h mit 500 ng/ml LZ-CD95L stimuliert und anschließend die überlebenden Zellen über einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Die CD95-Expression der so gewonnenen Zellen wurde durch extrazelluläre (Antikörper: anti-APO-1, erstes Histogramm) und intrazelluläre Färbung (ic, Antikörper: B-10, zweites Histogramm) analysiert. Die Expression von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> wurde durch Färbung mit polyklonalen Seren bzw. monoklonalen Antikörpern bestimmt. Dargestellt ist die jeweilige Expression in AICD-überlebenden Zellen (ausgefüllte Histogramme) im Vergleich zu unbehandelten Tag 6 T-Zellen (offene Histogramme).

Diese Daten sprechen für eine Selektion von Zellen mit niedriger CD95-Expression. Zusätzlich zur verringerten Expression dieses pro-apoptotischen Proteins in den überlebenden Zellen konnte eine erhöhte Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> festgestellt werden (Abb. 37, drittes, viertes und fünftes Histogramm). Für Bcl-x<sub>L</sub> ergab sowohl ein polyklonales Serum als auch ein monoklonaler Antikörper eine stärkere Färbung in überlebenden Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das Überleben von einigen Effektor T-Zellen nach Behandlung mit CD95L mit einer erniedrigten CD95-Expression und einer erhöhten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> korreliert.

### 5.3.2 LANGZEIT-KULTIVIERTE T-ZELLEN WEISEN PHÄNOTYPISCHE MERKMALE VON GEDÄCHTNIS T-ZELLEN AUF

Gedächtnis T-Zellen exprimieren andere Marker als naive T-Zellen, so daß der Phänotyp der Oberflächenmarker für die Differenzierung von Zellen in verschiedenen Phasen der Aktivierung genutzt werden kann. Jedoch sind die Oberflächenmarker, die für die Unterscheidung von Gedächtniszellen von naiven Zellen verwendet werden, teilweise auch auf kurzlebigen Effektorzellen exprimiert (Rogers *et al.*, 2000). Um zwischen Effektor und Gedächtnis T-Zellen zu unterscheiden, wurde eine Kombination verschiedener Oberflächenmarker benutzt. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal stellt die Zeit dar, welche seit initialer Lektin-Stimulation vergangen ist.



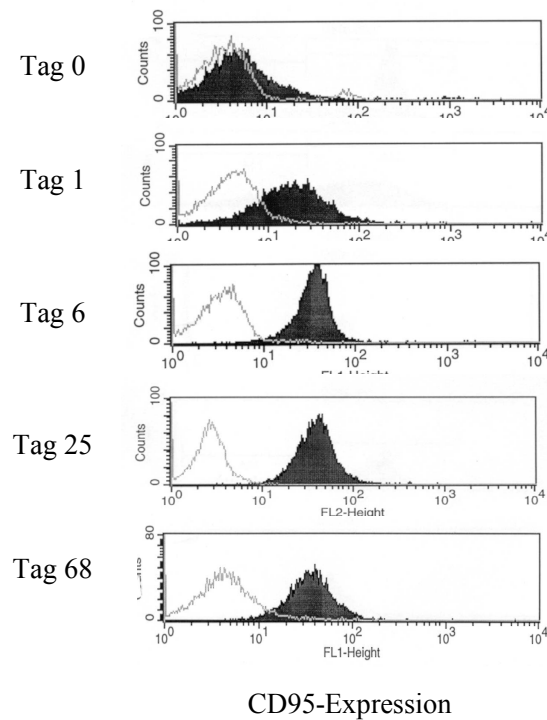
**Abbildung 38: Phänotypische Identifikation von Langzeit-kultivierten T-Zellen als Gedächtnis T-Zellen.** An den angegebenen Tagen wurde ein Aliquot der primären T-Zell-Kultur auf die Oberflächen-Expression von T-Zell-Markern überprüft. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD25, CD62L, CD45RA oder CD45RO gefärbt und im FACS analysiert.

Die wohl bekanntesten Marker zur Charakterisierung von Gedächtniszellen, CD45RA/CD45RO, werden kontrovers diskutiert (Arlettaz *et al.*, 1999). Obwohl die Langzeit-kultivierten T-Zellen den erwarteten CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> Phänotyp aufweisen (Abb. 38), wurden sie aus diesem Grund, ebenso wie die niedrige Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L, nicht zur Charakterisierung eingesetzt. Stattdessen wurden in dieser Studie drei Eigenschaften zur Charakterisierung von Gedächtniszellen verwendet: Bei Gedächtnis T-Zellen handelt es sich um ruhende bzw. nur langsam proliferierende Zellen, welche sich nicht in einem aktivierten Zustand befinden, und die deswegen im Gegensatz zu Tag 1-6 Effektorzellen nicht die IL2-R  $\alpha$ -Kette (CD25) exprimieren. Man erkennt eine Induktion der CD25-Expression von Tag 0 auf Tag 1, welche sich bis Tag 6 hält, jedoch zu späteren Zeitpunkten verschwindet (Abb. 38). Zudem sind Gedächtniszellen, ebenso wie naive T-Zellen, kleiner als proliferierende Effektorzellen, was durch FSC/SSC-Analyse im FACS zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Um naive T-Zellen von Gedächtniszellen zu unterscheiden, wurde der Umstand genutzt, daß naive T-Zellen im Gegensatz zu Zellen, die schon mal aktiviert wurden, keine CD95-Expression aufweisen (Abb. 39). Diese Marker wurden grundsätzlich nur in Kombination mit dem Parameter Zeit verwendet. Die PHA-Stimulation an Tag 0 aktiviert nahezu alle Zellen der Kultur. Bei T-Zellen, welche sich 2-3 Wochen später in einem nicht-aktivierten Zustand befinden, sollte es sich um Gedächtniszellen handeln.

Phänotypisch handelt sich bei den primären Langzeit-kultivierten T-Zellen des *in vitro*-Modells damit um Gedächtnis T-Zellen.

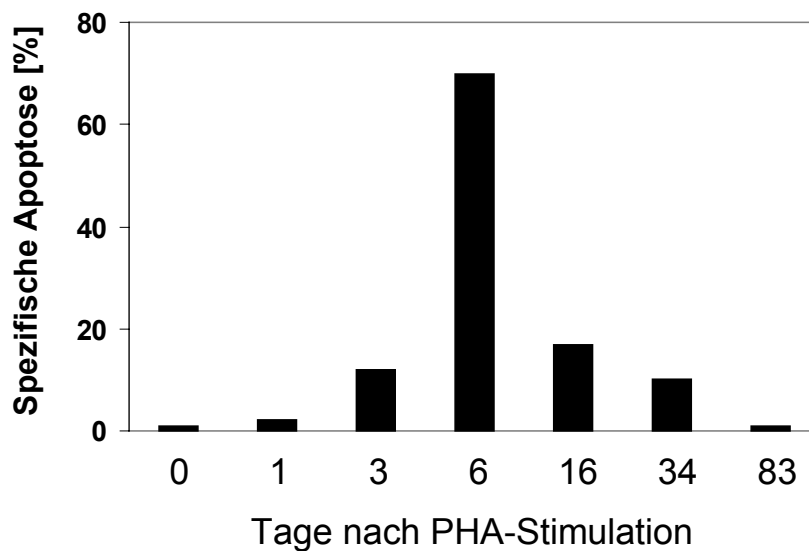
### **5.3.3 GEDÄCHTNIS T-ZELLEN SIND TROTZ CD95-EXPRESSION RESISTENT GEGENÜBER CD95-INDUZIRTER APOPTOSE**

Um den Apoptose-Phänotyp Langzeit-kultivierter T-Zellen zu untersuchen wurden primäre humane T-Zellen frisch präpariert und an Tag 0, 1, 6, 25 und 68 nach der initialen PHA-Stimulation auf CD95-Oberflächen-Expression analysiert. Die Zellen wurden nach initialer Stimulation an Tag 0 ohne weitere Stimulation in IL-2-haltigem Medium kultiviert. Tag 0 T-Zellen sind CD95-negativ, nach Stimulation jedoch wird die CD95-Expression induziert, ist an Tag 1 mittelstark und erreicht an Tag 6 ein Maximum (Trauth *et al.*, 1989). Auch nach 68 Tagen *in vitro*-Kultur bleibt die CD95-Expression hoch (Abb. 39). Die Intensität der CD95-Expression schwankt allerdings je nach T-Zell-Donor. So ist in manchen Fällen eine leicht erniedrigte Expression festzustellen, die derer von Tag 1 T-Zellen entspricht. Da Tag 1 T-Zellen mit mittelstarker CD95-Expression resistent gegenüber CD95-vermittelte Apoptose sind, was auf reduzierte CD95-DISC-Bildung und erhöhter Bcl-x<sub>L</sub>-Expression beruht, und Tag 6 T-Zellen mit hoher CD95-Expression sensitiv sind (Peter *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999a), war die Frage, wie Langzeit-kultivierte Zellen auf CD95-Stimulation reagieren.



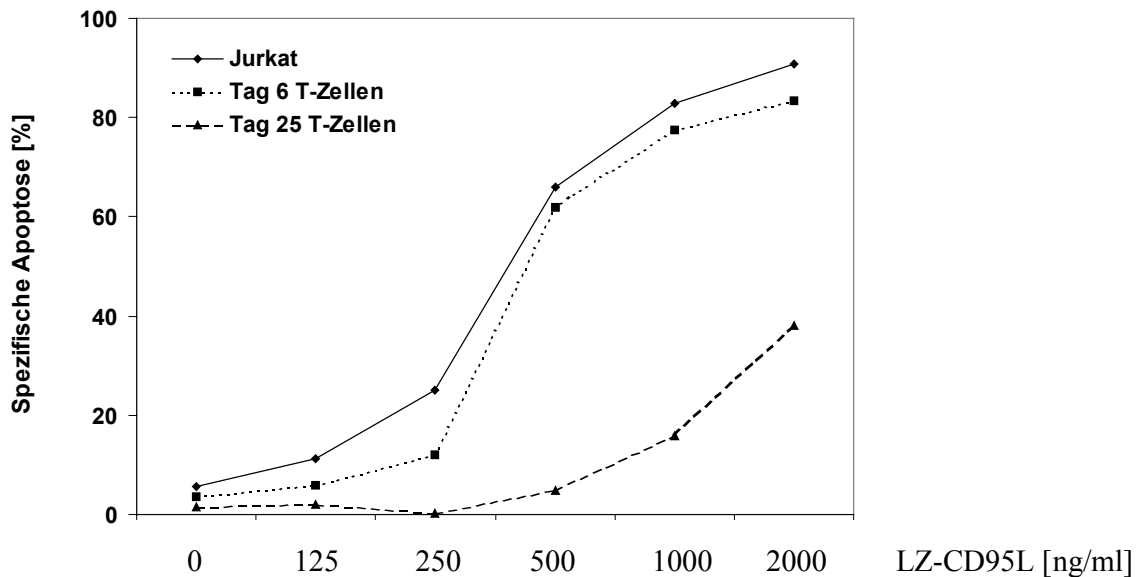
**Abbildung 39: Humane Gedächtnis T-Zellen exprimieren CD95.** Primäre humane T-Zellen wurden nach der Präparation für 16 h mit PHA stimuliert und anschließend in IL-2-haltigem Medium kultiviert. An den angegebenen Tagen wurde der Kultur ein Aliquot entnommen und auf die Expression von CD95 hin untersucht. Dazu wurden die Zellen mit dem CD95-Antikörper anti-APO-1 und einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-PE) gefärbt und im FACS analysiert.

Dazu wurden an verschiedenen Tagen der Kultivierung Aliquots für 16 h mit LZ-CD95L behandelt. Man erkennt eine Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose von Tag 0 auf Tag 6, jedoch eine deutliche Resistenz langzeit-kultivierter Zellen. Somit exprimieren die *in vitro* generierten humanen Gedächtniszellen zwar CD95, sind aber resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose (Abb. 40).



**Abbildung 40: Humane Gedächtnis T-Zellen sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose.** Primäre humane T-Zellen wurden an den angegebenen Tagen auf ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose hin untersucht. Dazu wurden sie für 16 h mit 500 ng/ml LZ-CD95L inkubiert. Bestimmung der Apoptose erfolgte durch FSC/SSC-Analyse im FACS.

Eine Titration des CD95L zeigt eine deutliche Resistenz von Tag 25 Gedächtnis T-Zellen (Abb. 41). Nur bei sehr hohen Konzentration ist eine geringe Induktion von Apoptose erkennbar. Dagegen sind Tag 6 Effektorzellen und Jurkat J27 T-Zellen CD95-sensitiv.

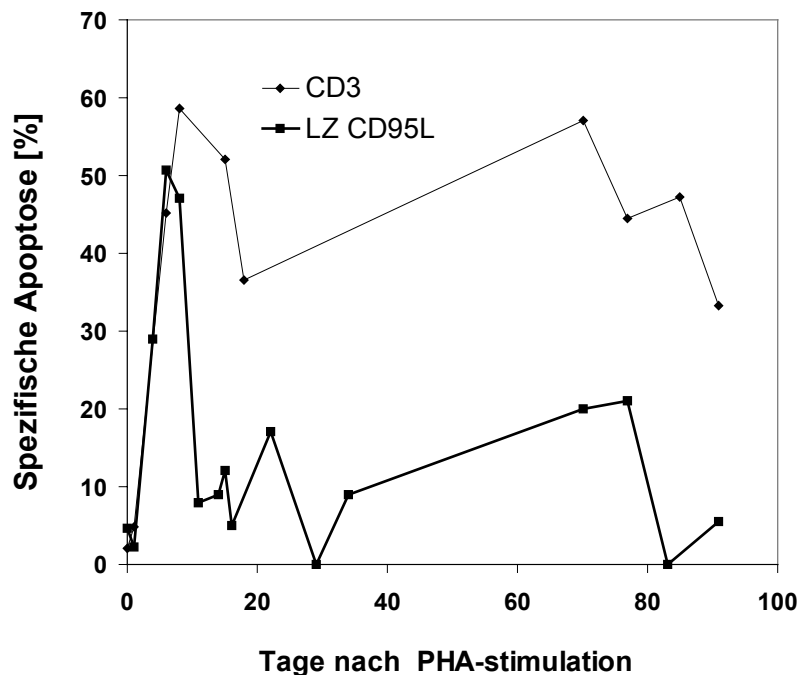


**Abbildung 41: Humane Gedächtnis T-Zellen sind deutlich resistenter gegenüber CD95-induzierter Apoptose als Effektorzellen.** Primäre humane T-Zellen an Tag 6 und Tag 25 nach initialer PHA-Stimulation und die Jurkat J27 T-Zellen wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen an LZ-CD95L behandelt. Bestimmung der Apoptose erfolgte durch FSC/SSC-Analyse im FACS.

Diese Resultate demonstrieren, daß Langzeit-kultivierte Gedächtnis T-Zellen trotz CD95-Expression auf der Zelloberfläche gegenüber CD95-induzierter Apoptose resistent sind.

#### 5.3.4 EIN ALTERNATIVER, CD95-UNABHÄNGIGER MECHANISMUS DES AICD IN GEDÄCHTNIS T-ZELLEN

Effektorzellen sind sowohl gegenüber CD95-induzierter als auch gegenüber TCR/CD3-vermittelter Apoptose sensitiv. Dieser als AICD bezeichnete Prozeß ist zur Deletion überflüssiger Effektorzellen am Ende der Immunantwort notwendig. Um zu überprüfen, wie sich Gedächtnis T-Zellen gegenüber TCR/CD3-Stimulation verhalten, wurden Aliquots primärer T-Zell-Kulturen an verschiedenen Tagen nach initialer PHA-Stimulation für 24 h mit anti-CD3-Antikörpern bzw. 16 h mit CD95L behandelt (Abb. 42).



**Abbildung 42: CD95-unabhängiger Mechanismus des AICD in Langzeit-kultivierten T-Zellen.** Primäre humane T-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten auf ihre Sensitivität gegenüber CD95- und TCR/CD3-induzierter Apoptose hin untersucht. Stimulation mit 500 ng/ml LZ-CD95L erfolgte für 16 h, TCR/CD3-Stimulation für 24 h. Bestimmung der Apoptose erfolgte durch FSC/SSC-Analyse im FACS.

Wie schon in Abb. 40 gezeigt, sind naive Tag 0 T-Zellen resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose, und erreichen ein Sensitivitäts-Maximum an Tag 6. Während dieser Expansionsphase verlaufen die Sensitivitäts-Kurven für CD95- und TCR/CD3-induzierter Apoptose parallel (Abb. 42). Ab etwa Tag 15 nach initialer PHA-Stimulation sind die Zellen CD95-resistent, jedoch überraschenderweise sensitiv gegenüber TCR/CD3-vermittelten Zelltod. Da TCR/CD3-induzierte Apoptose an Tag 6 über das CD95/CD95L-System vermittelt wird, die CD95-Signalübertragung in langzeit-kultivierten T-Zellen jedoch nicht funktionell ist, muß es sich hierbei um einen alternativen Mechanismus des AICD handeln.

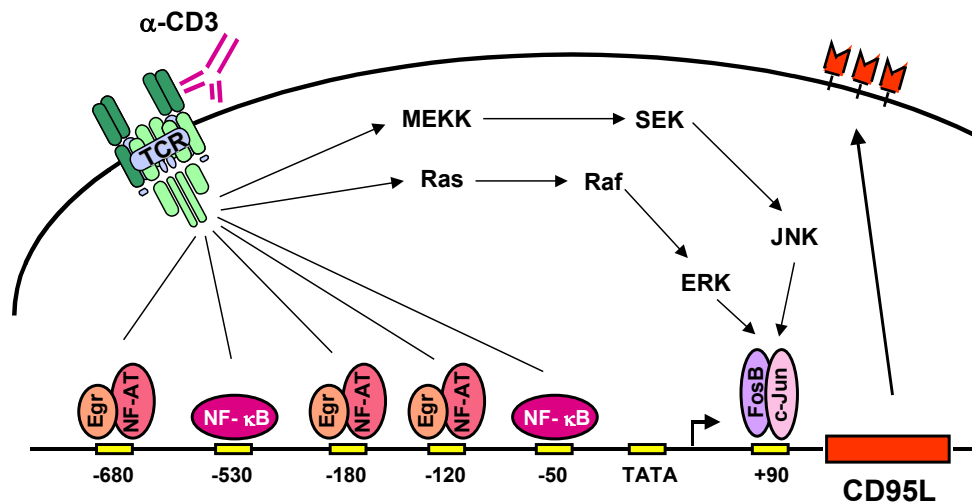
Diese Resultate demonstrieren, daß *in vitro* langzeit-kultivierte primäre T-Zellen, die phänotypisch Gedächtnis T-Zellen entsprechen, trotz CD95-Oberflächen-Expression resistent gegenüber CD95-induzierten Zelltod sind, in ihnen jedoch durch TCR/CD3-Stimulation ein CD95-unabhängigen Mechanismus des AICD induziert wird.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 EINE KRITISCHE ROLLE FÜR FOSB IM CD95-VERMITTELTEN AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN ZELLTOD (AICD) PRIMÄRER T-ZELLEN

Diese Studie zeigt erstmals eine kritische Rolle des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1, bestehend aus FosB und c-Jun, während des AICD primärer humaner T-Zellen. Es konnte eine AP-1 Bindung an eine Sequenz im 5' UTR des humanen CD95L-Promotors nach TCR/CD3-Stimulation nachgewiesen werden. Mutationen in dieser FosB/c-Jun Bindestelle oder Expression von dominant-negativem Jun reduzieren die TCR/CD3-vermittelte Induktion des CD95L-Promotors, und folglich den AICD.

