

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Regulation antigeninduzierter T-Zell Aktivierung durch
Integration stimulierender und inhibitorischer Signale**

**Lutz Zeitlmann
aus
München**

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Waldemar Kolanus betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 03.11.2000

Lutz Zeitlmann

Dissertation eingereicht am	08.11.2000
1. Gutachter	Prof. Dr. Waldemar Kolanus
2. Gutachter	Prof. Dr. Rudolf Grosschedl
Mündliche Prüfung am	07.02.2001

*Serendipity
is looking for a needle in a haystack and finding
the farmer's daughter*

Edmond H. Fischer

Nobel Prize Laureate in Physiology or Medicine 1992

*"for discoveries concerning
reversible protein phosphorylation
as a biological regulatory mechanism"*

DANKSAGUNGEN

Ohne die Hilfe zahlreicher Personen wäre die Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht denkbar gewesen.

Zunächst möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, deren Verständnis und großes Engagement in allen Bereichen eine wichtige Stütze waren.

Ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus für die Vergabe des Themas, dem kontinuierlichen Interesse am Fortgang der Arbeit und dem gewährten Freiraum zur eigenen wissenschaftlichen Entfaltung.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens und zusammen mit Herrn Prof. Dr. Winnacker für die Etablierung und Leitung des Genzentrums.

Unmittelbaren Anteil an Publikationen zu dieser Arbeit hatten Thomas Knorr, Michael Knoll und Pinar Sirim, für deren tatkräftige Unterstützung ich mich herzlich bedanke.

Meinen beiden Mitstreitern in Raum 2.20, Dr. Wolfgang Nagel und Pierre Schilcher, möchte ich für die freundschaftliche Stimmung im Labor und den wissenschaftlichen und persönlichen Austausch danken.

Allen übrigen Mitarbeitern des Genzentrums, insbesondere denen in unmittelbarer Nachbarschaft des zweiten Stockwerks, danke ich für die herzliche und produktive Atmosphäre am Institut.

Pinar Sirim bin ich außerdem dankbar für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit.

Die vorliegenden Studien wurde im Zeitraum vom September 95 bis September 2000 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus am Genzentrum - Laboratorium für Molekulare Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits früher veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

- 1) **Zeitlmann L, Sirim P, Kremmer E, Kolanus W.**: Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4. *In Druck, J Biol Chem*.
- 2) **Sirim P, Zeitlmann L, Falk CS, Schendel DJ, Kolanus W.**: Calcium signaling through the beta-2 cytoplasmic domain of LFA-1 requires intracellular elements of the T cell receptor complex. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.
- 3) **Geiger C, Nagel W, Boehm T, van Kooyk Y, Figdor CG, Kremmer E, Hogg N, Zeitlmann L, Dierks H, Weber KS, Kolanus W.** (2000): Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J* **19**: 2525-36.
- 4) **Nagel W, Schilcher P, Zeitlmann L, Kolanus W.** (1998): The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol Biol Cell* **9**: 1981-94.
- 5) **Zeitlmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W.** (1998): T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem* **273**: 15445-52.
- 6) **Nagel W, Zeitlmann L, Schilcher P, Geiger C, Kolanus J, Kolanus W.** (1998): Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* **273**: 14853-61.
- 7) **Kolanus W, Zeitlmann L.** (1998): Regulation of integrin function by inside-out signaling mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol* **231**: 33-49. (Übersichtsartikel).
- 8) **Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, Seed B.** (1996): Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**: 233-42.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Die Rolle von Lymphozyten innerhalb des Immunsystems	3
2.2 Reifung und Selektion lymphozytärer Zelltypen	4
2.3 Aktivierung von Lymphozyten	5
2.4 TCR-gekoppelte Protein-Tyrosinkinasen	6
2.5 Nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden	8
2.6 Corezeptoren der T-Zell Aktivierung	9
2.7 Funktionen des CD4-Moleküls	11
2.8 Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit	12
3 Material & Methoden	15
3.1 Spezielle Materialien	15
3.1.1 Geräte	15
3.1.2 Chemikalien	15
3.1.3 Enzyme für Molekularbiologie	16
3.1.4 DNA- und Molekulargewichtsstandards	16
3.1.5 Antikörper	16
3.1.6 Plasmide	17
3.1.7 Bakterienstämme	17
3.1.8 Eukaryotische Zelllinien	18
3.2 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen	18
3.2.1 <i>E. coli</i>	18
3.2.2 Adhärente Säugerzellen	19
3.2.3 Suspensionszellen	20
3.3 Molekularbiologische Techniken	20
3.3.1 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> im µg-Maßstab	20
3.3.2 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> im mg-Maßstab	21
3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	22
3.3.4 cDNA-Amplifikation durch PCR	22
3.3.5 PCR-Mutagenese	23
3.3.6 Enzymatische Restriktion von DNA	24
3.3.7 Erzeugung von nicht-überhängenden DNA-Enden	25
3.3.8 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	25
3.3.9 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen	26

3.3.10	DNA-Ligation-----	26
3.3.11	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mittels CaCl ₂ -----	27
3.3.12	Transfektion von COS7-Zellen mittels DEAE-Dextran -----	29
3.3.13	Calcium-Phosphat-Transfektion von CV-1 Zellen-----	30
3.3.14	Transfektion eukaryontischer Zelllinien mittels Elektroporation -----	30
3.3.15	Infektion humaner T-Zellen durch rekombinante Vaccinia-Viren -----	31
3.4	<i>Proteinbiochemische Methoden</i> -----	32
3.4.1	Proteinreinigung aus <i>E. coli</i> -----	32
3.4.2	Gesamtzellysate eukaryotischer Zellen -----	33
3.4.3	Zellfraktionierungsexperimente-----	33
3.4.4	Immunpräzipitation -----	33
3.4.5	<i>In vitro</i> Kinase-Assay-----	35
3.4.6	SDS-Gelelektrophorese-----	36
3.5	<i>Immunologische Arbeitstechniken</i> -----	37
3.5.1	Westernblot-----	37
3.5.2	Immuofluoreszenz-Mikroskopie-----	38
3.5.3	Durchflußzytometrie -----	38
3.5.4	ELISA -----	38
3.6	<i>T-Zell Funktionsanalysen</i> -----	39
3.6.1	Calcium-Influx-----	39
3.6.2	Promotoraktivierungsstudien -----	40
3.6.3	Antigenabhängige T-Zell Aktivierung -----	40
4	Ergebnisse zu ZAP-70 -----	43
4.1	<i>Mechanismen der Kooperativität zwischen ZAP-70 und p56^{lck}</i> -----	43
4.1.1	IL-2 Promotoraktivierung nach Aggregation von ZAP-70 und p56 ^{lck} -----	44
4.1.2	Die Protein-Interaktionsdomänen von p56 ^{lck} kooperieren funktionell mit ZAP-70-----	46
4.1.3	Potentielle Substrate des minimalisierten T-Zell-Antigenrezeptors -----	48
4.2	<i>In vivo Funktionsanalysen von Tyrosin-Substitutionsmutanten der Syk-Kinasen</i> -----	50
4.2.1	Transiente Überexpression von ZAP-70 und Syk Mutanten -----	51
4.2.2	Die ZAP YF-C Mutante ist in funktioneller Hinsicht konstitutiv aktiv -----	52
4.2.3	Die YF-C Mutation resultiert in funktioneller Hyperaktivität von p72 ^{Syk} -----	55
4.3	<i>Analysen zum Mechanismus der funktionellen Hyperaktivität von YF-C Mutanten der Syk-Kinasen</i> -----	56
4.3.1	<i>In vitro</i> Kinaseaktivität der ZAP-70 Mutanten -----	56
4.3.2	Funktionelle Analyse in Syk-defizienten DT40 Zellen -----	57
4.3.3	Funktionelle Analyse in TCR-defizienten Jurkat T3.5 Zellen -----	59
4.3.4	Funktionelle Analyse in Lck-defizienten JCaM1 Zellen-----	60
4.4	<i>Identifikation potentieller in vivo Substrate von ZAP und Syk YF-C</i> -----	64
4.4.1	Expression der YF-C Mutanten induziert die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine -----	64
4.4.2	ZAP YF-C assoziiert mit Phosphoproteinen von 21 und 23 kD-----	66
4.4.3	Die TCR-ζ Kette wird nach Expression von ZAP YF-C hyperphosphoryliert-----	67

5 Diskussion zu ZAP-70 -----73

5.1	<i>Regulation der in vitro Kinaseaktivität von ZAP-70</i>	73
5.1.1	Membranrekrutierung von Syk- und ZAP-70 substituiert für ITAM Bindung	74
5.1.2	Tyrosinreste regulieren die Kinaseaktivität von ZAP-70	74
5.2	<i>Regulation der funktionellen in vivo Aktivität von ZAP-70</i>	76
5.2.1	Die <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Aktivitätsmuster von ZAP-70 Mutanten sind nicht korreliert	77
5.2.2	Proximität zu Substraten reguliert die funktionelle Aktivität von ZAP-70	80
5.3	<i>Potentielle in vivo Substrate von ZAP-70</i>	81
5.3.1	Substrate nach Quervernetzung mit Kinase-inaktiven p56 ^{lck} Molekülen	82
5.3.2	Substrate der konstitutiv aktiven ZAP YF-C Mutante	86
5.3.3	Phosphorylierung der TCR- ζ -Kette in Abhängigkeit von ZAP-70: Ein potentieller Mechanismus zur Signalamplifikation durch positive Rückkopplung	88
5.4	<i>Ausblick</i>	92

6 Ergebnisse zu ACP33 -----93

6.1	<i>Sequenzanalyse der ACP33 cDNA</i>	93
6.1.1	Sequenzmotive auf Aminosäure-Ebene	95
6.1.2	Homologieanalyse	95
6.1.3	Sekundärstrukturvorhersage	99
6.2	<i>Expressionsanalysen</i>	100
6.2.1	Expressionsmuster des endogenen ACP33 Proteins	101
6.2.2	Expression von ACP33-Fusionsproteinen	102
6.3	<i>Enzymtest und Bindungsstudien</i>	102
6.3.1	Hydrolaseaktivitätsassay	102
6.3.2	Copräzipitation von CD4 mit cIg-ACP33	104
6.3.3	Mutationsanalyse der CD4 Interaktion mit cIg-ACP33	105
6.3.4	Copräzipitation von flag-ACP33 mit sIg-CD4	107
6.4	<i>Subzelluläre Lokalisationstudien</i>	108
6.4.1	Biochemische Zellfraktionierung	108
6.4.2	Immunofluoreszenzanalyse	110
6.4.3	Colokalisation von ACP33 mit CD4 in HUT78 T-Zellen	112
6.5	<i>Funktionsanalysen von CD4-Deletionsmutanten</i>	114
6.5.1	CD4-Funktion in antigenabhängiger T-Zell Aktivierung	114
6.5.2	Lck-unabhängige CD4 Funktion in JCaM1 Zellen	118
6.6	<i>Funktionsanalysen nach Überexpression von ACP33</i>	120
6.6.1	Überexpression von sIg-ACP33 resultiert in T-Zell Aktivierung	120
6.6.2	Serinrest 109 und p56 ^{lck} sind nicht-essentiell für die Aktivität von sIg-ACP33	121

7 Diskussion zu ACP33 ----- 123

7.1	<i>Grundlegende Charakterisierung des ACP33 Proteins</i> -----	123
7.1.1	ACP assoziiert mit Vesikeln des endosomalen/trans-Golgi Netzwerks -----	123
7.1.2	ACP33 ist ubiquitär exprimiert -----	124
7.1.3	Hydrophobe C-Termini von Peptiden als Liganden für ACP33 -----	125
7.2	<i>ACP33: Enzym oder Adapterprotein ?</i> -----	128
7.2.1	Sequenzanalyse von ACP33 -----	128
7.2.2	Katalytische Funktion ist nicht nachweisbar -----	129
7.2.3	Serinrest 109 ist essentiell für Ligandenbindung -----	131
7.3	<i>ACP33 als modulierender Faktor der CD4-Funktion</i> -----	132
7.3.1	Copräzipitationsanalysen von ACP33 und CD4 in T-Zellen -----	132
7.3.2	Partielle Colokalisation von ACP33 und CD4 in T-Zellen -----	133
7.3.3	Deletion des ACP33-Interaktionsmotivs steigert die costimulatorische Funktion von CD4 ----	133
7.4	<i>Potentielle Mechanismen der inhibitorischen Aktivität von ACP33</i> -----	134
7.4.1	Inhibition stimulatorischer Signaltransduktion durch ACP33 -----	135
7.4.2	Attenuation der CD4-vermittelten Costimulation von T-Zell Aktivierung -----	137
7.4.3	Inhibitorische Signaltransduktion durch CD4 -----	138
7.4.4	Funktionelle Analysen nach Überexpression von ACP33-Fusionsproteinen -----	140
7.5	<i>Ausblick</i> -----	142

8 Anhang ----- 143

8.1	<i>Literaturverzeichnis</i> -----	143
8.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> -----	161
8.3	<i>Tabellarischer Lebenslauf</i> -----	165

1 Zusammenfassung

Die Aktivierung naiver Lymphozyten bezeichnet einen komplexen, immunmodulatorischen Prozeß, in dessen Verlauf mitotisch inaktive B- und T-Zellen als Folge des Kontakts mit Antigen in den Zellzyklus eintreten, proliferieren und anschließend zu spezifischen Effektorzellen oder zu langlebigen Gedächtniszellen differenzieren. Die klonale Expansion von Lymphozyten ist somit einerseits bedeutsam für die Förderung der akuten Immunantwort, andererseits ist sie auch Voraussetzung für die Etablierung von dauerhafter, adaptiver Immunität, deren zelluläre Grundlage die lymphozytären Gedächtniszellen darstellen. Auf wiederholte Antigen-Exposition reagieren Lymphozyten mit unmittelbarer und effizienter Aktivierung der Effektorfunktionen, beispielsweise der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen oder der zytotoxischen bzw. immunmodulatorischen Aktivität von T-Zellen.

