

**Aus dem Institut für Molekulare Innere Medizin
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Harald Wajant

**„Herstellung und Charakterisierung multifunktionaler Fusionsproteine
des membranständigen Fas-Liganden und des membranständigen CD40-Liganden“**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Felix Stephan Schenkhoﬀ

aus

Würzburg

Würzburg, Oktober 2007

Referentenblatt:

Referent: Prof. Dr. H. Wajant

Koreferent: Prof. Dr. F. Kehl

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

24.01.2008

Der Promovend ist Arzt

1.	Einleitung	1
1.1	Die allgemeinen Merkmale der TNF-Liganden und der TNF-Rezeptor-Superfamilie	1
1.2	Der CD40-Rezeptor und sein Ligand	2
1.2.1	Der CD40-Rezeptor	2
1.2.2	Der CD40-Ligand	4
1.3	Der Fas-Rezeptor und sein Ligand	4
1.3.1	Der Fas-Rezeptor	4
1.3.2	Der Fas-Ligand	6
1.4	Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	7
2.	Materialien	8
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	8
2.2	Restriktionsenzyme	9
2.3	Antikörper und Antiseren	9
2.4	Zelllinien	10
2.4.1	Prokaryontische Zellen	10
2.4.2	Eukaryontische Zellen	10
2.5	Expressionsplasmide	10
2.6	Primer	10
2.7	Lösungen und Puffer	11
3.	Methoden	12
3.1	Arbeitstechniken zur Herstellung von Expressionsvektoren	12
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
3.1.2	Darstellung und Reinigung von DNA	12
3.1.3	Restriktion und Ligation von DNA	13
3.1.4	Transformation in kompetente Zellen	13
3.1.4.1	Transformation in TOP10 E.coli (One Shot, Invitrogen)	13
3.1.4.2	Transformation in Dam^- / Dcm^- - E. coli SCS110 (Stratagene)	13
3.1.5	Plasmidpräparation	14
3.2	Arbeitsmethoden im Rahmen der Zellkultur	16
3.2.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	16
3.2.2	Einfrieren bei - 80 °C und Wiederauftauen von Zellen	16

3.2.3	Transiente Transfektion mittels Elektroporation	16
3.2.3.1	Elektroporation für Interleukin-8-ELISAs	16
3.2.3.2	Elektroporation für GST-pull-down-Assays	17
3.2.4	Transiente Transfektion mittels Lipofektamine 2000	17
3.2.5	Durchflusszytometrie	17
3.2.5.1	Überprüfung der Transfektionseffizienz	18
3.2.5.2	Antikörperfärbungen zur FACS-Analyse von 293-Zellen	18
3.2.6	Messung der Interleukin-8-Induktion im ELISA	18
3.2.6.1	Kokultur	18
3.2.6.2	Detektion	19
3.2.7	Western-Blot	19
3.2.7.1	SDS-PAGE	19
3.2.7.2	Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	20
3.2.7.3	Immunofärbung von Westernblots	20
3.2.7.4	Peroxidasenachweis mittels ECL	20
3.2.8	GST-Fishing von Rezeptorsignalkomplexen	21
3.2.8.1	Vorstimulation der Rezeptorzellen mit sTNF	21
3.2.8.2	Kokultur und Herstellung der Gesamtzelllysate für GST-Fishing	21
3.2.8.3	GST-Fishing der Signalkomplexe	22
3.2.9	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	22
3.2.9.1	Transfektion, Kokultur und Fixierung der Zellen	22
3.2.9.2	Mikroskopische Analyse der Rezeptor-Ligand-Interaktion	23
4.	Ergebnisse	24
4.1	Klonierung der Fusionsproteine GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 und GST-Flag-YFP-FasL-pCR3	24
4.1.1	Zielsetzung der Klonierung	24
4.1.2	Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3	24
4.1.3	Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-FasL-pCR3	28
4.2	Charakterisierung der GST-Fusionsproteine des CD40L und FasL	32
4.2.1	Expressionsanalyse von GST-Flag-YFP-CD40L und GST-Flag-YFP-FasL durch Untersuchungen im FACS	32
4.2.2	Membranständiger CD40L und FasL induzieren Interleukin-8	34

4.3	Analyse CD40L-induzierter Rezeptorsignalkomplexe	36
4.3.1	GST-Flag-YFP-CD40L lässt sich effektiv durch GST-Fishing isolieren	36
4.3.2	In GST-Flag-YFP-CD40L stimulierten Zielzellen interagiert TRAF2 mit CD40	37
4.3.3	TRAF2 assoziiert transient mit dem membrangebundenen CD40-Signalkomplex	38
4.3.4	Vorstimulation der Rezeptorzellen mit sTNF führt zu einer Verringerung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex	39
4.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	40
4.4.1	Zielsetzung der mikroskopischen Untersuchungen	40
4.4.2	Analysen der Expression von CD40L-YFP und CD40-CFP in HeLa-Zellen des Wildtyps	40
4.4.3	Analyse der Interaktion von GST-Flag-YFP-CD40L mit CD40-CFP in Kokulturen von HeLa-Zellen des Wildtyps	42
4.4.4	Analyse der Interaktion von GST-Flag-YFP-FasL (293-Zellen) und Fas-CFP (HeLa-Zellen des Wildtyps) in Kokultur	44
5.	Diskussion	46
5.1	Die Molekülstruktur der Fusionsproteine von CD40L und FasL	46
5.1.1	Unterschiede der membranständigen Form zu den löslichen Varianten verschiedener TNF-Liganden	46
5.2	TRAF2 im memCD40L induzierten Rezeptorsignalkomplex von CD40/CD40L	48
5.2.1	Die Kinetik der Assoziation von CD40 und TRAF2	48
5.2.2	Regulation der TRAF2-CD40-Interaktion	49
5.3	FasL- und CD40L-induzierte Rezeptorsignalcluster	51
6.	Zusammenfassung	52
7.	Abkürzungen	54
8.	Literaturverzeichnis	57

1. Einleitung

1.1 Die allgemeinen Merkmale der TNF-Liganden und der TNF-Rezeptor-Superfamilie

Das Protein TNF-alpha ist der Prototyp einer Familie von Liganden, die vor allem in Immunregulations- und Entzündungsgeschehnisse involviert sind. Die Rezeptoren für TNF-alpha und die anderen Mitglieder der TNF-Liganden bilden hierzu eine korrespondierende Superfamilie von Rezeptoren. Mit Ausnahme von TNF-beta werden alle TNF-Liganden als Typ-II-Transmembranproteine (extrazellulärer C-Terminus) produziert, die ein kurzes 10-80 Aminosäuren (AS) großes, zytoplasmatisches Segment und eine ca. 140-215 AS lange extrazelluläre Region aufweisen.¹ Generell formen TNF-Liganden trimere Moleküle.²⁻⁴ Manche TNF-Liganden können auch in löslicher Form vorkommen. Beide Formen liegen in der Regel zwar als Trimere vor,⁵ sind jedoch nicht immer gleichwertig in ihren Eigenschaften. So kann zwar lösliches TNF (sTNF) beide TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2) binden, aktiviert aber bevorzugt TNF-R1, während membranständiges TNF beide Rezeptoren aktivieren kann.^{6,7} TNF-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, die im extrazellulären Bereich cysteinreiche Subdomänen aufweisen. Diese Domänen definieren die Zugehörigkeit zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Neue Studien zeigen, dass sich TNF-Rezeptoren schon zu trimeren Komplexen auf der Zelloberfläche zusammenlagern, bevor der Ligand gebunden wird. Für die TNF-Rezeptoren Fas, TNF-R1, TNF-R2, TRAIL-R1 und CD40 konnte in der ersten cysteinreichen Domäne eine Region identifiziert werden, die diese ligandunabhängige Trimerisierung vermittelt. Sie wird „Pre-Ligand Assembly Domain“ (PLAD) genannt.^{8,9}

Die an der Ligandenbindung und der Rezeptorsignalkomplexbildung beteiligten Proteine haben eine symmetrische Beziehung zueinander. Nach Bindung des Liganden interagiert der zytoplasmatische Teil des korrespondierenden Rezeptors mit Adapterproteinen, die die Aktivierung intrazellulärer Signalwege vermitteln. Die Signalweitergabe findet dabei durch zwei Hauptklassen zytoplasmatischer Adapterproteine statt, den TNF-Receptor Associated Factors (TRAFs) und Death-Domain-Molekülen (DD-Moleküle). In Säugetieren wurden bisher 6 TRAFs und eine Anzahl von Nicht-Rezeptor-Todesdomänenproteinen charakterisiert.⁵

Der jeweilige Adapter für die Signalweitergabe wird dadurch selektiert, dass der Rezeptor entweder eine Todesdomäne (DD) oder ein TRAF-Interagierendes Motiv (TIM) besitzt. Die DD ist eine ungefähr 60 AS große globuläre Struktur aus 6 konservierten α -Helices. Todesdomänen gibt es im zytoplasmatischen Teil von Todesrezeptoren (DRs) aber auch in Adapterproteinen. Das TIM ist eine Sequenz von ca. fünf bis sieben AS, die sich in der zytoplasmatischen Domäne von Nicht-Todesdomänen-Rezeptoren (NDRs) befindet. In der Subgruppe der DRs führt die Interaktion mit dem Liganden typischerweise zur Assoziation von Adapterproteinen wie dem Fas-Assoziierten Death-Domain-Protein (FADD) oder dem TNF-Rezeptor1-Assoziierten Death-Domain-Protein (TRADD), die schließlich über weitere Moleküle unterschiedliche Wege der Signaltransduktion einschlagen können. Im Fall von Fas führt die homotypische Assoziation der DD von FADD mit der Fas-Todesdomäne zur Rekrutierung von Procaspase-8 und -10. Dies erfolgt durch homotypische Interaktionen zwischen Todeseffektordomänen (DED), die sowohl in FADD, als auch in der Prodomäne dieser Caspasen enthalten sind.⁵

Seit einigen Jahren ist deutlich geworden, dass Todesdomänenrezeptoren auch nicht-apoptotische Signale generieren können. TNF-R1 zum Beispiel signalisiert einerseits über die Assoziation mit TRADD, das über seine Todesdomäne FADD rekrutiert, den klassischen Weg der Apoptose. Andererseits kann über TRADD auch eine Rekrutierung von TRAF2, TRAF1 und RIP (Receptor-interacting Protein) erfolgen, die über den NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B)- und JNK- (c-Jun N-terminal Kinase) Signalweg eine Entzündungsreaktion auslösen können.¹⁰

1.2 Der CD40-Rezeptor und sein Ligand

1.2.1 Der CD40-Rezeptor

Der humane CD40-Rezeptor ist ein 50 kDa schweres, 277 AS langes Transmembranglykoprotein, das für die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen wichtig ist^{11, 12} und deren klonale Expansion sowie den Klassenwechsel der von ihnen gebildeten Immunglobuline reguliert.¹³ Exprimiert wird der CD40-Rezeptor auf B-Zellen¹⁴, Monozyten, basophilen Granulozyten¹⁵, eosinophilen Granulozyten¹⁶, Endothelzellen¹⁷, interdigitierenden dendritischen Zellen¹⁸, Langerhans Zellen¹⁹,

Fibroblasten²⁰, Keratinozyten²¹, Reed-Sternberg-Zellen der Hodgkin Krankheit und Kaposi-Sarkom-Zellen^{22, 23}.

CD40 weist eine 20 AS lange Signalsequenz, eine 173 AS lange Extrazellulärdomäne, ein 22 AS langes Transmembransegment sowie eine 62 AS lange zytoplasmatische Domäne auf.¹¹ In seinem extrazellulären Teil besitzt CD40 cysteinreiche Motive, die von einer N-terminal-benachbarten und an Serin und Threonin reichen Sequenz begleitet werden.¹⁴ CD40 zählt zu der Subgruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie, die direkt mit TRAF-Molekülen interagieren können. Die zytoplasmatische Domäne von CD40 enthält zwei verschiedene TRAF-Bindungsstellen. Die Erste liegt zwischen den AS 231 und 238, die Zweite zwischen den AS 250 und 266. Über diese Bindungsstellen ist eine direkte Assoziation von TRAFs möglich. Die zur Membran proximal gelegene Bindungsstelle interagiert dabei mit TRAF6, während die distale eine Interaktion mit TRAF2 und TRAF3 vermittelt.²⁴⁻²⁶ Die Bindung von TRAF5 erfolgt indirekt über die Assoziation mit TRAF3 an CD40.²⁵ Inwieweit die Interaktion von TRAF1 mit CD40 direkt oder indirekt stattfindet, wird derzeit noch unterschiedlich diskutiert.²⁷

Am besten untersucht sind für CD40 die Signalwege für NF- κ B und JNK, bei denen TRAF2 ein unentbehrlicher Mediator ist. In diesem Zusammenhang konnte über die Struktur von TRAF2 und TRAF3, die bei der CD40-Signaltransduktion in lipid rafts rekrutiert werden, herausgefunden werden, dass der C-terminale Anteil für die Assoziation mit den TIMs benötigt wird. Der N-terminale Teil der TRAF-Moleküle hingegen, der neben einer Anzahl von Zinkfinger-Motiven einen RING-Finger besitzt, ist für die Signaltransduktion essentiell. Zum Beispiel ist die RING-Finger-Domäne entscheidend für die NF- κ B-Aktivierung durch TRAFs.¹⁰ Nach Ergebnissen von Brown et al. resultiert die Interaktion von CD40 mit TRAF2 nicht nur in der Überführung von TRAF2 in lipid rafts und der Aktivierung von NF- κ B, sondern initiiert anschließend auch den Abbau von TRAF2.²⁸ Essentiell hierfür ist wiederum die RING-Finger-Domäne des TRAF2, welche eine Ubiquitinierung von TRAF2 vermittelt, so dass es abschließend dem Proteasom zugeführt wird.²⁸

1.2.2 Der CD40-Ligand

Der humane CD40-Ligand (CD40L), auch bekannt als gp39 oder CD154, ist ein 39 kDa schweres Typ-II-Transmembranprotein, das ursprünglich auf der Oberfläche von CD4⁺-T-Zellen identifiziert wurde. CD40L ist 261 AS lang. Davon bilden 22 AS den zytoplasmatischen Teil, 24 AS das Transmembransegment und 215 AS den Extrazellulärteil.²⁹ Zwischen humanem und murinem CD40L finden sich auf Aminosäureebene 73% Übereinstimmung und für den murinen CD40L konnte eine Aktivität auf humanen Zellen gezeigt werden.³⁰ Wie TNF-alpha bildet auch CD40L Trimere und kann in löslicher Form vorliegen.^{31, 32} Nach Ergebnissen von Grassme et al. ist die Clusterbildung des CD40L eine Voraussetzung für die Clusterbildung des CD40-Rezeptors. Für die Clusterbildung des CD40L konnten sie beweisen, dass dies ein aktiver ASM- (Acid Sphingomyelinase) und p53-abhängiger Prozess ist, der im Vergleich zu der Clusterbildung des CD40 sehr schnell und kurzlebig sei. Sie schließen daraus, dass die Clusterbildung von CD40L die des CD40 nur initiiert, aber nicht für eine Aufrechterhaltung der Signaltransduktion des CD40 nötig ist.³³ Es wurde bereits gezeigt, dass lösliche dodekamere Formen des CD40L effektiver als seine trimeren Formen B-Zellen aktivieren. Nach Haswell et al. kann dieser Unterschied in der Signaltransduktion des CD40 nicht mit der unterschiedlichen Avidität der Konstrukte erklärt werden, sondern wird vom Ausmaß der Clusterbildung reguliert.³⁴

Als Zellen, die CD40L exprimieren, sind bekannt: CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen³⁵, B-Zellen, Mastzellen, basophile Granulozyten³⁶, eosinophile Granulozyten³⁷, dendritische Zellen³⁸ Monozyten sowie Natürliche Killerzellen.³⁹

1.3 Der Fas-Rezeptor und sein Ligand

1.3.1 Der Fas-Rezeptor

Der humane Fas-Rezeptor (Fas), auch bekannt unter Cluster of Differentiation 95 (CD95) oder APO-1 (Apoptosis-1), ist ein 43 kDa schweres, 355 AS langes, transmembranes Glykoprotein vom Typ I.⁴⁰ Sein extrazellulärer Teil ist 156 AS, das Transmembransegment 20 AS und der zytoplasmatische Anteil 144 AS lang.^{1, 40} Im extrazellulären Bereich finden sich drei cysteinreiche Motive, während im zytoplasmatischen Teil am C-Terminus eine Todesdomäne liegt, welche auch bei TNF-Rezeptor-1 gefunden wurde.^{41, 42}

Die Todesdomäne ist ein Protein-Protein-Interaktion-Modul, das sowohl für die Induktion von Apoptose wichtig ist, als auch nicht-apoptotische Signalwege vermittelt.^{43, 44} Auf der Zelloberfläche liegt Fas - wie bereits oben diskutiert - in Form von präformierten Komplexen vor, deren Todesdomänen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus an der Interaktion mit intrazellulären Adapterproteinen gehindert werden.⁴⁵ Bei der Aktivierung des Fas-Rezeptors durch löslichen (sFasL) oder membranständigen Fas-Liganden (memFasL) zeigen sich erhebliche Unterschiede. Während memFasL und agonistische Antikörper Fas aktivieren, geschieht dies beim natürlichen sFasL nur nach Quervernetzung.^{46, 47} Die nachfolgende Bildung signalkompetenter Fas-Komplexe ist verbunden mit der Rekrutierung des zytoplasmatischen Adapterproteins FADD über eine homotypische Interaktion der Todesdomänen von Fas und FADD. Diese Assoziation ermöglicht FADD die sekundäre Bindung von Procaspase-8 in den Signalkomplex. Innerhalb des DISC- (Death-inducing Signaling Complex) genannten CD95-Signalkomplexes wird Procaspase-8 durch Dimerisierung aktiviert. Die Dimere wiederum werden autoproteolytisch in die fertige heterotetramere Form des Enzyms Caspase-8 überführt und schließlich aus dem Fas Signalkomplex freigesetzt.⁴⁸ Für den weiteren Signalweg werden zwei Typen von Zellen unterschieden. In den Zellen des Typ I ist die durch Caspase-8 vermittelte Aktivierung der Effektorcaspase-3 ausreichend, um die abschließenden Schritte der Apoptose auszulösen, während in den Zellen des Typ II die Aktivierung der Effektorcaspasen durch Mitglieder der IAP- (Inhibitor of Apoptosis) Proteinfamilie blockiert wird. Um in diesen Zellen Apoptose zu vermitteln, ist eine Freisetzung Apoptose-fördernder Proteine aus den Mitochondrien nötig. Hierbei handelt es sich insbesondere um Cytochrom C, SMAC/Diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with low PI) und HtrA2/Omi (High temperature requirement Protein A2). Die Freisetzung dieser Proteine kann durch die Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak vermittelt werden, welche selbst durch Caspase-8-gespaltene Bid (tBid) aktiviert werden.⁴³

Während Cytochrom C im Zytoplasma an der Bildung des Apoptosoms zur Aktivierung von Caspase-9 beteiligt ist, heben SMAC/Diablo und HtrA2/Omi die durch Mitglieder der IAP-Proteinfamilie verursachte Inhibition der Caspasen auf.⁴⁹ Beide Mechanismen verstärken den Effekt der ursprünglich DISC-aktivierten Caspase-8.