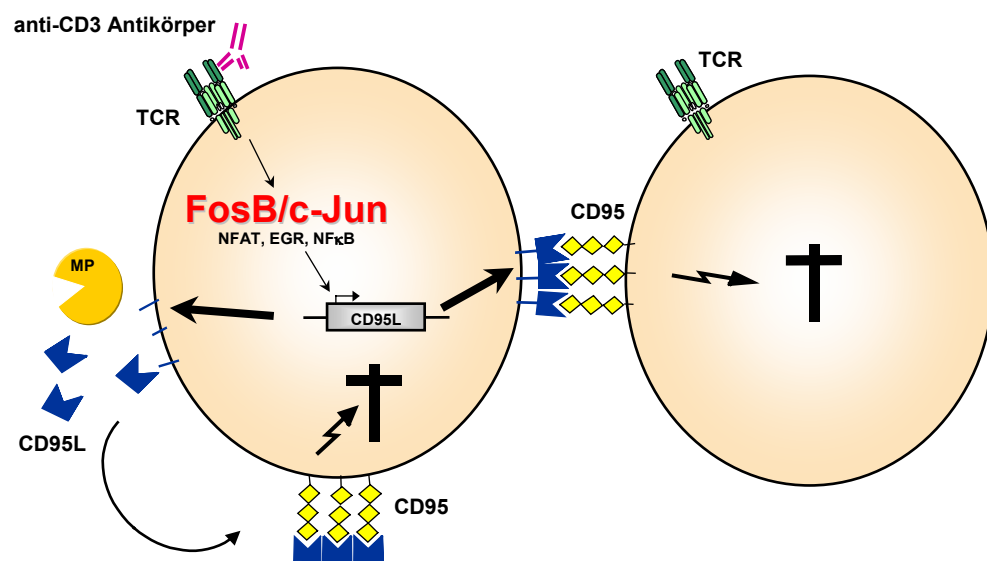
Interessanterweise führen Chemotherapeutika in Leber-Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung und Bindung von AP-1 an dieselbe Bindestelle im 5' UTR (Eichhorst *et al.*, 2000). Ebenso führen DNA-schädigende Stimuli wie Etoposid, Teniposid und UV-Strahlung in humanen T-Zellen zu einer Aktivierung von AP-1 und, in Kooperation mit NF- $\kappa$ B, zu einer daraus folgenden Streß-induzierten CD95L-Expression (Kasibhatla *et al.*, 1998). In Dickdarm-Tumorzellen wurde *upstream* des Transkriptions-Starts eine AP-1-responsive Bindestelle identifiziert (Harwood *et al.*, 2000), wohingegen in Leber-Zellen die AP-1 Stelle im 5' UTR als bedeutsam nachgewiesen wurde (Eichhorst *et al.*, 2000). In allen Fällen wurde ein heterodimerer Komplex aus c-Jun und c-Fos als Aktivator der CD95L-Expression beschrieben. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, daß nach TCR/CD3-Stimulation primärer humaner T-Zellen ein AP-1 Komplex an die CD95L 5' UTR bindet, welcher aus c-Jun und FosB besteht, jedoch keine signifikanten Mengen an c-Fos beinhaltet (Abb. 43).



**Abbildung 43: Schematische Darstellung der Induktion des CD95L-Promotors nach TCR/CD3-Stimulation.** Stimulation des TCR/CD3-Komplexes humaner Tag 6 T-Zellen führt zur Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, welche kooperativ die Induktion der CD95L-Expression bewirken. Die Bindung des Heterodimers aus FosB und c-Jun an die AP-1 Erkennungssequenz im 5' UTR ist für eine vollständige Induktion des CD95L-Gens notwendig. Weitere Erläuterungen siehe Text.

AP-1 Bindung nach TCR/CD3-Stimulation war an eine Sequenz von  $-125$  bis  $-95$  des murinen CD95L-Promotors nachweisbar, wobei diese Bindung von funktionellem NF- $\kappa$ B abhängig ist (Matsui *et al.*, 2000). Ebenfalls wurde die Beteiligung von AP-1 bei der CD95L-Induktion embryonaler Fibroblasten nach Behandlung mit alkylierenden Reagenzien beschrieben (Kolbus *et al.*, 2000). Allerdings ist zu bedenken, daß die Promotoren des murinen und des humanen CD95L-Gens deutliche Unterschiede aufweisen, besonders in 5' UTR, so daß aus Studien im murinen System keine direkten Schlußfolgerungen zu Transkriptionsfaktor-Erkennungssequenzen im humanen CD95L-Promotor gezogen werden können. Im humanen System wurde eine AP-1 Bindestelle bei Position  $-950$  identifiziert, die bei der Induktion der CD95L-Expression nach Behandlung mit DNA-schädigenden Reagenzien beteiligt ist (Kasibhatla *et al.*, 1998). Diese wird jedoch nicht bei T-Zell-Aktivierungs-induzierter CD95L-Promotor-Aktivität benötigt (Kasibhatla *et al.*, 1999). Während c-Fos pro- und anti-apoptotische Aktivitäten zugeschrieben werden, abhängig vom Zelltyp und Stimulus, stellen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die ersten funktionellen Daten zur Beteiligung von FosB bei der CD95L-vermittelten Apoptose dar. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, daß es im humanen CD95L-Promotor noch weitere AP-1 Bindestellen gibt, demonstrieren diese Experimente, daß die Bindung von FosB in 5' UTR zum AICD beiträgt (Abb. 44). Obwohl FosB für die vollständige Induktion des CD95L nach TCR/CD3-Stimulation essentiell ist, induziert die Überexpression von FosB alleine nicht den Promotor. Dies

führt zu der Vermutung, daß FosB in der Zelle zu jeder Zeit vorliegt, und c-Jun, als der Dimerisierungspartner den limitierenden Schritt darstellt. Interessant wäre die Klärung der Frage nach der Expression von FosB und c-Jun während des AICD. Die Beteiligung eines JunD/FosB-Dimers in TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1)-induzierter Apoptose wurde für Hepatozyten und Epithelzellen berichtet, wobei FosB zu einer Smad3/Smad4-abhängigen Transkription führt (Yamamura *et al.*, 2000). Im Unterschied zu primären humanen T-Zellen führte die FosB-Überexpression in einer Hepatom-Zelllinie auch alleine zu einer Verstärkung TGF $\beta$ 1-induzierter Transkription.



**Abbildung 44: Modell für die Rolle von FosB im Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD).** Restimulation primärer T-Zellen über den TCR führt zur Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, welche kooperativ die Induktion der CD95L-Expression und damit die Einleitung der Apoptose über Stimulation des CD95-Rezeptors bewirken.

Wie viele andere Gene steht das CD95L-Gen unter der Kontrolle einer großen Anzahl *cis*-regulatorischer Promotor-Elemente, welche zusammen die Feinregulation der transkriptionellen Aktivität des Gens gewährleisten. Vieles deutet darauf hin, daß FosB und c-Jun funktionell mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie NF-AT, synergistisch die CD95L-Expression regulieren. Mutationen in der NF-AT Bindestelle im CD95L-Promotor blockieren vollständig die induzierbare Transkription dieses Promotors (Li-Weber *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 1998). In Zellen des Immunsystems sind kooperative NF-AT/NF- $\kappa$ B Komplexe nach Stimulation des Antigen-Rezeptors von T- und B-Zellen beschrieben worden (Rao *et al.*, 1997). Zudem ist der AICD von der kooperativen

Aktivität von NF-AT/AP-1-Interaktionen abhängig (Macian *et al.*, 2000).  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aktiviert die Phosphatase Calcineurin, welche NF-AT dephosphoryliert und damit dessen Translokation aus dem Cytosol in den Nukleus bewirkt (Crabtree, 1999). Da die Stimulation des PKC/Ras-Signaltransduktionsweges in der Aktivierung eines AP-1 Transkriptions-Komplexes resultiert (Karin, 1995), stellt eine Kooperation zwischen NF-AT und AP-1 Proteinen damit einen wirkungsvollen Mechanismus zur Integration von Signalen des  $\text{Ca}^{2+}$ - und PKC/Ras-Signalweges dar. Kooperative Bindung wurde für Promotor-Regionen zahlreicher Gene gezeigt (Cockerill *et al.*, 1995; Rooney *et al.*, 1995). Möglicherweise agieren NF-AT und AP-1 funktionell zusammen, indem sie an unterschiedliche DNA-Sequenzen im CD95L-Promotor binden. Dies könnte die schwache Induktion des -36/+100 Reporter-Konstruktes erklären, welche die NF-AT Erkennungs-Sequenz nicht enthält (Li-Weber *et al.*, 1999). Ungeachtet des exakten Mechanismus der Kooperativität erweitern die Ergebnisse dieser Studie das Wissen um die Anzahl der AP-1 Untereinheiten, die in der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Ob auch andere apoptotische Prozesse, welche ebenfalls mit Änderungen in der FosB-Expression assoziiert sind, wie z.B. Glutamat-vermittelte Apoptose neuronaler Zellen (Lidwell and Griffiths, 2000) und TGF $\beta$ -induzierte Apoptose in Hepatozyten (Yamamura *et al.*, 2000), durch FosB/c-Jun-abhängiger Aktivierung vermittelt werden, bleibt zu untersuchen.

## **6.2 DIE INHIBITION DES AKTIVIERUNGS-INDUZIERTEN ZELLTODS (AICD) DURCH GLUCOCORTICOID-HORMONE WIRD ÜBER EINE DIREKTE TRANSREPRESSION DES CD95L-GENS DURCH DEN GLUCOCORTICOID-REZEPTOR VERMITTELT**

Direkte Hinweise für einen wichtigen Beitrag des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) zur Thymozyten-Differenzierung stammen aus Studien, in welchen sogenannte *transgene knockout* (TKO) Mäuse verwendet wurden, die antisense-GR mRNA unter der Kontrolle des T-Zell-spezifischen *lck* Promotors exprimieren. Dies resultierte in einer 50%-igen Reduktion der GR-Expression und verursachte eine deutliche Reduktion in der Anzahl  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  semi-reifer Thymozyten, welche eine erhöhte Sensitivität gegenüber TCR/CD3-vermittelter Apoptose aufwiesen (King *et al.*, 1995). Die periphere T-Zellzahl ist in diesen Mäusen reduziert und weist ein verändertes TCR-Repertoire auf (Lu *et al.*, 2000; Tolosa *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse wurden mit der Notwendigkeit des GR-Signals zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und Umwandlung des ansonsten Apoptose-induzierenden TCR-Signals in ein schwächeres positives Signal erklärt. Somit würden Thymozyten, welche normalerweise positiv selektiert werden, in der Abwesenheit des GR-Signals durch das TCR-Signal deletiert. Diese Hypothese wurde durch FTOC-(fetal thymic organ culture-) Experimente mit Metyrapon, welches den letzten Synthese-Schritt von Cholesterol zu Cortison inhibiert, unterstützt (Ashwell *et al.*, 1996; Vacchio and Ashwell, 1997; Vacchio *et al.*, 1999;

Vacchio *et al.*, 1994). Allerdings darf nicht unerwähnt bleiben, daß kürzlich gezeigt werden konnte, daß Metyrapon seinen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung von Thymozyten unabhängig vom GR-Signalweg ausübt (Purton *et al.*, 2002). Erstaunlicherweise zeigen mehrere Studien, welche das gleiche TKO-Modell verwendeten wie oben beschrieben, gegensätzliche Ergebnisse, so z.B. eine erhöhte Anzahl CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten und peripherer T-Zellen (Morale *et al.*, 1995; Pazirandeh *et al.*, 2000; Sacedon *et al.*, 1999a; Sacedon *et al.*, 1999b). Bisher konnte kein Konsens über die physiologische Rolle des GR in Thymozyten gefunden werden.

GR<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben aufgrund einer defekten Entwicklung der Lunge in den ersten Minuten nach der Geburt (Tronche *et al.*, 1998). GR<sup>-/-</sup>-Embryonen weisen, soweit eine Untersuchung möglich ist, keine Defekte in der Thymus-Zellularität und der Verteilung der Thymozyten-Populationen auf. Um die Bedeutung des GR in der Thymozyten-Reifung und der Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell-Homöostase in adulten Tieren zu klären, wurden mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems konditional GR-defiziente Mäuse generiert, in welchen der GR nur in T-Lymphozyten fehlt (GR<sup>lckCre</sup>). Bei diesen Mäusen fehlt die DNA-Bindedomäne und ein Proteinprodukt ist nicht nachweisbar. Im Gegensatz zur Expression von antisense-GR mRNA hat das Fehlen des GR-Proteins keinen Einfluß auf die Thymozyten-Reifung. Auch das TCR-Repertoire weist keine signifikanten Unterschiede auf, was für eine normale Selektion spricht (A. Bauer, unveröffentlichte Daten). Gestützt werden diese Ergebnisse durch Studien, welche Mäuse mit einem hypomorphen GR-Allel (GR<sup>hypo</sup>) verwenden (Purton *et al.*, 2000). Diese Mäuse enthalten eine Insertion in Exon 2 des GR-Gens, welche die N-terminale Transaktivierungsdomäne zerstört. Die meisten dieser Mäuse sterben aufgrund einer fehlerhaften Lungenentwicklung bei der Geburt (Cole *et al.*, 1995). Thymozyten-Entwicklung von GR<sup>hypo</sup> Embryonen ist unverändert (Purton *et al.*, 2000). Eine neuere Studie bestätigt diesen unveränderten Phänotyp durch Rekonstitution subletal bestrahlter Mäuse mit GR<sup>hypo</sup> T-Zell-Vorläufern aus fetaler Leber (Purton *et al.*, 2002). Bei den GR<sup>hypo</sup> Mäuse ist zu bedenken, daß die 3' Region des GR-Gens transkribiert und auch translatiert wird, und somit ein verkürztes GR-Protein vorliegt (Cole *et al.*, 2001). Was dieses verkürzte GR-Protein auf molekularer Ebene noch bewirken kann, wurde bisher nicht vollständig geklärt. Der Unterschiedliche Phänotyp von GR<sup>hypo</sup> zu GR<sup>-/-</sup> legt aber nahe, daß noch wichtige Gene reguliert werden, wenn vielleicht auch weniger effizient. Auch wenn dieses nicht zur Transaktivierung und Repression der Gen-Expression in der Lage ist, ist eine Bestätigung der Daten zur Rolle des GR in T-Lymphozyten durch Verwendung einer konditionalen *knockout*-Strategie besonders aufgrund voriger Studien mit gegensätzlichen Resultaten von großem Wert. Die weitreichenden, kontroversen Diskussionen (Ashwell *et al.*, 2000a; Ashwell *et al.*, 2000b; Godfrey *et al.*, 2000; Godfrey *et al.*, 2001; Jondal *et al.*, 2001) um die mögliche Funktion des GR während der T-Zell-Entwicklung wurden vor allem durch die Limitationen der experimentellen Ansätze verursacht. Der Umstand, daß GR<sup>-/-</sup> Mäuse und die Mehrzahl der GR<sup>hypo</sup> Mäuse direkt nach der Geburt sterben, erschwerte eine Untersuchung in adulten Tieren. Dieses Problem wurde nur durch Rekonstitutions-

Experimente umgangen. Die vorliegenden Daten demonstrieren eine normale Entwicklung und Homöostase peripherer T-Lymphozyten von GR<sup>lckCre</sup> Mäusen, die im Gegensatz zu antisense-GR transgenen und GR<sup>hypo</sup> Mäusen vollständig defizient für GR sind. Somit ist die Hypothese, daß Glucocorticoide die TCR-Signalübertragung regulieren, nicht weiter aufrecht zu erhalten. Es ist nicht nur schwer, die vorliegenden Daten im Kontext der GR-antisense transgenen Mäuse zu erklären, sondern es ist noch schwerer, die vollkommen unterschiedlichen Resultate der beiden Maus-Modelle zu erklären, welche das gleiche antisense-Konstrukt unter der Regulation des gleichen Promotors exprimieren (King *et al.*, 1995; Morale *et al.*, 1995). Eine mögliche Erklärung liegt darin, daß das im TKO-Modell verwendete antisense Transkript des 3' UTR des Ratten-GR (Pepin *et al.*, 1992) Homologien zu anderen mRNAs aufweist und somit zu einer unspezifischen Inhibition anderer Transkripte führt. Das Ausmaß einer solchen Inhibition mag aufgrund allelischer Unterschiede stark vom Maus-Stamm abhängen.

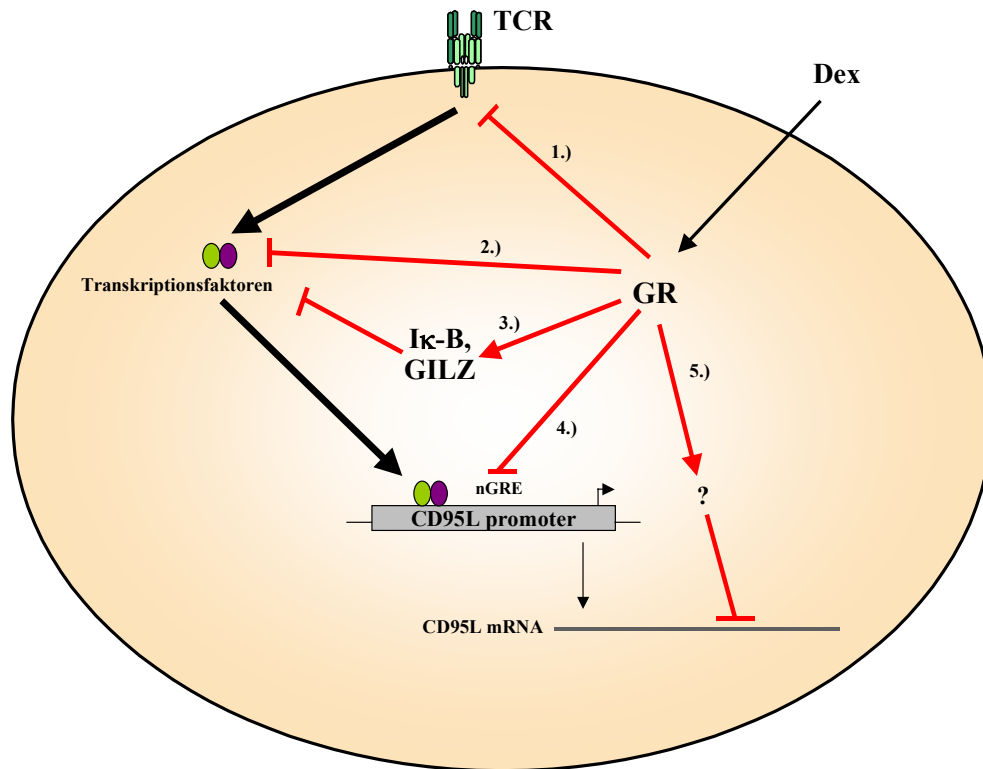
Schon 1993 wurde in einer Studie (Gonzalo *et al.*, 1993) die *in vivo* Rolle des GR in der Expansions- und Deletionsphase peripherer T-Zellen während der Immunantwort untersucht. Dazu wurden Mäuse mit SEB injiziert und 4 Stunden später mit dem Glucocorticoid-Antagonisten RU486 behandelt. Es wurden keinerlei Unterschiede in der Expansion und Kontraktion der V $\beta$ 8-T-Zell-Population festgestellt (Gonzalo *et al.*, 1993). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie an konditional GR-defizienten Mäusen spielen endogene Glucocorticoid-Werte, welche direkt nach SEB- oder CD3-Stimulation transient erhöht sind, keine Rolle bei der Regulation der klonalen Expansion (d.h. Proliferation) und Deletion (d.h. Aktivierungs-induziertem Zelltod).