Die Spezifität der Antigen-Erkennung wird in Lymphozyten durch hypervariable Antigenrezeptoren gewährleistet, deren Stimulation ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionsprozessen im Zellinneren initiiert. In T-Lymphozyten des Helfertyps resultieren diese Signalkaskaden unter anderem in der transkriptionellen Induktion des IL-2 Promotors. Das Signal des Antigenrezeptors wird jedoch moduliert durch die Aktivität von Corezeptoren, im Falle von T-Helferzellen beispielsweise unter Beteiligung des CD4-Moleküls. CD4 bindet an konstante Bereiche der antigenpräsentierenden MHC-II-Moleküle und stabilisiert so deren Interaktion mit dem T-Zell-Antigenrezeptor (TCR). Detaillierte Untersuchungen zu den Mechanismen der Koordination und Integration von Signalen des T-Zell-Antigenrezeptors mit denen des CD4-Moleküls bildeten das übergeordnete Thema der vorliegenden Arbeit.

Sowohl der T-Zell-Antigenrezeptor als auch CD4 gehören zu einer Klasse von Rezeptoren, deren zytoplasmatische Anteile an Proteintyrosinkinasen (PTKs) koppeln. CD4 interagiert konstitutiv und nahezu stöchiometrisch mit der src-ähnlichen Kinase p56^{lck}, welche während der Induktion von T-Zell Aktivierung eng mit der TCR-assozierten Syk-ähnlichen Kinase ZAP-70 zu kooperieren vermag. Die Verknüpfung beider Kinasen mit den nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden erfolgt durch die Phosphorylierung spezifischer Substrate, welche zu Beginn dieser Untersuchungen noch größtenteils unbekannt waren. Zwei unabhängige experimentelle Ansätze sollten eine Identifikation potentieller *in vivo* Substrate der Tyrosinkinase ZAP-70 ermöglichen. Aufgrund von Befunden mit transmembran exprimierten Kinase-Fusionsproteine konnten mehrere Phosphoproteine als wahrscheinliche Substrate von ZAP-70 bestätigt werden, die zur selben Zeit von anderen Autoren als solche diskutiert wurden. Die zweite, parallel verfolgte experimentelle Strategie zielte auf die Charakterisierung einer konstitutiv-aktiven Variante von ZAP-70, deren Expression in T-Zellen zu einer Entkopplung von stimulierenden Signalen und somit zur Phosphorylierung spezifisch nachgeschalteter Substrate führen sollte. Tatsächlich konnte - durch Substitution carboxyterminaler Tyrosinreste von ZAP-70 - eine funktionell konstitutiv-aktive Mutante generiert und deren Substrate *in vivo* analysiert werden. Dieser Ansatz resultierte in der Charakterisierung einer bislang unvermuteten, positiv-regulatorischen Rückkopplungsschleife

zwischen ZAP-70 und der ζ -Untereinheit des T-Zell-Antigenrezeptors. Dieser Rückkopplungsmechanismus könnte bedeutsam sein für die Amplifikation von Signalen des T-Zell Rezeptors. Dem Carboxyterminus von ZAP-70 würde somit entscheidendes Potential zur Modulation von T-Zell Aktivierung zukommen.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der funktionellen Charakterisierung des bislang unbekanntes Proteins ACP33, welches im Vorfeld als ein potentieller Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von CD4 identifiziert worden war. Verschiedene Befunde hatten zuvor darauf schließen lassen, daß - neben p56^{lck} - alternative intrazelluläre Liganden von CD4 existieren könnten. Mittels der *Two-Hybrid* Methodik konnte daraufhin die cDNA des ACP33 Proteins kloniert und zudem dessen Bindungsspezifität analysiert werden. ACP33 besitzt offenbar eine peptidbindende Domäne, welche spezifisch eine Kombination zweier hydrophober, nicht-aromatischer Aminosäurereste am Carboxyterminus von Peptiden erkennt. In der zytoplasmatischen Domäne von humanem CD4 und der aller bekannter CD4-Orthologe ist ein derartiges Interaktionsmotiv konserviert. Copräzipitationsexperimente und Mutationsanalysen bestätigten, daß C-terminale Deletionen von CD4 einen Verlust der Interaktion mit ACP33 zur Folge haben. Derselbe Effekt resultierte überraschenderweise auch aus der Substitution des Serinrestes 109 in ACP33, wodurch eine zu Hydrolasen homologe Region des ACP33 Proteins als neuartige peptidbindende Domäne identifiziert werden konnte. Funktionelle Analysen der carboxyterminalen CD4-Deletionsmutanten identifizierte das Interaktionsmotiv mit ACP33 als eine inhibitorische Determinante der antigenabhängigen T-Zell Aktivierung. ACP33 könnte demnach als eine negativ-regulatorische Komponente des Signalnetzwerkes einen bedeutenden Beitrag zur Modulation von T-Zell Aktivierung leisten.

Zusammengenommen verdeutlichen die Resultate beider Teilprojekte, daß Regulation von T-Zell Aktivierung als ein integrativer Prozeß aus stimulatorischen und inhibitorischen Signalen anzusehen ist. Detailliertere Analysen zur Koordination dieser gegensätzlichen Signale sollte in Zukunft wesentlich zu einem besseren Verständnis von T-Zell Aktivierungsprozessen beitragen.

2 Einleitung

Das menschliche Immunsystem vermag auf molekularer Ebene Abweichungen vom physiologischen Normalzustand zu erkennen und so zwischen funktionsfähigen, körpereigenen und körperfremden oder entarteten Substanzen zu diskriminieren. Molekulare Abnormalität geht in der Regel einher mit pathologischen Ereignissen, zu deren Abwehr das Immunsystem über eine Vielzahl von Effektormechanismen verfügt. Die Definition der physiologischen Norm ist jedoch in gewissem Rahmen variabel und somit an veränderte Voraussetzungen adaptierbar.

Aufgrund der essentiellen Schutzfunktion des Immunsystems hat sich im Lauf der Evolution ein immer komplexeres Repertoire an Mechanismen ausgebildet, mittels dessen Abnormalität spezifisch erkannt und bekämpft werden kann. In Vertebraten wird die Effizienz und Präzision des Immunsystems gewährleistet durch dessen ausgeprägte Diversität, Spezifität und Anpassungsfähigkeit, welche auf zellulärer, molekularer und mechanistischer Ebene verwirklicht sind. Innerhalb des Immunsystems gehören dabei Lymphozyten zu den Zelltypen, in denen die genannten Prinzipien am konsequentesten realisiert sind.

2.1 Die Rolle von Lymphozyten innerhalb des Immunsystems

Lymphozyten stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle, der lymphatischen Stammzelle, entwickeln. Die Expression funktionell relevanter Oberflächenmoleküle dient zur weiteren Unterteilung von Lymphozyten in drei übergeordnete Klassen, den B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und den Natürlichen Killerzellen. B-Lymphozyten erkennen Antigene über hochspezifische, membrangebundene Antikörper, die von aktivierten Zellen auch in löslicher Form sezerniert werden können. Antikörper vermitteln eine Vielzahl von Effektorfunktionen wie zelluläre Zytotoxizität, Phagozytose und Komplementaktivierung. T-Zellen exprimieren dagegen den strukturell ähnlichen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR), der in der Regel Peptid-Antigene im haplotypspezifischen Kontext erkennt. Proteine müssen hierzu von antigenpräsentierenden Zellen zu Peptiden prozessiert und als Komplex mit polymorphen Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert werden, welche im Gencluster des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) codiert sind. Einige nicht-polymorphe MHC-Moleküle präsentieren allerdings bakterielle Glykolipidantigene (Park S.H. und Bendelac A., 2000). Natürliche Killerzellen exprimieren dagegen keine hypervariablen Antigenrezeptoren, sondern gewinnen Spezifität aus der Integration diverser stimulierender und inhibitorischer Signale, die bislang noch unvollständig charakterisiert sind (Lanier L.L., 2000). Durch weitere Differenzierungs- und Selektionsprozesse bilden sich innerhalb dieser übergeordneten Klassen mehrere Subpopulationen aus, deren physiologische Funktion sich zum Teil erheblich unterscheidet. So können beispielsweise aktivierte T-Lymphozyten entweder zytotoxische Aktivität

gegenüber Zielzellen besitzen oder als Helfer-T-Zellen immunmodulatorische Lymphokine sezernieren. T-Helferzellen exprimieren meist das CD4-Antigen und sind MHC-Klasse-II restringiert, während zytotoxische T-Lymphozyten in der Regel CD8 als Rezeptor für nicht-polymorphe Bereiche von MHC-Klasse-I Molekülen tragen.

Zwei wesentliche Eigenschaften zeichnen T- und B-Lymphozyten gegenüber den übrigen Zelltypen des Immunsystems aus. Es sind dies zum einen die außerordentlich hohe Spezifität der Antigen-Erkennung und zum anderen das Vorhandensein eines molekularen Gedächtnisses für wiederholte Antigen-Exposition. Die Spezifität der Antigen-Erkennung wird durch molekulare Diversifizierung der Antigenrezeptoren ermöglicht, welche überwiegend auf einem kombinatorischen Rearrangement der kodierenden DNA-Abschnitte durch somatische Rekombination beruht. Defekte in Komponenten dieses Rekombinationsapparates haben den nahezu vollständigen Verlust der T- und B-Zell Funktion zur Folge und resultieren somit in einer gravierenden Form von Immundefizienz (Notarangelo L.D. *et al.*, 1999). Die Fähigkeit, nach wiederholtem Kontakt mit Antigen effizienter zu reagieren als bei der initialen Exposition, wurde als molekulares Gedächtnis des Immunsystems oder als erworbene Immunität bezeichnet. Dieses Adaptionsvermögen basiert zum einen auf antigen-induzierter Proliferation der aktivierten T- und B-Lymphozyten, andererseits aber auch auf deren fortschreitender Differenzierung zu sogenannten Gedächtniszellen.

2.2 Reifung und Selektion lymphozytärer Zelltypen

Die molekulare Diversifizierung der Antigenrezeptoren hat zur Folge, daß in großer Zahl neue Spezifitäten mit potentiell autoreaktiver Aktivität entstehen. Während ihrer Reifung unterliegen Lymphozyten deshalb Selektionsprozessen, die aus dem Repertoire zufällig generierter Antigenspezifitäten autoreaktive oder disfunktionelle Klone eliminieren. Nach welchen Kriterien kann differenziert werden, ob der Kontakt mit Antigen zur Proliferation oder zur Inaktivierung und Eliminierung der jeweiligen Zelle führt? Zum einen hat offenbar der Reifungszustand der Zellen Einfluß auf die Signaltransduktionsprozesse, welche aus einer Stimulation des Antigenrezeptors resultieren. Ohne vorherigen Kontakt mit Antigen werden beispielsweise naive T-Lymphozyten nur von sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, zu denen im wesentlichen dendritische Zellen gerechnet werden. Gedächtniszellen können demgegenüber von einer Vielzahl weiterer Zelltypen aktiviert werden. Zum anderen werden die Konsequenzen eines Antigenkontaktes auch über die Integration mit Signalen stimulatorischer oder inhibitorischer Corezeptoren moduliert. Die Liganden dieser Corezeptoren sind zum Teil induzierbar oder zelltypspezifisch exprimiert, und spiegeln so den Aktivierungszustand unspezifischer Komponenten der Immunabwehr wieder. In B-Lymphozyten können beispielsweise lösliche Chemokine oder Ligation von CD40 wichtige costimulatorische Signale beisteuern, während der Corezeptor CD28 von besonderer Bedeutung für das mitogene Potential stimulierter T-Lymphozyten zu sein scheint (Abschnitt 2.6). Ligation der Antigenrezeptoren bei fehlender Costimulation oder zusammen

mit negativ-regulatorischen Signalen könnte somit wesentlich zur Erzeugung von Toleranz gegenüber Autoantigenen beitragen. Die hierfür relevanten Schnittpunkte von spezifischer und natürlicher Immunität sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Zum Teil finden die Reifungs- und Selektionsprozesse von Lymphozyten auch in immunologisch privilegierten Organen wie dem Thymus oder dem Knochenmark statt, während proliferative Antigenaktivierung vor allem auf Lymphknoten konzentriert ist.