Hierdurch kommt es letztlich ebenso zu einer Aktivierung der Effektorcaspasen und zur effizienten Auslösung der Apoptose. Die in Zellen des Typs II bestehende mitochondriale Signalschleife zur Verstärkung der Caspasenaktivierung ist für die Inhibition durch Bcl2 empfindlich, die daher in diesen Zellen Apoptose vermindern oder verhindern kann. Diese Möglichkeit besteht in Zellen des Typs I nicht.⁴³ Für die nicht-apoptotische Signalübermittlung von Fas konnte gezeigt werden, dass es zu einer NFκB-Aktivierung einerseits über eine FADD-RIP-Interaktion, andererseits aber auch über einen FADD-Caspase8-Signalweg kommen kann. Letzterer kann durch FLIP_{S/L} (FLICE/Caspase-8-Inhibitory Protein short/long) blockiert werden und außerdem auch in einer Aktivierung von ERK (extracellular signal-regulated kinase) oder JNK weiterführen.⁴³

Fas-exprimierende Zellen sind: CD34⁺-Stammzellen⁵⁰, Fibroblasten⁴⁰, Natürliche Killerzellen⁵¹, Keratinozyten⁵², Hepatozyten⁵³, B-Zellen⁵⁴ und B-Vorläuferzellen⁵⁵, Monozyten, CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen⁵⁶, eosinophilen Granulozyten⁵⁷ und Thymozyten (hoher Level auf CD4⁺CD8⁺-Vorläufern)⁵⁸. Murines Fas hat eine 50%ige Übereinstimmung mit menschlichem Fas und ist 8 Aminosäuren kürzer.⁵⁹

1.3.2 Der Fas-Ligand

Der humane Fas-Ligand (FasL) ist ein hochkonserviertes, 40 kDa schweres Typ-II-Transmembranprotein, das entweder als membranständiges Protein oder zirkulierendes Homotrimer vorkommt.^{60, 61} Im menschlichen Körper wird FasL als 281 AS langes Protein synthetisiert. Davon bilden 80 AS die zytoplasmatische Region, 22 AS das Transmembransegment und 179 AS den Extrazellulärteil.⁶⁰ FasL wird in TypII-Pneumozyten, Bronchialepithel⁶², Monozyten⁶³, Natürlichen Killerzellen^{64, 65}, dendritischen Zellen⁶⁶, B-Zellen⁶⁷, Makrophagen⁶⁸, CD4⁺-und CD8⁺-Zellen⁶⁹ und Lungen- sowie Kolon-Karzinomzellen^{62, 70} exprimiert. Proteolytisch gespaltener FasL ist ein 70 kDa Homotrimer, das sich aus 26 kDa Monomeren zusammensetzt.⁶¹

Löslicher trimerer FasL interagiert mit trimerisiertem Fas, ist aber nicht in der Lage den Rezeptor effektiv zu aktivieren. Erst hexamere Formen oder durch Antikörper quervernetzter FasL sind fähig, eine Signaltransduktion auszulösen.^{46, 71}

Neueste Studien zeigen deutliche Unterschiede in der Möglichkeit des membranständigen und des löslichen FasL hochmolekulare Aggregate mit Fas zu formen.

Nur der membranständige FasL ist unabhängig von dem zytoplasmatischen Anteil des Fas und trotz der Abwesenheit von FADD oder Caspase-8 in der Lage, supramolekulare Cluster von hoher Stabilität mit Fas auszubilden.⁴⁸ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Bildung der durch löslichen Fas-Ligand induzierten SPOTS (Signaling Protein Oligomeric Transduction Structures)⁴⁵ neben lipid rafts auch der zytoplasmatische Teil von Fas benötigt wird. Für die Ausbildung von Fas-Clustern, die durch membranständigen FasL induziert werden, sind diese beiden Voraussetzungen nicht notwendig.⁴⁸

1.4 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es, Fusionsproteine der membranständigen Formen von CD40L und FasL zu entwickeln, die sowohl Koimmunopräzipitationen als auch mikroskopische Untersuchungen zulassen. Die damit zur Verfügung gestellten Moleküle sollen die Möglichkeit bieten, in weiterführenden Experimenten die Rezeptorsignalkomplexbildung der „natürlichen Formen“ dieser beiden Liganden genauer zu untersuchen. Für einzelne Liganden der TNF-Familie (TRAIL, TNF) konnten bereits Unterschiede bei der Rezeptoraktivierung durch die lösliche und die membranständige Form gezeigt werden. Bisher wurde auf dem Gebiet der Rezeptorsignalkomplex-Forschung für FasL und CD40L überwiegend mit den löslichen Varianten dieser Liganden gearbeitet. Diese benötigen zur Rezeptoraktivierung allerdings eine artifizielle Quervernetzung durch Antikörper oder müssen als rekombinante Multimere in höhergradig aggregierter Form vorliegen.

Diese Voraussetzungen sind für die natürliche membranständige Form des Liganden entbehrlich, weshalb eine Entwicklung entsprechender Fusionsproteine einen Fortschritt auf diesem Gebiet verspricht.

2. Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose L.M.P.	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose MEE0 Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma, Deisenhofen
CIAP	Fermentas, St. Leon-Rot
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DNA-Probenpuffer (6 x Loading Dye Solution)	Fermentas, St. Leon-Rot
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL-Western-Blotting-Detection-Reagenz	Amersham, Braunschweig
Ethidiumbromid (500ug/ml)	Sigma, Deisenhofen
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Penzberg
FCS	PAA Lab- GMBH, Linz, Österreich
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glutathion-Sepharose 4b	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Lipofektamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran	Amersham, Braunschweig
NucleoBond PC 100 (Plasmid DNA-Purification)	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin Extract II (PCR clean-up Gel extract)	MACHEREY-NAGEL, Düren
NEBuffer 2 und 3	NEB, Frankfurt a. M., Germany
Oligonucleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	PAA Lab- GMBH, Linz, Österreich
Prestained Protein Marker	NEB, Frankfurt a. M., Germany
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
RPMI 1640	PAA Lab GMBH, Linz, Österreich
sTNF	Knoll AG, Ludwigshafen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Lab- GMBH, Linz, Österreich
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2 Restriktionsenzyme

*Bam*H1, *Bgl*2, *Bsp*E1, *Eco*R1, *Hind*3, *Xba*1

NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

2.3 Antikörper und Antiseren

Anti-A20, Maus monoklonal

MIM, Würzburg

Anti-CD40, Maus monoklonal

BD, Heidelberg

Anti-CD40L, Maus monoklonal

BD, Heidelberg

Anti-cIAP1, Maus monoklonal

BD, Heidelberg

Anti-cIAP2, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-FasL-PE, monoklonal

R&D Systems, Wiesbaden

Anti-Flag (M2), Maus monoklonal

Sigma, Deisenhofen

Anti-GST, Kaninchen polyklonal

BD, Heidelberg

Anti-IgG1-PE, monoklonal

R&D Systems, Wiesbaden

Anti-Kaninchen-Ig, ECL-System

Dako-Cytomation, Glostrup,
Dänemark

Anti-Maus-Ig, ECL-System

Dako-Cytomation, Glostrup,
Dänemark

Anti-Maus-PE

Alexis, Grünberg

Anti-TNF (Meager)

MIM, Würzburg

Anti-TNFR1, Maus monoklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TNFR2, Maus monoklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF1, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF2, Maus monoklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF2, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF3-H20, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF3-H248, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRAF5, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

2.4 Zelllinien

2.4.1 Prokaryontische Zellen

E.coli TOP10 (OneShot Competent E.coli)	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli SCS110 (Dam ⁻ /Dcm ⁻ - Competent E.coli)	Stratagene, Amsterdam

2.4.2 Eukaryontische Zellen

293 (humane embryonale Nierenzellen)	ATCC, Rockwill, MD, USA
Hela (humane Cervixkarzinomzellen)	ATCC, Rockwill, MD, USA
HT1080 (humane Fibrosarkomzellen)	ATCC, Rockwill, MD, USA
HT1080-CD40 (Transfektante)	MIM, Würzburg, Deutschland
HT1080-TNFR2 (Transfektante)	MIM, Würzburg, Deutschland
NCTC (murine Zellen)	ATCC, Rockwill, MD, USA
SV80 (humane Fibroblasten)	MIM, Würzburg, Deutschland
SV80-CD40 (Transfektante)	MIM, Würzburg, Deutschland

2.5 Expressionsplasmide

YFP:	pEYFP-N1
CD40/CD40L:	
YFP-CD40L	CD40L-pEYFP-N1
CD40-CFP	CD40-pECFP-N1
GST-Flag-YFP-CD40L	GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3
Fas/FasL:	
YFP-FasL	FasL-pEYFP-N1
Fas-CFP	Fas-pECFP-N1
GST-Flag-YFP-FasL	GST-Flag-YFP-FasL-pCR3
TNF:	
GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNF	GST-Flag-YFP-TNF Δ 1-12pCR3
GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNF143N/145R	GST-Flag-YFP-TNF Δ 1-12pCR3 143N/145R

2.6 Primer

GFP-F-EcoR1-Not1, GFP-C1-R1393-Xho1	MWG-Biotech AG, Ebersberg
-------------------------------------	---------------------------

2.7 Lösungen und Puffer

Blockpuffer	5 % Magermilchpulver (w/v) in Wasser
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
Coating Buffer	100 mM Carbonat, pH 9,5
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,004 M SDS, pH 8,3
PBA	1 x PBS, 0,025 % BSA
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	20 mM Na-Phosphat, 0,7 % NaCl, pH 7,2
PBS-F	1 x PBS, 10% FCS (v/v)
PBS-T	1 x PBS, 0,05 % Tween-20
PBS-T-F-A	1 x PBS, 0,5% FCS (v/v), 0,1% Acid
Probenpuffer (SDS-PAGE, 2fach)	0,02 M Tris, 0,0002 M EDTA, 0,07 M SDS, 0,04 M DTT, 2,2 M Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8
Puffer zur Zelllyse	10 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7,9
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 6,8
TrisBaseAcetatEDTA (TAE)	1 x TAE: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,3
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 8,8

3. Methoden

3.1 Arbeitstechniken zur Herstellung von Expressionsvektoren

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der YFP-CD40L-cDNA aus dem Vektor pEYFP-CD40L-C1 wurden die Primer GFP-EcoR1-Not1 und GFP-C1-R1393-Xho1 zusammen mit dem Expand High Fidelity PCR-System (Roche) verwendet. Die benötigten Oligonucleotide wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Zunächst wurden die lyophilisierten Primer entsprechend den Herstellerangaben mit ddH₂O auf die angegebene Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt. Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und im Anschluss bei 6000 U/min zentrifugiert. Nun wurde die PCR-Reaktion im Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research, Watertown, Massachusetts USA) durchgeführt. Ausgehend von der Anfangsdenaturierung bei 94 °C für 3 min folgten 30 Zyklen mit einer Denaturierung für 20 s bei 94 °C, dem Annealing für 45 s bei 52 °C und der Elongation für 1 min bei 72 °C. Die Größe der Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.1.2 Darstellung und Reinigung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte mit 1 % Agarosegelen in 1 x TAE mit 4 µg/ml Ethidiumbromid in horizontalen Flachgelapparaturen (PeqLab, Model 40-0708 Class II, Erlangen) in 1 x TAE als Laufpuffer bei 10 V/cm Gellänge (Power Pack 300, BioRAD, Erlangen). Für Analysezwecke wurde einfache Agarose (MEEO Ultra-Qualität, Roth), für die Gewinnung verdauter DNA zur Ligation Agarose des Typs Low Melting Point (L.M.P.- Agarose, Invitrogen) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer (6 x Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Zum Längenvergleich wurde der DNA-Marker, Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas St. Leon-Rot), mit aufgetragen. Die Agarosegele wurden mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000 (BioRAD, Erlangen) dokumentiert. Zur Weiterverwendung aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel mit einem Skalpell herausgeschnitten und direkt im Anschluss aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (MACHERY-NAGEL, Düren). Die Elution erfolgte mit 25-50 µl des mitgelieferten Elutionspuffers NE.

3.1.3 Restriktion und Ligation von DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*H1, *Bgl*2, *Bsp*E1, *Eco*R1, *Hind*3 und *Xba*1 und den zugehörigen Puffern (NEB, Frankfurt a. M.) durchgeführt. Bei Vektorverdauen wurden in einem 50 µl Ansatz volumenanteilig 74 % ddH₂O, 10 % Puffer, 10 % Restriktionsenzyme und 1 - 5 µg Vektor (6%) verwendet. Beim Verdau von PCR-Produkten setzte sich der 50 µl Ansatz volumenanteilig aus 80 % gereinigtem PCR-Produkt, 10 % Puffer und 10 % Restriktionsenzymen zusammen. Die Restriktionsansätze wurden für 4 h in einem 37 °C Wasserbad inkubiert und danach die Reaktion bei 4 °C auf Eis beendet. Bei Vektorverdauen erfolgte nach 3,5 h eine Zugabe von CIAP, um später bei der Ligationsreaktion eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Nach Aufreinigung wurde die verdaute DNA elektrophoretisch in einem LMA-Gel überprüft (siehe 3.1.2).

Die Ligationen verdauter DNA-Fragmente und -Vektoren wurden mit 2 U T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) und dem mitgelieferten Puffer (10 x Puffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) nach Anleitung in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor war dabei ca. 10:1. Die Inkubationsdauer betrug bei Raumtemperatur (RT) mindestens 4 h. Der Ligationsansatz wurde danach direkt für die Transformation verwendet.

3.1.4 Transformation in kompetente Zellen

3.1.4.1 Transformation in TOP10 E.coli (One Shot, Invitrogen)

Die Transformation erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

3.1.4.2 Transformation in Dam⁻ / Dcm⁻ - E. coli SCS110 (Stratagene)

Zur Vorbereitung wurde zunächst ein 14 ml-Rundboden-Falconröhrchen (BD) auf Eis vorgekühlt und SOC Medium auf 42 °C erhitzt. In das vorgekühlte Falconröhrchen wurden nun 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen aliquotiert und 1,7 µl des im Kit mitgelieferten β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 10 min auf Eis, wobei die Zellen alle 2 min leicht geschüttelt wurden.

Die zu transformierende DNA wurde in einer Konzentration zwischen 0,1-50 ng/ μ l zugegeben und für 30 min auf Eis mit den Zellen inkubiert. Der nachfolgende Hitzschock bei 42 °C wurde für 45 s im Wasserbad durchgeführt, die Zellen danach wieder für 2 Min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen nach Zugabe von 900 μ l SOC Medium für 1 h in einem 37 °C-Schüttler bei 225 U/min verwahrt. Von diesem Ansatz wurden je 200 μ l entnommen, auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden von diesen Platten Kolonien entnommen.

3.1.5 Plasmidpräparation

Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen, wurde eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Miniprep) durchgeführt. Dazu wurden aus einer Flüssigkultur transformierter Bakterien 1,5 ml entnommen und in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Zur Isolierung wurden Lösungen des Plasmid-DNA-Purification-Kits (NucleoBond PC 100 MACHEREY-NAGEL) verwendet.

Nach Abzentrifugieren für 2 min bei 14000 U/min wurde der Überstand verworfen und anschließend das Bakterienpellet mit 100 μ l von Puffer S1 versetzt und mit Pipettensog durchmischt. Dem Zufügen von 100 μ l Puffer S2 schloss sich eine Inkubation von 5 min an. Danach wurden 100 μ l auf 4 °C gekühlte Puffer S3 hinzugegeben und der gesamte Ansatz durch Vortexen vermischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 U/min wurde der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurde eine phenolische Chloroform-Extraktion durchgeführt. 90 μ l eines 1:1 Phenol-Chloroform-Gemisches wurden in jedes Eppendorf-Gefäß hinzugegeben. Durch Mischung mittels Vortex konnten die Verunreinigungen in die Phenolphase und Interphase überführt werden. Nach Abzentrifugieren für 2 min bei 14000 U/min wurde der Überstand ohne sichtbare Kontamination durch die Phenolphase in neue Eppendorf-Gefäße überführt und diesen 500 μ l Isopropanol zur Präzipitation der DNA hinzugefügt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 U/min. An die Entfernung der 500 μ l Isopropanol schloss sich nun die Reinigung der DNA-Pellets mit 500 μ l 70 %igem Ethanol an. Danach wurde erneut bei 14000 U/min abzentrifugiert und die Pellets getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 24 μ l ddH₂O gelöst.

Die Plasmidpräparation von größeren Plasmidmengen für den Einsatz in transienten Transfektionen wurde mit dem Plasmid-DNA-Purification-Kit (NucleoBond PC 100 MACHEREY-NAGEL) durchgeführt.

Es erfolgte zunächst die Anzucht einer Kolonie in 100 ml LB-Medium, das je nach Resistenz des Plasmids Ampicillin- oder Kanamycin-haltig war, bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator. Im Anschluss wurde das Bakterienpellet durch 15 min Zentrifugation bei 6000 U/min und 4 °C in einer Kühlzentrifuge gewonnen. Das Pellet wurde in 4 ml RNase-haltigem Puffer S1 zur Zelllyse resuspendiert und nachfolgend mit 4 ml Puffer S2 versetzt, um im alkalischen Milieu zunächst die gesamte zelluläre DNA zu denaturieren. Dieser Ansatz wurde einige Male invertiert und ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation des basischen PH-Wertes der Lösung, zur Fällung der enthaltenen Proteine sowie der genomischen DNA und zur Überführung der Plasmid-DNA in seine natürliche Form, schloss sich eine Zugabe von Kaliumacetat-haltigem Puffer S3 (4 °C) an. Erneut wurde invertiert, für 5 min bei 4 °C auf Eis inkubiert und abschließend für 25 min bei 12000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die im Kit mitgelieferten Säulen mit 2,5 ml Puffer N2 equilibriert, um danach die Suspension durch Filterpapier hindurch auftragen zu können. Die in den Säulen an Anionenaustauschharze gebundene Plasmid-DNA wurde danach mit 10 ml Puffer N3 gewaschen und anschließend mit 5 ml Puffer N5 in neue Zentrifugationsröhrchen eluiert. Die nachfolgende Präzipitation der DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol erreicht und ein Pellet durch Zentrifugation bei 15000 U/min und 4 °C gewonnen. Nach Verwerfen des Isopropanols wurde das Waschen mit 70 %igem Ethanol in Eppendorf-Gefäßen von 2 ml Fassungsvermögen vollzogen. Danach erfolgte für 10 min bei 14000 U/min und RT ein erneutes Abzentrifugieren. Nach Verwerfen des Ethanolüberstands wurde das DNA-Pellet bei RT für 5-10 min getrocknet und danach in ddH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit dem Gene Quant Pro (Amersham Biotec, Schweden) durchgeführt. Zudem wurde die DNA-Integrität in einem Agarosegel überprüft.

3.2 Arbeitsmethoden im Rahmen der Zellkultur

3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Sämtliche verwendete Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) kultiviert. Für die GST-pull-down-Assays wurde den 293-Zellen nach Elektroporation Penicillin/Streptomycin zur Kultur zugesetzt. Adhärente Zellen wurden durch Inkubation bei 37 °C mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) für 5 min (10 min für Hela-Zellen) abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer.

3.2.2 Einfrieren bei -80 °C und Wiederauftauen von Zellen

Um über längere Zeiträume genügend Zellen der verwendeten Zelllinien vorrätig zu haben, wurden regelmäßig aliquotierte Zellen bei -80 °C eingefroren. Hierfür wurde das durch Zentrifugation gewonnene Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und jeweils 1-2 ml davon in Cryo-Röhrchen (Greiner Labortechnik) pipettiert. Die Röhrchen wurden ohne Verzögerung in eine Einfrierbox überführt und in einen -80 °C-Eisschrank gebracht. Zum Auftauen wurden die Röhrchen kurz im 37 °C Wasserbad unter sterilen Bedingungen erwärmt. Anschließend erfolgte die Überführung in 50 ml fassende Falconröhrchen und die Versorgung mit frischem RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS unter der Sterilbank. Nach Abzentrifugieren und Erneuern des Mediums wurden die Zellen in Zellkulturflaschen zur Expansion überführt.

3.2.3 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

3.2.3.1 Elektroporation für Interleukin-8-ELISAs

Für Interleukin-8-ELISAs wurden jeweils 50×10^6 293-Zellen zusammen mit der entsprechenden Plasmid-DNA in Elektroporationsküvetten (PeqLab, Erlangen) mit dem Elektroporator (Easyjet plus Equibio, PeqLab, Erlangen) elektroporiert (250 V, 1800 F). Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und erneut elektroporiert.

Nach jeder Elektroporation erfolgte die Aussaat der Zellen in je zwei Gewebekulturplatten (Ø 15 cm) pro Elektroporationsgruppe (zusätzlich in eine 6-Well-Zellkulturplatte zur Kontrolle der Transfektionseffizienz im FACS). Pro Elektroporationsvorgang wurden jeweils 80 µg DNA eingesetzt.