In Übereinstimmung mit Daten aus einer Studie mit peripheren GR<sup>hypo</sup>-T-Zellen (Purton *et al.*, 2002) hat das Fehlen des GR in GR<sup>lckCre</sup>-Mäusen keinerlei Auswirkungen auf die Proliferation und Aktivierbarkeit peripherer T-Zellen. Die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden wird hauptsächlich über die Inhibition der Zytokin-Expression vermittelt, was eine reduzierte Aktivierung des Immunsystems zur Folge hat. Durch Glucocorticoid-Behandlung wird die IL-2 mRNA-Expression über eine Beeinträchtigung der AP-1- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert (Almawi *et al.*, 1991; Reichardt *et al.*, 2001), was eine wichtige Rolle des GR bei der T-Zell-Aktivierung vermuten läßt (Herrlich, 2001). Aber auch wenn der GR für die Übermittlung der immunsupprimierenden Funktion nach Glucocorticoid-Behandlung wichtig ist, zeigt diese Arbeit, daß der GR *in vitro* nicht zur Regulation der T-Zell-Aktivierung und Proliferation unter Bedingungen beiträgt, bei welchen keine exogenen Glucocorticoide verabreicht werden (Abb. 22). Dies deutet darauf hin, daß der GR in T-Zellen keine entscheidende Rolle in der Regulation der Homöostase peripherer T-Zellen spielt. Jedoch ist zu bedenken, daß Veränderungen der HPA-Achsen-Aktivität während einer Infektion, durch Faktoren wie Stress und Zytokinen, zu veränderten Glucocorticoid-Leveln im Tier führt (Reichardt *et al.*, 2000). Dies könnte *in vivo* indirekte Effekte auf die T-Zell-Immunität haben. Eine Untersuchung im pathologischen Kontext wäre durch eine *in vivo* Infektion von GR<sup>lckCre</sup>-Mäusen möglich.

Eine mögliche regulatorische Funktion von Glucocorticoiden im Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) peripherer T-Zellen wurde intensiv mit Hilfe von T-Zell-Hybridomen untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine funktionelle Rolle für die direkte DNA-Bindung des GR an den CD95L-Promotor, und einer daraus resultierenden Regulation des AICD primärer T-Zellen.

Die Restimulation des TCR/CD3-Komplexes führt in aktivierten peripheren T-Zellen zur Oberflächen-Expression des CD95L, welcher über Aktivierung des CD95-Rezeptors Apoptose induziert. Zahlreiche Reagenzien wurden als Modulatoren der CD95L-Expression berichtet, u.a. Vitamin E (Li-Weber *et al.*, 2002b), Parthenolid (Li-Weber *et al.*, 2002a) und Glucocorticoide (Cui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995). Einige Studien berichten zudem von einer Glucocorticoid-vermittelten Inhibition des Signalübertragungsweges unterhalb von CD95, was auf eine Induktion des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 (Zipp *et al.*, 2000) oder einer Regulation zahlreicher pro- und anti-apoptischer Moleküle, u.a. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, FLIP und Bax (Yerramasetti *et al.*, 2002), zurückzuführen ist. Auch konnte ein Zusammenspiel von Dexamethason und TNF- $\alpha$  in der Inhibition CD95-vermittelter Apoptose in einer humanen Lungen-Epithel-Zelllinie gezeigt werden, welche auf einer Induktion von c-IAP2 beruht (Webster *et al.*, 2002). Die Mehrzahl der Untersuchungen zur anti-apoptischen Wirkungsweise von Glucocorticoiden zeigen dagegen einen Einfluß nur oberhalb der Todesrezeptoren, d.h. in der Regulation der Expression der entsprechenden Todesliganden (Cui *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1995). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Weder in humanen noch murinen primären T-Zellen war eine Beeinflussung CD95-induzierter Apoptose zu beobachten. Dabei war die Bcl-2 Expression unverändert.

Bei einem T-Zell-Hybridom wurde die differentielle Regulation der TNF-Familienmitglieder CD95L, TRAIL, TNF- $\alpha$  durch Dexamethason gezeigt (Wang *et al.*, 2001). Die Rolle von TNF- $\alpha$  im AICD ist bisher nicht vollständig geklärt (Medema *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1996), doch ließ eine Modulation der CD95L-Expression eine Funktion von Glucocorticoiden im AICD vermuten. Es konnte eine anti-apoptische Wirkung von Dexamethason während des AICD in primären T-Zellen bestätigt werden. Arbeiten an Hybridom-Zellen wiesen zuvor auf einen solchen Effekt hin (Cui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995). Auch Aktivierungs-induzierter Zelltod akut HIV-1-infizierter humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Glucocorticoide inhibiert (Lu *et al.*, 1995). Ziel dieser Studie war die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition des AICD in primären T-Zellen.



**Abbildung 45: Schematische Darstellung einiger möglicher Signalübertragungswege des Glucocorticoid-Rezeptors.** Nach Aktivierung des GR durch Liganden, wie z.B. dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason, kann der GR als ein Liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene positiv oder negativ regulieren. Dabei kann es sich um einen direkten [4.)] oder indirekten [3.)] Mechanismus handeln, wobei letzterer über die Induktion von Proteinen vermittelt wird, welche die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren modulieren. Zudem wurde ein Translations-abhängiger, negativer Effekt auf mRNA-Stabilität gezeigt [5.]). Als Monomer kann der GR mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF-κB, interagieren [2.)] und deren Aktivität reduzieren. Vermutet wurde zudem ein direkter Effekt auf die TCR-Signalübertragung durch Inhibition früher Tyrosin-Phosphorylierung [1.)]

Der GR ist ein Liganden-kontrollierter Transkriptionsfaktor. Die Signalübertragung durch den GR ist komplex und umfasst unterschiedliche Mechanismen. Einige davon sind schematisch in Abb. 45 dargestellt. Der GR kann als ein Monomer direkt über Protein-Protein-Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren wechselwirken und dadurch deren Aktivierung inhibieren (Gottlicher *et al.*, 1998). Dies wurde für Spi-1 (Gauthier *et al.*, 1993), AP-1 (Jonat *et al.*, 1990; Reichardt *et al.*, 1998a), NF-κB (Liden *et al.*, 1997), OCT-1 (Kutuh *et al.*, 1992), CREB (Imai *et al.*, 1993) und GATA-1 (Chang *et al.*, 1993) gezeigt. Der GR kann zudem als Co-Aktivatoren von STAT5 agieren

(Stocklin *et al.*, 1996). Dieser Mechanismus ist von der DNA-Bindung des GR unabhängig (Herrlich, 2001). GR<sup>dim</sup>-Mäuse tragen eine Mutation, welche zu einem Dimerisierungsdefekt des GR führt und damit die DNA-bindungsabhängige Transaktivierung verhindert, so daß GRE-vermittelte Geninduktion nach Glucocorticoid-Behandlung fehlt (Reichardt *et al.*, 1998b). Modulation der Genexpression durch Protein-Protein-Interaktion bleibt jedoch erhalten. Da der anti-apoptotische Effekt von Dexamethason in GR<sup>dim</sup>-T-Zellen nicht zu beobachten ist, kann ausgeschlossen werden, daß dieser Signalweg für die Vermittlung des beobachteten Effekts verantwortlich ist. Obwohl AP-1- und NF- $\kappa$ B-Bindestellen im CD95L-Promotor beschrieben sind (Li-Weber *et al.*, 2000), spielt eine mögliche Modulation dieser Transkriptionsfaktoren durch den GR bei der Inhibition des AICD keine entscheidende Rolle.

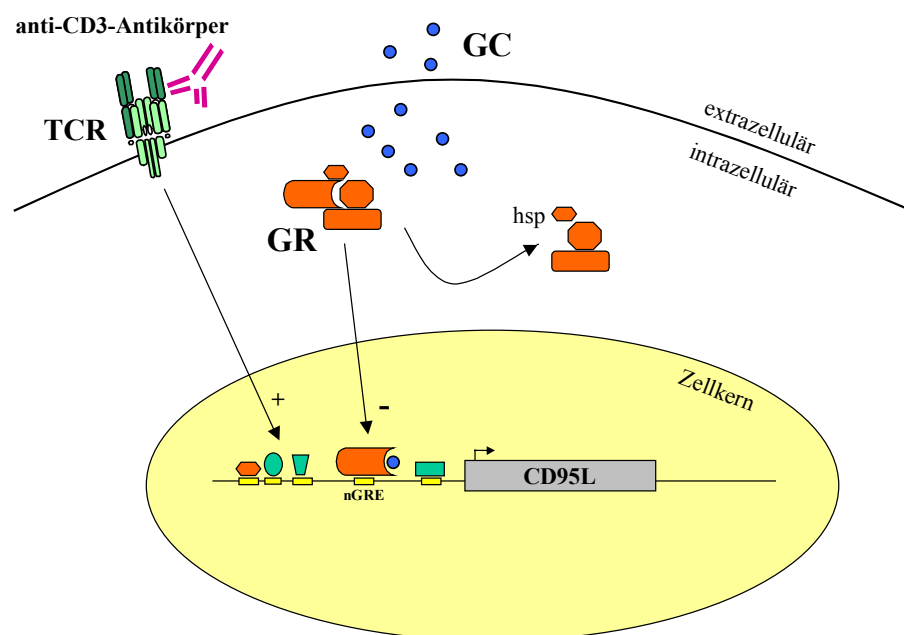
Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wurde als essentiell für die TCR/CD3-induzierte CD95L-Expression nachgewiesen (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Norian *et al.*, 1998). Der Inhibitor von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, ist ein Glucocorticoid-induzierbares Gen. Erhöhte I $\kappa$ B-Synthese kann den Kerntransport und damit die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B reduzieren. Somit ließ die Korrelation zwischen I $\kappa$ B-Induktion und Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Glucocorticoid-Behandlung einen direkten Zusammenhang vermuten (Auphan *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995). Jedoch zeigten weitere Studien, daß die Glucocorticoid-vermittelte Repression der NF- $\kappa$ B-Aktivität unabhängig von der I $\kappa$ B-Induktion ist (Brostjan *et al.*, 1996; Costas *et al.*, 2000; Goppelt-Strube *et al.*, 1999; Heck *et al.*, 1997; Reichardt *et al.*, 2001). So wurde demonstriert, daß erhöhte I $\kappa$ B-Synthese nicht (De Bosscher *et al.*, 2000) oder nur teilweise (Crinelli *et al.*, 2000) die Glucocorticoid-induzierte Immunsuppression beeinflußt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß auch die Repression von Entzündungsreaktionen durch reduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität zwar mit einer erhöhten I $\kappa$ B-Expression korreliert, dies jedoch nicht durch diese bedingt wird, da der anti-inflammatorische Effekt auch in der GR<sup>dim</sup>-Mutante erhalten ist (Reichardt *et al.*, 2001). Ein weiteres Glucocorticoid-induzierbares Protein, welches die Transaktivierung des CD95L nach TCR/CD3-Stimulation beeinflussen könnte, ist GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) (D'Adamio *et al.*, 1997). GILZ kann ebenso wie der GR an AP-1 und NF- $\kappa$ B binden und dadurch deren Aktivität inhibieren (Ayroldi *et al.*, 2001; Mittelstadt and Ashwell, 2001). Auch wenn GILZ-Überexpression T-Zell-Hybridomen eine Resistenz gegenüber TCR/CD3-vermittelte Apoptose verleiht (Nocentini *et al.*, 1997), kann die Induktion der Expression sowohl von GILZ als auch I $\kappa$ B als Mediatoren des anti-apoptotischen Effekts von Dexamethason beim AICD ausgeschlossen werden, da die Protein-Neusynthese nicht für die Inhibition der CD95L-mRNA-Induktion notwendig ist (Abb. 32). Auch in Gegenwart des Translations-Inhibitors Cycloheximid war Dexamethason in der Lage, CD95L-mRNA-Induktion nach TCR/CD3-Stimulation zu inhibieren, was zeigt, daß die Protein-Neusynthese für diesen Effekt entbehrlich ist.

Glucocorticoide können die Zytokin-Expression auch post-transkriptionell durch Reduktion der mRNA-Stabilität inhibieren. Dies wurde u.a. für c-myc (Tosato *et al.*, 1990), IL-1 (Amano *et al.*, 1993), IL-2 (Boumpas *et al.*, 1991), IL-6 (Tobler *et al.*, 1992), IL-8 (Tobler *et al.*, 1992), TNF- $\alpha$  (Mehindate *et al.*, 1994) und Cox-2 (Chang *et al.*, 2001) berichtet, jedoch ist dafür die *de novo* Synthese eines destabilisierenden Proteins notwendig (Amano *et al.*, 1993; Maroder *et al.*, 1990; Tobler *et al.*, 1992). Somit kann auch die Modulation der CD95L-mRNA Stabilität durch Glucocorticoide als Mechanismus der Inhibition des AICD nicht verantwortlich sein.

TCR/CD3-Stimulation führt zu einer erhöhten Protein-Kinase-Aktivität (June *et al.*, 1990), welche zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von zahlreichen intrazellulären Substraten führt, darunter auch von Untereinheiten des TCR selbst. In Thymozyten und T-Zell-Hybridomen wurde eine Reduktion dieser frühen Tyrosin-Phosphorylierung bei Behandlung mit hohen Dexamethason-Konzentration gezeigt (Baus *et al.*, 1996; Van Laethem *et al.*, 2001). Sehr hohe Dexamethason-Gaben wurden als Inhibitoren der Tyrosin-Phosphorylierung nach TCR-Stimulation beschrieben (Anastassiou *et al.*, 1992). Jedoch wird dieser Befund kontrovers diskutiert, da in anderen Studien dieser Effekt nicht beobachtet wird (Elliott *et al.*, 1996). In primären humanen T-Zellen konnte auch bei hohen Dexamethason-Konzentrationen eine Inhibition des TCR-Signals jedoch nur beobachtet werden, wenn die Zellen zusammen mit PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>) behandelt wurden (Elliott *et al.*, 1996). Hoche Konzentrationen von Dexamethason erhöhen in PEG<sub>2</sub>-vorbehandelten T-Zellen die cAMP-Konzentration, was mit dem TCR-Signal interferiert (Mendelsohn *et al.*, 1973). Allerdings konnte gezeigt werden, daß sowohl cAMP- als auch Glucocorticoid-vermittelte Inhibition von AICD nicht auf einer Beeinträchtigung des TCR-Signals direkt beruht, da auch die Behandlung mit nach TCR/CD3-Stimulation noch zu einer Reduktion des Zelltods führt (Lee *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. RT-PCR-Daten (Abb. 33) zeigen, daß Dexamethason seine inhibitorische Wirkung auf die CD95L-Expression auch nach vollendeter TCR-Stimulation ausüben kann. Auch initiale Experimente zur frühen Tyrosin-Phosphorylierung von TCR-Komponenten lassen keine Unterschiede durch Dexamethason-Behandlung vermuten. Zudem beruht der eventuelle Effekt von Glucocorticoiden auf die Vermittlung des TCR-Signals auf *de novo* Proteinsynthese (Baus *et al.*, 1996), was aus diesem Grund in diesem System als Mechanismus ausgeschlossen werden kann.

Die Resultate dieser Studie weisen eine direkte DNA-Bindung des GR an den CD95L-Promotor nach Dexamethason-Behandlung nach. Dies führt zu einer reduzierten Induktion der CD95L-Expression und damit reduzierten Apoptose (Abb. 46). Bei der GR-Bindesequenz im CD95L-Promotor handelt es sich um ein nGRE (**n**egative **g**lucocorticoid **r**esponsive **e**lement). Die nGRE-*Consensus*-Sequenz wurde bisher nicht klar definiert, doch scheint sie von positiven GRE-Sequenzen abzuweichen. So wurde ein nGRE im PRL3-Promotor gefunden, welches nur eine Seite des palindromischen GRE enthält, was nur einer GR-Dimer-Hälfte die DNA-Bindung erlaubt (Subramaniam *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu positiven GRE erhöhen nGRE die Promotor-Aktivität in

der Abwesenheit der GR-Bindung, wahrscheinlich durch andere Transkriptionsfaktoren, welche in der selben Region binden, deren Aktivität durch die GR-Bindung negiert wird (Sakai *et al.*, 1988). Für diese Wirkungsweise gibt es mehrere Modelle. Es wurde eine direkte Interaktion des an nGRE gebundenen GR mit der basalen Transkriptionsmaschinerie beobachtet (Jaffuel *et al.*, 1999), aber auch Überlappungen der nGRE-Sequenz mit einerseits der TATA-Box (Morrison and Eisman, 1993) und andererseits Bindestellen weiterer Transkriptionsfaktoren (Subramaniam *et al.*, 1998) (Drouin *et al.*, 1989a; Drouin *et al.*, 1989b; Drouin *et al.*, 1989c). Dabei ist die Bindung exklusiv nur eines der Faktoren möglich. Eine Inhibition der Transaktivierung durch ein überlappendes bzw. benachbartes nGRE wurde für AP-1 beschrieben (Chandran *et al.*, 1999) (Kraemer *et al.*, 1992; Malkoski and Dorin, 1999). Zusätzlich zu einer Kompetition um DNA-Bindung (Diamond *et al.*, 1990; Hoepfner *et al.*, 1995) könnte die GR-Bindung an ein nGRE die transkriptionelle Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren durch sterische Veränderungen modulieren (Nakai *et al.*, 1991). Beschrieben wurde dieser Mechanismus für AP-1; eine Bindung von GR in direkter Nähe einer AP-1 Bindestelle erlaubte zwar noch die AP-1 Bindung, führte jedoch zu einer Transrepression der AP-1 Aktivität (Pearce *et al.*, 1998).



**Abbildung 46: Vereinfachte Darstellung der inhibitorischen Wirkung von Glucocorticoiden auf die TCR/CD3-vermittelte CD95L-Induktion.** TCR/CD3-Restimulation primärer T-Zellen resultiert in der Aktivierung und dem nukleären Transport zahlreicher Transkriptionsfaktoren, welche durch Bindung an den CD95L-Promotor zur Induktion der CD95L-Expression führen. Glucocorticoid-Behandlung von T-Zellen führt zur Bindung des Liganden-aktivierten GR-Dimers an eine nGRE-Sequenz im CD95L, was in einer reduzierten Induktion nach TCR/CD3-Stimulation resultiert. Somit bewirken Glucocorticoide über eine

direkte CD95L-Promotor-Bindung des GR eine Reduktion des Aktivierungs-induzierten Zelltods. Hsp: Hitze-Schock-Proteine; GC: Glucocorticoide; GR: Glucocorticoid-Rezeptor; nGRE: negatives Glucocorticoid Responsives Element. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Da nGRE-Sequenzen bisher nicht gut definiert sind, ist deren Identifikation innerhalb eines Promotors nur schwer durch Sequenz-Analyse möglich. Experimente zur Überprüfung einer direkten Bindung des GR an den CD95L-Promotor werden derzeit unternommen. Dazu wird ein 3 Kb- bzw. 1,5 Kb-langes Fragment des murinen CD95L-Promotors in einen Luziferase-Vektor kloniert. Deletions- und Mutations-Analysen können dann zur Identifikation und funktionellen Beschreibung der nGRE-Sequenz führen. Ein 500 bp-langes Promotor-Konstrukt zeigte zwar eine TCR/CD3-Induzierbarkeit, jedoch keine negative Regulation durch Dexamethason (Daten nicht gezeigt), was demonstriert, daß die putative nGRE-Bindestelle weiter 5' im Promotor zu suchen ist.

Um detailliertere Erkenntnisse über die regulatorischen Mechanismen des GR in sowohl peripheren T-Zellen als auch Thymozyten zu erhalten, laufen derzeit Unternehmungen zur Analyse der differentiellen Genexpression nach TCR/CD3-Stimulation in der Gegenwart oder Abwesenheit von Dexamethason durch Verwendung von DNA-Microarrays (Affymetrix).

