

CD95-induced Apoptosis in Health and Disease

Dimers at the DISC and the Effect of c-FLIP_R on *L. Monocytogenes* Infection

Death Receptor (DR)-induced apoptosis is an essential mechanism to retain homeostasis in the immune system. Upon Death Receptor stimulation Caspase-8, -10 and c-FLIP are recruited to the Death inducing Signaling Complex (DISC). Caspase-8 is assumed to form heterodimers with c-FLIP and caspase-10 as well as caspase-8-caspase-8 homodimers. Experiments with altered DEDs or kosmotropic salts showed dimer formation of these molecules. Nevertheless, the exact dimer composition in living cells with unaltered recruitment domains has never been shown. Here caspase-8-caspase-8 homodimers and caspase-8-c-FLIP and caspase-8-caspase-10 heterodimers were shown for the first time in living cells with unaltered recruitment domains. c-FLIP proteins are known to act regulatory at the DISC. The short isoforms, c-FLIP_S and c-FLIP_R, have been shown to act anti-apoptotic. Mice express c-FLIP_R as solely short isoform. However previously described transgenic mouse models overexpress the human short isoform c-FLIP_S. Here c-FLIP_R was analyzed in a transgenic mouse model under control of the *vav* promotor. During steady state conditions mild alterations of B cell maturation stages were detected, B and T cell numbers were similar between *vavFLIP_R* mice and wildtype littermates. Interestingly, after *L. monocytogenes* infection *vavFLIP_R* mice showed a reduced bacterial burden and less liver necrosis compared to wildtype littermates. This suggest, that c-FLIP_R is beneficial for the clearance of *L. Monocytogenes* infections. Further analyses of this may be of interest for therapeutic interference with Listeriosis. Taken together caspase-8 forms homodimers and heterodimers with c-FLIP and caspase-10 and constitutive expression of c-FLIP_R in hematopoietic cells leads to an improved clearance of *L. Monocytogenes* infection.

CD95-induced Apoptosis in Health and Disease

Dimers at the DISC and the Effect of c-FLIP_R on *L. Monocytogenes* Infection

Veränderte Todesrezeptor-induzierte Apoptose spielt eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Autoimmunität, neurodegenerativen und onkologischen Erkrankungen. Todesrezeptoren, wie CD95 oder TRAIL Rezeptoren, werden durch extrazelluläres Binden ihrer jeweiligen Liganden aktiviert. Daraufhin rekrutieren sie intrazellulär einen Proteinkomplex namens DISC (Death Inducing Signaling Complex). Caspase-8 und -10 sind Bestandteile dieses Komplexes und werden dort gespalten und aktiviert. Hierbei wird vermutet, dass Caspase-8 Homodimere und mit c-FLIP sowie mit Caspase-10 Heterodimere bildet. Jedoch wurde dies nie mit Proteinen mit unveränderten Rekrutierungsdomänen in lebenden Zellen gezeigt. Das Verhältnis von c-FLIP zu Caspase-8 entscheidet über das Ergebnis des Signalwegs, ob die Zelle in Apoptose geht oder proliferiert und NF-κB aktiviert. Die kurzen Isoformen von c-FLIP wirken anti-apoptotisch, indem sie mit Caspase-8 um die Bindung an das Adapter Molekül FADD konkurrieren und die Aktivierung und Spaltung der caspase-8 verhindern. Mäuse exprimieren neben der langen Isoform, c-FLIP_L, nur eine kurze Isoform, c-FLIP_R. Bereits bekannte transgene Mausmodelle überexprimieren jedoch das humane c-FLIP_S anstelle des murinen c-FLIP_R.

In dem hier beschriebenen Projekt wurden transgene Mäuse, welche c-FLIP_R unter dem vav Promoter überexprimieren charakterisiert. Die Mäuse zeigen leichte Änderungen im Bezug auf B-Zell-Entwicklungsstadien. Bezüglich der absoluten T- und B-Zellzahlen gibt es jedoch keine Unterschiede. Durch Mutationen von CD95 oder des CD95 Liganden veränderte Apoptose ist als Ursache von Autoimmunität beim humanen Autoimmunen Lymphoproliferative Syndrom (ALPS) und bei den Mausmodellen *gld* und *lpr* bekannt. Hierbei wurde eine Akkumulation von doppelt negativen (DN; CD3⁺CD4⁻CD8⁻) Zellen beschrieben. Diese Zellen unterscheiden sich jedoch

zwischen jungen vavFLIP_R Mäusen und Wildtyp Geschwistertieren nicht. Die Mäuse wurden mit *L. Monocytogenes* infiziert um den Effekt von c-FLIP_R auf die Immunantwort nach *L. Monocytogenes* Infektion zu analysieren. Es ist bekannt, dass *L. Monocytogenes* Infektion zu einer massiven Lymphozytenapoptose und zu Nekrosen in Leber und Milz führt. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen vavFLIP_R Mäusen und Wildtyp Geschwistertieren. vavFLIP_R Mäuse haben nach *L. Monocytogenes* Infektion eine geringere Anzahl Bakterien in Leber und Milz und weniger Nekroseherde in der Leber. Eine Analyse der Lymphozytenapoptose nach *L. Monocytogenes* Infektion zeigte ebenfalls weniger apoptotische Zellen in vavFLIP_R Mäusen als in Wildtyp Tieren. Der genaue Signalweg, der zur Lymphozyten Apoptose nach *L. Monocytogenes* Infektion führt, ist unbekannt. Die Tatsache, dass c-FLIP_R Expression die Anzahl apoptotischer Lymphozyten nach einer Infektion verändert deutet auf eine Beteiligung von Todesrezeptor-induzierten Signalwegen hin. Eine weitere Analyse der Rolle von kurzen c-FLIP Isoformen bei *L. Monocytogenes* Infektion ist auch in Bezug auf die Behandlung von Listerien Infektionen bei Menschen interessant, da Listeriose eine der Hauptursachen für Lebensmittelvergiftungen darstellt. Auf molekularer Ebene wurde die Bildung von Dimeren am DISC mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementation analysiert. Hierbei werden Zellen mit Konstrukten transfiziert, welche, neben dem entsprechendem Protein, auch für ein Fluoreszenz-Fragment kodieren. Interagieren die Proteine nach ihrer Expression bildet sich das vollständige Fluoreszenz Protein Venus und kann mittels Mikroskop oder FACS detektiert werden. Hier konnte gezeigt werden, dass Caspase-8 in lebenden Zellen mit natürlich vorkommenden Rekrutierungsdomänen sowohl Caspase-8-Caspase-8 Homodimere, als auch caspase-8-c-FLIP_L und Caspase-8-Caspase-10 Heterodimere bilden kann.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Caspase-8 Homodimere und Heterodimere mit c-FLIP und Caspase-10 bildet. Konstitutive Expression von c-FLIP_R in hematopoetischen Zellen führt zu einer verbesserten Kontrolle der Immunantwort nach *L. Monocytogenes* Infektion.