3.2.3.2 Elektroporation für GST-pull-down-Assays

Die Durchführung der Transfektion für die GST-pull-down-Assays erfolgte wie bereits unter 3.2.3.1 beschrieben. Es wurden lediglich unterschiedliche Mengen an DNA für das CD40-Konstrukt und andere Kontrollplasmide verwendet. Bei der Transfektion des GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 Plasmids wurden 80 µg DNA je Elektroporation eingesetzt (38-80 % positiv im FACS). Für die Transfektion der Kontrollgruppen wurden 80 µg DNA je Elektroporation des TNF-Rezeptor2-spezifischen GST-Flag-YFP-Δ1-12TNF-Mutein-Plasmides eingesetzt (38-80 % positiv im FACS). Bei Kombination mit pEYFP-mCD40L-N1 wurden hiervon 20 µg und 60 µg des TNFR2-Muteins pro Elektroporation verwendet. Am Tag nach der zweiten Elektroporation wurden die Zellen für die Experimente geerntet.

3.2.4 Transiente Transfektion mittels Lipofektamine 2000

Zur Transfektion von 293- und NCTC-Zellen für funktionelle Assays wurde auch Lipofektamine 2000 verwendet. Die Transfektion erfolgt hier durch einen Liposomenvermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende DNA wird dabei von polykationischen Lipiden komplexiert und durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endozytose in die eukaryontische Zelle aufgenommen. Durchgeführt wurden diese Transfektionen je nach benötigter Zellzahl im 96-Well, 24-Well und 6-Well-Format entsprechend den Angaben des Herstellers. Für Kokulturversuche wurden die Zellen am zweiten Tag nach Transfektion geerntet.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Fluoreszierende Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung stammen oder durch die Expression eines fluoreszierenden Proteins erreicht werden, dessen DNA vorher durch Transfektion in die Zelle eingeführt wurde. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) angeregt und emittieren anschließend Licht einer charakteristischen Wellenlänge.

Das FACS-Gerät (BD-Calibur, BD, Heidelberg) detektiert dabei die Wellenlänge entsprechend entweder auf dem Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H) für YFP und GFP oder dem Fluoreszenzkanal 2 (FL2-H) für Phycoerythrin. Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell-Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.2.5.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz

YFP-exprimierende Zellen wurden in einer Konzentration von ca. 1×10^6 /ml in PBS aufgenommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie im FL1-H analysiert.

3.2.5.2 Antikörperfärbungen zur FACS-Analyse von 293-Zellen

Zur Gegenfärbung der mit den GST-Konstrukten für FasL und CD40L transfizierten NCTCs wurden entweder direkt mit PE-markierte Antikörper oder unmarkierte Antikörper gegen den betreffenden Liganden verwendet. Die Unmarkierten wurden anschließend noch mit einem PE-markierten Zweitantikörper inkubiert. Es wurden pro Ansatz 300.000 aliquotierte Zellen abzentrifugiert. Diese wurden zwei bis drei Mal in jeweils 1 ml PBS gewaschen und schließlich in 100 μ l PBS für 1 h auf Eis mit 5 μ g/ml Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut drei Mal in 1 ml PBS gewaschen und in 400 μ l PBS zur FACS-Analyse resuspendiert. Bei benötigtem Zweitantikörper wurde nach dem letzten Waschen in PBS eine Inkubation für 45 min mit 1 μ g/ml des Antikörpers auf Eis vorgenommen. Danach erfolgte erneut drei Mal Waschen in 1 ml PBS und Resuspension in 400 μ l PBS.

3.2.6 Messung der Interleukin-8-Induktion im ELISA

3.2.6.1 Kokultur

Zur Kokultur wurden $2-3 \times 10^4$ Zielzellen sowie 3×10^4 transfizierte Effektorzellen pro Well in 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät. 6 h nach Beginn der Kokultur wurde der Überstand zur Messung im IL-8-ELISA abgenommen, in eine neue 96-Well-Flachbodenplatte überführt und bis zur Analyse am nächsten Tag bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. In Kokulturen, bei denen mit FasL-transfizierte Effektorzellen verwendet wurden, wurde N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-keton (z-VAD-fmk) in Konzentration von 10nM zugesetzt, um die Induktion von Apoptose in den Rezeptorzellen zu verhindern.

Alle Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS unter Standardbedingungen im Inkubatorschrank kultiviert. Als Zielzellen dienten HT1080-Zellen (humane Fibrosarkomzellen) vom Wildtyp, die Fas- und TNF-Rezeptoren exprimieren, sowie die stabilen Transfektanten HT1080-CD40 und HT1080-TNFR2, die zusätzlich CD40 oder entsprechend TNFR-2 bilden. 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) wurden als Effektorzellen verwendet (Transfektion durch Elektroporation, siehe 3.2.3.1).

3.2.6.2 Detektion

Am Vortag der Durchführung des IL-8-ELISA wurde die benötigte Anzahl von ELISA-Platten mit 50 µl/Well einer IL-8-Antikörperlösung (α -IL8 1:250 in Coating-Puffer) versehen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Mal Waschen der Platten mit 200 µl PBS-T/Well wurden die Platten für 1 h mit 200 µl PBS-F/Well geblockt. Die Proben, drei Standardkonzentrationen IL-8 (0,2 ng, 0,1 ng, 0,05 ng) sowie Medium mit 10 % FCS wurden nach erneutem Waschen (drei Mal) für 2 h aufgetragen. Nach fünf Mal Waschen wurden die Platten für 1 h mit 50 µl/Well einer Lösung aus biotinyliertem IL-8-Antikörper und Streptavidin-HRP (jeweils 1:250 in PBS-F) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut sieben Mal gewaschen und 100 µl/Well an Substrat (1 mg/ml 2,2-Azino-di-3-ethylenbenzthiaolinsulfonsäure in ABTS-Puffer) dazugegeben. Die Messung erfolgte nach kurzer Inkubationszeit vor Eintritt der Sättigung der eintretenden Farbreaktion im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) bei 405 nm. Sämtliche Antikörper sowie Streptavidin-HRP und rekombinantes IL-8 wurden dem OptEIA humanIL-8-ELISA-Kit (Pharmingen, San Diego, USA) entnommen.

3.2.7 Western-Blot

3.2.7.1 SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Herstellung des Trenngels wurde eine Trenngellösung verwendet (10 %, 12 % oder 13,5 % Polyacrylamid in 374 mM Tris, 3,75 mM SDS, pH 8,8), deren Polymerisation durch die Zugabe von APS und TEMED (Endkonzentration je 0,1 %) gestartet wurde. Zur Glättung der Oberfläche erfolgte für die Zeit der Polymerisation des Trenngels eine Überschichtung mit Isopropanol (70 %).

Nach der Polymerisation wurde der Isopropanol abgegossen und das verbliebene Trenngel mit Sammelgel (6 % Polyacrylamid in 123 mM Tris, 3,75 mM SDS pH 6,8, APS 0,1 % (v/v), TEMED 0,1 % (v/v)) überschichtet und der Kamm vor Auspolymerisation eingesetzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Als Proteinmarker wurde Prestained Protein Marker (NEB) verwendet.

3.2.7.2 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer horizontalen Blotkammer (PeqLab). Die Membran wurde in Blotpuffer getränkt und gemeinsam mit dem Gel folgendermaßen in die Blotkammer gelegt:

Anode/ Whatman-Papier/Nitrocellulose-Membran/ Gel/ Whatman-Papier/ Kathode.

Das Blotting erfolgte je nach Proteingröße für 1,5-2 h bei RT und einer Stromstärke von 1,5 mA je cm² Gelfläche.

3.2.7.3 Immunofärbung von Westernblots

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1,5-2 h bei RT in Blockpuffer geschwenkt. Nach drei Mal kurzem Waschen in PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS-T über Nacht bei 4 °C oder 1,5-2 h bei RT. Nach erneutem Waschen für jeweils 15 min und drei Mal wurde die Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in PBS-T für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut für 1,5 h in regelmäßig gewechseltem PBS-T gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.

3.2.7.4 Peroxidasenachweis mittels ECL

Die gebundenen Antikörper-Peroxidase-Konjugate wurden in der Dunkelkammer mit dem ECL-System nachgewiesen. Bei der durch das Enzym Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt, welches einen Röntgenfilm belichtet. Die mitgelieferten Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1 min in dem Gemisch inkubiert. Anschließend erfolgten unterschiedlich lange Belichtungen (1-30 min) eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham) in einer lichtdichten Kassette.

3.2.8 GST-Fishing von Rezeptorsignalkomplexen

3.2.8.1 Vorstimulation der Rezeptorzellen mit sTNF

Für den in dieser Arbeit in Abbildung 10 gezeigten GST-pull-down-Assay wurden als Rezeptorzellen nur SV80-CD40-Zellen verwendet. Ein Teil davon wurde für 7 h mit löslichem TNF (sTNF) in einer Konzentration von 20 ng/ml in 1640 RPMI mit 10 % FCS zur Vorstimulation inkubiert.

3.2.8.2 Kokultur und Herstellung der Gesamtzellysate für GST-Fishing

Die Rezeptorkomplexe wurden mittels GST-Fishing isoliert.

Dabei bindet die im Konstrukt vorhandene Glutathion-S-Transferase-Domäne an Glutathion-Sepharose-Beads, so dass die Liganden und ihr gebundener Rezeptor zusammen mit weiteren assoziierten Proteinen als Signalkomplex aus dem Zellysate in den Beads angereichert und durch Zentrifugation gewonnen werden können.

Die mit den Konstrukten GST-Flag-YFP-CD40L und GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNFR2-Mutein/YFP-CD40L transfizierten 293 Zellen (15×10^6) wurden für definierte Zeiträume mit den zu stimulierenden Zielzellen (30×10^6 adhärenente SV80- oder SV80-CD40-Zellen) bei hoher Zelldichte (45×10^6 /ml) in vorgewärmtem Medium kokultiviert. Die ersten 2 min der Kokultur erfolgten im 37 °C-Wasserbad im 15 ml-Falconröhrchen. Anschließend wurden die Zellen in Gewebekulturschalen (\varnothing 3 cm) überführt und im Inkubator unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit Lysispuffer (Puffer für Zellyse, 1 % NP40, Proteaseinhibitor) in 1,6 ml für 25 min auf Eis bei 4 °C lysiert. Der Überstand wurde bei 13×10^3 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden 1,4 ml des Überstandes für das GST-Fishing verwendet und der Rest bei -20 °C aufbewahrt. Für den Zeitpunkt 0 min erfolgte eine getrennte Lyse der Effektor- (transfizierte 293-Zellen) und der Zielzellen (SV80-Zelltypen) in je 0,8 ml Lysispuffer. Nach Abzentrifugation wurden je 0,7 ml der Zellysate vermischt und in diesem Fall jeweils 0,1 ml Restlysat getrennt im bei -20 °C verwahrt.

3.2.8.3 GST-Fishing der Signalkomplexe

Der Überstand für GST-Fishing wurde mit 250 µl Glutathion-Sepharose-Beads bei 4 °C über Nacht auf einer Rollapparatur inkubiert. Die Beads wurden durch Kurzzentrifugation (10 s, 1×10^4 U/min) zurückgewonnen und anschließend zwei Mal mit Waschpuffer (Puffer für Zelllyse mit 0,2 % NP40), sowie zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach der letzten Kurzzentrifugation wurden die Beads 5 min bei 94 °C mit Probepuffer aufgeköcht und bei -20 °C eingefroren oder direkt im Westernblot analysiert. Alle Schritte erfolgten auf Eis, zentrifugiert wurde bei 4 °C.

3.2.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

3.2.9.1 Transfektion, Kokultur und Fixierung der Zellen

Als Rezeptorzellen wurden Wildtyp-Hela-Zellen verwendet und mit CD40-pECFP-N1 beziehungsweise Fas-pECFP-N1 mittels Elektroporation transfiziert. Als Ligandzellen wurden entweder 293-Zellen oder Hela-Zellen vom Wildtyp verwendet. Diese wurden entweder mit CD40L-pEYFP-N1 beziehungsweise mit FasL-pEYFP-N1 oder mit den GST-Konstrukten von FasL beziehungsweise CD40L durch Elektroporation transfiziert. Für 3-5 Millionen Zellen wurden jeweils 10-16 µg DNA eingesetzt. In einer quadratischen Zellkulturplatte (Sterilin, UK), die in 25 Kammern unterteilt ist, wurden deren innere neun Unterteilungen mit abgeflamten 18 mm-Deckgläschen ausgelegt. In diesen neun Kammern erfolgte die Zellaussaat. Sowohl die Rezeptorzellen mit den CFP-Konstrukten als auch die Ligandzellen mit den YFP-Konstrukten wurden einzeln oder als Kokultur ausgesät. Alle Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin unter Standardbedingungen im Inkubatorschrank für 45 min gehalten. Pro Gruppe wurden für jede Zellart ca. 250.000 Zellen eingesetzt. Bei den FasL-Konstrukten wurde z-VAD-fmk in einer Verdünnung von 10 nM zugesetzt. Einen Tag nach Zellaussaat wurde eine der mit CD40-pECFP-N1 transfizierten Gruppen, die nicht kokultiviert wurden, mit M2-vorvernetztem Flag-markiertem löslichem CD40L (Flag-sCD40L) inkubiert. Die Vorinkubation von M2 und Flag-sCD40L erfolgte für 10 min bei RT, die Inkubation der Zellen mit vernetztem Flag-sCD40L für 45 min im Inkubatorschrank unter Standardbedingungen. Es wurde M2 in einer Konzentration von 1 µg/ml und Flag-sCD40L in einer Konzentration von 400 ng/ml verwendet.

Abschließend wurden die Deckgläschen mit den adhärenierten Zellen aus der Zellkulturplatte entnommen und einer Fixierung für ca. 10 min mit 3 % Paraformaldehyd in PBS unterzogen. Nach kurzem Waschen in ddH₂O erfolgte die Einbettung in 20 µl Fluoromount G auf einem Objektträger, um die kokultivierten Zellen dauerhaft für die Mikroskopie stabil zu machen.

3.2.9.2 Mikroskopische Analyse der Rezeptor-Ligand-Interaktion

Für die mikroskopische Betrachtung der Zellen wurde ein invertiertes konfokales Fluoreszenzmikroskop DM IRBE (Leica) mit einem 63-fachen Objektiv verwendet. Zur Auswertung diente die Software TCS SL (Leica, Version 2.5.1227).

Zur Betrachtung der Zellen, welche das CFP-Konstrukt exprimieren, wurde eine Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 456 nm und eine Messung im Spektrum von 470 nm bis 500 nm vorgenommen.

Für Zellen, die das YFP-Konstrukt exprimierten, wurden zur Darstellung bei 514 nm Wellenlänge angeregt und im Bereich von 600 nm bis 700 nm gemessen.

Für beide Kanäle konnte festgestellt werden, dass die anhand des fluoreszierenden Proteins kanalspezifisch zugeordneten Zellen nur in eben diesem Kanal, nicht aber im anderen, sichtbar sind. Als Kriterium für die Nachbarschaft zweier Zellen wurde definiert, dass der Abstand zwischen ihnen nicht mehr als einen Kerndurchmesser (ca. 2 µm) betragen dürfe.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung der Fusionsproteine GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 und GST-Flag-YFP-FasL-pCR3

4.1.1 Zielsetzung der Klonierung

Mit dem Ziel FasL und CD40L hinsichtlich ihrer Funktion als membranständige Liganden ausführlich biochemisch untersuchen zu können, sollten zu Beginn in der Arbeit Expressionsvektoren für diese Proteine hergestellt werden. Um biochemische Arbeiten zu erleichtern, wurde der jeweilige Ligand mit diversen Domänen kombiniert. So sollten die Fusionsproteine später eine Glutathion-S-Transferase-Domäne (GST) enthalten, die für Pull-down-Assays zur Untersuchung von Signalkomplexen genutzt werden kann, ein Flag-Epitop (Flag), um die Detektion des Proteins in Westernblots zu erleichtern und, um durch FACS die Transfektionseffizienz der Expressionsvektoren prüfen zu können, sollte außerdem ein Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) als Domäne enthalten sein.

4.1.2 Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3

Für die Erstellung des Konstrukts GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 wurden die aus dem Labor zur Verfügung gestellten und schon charakterisierten Plasmide GST-Flag-FasL-pCR3 und pEYFP-CD40L-C1 genutzt. Aus dem Plasmid pEYFP-CD40L-C1 wurde durch PCR mit den Primern GFP-EcoR1-Not1 und GFP-C1-R1393-Xho1 das Fragment YFP-CD40L, welches eine Länge von ca. 1500 bp aufweist, gewonnen. Nachfolgend wurden der Vektor GST-Flag-FasL-pCR3 und das Fragment YFP-CD40L mit den Restriktionsenzymen *EcoR1* / *Xba1* verdaut. Dadurch wurde im Vektor GST-Flag-FasL-pCR3 der FasL entfernt (Abb. 1) und das PCR-Produkt für die Ligation vorbereitet. Nach Reinigung und Untersuchung des Vektorgerüsts GST-Flag-pCR3 und des PCR-Fragments YFP-CD40L in einem Agarosegel wurde die Ligation durchgeführt (Abb. 1). Abschließend erfolgte eine Transformation in kompetente *E. coli* und die Anzucht von Einzelklonen in Flüssigkulturen. Um positive Klone zu identifizieren, wurden DNA-Minipreps hergestellt, welche einem *BamH1* - Verdau unterzogen wurden, der als Ergebnis das Fragment YFP-CD40L (ca. 1500 bp) aus dem Vektor freisetzte.

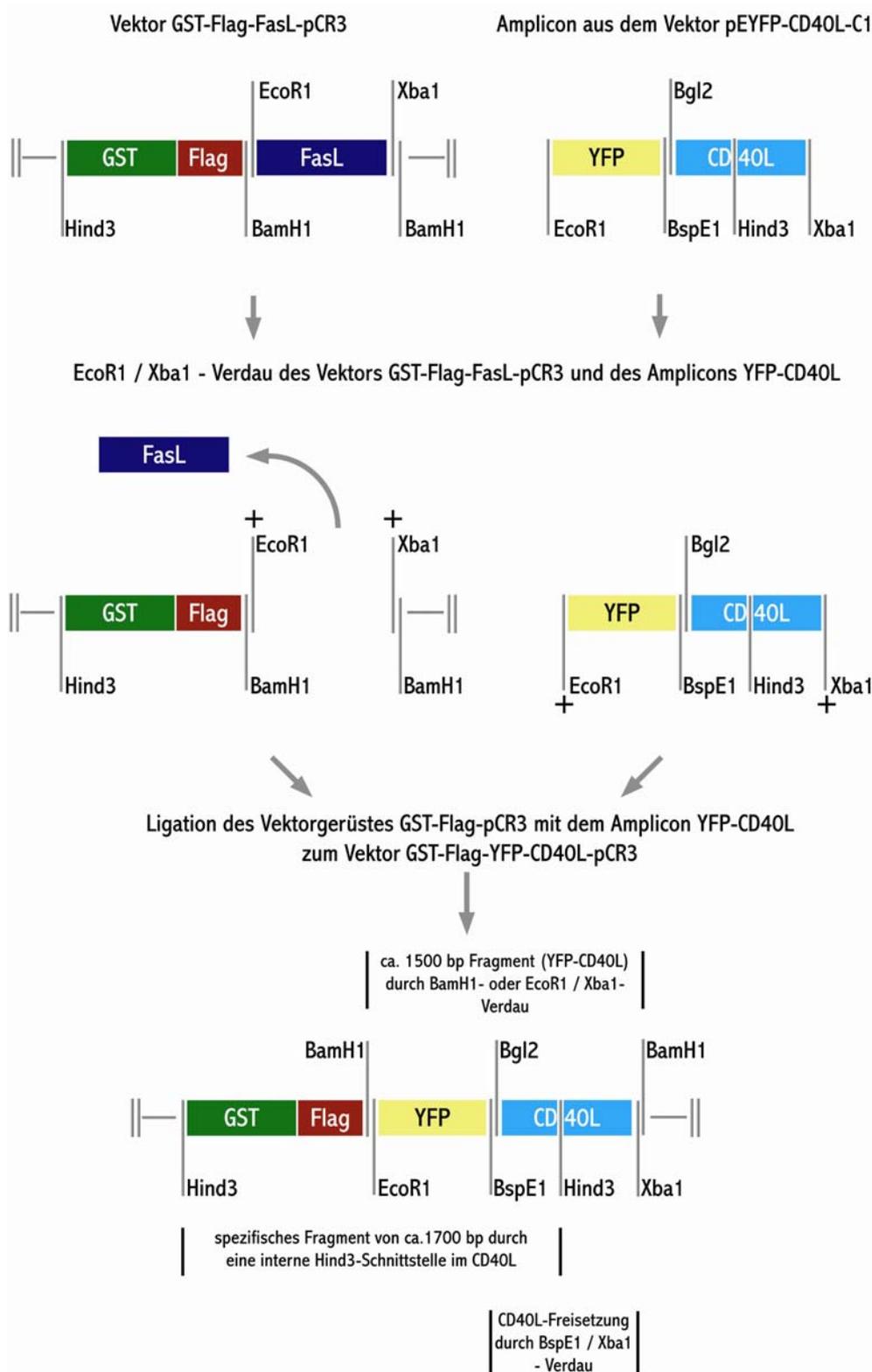
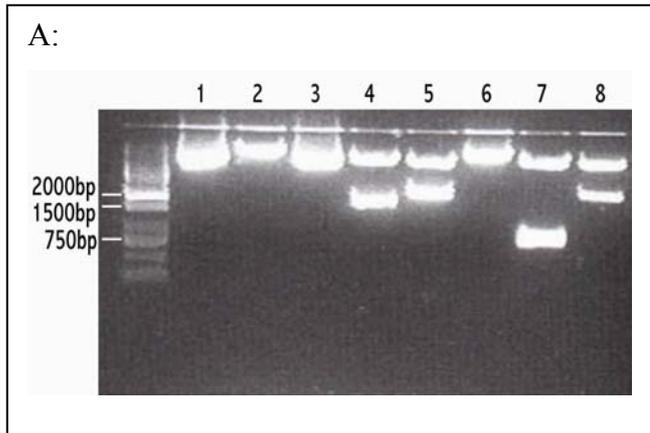