Diese Studie stellt eine detaillierte Analyse der molekularen Mechanismen der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition des AICD in primären T-Zellen dar. Mit Hilfe konditional GR-defizienter Mäuse und Dimerisierungs-defekter GR-Mutanten konnte erstmals die Funktion und der Wirkungsmechanismus des GR in T-Zell-Entwicklung und Regulation des AICD in primären T-Zellen aufgeklärt werden. Bei Dexamethason-Applikation über das Trinkwasser konnte eine beschleunigte Reduktion der V $\beta$ 8-T-Zell-Population festgestellt werden. Diese Deletion betrifft nur die aktivierten V $\beta$ 8-Population, nicht jedoch die unstimulierten V $\beta$ 6-Zellen, was auf eine *in vivo*-Sensitivierung aktivierter T-Zellen gegenüber Glucocorticoid-induzierter Apoptose hinweist. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß die systemische Glucocorticoid-Behandlung *in vivo* nicht nur T-Lymphozyten, sondern auch zahlreiche andere Zelltypen beeinflusst. So wäre es denkbar, daß die Dexamethason-induzierte Genregulation in T- oder nicht-T-Zellen indirekt zu einer beschleunigten Deletion SEB-stimulierter T-Zellen führt. Um dies weiter zu untersuchen, wird durch eine Titration der Dexamethason-Menge im Trinkwasser versucht, ein Dosis zu finden, welche für die T-Zellen subtoxisch ist. Interessant wäre in diesem Kontext auch die mechanistische Untersuchung der Sensitivierung aktivierter T-Zellen gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose *in vivo*.

Die Signalübertragung durch den Liganden-aktivierten GR ist komplex und unterscheidet sich je nach Zelltyp und den physiologischen Bedingungen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Maus-Modelle und *in vitro* Experimenten mit Hybridom-Zellen entstand ein komplexes Bild der Wirkungsweise des GR in T-Zellen.

Indem in dieser Studie jeder mögliche, bisher bekannte Signalweg des GR in primären T-Zellen getestet wurde, konnte die Regulation des CD95L-Promotors über ein nGRE als der anti-apoptotische Mechanismus von Glucocorticoiden im Laufe des AICD identifiziert werden. Repression von NF- $\kappa$ B und AP-1, deren Bindestellen ebenfalls im CD95L-Promotor identifiziert wurden (Harwood *et al.*, 2000; Li-Weber *et al.*, 2000), scheinen bei der Inhibition keine wesentliche Rolle zu spielen.

In murinen T-Zellen führt die Dexamethason-Behandlung in Gegenwart CD95L-antagonistischer Antikörper zu einer stärkeren Inhibition des Zelltods als die Blockade der CD95L-CD95-Interaktion alleine, was darauf hinweist, daß Glucocorticoide zusätzlich zum CD95-System möglicherweise noch ein weiteres im AICD involviertes System inhibieren. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie an einem T-Zell-Hybridom, in welchem eine Reduktion der TNF- $\alpha$  Induktion durch Dexamethason gezeigt wurde (Wang *et al.*, 2001). In humanen T-Zellen hat Dexamethason hingegen keinen Effekt auf CD95L-inhibierten AICD, was auf einen eventuellen Spezies-Unterschied in der Beteiligung verschiedenen Todesrezeptor-Systeme beim AICD hinweist. Dies verlangt jedoch weitergehende Untersuchungen.

Glucocorticoid-Hormone üben ihre entzündungshemmende Wirkung hauptsächlich dadurch aus, daß sie die Expression von Zytokinen inhibieren und damit die Aktivierung des Immunsystems effizient hemmen. Obwohl es noch am genauem Verständnis der entzündungshemmenden Funktion der Glucocorticoide fehlt, ist klar gezeigt, daß der GR Liganden-abhängig die Expression zahlreicher inflammatorischer Zytokine vermindert, was so die Immunantwort inhibiert. Bei GR<sup>lckCre</sup>-Mäusen wurde im Gegensatz zu GR<sup>lysMCre</sup>-Mäusen, welche konditional GR-defizient in myeloiden Zellen (z.B. Makrophagen) sind (Clausen *et al.*, 1999), kein Verlust der Entzündungshemmung oder der Immunsuppression durch Glucocorticoide gefunden (unveröffentlichte Daten). Bei den *in vitro* verwendeten Dexamethason-Mengen in dieser Arbeit handelt es sich um Konzentrationen, die *in vivo* unter Streß-Bedingungen erreicht werden können (Gonzalo *et al.*, 1993; Reichardt *et al.*, 2000). Ob die Glucocorticoid-vermittelte Reduktion der CD95L-Expression zur Inhibition einer Entzündungsreaktion *in vivo* beiträgt bleibt zu untersuchen. Denkbar wäre, daß bei Glucocorticoid-Behandlung von chronischen Entzündungen die Reduktion der Anzahl CD95L-positiver Effektor T-Zellen zu einer verminderten Gewebsschädigung beiträgt.

### 6.3 MECHANISMEN DER APOPTOSE-RESISTENZ HUMANER GEDÄCHTNIS T-ZELLEN

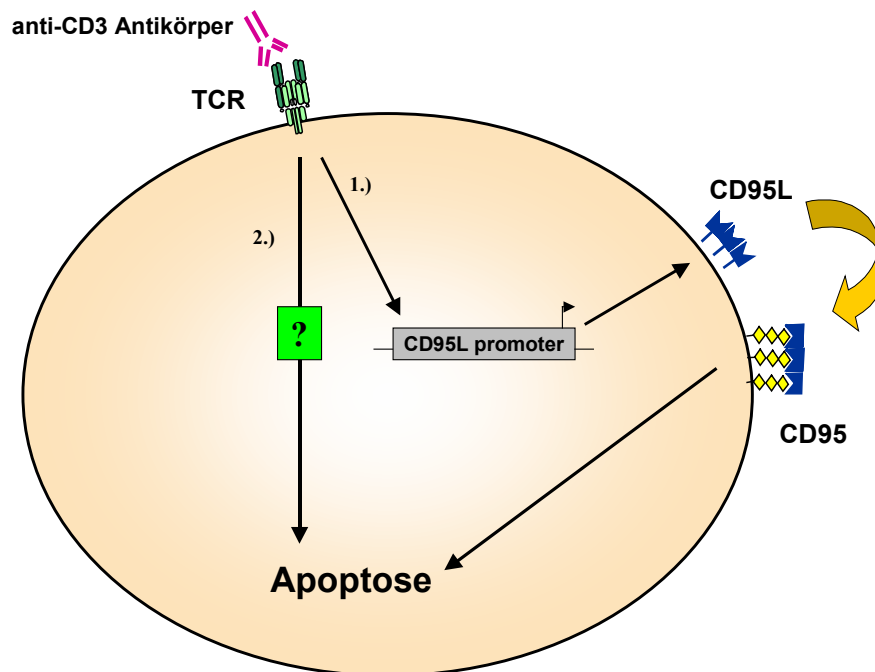
Immunologisches Gedächtnis schützt Organismen vor wiederholter Infektion mit Pathogenen. Die Aufrechterhaltung der verstärkten Reaktivität nach Antigen-Kontakt wird durch langlebige Gedächtnis-Zellen vermittelt. Der genaue Mechanismus, wie Gedächtnis T-Zellen entstehen, ist nicht vollständig geklärt, jedoch geht man davon aus,

daß sie aus aktivierten Effektorzellen hervorgehen, die während des AICD nicht durch Apoptose deletiert werden (Opferman *et al.*, 1999). Diese Arbeit demonstriert, daß langzeit-kultivierte Gedächtniszellen trotz deutlicher CD95-Expression gegenüber CD95-induzierte Apoptose resistent sind. TCR/CD3-Stimulation führt jedoch über einen CD95-unabhängigen Mechanismus des AICD zu Apoptose.

Die Stimulation des CD95-Todesrezeptors führt in Tag 6 Effektor T-Zellen zur Induktion von Apoptose. Einige Zellen überleben jedoch die Behandlung mit LZ-CD95L *in vitro*. Diese überlebenden Zellen könnten diejenigen darstellen, die *in vivo* zu Gedächtnis T-Zellen differenzieren. Ob es sich bei der Selektion um einen stochastischen Prozeß handelt, oder ob eine Effektor T-Zelle vorprogrammiert ist, zu einer Gedächtnis T-Zelle zu differenzieren, ist bisher nicht geklärt. Initiale Experimente zeigen, daß Effektorzellen, die eine CD95-Stimulation überleben, eine reduzierte CD95-Oberflächen-Expression und eine erhöhte Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> aufweisen (Abb. 37). Da das Todessignal des CD95-Rezeptors schnell in einer Caspasen-Aktivierung und damit einer Initiation von Apoptose endet (Scaffidi *et al.*, 1998), ist eine spontane Regulation der Expression pro- oder anti-apoptotischer Proteine unwahrscheinlich. Die Daten weisen eher darauf hin, daß solche Effektorzellen selektiert werden, die schon vorher geringere CD95-Expression in Kombination mit erhöhten Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Leveln aufweisen. Es wurde von einer Induktion der Bcl-2-Expression in Antigen-spezifischen Gedächtniszellen berichtet, jedoch wird in diesem Zusammenhang auch eine Reduktion der Bcl-2-Level in Effektorzellen im Vergleich zu naïven T-Zellen gezeigt (Grayson *et al.*, 2001; Grayson *et al.*, 2000), was im Widerspruch zu Experimenten mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell steht (Scaffidi *et al.*, 1999a). Allerdings ist zu bedenken, daß Tag 6 T-Zellen als CD95-Typ I identifiziert wurden, d.h. die Signalübertragung nach CD95-Stimulation nicht von der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien abhängig ist, da durch starke CD95-DISC-Aktivität ausreichende Mengen an Caspasen direkt aktiviert werden können (Scaffidi *et al.*, 1998). Dies stellt eine physiologische Rolle der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine in den überlebenden Zellen in Frage. Im Gegensatz zu passiven Formen der T-Zell-Apoptose (Nelson and Willerford, 1998) läßt sich der AICD nur unvollständig durch Bcl-2 inhibieren (Dhein *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1995). Jedoch ist zu bedenken, daß die AICD-überlebenden Zellen eine geringere CD95-Oberflächen-Expression aufweisen. Apoptose-resistente Tag 1 T-Zellen, welche CD95-Typ II sind und somit auf die apoptotische Aktivierung der Mitochondrien angewiesen sind, weisen ebenfalls geringere CD95-Expression auf. Dies könnte auf einen Wechsel von CD95-Typ I zu Typ II hinweisen, so daß eine erhöhte Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Expression Resistenz vermitteln könnte. Diese Frage kann in Zukunft durch die Untersuchung der CD95-DISC-Bildung geklärt werden, da CD95-Typ II-Zellen eine verminderte CD95-DISC-Bildung im Vergleich zu CD95-Typ I-Zellen zeigen (Scaffidi *et al.*, 1998). Bei murinen Gedächtnis T-Zellen wurde von einer erhöhten c-FLIP-Expression berichtet, was zu einer Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose führen könnte (Inaba *et al.*, 1999), wobei im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit Gedächtniszellen in deren Modell auch

resistent gegenüber TCR/CD3-induzierten Zelltod waren. In humanen Effektor T-Zellen wurde eine Induktion von c-FLIP<sub>s</sub> nach TCR/CD3-Restimulation beobachtet, was die CD95-DISC-Aktivität reduziert und damit Zellen von Apoptose schützt (Kirchhoff *et al.*, 2000).

Aktivierungs-induzierter Zelltod wird hauptsächlich über das CD95/CD95L-System vermittelt. Dementsprechend gibt es eine klare Korrelation zwischen der Sensitivität gegenüber TCR/CD3- und CD95-induzierter Apoptose während der Expansions- und Deletionsphase der Immunantwort. Diese Korrelation geht während der weiteren Kultivierung verloren. Gedächtnis T-Zellen (Tag 30 – 80) sind trotz CD95-Resistenz sensitiv gegenüber TCR/CD3-vermittelten AICD. Dies wirft die Frage nach einem alternativen AICD-Mechanismus auf (Abb. 47). Denkbar wäre die Beteiligung eines anderen Todesrezeptors der TNFR-Familie, aber auch ein Todesrezeptor-unabhängiger Mechanismus ist nicht auszuschließen. Derzeitige Untersuchungen auf diesem Gebiet konzentrieren sich auf die Blockierung einzelner Todes-Signalwege, so z.B. die Inhibition von Todesliganden wie TNF- $\alpha$  oder TRAIL, aber auch die Inhibition von Caspasen. Eine Form CD95-unabhängiger Apoptose nach TCR/CD3-Stimulation wurde in T-Zellen von Patienten mit septischem Schock beobachtet (M. Weigand, unveröffentlichte Daten), wobei dieser Mechanismus unabhängig von Caspasen-Aktivierung ist. Initiale Experimente deuten aber auf eine Notwendigkeit von Caspasen in der Signalübertragung der TCR/CD3-induzierten Apoptose in Gedächtnis T-Zellen hin (S. Fas, unveröffentlichte Daten). Es bleibt zu klären, ob es sich bei dem Mechanismus der TCR/CD3-induzierten Apoptose in Gedächtniszellen um einen direkten Signalweg handelt, oder ob wie in Effektorzellen die Neusynthese von Proteinen notwendig ist. Ebenso ist die Rolle der apoptotischen Aktivierung von Mitochondrien hierbei bislang nicht geklärt.



**Abbildung 47: Vereinfachtes Modell eines CD95-unabhängigen Mechanismus des AICD in primären humanen Gedächtnis T-Zellen.** 1.) TCR/CD3-Restimulation induziert in Effektor T-Zellen die Expression des CD95L, welcher durch Stimulation von CD95 Apoptose induziert. 2.) Langzeit-kultivierte Gedächtnis T-Zellen hingegen sind trotz hoher CD95-Expression resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose. TCR/CD3-Restimulation führt in diesen Zellen über einen bisher ungeklärten Mechanismus zur Apoptose-Induktion.

Die *in vitro* kultivierten T-Zellen werden über die gesamte Dauer der Experimente in IL-2-haltigem Medium gehalten. Da Gedächtnis-Zellen nicht (oder nur sehr langsam) proliferieren, exprimieren sie nicht die hochaffine  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25). Nur unphysiologisch hohe Konzentrationen an IL-2 sind noch in der Lage, über die verbliebenden IL-2R-Ketten ein Signal zu übertragen. Eine Aktivierung von Antigen-spezifischen Gedächtniszellen durch IL-2 und IL-4 wurde im murinen T-Zellen berichtet (London *et al.*, 1999). Interessant wäre die Klärung, ob das Vorhandensein von IL-2, oder auch anderer Zytokine bzw. Costimulation, einen Effekt auf das Überleben der *in vitro* generierten Gedächtnis T-Zellen hat. Das Langzeit-Überleben von Gedächtniszellen scheint von Zytokinen abhängig zu sein (Ashton-Rickardt and Opferman, 1999; Carter *et al.*, 1998). So wurde von einer Kontrolle der Homöostase CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen durch IL-15 berichtet (Judge *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2000; Lodolce *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). IL-15 könnte dabei gewisse Funktionen von IL-2 übernehmen (Alileche *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 1998). Auch IL-7 scheint positive Auswirkungen auf das Überleben von Gedächtniszellen zu haben (Kieper *et al.*,

2002; Schluns *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2002). Zwar sind Gedächtnis T-Zellen zur Aktivierung weniger auf Costimulation angewiesen als naive T-Zellen (Croft *et al.*, 1994; Kuiper *et al.*, 1994), jedoch wurde eine Rolle costimulatorischer Moleküle in der Aufrechterhaltung der Homöostase von Gedächtniszellen gezeigt (Bertram *et al.*, 2002; Semnani *et al.*, 1994; Sporici and Perrin, 2001).

Zur Differenzierung unterschiedlicher T-Zell-Aktivierungsphasen werden im humanen und murinen System verschiedene phänotypische Oberflächenmarker herangezogen (Ashton-Rickardta and Opferman, 1999). Die wohl bekanntesten Marker sind CD45RA und CD45RO. Dabei handelt es sich um alternative Spleiß-Varianten von CD45, wobei CD45RA<sup>+</sup> Zellen als naive und CD45RO<sup>+</sup> Zellen als Gedächtnis T-Zellen betrachtet werden (de Jong *et al.*, 1991). Jedoch wird die CD45RO-Form auch auf der Zelloberfläche von Effektorzellen exprimiert. Zudem ist die exklusive Expression von CD45RA auf naiven und CD45RO auf Gedächtniszellen nicht stabil, was durch eine Reversion dieser Verhältnisse in späten Gedächtniszellen gezeigt werden konnte (Abb. 38) (Arlettaz *et al.*, 1999; Beverley, 1991; Dunne *et al.*, 2002). Die IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL-2R $\alpha$ )/CD25 wird nur von aktivierten, proliferierenden T-Zellen exprimiert, hingegen nicht von ruhenden Zellen, wie naiven und Gedächtnis T-Zellen. Bei CD62L handelt es sich um ein Adhäsions-Molekül, welches wie CCR7 (Sallusto *et al.*, 1999) daran beteiligt ist, naiven T-Zellen das Einwandern in periphere lymphatische Organe zu ermöglichen (*homing*) und dadurch auch deren Lokalisation auf diese Organe beschränkt. CD62L wird nicht auf Effektor- und nur auf Subpopulationen von Gedächtniszellen (Zentrale Gedächtniszellen) exprimiert, welche dadurch in nicht-lymphoides Gewebe einwandern können. Auch die CD95-Expression kann als Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden, da nur naive Zellen CD95-negativ sind. Zahlreiche weitere Marker können zur Phänotypisierung herangezogen werden, so z.B. CD11a, CD18, CD29, CD49e, CD49d, LFA-2 und LFA-1 (Hamann *et al.*, 1997), jedoch handelt es sich bei diesen Proteinen um Marker, die sowohl auf Effektor- als auch auf Gedächtniszellen zu finden sind. Gedächtnis T-Zellen sind in der Lage, Effektorfunktionen schneller und effizienter zu übernehmen als naive T-Zellen. In vielen Fällen sind sie auch zur schnelleren Zytokin-Sekretion in der Lage (Rogers *et al.*, 2000; Sasama *et al.*, 1998). Dies könnte als zusätzlicher funktioneller Marker zur Identifikation von Gedächtnis T-Zellen dienen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß zwar bisher kein Oberflächenprotein identifiziert werden konnte, das exklusiv nur von Gedächtniszellen exprimiert wird, aber daß man über eine Kombination von Markern Gedächtniszellen identifizieren kann. In Hinblick auf allgemein akzeptierte Gedächtnis T-Zell-Oberflächenmarker entsprechen die *in vitro* langzeit-kultivierten Zellen dieser Studie Gedächtnis T-Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung von humanen Gedächtniszellen ist es erforderlich, in T-Zell-Präparationen aus Spenderblut direkt an Tag 0 die Gedächtnis T-Zell-Population zu isolieren und mit den Gedächtnis T-Zellen des Langzeit-Kultivierungs-Modells zu vergleichen. Auch wenn das biochemische Arbeiten mit Langzeit-kultivierten Zellen

einfacher ist, da der Prozentsatz an Gedächtnis-Zellen im Blut gering ist und somit nur wenige Zellen für proteinbiochemische Studien zur Verfügung stehen, ist eine Bestätigung der Befunde in unbehandelten T-Zellen notwendig. Zur Zeit ist eine Isolierung primärer Gedächtnis-Zellen direkt aus dem Blut jedoch nur bedingt möglich, da es keine verlässlichen Marker gibt. Doch wäre eine Kombination unterschiedlicher Oberflächen-Moleküle zur Isolation durch entweder MACS- oder FACS-Sortierung denkbar.