2.3 Aktivierung von Lymphozyten

Periphere Lymphozyten befinden sich nach ihrer Reifung in einem Stadium mitotischer Ruhe. Erst der Kontakt mit Antigen induziert den Übergang von der G_0 - in die G_1 -Phase des Zellzyklus, ein Prozeß, der im engeren Sinn als Lymphozytenaktivierung definiert ist (Abbildung 2.1). Charakteristische Veränderungen im Expressionsmuster diverser Proteine resultieren aus dem Eintritt in den Zellzyklus, beispielsweise die transkriptionelle Aktivierung

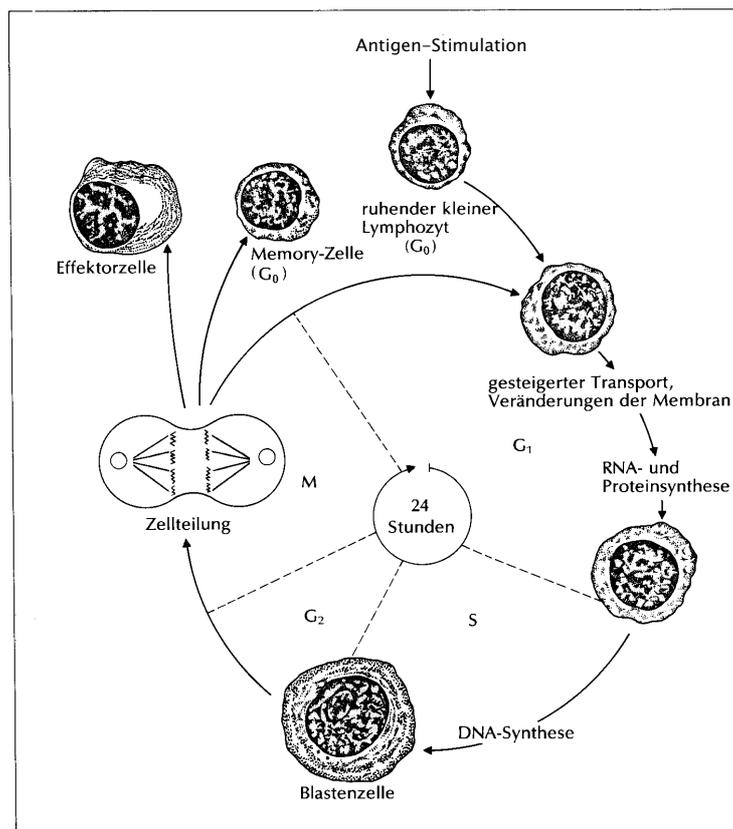


Abbildung 2.1: Schema der Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten (adaptiert nach Klein J., Immunologie, VCH Verlagsgesellschaft). Reife Lymphozyten befinden sich in einem Stadium mitotischer Inaktivität, solange kein antigener Stimulus den Eintritt in den Zellzyklus initiiert. Als lymphozytäre Aktivierung wird gemäß einer engeren Definition lediglich der Übergang von G_0 - in die G_1 -Phase des Zellzyklus bezeichnet. Nach wiederholter Zellteilung differenzieren Lymphozyten zu Effektorzellen oder zu langlebigen Gedächtniszellen, welche die zelluläre Grundlage der adaptiven Immunität darstellen.

des IL-2 Gens in stimulierten T-Helferzellen. Da IL-2 als Wachstumsfaktor an den Übergängen zwischen den nachfolgenden Zellzyklusphasen beteiligt ist, fungiert es für T-Lymphozyten als autokriner Wachstumsfaktor. Die Induktion des IL-2 Promotors durch Antigenstimulation ist allerdings in vielen immortalisierten Zelllinien und Hybridomen unabhängig vom Zellzyklusstadium zu beobachten, weshalb IL-2 Sekretion oder Promotoraktivierung oftmals als analytische Parameter für T-Zell Aktivierung herangezogen werden. Nach wiederholter Zellteilung können Lymphozyten entweder zu Effektorzellen differenzieren - B-Lymphozyten beispielsweise zu antikörperproduzierenden Plasmazellen - oder aber als langlebige Gedächtniszelle wiederum in ein Stadium mitotischer Ruhe eintreten (Abbildung 2.1).

Wie erzeugt der Antigenkontakt des T-Zell-Rezeptors ein Signal, welches ins Zellinnere übermittelt wird und letztlich im Zellkern in der Aktivierung transkriptionell regulierter Genexpression resultiert? Obwohl ein molekulares Verständnis dieser Frage durch die Komplexität der beteiligten Signalnetzwerke erschwert ist, wurden in den vergangenen Jahren umfangreiche Modelle zu Teilaspekten dieses Prozesses entwickelt (van Leeuwen J.E.M. und Samelson L.E., 1999; Kane L.P. *et al.*, 2000; Acuto O. und Cantrell D., 2000; Anton van der Merwe P. *et al.*, 2000; Lanzavecchia A. und Sallusto F., 2000).

2.4 TCR-gekoppelte Protein-Tyrosinkinasen

Der T-Zell-Antigenrezeptor liegt als ein Komplex antigenbindender Untereinheiten mit assoziierten CD3- und TCR- ζ -Ketten vor, die als akzessorische Komponenten nach Ligandenbindung die Signalübertragung ins Zellinnere vermitteln. Eine der ersten experimentell nachweisbaren Konsequenzen der Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors ist die verstärkte Phosphorylierung zellulärer Proteine an Tyrosinresten. Unter anderem werden die CD3- und TCR- ζ -Ketten innerhalb definierter Sequenzanordnungen phosphoryliert, die als Immunorezeptor-tyrosinbasierte-Aktivierungsmotive (ITAMs) bezeichnet werden. Katalysiert werden die proximalen Phosphorylierungsereignisse offenbar hauptsächlich von Tyrosinkinasen der src-Familie, deren wichtigste Vertreter in T-Lymphozyten p56^{lck} und p59^{lyn} sind. Über die Regulation von src-Kinasefunktion herrscht noch keine Klarheit, es scheint sich jedoch um ein Zusammenspiel einer Aktivierung der katalytischen Funktion (durch Dephosphorylierung eines C-terminalen Tyrosinrests) und einer Rekrutierung favorisierter Substrate in die räumliche Nähe der Kinasen zu handeln. Im ruhenden Zustand könnten src-Kinasen von ihren Substraten sequestriert werden, beispielsweise durch Kompartimentierung der Plasmamembran (Abschnitt 2.6).

Neben den ITAMs der CD3- und TCR- ζ -Untereinheiten sind Tyrosinkinasen der Syk-Familie putative Substrate von src-Kinasen. In T-Lymphozyten sind als Vertreter dieser Klasse ZAP-70 und Syk exprimiert. Während Syk in allen hämatopoetischen Zelltypen nachweisbar ist, weist ZAP-70 ein T-Zell-spezifisches Expressionsmuster auf (Chan A.C. *et al.*, 1992; Chu D.H. *et al.*, 1998). Beide Vertreter besitzen N-terminal der Kinasedomäne zwei

aufeinanderfolgende SH2-Domänen, die spezifisch an tyrosinphosphorylierte ITAMs des TCR-Komplexes binden (Hatada M.H. *et al.*, 1995). Die Kinaseaktivität von ZAP-70 scheint intrinsisch sehr gering zu sein, kann aber nach trans-Phosphorylierung durch src-Kinasen deutlich gesteigert werden. Insbesondere der Tyrosinrest 493 in der ZAP-70 Kinasedomäne scheint durch p56^{lck} und p59^{fyn} phosphorylierbar zu sein und direkt die Kinaseaktivität von ZAP-70 zu stimulieren (Wangel R.L. *et al.*, 1995; Chan A.C. *et al.*, 1995). Ein Modell der Kooperativität beider Klassen von Tyrosinkinase nach dem Wissensstand des Jahres 1995 ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Neben der Aktivierung der Kinasefunktion reguliert der Phosphotyrosingehalt des ZAP-70 Moleküls die Rekrutierung phosphotyrosinbindender Proteine. ZAP-70 erfüllt somit eine Doppelfunktion als Tyrosinkinase und als Ankerprotein zur Assemblierung multimolekularer Proteinkomplexe.

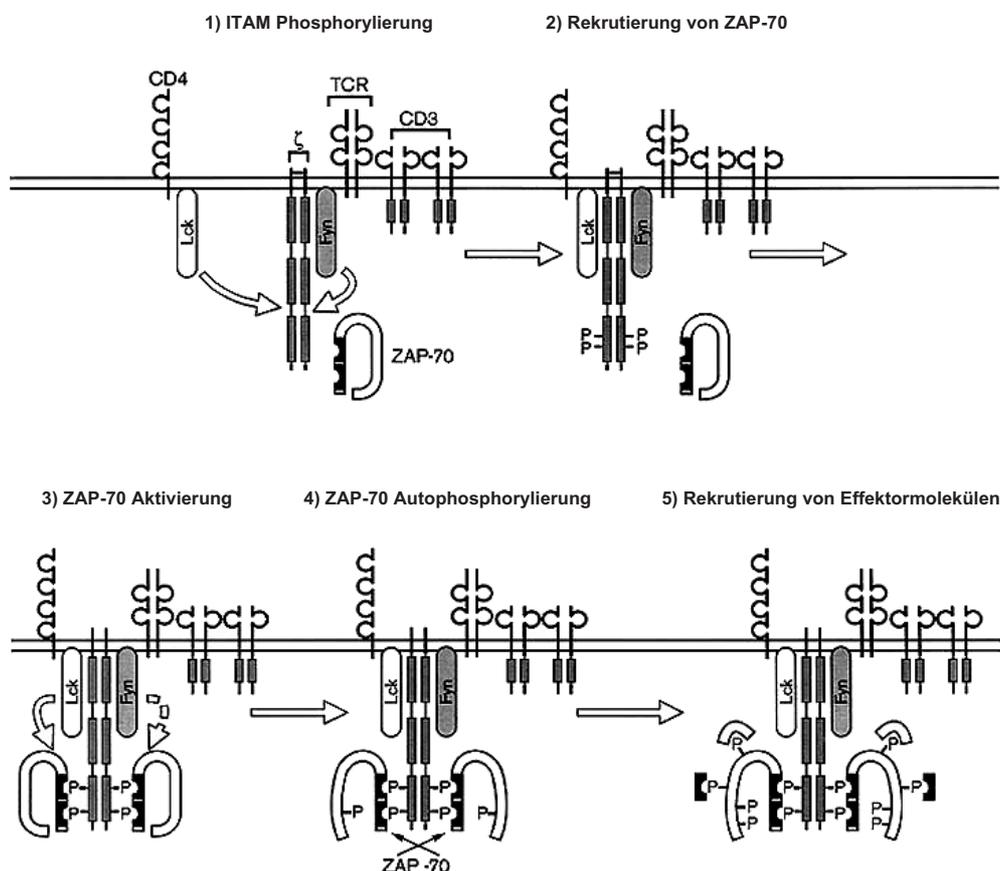


Abbildung 2.2: **Kooperativität zwischen Tyrosinkinase der src- und Syk-Familien nach dem Modell von Chan und Shaw (adaptiert nach Chan A.C. und Shaw A.S., 1995).** Phosphorylierung von ITAMs der Ketten des T-Zell-Antigenrezeptorkomplexes resultiert in der Rekrutierung von ZAP-70 und Syk, deren katalytische Aktivierung durch trans-Phosphorylierung stimuliert wird. Autophosphorylierung führt zur Erhöhung des Phosphotyrosingehalts von ZAP-70 und damit zur verstärkten Rekrutierung phosphotyrosinbindender Proteine, welche T-Zell Aktivierung propagieren.

2.5 Nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden

Phosphorylierbare Substrate der src- und Syk-Tyrosinkinasen waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch unbekannt. Nach heutigem Wissen handelt es sich größtenteils um T-Zell-spezifisch exprimierte Adapterproteine, welche durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zumeist an klassische, ubiquitär vorhandene Signaltransduktionskaskaden koppeln (Rudd C.E., 1999; Clements J.L. *et al.*, 1999; Hunter T., 2000). Beispiele hierfür sind der MAP-Kinase Signalweg (grb-2/Sos/ras/Raf/Mek/Erk/c-fos), der JNK-Signalweg (vav/rac/MKK/JNK/c-jun) und die durch PI-3-Kinase vermittelte anti-apoptotische Aktivität (p85/p110-PI-3-Kinase/PDK/Akt/Bad). Darüber hinaus existieren aber auch zelltyp-spezifische Signalwege, wie die durch Calcium-Influx induzierte Aktivierung von NF-AT (PLC- γ /Ca²⁺/Calcineurin/NF-AT) oder die Stimulation von Oktamer- und NF- κ B-Aktivität.