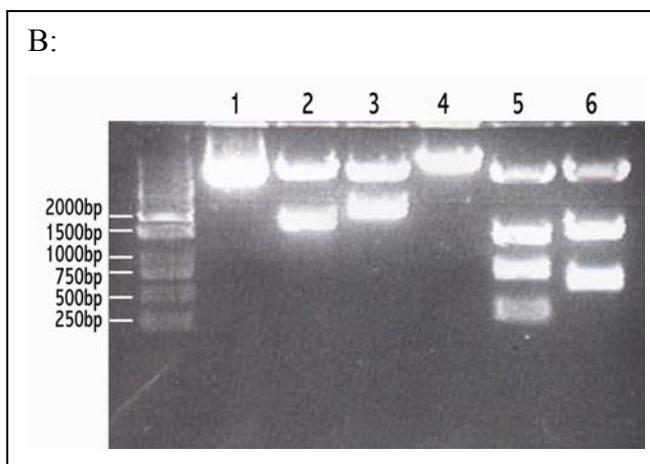
Abbildung 1: Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3

Durch den *EcoR1* / *Xba1* - Verdau wird der FasL aus dem Vektor GST-Flag-FasL-pCR3 entfernt und das PCR-Produkt YFP-CD40L für die Ligation vorbereitet. Die anschließende Ligation des Vektorgerüsts GST-Flag-pCR3 mit dem Amplicon führt zur Bildung des Expressionsvektor GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3, der anhand seiner im CD40L liegenden *Hind3* - Schnittstelle charakterisiert werden kann.

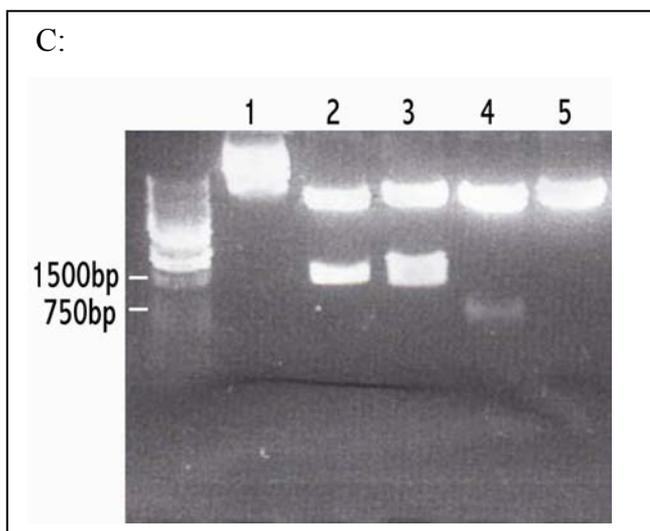
Um die korrekte Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 weiter zu verifizieren, wurden mehrere Restriktionsverdau durchgeföhrt. Hierbei ergab sich für den schon in der Klonierung verwendeten *EcoR1* - Verdau die erwartete Linearisierung. Die Verwendung von *Xba1* alleine führte jedoch zu keinem Verdau (Abb. 2A, Bahnen 2 und 3). Beim *BamH1* - Verdau trat das in Abbildung 1 dargestellte Fragment von 1500 bp auf, welches aus YFP und CD40L besteht. Das ca. 1700 bp große Fragment im *Hind3* - Verdau bestätigte eine im CD40L vorhandene interne *Hind3* - Schnittstelle. Aus dem Ursprungsvektor GST-Flag-FasL-pCR3 wurde eine weitere *Hind3* - Schnittstelle vor der GST-Domäne mitgebracht (Abb. 2A, Bahnen 4 und 5). Neben dem *Xba1* - Verdau zeigte auch der *EcoR1* / *Xba1* - Verdau nur eine Linearisierung (Abb. 2A, Bahn 6). Dies entspricht der Angabe der Firma Clontech, die für den bei der PCR verwendeten pEYFP-C1-Vektor eine Dam-Methylierung der *Xba1* - Schnittstelle angibt. Für die Klonierung von GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 ergab sich jedoch deshalb kein Problem mit einer methylierten *Xba1* - Schnittstelle, da das Fragment YFP-CD40L nicht durch Restriktionsverdau, sondern mittels PCR aus dem pEYFP-C1-Vektor gewonnen wurde und der Expressionsvektor GST-Flag-pCR3 keine methylierte *Xba1* - Schnittstelle aufwies. Die Methylierung erfolgte nach der Transformation in kompetente Bakterien und zeigte sich erst dann in den Verdau-Experimenten. Der *Hind3* / *Xba1* - Verdau führte daher zu einem analogen Ergebnis wie der *Hind3* - Verdau, einem 1700 bp-Fragment. Der *BamH1* / *BspE1* - Verdau ergab zwei Fragmente von je 750 bp. Es handelt sich hierbei um die durch eine *BspE1* - Schnittstelle getrennten Domänen für CD40L und YFP (Abb. 2A, Bahn 7). Ein *Bgl2* - Verdau des Vektors führte zu einer Linearisierung. Ursächlich dafür ist eine Schnittstelle der Multi-Cloning-Site (MCS) aus dem zur Klonierung verwendeten pEYFP-C1-Vektor, der sich nach Herstellerangaben hinter der *BspE1* - Schnittstelle befindet (Abb. 2B, Bahn 4). Durch einen *BamH1* / *Hind3* - Verdau wurden 3 Fragmente erzielt: Es handelt sich dabei um ein 1150 bp-Fragment bestehend aus YFP und einem Großteil des CD40L, um ein 550 bp-Fragment aus der GST-Domäne und dem Flag-Epitop, sowie ein 300 bp großes Fragment, welches einen Teil des CD40L darstellt (Abb. 2B, Bahn 5). Der Verdau mit *Bgl2* / *Hind3* erbrachte ein 1300 bp-Fragment bestehend aus den Domänen für GST, YFP und dem Flag-Epitop sowie ein 400 bp-Fragment, das dem CD40L entspricht (Abb. 2B, Bahn 6).



1. unverdaut: supercoiled DNA
2. *EcoR*1: Linearisierung
3. *Xba*1: supercoiled DNA
4. *Bam*H1: 1500 bp-Fragment
5. *Hind*3: 1700 bp-Fragment
6. *EcoR*1/*Xba*1: Linearisierung
7. *Bam*H1/*Bsp*E1: 750bp-Fragmente
8. *Hind*3/*Xba*1: 1700 bp-Fragment



1. unverdaut: supercoiled DNA
2. *Bam*H1: 1500 bp-Fragment
3. *Hind*3: 1700 bp-Fragment
4. *Bgl*2: Linearisierung
5. *Bam*H1/*Hind*3: 1150 bp-Fragment
550 bp-Fragment
350 bp-Fragment
6. *Bgl*2/*Hind*3: 1300 bp-Fragment
400 bp-Fragment



1. unverdaut: supercoiled DNA
2. *EcoR*1/*Xba*1: 1500 bp-Fragment
3. *Not*1/*Xba*1: 1600 bp-Fragment
4. *Bgl*2/*Xba*1: 750 bp-Fragment
5. *Xba*1: Linearisierung

Abbildung 2: Kontrollverdaue von GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3

A und B: Verdaue des Vektors bei methylierter *Xba*1 - Schnittstelle

Unter A zeigt der *Xba*1 - Verdau in Bahn 2 die supercoiled Form des Vektors. Der *EcoR*1 / *Xba*1 - Verdau setzt nicht das 1500 bp - Fragment YFP-CD40L frei. Es zeigt sich eine Linearisierung

C: Verdaue des Vektors nach der Transformation in *Dam*⁻ / *Dcm*⁻ - *E. coli*:

Der *Xba*1 - Verdau führt zur Linearisierung des Vektors (Bahn 5), der *EcoR*1 / *Xba*1 - Verdau setzt das 1500 bp - Fragment YFP-CD40L frei (Bahn 2).

4.1.3 Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-FasL-pCR3

Um die Dam-methylierte *Xba1* - Schnittstelle des Konstrukts GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 für die Umklonierung des Vektors in GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 nutzen zu können, wurde der Expressionsvektor GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 in Dam⁻/Dcm⁻- *E. coli* (SCS110) transformiert. Die Demethylierung der *Xba1* - Schnittstelle wurde durch mehrere *Xba1* - Verdauungen des Vektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 überprüft. Ein alleiniger *Xba1* - Verdau ergab nun eine Linearisierung (Abb. 2C, Bahn 5). Die Kombination von *EcoR1* / *Xba1* erzeugte das erwartete 1500 bp-Fragment, bestehend aus YFP und CD40L (Abb. 2C, Bahn 2). Eine *Bgl2* / *Xba1* - Kombination schnitt CD40L aus dem Expressionsvektor als ein 750 bp-Fragment heraus (Abb. 2C, Bahn 4). Durch den nun möglichen *BspE1* / *Xba1* - Verdau konnte der CD40L aus dem Vektor GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 entfernt werden (Abb. 3).

Zur Bereitstellung des FasL für die Umklonierung in das GST-Flag-YFP-pCR3-Vektorgerüst wurde ein vorhandener und bereits charakterisierter pEYFP-FasL-C1-Vektor ebenfalls mit *BspE1* / *Xba1* verdaut. Zuvor war auch dieser Vektor in Dam⁻ / Dcm⁻ - *E. coli* überführt worden, um das Methylierungsproblem der *Xba1* - Schnittstelle zu umgehen. Nach Aufreinigung beider Fragmente im Agarosegel erfolgte die Ligation von FasL und GST-Flag-YFP-pCR3 zum Vektor GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 (Abb. 3). Der Transformation in kompetente *E. coli* und der Mini-Präparation zur Plasmidgewinnung folgte abschließend zur Erfolgskontrolle der Umklonierung ein *BamH1* - Verdau, der das Fragment YFP-FasL freisetzte (Abb. 4).

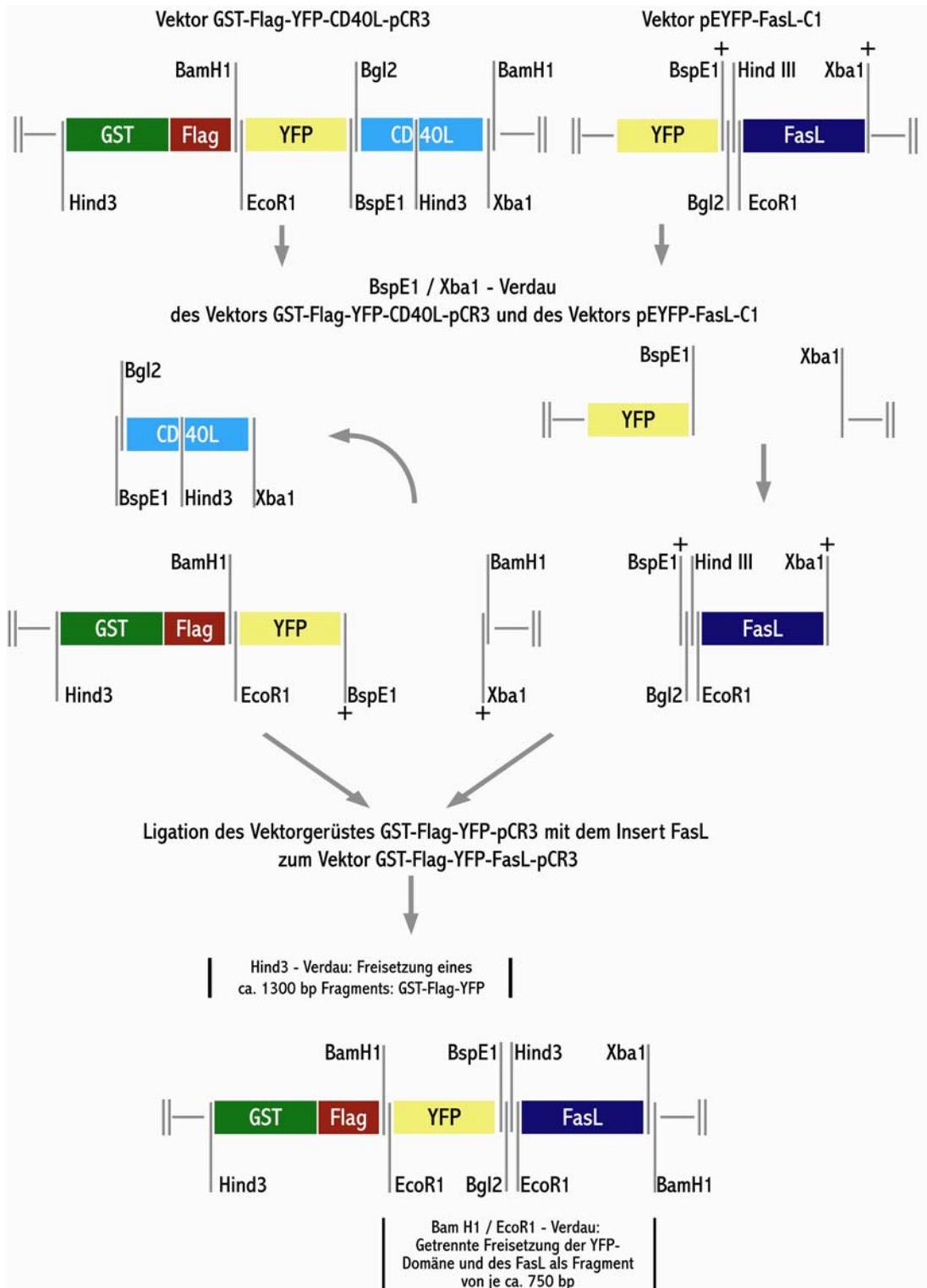
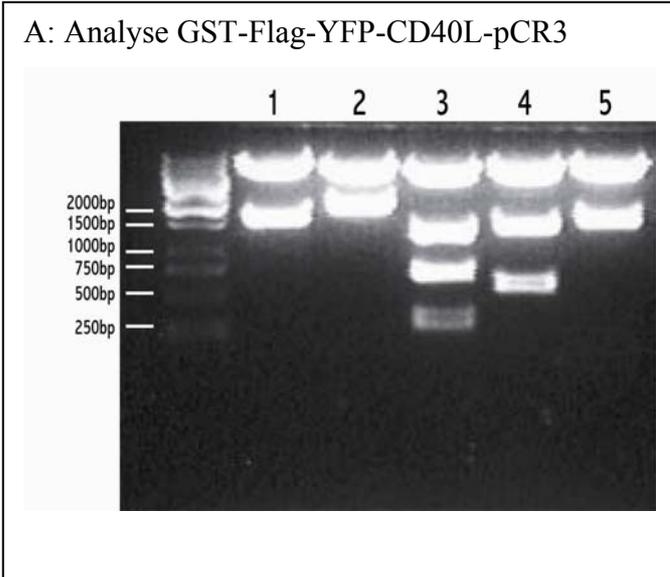


Abbildung 3: Klonierung des Expressionsvektors GST-Flag-YFP-FasL-pCR3

Zuerst wurde ein *BspE1* / *Xba1* - Verdau des Vektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 zur Entfernung des CD40L durchgeführt. Anschließend erfolgte die Ligation des Vektorfragments GST-Flag-YFP-pCR3 und des Fragments FasL, das aus einem C1-Vektorgerüst durch einen *BspE1* / *Xba1* - Verdau gewonnen wurde. Der neue Expressionsvektor weist keine interne *Hind3* - Schnittstelle auf. Aus der MCS des Vektors pEYFP-FasL-C1 wurden die neuen Restriktionsschnittstellen *Bgl2*, *Hind3* und *EcoR1* eingeführt.

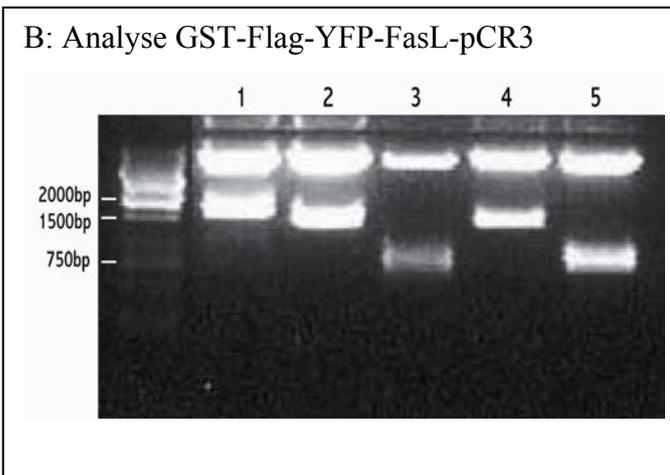
Zur genauen Charakterisierung des neuen Konstruktes wurden mehrere Restriktionsverdäue von GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 und GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 durchgeföhrt und gegenübergerstellt. Für die Erläuterungen zum Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 sei auf dessen Analyse unter 4.1.2 in dieser Arbeit verwiesen. Durch den *BspE1* / *Xba1* - Verdau des pEYFP-FasL-C1-Vektors wurden entsprechend der soweit bekannten Struktur des kommerziellen C1-Vektors (Clontech) aus dessen MCS mehrere Restriktionsschnittstellen in das Endkonstrukt GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 eingeföhrt. Die neuen Restriktionsschnittstellen folgen nach der *BspE1* - Schnittstelle in folgender Reihenfolge *Bgl2*, *Hind3*, *EcoR1*. Sie befinden sich zwischen der Domäne für YFP und der für FasL (Abb. 3). Da die FasL-cDNA keine interne *Hind3* - Schnittstelle aufweist, führte der *Hind3* - Verdau hier zu einem 1300 bp-Fragment. Durch die Lage der im Vergleich zum Vektor GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 neu eingebrachten *Hind3* - Schnittstelle in der MCS zwischen YFP und dem FasL ergab auch der *BamH1* / *Hind3* - Verdau ein zum CD40L-Expressionsvektor deutlich unterschiedliches Bild. Es entstanden hier zwei Fragmente von 750 bp Länge, die den voneinander getrennten Domänen für YFP und FasL entsprechen (Abb. 4B, Bahnen 2 und 3 in Vergleich zu Abb. 4A, Bahnen 2 und 3).

Im Gegensatz zum *Bgl2* / *Hind3* - Verdau des GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 findet sich für den FasL-Expressionsvektor nur ein 1300 bp-Fragment aus GST-Flag-YFP (Abb. 4B, Bahn 4). Durch die neu eingeföhrt *EcoR1* - Schnittstelle in der MCS zwischen YFP und FasL ergab der *BamH1* / *EcoR1* - Verdau eine getrennte Freisetzung von YFP und FasL als Fragmente von je ca. 750 bp (Abb. 4B, Bahn 5).