Letztlich bleibt die Frage, welche physiologische Funktion der beobachtete Apoptose-Phänotyp erfüllt. Denkbar ist, daß die CD95-Resistenz einen Schutz vor sogenanntem *bystander kill* (Ando *et al.*, 1997; Thilenius *et al.*, 1999) darstellt, d.h. Gedächtnis T-Zellen während der Deletionsphase einer Immunantwort nicht „versehentlich“ durch Apoptose eliminiert werden. Jedoch bleibt zu klären, warum die Zellen nicht die CD95-Expression reduzieren, sondern stattdessen die Signalübertragung des Todesrezeptors blockieren. Interessant ist sicherlich auch die Aufklärung des molekularen Mechanismus der CD95-Resistenz und die Frage, ob die Stimulation des CD95-Rezeptors überhaupt einen Effekt hat. Es wurde berichtet, daß primäre Gedächtnis T-Zellen durch CD95-Stimulation costimuliert werden, was zu einer verstärkten Aktivierung und Proliferation führt (Chun *et al.*, 2000; Desbarats *et al.*, 1999). Bisher ungeklärt ist, ob CD95-positive, CD95-resistente Gedächtniszellen nach TCR/CD3-Stimulation den CD95L exprimieren, und ob dieser zu einem physiologischen Effekt beiträgt. Bei der Beobachtung, daß Gedächtnis T-Zellen gegenüber TCR/CD3-induzierter Apoptose sensitiv sind, könnte es sich um eine Frage der Intensität des TCR-Signals handeln. Sicherlich ist die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes über anti-CD3-Antikörper stärker als während der Initiation einer sekundären Immunantwort durch Kontakt mit geringen Mengen an Antigen. Derzeit wird untersucht, ob das Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose nach TCR/CD3-Stimulation in Gedächtnis T-Zellen gegenüber naiven oder Effektor Zellen verschoben ist. Zu erwarten wäre eine weitaus stärkere Proliferation von Gedächtnis T-Zellen als Antwort auf geringe Mengen an Antigen bzw. anti-CD3-Antikörper. Aktuelle Untersuchungen konzentrieren sich somit auf die Regulation des Gleichgewichts von Proliferation *versus* Apoptose nach TCR/CD3-Stimulation und der involvierten regulatorischen Mechanismen.

## 7 AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine funktionelle Rolle für die direkte DNA-Bindung des GR an den CD95L-Promotor, und einer daraus resultierenden Regulation des AICD primärer T-Zellen *in vitro*. Die Glucocorticoid-Wirkung *in vivo* ist weitaus komplexer als in einem *in vitro*-Modell, da neben T-Lymphozyten zahlreiche weitere Zelltypen direkt oder indirekt beeinflusst werden. So haben Glucocorticoide Einfluß auf die Zytokin-Expression und die Aktivierung der HPA-Achse, was indirekt zu einer Modulation der Immunantwort führen kann. Zukünftige Experimente konzentrieren sich auf Untersuchungen der *in vivo*-Wirkung von Dexamethason auf die T-Zell-Deletion am Ende einer Immunantwort. Hierbei findet das *in vivo*-Modell der SEB-Injektion Verwendung. Ebenfalls untersucht wird in diesem Kontext der Mechanismus der *in vivo*-Sensitivierung aktivierter T-Zellen gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine AP-1 Bindestelle im 5' UTR des humanen CD95L-Gens identifiziert werden. Mutationen in dieser Bindestelle reduzieren die TCR/CD3-vermittelte Induktion des CD95L-Promotors, und folglich den AICD. Obwohl AP-1- und NF- $\kappa$ B-Bindestellen im CD95L-Promotor beschrieben sind, spielt eine mögliche Repression dieser Transkriptionsfaktoren durch direkte Protein-Protein-Interaktionen mit dem GR bei der Glucocorticoid-vermittelten Inhibition des AICD keine entscheidende Rolle. Die Resultate der vorliegenden Arbeit mit konditional GR-defizienten Mäusen und GR-Mutanten weisen vielmehr auf eine direkte DNA-Bindung des GR an den CD95L-Promotor und einer daraus resultierenden Inhibition des AICD hin. Derzeitige Untersuchungen zur Identifikation eines nGRE im CD95L-Promotor mit einem 500 bp-langen Promotor-Konstrukt weisen auf eine Lokalisation weiter 5' im Promotor hin. Künftige Deletions- und Mutations-Analysen mit einem 3 Kb-langen Promotor-Konstrukt werden zu detaillierteren Erkenntnissen über die genaue Lage und Funktion des nGRE führen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Gedächtnis T-Zellen trotz einer Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose sensitiv gegenüber TCR/CD3-vermittelten Zelltod sind. Bei diesem AICD handelt es sich um einen alternativen, CD95-unabhängigem Mechanismus. Weitere Experimente werden zeigen, ob hierbei andere Todesrezeptoren involviert sind. Unklar ist bisher, ob Glucocorticoide, welche zu einer Inhibition des AICD in Effektor-Zellen in der Lage sind, einen Einfluß auch auf TCR/CD3-vermittelte Apoptose von Gedächtnis T-Zellen haben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Dexamethason in primären murinen T-Zellen in Gegenwart CD95L-antagonistischer Antikörper zu einer stärkeren Inhibition des Zelltods führt als die Blockade der CD95L-CD95-Interaktion alleine, was auf einen Einfluß auf einen weiteren Todessignalweg hinweist. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob ein Glucocorticoid-inhibierbarer Signalweg im AICD von Gedächtnis T-Zellen involviert ist.

## 8 LITERATUR

- Adachi M., Suematsu S., Kondo T., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N. and Nagata S. (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* **11**, 294-300.
- Adachi M., Watanabe-Fukunaga R. and Nagata S. (1993) Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1756-60.
- Alderson M. R., Tough T. W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K. A., Goodwin R. G., Smith C. A., Ramsdell F. and Lynch D. H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**, 71-7.
- Alexander-Miller M. A., Leggatt G. R., Sarin A. and Berzofsky J. A. (1996) Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* **184**, 485-92.
- Alileche A., Goldman C. K. and Waldmann T. A. (2001) Differential effects of IL-2 and IL-15 on expression of IL-2 receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1302-8.
- Allison J., Georgiou H. M., Strasser A. and Vaux D. L. (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**, 3943-7.
- Almawi W. Y., Lipman M. L., Stevens A. C., Zanker B., Hadro E. T. and Strom T. B. (1991) Abrogation of glucocorticoid-mediated inhibition of T cell proliferation by the synergistic action of IL-1, IL-6, and IFN-gamma. *J Immunol* **146**, 3523-7.
- Alnemri E. S., Livingston D. L., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. and Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Amano Y., Lee S. W. and Allison A. C. (1993) Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol* **43**, 176-82.
- Anastassiou E. D., Paliogianni F., Balow J. P., Yamada H. and Boumpas D. T. (1992) Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels. *J Immunol* **148**, 2845-52.
- Ando K., Hiroishi K., Kaneko T., Moriyama T., Muto Y., Kayagaki N., Yagita H., Okumura K. and Imawari M. (1997) Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* **158**, 5283-91.
- Andrews B. S., Eisenberg R. A., Theofilopoulos A. N., Izui S., Wilson C. B., McConahey P. J., Murphy E. D., Roths J. B. and Dixon F. J. (1978) Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* **148**, 1198-215.
- Andrews N. C. and Faller D. V. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**, 2499.
- Angel P. and Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-57.

- Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. and Martinou J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**, 11615-23.
- Aoki K., Kurooka M., Chen J. J., Petryniak J., Nabel E. G. and Nabel G. J. (2001) Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. *Nat Immunol* **2**, 333-7.
- Arai H., Gordon D., Nabel E. G. and Nabel G. J. (1997) Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13862-7.
- Arima M., Plitt J., Stellato C., Bickel C., Motojima S., Makino S., Fukuda T. and Schleimer R. P. (1999) Expression of interleukin-16 by human epithelial cells. Inhibition by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 684-92.
- Aritomi M., Kunishima N., Inohara N., Ishibashi Y., Ohta S. and Morikawa K. (1997) Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27886-27892.
- Arletta L., Barbey C., Dumont-Girard F., Helg C., Chapuis B., Roux E. and Roosnek E. (1999) CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol* **29**, 3987-94.
- Ashkenazi A. and Dixit V. M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 255-60.
- Ashton-Rickardt P. G. and Opferman J. T. (1999) Memory T lymphocytes. *Cell Mol Life Sci* **56**, 69-77.
- Ashwell J. D., King L. B. and Vacchio M. S. (1996) Cross-talk between the T cell antigen receptor and the glucocorticoid receptor regulates thymocyte development. *Stem Cells* **14**, 490-500.
- Ashwell J. D., Lu F. W. and Vacchio M. S. (2000a) Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annu Rev Immunol* **18**, 309-45.
- Ashwell J. D., Vacchio M. S. and Galon J. (2000b) Do glucocorticoids participate in thymocyte development? *Immunol Today* **21**, 644-6.
- Auphan N., DiDonato J. A., Rosette C., Helmborg A. and Karin M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286-90.
- Ayrolidi E., Cannarile L., D'Adamio F. and Riccardi C. (1995) Superantigen-induced peripheral T-cell deletion: the effects of chemical modification of antigen-presenting cells, interleukin-4 and glucocorticoid hormones. *Immunology* **84**, 528-35.
- Ayrolidi E., Migliorati G., Bruscoli S., Marchetti C., Zollo O., Cannarile L., D'Adamio F. and Riccardi C. (2001) Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* **98**, 743-53.
- Baker S. J. and Reddy E. P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* **12**, 1-9.
- Barker C. F. and Billingham R. E. (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* **25**, 1-54.
- Basson M. A. and Zamoyska R. (2000) The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways. *Immunol Today* **21**, 509-14.
- Baumann S., Krueger A., Kirchhoff S. and Krammer P. H. (2002) Regulation of T cell Apoptosis during the Immune Response. *Current Molecular Medicine* **2**, 257-272.

- Baus E., Andris F., Dubois P. M., Urbain J. and Leo O. (1996) Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J Immunol* **156**, 4555-61.
- Beato M., Herrlich P. and Schutz G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-7.
- Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A. and Duke R. C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* **377**, 630-2.
- Bennett M. W., O'Connell J., O'Sullivan G. C., Brady C., Roche D., Collins J. K. and Shanahan F. (1998) The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* **160**, 5669-75.
- Bertram E. M., Lau P. and Watts T. H. (2002) Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* **168**, 3777-85.
- Beverley P. (1991) Immunological memory in T cells. *Curr Opin Immunol* **3**, 355-60.
- Bleckmann S. C., Blendy J. A., Rudolph D., Monaghan A. P., Schmid W. and Schutz G. (2002) Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Mol Cell Biol* **22**, 1919-25.
- Blotta M. H., DeKruyff R. H. and Umetsu D. T. (1997) Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* **158**, 5589-95.
- Boehme S. A. and Lenardo M. J. (1993) Ligand-induced apoptosis of mature T lymphocytes (proapoptotic regulation) occurs at distinct stages of the cell cycle. *Leukemia* **7 Suppl 2**, S45-9.
- Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltsev Y. V. and Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-15.
- Boldin M. P., Varfolomeev E. E., Panczer Z., Mett I. L., Camonis J. H. and Wallach D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**, 7795-8.
- Bonfoco E., Stuart P. M., Brunner T., Lin T., Griffith T. S., Gao Y., Nakajima H., Henkart P. A., Ferguson T. A. and Green D. R. (1998) Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* **9**, 711-20.
- Bossy-Wetzell E., Bakiri L. and Yaniv M. (1997) Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J* **16**, 1695-709.
- Boumpas D. T., Anastassiou E. D., Older S. A., Tsokos G. C., Nelson D. L. and Balow J. E. (1991) Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *J Clin Invest* **87**, 1739-47.
- Braun M. Y., Lowin B., French L., Acha-Orbea H. and Tschopp J. (1996) Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* **183**, 657-61.
- Brostjan C., Anrather J., Csizmadia V., Stroka D., Soares M., Bach F. H. and Winkler H. (1996) Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem* **271**, 19612-6.

- Brunner T., Mogil R. J., LaFace D., Yoo N. J., Mahboubi A., Echeverri F., Martin S. J., Force W. R., Lynch D. H., Ware C. F. and et al. (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**, 441-4.
- Buttgereit F., Brand M. D. and Muller M. (1993) Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and ConA-stimulated thymocytes of the rat. *Biosci Rep* **13**, 41-52.
- Buttgereit F. and Scheffold A. (2002) Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* **67**, 529-34.
- Cadepond F., Ulmann A. and Baulieu E. E. (1997) RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med* **48**, 129-56.
- Cairns C., Cairns W. and Okret S. (1993) Inhibition of gene expression by steroid hormone receptors via a negative glucocorticoid response element: evidence for the involvement of DNA-binding and agonistic effects of the antiglucocorticoid/antiprogestin RU486. *DNA Cell Biol* **12**, 695-702.
- Cantrell D., Bluestone J., Vivier E. and Tybulewicz V. (1998) Signalling through the TCR. *Res Immunol* **149**, 866-7.
- Carter L. L., Zhang X., Dubey C., Rogers P., Tsui L. and Swain S. L. (1998) Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother* **21**, 181-7.
- Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A. and Gruss P. (1998) Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development. *Cell* **94**, 727-737.
- Chan F. K. (2000) The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis* **59 Suppl 1**, i50-3.
- Chandran U. R., Warren B. S., Baumann C. T., Hager G. L. and DeFranco D. B. (1999) The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element. *J Biol Chem* **274**, 2372-8.
- Chang L. and Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chang M. M., Juarez M., Hyde D. M. and Wu R. (2001) Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L107-15.
- Chang T. J., Scher B. M., Waxman S. and Scher W. (1993) Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol Endocrinol* **7**, 528-42.
- Chen R., Burke T. F., Cumberland J. E., Brummet M., Beck L. A., Casolaro V. and Georas S. N. (2000) Glucocorticoids inhibit calcium- and calcineurin-dependent activation of the human IL-4 promoter. *J Immunol* **164**, 825-32.
- Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Tewari M. and Dixit V. M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-12.
- Chow W. A., Fang J. J. and Yee J. K. (2000) The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol* **164**, 3512-8.

- Chu J. L., Drappa J., Parnassa A. and Elkon K. B. (1993) The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med* **178**, 723-30.
- Chun D. H., Jung K. C., Park W. S., Lee I. S., Choi W. J., Kim C. J., Park S. H. and Bae Y. (2000) Costimulatory effect of Fas in mouse T lymphocytes. *Mol Cells* **10**, 642-6.
- Clausen B. E., Burkhardt C., Reith W., Renkawitz R. and Forster I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265-77.
- Cockerill G. W., Bert A. G., Ryan G. R., Gamble J. R., Vadas M. A. and Cockerill P. N. (1995) Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. *Blood* **86**, 2689-98.
- Cole T. J., Blendy J. A., Monaghan A. P., Schmid W., Aguzzi A. and Schutz G. (1995) Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* **60**, 93-6.
- Cole T. J., Myles K., Purton J. F., Brereton P. S., Solomon N. M., Godfrey D. I. and Funder J. W. (2001) GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant. *Mol Cell Endocrinol* **173**, 193-202.
- Colotta F., Polentarutti N., Sironi M. and Mantovani A. (1992) Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* **267**, 18278-83.
- Costas M. A., Muller Igaz L., Holsboer F. and Arzt E. (2000) Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1499**, 122-129.
- Crabtree G. R. (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611-4.
- Crinelli R., Antonelli A., Bianchi M., Gentilini L., Scaramucci S. and Magnani M. (2000) Selective inhibition of NF-kB activation and TNF-alpha production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol Dis* **26**, 211-22.
- Croft M., Bradley L. M. and Swain S. L. (1994) Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* **152**, 2675-85.
- Croxtall J. D., Choudhury Q. and Flower R. J. (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* **130**, 289-98.
- Cui H., Sherr D. H., el-Khatib M., Matsui K., Panka D. J., Marshak-Rothstein A. and Ju S. T. (1996) Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of FasL- but not Fas-mediated function. *Cell Immunol* **167**, 276-84.
- D'Adamio F., Zollo O., Moraca R., Ayroldi E., Bruscoli S., Bartoli A., Cannarile L., Migliorati G. and Riccardi C. (1997) A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* **7**, 803-12.
- Dalman F. C., Scherrer L. C., Taylor L. P., Akil H. and Pratt W. B. (1991) Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J Biol Chem* **266**, 3482-90.

- De Bosscher K., Schmitz M. L., Vanden Berghe W., Plaisance S., Fiers W. and Haegeman G. (1997) Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13504-9.
- De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Plaisance S., Boone E. and Haegeman G. (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3919-24.
- de Jong R., Loenen W. A., Brouwer M., van Emmerik L., de Vries E. F., Borst J. and van Lier R. A. (1991) Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J Immunol* **146**, 2488-94.
- Deroo B. J. and Archer T. K. (2001a) Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. *Mol Biol Cell* **12**, 3365-74.
- Deroo B. J. and Archer T. K. (2001b) Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* **20**, 3039-46.
- Desbarats J., Wade T., Wade W. F. and Newell M. K. (1999) Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8104-9.
- Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K. M. and Krammer P. H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-41.
- Diamond M. I., Miner J. N., Yoshinaga S. K. and Yamamoto K. R. (1990) Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**, 1266-72.
- Dong Z., Saikumar P., Weinberg J. M. and Venkatachalam M. A. (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* **151**, 1205-13.
- Drouin J., Nemer M., Charron J., Gagner J. P., Jeannotte L., Sun Y. L., Therrien M. and Tremblay Y. (1989a) Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome* **31**, 510-9.
- Drouin J., Sun Y. L., Chamberland M., Gauthier Y., De Lean A., Nemer M. and Schmidt T. J. (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *Embo J* **12**, 145-56.
- Drouin J., Sun Y. L. and Nemer M. (1989b) Glucocorticoid repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *J Steroid Biochem* **34**, 63-9.
- Drouin J., Trifiro M. A., Plante R. K., Nemer M., Eriksson P. and Wrangé O. (1989c) Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* **9**, 5305-14.
- Dunne P. J., Faint J. M., Gudgeon N. H., Fletcher J. M., Plunkett F. J., Soares M. V., Hislop A. D., Annels N. E., Rickinson A. B., Salmon M. and Akbar A. N. (2002) Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* **100**, 933-40.
- Dutton R. W., Bradley L. M. and Swain S. L. (1998) T cell memory. *Annual Reviews in Immunology* **16**, 201-223.
- Eichhorst S. T., Muller M., Li-Weber M., Schulze-Bergkamen H., Angel P. and Krammer P. H. (2000) A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of

- apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Mol Cell Biol* **20**, 7826-37.
- Eischen C. M., Williams B. L., Zhang W., Samelson L. E., Lynch D. H., Abraham R. T. and Leibson P. J. (1997) ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J Immunol* **159**, 1135-9.
- Elenkov I. J., Papanicolaou D. A., Wilder R. L. and Chrousos G. P. (1996) Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* **108**, 374-81.
- Elgin S. C. (1988) The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J Biol Chem* **263**, 19259-62.
- Elliott L. H., Levay A. K., Sparks B., Miller M. and Roszman T. L. (1996) Dexamethasone and prostaglandin E2 modulate T-cell receptor signaling through a cAMP-independent mechanism. *Cell Immunol* **169**, 117-24.
- Faris M., Latinis K. M., Kempiak S. J., Koretzky G. A. and Nel A. (1998) Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol Cell Biol* **18**, 5414-24.
- Fournel S., Genestier L., Robinet E., Flacher M. and Revillard J. P. (1996) Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* **157**, 4309-15.
- Freitas A. A. and Rocha B. (1999) Peripheral T cell survival. *Curr Opin Immunol* **11**, 152-6.
- Galle P. R., Hofmann W. J., Walczak H., Schaller H., Otto G., Stremmel W., Krammer P. H. and Runkel L. (1995) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* **182**, 1223-30.
- Gametchu B., Chen F., Sackey F., Powell C. and Watson C. S. (1999) Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* **64**, 107-19.
- Gametchu B., Watson C. S. and Wu S. (1993) Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *Faseb J* **7**, 1283-92.
- Garcia S., DiSanto J. and Stockinger B. (1999) Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**, 163-171.
- Gauthier J. M., Bourachot B., Doucas V., Yaniv M. and Moreau-Gachelin F. (1993) Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors. *Embo J* **12**, 5089-96.
- Ge Q., Hu H., Eisen H. N. and Chen J. (2002) Naive to memory T-cell differentiation during homeostasis-driven proliferation. *Microbes Infect* **4**, 555-8.
- Giordano C., Stassi G., De Maria R., Todaro M., Richiusa P., Papoff G., Ruberti G., Bagnasco M., Testi R. and Galluzzo A. (1997) Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**, 960-963.
- Godfrey D. I., Purton J. F., Boyd R. L. and Cole T. J. (2000) Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today* **21**, 606-11.
- Godfrey D. I., Purton J. F., Boyd R. L. and Cole T. J. (2001) Glucocorticoids and the thymus: the view from the middle of the road. *Trends Immunol* **22**, 243.