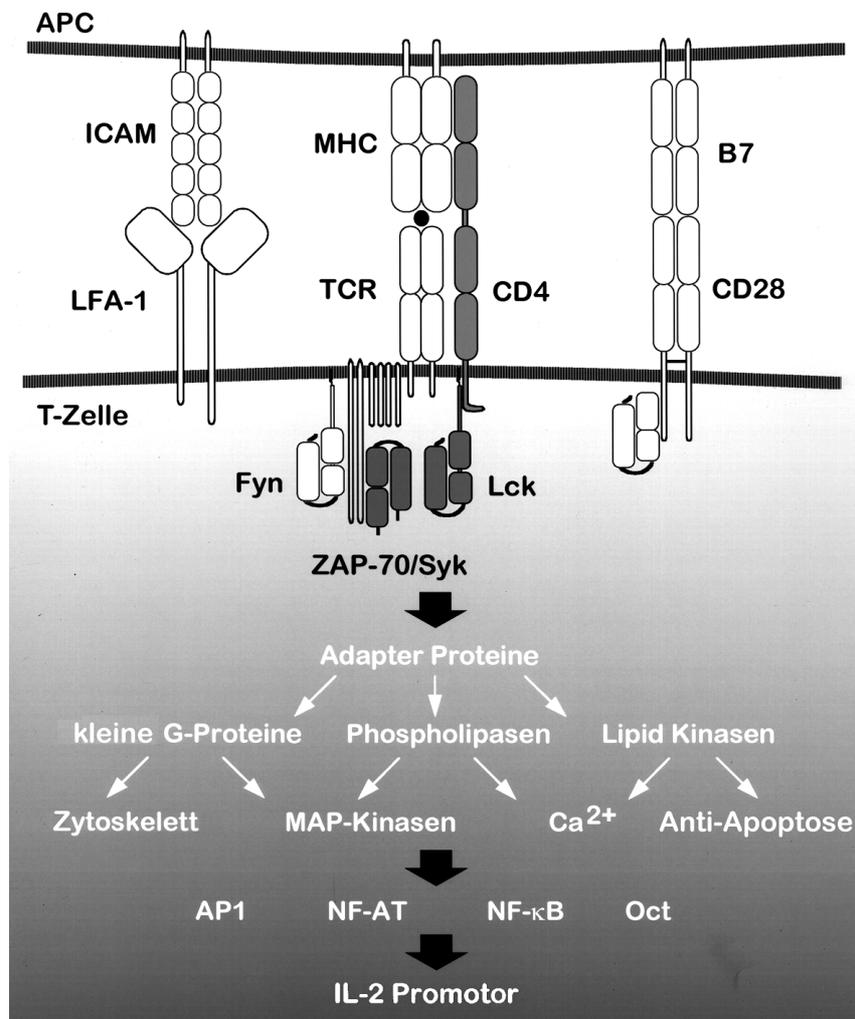


Abbildung 2.3: Ebenen der Signalvermittlung zwischen Zelloberfläche und Nucleus. Der Aktivierung von Tyrosinkinasen folgt die Phosphorylierung T-Zell-spezifischer Substrate, die an ubiquitäre Signaltransduktionskaskaden koppeln. Die Integration dieser Signale erfolgt auf Ebene der Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung in der Induktion spezifischer Promotoren resultiert, beispielsweise dem des IL-2 Gens.

Zusammengenommen resultiert die Aktivierung der genannten Transkriptionsfaktoren in einer effizienten Induktion der transkriptioneller Aktivität spezifischer Gene, beispielsweise der des IL-2 Promotors (Abbildung 2.3; Gerondakis S. *et al.*, 1998).

2.6 Corezeptoren der T-Zell Aktivierung

Wie können Signale der Corezeptoren die Effizienz der IL-2 Promotoraktivierung durch den T-Zell-Antigenrezeptor beeinflussen? Grundsätzlich denkbar ist entweder eine Modulation TCR-abhängiger Signale (Signal 1) oder eine Induktion eigenständiger, TCR-unabhängiger Signaltransduktionsmechanismen (Signal 2; Chambers C.A. und Allison J.P., 1999). CD28 könnte unter anderem deshalb ein bedeutendes Corezeptormolekül darstellen, weil über beide Mechanismen starke costimulatorische Signale zur T-Zell Aktivierung beige-steuert werden. So resultiert eine Aggregation der zytoplasmatischen Domäne von CD28 über TCR-unabhängige Mechanismen in Calcium-Influx, dessen Amplitude jedoch durch die Gegenwart von Komponenten des T-Zell-Antigenrezeptor deutlich verstärkt wird (Sirim P. *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Die CD28-vermittelten Signale scheinen im Kontext der T-Zell Aktivierung neueren Befunden zufolge im wesentlichen lediglich unterstützende Funktion zu besitzen (Chiang Y.J. *et al.*, 2000; Rudd C.E. und Schneider H., 2000). Mögliche Mechanismen schließen eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase oder von Tyrosinkinasen der src- und Tec-Familien ein, beschrieben wurden darüber hinaus eine verstärkte Phosphorylierung des multifunktionellen Proteins p95^{vav}, wodurch eine Stimulation von NF- κ B Aktivität vermittelt werden könnte (Acuto O. und Cantrell D., 2000). Neueren Modellen zufolge unterstützt die Ligation von CD28 die Umverteilung von Subdomänen der Plasmamembran, in denen wichtige Komponenten der TCR-vermittelten Signaltransduktionswege angereichert sind, insbesondere die Kinasen der src-Familie (Wulfing C. und Davis M.M., 1998; Viola A. *et al.*, 1999). Der T-Zell-Antigenrezeptor scheint im Zuge der T-Zell Stimulation eine induzierbare Rekrutierung in die Proximität dieser Membrankompartimente zu erfahren, ein Prozeß, welcher durch den Einfluß von Corezeptoren weiter begünstigt werden könnte (Xavier R. und Seed B., 1999; Horejsi V. *et al.*, 1999; Langlet C. *et al.*, 2000). Die 3-dimensionale Anordnung des T-Zell-Rezeptors und der Corezeptoren weist tatsächlich in der Kontaktfläche zur antigenpräsentierenden Zelle eine charakteristische Verteilung auf, die wegen ihrer definierten Morphologie als supra-molekularer Aktivierungskluster (SMAC) bezeichnet wurden (Monks C.R. *et al.*, 1998; Anton van der Merwe P. *et al.*, 2000; Krummel M.F. *et al.*, 2000). Noch sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nicht geklärt, es werden aber gegenwärtig verschiedene Modelle diskutiert, nach denen insbesondere die Topologie der beteiligten Rezeptor-Liganden-Komplexe (Anton van der Merwe P. *et al.*, 2000), die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran (Janes P.W. *et al.*, 2000; Lanzavecchia A. und Sallusto F., 2000) oder das Zytoskelett (Acuto O. und Cantrell D., 2000; Wulfing C. *et al.*, 2000) die treibende Kraft hinter der Koordination von Oberflächenrezeptoren während der Ausbildung des Zell-Zell-

Konjugates ist (Abbildung 2.4). Neben der costimulatorischen Aktivität von CD28 wurden auch diejenigen von CD5, CD9, CD2, CD44 und von Integrinen auf derartige Mechanismen zurückgeführt (Wulfig C. und Davis M.M., 1998; Dustin M.L. *et al.*, 1998; Horejsi V. *et al.*, 1998; Yashiro-Ohtani Y. *et al.*, 2000). Ebenso könnten negativ-regulatorische Komponenten wie Tyrosinphosphatasen durch die genannten Mechanismen sequestriert werden, wodurch Tyrosinphosphorylierungsereignisse gefördert würden (Janes P.W. *et al.*, 2000; Johnson K.G. *et al.*, 2000).

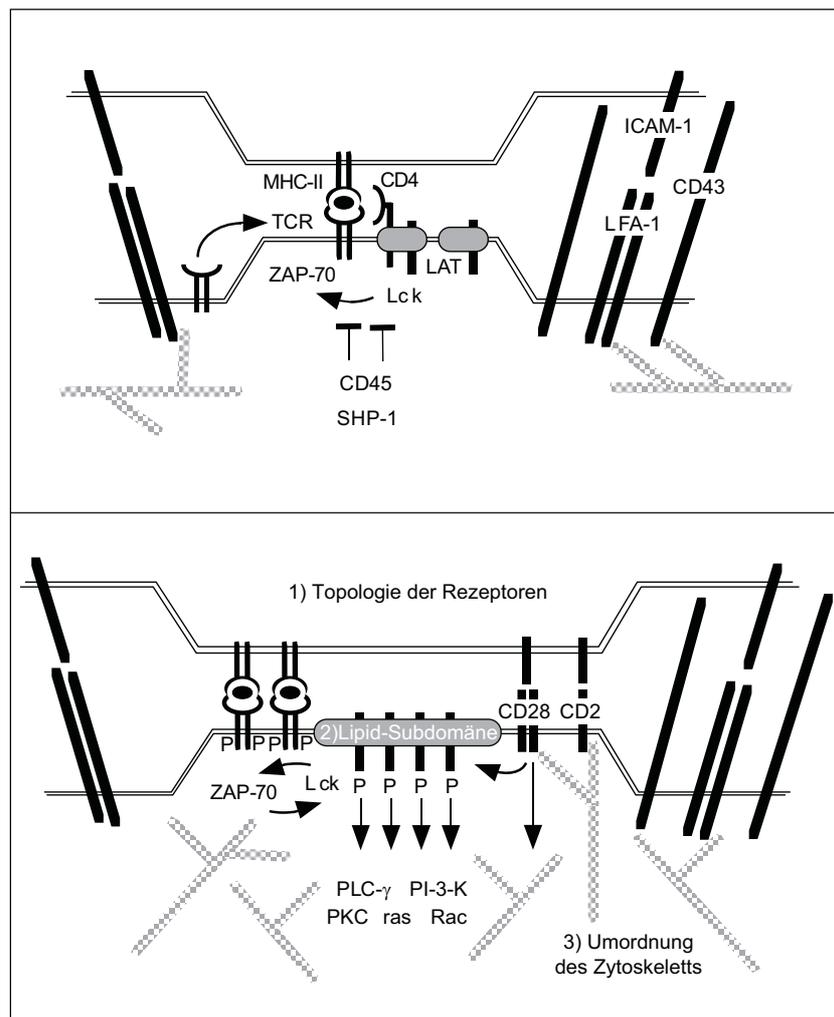


Abbildung 2.4: **SMAC Formation und Corezeptor Funktion** (adaptiert nach Lanzavecchia A. und Sallusto F., 2000). Dargestellt sind die frühe (obere Hälfte) und späte (untere Hälfte) Phase der Konjugatbildung zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle. Mögliche, nicht-ausschließliche Mechanismen der Corezeptorfunktionen sind bedingt durch 1) die Topologie der Rezeptor-Liganden-Komplexe, welche deren Umordnung anhand der molekularen Dimensionen zur Folge hat, 2) die Aggregation von Membran-Subdomänen, in denen Signaltransduktionsmoleküle konzentriert sind, sowie 3) die Umverteilung des Zytoskeletts.

2.7 Funktionen des CD4-Moleküls

Das CD4-Molekül scheint als Corezeptor insofern eine besondere Rolle zu spielen, als daß es durch direkte Assoziation mit dem Komplex aus TCR, Antigen und MHC-Klasse-II Molekülen deren Interaktion stabilisieren kann (Konig R.S. *et al.*, 1996). Nach diesem Modell würde CD4 - ähnlich wie CD8 auf zytotoxischen T-Lymphozyten - unmittelbar die Sensitivität des TCR steigern, indem es die minimale Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Antigen/MHC-Komplex erniedrigt, welche noch ausreichend für eine Aktivierung der T-Zelle ist (Janeway C.A. Jr., 1992). Bislang konnte diese stabilisierende Funktion von CD4 jedoch nicht direkt demonstriert werden (Hamad A.R. *et al.*, 1998; Krummel M.F. *et al.*, 2000). Darüber hinaus scheint der Komplex zwischen CD4 und dem ligandengebundenen T-Zell-Rezeptor nicht für längere Zeit stabil zu sein, da sich CD4 und die TCR- ζ -Kette bereits kurz nach Bildung des Zell-Zell-Kontaktes räumlich separieren (Krummel M.F. *et al.*, 2000; Kupfer A., 2000). Die costimulatorische Funktion von CD4 könnte demnach lediglich während der frühen Phase von transientser Bedeutung für die Effizienz der T-Zell Aktivierung sein. Disruption des CD4-Gens in Mäusen resultiert in moderat reduzierter T-Helfer-Zell-Aktivität, die auch ohne CD4 Expression MHC-Klasse-II-restringiert bleibt (Rahemtulla A. *et al.*, 1994; Killeen N. und Littman D.R., 1996; von Herrath M.G. *et al.*, 1996; Fowell D.J. *et al.*, 1997). Außer von T-Lymphozyten wird CD4 in moderater Menge auch von menschlichen Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen und Eosinophilen exprimiert. Die Funktion von CD4 in diesen nicht-lymphoiden Zelltypen ist derzeit unbekannt.

Neben der Funktion der extrazellulären Region als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül besitzt CD4 starkes Potential zur Signalvermittlung, welches insbesondere durch die nahezu stöchiometrische Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit der Tyrosinkinase p56^{lck} bedingt wird (Veillette A. *et al.*, 1988; Rudd C.E. *et al.*, 1988; Gleichenhans N. *et al.*, 1991; Collins T.L. *et al.*, 1992; Abraham N. *et al.*, 1991). Die CD4-vermittelte Rekrutierung von lck zum ligandengebundenen TCR-Komplex soll dort sowohl die Phosphorylierung der intrazellulären Anteile der CD3- und TCR- ζ -Ketten fördern, als auch die TCR-assoziierten Tyrosinkinasen der Syk-Familie aktivieren (Abschnitt 2.4). Die Signaltransduktionsfunktion von CD4 ist außer in reifen T-Lymphozyten auch in Thymozyten von Bedeutung, wo sie deren Differenzierung zu MHC-Klasse-II-restringierten T-Zellen des Helfer-Typs zu kontrollieren scheint (Killeen N. und Littman D.R., 1996; Hernandez-Hoyos G. *et al.*, 2000). Die Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne von CD4 und dem p56^{lck} N-Terminus wird durch je zwei Cysteinreste vermittelt, deren Thiogruppen einen ungewöhnlichen, Zinkhaltigen Komplex bilden (Shaw A.S. *et al.*, 1990; Lin R.S. *et al.*, 1998). Darüber hinaus interagiert der intrazelluläre Anteil von CD4 über ein Di-Leucin-Motiv mit Clathrin-Adapterproteinen, welche an der induzierbaren Endozytose von CD4 beteiligt sind (Pitcher C. *et al.*, 1999). Die funktionelle Bedeutung der aktiven, clathrin-vermittelten Endozytose von CD4 für T-Zell Aktivierung ist spekulativ (Parolini I. *et al.*, 1999).