Neben dem linearisierten Vektor werden folgende Fragmente erzeugt:

1. *Bam*H1: 1500 bp-Fragment
2. *Hind*3: 1700 bp-Fragment
3. *Bam*H1/*Hind*3: 1150 bp-Fragment
550 bp-Fragment
300 bp-Fragment
4. *Bgl*2/*Hind*3: 1300 bp-Fragment
400 bp-Fragment
5. *Bam*H1/*Eco*R1: 1500bp-Fragment



1. *Bam*H1: 1500 bp-Fragment
2. *Hind*3: 1300 bp-Fragment
3. *Bam*H1/*Hind*3: 2x 750 bp-Fragment
4. *Bgl*2/*Hind*3: 1300 bp-Fragment
5. *Bam*H1/*Eco*R1: 2x 750-bp-Fragment

Abbildung 4: Gegenüberstellung von GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 und GST-Flag-YFP-FasL-pCR3

Der durch Umklonierung entstandene Expressionsvektor GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 weist keine interne *Hind*3 - Schnittstelle auf. Aus der MCS des C1-Vektors pEYFP-FasL-C1 werden die neuen Restriktionsschnittstellen *Bgl*2, *Hind*3 und *Eco*R1 eingeführt. Hierdurch ergeben sich erhebliche Unterschiede im Restriktionsverdau. Besonders deutlich wird dies in den Bahnen 2 und 3 unter A bzw. B. Der *Hind*3 - Verdau in Bahn 2A erzeugt aus dem Vektor GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 ein Fragment von 1700 bp, das aus GST-Flag-YFP und einem Teil des CD40L besteht. Im Vektor GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 wird hingegen nur GST-Flag-YFP als ca. 1300 bp großes Fragment freigesetzt (Bahn 2B). Der *Bam*H1 / *Hind*3 - Verdau des Vektors GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 in Bahn 3A erzielte drei Fragmente: Es handelt sich dabei um ein 1150 bp-Fragment bestehend aus YFP und einem Großteil des CD40L, um ein 550 bp-Fragment aus der GST-Domäne und dem Flag-Epitop sowie einem 300 bp großen Fragment, welches einen Teil des CD40L darstellt. Der gleiche Verdau führt in Bahn 3B beim Vektor GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 zur Bildung zweier getrennter 750 bp - Fragmente: Der YFP-Domäne und dem CD40-Liganden.

4.2 Charakterisierung der GST-Fusionsproteine des CD40L und FasL

4.2.1 Expressionsanalyse von GST-Flag-YFP-CD40L und GST-Flag-YFP-FasL durch Untersuchungen im FACS

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz enthalten die beiden Fusionsproteine eine YFP-Domäne, die in erfolgreich transfizierten Zellen im FACS als Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Allerdings belegt die Expression der YFP-Domäne nicht, dass auch der Ligand durch die Zelle korrekt auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde eine immunologische Färbung mit ligandenspezifischen PE-markierten Antikörpern durchgeführt. Als Referenz für die Eigenfluoreszenz der Zellen dienen untransfizierte NCTCs (Abb. 5A). Mit dem Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L transfizierte NCTCs zeigten bei 28 % der Zellen eine Fluoreszenz im Kanal FL1-H (Abb. 5B, Position 1). Die Färbung mit dem CD40L-spezifischen Antikörper erbrachte eine deutlich sichtbare zusätzliche indirekte Fluoreszenz auf YFP-bildenden Zellen durch Phycoerythrin-markierte Zweitantikörper, visualisiert auf FL2-H (Abb. 5B, Position 2). Die Färbung mit dem isotypengleichen Kontrollantikörper Anti-IgG1-PE führte zu keiner zusätzlichen Fluoreszenz im Kanal FL2-H. Es blieb bei der Fluoreszenz des Fusionsproteins im Kanal FL1-H (Abb. 5B, Position 3).

NCTCs, die mit dem Konstrukt GST-Flag-YFP-FasL transfiziert wurden, zeigten im Kanal FL1-H eine Fluoreszenz bei ca. 25 % der Zellen. (Abb. 5C, Position 1).

Eine deutliche zusätzliche Fluoreszenz im Kanal FL2-H von ca. 50 % konnte wiederum nur bei der Färbung mit dem spezifischen, direkt markierten Antikörper, Anti-FasL-PE, erzielt werden (Abb. 5C, Position 2), nicht aber bei Zellen, die mit dem direkt markierten Kontrollantikörper Anti-TNFR2-PE gefärbt wurden. Die Fluoreszenz gleicht den transfizierten Zellen ohne Antikörperfärbung (Abb. 5C, Position 3).

Für beide Liganden konnte folglich ein spezifischer Nachweis ihrer Expression an der Zelloberfläche erbracht werden.

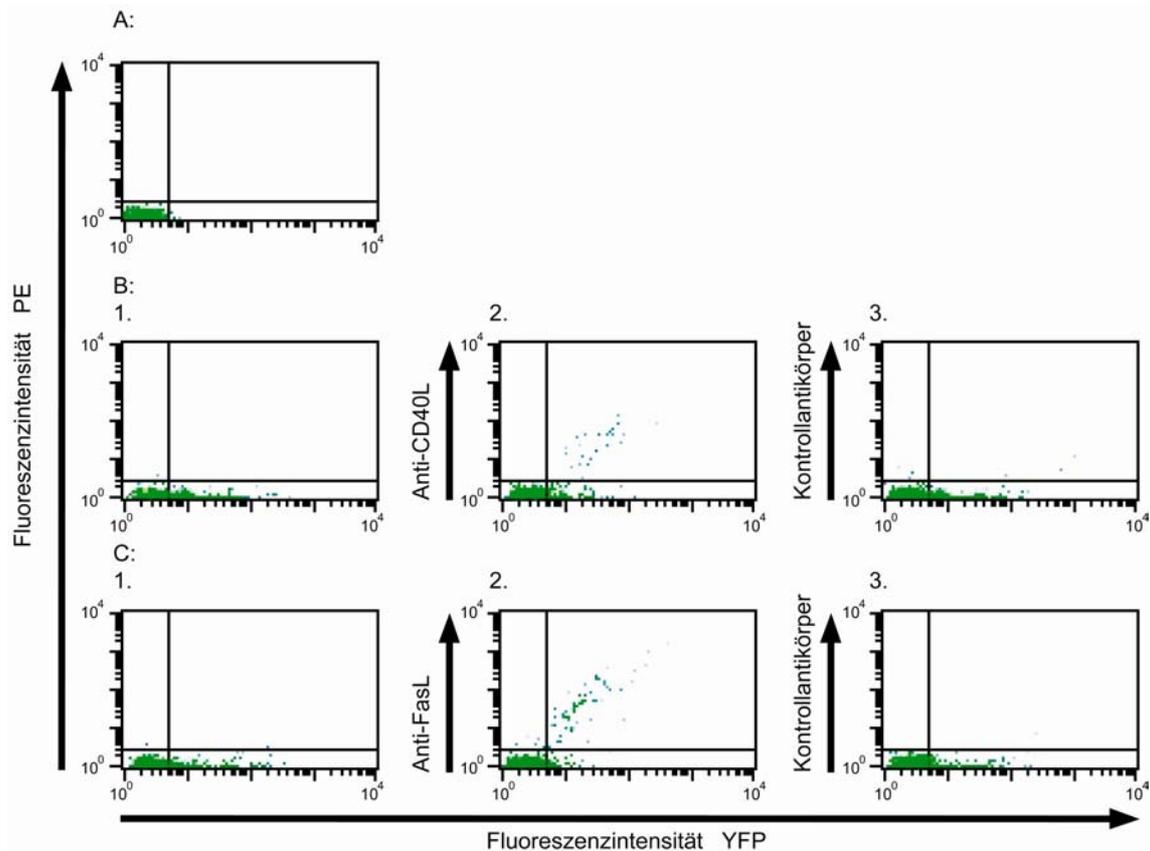


Abbildung 5: Zusätzliche Fluoreszenz durch spezifische Antikörperfärbung von CD40L u. FasL

- A: Untransfizierte NCTCs zur Festlegung der Eigenfluoreszenz.
- B1: GST-Flag-YFP-CD40L transfizierte NCTCs ohne Antikörperfärbung zeigten die YFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins.
- B2: GST-Flag-YFP-CD40L transfizierte NCTCs, inkubiert mit Anti - CD40L / Anti - Mouse - PE, zeigten eine zusätzliche Fluoreszenz von PE.
- B3: GST-Flag-YFP-CD40L transfizierte NCTCs, inkubiert mit Anti - IGG1 / Anti - Mouse - PE, zeigten keine zusätzliche Fluoreszenz von PE
- C1: GST-Flag-YFP-FasL transfizierte NCTCs ohne Antikörperfärbung zeigten die YFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins.
- C2: GST-Flag-YFP-FasL transfizierte NCTCs, inkubiert mit Anti - FasL - PE, zeigten eine zusätzliche Fluoreszenz von PE.
- C3: GST-Flag-YFP-FasL transfizierte NCTCs, inkubiert mit Anti - TNFR2 - PE, zeigten keine zusätzliche Fluoreszenz von PE.

4.2.2 Membranständiger CD40L und FasL induzieren Interleukin-8

Im Folgenden ging es um den Nachweis einer funktionellen Aktivität der GST-Fusionsproteine beider Liganden, wofür der Nachweis einer IL-8-Induktion geeignet erschien. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der IL-8-Expression spielt NF κ B. Interleukin-8 ist damit ein geeignetes Zielgen zum Nachweis einer durch Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR, CD40, Fas) vermittelten NF κ B-abhängigen Genexpression.

Für die Transfektion mit den GST-Fusionsproteinen wurden zum einen humane 293-Zellen, zum anderen murine NCTCs verwendet, um die Funktionalität der Liganden auch in Zellarten unterschiedlicher Spezies zu testen. Als Rezeptorzellen dienten verschiedene HT1080-Zelltypen, die mit den Ligandenzellen für 6 h kokultiviert wurden. Die Wildtypform von HT1080 exprimiert sowohl Fas als auch TNFR1. Die weiteren HT1080-Zelltypen sind zusätzlich entweder mit TNFR2 oder CD40 stabil transfiziert. Neben den zu untersuchenden Konstrukten GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 und GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 wurde als Positivkontrolle das im Aufbau analoge Konstrukt GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNF-pCR3 sowie als Negativkontrolle pEYFP-N1 bei der Transfektion von 293-Zellen bzw. NCTCs eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass alle GST-TNF-Ligand-Fusionsproteine im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante IL-8-Induktion in ihren receptorspezifischen HT1080-Zelltypen hervorriefen. Das GST-FasL-Fusionsprotein zeigte vor allem in HT1080-Wildtypzellen, aber auch in den TNFR2-Transfektanten eine starke IL-8-Induktion. Den Erwartungen entsprechend war die IL-8-Induktion durch das GST-CD40L-Fusionsprotein in der CD40-Transfektante der HT1080-Zellen ausgeprägt, blieb aber in den Wildtyp-Zellen und der TNFR2-Transfektante vergleichbar zur Negativkontrolle. Das als Positivkontrolle eingesetzte Konstrukt GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNF-pCR3 induzierte in der TNFR2-Mutante der HT1080-Zellen die stärkste IL-8-Produktion. Für alle verwendeten GST-Konstrukte wurden sowohl nach Transfektion in 293-Zellen als auch nach Transfektion in NCTCs (Daten nicht gezeigt) ähnliche Ergebnisse erzielt. Für beide Konstrukte konnte eine receptorspezifische deutliche Bioaktivität in Form einer IL-8-Induktion nachgewiesen werden (Abb. 6). Die erfolgreiche Expression funktional aktiver Liganden war in murinen und humanen Zellarten möglich.

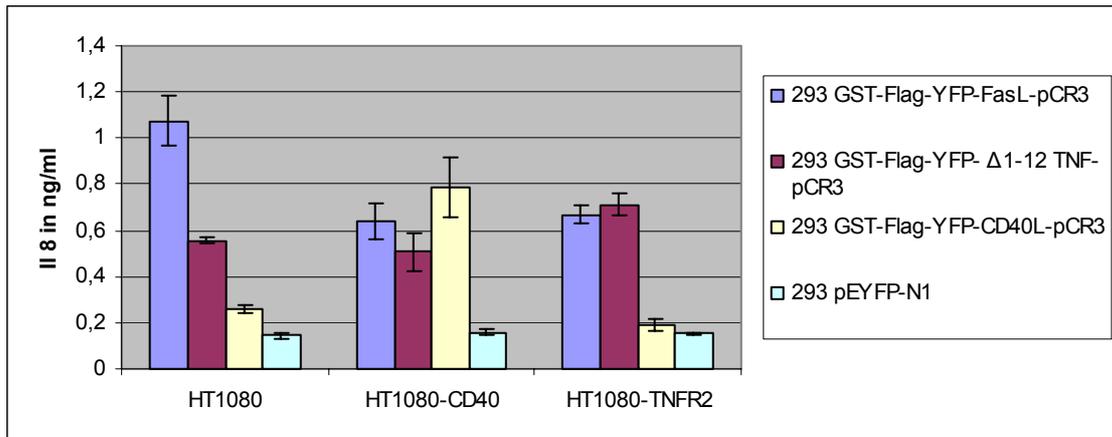


Abbildung 6: IL-8-Induktion in HT1080-Zelltypen durch GST-Flag-YFP-Konstrukte

293-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und mit den angegebenen HT1080-Zelltypen unter Standardbedingungen kokultiviert. 6 h nach Beginn der Kokultur wurde das Medium abgenommen und im ELISA auf humanes IL-8 untersucht. Die Transfektionseffizienz für die GST-Fusionsproteine wurde im FACS gemessen. Alle GST-Konstrukte zeigten eine ähnliche Transfektionseffizienz: GST-Flag-YFP-FasL-pCR3 45,08 %, GST-Flag-YFP-CD40L-pCR3 38,10 %, GST-Flag-YFP-Δ1-12TNF-pCR3 40,55 %, pEYFP-N1 87,25 %.

4.3 Analyse CD40L-induzierter Rezeptorsignalkomplexe

4.3.1 GST-Flag-YFP-CD40L lässt sich effektiv durch GST-Fishing isolieren

Um Rezeptorsignalkomplexe von CD40L und CD40 untersuchen zu können, ist es notwendig diese aus einem Gesamtzelllysate von Effektor- (CD40L) und Zielzellen (CD40) effektiv zu isolieren. Hierfür wurde die im Fusionsprotein des CD40L vorhandene Glutathion-S-Transferase-Domäne genutzt. Durch die Bindung der Glutathion-S-Transferase an Sepharose-Beads konnte der Ligand zusammen mit dem Rezeptor und nachgeschalteten Signalproteinen als Signalkomplex durch Zentrifugation aus Kokulturlysaten gewonnen werden. Nach diesem als GST-Fishing bezeichneten Anreicherungsprozess nahm die Konzentration der GST-Fusionsproteine im Gesamtzelllysate der Kokulturen stark ab (Abb. 7). Es ließ sich also eine deutliche Anreicherung der Rezeptorsignalkomplexe aus den Lysaten in die Glutathion-Sepharose-Beads erreichen. Dies spricht für eine gute Bindung der Konstrukte über ihre GST-Domäne.

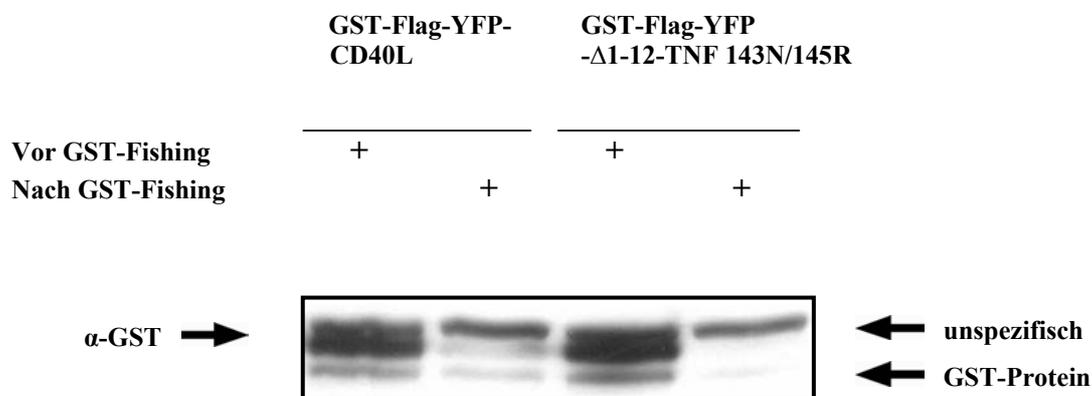


Abbildung 7: GST-Fishing von GST-Flag-YFP-CD40L und GST-Flag-YFP- Δ 1-12-TNF143N/145R

293-Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und für 30 min mit SV80-CD40-Zellen unter Standardbedingungen kokultiviert. Die Gesamtzelllysate vor GST-Fishing und nach GST-Fishing (Überstand der Beads) wurden im Westernblot anschließend unter Verwendung von Antikörpern gegen GST untersucht. Es ist eine deutliche Abnahme im Gesamtzelllysate nach GST-Fishing erkennbar.

4.3.2 In GST-Flag-YFP-CD40L stimulierten Zielzellen interagiert TRAF2 mit CD40

Um die Aktivierung von CD40 durch GST-Flag-YFP-CD40L zu zeigen, war es ein weiteres Ziel, das direkt an den aktivierten CD40-Rezeptor bindende Signalmolekül TRAF2 im GST-Fishing nachzuweisen. Wie man dem 0-Wert für die Kokultur von SV80-CD40-Zellen mit 293-Zellen, die das Fusionsprotein GST-Flag-YFP-CD40L exprimieren, entnehmen kann, ist ein schwacher Nachweis von TRAF2 bereits hier im Rezeptorsignalkomplex möglich. Nach der 30 min dauernden Kokultur der gleichen Zellen-Konstellation, kann TRAF2 durch GST-Fishing deutlich stärker im CD40-Signalkomplex nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß gelang dies nicht bei einer Kokultur mit CD40-negativen SV80-Rezeptorzellen. Um zu beweisen, dass die Aktivierung des CD40 ausschließlich durch CD40L und nicht durch andere Komponenten des GST-Fusionsproteins verursacht wird, wurde als Kontrolle ein Molekül gleichartigen Aufbaus eingesetzt, bei dem nur der TNF-Ligand den Unterschied darstellt. Auch in dieser zweiten Kontroll-Kokultur, bei welcher 293-Zellen das Fusionsprotein GST-Flag-YFP- Δ 1-12-TNF 143N/145R als Liganden produzieren, konnte kein TRAF2 im Immuno-Westernblot präzipitiert werden.

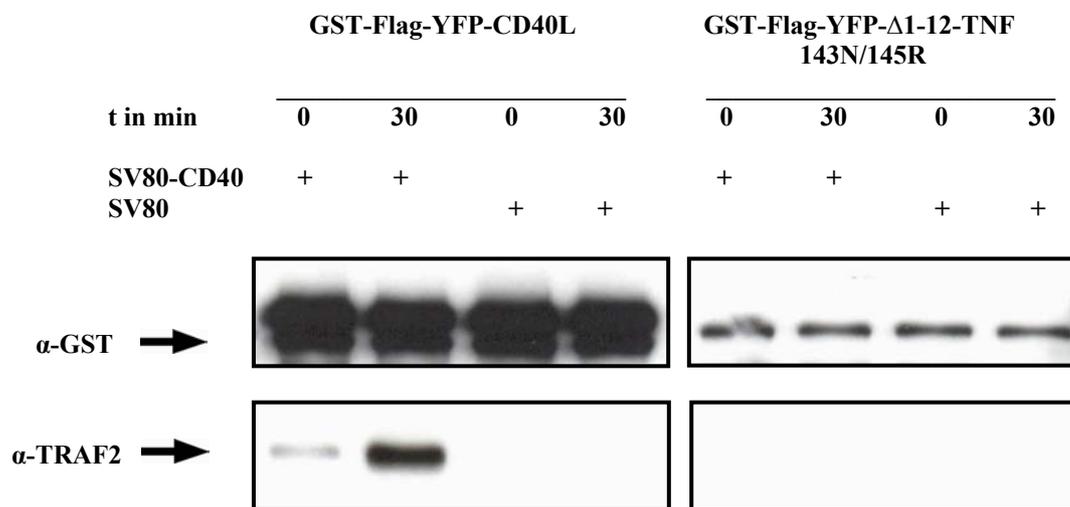


Abbildung 8: Nachweis von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex des CD40L

293-Zellen wurden mit GST-Flag-YFP-CD40L bzw. mit GST-Flag-YFP- Δ 1-12TNF 143N/145R transfiziert und mit SV80- bzw. SV80-CD40-Zellen für 30 min unter Standardbedingungen kokultiviert. Bei den 0-Werten fand eine getrennte Lyse der Zellen und anschließendes Vermischen zum Gesamtzelllysate statt. Nach Isolierung der GST-Fusionsproteine durch GST-Fishing wurden die Präzipitate im Westernblot unter Verwendung von Antikörpern gegen GST und TRAF2 analysiert.