- Gonzalez-Garcia A., L R. B., Leonardo E., Merida I., Martinez A. C. and Carrera A. C. (1997) Lck is necessary and sufficient for Fas-ligand expression and apoptotic cell death in mature cycling T cells. *J Immunol* **158**, 4104-12.
- Gonzalo J. A., Baixeras E., Gonzalez-Garcia A., George-Chandy A., Van Rooijen N., Martinez C. and Kroemer G. (1994) Differential in vivo effects of a superantigen and an antibody targeted to the same T cell receptor. Activation-induced cell death vs passive macrophage-dependent deletion. *J Immunol* **152**, 1597-608.
- Gonzalo J. A., Gonzalez-Garcia A., Martinez C. and Kroemer G. (1993) Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo. *J Exp Med* **177**, 1239-46.
- Gonzalo J. A., Moreno de Alboran I., Ales-Martinez J. E., Martinez C. and Kroemer G. (1992) Expansion and clonal deletion of peripheral T cells induced by bacterial superantigen is independent of the interleukin-2 pathway. *Eur J Immunol* **22**, 1007-11.
- Goppelt-Struebe M., Hahn A., Stroebel M. and Reiser C. O. (1999) Independent regulation of cyclo-oxygenase 2 expression by p42/44 mitogen-activated protein kinases and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Biochem J* **339**, 329-34.
- Gottlicher M., Heck S. and Herrlich P. (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* **76**, 480-9.
- Grayson J. M., Murali-Krishna K., Altman J. D. and Ahmed R. (2001) Gene expression in antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells during viral infection. *J Immunol* **166**, 795-9.
- Grayson J. M., Zajac A. J., Altman J. D. and Ahmed R. (2000) Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **164**, 3950-4.
- Green D. R., Bissonnette R. P., Glynn J. M. and Shi Y. (1992) Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin Immunol* **4**, 379-88.
- Greenstein S., Ghias K., Krett N. L. and Rosen S. T. (2002) Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. *Clin Cancer Res* **8**, 1681-94.
- Griffith T. S., Brunner T., Fletcher S. M., Green D. R. and Ferguson T. A. (1995) Fas-ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**, 1189.
- Griffith T. S., Yu X., Herndon J. M., Green D. R. and Ferguson T. A. (1996) CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* **5**, 7-16.
- Groner B., Fritsche M., Stocklin E., Berchtold S., Merkle C., Moriggl R. and Pfitzner E. (2000) Regulation of the trans-activation potential of STAT5 through its DNA-binding activity and interactions with heterologous transcription factors. *Growth Horm IGF Res* **10**, S15-20.
- Gross A., McDonnell J. M. and Korsmeyer S. J. (1999a) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911.
- Gross A., Yin X.-M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Korsmeyer S. J. (1999b) Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1156-1163.
- Gross D. S. and Garrard W. T. (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* **57**, 159-97.

- Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H. and Rajewsky K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-6.
- Hafezi F., Steinbach J. P., Marti A., Munz K., Wang Z. Q., Wagner E. F., Aguzzi A. and Reme C. E. (1997) The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med* **3**, 346-9.
- Hahne M., Peitsch M. C., Irmeler M., Schroter M., Lowin B., Rousseau M., Bron C., Renno T., French L. and Tschopp J. (1995) Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol* **7**, 1381-6.
- Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L. E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J. and Tschopp J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**, 1363-6.
- Hakem R., Hakem A., Duncan G. S., Henderson J. T., Woo M., Soengas M. S., Elia A., de la Pompa J. L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S. A., Lowe S. W., Penninger J. M. and Mak T. W. (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**, 339-52.
- Ham J., Babij C., Whitfield J., Pfarr C. M., Lallemand D., Yaniv M. and Rubin L. L. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* **14**, 927-39.
- Hamann D., Baars P. A., Rep M. H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S. R., Klein M. R. and van Lier R. A. (1997) Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* **186**, 1407-18.
- Harwood F. G., Kasibhatla S., Petak I., Vernes R., Green D. R. and Houghton J. A. (2000) Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**, 10023-9.
- Hawkins C. J. and Vaux D. L. (1997) The role of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory proteins in the immune system. *Semin Immunol* **9**, 25-33.
- Haynesworth S. E., Baber M. A. and Caplan A. I. (1996) Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* **166**, 585-92.
- Heck S., Bender K., Kullmann M., Gottlicher M., Herrlich P. and Cato A. C. (1997) I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J* **16**, 4698-707.
- Hengartner M. O. (2001) Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* **104**, 325-8.
- Herrlich P. (2001) Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* **20**, 2465-75.
- Hildeman D. A., Mitchell T., Teague T. K., Henson P., Day B. J., Kappler J. and Marrack P. C. (1999) Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* **10**, 735-744.
- Hildeman D. A., Zhu Y., Mitchell T. C., Bouillet P., Strasser A., Kappler J. and Marrack P. (2002a) Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* **16**, 759-67.
- Hildeman D. A., Zhu Y., Mitchell T. C., Kappler J. and Marrack P. (2002b) Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* **14**, 354-9.

- Hoepfner M. A., Mordacq J. C. and Linzer D. I. (1995) Role of the composite glucocorticoid response element in proliferin gene expression. *Gene Expr* **5**, 133-41.
- Holtz-Heppelmann C. J., Algeciras A., Badley A. D. and Paya C. V. (1998) Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem* **273**, 4416-23.
- Hsu S. C., Gavrilin M. A., Lee H. H., Wu C. C., Han S. H. and Lai M. Z. (1999) NF-kappa B-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* **29**, 2948-56.
- Huang D. C. and Strasser A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839-42.
- Igney F. H., Behrens C. K. and Krammer P. H. (2000) Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol* **30**, 725-31.
- Igney F. H. and Krammer P. H. (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* **71**, 907-20.
- Imai E., Miner J. N., Mitchell J. A., Yamamoto K. R. and Granner D. K. (1993) Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* **268**, 5353-6.
- Inaba M., Kurasawa K., Mamura M., Kumano K., Saito Y. and Iwamoto I. (1999) Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol* **163**, 1315-20.
- Ivanov V. N., Lee R. K., Podack E. R. and Malek T. R. (1997) Regulation of Fas-dependent activation-induced T cell apoptosis by cAMP signaling: a potential role for transcription factor NF-kappa B. *Oncogene* **14**, 2455-64.
- Iwata M., Hanaoka S. and Sato K. (1991) Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol* **21**, 643-8.
- Izquierdo Pastor M., Reif K. and Cantrell D. (1995) The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol Today* **16**, 159-64.
- Izui S., Kelley V. E., Masuda K., Yoshida H., Roths J. B. and Murphy E. D. (1984) Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *J Immunol* **133**, 227-33.
- Jaffuel D., Mathieu M., Godard P., Michel F. B. and Demoly P. (1999) [Mechanism of action of glucocorticoids in asthma]. *Rev Mal Respir* **16**, 431-42.
- Jamieson C. A. and Yamamoto K. R. (2000) Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7319-24.
- Janssen O., Sanzenbacher R. and Kabelitz D. (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* **301**, 85-99.
- Jochum W., Passegue E. and Wagner E. F. (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 2401-12.
- Jonat C., Rahmsdorf H. J., Park K. K., Cato A. C., Gebel S., Ponta H. and Herrlich P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-204.
- Jondal M., Pazirandeh A. and Okret S. (2001) A role for glucocorticoids in the thymus? *Trends Immunol* **22**, 185-6.

- Ju S. T., Panka D. J., Cui H., Ettinger R., el-Khatib M., Sherr D. H., Stanger B. Z. and Marshak-Rothstein A. (1995) Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature* **373**, 444-8.
- Judge A. D., Zhang X., Fujii H., Surh C. D. and Sprent J. (2002) Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* **196**, 935-46.
- June C. H., Fletcher M. C., Ledbetter J. A. and Samelson L. E. (1990) Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* **144**, 1591-9.
- Kabelitz D. and Janssen O. (1997) Antigen-induced death of T-Lymphocytes. *Front Biosci* **2**, d61-77.
- Kaech S. M., Wherry E. J. and Ahmed R. (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**, 251-62.
- Kamei Y., Xu L., Heinzl T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. C., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K. and Rosenfeld M. G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-14.
- Karin M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**, 16483-6.
- Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F., Mahboubi A. and Green D. R. (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* **1**, 543-51.
- Kasibhatla S., Genestier L. and Green D. R. (1999) Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* **274**, 987-92.
- Kawabe Y. and Ochi A. (1991) Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* **349**, 245-8.
- Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., Butz E. A., Viney J. L., Embers M., Matsuki N., Charrier K., Sedger L., Willis C. R., Brasel K., Morrissey P. J., Stocking K., Schuh J. C., Joyce S. and Peschon J. J. (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-80.
- Keppler O. T., Peter M. E., Hinderlich S., Moldenhauer G., Stehling P., Schmitz I., Schwartz-Albiez R., Reutter W. and Pawlita M. (1999) Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology*. **9**, 557-569.
- Kieper W. C., Tan J. T., Bondi-Boyd B., Gapin L., Sprent J., Ceredig R. and Surh C. D. (2002) Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* **195**, 1533-9.
- King L. B., Vacchio M. S., Dixon K., Hunziker R., Margulies D. H. and Ashwell J. D. (1995) A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity*. **3**, 647-656.
- Kirchhoff S., Muller W. W., Krueger A., Schmitz I. and Krammer P. H. (2000) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* **165**, 6293-300.

- Kirchhoff S., Sebens T., Baumann S., Krueger A., Zawatzky R., Li-Weber M., Meinel E., Neipel F., Fleckenstein B. and Krammer P. H. (2002) Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol* **168**, 1226-34.
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H. and Peter M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**, 5579-88.
- Klas C., Debatin K. M., Jonker R. R. and Krammer P. H. (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* **5**, 625-30.
- Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. and Newmeyer D. D. (1997) The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Kolbus A., Herr I., Schreiber M., Debatin K. M., Wagner E. F. and Angel P. (2000) c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol* **20**, 575-82.
- Kraemer S. A., Meade E. A. and DeWitt D. L. (1992) Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* **293**, 391-400.
- Krammer P. H. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* **71**, 163-210.
- Krammer P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-95.
- Kroemer G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**, 614-20.
- Kroin J. S., Schaefer R. B. and Penn R. D. (2000) Chronic intrathecal administration of dexamethasone sodium phosphate: pharmacokinetics and neurotoxicity in an animal model. *Neurosurgery* **46**, 178-82; discussion 182-3.
- Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P. H. and Kirchhoff S. (2001) Cellular flce-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the cd95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-40.
- Kuan C. Y., Yang D. D., Samanta Roy D. R., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**, 667-76.
- Kuida K., Haydar T. F., Kuan C.-Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M. S.-S., Rakic P. and Flavell R. A. (1998) Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. *Cell* **94**, 325-337.
- Kuiper H., Brouwer M., de Boer M., Parren P. and van Lier R. A. (1994) Differences in responsiveness to CD3 stimulation between naive and memory CD4+ T cells cannot be overcome by CD28 costimulation. *Eur J Immunol* **24**, 1956-60.
- Kunicka J. E., Talle M. A., Denhardt G. H., Brown M., Prince L. A. and Goldstein G. (1993) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol* **149**, 39-49.
- Kutuh E., Stromstedt P. E. and Poellinger L. (1992) Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF- 1. *Mol Cell Biol* **12**, 4960-9.

- Lanzavecchia A. and Sallusto F. (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**, 92-7.
- Lasa M., Brook M., Saklatvala J. and Clark A. R. (2001) Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen- activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol* **21**, 771-80.
- Latinis K. M., Carr L. L., Peterson E. J., Norian L. A., Eliason S. L. and Koretzky G. A. (1997) Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *The Journal of Immunology* **158**, 4602-4611.
- Lau H. T., Yu M., Fontana A. and Stoeckert C. J., Jr. (1996) Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science* **273**, 109-12.
- Lee M. R., Liou M. L., Yang Y. F. and Lai M. Z. (1993) cAMP analogs prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas. *The Journal of Immunology* **151**, 5208-5217.
- Lenardo M., Chan K. M., Hornung F., McFarland H., Siegel R., Wang J. and Zheng L. (1999) Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* **17**, 221-53.
- Lenardo M. J. (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**, 858-61.
- Liden J., Delaunay F., Rafter I., Gustafsson J. and Okret S. (1997) A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J Biol Chem* **272**, 21467-72.
- Lidwell K. and Griffiths R. (2000) Possible role for the FosB/JunD AP-1 transcription factor complex in glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* **62**, 427-39.
- Lissy N. A., Van Dyk L. F., Becker-Hapak M., Vocero-Akbani A., Mendler J. H. and Dowdy S. F. (1998) TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. *Immunity* **8**, 57-65.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Liu Y. J., Kanzler H., Soumelis V. and Gilliet M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* **2**, 585-9.
- Li-Weber M., Giaisi M., Baumann S., Treiber M. K. and Krammer P. H. (2002a) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses CD95-mediated activation-induced-cell-death in T-cells. *Cell Death Differ* **9**, 1256-65.
- Li-Weber M. and Krammer P. H. (2002) The death of a T-cell: expression of the CD95 ligand. *Cell Death Differ* **9**, 101-3.
- Li-Weber M., Laur O., Dern K. and Krammer P. H. (2000) T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB. *Eur J Immunol* **30**, 661-70.
- Li-Weber M., Laur O. and Krammer P. H. (1999) Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO- 1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur J Immunol* **29**, 3017-27.
- Li-Weber M., Salgame P., Hu C., Davydov I. V., Laur O., Klevenz S. and Krammer P. H. (1998) Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter. *J Immunol* **161**, 1380-9.

- Li-Weber M., Weigand M. A., Giaisi M., Suss D., Treiber M. K., Baumann S., Ritsou E., Breitskreutz R. and Krammer P. H. (2002b) Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. *J Clin Invest* **110**, 681-90.
- Lodolce J. P., Boone D. L., Chai S., Swain R. E., Dassopoulos T., Trettin S. and Ma A. (1998) IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-76.
- London C. A., Perez V. L. and Abbas A. K. (1999) Functional characteristics and survival requirements of memory CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Immunol* **162**, 766-73.
- Lu F. W., Yasutomo K., Goodman G. B., McHeyzer-Williams L. J., McHeyzer-Williams M. G., Germain R. N. and Ashwell J. D. (2000) Thymocyte resistance to glucocorticoids leads to antigen-specific unresponsiveness due to "holes" in the T cell repertoire. *Immunity* **12**, 183-92.
- Lu W., Salerno-Goncalves R., Yuan J., Sylvie D., Han D. S. and Andrieu J. M. (1995) Glucocorticoids rescue CD4+ T lymphocytes from activation-induced apoptosis triggered by HIV-1: implications for pathogenesis and therapy. *Aids* **9**, 35-42.
- Luisi B. F., Xu W. X., Otwinowski Z., Freedman L. P., Yamamoto K. R. and Sigler P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497-505.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.
- Lynch D. H., Ramsdell F. and Alderson M. R. (1995) Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* **16**, 569-74.
- Lynch D. H., Watson M. L., Alderson M. R., Baum P. R., Miller R. E., Tough T., Gibson M., Davis-Smith T., Smith C. A., Hunter K. and et al. (1994) The mouse Fas-ligand gene is mutated in *gld* mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity* **1**, 131-6.
- Macian F., Garcia-Rodriguez C. and Rao A. (2000) Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *Embo J* **19**, 4783-95.
- Mahajan D. K. and London S. N. (1997) Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril* **68**, 967-76.
- Malkoski S. P. and Dorin R. I. (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* **13**, 1629-44.
- Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann S. C., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W. and Schutz G. (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* **31**, 47-54.
- Mariani S. M., Matiba B., Armandola E. A. and Krammer P. H. (1994) The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* **24**, 3119-23.
- Marino M. W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S. and Old L. J. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8093-8.
- Maroder M., Martinotti S., Vacca A., Screpanti I., Petrangeli E., Frati L. and Gulino A. (1990) Post-transcriptional control of c-myc proto-oncogene expression by glucocorticoid hormones in human T lymphoblastic leukemic cells. *Nucleic Acids Res* **18**, 1153-7.

- Matsui K., Fine A., Zhu B., Marshak-Rothstein A. and Ju S. T. (1998) Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol* **161**, 3469-73.
- Matsui K., Xiao S., Fine A. and Ju S. T. (2000) Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine fasl promoter. *J Immunol* **164**, 3002-8.
- Matsuzawa A., Moriyama T., Kaneko T., Tanaka M., Kimura M., Ikeda H. and Katagiri T. (1990) A new allele of the lpr locus, lprcg, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. *J Exp Med* **171**, 519-31.
- Medema J. P., Toes R. E., Scaffidi C., Zheng T. S., Flavell R. A., Melief C. J., Peter M. E., Offringa R. and Krammer P. H. (1997) Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* **27**, 3492-8.
- Mehindate K., al-Daccak R., Rink L., Mecheri S., Hebert J. and Mourad W. (1994) Modulation of Mycoplasma arthritidis-derived superantigen-induced cytokine gene expression by dexamethasone and interleukin-4. *Infect Immun* **62**, 4716-21.
- Meinl E., Fickenscher H., Thome M., Tschopp J. and Fleckenstein B. (1998) Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today* **19**, 474-9.
- Mendelsohn J., Multer M. M. and Boone R. F. (1973) Enhanced effects of prostaglandin E1 and dibutyryl cyclic AMP upon human lymphocytes in the presence of cortisol. *J Clin Invest* **52**, 2129-37.
- Mittelstadt P. R. and Ashwell J. D. (1998) Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol Cell Biol* **18**, 3744-51.
- Mittelstadt P. R. and Ashwell J. D. (1999) Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J Biol Chem* **274**, 3222-7.
- Mittelstadt P. R. and Ashwell J. D. (2001) Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*.
- Morale M. C., Batticane N., Gallo F., Barden N. and Marchetti B. (1995) Disruption of hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in transgenic mice expressing type II glucocorticoid receptor antisense ribonucleic acid permanently impairs T cell function: effects on T cell trafficking and T cell responsiveness during postnatal development. *Endocrinology* **136**, 3949-60.
- Mori A., Kaminuma O., Suko M., Inoue S., Ohmura T., Hoshino A., Asakura Y., Miyazawa K., Yokota T., Okumura Y., Ito K. and Okudaira H. (1997) Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood* **89**, 2891-900.
- Morrison N. and Eisman J. (1993) Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J Bone Miner Res* **8**, 969-75.
- Muller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S. L., Galle P. R., Stremmel W., Oren M. and Krammer P. H. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**, 2033-45.
- Muzio M., Chinnaiyan A. M., Kischkel F. C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J. D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P. H., Peter M. E. and Dixit V. M. (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**, 817-27.