Kürzlich wurden alternative, lösliche Liganden der extrazellulären Domäne von CD4 beschrieben, deren physiologische Relevanz jedoch bislang kontrovers diskutiert wird (Rand

T.H. *et al.*, 1991; Basmaciogullari S. *et al.*, 2000). IL-16 wurde beispielsweise als spezifischer Ligand von CD4 identifiziert, dessen Bindung Chemotaxis und Zellzyklus-Progression induzieren kann (Center D.M. *et al.*, 2000; Cruikshank W.W. *et al.*, 2000). Grundlegende Aspekte der Funktion von IL-16 sind jedoch nach wie vor unverstanden, insbesondere die Mechanismen der Prozessierung und Sekretion des zytoplasmatisch exprimierten Vorläufer-Proteins, welche durch pro-inflammatorische Zytokine induziert werden sollen. Kürzlich wurden Evidenzen gefunden, welche eine Rolle von CD4 als bedeutendem Rezeptor von IL-16 in Frage stellen. (Mathy N.L. *et al.*, 2000).

Intensiv untersucht worden sind auch die Konsequenzen der Bindung des HIV Oberflächenglykoproteins gp120 an einen Komplex aus CD4 und Chemokinrezeptoren (Berger E.A. *et al.*, 1999). In primären T-Lymphozyten resultiert die Ligation von CD4 durch gp120 in der Induktion von Apoptose (Banda N.K. *et al.*, 1992), offenbar unter Einbeziehung sowohl des Fas- als auch des Bcl-2 vermittelten Signalwegs (Somma F. *et al.*, 2000). Generell scheint eine Ligation von CD4 separat von der Stimulation des T-Zell-Rezeptors in inhibitorischen Signaltransduktionsprozessen zu resultieren, welche T-Zell Aktivierung negativ beeinflussen (Chirmule N. *et al.*, 1999). Inhibitorische Signalprozesse durch CD4 sind therapeutisch bedeutsam, da spezielle anti-CD4 Antikörper zur Toleranzinduktion gegen Transplantat-Abstoßung und Autoimmunerkrankungen *in vivo* eingesetzt werden (Waldmann H. und Cobbold S., 1998; Phillips J.M. *et al.*, 2000). Der zeitlichen und räumlichen Koordination von Signalen des T-Zell-Antigenrezeptors mit denen von CD4 könnte somit entscheidende Bedeutung für die Integration positiv- und negativ-regulatorischer Signale und somit für Modulation von T-Zell Aktivierung zukommen (Pratt J.C. *et al.*, 1999).

2.8 Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit

Der eben dargestellte Erkenntnisstand zum Prozeß der T-Zell Aktivierung verdeutlicht, daß sich trotz intensiver Forschungen noch kein lückenloses Modell der beteiligten Faktoren und Mechanismen etabliert hat. Insbesondere die Koordination der Komponenten dieser komplexen Signalnetzwerke entzieht sich - nach heutigem Stand der Technik - einer detaillierten Analyse. Darüberhinaus sind die sich unmittelbar an den Antigenkontakt anschließenden Ereignisse derzeit noch weitgehend unverstanden, beispielsweise die Mechanismen zur Aktivierung von src-Kinasen oder zur Umverteilung von TCR-Molekülen während der interzellulären Konjugatbildung. In diesem Zusammenhang ist etwa umstritten, auf welche Weise wenige Peptid-MHC-Komplexe die Aktivierung und Phosphorylierung vieler TCR-Moleküle initiieren können.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten darum auch Studien zur Regulation und Funktion der unmittelbar mit dem T-Zell-Antigenrezeptor assoziierten Tyrosinkinase ZAP-70, die eine essentielle und zentrale Komponente der TCR induzierten Signaltransduktionskaskaden darstellt und somit eine Schlüsselfunktion in der Regulation früher Ereignisse der T-Zell

Aktivierung einnimmt. Offene Fragen betrafen zu Beginn der Untersuchungen vor allem die Identität der *in vivo* Substrate von ZAP-70, die nach Tyrosinphosphorylierung eine Kopplung an die generellen Signalwege der TCR-Stimulation vermitteln, beispielsweise an die PLC- γ , ras und rac Signaltransduktionskaskaden (siehe Abbildung 2.3). Zur Identifizierung von direkten Substraten einzelner Tyrosinkinassen in lebenden Zelle existiert keine allgemein verfügbare Technologie. Die gängigen Nachweissysteme liefern - wegen der Kooperativität vieler Tyrosinkinassen *in vivo* und einer relaxierten Spezifität *in vitro* - in der Regel nur indirekte Hinweise auf mögliche Enzym-Substrat-Wechselwirkungen. Zwei unterschiedliche methodische Ansätze wurden verfolgt, um dennoch Proteine identifizieren zu können, welche als potentielle ZAP-70 Substrate in Frage kommen: Zum einen wurde eine konstitutiv-aktive Mutante von ZAP-70 generiert, deren Expression in T-Zellen in einer bevorzugten Phosphorylierung von direkten und indirekten Substraten führen sollte. Aus der enzymatischen und funktionellen Charakterisierung von Tyrosinstitutionsmutanten waren darüber hinaus auch neue Erkenntnisse zum Regulationsmechanismus der ZAP-70 Aktivität zu erwarten. Zum anderen war aus Voruntersuchungen in unserem Labor bekannt, daß die stimulierende Aktivität von src-Kinasen nicht unabdingbar für die Aktivierung von ZAP-70 ist, wenn transmembrane Fusionsproteine von ZAP-70 an der Zelloberfläche quervernetzt werden (Kolanus W., persönliche Mitteilung; Knoll M., 1999). Somit bot sich ein experimenteller Ansatz zur Isolierung von src- und Syk-spezifischen Tyrosinphosphorylierungsereignissen in lebenden Zellen.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit betraf die detaillierte Charakterisierung des Corezeptors CD4. Wie bereits erwähnt, ist CD4 kontextabhängig in der Lage, entweder positiv-regulatorische oder inhibitorische Signale zur T-Zell Aktivierung beizusteuern. Während die stimulatorische Funktion eng mit der zytoplasmatischen Assoziation der src-Kinase p56^{lck} zu korrelieren scheint, wurden kürzlich von mehreren Autoren Befunde veröffentlicht, die lck-unabhängige Mechanismen für die inhibitorische Signaltransduktionsfunktion von CD4 implizieren. CD4-Liganden wie HIV gp120, IL-16 oder spezifische anti-CD4 Antikörper inhibieren offenbar antigeninduzierte T-Zell Aktivierung und HIV Replikation oder induzieren Apoptose und Chemotaxis über p56^{lck}-unabhängige Mechanismen (Tabelle 2.1).

Ligand	Zelltyp	funktioneller Effekt	Literaturstelle
HIV gp120	T-Zell Klon 2.10	Inhibition von Proliferation	Gratton S.,...1998
dito	T-Zell Linie A2.01	Apoptose	Moutouh L.,...1998
dito	T-Zell Linie CMO	Inhibition von IL-2-R Signal	Goebel J.,...1999
anti-CD4	T-Zell Klon 2.10	Inhibition von Proliferation	Bonnard M.,...1999
dito	T-Zell Hybridom BI	Inhibition von IL-2 Produktion	Zerbib A.C.,...1994
dito	T-Zell Linie MT2	Inhibition von HIV Replikation	Coudronniere N.,...1998
IL-16	nicht-lymph. Zellen	Chemotaxis	Cruikshank W.,...2000

Tabelle 2.1: **Lck-unabhängige Signaltransduktion durch CD4.** Liganden, welche CD4 separat vom T-Zell-Rezeptor binden, induzieren inhibitorische Effekte auf T-Zell Aktivierung offenbar ohne Beteiligung von p56^{lck}. Darüber hinaus besitzt IL-16 chemotaktische Aktivität auf monozytäre Zellen und Eosinophile, in denen keine Expression von p56^{lck} nachzuweisen ist.

Diese Befunde veranlaßten uns und andere Labore dazu, nach alternativen zytoplasmatischen Interaktionspartnern von CD4 zu suchen (Mesnard J.M. *et al.*, 1997). Waldemar Kolanus isolierte mittels der Hefe-*Two-Hybrid* Methodik ein zum damaligen Zeitpunkt unbekanntes Protein, welches offenbar spezifisch mit der zytoplasmatischen Domäne von CD4 interagieren kann. In Voruntersuchungen zu der hier dokumentierten Arbeit wurde bereits eine cDNA mit vollständigem offenen Leserahmen isoliert und die Bindungsspezifität des als ACP33 bezeichneten Proteins charakterisiert (Abschnitt 7.1.3). Zielsetzung der im folgenden beschriebenen Arbeiten war eine detaillierte Analyse der Interaktionsdeterminanten zwischen CD4 und ACP33 sowie die Suche nach Hinweisen für eine mögliche Rolle von ACP33 in CD4-vermittelter Signaltransduktion.

3 Material & Methoden

3.1 Spezielle Materialien

3.1.1 Geräte

Agarosegelkammern :	Harnischmacher
Durchflußzytometer:	Epics XL, Coulter
Dünnschichtelektrophoreseapparatur:	HTLE-7000, C.B.S.
Elektroporationsapparatur:	EasyJect Plus D2000, Eurogentec
Kapillar-PCR-Gerät:	FTS-1, Corbett Research
Lichtmikroskop:	Typ IM 35, Zeiss
pH-Meter:	Mod. 761, Knick
Photometer:	Du 640, Beckman
Protein-Minigel-Apparaturen:	Hoefer
Protein-Elektroblot-Apparaturen:	Biorad
Radioaktivitätsmeßgerät:	InstantImager, Canberra/Packard
Reinstwasseranlage:	Milli-Q UF plus, Millipor
Schwingmühle:	MM2, Retsch
Szintillationsmeßgerät:	Canberra/Packard

3.1.2 Chemikalien

Acrylamid:Bisacrylamid 30%:0.8%	Roth
Agarose (LMP-NuSieve)	Biozym
Ampicillin	Sigma, Roth
Aprotinin	Sigma
Calcium Ionophor (A23187)	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloro quin-Phosphat	Sigma
CsCl	Biomol
DEAE-Dextran	Sigma
NonidetP40	Sigma, ICN
HEPES	Biomol
PMA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat)	Sigma
Triton X-100	Fluka

Nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck im Reinheitsgrad p.A. bezogen.

3.1.3 Enzyme für Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase 1U/μl	Boehringer Mannheim
DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	NEB, Fermentas
Restriktionsendonukleasen	NEB, Fermentas
RNase A	Sigma
T4-DNA-Ligase	NEB, Fermentas
T4-DNA-Polymerase	Fermentas
T4-PNK	Fermentas
<i>Vent</i> -DNA-Thermopolymerase	NEB

3.1.4 DNA- und Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandard Lambda E/H (Fermentas):	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp
Protein Molekulargewichtsstandard (Biorad):	200, 116.25, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 kD
Vorgefärbter SDS-PAGE-Standard (Sigma):	180, 112, 84, 64, 52, 35, 32 kD

3.1.5 Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Subtyp	Referenz
anti-h-CD4	Q4120	Maus IgG1	Sigma
dito	MT151	Maus IgG1	P. Rieber, Dresden
dito	T4-4	Kan. polyklonal	AIDS Reagent Prog.
anti-h-ACP33	it1-2D5	Ratte IgG2a	E. Kremmer, GSF
anti-h-CD16	3G8	Maus IgG1	Medac
anti-Phosphotyrosin	4G10	Maus IgG2b	UBI
anti-m-lck	lck-01	Maus IgG1	V. Horejsi, Prag
dito	lck-04	Maus IgG1	dito
anti-h-ZAP-70	2F3.2	Maus IgG1	UBI
anti-h-CD3-ε	OKT3	Maus IgG2b	ATCC
anti-ch-IgM	M4	Maus IgM	Southern Biotech.
anti-Flag	M5	Maus IgG	Sigma
h/m/rat IgG	div.	div. polyklonal	Jackson Immunores.