4.3.3 TRAF2 assoziiert transient mit dem membrangebundenen CD40-Signalkomplex

In den nachfolgenden Experimenten wurden die 293-Zellen der Kontrolle sowohl mit dem Fusionsprotein GST-Flag-YFP- Δ 1-12-TNF 143N/145R als auch mit CD40L-YFP transfiziert, um zu unterstreichen, dass es sich bei dem Nachweis von Molekülen des Signalweges ausschließlich um solche handelt, die durch das GST-Fishing des Rezeptor-Ligand-Komplexes gewonnen wurden. Im folgenden Experiment sollte die Kinetik der TRAF2-CD40-Assoziation durch die Methode des GST-pull-down-Assays untersucht werden. Wie schon in Abbildung 8 gezeigt, rekrutiert TRAF2 in unstimulierten SV80-CD40-Zellen nur gering an CD40 und kann durch GST-Fishing mit dem Rezeptor-Ligand-Komplex gewonnen werden. Durch eine Kokultur für 30 min mit dem Fusionsprotein GST-Flag-YFP-CD40L wurde eine deutliche Steigerung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex erreicht. Eine Reduktion von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex, die in etwa dem Zeitpunkt 0 entsprach, zeigte sich jedoch nach einer Kokultur für 90 min. Abbildung 9 kann man daher entnehmen, dass CD40 und TRAF2 nach GST-Flag-YFP-CD40L-Stimulation transient interagieren. Ein Versuch, die zeitabhängige Entwicklung des Rezeptors im Komplex mit GST-Flag-YFP-CD40L durch eine Detektion mit Anti-hCD40 aufzuzeigen, gelang nicht. Es konnte daher nicht geklärt werden, ob sich die zeitliche Veränderung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex mit einer Lösung des Rezeptors vom GST-Flag-YFP-CD40L erklären lässt.

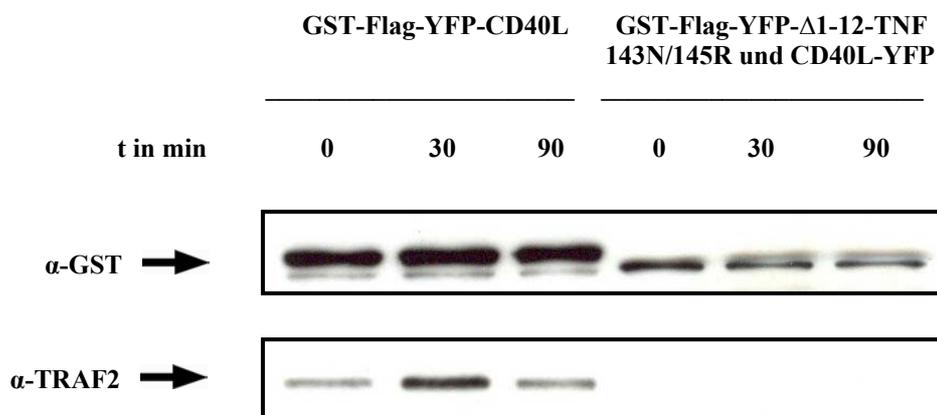


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Interaktion von TRAF2 und CD40

293-Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und mit SV80-CD40-Zellen für den angegebenen Zeitraum unter Standardbedingungen kokultiviert. Der Zeitpunkt 0 min steht für die jeweils getrennte Lyse von SV80-CD40- und 293-Zellen mit anschließendem Mischen der Lysate. Nach GST-Fishing wurden die GST-Beads im Westernblot auf GST und TRAF2 untersucht.

4.3.4 Vorstimulation der Rezeptorzellen mit sTNF führt zu einer Verringerung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex

Im nachfolgenden Experiment wurde die Entwicklung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex nach Vorstimulation mit löslichem TNF (sTNF) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die CD40-TRAF2-Assoziation sowohl für den 0-Wert als auch für die 30 Minuten dauernde Kokultur geringer ausfällt, wenn vorher mit sTNF stimuliert wurde. Aufgrund der Gleichmäßigkeit der GST-Banden kann man davon ausgehen, dass die Verringerung von TRAF2 im Rezeptorsignalkomplex nicht auf eine unterschiedliche Effektivität des GST-Fishings zurückzuführen ist, sondern durch die Stimulation mit sTNF verursacht sein muss. Ferner hat die Vorstimulation mit sTNF offensichtlich auch einen Einfluss auf die TRAF2-Menge in den unstimulierten Rezeptorzellen.

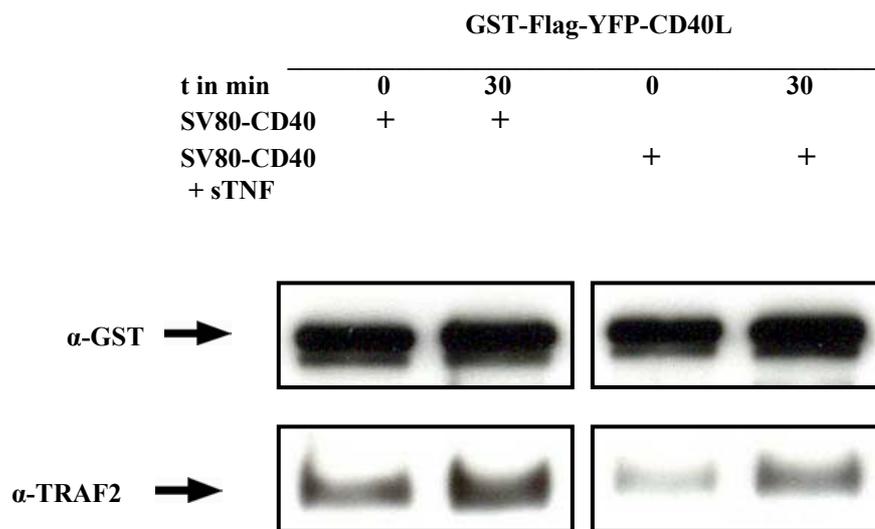


Abbildung 10: TRAF2 - Entwicklung im Rezeptorsignalkomplex nach Vorstimulation der Rezeptorzellen mit sTNF

293-Zellen wurden mit GST-Flag-YFP-CD40L transfiziert. Diese wurden danach mit SV80-CD40-Zellen bzw. SV80-CD40-Zellen, die für 7 h mit sTNF in einer Konzentration von 20 ng/ml vorstimuliert wurden, für 30 min unter Standardbedingungen kokultiviert. Bei den 0-Werten fand eine getrennte Lyse der Zellen und anschließendes Vermischen zum Gesamtzelllysat statt. Nach Isolierung der GST-Fusionsproteine durch GST-Fishing wurden die Proben im Westernblot unter Verwendung von Antikörpern gegen GST und TRAF2 analysiert.

4.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1 Zielsetzung der mikroskopischen Untersuchungen

Neuere Studien haben gezeigt, dass viele TNF-Rezeptoren nur vollständig aktiviert werden, wenn es nach der Bindung des Liganden auch zur Bildung höher-molekularer Rezeptor-Ligand-Strukturen kommt, die in der Literatur als Cluster oder SPOTS bezeichnet werden. Diese Strukturen können mit mikroskopischen Methoden untersucht werden (Vgl. Henkler, F. et al. 2005).

Für die neu entwickelten GST-Fusionsproteine sollte nachfolgend geklärt werden, ob und welche Art von Rezeptorsignalkomplexen gebildet werden. Dazu wurden Kokulturen von Hela-Zellen angesetzt, die die Ligand-Fusionsproteine oder die entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten. Das Detektionsmuster der Rezeptoren wurde in unterschiedlichen Kokulturen und in Kontrollzellen verglichen, die mit löslichem, quervernetztem Liganden stimuliert wurden. Die Frage ob wild-type Liganden und abgeleitete GST-Fusionsproteine ähnliche Aktivitäten aufweisen, ist von Bedeutung, da ein Einfluss der eingeführten Domänen auf die Interaktion von Ligand und Rezeptor nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4.2 Analysen der Expression von CD40L-YFP und CD40-CFP in Hela-Zellen des Wildtyps

In Hela-Zellen, die CD40L-YFP exprimieren, ist durch die YFP-Markierung die Verteilung des Liganden in der Zelle im Fluoreszenzmikroskop erkennbar. Es lässt sich hierbei eine homogene Verteilung über die Zelle feststellen (Abb. 11A, 2. Spalte). Die Expression von CD40-CFP zeigt in Hela-Zellen ebenso eine gleichmäßige Verteilung (Abb. 11A, 2. Spalte). Durch Stimulation der CD40-CFP exprimierenden Hela-Zellen mit M2-quervernetztem Flag-sCD40L kann jedoch eine Umverteilung des Rezeptors in supramolekulare Cluster an der Zellmembran induziert werden (Abb. 11A, 3. Spalte).

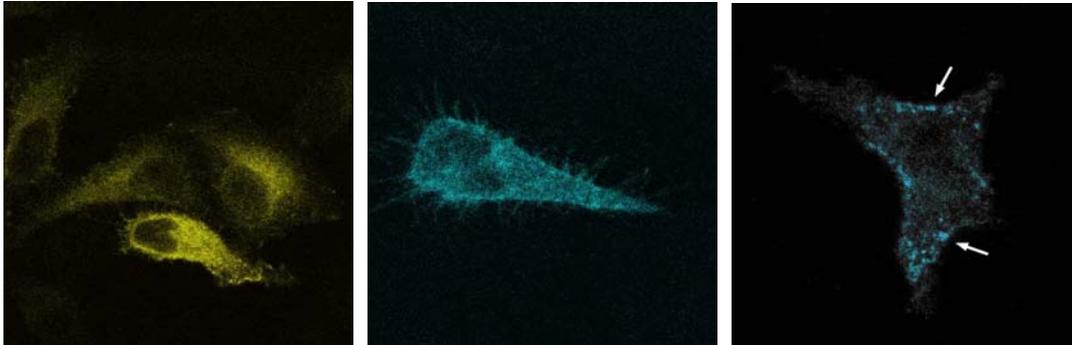
Die Kokultur von CD40L-YFP und CD40-CFP exprimierenden Hela-Zellen zeigt analog eine Kolokalisation der transfizierten Moleküle in Cluster im Bereich der Zellkontakte auf transfizierten Zellen. Es handelt sich hierbei offenbar um Rezeptorsignalcluster, die durch den membranständigen CD40L induziert wurden (Abb. 11B, 3. Spalte). Diese CD40L-CD40-Cluster wurden in allen Zellpaaren gefunden, bei denen eine CD40L-YFP-Zelle einer CD40-CFP-Zelle benachbart war.

A :

1. CD40L-YFP

2. CD40-CFP

3. CD40-CFP mit
Flag-sCD40L+M2



B:

1. CD40L-YFP

2. CD40-CFP

3. Overlay

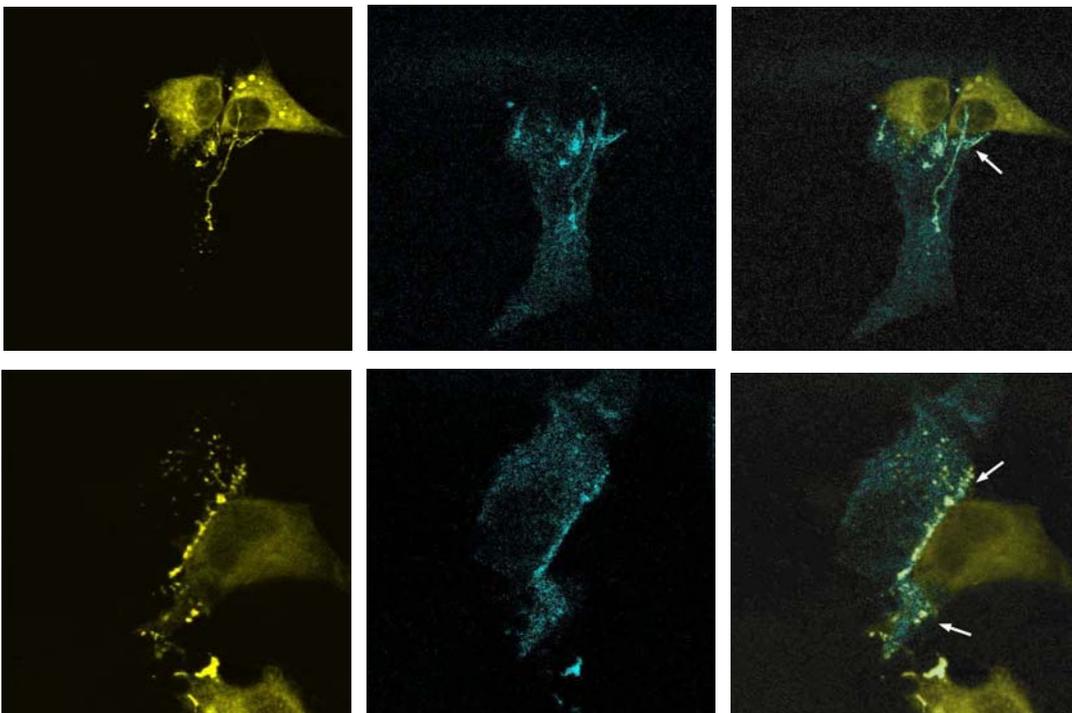


Abbildung 11:

A: HeLa-Zellen (wt) mit CD40L-YFP, CD40-CFP oder CD40-CFP mit Flag-sCD40L+M2.

HeLa-Zellen wurden entweder mit CD40L-YFP (1. Spalte) oder CD40-CFP (2. Spalte) transfiziert und unter Standardbedingungen für 45 min kultiviert. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung von Ligand bzw. Rezeptor in der Zelle. In der dritten Spalte sieht man CD40-CFP transfizierte HeLa-Zellen, die mit M2 - quervernetztem Flag-sCD40L (400 ng/ml) für 45 min stimuliert wurden. Es erfolgt eine Umverteilung des Rezeptors in die Zellmembran (weiße Pfeile).

B: Clusterbildung bei der Interaktion von CD40L-YFP mit CD40-CFP in Kokulturen

HeLa-Zellen wurden entweder mit CD40L-YFP oder CD40-CFP transfiziert und dann für 45 min unter Standardbedingungen kokultiviert. Dabei kommt es zur Ausbildung deutlich sichtbarer Rezeptorsignalcluster, die durch den CD40L induziert werden (weiße Pfeile).

4.4.3 Analyse der Interaktion von GST-Flag-YFP-CD40L mit CD40-CFP in Kokulturen von HeLa-Zellen des Wildtyps

HeLa-Zellen, die mit dem Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L transfiziert wurden, zeigten im Gegensatz zur homogenen Verteilung des CD40L-YFP (siehe Abbildung 11A) eine deutliche Aggregation des Liganden innerhalb vieler der transfizierten Zellen. Dies spricht für die Ausbildung von Eigenstrukturen des Fusionsproteins GST-Flag-YFP-CD40L, da HeLa-Zellen kein CD40 exprimieren (Abb. 12).

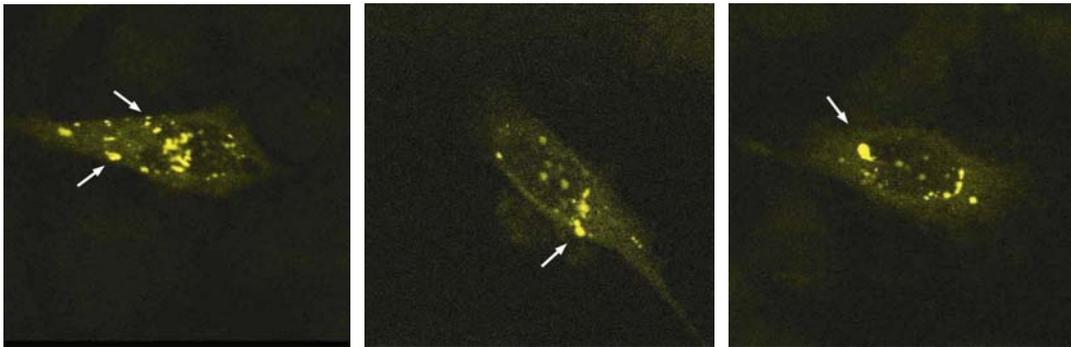


Abbildung 12: Signifikante Ausbildung von Eigenstrukturen des GST-Flag-YFP-CD40L

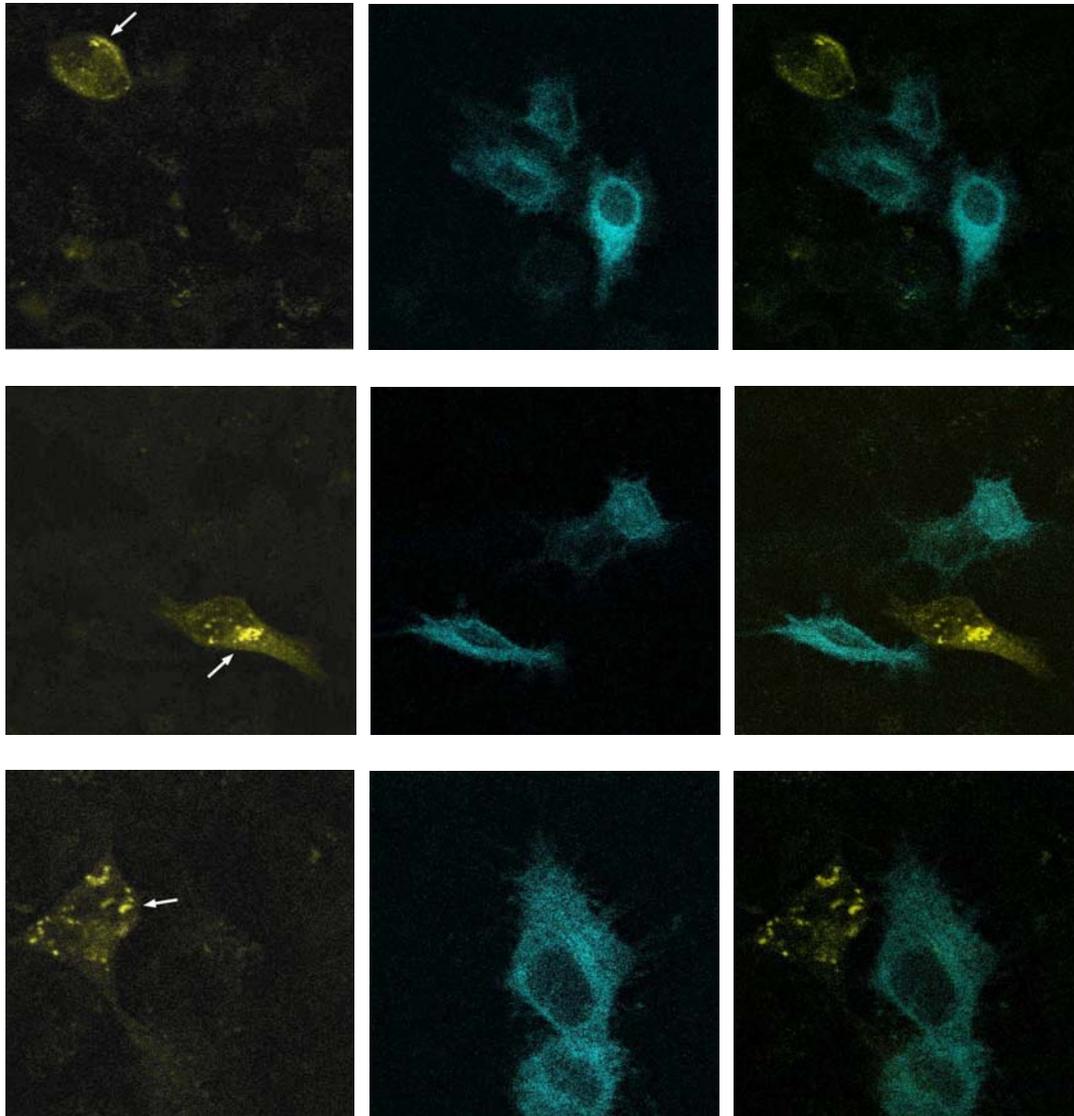
Dargestellt sind HeLa-Zellen des Wildtyps die mit GST-Flag-YFP-CD40L transfiziert wurden. Der Ligand liegt ungleichmäßig in der Zelle verteilt vor. Er bildet so genannte Eigenstrukturen (weiße Pfeile) im Gegensatz zum YFP-CD40L-Konstrukt, das eine homogene Verteilung zeigt (Vgl. Abb. 11, 1. Spalte).