- Mysler E., Bini P., Drappa J., Ramos P., Friedman S. M., Krammer P. H. and Elkon K. B. (1994) The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **93**, 1029-34.
- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65.
- Nakai Y., Usui T., Tsukada T., Takahashi H., Fukata J., Fukushima M., Senoo K. and Imura H. (1991) Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 301-6.
- Nakajima H., Shores E. W., Noguchi M. and Leonard W. J. (1997) The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med* **185**, 189-95.
- Natoli G., Costanzo A., Ianni A., Templeton D. J., Woodgett J. R., Balsano C. and Levrero M. (1997) Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* **275**, 200-3.
- Nelson B. H. and Willerford D. M. (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Advances in Immunology* **70**, 1-81.
- Newton R., Seybold J., Kuitert L. M., Bergmann M. and Barnes P. J. (1998) Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem* **273**, 32312-21.
- Nicholson D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* **6**, 1028-1042.
- Niculescu F., Soane L., Badea T., Shin M. and Rus H. (1999) Tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase 1 and STAT3 by sublytic C5b-9 complement complex in aortic endothelial cells. *Immunopharmacology* **42**, 187-93.
- Niehans G. A., Brunner T., Frizelle S. P., Liston J. C., Salerno C. T., Knapp D. J., Green D. R. and Kratzke R. A. (1997) Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* **57**, 1007-12.
- Nishina H., Fischer K. D., Radvanyi L., Shahinian A., Hakem R., Rubie E. A., Bernstein A., Mak T. W., Woodgett J. R. and Penninger J. M. (1997) Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**, 350-353.
- Nissen R. M. and Yamamoto K. R. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **14**, 2314-29.
- Nocentini G., Giunchi L., Ronchetti S., Krausz L. T., Bartoli A., Moraca R., Migliorati G. and Riccardi C. (1997) A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**, 6216-6221.
- Noel P. J., Boise L. H., Green J. M. and Thompson C. B. (1996) CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* **157**, 636-42.
- Norian L. A., Latinis K. M. and Koretzky G. A. (1998) A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes. *J Immunol* **161**, 1078-82.
- O'Connell J., O'Sullivan G. C., Collins J. K. and Shanahan F. (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* **184**, 1075-82.

- Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T. and Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-9.
- Ohta T., Kinoshita T., Naito M., Nozaki T., Masutani M., Tsuruo T. and Miyajima A. (1997) Requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **272**, 23111-6.
- Opferman J. T., Ober B. T. and Ashton-Rickardt P. G. (1999) Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* **283**, 1745-1748.
- Orban P. C., Chui D. and Marth J. D. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6861-5.
- Paliogianni F. and Boumpas D. T. (1995) Glucocorticoids regulate calcineurin-dependent transactivating pathways for interleukin-2 gene transcription in human T lymphocytes. *Transplantation* **59**, 1333-9.
- Passegue E. and Wagner E. F. (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* **19**, 2969-79.
- Pazirandeh A., Xue Y., Okret S. and Jondal M. (2000) Glucocorticoid resistance in thymocytes from mice expressing a T cell receptor transgene. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 189-96.
- Pearce D., Matsui W., Miner J. N. and Yamamoto K. R. (1998) Glucocorticoid receptor transcriptional activity determined by spacing of receptor and nonreceptor DNA sites. *J Biol Chem* **273**, 30081-5.
- Pei L. (1996) Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *J Biol Chem* **271**, 20879-84.
- Pepin M. C., Pothier F. and Barden N. (1992) Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature* **355**, 725-8.
- Peter M. E., Kischkel F. C., Scheuерpflug C. G., Medema J. P., Debatin K. M. and Krammer P. H. (1997) Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur J Immunol* **27**, 1207-12.
- Peter M. E. and Krammer P. H. (1999) Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated Apoptosis.
- Petrie H. T., Hugo P., Scollay R. and Shortman K. (1990) Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J Exp Med* **172**, 1583-8.
- Petschner F., Zimmerman C., Strasser A., Grillot D., Nunez G. and Pircher H. (1998) Constitutive expression of Bcl-xL or Bcl-2 prevents peptide antigen- induced T cell deletion but does not influence T cell homeostasis after a viral infection. *Eur J Immunol* **28**, 560-9.
- Pilling D., Akbar A. N., Girdlestone J., Orteu C. H., Borthwick N. J., Amft N., Scheel-Toellner D., Buckley C. D. and Salmon M. (1999) Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur J Immunol* **29**, 1041-50.
- Preston G. A., Lyon T. T., Yin Y., Lang J. E., Solomon G., Annab L., Srinivasan D. G., Alcorta D. A. and Barrett J. C. (1996) Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol* **16**, 211-8.

- Purton J. F., Boyd R. L., Cole T. J. and Godfrey D. I. (2000) Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* **13**, 179-86.
- Purton J. F., Zhan Y., Liddicoat D. R., Hardy C. L., Lew A. M., Cole T. J. and Godfrey D. I. (2002) Glucocorticoid receptor deficient thymic and peripheral T cells develop normally in adult mice. *Eur J Immunol* **32**, 3546-55.
- Radvanyi L. G., Mills G. B. and Miller R. G. (1993) Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *The Journal of Immunology* **150**, 5704-5715.
- Radvanyi L. G., Shi Y., Mills G. B. and Miller R. G. (1996) Cell cycle progression out of G1 sensitizes primary-cultured nontransformed T cells to TCR-mediated apoptosis. *Cell Immunol.* **170**, 260-273.
- Ramsdell F., Seaman M. S., Miller R. E., Tough T. W., Alderson M. R. and Lynch D. H. (1994) gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* **24**, 928-33.
- Rao A., Luo C. and Hogan P. G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-47.
- Ray A. and Prefontaine K. E. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 752-6.
- Razvi E. S., Jiang Z., Woda B. A. and Welsh R. M. (1995) Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, lpr, and Bcl-2-transgenic mice. *Am J Pathol* **147**, 79-91.
- Reichardt H. M., Kaestner K. H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P. and Schutz G. (1998a) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-41.
- Reichardt H. M., Kaestner K. H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P. and Schutz G. (1998b) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-41.
- Reichardt H. M., Tuckermann J. P., Gottlicher M., Vujic M., Weih F., Angel P., Herrlich P. and Schutz G. (2001) Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *Embo J* **20**, 7168-73.
- Reichardt H. M., Umland T., Bauer A., Kretz O. and Schutz G. (2000) Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol* **20**, 9009-17.
- Rivera I., Harhaj E. W. and Sun S. C. (1998) Involvement of NF-AT in type I human T-cell leukemia virus Tax-mediated Fas ligand promoter transactivation. *J Biol Chem* **273**, 22382-8.
- Rodriguez J. and Lazebnik Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes.Dev.* **13**, 3179-3184.
- Rogers P. R., Dubey C. and Swain S. L. (2000) Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* **164**, 2338-46.
- Rooney J. W., Hoey T. and Glimcher L. H. (1995) Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* **2**, 473-83.

- Roths J. B., Murphy E. D. and Eicher E. M. (1984) A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* **159**, 1-20.
- Russell J. H., Rush B., Weaver C. and Wang R. (1993) Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4409-13.
- Russell J. H. and Wang R. (1993) Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur J Immunol* **23**, 2379-82.
- Russell J. H., White C. L., Loh D. Y. and Meleedy-Rey P. (1991) Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2151-5.
- Sabapathy K., Hu Y., Kallunki T., Schreiber M., David J. P., Jochum W., Wagner E. F. and Karin M. (1999) JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* **9**, 116-25.
- Sacedon R., Vicente A., Varas A., Jimenez E., Munoz J. J. and Zapata A. G. (1999a) Early maturation of T-cell progenitors in the absence of glucocorticoids. *Blood* **94**, 2819-26.
- Sacedon R., Vicente A., Varas A., Morale M. C., Barden N., Marchetti B. and Zapata A. G. (1999b) Partial blockade of T-cell differentiation during ontogeny and marked alterations of the thymic microenvironment in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neuroimmunol* **98**, 157-67.
- Sakai D. D., Helms S., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J. A., Rottman F. M. and Yamamoto K. R. (1988) Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* **2**, 1144-54.
- Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M. and Lanzavecchia A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12.
- Salvesen G. S. (1999) Caspase 8: igniting the death machine. *Structure Fold Des* **7**, R225-9.
- Sarin A., Conan-Cibotti M. and Henkart P. A. (1995) Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* **155**, 3716-8.
- Sasama J., Vyas B., Vukmanovic-Stejic M. and Kemeny D. M. (1998) Effect of IL-4, IFN-gamma and IL-12 on cytokine production from human CD45RA and CD45RO CD4 T cell precursors. *Int Arch Allergy Immunol* **117**, 255-62.
- Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows R. P., Harlan J. E., Eberstadt M., Yoon H. S., Shuker S. B., Chang B. S., Minn A. J., Thompson C. B. and Fesik S. W. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-986.
- Sauer B. and Henderson N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-70.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K. J., Debatin K. M., Krammer P. H. and Peter M. E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87.
- Scaffidi C., Kirchhoff S., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999a) Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **11**, 277-85.
- Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999b) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 1541-8.

- Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., Korsmeyer S. J., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999c) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* **274**, 22532-8.
- Scheinman R. I., Cogswell P. C., Lofquist A. K. and Baldwin A. S., Jr. (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283-6.
- Schendel S. L., Montal M. and Reed J. C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* **5**, 372-80.
- Schluns K. S., Kieper W. C., Jameson S. C. and Lefrancois L. (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426-32.
- Schmid D., Burmester G. R., Tripmacher R., Kuhnke A. and Buttgerit F. (2000) Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states. *Biosci Rep* **20**, 289-302.
- Schmitz I., Kirchhoff S. and Krammer P. H. (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1123-36.
- Schmitz I., Walczak H., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999) Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ* **6**, 821-2.
- Schneider P., Holler N., Bodmer J. L., Hahne M., Frei K., Fontana A. and Tschopp J. (1998) Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of Experimental Medicine* **187**, 1205-1213.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S. and Peter M. E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* **254**, 439-459.
- Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M. F. and Ohashi P. S. (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annual Reviews in Immunology* **17**, 829-874.
- Seino K., Kayagaki N., Okumura K. and Yagita H. (1997) Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* **3**, 165-70.
- Semnani R. T., Nutman T. B., Hochman P., Shaw S. and van Seventer G. A. (1994) Costimulation by purified intercellular adhesion molecule 1 and lymphocyte function-associated antigen 3 induces distinct proliferation, cytokine and cell surface antigen profiles in human "naive" and "memory" CD4+ T cells. *J Exp Med* **180**, 2125-35.
- Shaulian E. and Karin M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-400.
- Shaulian E. and Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6.
- Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E. F. and Karin M. (2000) The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* **103**, 897-907.
- Sheppard K. A., Phelps K. M., Williams A. J., Thanos D., Glass C. K., Rosenfeld M. G., Gerritsen M. E. and Collins T. (1998) Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor- kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* **273**, 29291-4.
- Shiraki K., Tsuji N., Shioda T., Isselbacher K. J. and Takahashi H. (1997) Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6420-5.

- Shortman K. and Wu L. (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* **14**, 29-47.
- Siegel J. N., Egerton M., Phillips A. F. and Samelson L. E. (1991) Multiple signal transduction pathways activated through the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol* **3**, 325-34.
- Siegel R. M., Frederiksen J. K., Zacharias D. A., Chan F. K., Johnson M., Lynch D., Tsien R. Y. and Lenardo M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-7.
- Singer G. G. and Abbas A. K. (1994) The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **1**, 365-371.
- Speiser D. E., Sebzda E., Ohteki T., Bachmann M. F., Pfeffer K., Mak T. W. and Ohashi P. S. (1996) Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* **26**, 3055-60.
- Sporici R. A. and Perrin P. J. (2001) Costimulation of memory T-cells by ICOS: a potential therapeutic target for autoimmunity? *Clin Immunol* **100**, 263-9.
- Sprent J. and Miller J. F. (1976) Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. III. Differentiation into long-lived recirculating memory cells. *Cell Immunol* **21**, 314-26.
- Sprent J. and Surh C. D. (2002) T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**, 551-79.
- Sprent J. and Tough D. F. (2001) T cell death and memory. *Science* **293**, 245-8.
- Stein B., Baldwin A. S., Jr., Ballard D. W., Greene W. C., Angel P. and Herrlich P. (1993) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *Embo J* **12**, 3879-91.
- Stocklin E., Wissler M., Gouilleux F. and Groner B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**, 726-8.
- Strand S. and Galle P. R. (1998) Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol Med Today* **4**, 63-8.
- Strand S., Hofmann W. J., Hug H., Muller M., Otto G., Strand D., Mariani S. M., Stremmel W., Krammer P. H. and Galle P. R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* **2**, 1361-6.
- Strasser A. (1995) Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr Opin Immunol* **7**, 228-34.
- Strasser A., Harris A. W., Huang D. C., Krammer P. H. and Cory S. (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J* **14**, 6136-47.
- Stratakis C. A., Karl M., Schulte H. M. and Chrousos G. P. (1994) Glucocorticosteroid resistance in humans. Elucidation of the molecular mechanisms and implications for pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* **746**, 362-74; discussion 374-6.
- Stuart P. M., Griffith T. S., Usui N., Pepose J., Yu X. and Ferguson T. A. (1997) CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest* **99**, 396-402.
- Su B., Jacinto E., Hibi M., Kallunki T., Karin M. and Ben-Neriah Y. (1994) JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**, 727-36.
- Subramaniam N., Cairns W. and Okret S. (1997) Studies on the mechanism of glucocorticoid-mediated repression from a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *DNA Cell Biol* **16**, 153-63.

- Subramaniam N., Cairns W. and Okret S. (1998) Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1. *J Biol Chem* **273**, 23567-74.
- Suda T., Hashimoto H., Tanaka M., Ochi T. and Nagata S. (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* **186**, 2045-50.
- Suda T., Tanaka M., Miwa K. and Nagata S. (1996) Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J Immunol* **157**, 3918-24.
- Susin S. A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M. and Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* **184**, 1331-41.
- Sytwu H. K., Liblau R. S. and McDevitt H. O. (1996) The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **5**, 17-30.
- Takahashi T., Tanaka M., Brannan C. I., Jenkins N. A., Copeland N. G., Suda T. and Nagata S. (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-76.
- Tan J. T., Ernst B., Kieper W. C., LeRoy E., Sprent J. and Surh C. D. (2002) Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8<sup>+</sup> cells but are not required for memory phenotype CD4<sup>+</sup> cells. *J Exp Med* **195**, 1523-32.
- Tanke H. J., van der Linden P. W. and Langerak J. (1982) Alternative fluorochromes to ethidium bromide for automated read out of cytotoxicity tests. *J Immunol Methods* **52**, 91-6.
- Thilenius A. R., Sabelko-Downes K. A. and Russell J. H. (1999) The role of the antigen-presenting cell in Fas-mediated direct and bystander killing: potential in vivo function of Fas in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **162**, 643-50.
- Tobler A., Meier R., Seitz M., Dewald B., Baggiolini M. and Fey M. F. (1992) Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood* **79**, 45-51.
- Tolosa E., King L. B. and Ashwell J. D. (1998) Thymocyte glucocorticoid resistance alters positive selection and inhibits autoimmunity and lymphoproliferative disease in MRL-lpr/lpr mice. *Immunity* **8**, 67-76.
- Tosato G., Miller J., Marti G. and Pike S. E. (1990) Accessory function of interleukin-1 and interleukin-6: preferential costimulation of T4 positive lymphocytes. *Blood* **75**, 922-30.
- Trauth B. C., Klas C., Peters A. M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K. M. and Krammer P. H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**, 301-5.
- Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H. M. and Schutz G. (1998) Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 532-8.
- Tschopp J., Irmeler M. and Thome M. (1998) Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**, 552-8.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E. and Croce C. M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-1443.

- Tucek-Szabo C. L., Andjelic S., Lacy E., Elkon K. B. and Nikolic-Zugic J. (1996) Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis. Activation-induced death can occur without Fas receptor. *J Immunol* **156**, 192-200.
- Ulmann A., Teutsch G. and Philibert D. (1990) Ru 486. *Sci Am* **262**, 42-8.
- Vacchio M. S. and Ashwell J. D. (1997) Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *The Journal of Experimental Medicine* **185**, 2033-2038.
- Vacchio M. S., Lee J. Y. and Ashwell J. D. (1999) Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. *J Immunol* **163**, 1327-33.
- Vacchio M. S., Papadopoulos V. and Ashwell J. D. (1994) Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J Exp Med* **179**, 1835-46.
- Van Laethem F., Baus E., Smyth L. A., Andris F., Bex F., Urbain J., Kioussis D. and Leo O. (2001) Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* **193**, 803-14.
- van Stipdonk M. J., Lemmens E. E. and Schoenberger S. P. (2001) Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* **2**, 423-9.
- Vander Heiden M. G. and Thompson C. B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* **1**, E209-E216.
- Vaux D. L. and Korsmeyer S. J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-54.
- Vieira P. L., Kalinski P., Wierenga E. A., Kapsenberg M. L. and de Jong E. C. (1998) Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol* **161**, 5245-51.
- Villalba M., Kasibhatla S., Genestier L., Mahboubi A., Green D. R. and Altman A. (1999) Protein kinase ctheta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol* **163**, 5813-9.
- Villunger A., Ghaffari-Tabrizi N., Tinhofer I., Krumbock N., Bauer B., Schneider T., Kasibhatla S., Greil R., Baier-Bitterlich G., Uberall F., Green D. R. and Baier G. (1999) Synergistic action of protein kinase C theta and calcineurin is sufficient for Fas ligand expression and induction of a crmA-sensitive apoptosis pathway in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* **29**, 3549-61.
- von Boehmer H., Aifantis I., Feinberg J., Lechner O., Saint-Ruf C., Walter U., Buer J. and Azogui O. (1999) Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* **11**, 135-42.
- von Boehmer H. and Kisielow P. (1993) Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell* **73**, 207-8.
- Walker P. R., Saas P. and Dietrich P. Y. (1998) Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol* **10**, 564-72.
- Wang R., Zhang L., Zhang X., Moreno J., Luo X., Tondravi M. and Shi Y. (2001) Differential regulation of the expression of CD95 ligand, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF-alpha during T cell activation. *J Immunol* **166**, 1983-90.
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A. and Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-7.

- Webster J. C., Huber R. M., Hanson R. L., Collier P. M., Haws T. F., Mills J. K., Burn T. C. and Allegretto E. A. (2002) Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* **143**, 3866-74.
- Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K. A., MacGregor G. R., Thompson C. B. and Korsmeyer S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30.
- Weitzman J. B., Fiette L., Matsuo K. and Yaniv M. (2000) JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* **6**, 1109-19.
- White J., Herman A., Pullen A. M., Kubo R., Kappler J. W. and Marrack P. (1989) The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56**, 27-35.
- Whitfield J., Neame S. J., Paquet L., Bernard O. and Ham J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* **29**, 629-43.
- Wolffe A. P. and Hayes J. J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* **27**, 711-20.
- Wu J., Zhou T., He J. and Mountz J. D. (1993) Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J Exp Med* **178**, 461-8.
- Wu J., Zhou T., Zhang J., He J., Gause W. C. and Mountz J. D. (1994) Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-*lpr/lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2344-8.
- Wyllie A. H. (1997) Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin* **53**, 451-465.
- Wyllie A. H., Kerr J. F. and Currie A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* **68**, 251-306.
- Wyllie A. H., Morris R. G., Smith A. L. and Dunlop D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* **142**, 67-77.
- Yamada Y., Sugawara K., Hata T., Tsuruta K., Moriuchi R., Maeda T., Atogami S., Murata K., Fujimoto K., Kohno T., Tsukasaki K., Tomonaga M., Hirakata Y. and Kamihira S. (1998) Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells. *Blood* **91**, 4265-72.
- Yamamura Y., Hua X., Bergelson S. and Lodish H. F. (2000) Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor- beta -dependent apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 36295-302.
- Yang Y., Mercep M., Ware C. F. and Ashwell J. D. (1995) Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med* **181**, 1673-82.
- Yerramasetti R., Gollapudi S. and Gupta S. (2002) Rifampicin inhibits CD95-mediated apoptosis of Jurkat T cells via glucocorticoid receptors by modifying the expression of molecules regulating apoptosis. *J Clin Immunol* **22**, 37-47.