3.1.6 Plasmide

Verwendung	Bezeichnung	Resistenz	Referenz
prokaryotische Expression	pGEX-2T	amp	Amersham
eukar. transiente Expression	p5C7	amp	Zeitlmann L.,...1998
dito	pN1	kan, G418	Clontech
dito	pCDM7/8	supF	Seed, B. 1987
dito	pEF-BOS	amp	Mizushima S.,...1990
eukar. stabile Expression	pEF-IRESpuro	amp, puro	Geiger C., ...2000
Retrovirale Infektion	pLEN	amp	Adam, M.A.,...1991
Vaccinia Infektion	pTKg	amp	Romeo C.,... 1991
Luziferase-Reporterplasmid	3 x NFAT	amp	Baldari C., Siena
dito	pIL-2 GL2	amp	Zeitlmann L.,...1998

3.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
MC1061	F ⁻ ,araD139,Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)X74, rpsL(Str ^r), hsdR2(r _K ⁻ m _K ⁻); mcrA, mcrB1	Plasmidamplifikation	Casadaban and Cohen, 1980
MC1061 p3	wie MC1061, aber mit Helfer-Plasmid p3: kan, bla(amp)-am,tet-am	Amplifikation von CDM7/8-Vektoren	dito
DH5α	endA1, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Nal ^r), relA1	Plasmidamplifikation, prokaryotische Proteinexpression	Hanahan, 1983

3.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Verwendung	Referenz
CV-1	fibroblastenähnliche Affennierenzelllinie	Amplifikation von Vaccinia Viren	ATCC CCL-70
COS7m6	CV1 mit integriertem, replikationsdefektem SV-40-Genom	transiente Expression	ATCC CRL-1651
Jurkat E6	humane T-Zelllinie aus Patienten mit akuter Leukämie	Funktionelle Studien nach transienter Transfektion	ATCC TIB-152
Jurkat LT	SV-40 LT-Ag. exprimierendes E6-Derivat	dito	Clipstone N.A.,...1992
JCaM1.6	E6-Derivat; p56 ^{lck} defizient	dito	ATCC CRL-2063
J.RT3-T3.5	E6-Derivat; TCR- β defizient	dito	ATCC TIB-153
HUT78	humane T-Zelllinie (kutane Leukämie)	Lokalisationsstudien von nativem CD4 und ACP33	ATCC TIB-161
syk ⁻ -DT40	Syk-defizientes Derivat von DT40 (B-Zelllinie aus Huhn)	Funktionelle Studien nach Transfektion	Takata M.,...1994
171	antigenspezifisches, murines T-Zell Hybridom; CD4 defizient	Funktionelle Studien nach stabiler CD4-Rekonstitution	Glaichenhaus N.,...1991
FT7.1	L-Zell Derivat (Fibroblasten); exprimieren MHC A ^b	APC (HEL Peptid) für 171 T-Zellen	dito

3.2 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen

3.2.1 *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden unter sterilen Bedingungen der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Kolanus entnommen, auf LB-Agarplatten vereinzelt und entsprechend der weiteren Verwendung in Flüssigkultur vermehrt. Selektion auf plasmid-kodierte Resistenzen erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika. Die Stämme MC1061 und DH5 α wurden in jedem Fall mit β -Lactamase-codierenden Vektoren transformiert und dem Medium 50-100 μ g/ml Ampicillin zugesetzt. Transformation von CDM-Vektoren, die ein Gen einer amber-Suppressor-tRNA beinhalten, erfolgte demgegenüber generell in den Stamm MC1061p3. Selektiert wurde dabei in Gegenwart von 12,5 μ g/ml Ampicillin und 7.5 μ g/ml Tetracyclin. Bei Plasmid-Isolationen aus dem MC1061p3-Stamm wurde M9-Medium für die Präparationen im mg-Maßstab dem in allen anderen Fällen verwendeten LB-Medium vorgezogen, da die so gewonnene DNA einen höheren Reinheitsgrad aufweist.

Mit Parafilm abgedichtete Agarplatten wurden bis zu 3 Monaten bei 4°C aufbewahrt. Anlegen von Dauerkulturen erfolgte durch Zugabe von 2 Vol. 86% Glycerin zu einer saturierten Flüssigkultur und Lagerung bei -80°C.

LB-Medium: 1.0% (w/v) Bacto-Trypton Für die Herstellung fester Nährmedien wurde vor dem Autoklavieren
 0.5% (w/v) Hefeextrakt 1.5%(w/v) Agar zugesetzt. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach
 1.0% (w/v) NaCl Abkühlen auf < 55°C
 pH 7.0

Ampicillin-Stocklösung: 100mg/ml in 50% EtOH
 Tetracyclin-Stocklösung: 7.5mg/ml in 90% EtOH (Lagerung im Dunkeln)

M9-Medium: 10 g/l M9-Salze
 10 g/l Casaminoacids
 ad 990ml/l Bidest. Wasser

Nach Sterilisation durch Autoklavieren und Abkühlen auf <55°C wurde zugegeben:

10 ml/l 100xM9 additions
 125 µl/l Ampicillin-Stammlösung (100mg/ml)
 1ml/l Tetracyclin-Stammlösung (7.5mg/ml)

M9-Additions: 70% (v/v) Glycerin Alle Komponenten wurden separat autoklaviert
 10 mM CaCl₂
 100 mM MgSO₄

3.2.2 Adhärenente Säugerzellen

Die auf Zellkulturplastik adhärenent wachsenden Zelllinien CV-1, COS-7m6 und FT7.1 wurden aus 1,5 ml DMSO-Dauerkulturen aufgetaut, unverzüglich in 10ml DMEM verdünnt und bei 1100 rpm abzentrifugiert. Je nach Menge der eingefrorenen Zellen wurde das Pellet in 10-20ml Medium resuspendiert und auf eine entsprechend große Zellkulturplatte verteilt. Unter optimalen Wachstumsbedingungen (37°C; 5% CO₂) verdoppelte sich die Zellzahl etwa alle 24 Stunden. Konfluente Platten wurden nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 1 Vol. PBS durch etwa 5 minütige Inkubation in 1/10 Vol. Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und auf 1¹/₂-5 Platten des gleichen Durchmessers verteilt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde die Zellen einer konfluente 150 x 20 mm-Gewebekulturschale mit PBS gewaschen, trypsiniert, pelletiert, wiederum PBS-gewaschen und in 0,9 ml Medium resuspendiert. In ein spezielles 1,8 ml Gefäß (Kryotube) wurden 0,9 ml 30% DMSO in FCS vorgelegt und mit der Zellsuspension in einer Weise überschichtet, die eine möglichst geringe Durchmischung der beiden Phasen gewährleistet. Die Mischung erfolgte erst unmittelbar vor dem Einfrieren bei -20°C für 24 Stunden. Für weitere 24 Stunden wurden die Gefäße vor der Überführung in flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

Medium: DMEM (Gibco/LifeTechnologies)
 +10% FCS (Gibco/LifeTechnologies; 30min 56°C hitzeinaktiviert)
 +1% Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml - 5000 µg/ml in PBS)
 oder 0.025% Gentamicin-Sulfat (50mg/ml)

Trypsin/EDTA: 0.5 g/l Trypsin
0.2 g/l EDTA
in HBSS

3.2.3 Suspensionszellen

Die humanen T-Zelllinien Jurkat und HUT78, die murine T-Zelllinie 171 sowie die B-Zelllinie DT40 aus Huhn wurden in Suspension bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 1-1,5·10⁶/ml wurden die Zellen mit frischem Medium verdünnt oder bei 1100 rpm pelletiert, mit PBS gewaschen und in 1-10 Vol. frischem Medium resuspendiert.

Dauerkulturen wurden angelegt, indem 10⁷ Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 0,9 ml RPMI resuspendiert wurden. Im Weiteren wurde wie für COS-Zellen beschrieben verfahren.

Medium: RPMI (Gibco/LifeTechnologies)
+10% FCS (Gibco/LifeTechnologies)
+0.025% Gentamicin-Sulfat (50 mg/ml)

3.3 Molekularbiologische Techniken

3.3.1 Plasmid-Präparation aus *E. coli* im µg-Maßstab

Für die Verwendung in wenigen Restriktions- oder Sequenzanalysen wurde bakterielle Plasmid-DNA im µg-Maßstab nach einer Methode präpariert, die eine Modifikation der von Birnboim und Doly (1979) erstmals beschriebenen „Alkalischen Lyse“ darstellt. Ausgenutzt wird dabei das unterschiedliche Renaturierungs- und Löslichkeitsverhalten von zirkulär geschlossener DNA gegenüber chromosomaler DNA und Proteinen.

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und unter selektiven Bedingungen bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden in ein entsprechendes Plastikgefäß überführt und die Zellen bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren verworfen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Daran schloß sich die Zugabe von 200 µl der Lösung I, 400 µl der Lösung II und 300 µl der Lösung III an. Diese Mischung wurde durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes durchmischt und das entstehende Präzipitat durch Zentrifugation bei 14000 rpm gesammelt. Der Überstand wurde in ein frisches Plastikgefäß überführt und zusammen mit 400 µl TE-gesättigtem Phenol ca. 30 Sekunden heftig geschüttelt. Die Phasen wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm getrennt und die wäßrige Phase in einem frischen 1,5ml Plastikgefäß mit dem maximal möglichen Volumen

Isopropanol versetzt und durchmischt. Das Präzipitat wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert, zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in einem geeignet erscheinenden Volumen bidest. Wasser (30-50µl) resuspendiert. Bei der Weiterverarbeitung muß berücksichtigt werden, daß die so erhaltene Plasmid-DNA noch beträchtliche Mengen an RNA aufweist.

3.3.2 Plasmid-Präparation aus *E. coli* im mg-Maßstab

Die Reinigung bakterieller Plasmid-DNA durch Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation liefert große Mengen hochreiner DNA, die in konzentrierter wäßriger Lösung über Jahre hinweg lagerfähig ist. Da mit einer derart präparierten Plasmid-DNA im Vergleich zu über Ionenaustauschersäulen gereinigten DNA höhere Transfektionseffizienzen von Säugerzellen erreicht wurden, erfolgte die Präparation von Plasmiden im mg-Maßstab ausschließlich über die im Folgenden beschriebene Methode, die erneut auf der „Alkalischen Lyse“ beruht (s.o.). Prinzip der Trennung in einem Caesiumchlorid-Dichtegradienten ist die unterschiedliche Menge an Ethidiumbromid, die überspiralisierte Plasmid-DNA im Vergleich zu linearen Nukleinsäuremolekülen inkorporiert.

Eine 1 l Bakterienkultur wurde mit einer 5-10 ml Vorkultur inokuliert und 12-19 Stunden bei 37°C unter selektiven, aeroben Bedingungen kultiviert. Dies erfolgte mit Ausnahme des *E. coli*-Stammes MC1061p3, für den M9-Medium verwendet wurde, in LB. Zur Sedimentierung wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4500 rpm in einem GS-3-Rotor abzentrifugiert und das Zellpellet in 40 ml Lösung I resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 80 ml Lösung II unter kräftigem Rühren, die Präzipitation von chromosomaler DNA und Proteinen geschah durch Zugabe von 40 ml Lösung III. Zur besseren Dekantierbarkeit wurde für 5 Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand durch 2 Lagen Mullbinde in 250 ml Zentrifugenbecher filtriert. Diese wurden mit Isopropanol aufgefüllt, zur gründlichen Durchmischung des Inhalts mehrmals invertiert und bei 4500 rpm in einem GSA-Rotor 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte je nach Größe des Pellets in 3,5-4,0 ml Lösung I, so daß ein Endvolumen von 4,4 ml zu 5,5 g CsCl hinzugefügt werden konnte, die in 13 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt worden waren. Durch kräftiges Schütteln wird das Caesiumchlorid vollständig in Lösung gebracht. Es folgt die Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) und erneutes gründliches Durchmischen. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde 5 Minuten bei 10000 rpm in einem SS-34-Rotor zentrifugiert. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde der Überstand in ein QuickSeal-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und je zwei dieser Röhrchen gegeneinander austariert und verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte für mindestens 2,5 Stunden bei 80000 rpm in einem Vti80-Rotor oder für mind. 4 Stunden bei 65000 rpm in einem Vti65-Rotor. Anschließend wurden die Plasmidbande mit einer Spritze abgezogen und in ein 13 ml Zentrifugenröhrchen überführt, dieses mit in 1M NaCl-gesättigtem 1-Butanol aufgefüllt und so lange geschüttelt,

bis das Ethidiumbromid vollständig in die hydrophobe Phase übergegangen war. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Butanol-Phase in ein Gefäß, in das 5M NaOH vorgelegt worden war, abgesaugt. Die verbleibende wäßrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen 1M Ammoniumacetat-Lösung und dem zweifache Volumen 100% Ethanol versetzt und durchmischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei -20°C wurde 10 Minuten bei 10000 rpm in einem SS-34-Rotor zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 500-1000 µl bidest. Wasser resuspendiert. Die so erhaltenen Ausbeuten betragen etwa 1-2 mg DNA.

Lösung I :	10 mM EDTA pH 8.0
Lösung II :	0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III :	2.5 M Kaliumacetat 2.5 M Essigsäure pH 4.7

3.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte durch photometrische Messung der OD₂₆₀. Für längere, doppelsträngige DNA-Moleküle wurde bei einer OD₂₆₀ =1,0 von einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml ausgegangen, bei längeren, einzelsträngigen DNA-Molekülen wurde ein Wert von 33 µg/ml angenommen.

Für die Konzentrationsbestimmung kürzerer Oligonukleotide wurde der Extinktionsfaktor des Gesamtmoleküls von einem Programm des Spektralphotometers (Beckman DU-640) anhand der Basenzusammensetzung ermittelt.

Darüber hinaus wurde durch Messung der OD₂₈₀ und OD₃₂₀ der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt. Für reine DNA-Lösungen liegt der OD₂₆₀/OD₂₈₀-Koeffizient bei 1,8. Meßbare Absorption bei 320 nm deutet auf partikuläre Bestandteile in der Lösung hin.