HeLa-Zellen, die mit dem Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L transfiziert wurden, zeigten in Kokultur mit CD40-CFP exprimierenden HeLa-Zellen zwar die Aggregate des Fusionsproteins (Abb. 13, 1. Spalte), diese kolokalisierten jedoch nicht mit CD40-CFP, der weiterhin eine homogene Verteilung über die Zelle aufwies (Abb. 13, 2. Spalte). Es handelt sich folglich nicht um CD40L-CD40-Signalcluster, sondern um die bereits beschriebenen Eigenstrukturen des GST-Flag-YFP-CD40L-Fusionsproteins. In keiner der Kokulturen wurden CD40L-CD40-Signalcluster gefunden. Exemplarisch sind in Abbildung 13 drei Zellpaare dargestellt, in denen jeweils trotz ausreichender Nachbarschaft keine Rezeptorsignalcluster gefunden werden konnten. Deutlich ist dies im Overlay (Abb. 13, 3. Spalte) zu erkennen.

1. GST-Flag-YFP-CD40L

2. CD40-CFP

3. Overlay



**Abbildung 13: GST-Flag-YFP-CD40L erzeugt keine mikroskopisch sichtbaren
Rezeptorcluster von CD40-CFP**

Hela-Zellen wurden entsprechend der Beschriftung entweder mit GST-Flag-YFP-CD40L oder CD40-CFP transfiziert und dann für 45 min unter Standardbedingungen kokultiviert.

In der ersten Spalte erkennt man deutlich die Aggregation von GST-Flag-YFP-CD40L innerhalb der Zelle (1. Spalte, weiße Pfeile). Diese Strukturen finden sich nicht in der Rezeptorzelle wieder. Auch bleibt die Verteilung des Rezeptors gleichmäßig (2. Spalte). Im Overlay von Ligand- und Rezeptorzelle sind keine Kolokalisationen von CD40L und CD40 zu beobachten (3. Spalte). Somit handelt es sich bei den Aggregaten des Liganden um die schon bei den Einzeltransfektionen beschriebenen Eigenstrukturen.

4.4.4 Analyse der Interaktion von GST-Flag-YFP-FasL (293-Zellen) und Fas-CFP (Hela-Zellen des Wildtyps) in Kokultur

Im Gegensatz zum Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L konnte bei dem analog aufgebauten Konstrukt GST-Flag-YFP-FasL eine Induktion von Rezeptorclustern beobachtet werden. In Abbildung 14 werden exemplarisch drei Rezeptor-Ligand-Zellpaare dargestellt, welche repräsentativ die in diesem Kokultur-Experiment beobachtete Clusterbildung zeigen sollen. Deutlich wird anhand der in den beiden ersten Abbildungsspalten dargestellten Zellen, dass es sich um keine Koexpression innerhalb einer Zelle handelt. Die YFP-exprimierende Ligandzelle zeigt lediglich die gemeinsame Clusterstruktur im CFP-Kanal des Mikroskops (Abb. 14, 2. Spalte). Umgekehrt findet sich im YFP-Kanal auch nur der Clusteranteil der CFP-exprimierenden Rezeptorzelle (Abb. 14, 1. Spalte). Wie man dem Overlay-Bild in der dritten Spalte der ersten Reihe entnehmen kann, bilden die Ligandzellen die Clusterstruktur auch mit mehr als einer Rezeptorzelle gleichzeitig aus (weiße Pfeile).

Diese Clusterbildung wurde auch bei Koexpression von GST-Flag-YFP-FasL und Fas-CFP innerhalb einzelner Zellen beobachtet. Außerdem wurde dieser mikroskopische Nachweis von Rezeptor-Ligand-Signalinteraktion erneut bei der Kokultur von FasL-YFP-transfizierten 293-Zellen mit Fas-CFP-transfizierten Hela-Zellen vom Wildtyp festgestellt (unpublizierte Daten von Dr. Frank Henkler PhD, nicht dargestellt).

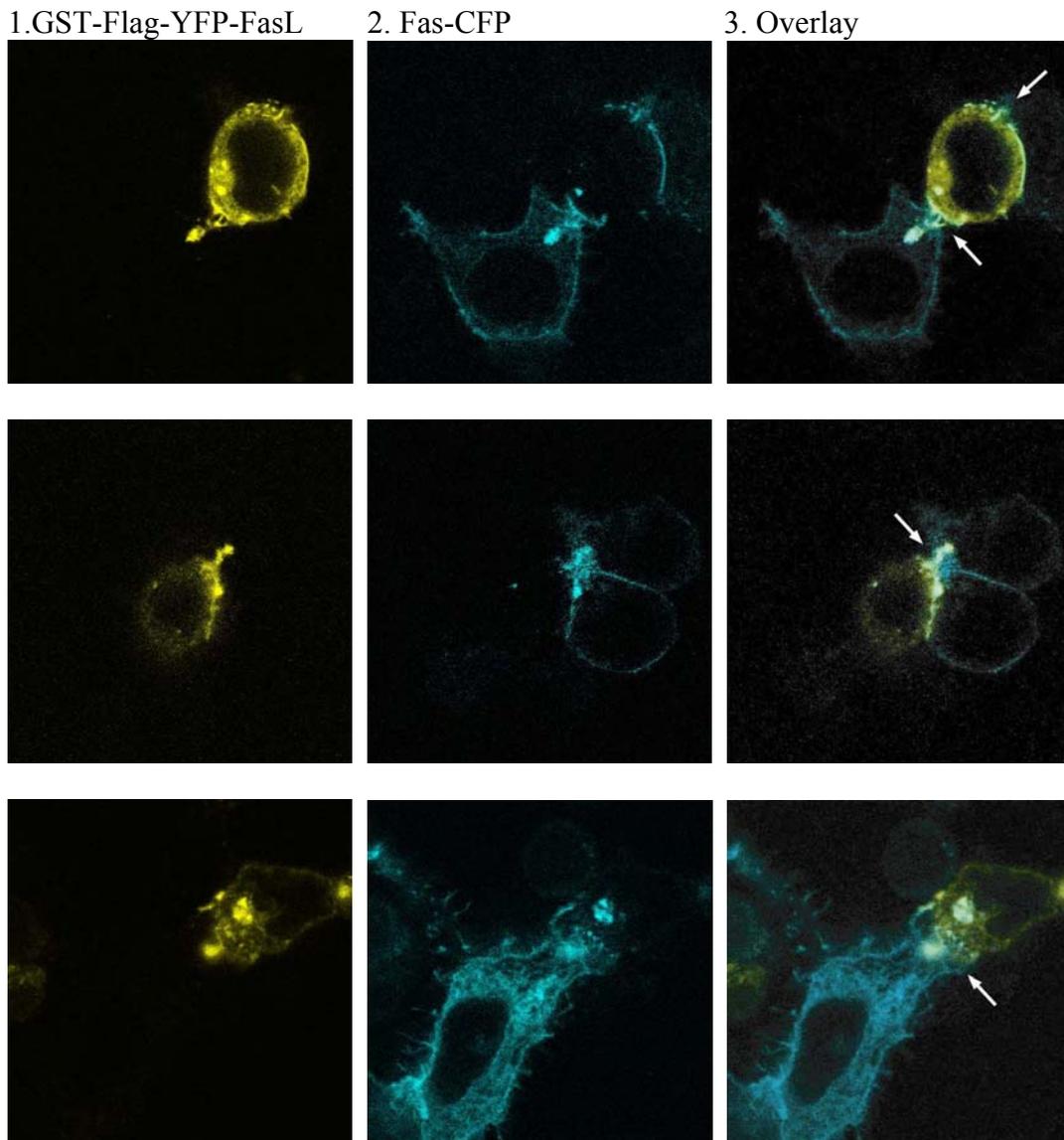


Abbildung 14: Clusterbildung bei der Interaktion von GST-Flag-YFP-FasL mit Fas-CFP

293-Zellen wurden mit GST-Flag-YFP-FasL transfiziert und unter Standardbedingungen mit Fas-CFP transfizierten Hela-Zellen vom Wildtyp für 45 min kokultiviert. Die erste Spalte zeigt den YFP-Kanal, die zweite Spalte den CFP-Kanal im Mikroskop.

Die gemeinsamen Signalkomplexstrukturen der Ligand- und der Rezeptorzelle sind jeweils in beiden Kanälen des Mikroskops sichtbar, sie kolokalisieren folglich. In der dritten Spalte wurden jeweils die beiden Bilder der ersten und der zweiten Spalte einer Reihe fusioniert. Dadurch werden die beiden gemeinsamen Strukturen der Rezeptor- und der Ligandzelle deutlicher sichtbar gemacht (weiße Pfeile). GST-Flag-YFP-FasL ist in der Lage Rezeptorsignalkomplexe mit Fas-CFP zu bilden.

5. Diskussion

5.1 Die Molekülstruktur der Fusionsproteine von CD40L und FasL

Wie bereits eingangs in der Zielsetzung formuliert, sollten im Rahmen dieser Arbeit membranständige Formen des CD40L und des FasL hergestellt werden, die eine genauere Untersuchung der durch sie induzierten Rezeptorsignalkomplexe ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine der Liganden hergestellt, die es gestatten, die Rezeptor-Ligand-Interaktion in funktionellen Assays, durch Immunopräzipitationen und Mikroskopie zu analysieren.

In den FACS-Analysen konnte nicht nur eine korrekte Expression der YFP-Domäne, sondern auch die Lokalisation der Liganden an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 5). In Kokultur-Assays konnte die Funktionalität der GST-Fusionsproteine durch die selektive Induktion von IL-8 in CD40- bzw. Fas-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Funktionstüchtigkeit der GST-Domäne wurde in den Pull-down-Assays gezeigt. So wurde zum Beispiel einerseits eine Anreicherung von Rezeptorkomplexen aus den Lysaten erzielt (Abb. 7), andererseits gelang auch der Nachweis von TRAF2, einem CD40-bindenden Adapterprotein, in diesem Komplex (Abb. 8). Die korrekte Funktion des Flag-Epitop wurde gleichfalls in Immunopräzipitationen demonstriert. In mikroskopischen Untersuchungen konnte die Interaktion der GST-Fusionsproteine mit dem korrespondierenden Rezeptor an der Zelloberfläche analysiert werden (Abb. 11-14).

5.1.1 Unterschiede der membranständigen Form zu den löslichen Varianten verschiedener TNF-Liganden

Die Liganden der TNF-Superfamilie werden zunächst als membranständige Proteine exprimiert. Durch Metalloproteasen können sie jedoch auch in lösliche trimere Formen prozessiert werden.⁴⁶ Während membranständige Formen der TNF-Liganden ihre korrespondierenden Rezeptoren aktivieren können, trifft das nicht für alle löslichen Varianten zu, obwohl sie ebenfalls zu Bindung an den Rezeptor fähig sind.

Beispielsweise kann sTNF den TNFR1 stimulieren, aber den TNFR2 nur unzureichend aktivieren.⁶ Ein ähnliches Verhalten konnte für den „TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand“ (TRAIL) gezeigt werden.

Die natürlich vorkommende lösliche Variante von TRAIL kann zwar wie die membranständige Form TRAILR1 aktivieren, den TRAILR2 hingegen nicht.⁷²

Hier ist eine artifizielle, sekundäre Quervernetzung durch Antikörper erforderlich, um eine dem membranständigen TRAIL vergleichbare Aktivierung zu induzieren.⁷²

Für den FasL konnte eine stärkere Einschränkung des natürlich prozessierten gelösten Liganden nachgewiesen werden. Trotz Bindung an den Rezeptor fehlt ihm fast jegliche Signalfähigkeit, so dass er auch als Antagonist der membranständigen Form des FasL wirken kann.⁴⁶ Wie schon am Beispiel für TRAIL beschrieben, können trimere lösliche TNF-Liganden durch sekundäre Multimerisierung in aktive Formen überführt werden. Gentechnisch hergestellte Hexamere oder höhergradig aggregierte Varianten des löslichen FasL sind hochpotente Agonisten. Ähnliche Effekte können durch eine sekundäre Quervernetzung des löslichen Liganden mit Antikörpern erzielt werden.⁷¹ Die reduzierte Signalfähigkeit des gentechnisch hergestellten, löslichen trimeren CD40L kann ebenso durch Multimerisierung verbessert werden.³⁴

Auch wenn durch Herstellung artifiziell multimerisierter Liganden oder durch sekundäre, Antikörper-vermittelte Quervernetzung die Aktivität einiger TNF-Liganden verbessert oder erst ermöglicht wird, bleiben doch erhebliche Unterschiede zu den natürlichen Prozessen der Rezeptor-Ligand-Interaktion bestehen. In der Natur findet die Rezeptoraktivierung durch die Interaktion mit membranständigen Liganden statt. Bisher wurden aber überwiegend die oben beschriebenen artifiziellen Reagenzien verwendet, um die Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren zu untersuchen. Die Identifikation möglicher Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen löslichen Agonisten und membranständigen Liganden ist ein Gegenstand der aktuellen Forschung geworden.

Als ein Beispiel für Unterschiede im Verhalten der löslichen und der membranständigen Form eines TNF-Liganden gegenüber seinem Rezeptor wird die Internalisierung des Rezeptor-Signalkomplexes angeführt. Hierzu konnten Chen et al. 2006 zeigen, dass sowohl agonistische Ak gegen CD40 als auch löslicher trimerer CD40L eine zügige Rezeptorinternalisierung induzieren. Der membranständige CD40L ruft hingegen eine Clusterbildung des Rezeptors an der Zelloberfläche hervor und es konnte keine vergleichbare Internalisierung gefunden werden.⁷³

Bei der weiteren Untersuchung intrazellulärer Signalwege zeigten sich deutliche Unterschiede in der Rekrutierung der mit CD40 interagierenden Proteine TRAF2 und 6. In den Rezeptorzellen konnte überdies nur die membranständige Form des CD40L eine Induktion von Interleukin-8 und ICAM-1 bewirken.⁷³ Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Baccam et al., die anhand von B-Zellen demonstrierten, dass nur die membranständige Form von CD40L in der Lage ist eine Interleukin-6-Produktion zu induzieren. Lösliche trimere Varianten oder agonistische Antikörper waren nicht dazu fähig.⁷⁴

Neben der Möglichkeit einer unterschiedlichen Internalisierung durch lösliche Liganden und membranständige Liganden, steht auch eine unterschiedliche Befähigung der diversen Ligandformen bei der Induktion von höhermolekularen Rezeptorclustern im Zentrum der aktuellen Forschung.

Für den FasL fanden Henkler et al. 2005 heraus, dass nur der membranständige Ligand unabhängig vom cytoplasmatischen Teil des Rezeptors und unabhängig von Caspase-8 und FADD die Fähigkeit besitzt, supramolekulare Cluster von hoher Stabilität mit Fas auszubilden.⁴⁸ Für die Stimulation des Fas-Rezeptors durch spezifische Antikörper oder künstlich aggregierten löslichen FasL wurde hingegen eine Abhängigkeit von Caspase-8 und FADD für die Ausbildung von Signalclustern gezeigt. Im zeitlichen Verlauf findet bei diesen beiden Fas-Aktivatoren eine anschließende Aktinfilament-abhängige Rezeptorinternalisierung statt.⁷⁵ Ein derartiger Prozess der Internalisierung ist für die Interaktion mit dem membranständigen FasL schwer vorstellbar und kann durch zukünftige Experimente mit den durch diese Arbeit zur Verfügung gestellten, membranständigen Fusionsproteinen untersucht werden.

5.2 TRAF2 im memCD40L- induzierten Rezeptorsignalkomplex von CD40/CD40L

5.2.1 Die Kinetik der Assoziation von CD40 und TRAF2

In Abbildung 8 ist ersichtlich, dass TRAF2 auch ohne vorherige Stimulation durch den membranständigen CD40L mittels GST-Fishing angereichert und im Westernblot durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden kann. Dies könnte zum einen durch die nachträgliche Bindung von CD40 und TRAF2 an den CD40L durch das Vermischen der vorher getrennt lysierten Ligand- und Rezeptorzellen zur Herstellung der 0-Wert-

Proben verursacht sein. Eine andere Erklärung wäre, dass TRAF2 bereits konstitutiv ohne Stimulation durch memCD40L an CD40 bindet. Bekannt ist, dass eine konstitutive Bindung von TRAF2 bis 6 in verschiedenen Zellen erfolgt.⁷⁶ Inwieweit eine Bindung von TRAF2 an CD40 schon vor der Aktivierung des Rezeptors erfolgt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Dieses Bindungsverhalten kann hier nicht eindeutig von einer methodischen Ursache abgegrenzt werden. Nach Brown et al. ist TRAF2 eine Ubiquitinligase, die selbst polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut werden kann. Dieser Mechanismus reguliert möglicherweise die Signaltransduktion von CD40.²⁸ Für die in Abbildung 9 dargestellte transiente Interaktion von TRAF2 mit dem Rezeptorsignalkomplex aus CD40/CD40L könnte man daher annehmen, dass die selbst induzierte Degradation die Abnahme von TRAF2 im Signalkomplex nach 90 Minuten Kokultur erklärt. Auch eine zeitabhängige Lösung des Rezeptors von seinem Liganden könnte als Erklärung herangezogen werden und müsste durch den spezifischen Nachweis des CD40-Rezeptors im Signalkomplex ausgeschlossen werden.

5.2.2 Regulation der TRAF2-CD40-Interaktion

In der Regulation der CD40-Signaltransduktion spielt ferner die Interaktion von TRAF1 mit TRAF2 eine große Rolle. So konnte bisher gezeigt werden, dass TRAF1 an TRAF2 bindet und dadurch die Bindung von TRAF2 an CD40 beeinträchtigt. Dies führt beispielsweise zu verringerter NF κ B-Aktivierung über CD40. In diesem Zusammenhang wurde ein Modell vorgeschlagen, dass eine Regulation der CD40-Signalvermittlung durch differentielle Interaktion mit unterschiedlichen TRAF2-TRAF1-Komplexen vorsieht.

Insbesondere bei Vorliegen einer verstärkten Expression von TRAF1, zum Beispiel nach einer TNF-Stimulation, könnte eine vermehrte Ausbildung von TRAF2-TRAF1-Heterotrimeren beobachtet werden. Das Modell geht bei überwiegend aus TRAF1 bestehenden Trimeren von einer geringeren Affinität zum CD40-Rezeptor aus, so dass kein stabiler Signalkomplex mit CD40 gebildet werden kann.²⁷

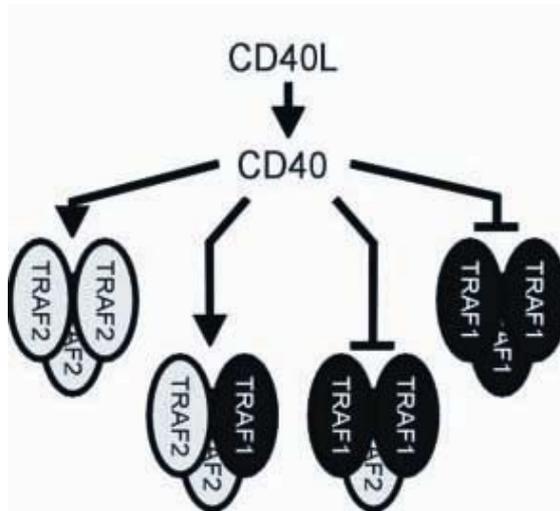


Abbildung 15: TRAF1-abhängige Regulation der CD40-Signaltransduktion

Vgl. Figur 2F bei Fotin-Mleczek M. et al. in J. Biol. Chem. 2004:
 Homotrimere von TRAF2 und heterotrimere Komplexe von TRAF2 mit TRAF1 führen zu unterschiedlicher Signaltransduktion des CD40-Rezeptors.