- Yin X. M., Wang K., Gross A., Zhao Y., Zinkel S., Klocke B., Roth K. A. and Korsmeyer S. J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**, 886-91.
- Yoshida H., Kong Y. Y., Yoshida R., Elia A. J., Hakem A., Hakem R., Penninger J. M. and Mak T. W. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**, 739-50.
- Zacharchuk C. M., Mercep M., Chakraborti P. K., Simons S. S., Jr. and Ashwell J. D. (1990) Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol* **145**, 4037-45.
- Zhang J., Gao J. X., Salojin K., Shao Q., Grattan M., Meagher C., Laird D. W. and Delovitch T. L. (2000) Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med* **191**, 1017-30.
- Zhang X., Fujii H., Kishimoto H., LeRoy E., Surh C. D. and Sprent J. (2002) Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells. *J Exp Med* **195**, 283-93.
- Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D. F. and Sprent J. (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**, 591-9.
- Zheng L., Fisher G., Miller R. E., Peschon J., Lynch D. H. and Lenardo M. J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348-351.
- Zhu B. G., Zhu D. H. and Chen Y. Z. (1998) Rapid enhancement of high affinity glutamate uptake by glucocorticoids in rat cerebral cortex synaptosomes and human neuroblastoma clone SK-N-SH: possible involvement of G-protein. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 261-5.
- Zhu L. and Anasetti C. (1995) Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T cells. *J Immunol* **154**, 192-200.
- Zimmermann C., Rawiel M., Blaser C., Kaufmann M. and Pircher H. (1996) Homeostatic regulation of CD8+ T cells after antigen challenge in the absence of Fas (CD95). *Eur J Immunol* **26**, 2903-10.
- Zipp F., Wendling U., Beyer M., Grieger U., Waiczies S., Wagenknecht B., Haas J. and Weller M. (2000) Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J Neuroimmunol* **110**, 214-22.
- Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A. and Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-13.
- Zou H., Li Y., Liu X. and Wang X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-56.

## 9 ANHANG

### Sequenz des humanen CD95L 5' UTR und Promotors:

>gi|3492846|dbj|AB013303.1| Homo sapiens gene for Fas ligand, 5'-flanking region and partial cds

```
TGCCTTGCTCCTGAATCAAACCTTCCAACAGAAGGCAGGGAAGTGAGATCATTAGGTTTGTTTTTTAAAA
AGCATTTTTTCTTATAGCATTTTACTGGGTGATTTGGGCTTGGGAAAGGTCGGTGGCAGGGCACCTGTTAG
GGCATTATTGCAGTATTTCAAGTGAGAGATAAAGTCTGACCCCAGGCAACAGCAGTAAGAAAAATGGGAG
TAGCGAGGATGGGGCAGGGGGCAGTACACTGAGGGGAGGGTAAGGAACAGGTCTCAGGTAAAAGCGACA
GTCCTGGGTGACCAGTTAAACGTTGGGGGAGAGGAAAAGAAAGGAGATGAAGTTGCCACCAGAAAGAGTG
GCCTCAGGAGAAAGGGGTTGTACAGGGTTGGGGATGGGGTGGGATGGGCAGAATGTATCAGGGAAATAGT
ACCCTTGGGGTTGGTGTGGTACAGGTGAGTGGGCCTGAATGATAGTAATGGAAATCCCAAAGCATGATAT
AAAACTAACGAAATTTGAAAAGTAATAAACATGAAAAAATGAAAAATTTTGATTTATGGGGGATTTAT
TTGGCTTCTATTGGAGAATGATTAGGACTGAAGCTAACTACTTGGAAAGTTATTGGCATATAAATGGTATG
TGAGGCCAGAGGAAATGGTGAGATGAGCCCAAGTAGAGAGGCCAGCTTTAAACAACAACAACAACAACA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAAACAAAGAAATAGGACACAGAGTTAGATTTGAATGTCAGATAT
ATGATGAATAATTGTTTAGTATATTCATGTTTTGGACATGTTTAAGACCTACTTGTCTAAAAATAATGT
ATTATTTATCTGAAATTCAAATTTAACTGGGCACCATGTATTTTCATCTGGCAACCATAACAGGGGCAGCA
CACAGAAATGTTGGCAGGGACCAGGCAGGCCTTTCAGATAGTGAGGTGGTGTGTGAGACACAGGCCAGTG
GTGGAGGCTGGGTGACCCAGAACTCCTGTCTCTCATTCTCAGGGGCAGCTGCTACATACTTCCCCTGAT
TGGGTTTGCAGAGATGGCCTCGAGGGTGTCTGATATTCTGATATTTCAAACAGAATAGAAATATGTATT
TTAATGTGTATTTAATATATATATATTTTAAATATTTTTAATGTTGATATTTAAAGTGGTCAGTTGGGCTC
AGTGCAGTGGCTCATGCCTGTAATTCCAGCACTTTGGGAAACTGAGGCAGGAGGATGTCTTGAAGCTAGG
AGTTTGAGACAAGCCTGGGCAACATAGCAAGTCCCCATCTGTACAAAAAAAAAAAAAAAAAGAATAAATTAGTCA
GGTGTAGTGACTIONTATGCCTATAATCCCAGCTACTCAGGAGGCCAAGGCAAGAGGATTGCTTGAGCCCAGG
AGTTTGAGGCTGCAGTTAACTACGATAGCACCCTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCTGTCT
TCTATTTAAATAAATAAGTAAATAAATAAAGTGGGCAACAATGAAAATGAAAACATTGCGAAATACAAA
GCAGCTCTGTGGGTTCCACTGGTTTTGCAGCCTCTGATCTAATTTCTAAAGTGGGTGTAGCAGGTTTTTAA
```

CCTGTAAATTATGGTGATCGGCAGGTCAGGGTAAATGGTAGTTGTGTGTGGGGAAGAGATGATGGCAACA  
 GATGTTTTTCTCCTGCAAAAATAAAATGTGGGAGTGA CTCTCTGGCCATGACTCCATGGTCTCTCCCC  
 TCAGAGCCATTTTCAGTAAAATTTTTATAGTTTTAAAAATACGGTTCTGAACAATTTTTGTTAGAGTTAT  
 TTTGGGATTTTTAAATAGTTTTTTGGTTGTGTATATGGTAGAATTCTTAAAATTATACAATTATAATGTA  
 TAAAAAGCATGCAATTATAATTCATAAAATTATAGCCCCACTGACCATTCTCCTGTAGCTGGGAGCAGT  
 TCACACTAACAGGGCTATACCCCCATGCTGACCTGCTCTGCAGGATCCCAGGAAGGTGAGCATAGCCTAC  
 TAACCTGTTTGGGTAGCACAGCGACAGCAACTGAGGCCTTGAAGGCTGTTATCAGAAAATTGTGGGCGGA  
 AACTTCCAGGGGTTTGTCTCTGAGCTTCTTGAGGCTTCTCAGCTTCAGCTGCAAAGTGAGTGGGTGTTTCT  
 TTGAGAAGCAGAATCAGAGAGAGAGAGATAGAGAAAGAGAAAGACAGAGGTGTTTCCCTTAGCTATGGAA  
 ACTCTATAAGAGAGATCCAGCTTGCCTCCTCTTGAGCAGTCAGCAACAGGGTCCCCTGCTTGACACCTCA  
 GCCTCTACAGGACTGAGAAGAAGTAAAACCGTTTGCTGGGGCTGGCCTGACTCACCAGCTGCCATGCAGC  
 AGCCCTTCAATTACCCATATCCCCA

#### Erklärungen zu den Farbmarkierungen:

- blau: TATA-Box an Position -30
- grün: Transkriptions-Start an Position +1
- grau: +76/+95 Oligonukleotid mit AP-1 Bindestelle  
(doppelt unterstrichen)
- rot: Translations-Start-Codon ATG an Position +100

#### Sequenz des murinen CD95L Promotors:

>gi|20830819:c5703098-5693061 Mus musculus WGS supercontig Mm1\_WIFeb01\_18  
 TAGTCCTGGCTGTCTGGAACCTCACTCTTTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCCGCCTGCCTCT  
 GCCTCCCAAGTGCTGGGATTAAGGCATGCACATATTTTTAATAATGACAACAATCACTTCTTCATACA  
 ACACTTCTCTCTGGCTATTTCAATTACAGTTACTAGTCTGTGGGATGTTTTCTAATATGACTGTTTTCT  
 CTGCTAATACACGTGGAAGATTAATATATGCAAATAGTTGTTTTGTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTAA  
 GAGCAAAGAGACAGGAGATTTGCCTAACTGTCAAACAGTCAAGACATCTGTAAAGTTGCTGGGCATGG  
 TGGTGAACATCTGTAATTCCAAACCTTAAGAAAAGGGGTCGGGAGGATTGCTACAAGTAGGAGGCCAGC

CTGGGTTACACACTGAGTTAGGAGTCAGTTTTGGTACATAGAGACTCTATCTCTATAAAGGGAAAAAA  
CTATATCTACAATACCATGACTATGAGAACTGCATAACTATTGTACCAGGATAGATGGATGGGCAGATCA  
ACAAGAATCAGAGCTATAAGATGTCATCAATAAAGACCATGGTAACTATGCTACTGTGATTCAGTAGAA  
GAAATGAGGGATCGAGTTGAGGAAATTGGTTCATTCATAGTACAAGGTTTGCACTTTAGAACTTTTATT  
TCTTATTTTTAAATATGCACATGCATGTGTGTCTTATATGTGGCCACATGCTTGTGAGTGCAGCTACCTG  
TACTTGGGGAGGCCAGAAGAGGGAACAGGATGCTGTGGAGGTGGAGGTGGTTGTTAGCTGCCTGAGATGG  
ATGCTAGGACTGAAGTCAGGCCCTCTGCAAGAGCAGGACATGCTCTGAACTGCTGAGCCACCTTTCTGGC  
TTCTGGTTTTAACTGTAGATGTCTTCTTAGAGCTTGAGTATTCGAGGCACGTTCTCCAATGCAAGGGGCC  
TCTAGGATCCTGGTAATGGGATGTGGCAAACAGAAAAATTCACATAACAAGAAAGTGGGTTGCCCAACAA  
ATCTATGACTGATGTTCAAACCTCACAAGAAACAAGTGAGAAAGCAGTTCATAGACAGTGAGATTATCTTT  
ATAGGTATAATGCTGGCAAAAACCTGGAAAGGTAGGTAGCATTATACAAAGCAGAGATCAAAGCAGCAGCT  
AGGATGCTCCTTCTGCAACTGCCAGTGGCGATGAGGGACTGAGCTGCTAAACGAGCATCCTGGAGGTACC  
TAGAGAAGTTGAACGAGTAGCCTCATGTTTATAAATACACAAACTCAAACCTGGAGTGTTCTACGGTCTT  
TACTCACATTTGAGAAATCTTGTCTGGTCTGTCTGTTTGGCAGATTGCTTCAGGGGGCTTCCCTAGGCT  
TGTTAAGGTTAAATACCAGGTTCCCTGGCTATGTATCACCTCTGTTGCTCCTGAGTCACCTCTGGAGCT  
CTGGCCTGTAGTCAACTTTAAGGCTGATTCCGTGGAATCATGAGAGTAGGAGGCTGAAAGGACTGAGTTT  
GAGGTTCTAGGATGTGGGGCCATCAGCCTGTTGGCTCTTGATCCATTTTTCTTCCAGCAGCTACAGAG  
CTAAGTCTACTTTGAATGGTGATTTCTTTTCTAATAAAGGTTCTGGTACCAATGTGATGGGTCTTGA  
GACTGTTACGGGGGTGTTTATTCTTTCTCAATCTTGCCAATAATAGTACCATTTCTGCTGAATGGCACT  
ACCAAACCTCAACCCAGTTTCTAGAAGTTTCTCTCTCGTCTCTTTCCAGCTAGAACTCTTTCCCTGTGATT  
GGTGGACAGTAGGGTGTGATATTTTGAATCCTCTATGAAAAAAATTAATCAAAGAAGGACAAAGAGA  
TGTGGACAGACAGAATGACAATTACTAAAGAATCCTGGGAGTTGAGATATAAAAAATCACAAAAGACTCAT  
CTGGTACAGGGAGAGCAGCCATGGGACTAGGGAAGGAGGGGAAGATAAGAAATGTGTACAGGTGAGAAA  
AAGCAGGCCTGGATGATCAGGGTGGGGCGGGGAGGGTGCAGGGGGAAGGGCTGGGGGCAAAAGGAAGGAA  
CAGCCTGAGATTGCCAGCAGAGTGACCTCAGGAGAATTAGCAGCTGGGGTGGGGCAGGATGAAGGCAGCA  
GAAAAATAACACTTTGGGAGTTGTTTTGGCATAGGTGAGAGGGGTAGGGTGCTCATCCCAGAAATCCCAA  
AGCATGAGATAAAAAAATAAAACCACTTAAATGTAGAGTCTGCCAAAAAGGTGGAATATAGGAACTTA  
TTGGGATTTATATGGTTTATATGGGAAAGTAATGGGAACCGAGACTGAGTTCCTTAGAGGTTATTAGACAT  
AAATGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGCCAGAAGACTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGG  
CCAGAAGACTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGCCAGAAGACTGAAGTCAAACCTAAGGCAGAGTGGT  
CGGTTTTATAAAGGCATAAGATATATACTTAAATTTGTTGTAAATGTTGAATAATGTTTTAGTATGTGCT

GTGTGATGGTTAAGGCACACTTGCTATAAAAATGCTATTTATTGCTTATCTCAAACCTCTTCTGAATTAGG  
 CACCTCAGTTTTTCATCTGGTGACCAGAAGAGAGATTGCAAAGTTAAATGATTACAGAGGAGGAAGGCTAC  
 ATTTCCCAGGGGAAGTGGGATGGATAGGGGCGAGGCACAGTGGGGGGTTAGGGCAGCCTTGAACACCTGG  
 CACACATTCCTGGTTGCAGCTGGCTGATGTTTCAGGGAAGGGACTTCAACAGAGGATTCAACTCCCTATGC  
 TCAGATGTGGAGATATCTTCTCTAGCCGAACTCCTTGGTCTTTTCCCCATGCCTCAGCACCAACAGGCTT  
 CTCAGGACACACCCCAGAGCTGCGGAAGAGCTAATGTCTCAAGGGGTATCCAGCGCTGACTTGCTGAGT  
 TGGACCTCAGGCAGGCAAGCCTGGTTTACCAGCCTTCTCAGTTAGCACAGAGACGCCAATTGGAACCTTCG  
 AAGACTTGTCGTCAGAAATTTCTGGGCGGAAACTTCCTGGGGTTGCTGTGAGCTTTTTGAGGCTTCTCAG  
 CTTTCAGATGCAAGTGAGTGGGTGTCTCACAGAGAAGCAAAGAGAAGAGAACAGGAGAAAGGTGTTTCCCT  
 TGACTGCGGAAACTTATAAAGAAAAGTTAGCTTCTCTGGAGCAGTCAGCGTCAGAGTTCTGTCTTGCAC  
 ACCTGAGTCTCCTCCACAAGGCTGTGAGAAGGAAAC CCTTTCCTGGGGCTGGGTGCCATGCAGCAGCCCA  
 TGAATTACCCATGTCCCCAGATCTTCTGGGTAGACAGCAGTGCCACTTCATCTTGGGCTCCTCC

#### Erklärungen zu den Farbmarkierungen:

- blau: TATA-Box
- rot: Translations-Start-Codon ATG
- hellgrau: downstream Primer zur Klonierung der 1,5 Kb- bzw. 3 Kb-  
CD95L- Promotor-Fragmente
- : dunkelgrau: upstream Primer zur Klonierung der CD95L-Promotor-Fragmente

## 10 ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator-Protein-1
AS	Aminosäure
ATF-1	aktivierender Transkriptionfaktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Zell-Lymphoma-2
bp	Basenpaare
bZIP	basischer Leuzin-Zipper
CAP	Zytotoxizitäts-abhängiges APO-1 assoziiertes Protein
c-FLIP	zelluläres FLICE-inhibitorisches Protein
CD	“Cluster of differentiation”
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHX	Cycloheximid
ConA	Concanavalin A
Cy	CyChrome
Da	Dalton
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
Dex	Dexamethason
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol

---

$\Psi_M$	Mitochondriales Transmembranpotential
EMSA	“electrophoretic mobility shift assay”
FACS	“fluorescence activated cell sorter”
FADD	“Fas-associated death domain protein”
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FLICE	“FADD-like ICE”
FSC	„forward scatter“ (im FACS)
g	Gramm
GC	Glucocorticoid
GILZ	“Glucocorticoid Induced Leucine Zipper”
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GR <sup>lckCre</sup>	konditional T-Zell-spezifische GR-defiziente Maus
GR <sup>dim</sup>	Dimerisierungs-defekte GR-Mutante
GRE	Glucocorticoid-responsives Element
h	Stunde
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -konvertierendes Enzym
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
LZ	Leuzin-Zipper
M	molar
MACS	“magnetic activated cell sorter”
ME	2-Mercaptoethanol
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
min.	Minute

---

NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NGF	Nervenwachstumsfaktor
nGRE	negatives Glucocorticoid-responsive Element
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	phorbol-12-myristat-13-acetat
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidium Iodid
PT	Permeabilitäts-Transition
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	„sideward scatter“ (im FACS)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRAIL	“TNF-related Apoptosis-inducing ligand”
TRE	TPA-responsives Element
UTR	untranslatierte Region
v-FLIP	virales FLICE-inhibitorisches Protein

Weitere Abkürzungen sind in den einzelnen Kapiteln erläutert.

## 11 PUBLIKATIONSLISTE

Aus Prioritätsgründen wurden Teile der Arbeit vorab veröffentlicht.

Originalveröffentlichungen:

Krueger, A., Schmitz, I., **Baumann, S.**, Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-Inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-Inducing Signaling Complex. *J Biol Chem*, **276**, 20633-20640.

Kirchhoff, S., Sebens, T., **Baumann, S.**, Krueger, A., Zawatzky, R., Li-Weber, M., Meinl, E., Neipel, F., Fleckenstein, B. und Krammer, P.H. (2002) Viral IFN-Regulatory Factors Inhibit Activation-Induced cell Death via two Regulatory IFN-Regulatory Factor 1-Dependent Domains in the CD95 Ligand Promotor. *J Immunol*, **168**: 1226-1234.

Li-Weber, M., Weigand, M.A., Giaisi, M., Süss, D., Treiber, M., **Baumann, S.**, Ritsou, E., Breitkreutz, R. und Krammer, P.H. (2002) Vitamin E Inhibits CD95 Ligand Expression and Protects T Cells from Activation-Induced-Cell-Death of noninfected and HIV-1-infected individuals. *J Clin Invest*, **110** (5): 681-690.

Li-Weber, M., Giaisis, M., **Baumann, S.**, Treiber, M. und Krammer, P.H. (2002) The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Parthenolide Suppresses CD95-mediated Activation-Induced-Cell-Death in T Cells. *Cell Death and Differentiation*, **9** (11): 1256-1265.

Schmitz, I.\*, Krueger, A.\*, **Baumann, S.**, Kirchhoff, S. und Krammer, P.H. (2002) Specificity of anti-human CD95 (APO-1/Fas) antibodies. *Biochem Biophys Res Comm*, **297**: 459-462.

**Baumann, S.**, Hess, J., Eichhorst, S.T., Krueger, A., Angel, P., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. *Oncogene*. Im Druck.

Lavirk, I., Krueger, A., Schmitz, I., **Baumann, S.**, Weyd, H., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death and Differentiation*. Im Druck.

Schmitz, I., Weigd, H., Krueger, A., **Baumann, S.**, Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) Sensitisation of Primary Human T cells by Cycloheximide. Zur Publikation eingereicht.

Die mit \* gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen teilen zu dieser Studie beigetragen.

Übersichtsartikel:

Krueger, A., **Baumann, S.**, Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2001) FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-8254.

Kirchhoff, S., Krueger, A., **Baumann, S.** und Krammer, P.H. (2001) TCR/CD3 Restimulation und CD28 Kostimulation induzieren die Expression von c-FLIPshort und verhindern CD95-vermittelte Apoptose in T-Zellen. *Immunologie Aktuell*, **1**, 117-118.

**Baumann, S.**, Krueger, A., Kirchhoff, S., Krammer, P.H. (2002) Regulation of T cell Apoptosis during the Immune Response. *Current Molecular Medicine*, **2**, 257-272.

Krueger, A., Fas, S., **Baumann, S.** und Krammer, P.H. (2002) The role of CD95 in regulation of peripheral T cell apoptosis. Zur Publikation eingereicht.

## **12 ERKLÄRUNGEN**

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, im Dezember 2002