3.3.4 cDNA-Amplifikation durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für die Amplifikation und Isolation von DNA-Fragmenten aus Genbanken sowie für Mutagenisierungen eingesetzt und in einer Kapillar-PCR-Apparatur der Fa. Corbett Research durchgeführt. Wegen der höheren Kopiergenauigkeit gegenüber anderen Enzymen wurde die Vent-Polymerase der Fa. NE-Biolabs verwendet. Prinzip der PCR ist die exponentielle Vermehrung eines zwischen zwei - mit dem Substrat hybridisierenden - Oligonukleotiden (Primern) liegenden DNA-Abschnitts. Das Produkt eines Reaktionszyklus kann dabei erneut als Substrat der Polymerase fungieren.

Ein typischer Ansatz für eine PCR enthielt:

200 ng DNA
4 µl 10xVent-Polymerase-Puffer
4 µl 2.5mM dNTP-Mix
0.5 µg Vorwärts-Primer
0.5 µg Rückwärts-Primer
1 µl Vent-Polymerase (2U/µl)
ad 40µl bidest. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde in eine PCR-Kapillare überführt, diese verschlossen und in der Apparatur den programmierten Temperaturzyklen für Strangtrennung, Primerhybridisierung und Primerelongation ausgesetzt. Ein Aliquot des Produktes wurde durch Elektrophorese in Agarosegelen analysiert, das verbleibende Produkt einer Phenol-Extraktion unterworfen, ethanolgefällt, gewaschen, in 25 µl bidest. Wasser resuspendiert und anschließend in *E. coli* subkloniert. Der amplifizierte Bereich eines PCR-Produkts wurde in jedem Fall vollständig sequenziert, um eventuelle Fehler der Polymerase zu erkennen.

10x Vent-Polymerase-Puffer: 100 mM KCl
200 mM Tris/HCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
20 mM MgSO₄
1 % (v/v) Triton X-100
pH 8,8 (bei 25°C)

2.5mM dNTP-Mix: 2.5 mM dGTP
2.5 mM dATP
2.5 mM dCTP
2.5 mM dTTP

3.3.5 PCR-Mutagenese

Die Mutagenisierung von cDNAs erfolgte ebenfalls durch die Polymerase-Kettenreaktion. Verfahren wurde dabei zumeist nach dem in Abbildung 3.1 dargestellten Schema. Mittels geeigneter Primer wurden gleichzeitig Mutation und eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle in eine cDNA eingeführt, so daß eine PCR-Reaktion, Restriktion und eine Dreifach-Ligation (ein Vektor; zwei Inserts) ausreichend war, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Die Sequenz der Restriktionsschnittstelle wurde dabei so gewählt, daß es auf Aminosäureebene zu keinem zusätzlichen Austausch kam. Falls keine geeignete Restriktionsschnittstelle verfügbar war, wurde auf deren Einführung verzichtet und statt dessen ein zusätzlicher PCR-Schritt mit den überlappenden Produkten des ersten Schritts als Matrize und mit einem Überschuß der äußeren Primer angefügt. Wegen der zweifachen PCR-Amplifikation wiesen die Endprodukte dieser Reaktion jedoch häufig sekundäre Mutationen auf.

NEB-Restriktions-Puffer Nr. 2:	10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1.0 mM DTT pH 7.9 bei 25°C
NEB-Restriktions-Puffer Nr. 3:	50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1.0 mM DTT pH 7.9 bei 25°C
NEB-Restriktions-Puffer Nr. 4:	20 mM Tris-acetat 10 mM Magnesiumacetat 50 mM Kaliumacetat 1.0 mM DTT pH 7.9 bei 25°C

3.3.7 Erzeugung von nicht-überhängenden DNA-Enden

Für die spätere Ligation zweier nicht-kohäsiver DNA Fragmente wurden zuvor doppelsträngige Enden erzeugt. Im Fall von 5'-überhängenden Enden wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau eine Mischung aller dNTPs bis zu einer Endkonzentration von 100 µM und 1 µl Klenow-DNA-Polymerase zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde das Enzym für 20 min bei 70°C inaktiviert oder durch eine Protein-Entfernungs-Säule zentrifugiert. Im Fall von 5'-zurückgesetzten Enden wurde T4-DNA-Polymerase anstelle des Klenow-Fragments benutzt, da 3'-überhängenden Enden von der Exonukleaseaktivität dieses Enzyms entfernt werden.

3.3.8 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

In der Regel wurden die 5'-Phosphatgruppen eines geschnittenen und zu ligierenden Vektors abgespalten, um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation der beiden Enden des Vektors zu reduzieren. Unerlässlich ist dies, wenn der für die Ligationsreaktion präparierte Vektor komplementäre Enden aufweist. Die Vektor-DNA wurde zu diesem Zweck nach erfolgter Restriktionsspaltung einer Phosphatase-Behandlung unterzogen. Dies geschah durch Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) zu dem Restriktionsansatz und einer mindestens 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zugabe eines speziellen Puffers war für eine ausreichende Dephosphorylierung nicht notwendig. Um die spätere

Ligasereaktion nicht zu behindern, wurde der Ansatz anschließend phenolisiert bevor die Elektrophorese auf einem präparativen Agarosegel erfolgte.

3.3.9 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen

DNA bewegt sich aufgrund der negativen Ladungen der Phosphodiester-Gruppen in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. In einem Agarosegel ist die Wanderungsgeschwindigkeit durch Reibung limitiert und eine Funktion der Länge der DNA-Moleküle. Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht somit eine Trennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe und eine Molekulargewichtsbestimmung anhand einer bekannten Referenz (DNA-Marker). Zur Visualisierung der DNA kann dem Gelsystem Ethidiumbromid zugefügt werden, das in DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird.

Agarose wurde durch Erhitzen in Lösung gebracht und in Gießeinrichtungen wieder erstarren gelassen. Die verwendeten Gele enthielten Agarose in einer Konzentration von 1-5% (w/v) und wurden in TAE-Puffer angesetzt und elektrophoretisiert. Je nach Länge und Prozentigkeit des Geles wurden für 10-60 Minuten Spannungen von 80-150 V angelegt.

1xTAE-Elektrophoresepuffer:	40 mM Tris/HCl
	40 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
	20 µl/l Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml in Wasser)
	pH 8.0 bei 25°C

3.3.10 DNA-Ligation

Für die kovalente Verknüpfung von Vektor-DNA mit einem zweiten DNA-Fragment wurden beide über Elektrophorese und anschließender Excision unter UV-Licht (366nm) aus einem niedrigschmelzenden Agarosegel (NuSieve-Agarose, FMC) isoliert.

In den Fällen, wo ein relativ großes Volumen (>20 µl) Agarose ausgeschnitten werden mußte, schloß sich daran eine Reinigung der DNA-Fragmente über Absorption an Glaskugeln (Gene clean Kit, Bio 101) an. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurden zum ausgeschnittenen Gelstück das 3-fache Volumen der im Kit enthaltenen 6 M Natrium-Iodid-Lösung zugesetzt, für 2 Minuten auf 55°C erwärmt, 5 µl der resuspendierten Glasmilch zugegeben und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (20 Sekunden bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge) erfolgte ein 3-maliger Waschschrift mit eiskaltem New Wash und die Resuspendierung in 10-20µl bidest. Wasser. Zur vollständigen Elution der DNA von den Glaskugeln wurde für mindestens 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (wie oben) und die Überführung des Überstandes in ein neues

Gefäß. Die so gereinigte DNA-Lösung wurde wie unten angegeben in die Ligationenreaktion eingesetzt.

In den Fällen, in denen nur ein geringes Agarosevolumen mit der DNA aus dem Gel ausgeschnitten werden mußte, wurde das DNA-enhaltende Agarosestück bei 67°C bis zur vollständigen Solubilisierung geschmolzen und das angegebene Volumen direkt in die Ligationenreaktion eingesetzt. Erfahrungsgemäß behindert die Zugabe von bis zu $\frac{1}{10}$ Vol. (des Gesamtansatzes) geschmolzene NuSieve-Agarose die Ligationseffizienz bei Raumtemperatur kaum.

Angestrebt wurde die Zugabe des zu inserierenden Fragments im 3-fach molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA. Aus diesem Grund wurde jeweils die gleiche Menge der beiden äquimolaren Restriktionsansätze auf das präparative Gel aufgetragen und die isolierten Fragmente in den folgenden Volumina in die Ligationenreaktion eingesetzt:

Ligationenansatz:	1.25 µl Vektor-Fragment
	3.75 µl zu inserierendes Fragment
	5 µl 10xLigationenpuffer
	0.5 µl T4-Ligase (400U/µl)
	ad 50 µl bidest. Wasser

Die Ligation erfolgte durch 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur. 6µl dieses Ansatzes wurden direkt für die Transformation von *E. coli* eingesetzt. Um das Ausmaß der Selbstligation des Vektors zu ermitteln, wurde jeweils ein weiterer Ansatz unter den gleichen Bedingungen ligiert, in dem jedoch das zu inserierende Fragment durch bidest. Wasser ersetzt war. Die Anzahl der anschließend zur Plasmid-Präparation weiterverwendeten Klone richtete sich nach dem Verhältnis der Kolonienzahl auf beiden Platten.

Lösungen des Gene clean-Kits (Bio 101):

6 M Natriumiodid
Glaskugelsuspension
New Wash (unbek. Zusammensetzung)

10x Ligationenpuffer:	50 mM Tris/HCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM DTT
	1 mM ATP
	25 µg/ml BSA
	pH 7.8 bei 25°C

3.3.11 Transformation von *E. coli* Zellen mittels CaCl₂

Die im Folgenden beschriebene Methode basiert auf einem von Mike Scott (UCSF) etablierten Verfahren, mit dem Kompetenzen von 10^6 Transformanden pro µg DNA erreicht

werden können. Der entsprechende *E. coli*-Stamm wurde auf einer antibiotikafreien LB-Platte vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde am folgenden Morgen in 20 ml TYM (in 250 ml Erlenmeyer-Kolben) inokuliert und bei 37°C unter heftigem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,8 inkubiert. Diese Vorkultur wurde in einen 2-3 l Erlenmeyerkolben überführt, in den 100 ml TYM vorgelegt und auf 37°C präinkubiert worden waren. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,9 wurde im selben Gefäß durch Zugabe von 380 ml vorgewärmtem TYM auf ein Volumen von 500 ml verdünnt. Sobald diese Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte, wurde sie durch Schwenken in einem Eis-Wasser-Bad möglichst rasch auf 4°C abgekühlt und bei 4200 rpm in einem GS-3-Rotor 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml kaltem TfB I schonend resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut pelletiert. Die folgende Resuspendierung durch vorsichtiges Schütteln geschah in 20 ml TfB II. Von der erhaltenen Suspension wurden 200 µl-Aliquots möglichst rasch in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -80°C gelagert. Die Ermittlung der Kompetenz der erhaltenen Zellen erfolgte durch Transformation mit 10 ng Plasmid-DNA und Plattierung mehrerer Verdünnungen.

Für die Transformation der so erhaltenen Zellen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und 80 µl Zellsuspension mit 5-7 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA in gekühlten Plastikgefäßen gründlich vermischt. Nach 15-30 Minuten Inkubation im Eis-Wasser-Bad wurden die Ansätze für 5 Minuten einem Hitzeschock von 37°C ausgesetzt. Bei unproblematisch erscheinenden Ligationen wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, andernfalls erfolgte eine 30-60 minütige Präinkubation (37°C) durch Zugabe von 1ml nicht-selektivem LB-Medium.

TYM:	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0.1 M NaCl 10 mM MgSO ₄	Sterilisation durch Autoklavierung
TfB I:	30 mM Kaliumacetat 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin	nach Sterilisation durch Autoklavierung wird zugesetzt: 50 mM MnCl ₂ (separat autoklaviert)
TfB II:	10 mM HEPES pH 7.0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (v/v) Glycerin	Sterilisation durch Filtration

3.3.12 Transfektion von COS7-Zellen mittels DEAE-Dextran

Transfektion der verwendeten COS-Zelllinie diente zur transienten Überexpression von nativen und rekombinanten Proteinen. COS-Zellen gewährleisteten eine relative Nähe zum homologen System der humaner Fibroblasten bei einfacher Handhabung und hoher Ausbeute. Das Vorgehen lehnte sich eng an das im Labor von Brian Seed etablierte Verfahren an, welches wiederum eine Modifikation älterer Protokolle (Lopata M.A. *et al.*, 1984) darstellt. Eine Plasmid-DNA mit SV-40-Replikationsursprung wird dabei als Komplex mit DEAE-Dextran von den Zellen in einer bisher mechanistisch nicht gut charakterisierten Weise aufgenommen, repliziert und transkribiert. Die Gegenwart von Chloroquin fördert diesen Prozeß, vermutlich indem die Azidifikation von DNA-enthaltenden Endosomen gemindert wird. Als COS-Zell-Expressionsvektoren wurden CDM-Derivate für die Expression von Fusionsproteinen oder p5C7-Konstrukte für nativ exprimierte Proteine eingesetzt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vorabend von konfluenten Gewebekulturschalen (10^6 Zellen) durch Trypsinierung abgelöst in einem Verhältnis auf neue 100x15 mm-Schalen verteilt, das am nächsten Morgen eine 40-60%-igen Konfluenz der Zellen erwarten ließ. Ausgehend von 100x15 mm-Schalen beträgt dieses Verhältnis erfahrungsgemäß 1:3, von 150x20 mm-Schalen 1:8. Am Tag der Transfektion wurde das auf den Schalen befindliche Medium durch 5ml DMEM ersetzt, welches mit 10% (v/v) NuSerum (Collaborativ Research 55000) komplementiert worden war. Die geringe Proteinkonzentration dieses Serums minimiert die Bildung von hochmolekularen Protein-DEAE-Komplexen. Zu diesem Medium wurden anschließend 1 µg/ml der zu transfizierenden Plasmid-DNA pipettiert und gründlich gemischt. Es wurde ausschließlich Caesium-Chlorid-gereinigte DNA verwendet, da diese in unseren Händen die besten Transfektionseffizienzen lieferte (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei Mehrfach-Transfektionen wurden alle Plasmide jeweils in der oben genannten Endkonzentration zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl einer 25-fach konzentrierten DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung. Nach gründlichem Mischen wurden die Schalen für 3-4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Folge dieser Behandlung - insbesondere des Chloroquin-Gehalts der Lösung - beginnen sich die Zellen nach etwa 2 Stunden abzurunden und vom Schalenboden zu lösen. Entscheidend für eine zufriedenstellende Transfektionseffizienz scheint die richtige Beurteilung des Zustandes der Zellen zu sein. Angestrebt wurde ein Zeitpunkt, bei dem sich die überwiegende Mehrzahl der Zellen bereits abgerundet, noch nicht aber vom Boden gelöst hatten. Eine wichtige Voraussetzung hierfür scheint eine möglichst homogene Verteilung der Zellen auf dem Boden der Kulturschale zu sein. Sobald sich der beschriebene Zustand eingestellt hatte, wurde das Medium entfernt und durch 2ml 10% (v/v) DMSO in PBS ersetzt. Nach 2 minütiger Inkubation (bei Raumtemperatur) wurde diese Lösung ebenfalls abgesaugt. Es folgte die vorsichtige Zugabe von 10 ml DMEM/FCS/Antibiotikum und eine 6-12 stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden daraufhin durch Trypsinierung (nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS) im Verhältnis 1:1 auf neue Schalen umgesetzt und unter gleichen Bedingungen zusätzliche 24-48 Stunden inkubiert, worauf die weitere Verarbeitung folgte.