In Abbildung 10 zeigen mit sTNF vorstimulierte SV80-CD40-Zellen eine reduzierte TRAF2-Bindung an CD40 im Vergleich zu Rezeptorzellen, die keine Vorstimulation erhielten. Als Erklärung könnte das von Fotin-Mleczek M. et al. vorgeschlagene Modell herangezogen werden. Die durch Vorstimulation mit sTNF über den NFκB-Signalweg induzierte TRAF1-Expression wäre demnach für die quantitative Abnahme der Bindung von TRAF2 an den CD40/CD40L-Signalkomplex verantwortlich. Im Zusammenhang mit der Regulation der TRAF2-vermittelten CD40-Signaltransduktion wurde 1996 auch dem Protein A20 zusammen mit TRAF1 eine regulative Funktion zugewiesen. A20 wird ebenfalls NFκB-abhängig induziert. Durch seine N-terminale Domäne kann es mit TRAF2 und TRAF1 interagieren. Seine C-terminale Domäne inhibiert schließlich die NFκB-Aktivierung.⁷⁷

5.3 FasL- und CD40L-induzierte Rezeptorsignalcluster

Der mikroskopische Vergleich der durch lösliche und membranständige TNF-Liganden induzierten Signalkomplexe ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In Abbildung 11 A und 11 B ist deutlich erkennbar, dass sowohl M2-quervernetzter Flag-markierter löslicher CD40L als auch YFP-Fusionsproteine des membranständigen CD40L in Kokulturen eine Clusterbildung des CD40-Rezeptors induzieren können, was in der Literatur mit der Aktivierung des Rezeptors gleichgesetzt wird.³³ Das GST-Fusionsprotein des membranständigen CD40L konnte wider den Erwartungen jedoch keine mikroskopisch sichtbaren Rezeptorsignalcluster induzieren, obwohl in den vorausgegangenen Experimenten sowohl die korrekte Expression des Liganden an der Zelloberfläche als auch seine funktionale Aktivität durch CD40-vermittelte Interleukin-8-Induktion und den Nachweis von TRAF2 im Signalkomplex gezeigt werden konnten. Eine mögliche Erklärung könnte eine geringere Expression des GST-Fusionsproteins an der Zelloberfläche sein, so dass es zur Bildung mikroskopisch nicht sichtbarer Mikrocluster kommt. Zum anderen wäre auch ein vollständiges Ausbleiben der Clusterbildung denkbar, welches durch die Einführung der GST- und Flag-Domänen verursacht würde. Demnach würde die Vergrößerung des zytoplasmatischen Anteiles des CD40L zu einer sterischen Behinderung der Bildung von Ligandclustern führen, welche konsekutiv eine Clusterbildung des Rezeptors verhindert. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine vorausgehende Clusterbildung des Liganden für das anschließende Rezeptorclustering nötig ist.³³ Das GST-Fusionsprotein von CD40L wäre folglich in der Lage trotz ausbleibender Rezeptorclusterbildung eine TRAF2-Rekrutierung an den Rezeptor und eine NFκB-abhängige Genexpression von IL-8 zu induzieren. Das im Aufbau analoge GST-Fusionsprotein des FasL war hingegen in der Lage hochmolekulare Rezeptorsignalcluster zu induzieren (Abb. 14). Obwohl ein analog aufgebautes Fusionsprotein Signalcluster erzeugt, kann man nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die eingeführten Domänen GST und Flag möglicherweise die Clusterbildung bei CD40L verhindern. Die in Abbildung 11 gezeigten YFP-Fusionsproteine des CD40L, von denen sich das GST-Fusionsprotein des CD40L ableitet, waren zu einer sichtbaren Rezeptorclusterbildung fähig. Es bleibt daher in nachfolgenden Experimenten zu klären, warum das GST-Fusionsprotein des CD40L keine mikroskopisch sichtbare CD40-Aggregation erlaubt.

6. Zusammenfassung

TNF-Liganden liegen primär in membranständiger Form mit trimerer Struktur vor und die meisten von ihnen können sekundär durch Metalloproteasen in lösliche trimere Liganden prozessiert werden. Während membranständige Formen der TNF-Liganden ihre korrespondierenden Rezeptoren aktivieren können, sind die löslichen Varianten einzelner TNF-Liganden unterschiedlich aktiv beziehungsweise inaktiv an den korrespondierenden Rezeptoren, obwohl sie ebenfalls zur Bindung in der Lage sind. Dies konnte bereits in Studien für TNF und TRAIL gezeigt werden. Die Unterschiede zwischen löslichen Varianten und der membranständigen Form des Liganden betreffen sowohl die Rezeptorselektivität als auch den Aktivierungsgrad am Rezeptor bis hin zu völliger Inaktivität der löslichen Form. Unterschiede finden sich jedoch nicht nur hinsichtlich der Aktivität, sondern auch in der Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor. Für die membranständige und die lösliche Form von FasL konnten Unterschiede in der Notwendigkeit intrazellulärer Signalmoleküle bei der Ausbildung Ligand-induzierter Rezeptorsignalcluster gezeigt werden. Für die lösliche und membranständige Form des CD40L werden eine unterschiedliche Rezeptorinternalisierung und eine unterschiedliche Rekrutierung von TRAF-Molekülen angenommen. Bisherige Arbeiten zur Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Interaktion stützen sich meist auf lösliche Varianten von TNF-Liganden, die durch artifizielle Multimerisierung oder Ak-induzierte Quervernetzung sekundär aktiviert werden müssen. Um für die Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Interaktion in Zukunft realitätsnähere Bedingungen zu schaffen, sollten im Rahmen dieser Arbeit multifunktionelle Fusionsproteine des membranständigen FasL und CD40L hergestellt und charakterisiert werden. Die Fusionsproteine wurden im Rahmen der Klonierung so konstruiert, dass von der aminoterminalen Seite beginnend eine GST-Domäne, ein Flag-Tag, ein YFP-Tag und abschließend die vollständige membranständige Form des Liganden (FasL oder CD40L) aneinander gefügt wurden. In FACS-Analysen konnte sowohl die Funktion des YFP-Tag als auch die korrekte Expression des Liganden an der Zelloberfläche durch spezifische Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Die funktionelle Aktivität der Liganden wurde durch IL-8-Induktion gezeigt, die eine

Aktivierung des NF κ B-Signalweges durch die GST-Fusionsproteine des membranständigen FasL und des membranständigen CD40L beweist.

Im Rahmen von Immunopräzipitationen wurde die Möglichkeit der Detektion der Fusionsproteine über ihr Flag-Tag getestet. Für das in GST-pull-down-Assays genauer untersuchte membranständige GST-Flag-YFP-CD40L-Fusionsprotein gelang eine Koimmunopräzipitation mit dem im Rezeptorkomplex gebundenen TRAF2. Für dieses in der Signaltransduktion des CD40 entscheidende Molekül konnte seine transiente Interaktion mit dem Rezeptorsignalkomplex sowie eine Veränderung in der Assoziation an den Rezeptor durch TNF-abhängige TRAF1-Induktion gezeigt werden. Im Zusammenhang der mit der Rezeptoraktivierung oftmals gleichgesetzten Bildung von Rezeptorsignalclustern durch den entsprechenden TNF-Liganden war die Beobachtung interessant, dass das Konstrukt GST-Flag-YFP-CD40L im Gegensatz zum analog konstruierten GST-Flag-YFP-FasL nicht in der Lage war, Signalcluster des korrespondierenden Rezeptors zu erzeugen, aber dennoch fähig war, eine Rezeptoraktivierung zu bewirken. Hinsichtlich der Untersuchung von Unterschieden in der Rezeptor-Ligand-Interaktion von löslichen und membranständigen Formen sind für FasL und CD40L noch viele Fragen offen, die beispielsweise auch die Stabilität von Rezeptorsignalclustern betreffen. Die in dieser Arbeit erzeugten und charakterisierten multifunktionellen Fusionsproteine sollten helfen, neue Erkenntnisse bezüglich der molekularen Grundlagen der Rezeptor-Ligand-Interaktion zu erzielen.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-3-ethylenbenzthiaolinsulfonsäure
Ak	Antikörper
APS	Ammonium-Persulfat
AS	Aminosäure(n)
ASM	Acid Sphingomyelinase
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia 2
°C	Grad Celcius
Caspase	Cysteinyll Aspartat-spezifische Protease
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
c-IAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
CD40	Cluster of Differentiation 40
CD40L	CD40-Ligand
CD95	Cluster of Differentiation 95
cFLIP	cellular FLIP
CHX	Cycloheximid
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
Diablo	Direct IAP Binding Protein with low PI
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid
DRs	Death Receptors (Todesrezeptoren)
DTT	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated DD Protein

FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum
Flag-sCD40L	Flag markierter löslicher CD40-Ligand
FLICE	FADD-Like ICE = Caspase-8
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
FLIP _{S/L}	FLIP short/long
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
HtrA2/Omi	High temperature requirement protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICE	Interleukin-1beta-Converting Enzyme
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB Kinase Komplex
IκB	Inhibitor of NFκB
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LMA-Gel	Low Melting Agarose-Gel
M	Molar (Mol/ Liter)
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCS	Multi-Cloning-Site
memCD40L	membranständiger CD40-Ligand
memFasL	membranständiger Fas-Ligand
min	Minute(n)
mM	Millimolar
nm	Nanometer
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NGF	Nerve Growth Factor

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PLAD	Pre-Ligand Assembly Domain
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor-Interacting Protein
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sCD40L	soluble CD40-Ligand
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFasL	soluble Fas-Ligand
sTNF	soluble Tumor Necrosis Factor
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SPOTS	Signaling Protein Oligomeric Transduction Structures
tBid	truncated Bid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIM	TRAF-interacting Motif
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
TRADD	TNF-Receptor Associated Death Domain Protein
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
WB	Westernblot
z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-ke-ton

8. Literaturverzeichnis

1. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*. Jun 15 1995;85(12):3378-3404.
2. Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol*. Jun 1994;6(3):407-413.
3. Cosman D. Hematopoietic Cell Growth Factors and Their Receptors: Blood Cell Biochemistry. In: Whetten AD, Gordon J, eds. Vol 7. New York: Plenum Press; 1996.
4. Lotz M, Setareh M, von Kempis J, et al. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *J Leukoc Biol*. Jul 1996;60(1):1-7.
5. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. Feb 23 2001;104(4):487-501.
6. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. Dec 1 1995;83(5):793-802.
7. Grell M, Wajant H, Zimmermann G, et al. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 20 1998;95(2):570-575.
8. Chan FK. The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis*. Nov 2000;59 Suppl 1:i50-53.
9. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. Jun 30 2000;288(5475):2351-2354.
10. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, et al. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. Jun-Aug 2003;14(3-4):193-209.
11. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J*. May 1989;8(5):1403-1410.

12. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol.* 1996;61:1-77.
13. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-135.
14. Torres RM, Clark EA. Differential increase of an alternatively polyadenylated mRNA species of murine CD40 upon B lymphocyte activation. *J Immunol.* Jan 15 1992;148(2):620-626.
15. Agis H, Fureder W, Bankl HC, et al. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology.* Apr 1996;87(4):535-543.
16. Ohkawara Y, Lim KG, Xing Z, et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest.* Apr 1 1996;97(7):1761-1766.
17. Yellin MJ, Brett J, Baum D, et al. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med.* Dec 1 1995;182(6):1857-1864.
18. Van Den Berg TK, Hasbold J, Renardel De Lavalette C, et al. Properties of mouse CD40: differential expression of CD40 epitopes on dendritic cells and epithelial cells. *Immunology.* Jun 1996;88(2):294-300.
19. Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Rattis FM, et al. Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol.* Nov 1 1995;155(9):4241-4247.
20. Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, et al. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol.* Aug 1995;58(2):209-216.
21. Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, et al. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* Jun 1996;26(6):1371-1377.
22. Carbone A, Gloghini A, Gattei V, et al. Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood.* Feb 1 1995;85(3):780-789.

23. Pammer J, Plettenberg A, Weninger W, et al. CD40 antigen is expressed by endothelial cells and tumor cells in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*. May 1996;148(5):1387-1396.
24. Ishida T, Mizushima S, Azuma S, et al. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem*. Nov 15 1996;271(46):28745-28748.
25. Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, et al. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*. Aug 25 1998;37(34):11836-11845.
26. Tsukamoto N, Kobayashi N, Azuma S, et al. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 16 1999;96(4):1234-1239.
27. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Hausser A, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. Jan 2 2004;279(1):677-685.
28. Brown KD, Hostager BS, Bishop GA. Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J Biol Chem*. May 31 2002;277(22):19433-19438.
29. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *Embo J*. Dec 1992;11(12):4313-4321.
30. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. May 7 1992;357(6373):80-82.
31. Peitsch MC, Jongeneel CV. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int Immunol*. Feb 1993;5(2):233-238.
32. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem*. Mar 15 1996;271(11):5965-5967.

33. Grassme H, Bock J, Kun J, et al. Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem*. Aug 16 2002;277(33):30289-30299.
34. Haswell LE, Glennie MJ, Al-Shamkhani A. Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154. *Eur J Immunol*. Oct 2001;31(10):3094-3100.
35. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, et al. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest*. May 1 1996;97(9):2063-2073.
36. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature*. Sep 23 1993;365(6444):340-343.
37. Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol*. Mar 1995;25(3):863-865.
38. Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, et al. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol*. Nov 15 1996;157(10):4363-4370.
39. Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, et al. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*. Jun 1993;5(6):657-663.
40. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. Jul 26 1991;66(2):233-243.
41. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. May 25 1993;268(15):10932-10937.
42. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, et al. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. Sep 10 1993;74(5):845-853.
43. Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, et al. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol*. Aug 2 2004;166(3):369-380.
44. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. Feb 2003;14(1):53-66.

45. Siegel RM, Muppidi JR, Sarker M, et al. SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol.* Nov 22 2004;167(4):735-744.
46. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* Apr 20 1998;187(8):1205-1213.
47. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, et al. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* Dec 15 1997;186(12):2045-2050.
48. Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, et al. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol.* Mar 28 2005;168(7):1087-1098.
49. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.* Jun 2003;15(3):185-193.
50. Sato T, Selleri C, Anderson S, et al. Expression and modulation of cellular receptors for interferon-gamma, tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol.* May 1997;97(2):356-365.
51. Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, et al. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine.* Jun 1997;9(6):394-404.
52. Hochman PS, Majeau GR, Mackay F, et al. Proinflammatory responses are efficiently induced by homotrimeric but not heterotrimeric lymphotoxin ligands. *J Inflamm.* 1995;46(4):220-234.
53. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med.* Nov 1 1995;182(5):1223-1230.
54. Ramaswamy M, Siegel RM. A FAScinating receptor in self-tolerance. *Immunity.* May 2007;26(5):545-547.
55. Mandik L, Nguyen KA, Erikson J. Fas receptor expression on B-lineage cells. *Eur J Immunol.* Nov 1995;25(11):3148-3154.

56. Shinohara S, Sawada T, Nishioka Y, et al. Differential expression of Fas antigen and Bcl-2 protein on CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and monocytes. *Cell Immunol.* Jul 1995;163(2):303-308.
57. Druilhe A, Cai Z, Haile S, et al. Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils. *Blood.* Apr 1 1996;87(7):2822-2830.
58. Nishimura Y, Ishii A, Kobayashi Y, et al. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J Immunol.* May 1 1995;154(9):4395-4403.
59. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol.* Feb 15 1992;148(4):1274-1279.
60. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol.* Oct 1994;6(10):1567-1574.
61. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, et al. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J.* Mar 15 1995;14(6):1129-1135.
62. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* Mar 15 1997;57(6):1007-1012.
63. Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, et al. Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4⁺ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J Immunol.* Mar 1 1997;158(5):2456-2463.
64. Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med.* Mar 1 1995;181(3):1235-1238.
65. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, et al. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol.* Sep 1 1996;157(5):1919-1925.
66. Lu L, Qian S, Hershberger PA, et al. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol.* Jun 15 1997;158(12):5676-5684.

67. Hahne M, Renno T, Schroeter M, et al. Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J Immunol*. Mar 1996;26(3):721-724.
68. Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, et al. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol*. Jan 1996;70(1):199-206.
69. Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, et al. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 24 1994;91(11):4930-4934.
70. Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, et al. Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 10 1997;94(12):6420-6425.
71. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*. Feb 2003;23(4):1428-1440.
72. Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, et al. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*. Jul 5 2001;20(30):4101-4106.
73. Chen Y, Chen J, Xiong Y, et al. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 23 2006;345(1):106-117.
74. Baccam M, Bishop GA. Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF-kappaB-independent IL-6 production in B cells. *Eur J Immunol*. Dec 1999;29(12):3855-3866.
75. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, et al. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*. Jan 2002;22(1):207-220.
76. Xie P, Hostager BS, Munroe ME, et al. Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol*. May 1 2006;176(9):5388-5400.
77. Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 25 1996;93(13):6721-6725.

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant, der mir meine Dissertation ermöglicht und mich bei meinem Promotionsvorhaben stets konstruktiv und positiv begleitet hat, einen besonderen Dank für seine Unterstützung aussprechen.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Franz Kehl für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates.

Dem gesamten Team des Instituts für Molekulare Innere Medizin, insbesondere Herrn Dr. Frank Henkler (PhD) sowie Herrn Dr. rer. nat. Andreas Wicovsky, danke ich für die gute Betreuung und kollegiale Zusammenarbeit.

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich, möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht und mir bei meinem Promotionsvorhaben immer den nötigen Rückhalt gegeben haben.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN:

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Konfession: röm.-kath.
- Geburtsdatum: 07.03.1981
- Geburtsort: Würzburg
- Eltern: Dipl.-Volksw. Hans Joachim Schenkhoff
Irmgard Beate Schenkhoff
- Geschwister: Ulrich (geb. 1974), Bernhard (geb. 1978)

SCHULISCHE AUSBILDUNG:

- September 1987 Einschulung in die Grundschule Reichenberg, Lkr. Würzburg
- September 1991 Aufnahme in das Wirsberg-Gymnasium in Würzburg
- September 1995 Umzug nach Weimar, Besuch des Goethe-Gymnasiums
- Juli 1999 Allgemeine Hochschulreife am Goethe-Gymnasium in Weimar

ZIVILDIENST:

- 01.09.99-31.07.00 Pflegedienst im Sophien- und Hufeland-Klinikum Weimar

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

- 16.10.2000 Beginn des Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
- 03.09.2002 Ärztliche Vorprüfung
- 28.08.2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 12.04.2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 30.05.2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 01.06.2007 Approbation als Arzt

FAMULATUREN UND PRAKTISCHES JAHR:

- 17.02.-18.03.03 Kardiologie im St. Franziskus-Hospital in Münster
- 01.09.-30.09.03 Allgemeine Chirurgie und Traumatologie in Regensburg
- 01.09.-30.09.04 Innere Molekulare Medizin am Universitätsklinikum Würzburg
- 14.03.-28.03.05 Anästhesiologie im Kreisklinikum Großburgwedel
- 22.08.-09.09.05 Anästhesiologie in der Universitätsklinik Münster
- 24.04.-13.08.06 Anästhesiologisches Tertial im Klinikum Aschaffenburg
- 04.12.06-28.01.07 Internistisches Tertial im Universitätsklinikum Würzburg

AUSLANDSAUFENTHALTE:

- 14.08.-03.12.06 Chirurgisches Tertial am Universitätsspital Basel in den Bereichen Traumatologie, Visceral- und Gefäßchirurgie und der chirurgischen Ambulanz der interdisziplinären Notfallstation
- 05.02.-01.04.07 Internistisches Tertial an der University of Rochester NY, School of Medicine and Dentistry (USA) in den Bereichen Kardiologie, Infektionsmedizin und Gastroenterologie

STIPENDIEN:

- 01.10.03-30.05.07 Stipendiat in der Begabtenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.
- 02.02.07-01.04.07 Homberger-Stipendium der Universität Würzburg zur Förderung eines Studienaufenthalts an der University of Rochester NY. (USA)

BERUFLICHER WERDEGANG:

- seit 03.09.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Münster

Münster, den 22.09.2007