Transfektionseffizienzen von in der Regel 50% wurden durch Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie nachgewiesen.

25x DEAE-Dextran/Chloroquin: 10 mg/ml (w/v) DEAE-Dextran (Sigma)
2.5 mM Chloroquin-Phosphat
in PBS

Die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert und in 1ml Aliquots bei -20°C gelagert.

3.3.13 Calcium-Phosphat-Transfektion von CV-1 Zellen

Die Transfektion von CV-1 Zellen erfolgte in der Regel im Zuge der Präparation rekombinanter Vaccinia Viren. Zur Transfektion einer konfluenten 10 cm Schale CV-1 Zellen wurden zunächst 500 µl einer 250 millimolaren CaCl₂-Lösung zu 10 µg Plasmid-DNA pipettiert. Unter Schüttel dieser Mischung wurden tropfenweise 500 µl einer 2-fach konzentrierten HEBS-Lösung zugegeben und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert. Nach Abziehen des Zellkulturmediums wurde das DNA-Präzipitat auf eine konfluente 10 cm Schale mit CV-1 Zellen pipettiert und für 12 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand gegen normales Zellkulturmedium ersetzt und nach Bedarf weiter inkubiert.

2x HEBS-Lösung: 270 mM NaCl
12 mM Glukose
100 mM KCl
1,4 mM Na₂HPO₄
40 mM HEPES pH 7.1

3.3.14 Transfektion eukaryontischer Zelllinien mittels Elektroporation

Elektroporation ist eine universell anwendbare Transfektionsmethode, mit der in allen analysierten eukaryotischen Zelltypen gute Expressionseffizienzen von rekombinanten Proteinen erzielt wurden. Neben Expressionsvektoren wurden auch Reporterplasmide mit Hilfe dieser Technik in diverse Zelltypen eingebracht und deren funktionelle Aktivität bestimmt (Abschnitt 3.6.2). Darüber hinaus eignet sich diese Methode auch zur Selektion stabil transfizierter Zellen, da sie weniger mutagen wirkt als z.B. die DEAE-Dextran Transfektion. Obwohl der grundsätzliche Ablauf der Transfektion bei allen Zelltypen unverändert gelassen wurde, war es nötig, einzelne Parameter der Elektroporation dem jeweiligen Zelltyp anzupassen. In der Regel wurden etwa 10⁷ Zellen in 400 µl RPMI aufgenommen, gründlich mit etwa 10 µg Plasmid-DNA durchmischt, unter den in Tabelle 3.1 angegebenen Bedingungen elektroporiert und mit mindestens 10 ml Zellkulturmedium inkubiert, bis die optimale Expression des rekombinanten Proteins erreicht war. Zur Selektion

stabil transfizierter Zellen wurden die Ansätze nach 48 Stunden mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt.

Zelllinie	Spannung [V]	Feldstärke [μ FD]	Effizienz
Jurkat E6	260	1200	ca. 45 %
Jurkat LT	310	1200	ca. 80 %
JCaM1.6	240	1200	ca. 35 %
J.RT3-T3.5	260	1200	ca. 45 %
HUT78	200	900	ca. 30 %
171	280	1200	ca. 10 %
syk ⁻ -DT40	260	900	ca. 25 %
COS7m6	240	900	ca. 40 %

Tabelle 3.1: Elektroporationsbedingungen und Transfektionseffizienzen der verwendeten Zelllinien. Zur Bestimmung der jeweiligen Effizienz wurden Expressionsvektoren für EGFP transfiziert und durchflußzytometrisch der Anteil der fluoreszierenden Zellen bestimmt.

3.3.15 Infektion humaner T-Zellen durch rekombinante Vaccinia-Viren

Die Infektion humaner T-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia Viren ermöglicht eine starke Überexpression rekombinanter Proteine und, bei Wahl geeigneter Viruskonzentrationen, eine 100%-ige Transfektionseffizienz. Das hier beschriebene Verfahren leitet sich im wesentlichen von publizierten Methoden ab (Falkner F.G. und Moss B., 1988). Die zu exprimierende cDNA wurde in den Plasmidvektor pTKg kloniert, der über homologe Rekombination in das Tymidinkinase Gen des Vaccinia Stammes WR inseriert. Als ersten Schritt wurde eine konfluente 10cm Schale von CV-1 Zellen mit einer geeigneten Konzentration von Wildtyp Vaccinia Viren infiziert (10^8 pfu entsprechen etwa einer MOI von 10). Hierzu wurde das Kulturmedium durch 2,5 ml DMEM ohne Zusätze ersetzt und für 2 h im Brutschrank mit Wildtyp Vaccinia Viren infiziert. Daraufhin wurde die Virensuspension durch 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und die Zellen durch die Calcium-Phosphat-Methode mit dem jeweiligen pTKg-Derivat transfiziert. Nach etwa 48 h zeigten die Zellen deutliche Anzeichen der Infektion und wurden mit Hilfe eines Zellschabers vollständig abgelöst, in 300 μ l 10mM Tris pH 9.0 bei RT für 30 min inkubiert und durch Tiefgefrieren lysiert. Zur Selektion von rekombinanten Viren aus dem primären Zellüberstand wurden konfluente CV-1 Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen für 6 h mit je 2,5 ml des Selektionsmediums vorinkubiert und mit einer Verdünnungsreihe (je 1 μ l, 10 μ l und 100 μ l) des primären Zellüberstands infiziert. Nach 48 h Inkubation wurden Plaques im Zellrasen sichtbar. Die Expression von rekombinantem Protein in peripheren Zellen eines Plaques wurde im Fall von Oberflächenproteinen über Antikörper nachgewiesen, welche mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Die Visualisierung erfolgte nach Zugabe von 2,5 ml AP-Puffer, 8,25 μ l BCIP (50 mg/ml) und 16,5 μ l NBT (50 mg/ml) für 10-20 min. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurden die peripheren Zellen eines Plaques von der trockenen Platte abgeschabt und in 100 μ l

10 mM Tris pH 9 lysiert. Die rekombinanten Viren in diesen Lysaten wurden in mit Selektionsmedium vorbehandelten Zellen weiter amplifiziert, bis eine konfluente 15 cm Schale CV-1 Zellen vollständig infiziert werden konnte. Nach 48 h Inkubation wurde die Zellmenge einer Schale in 1,5 ml 10 mM Tris pH 9 lysiert, tiefgefroren und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Infektiosität (MOI) dieser Virensuspension wurde durch Verdünnungsreihen der jeweiligen Zielzellen bestimmt. Der optimale Zeitpunkt der Verwendung der infizierten Zellen richtete sich nach dem jeweiligen Zelltyp, variierte aber in der Regel zwischen 4-6 Stunden nach Infektion.

Selektionsmedium:	190 ml DMEM 2,5 % (v/v) FCS 10 mg MPA 100 mg Xanthin 3 mg Hypoxanthin
AP-Puffer:	100 mM Tris 9 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinreinigung aus *E. coli*

Ein N-terminaler Fusionsanteil bestehend aus dem Glutathion-S-Transferase Protein (Amersham Pharmacia Biotech) wird häufig genetisch an bakteriell exprimierte Proteine fusioniert, um deren Aufreinigung zu erleichtern. Die jeweiligen cDNAs wurden hierzu in den Vektor pGEX-2T subkloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Eine Flüssigkultur wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei RT oder 37°C inkubiert und zu diesem Zeitpunkt mit 2 mM IPTG versetzt, welches den Promotor des Expressionsplasmids induziert. Nach weiteren 4 h wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert, in Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Lysate wurden zweimal bei 30000 x g abzentrifugiert und der klare Überstand mit 0,5 ml GSH-Sepharose für 2 h im Überkopfschüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS wurde die GSH-Sepharose kurz in 50 mM Tris pH 8 gewaschen und anschließend das GST-Fusionsprotein in 50 mM Tris pH 8 mit 10 mM GSH von der Matrix dissoziiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Bradford-Reagenz (Biorad).

Lysepuffer:	20 mM Tris pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % (v/v) NP-40
-------------	--

3.4.2 Gesamtzellysate eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung eines Gesamtzellysats eukaryotischer Zellen wurden diese in der gewünschten Menge aus dem Kulturmedium abzentrifugiert (500-1000 x g) und mehrmalig in PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte in der Regel durch Zugabe von 1/10 Vol. 10%(w/v) SDS und 5 minütiges Kochen im Wasserbad. Durch Ultraschallbehandlung (3x3 Sekunden bei niedriger Intensität im Stab-Ultraschallgerät) wurde die Viskosität des Lysats verringert, bis eine pipettierfähige Lösung entstand. Nach Zugabe von 1/3 Vol. 3xSDS-Probenpuffer wurden die Lysate über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt.

3x Red. SDS-Probenpuffer: 150 mM Tris/HCl pH 6.8 Der Puffer wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt
300 mM DTT
6% (w/v) SDS
30 % (v/v) Glycerin
0.3% (w/v) Bromphenolblau

3.4.3 Zellfraktionierungsexperimente

Zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden transfizierte Zellen (z.B. HUT78 T-Zellen) zweimal in PBS/EDTA gewaschen und 30 min in hypotonischem Lysepuffer inkubiert. Die Lyse wurde anschließend mittels zwanzigmaler Passage durch eine 26 G Nadel unterstützt. In manchen Experimenten wurden die Zellkerne und nicht-lysierte Zellen durch einen Zentrifugationsschritt bei 3000 x g entfernt. Die Peletierung von Membranen und Zytoskelettanteilen erfolgte bei 20000 x g. Der Überstand dieser Separierung wurde als zytoplasmatische Fraktion bezeichnet. Das Pellet wurde mit Lysepuffer (Abschnitt 3.4.4) extrahiert und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand entsprach der partikulären Fraktion, die Membranen und Zytoskelettanteile enthält. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

Hypotonischer Lysepuffer: 20 mM HEPES pH 8
10 mM KCl

3.4.4 Immunpräzipitation

Immuno-Copräzipitation wurde zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen in COS- und T-Zellysaten eingesetzt. Die dazu verwendeten Antikörper und -seren richteten sich entweder spezifisch gegen die native Form eines der Interaktionspartner oder gegen einen Fusionsanteil eines rekombinant exprimierten Proteins. Im Verlauf dieser Arbeit wurden außerdem verschiedene Fusionsanteile für die Expression in höheren eukaryotischen Zellen eingesetzt. Zur zytoplasmatischen Expression und Immunpräzipitation wurde häufig als N-terminaler Fusionsanteil die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG₁ verwendet

(Abbildung 6.6). Die Translation wird dabei vom Start-ATG des IgG-Fusionsanteils aus initiiert. Da keine Signalsequenz für Membranlokalisierung eingeschlossen ist, weist das Fusionsprotein eine zytoplasmatische Lokalisation auf. Die IgG-Domänen ermöglichen eine gute Detektierbarkeit des Fusionsproteins im Westernblot und über Immunofluoreszenz, vor allem aber eine fast quantitative Präzipitierbarkeit an Protein A, welches an einer polymeren Matrix immobilisiert ist. Sie sind jedoch nicht völlig inert gegenüber zellulären Modifikationen und werden wahrscheinlich von kreuzreagierenden Antikörpern erkannt.

Zytoplasmatische Domänen von Membranproteinen und andere membranständige Proteine wurde demgegenüber in einem Fusionskontext exprimiert, der eine membranäre Lokalisation des Moleküls zur Folge hat. Es diente hierzu ein N-terminaler Fusionsanteil, der sich aus der extrazellulären Domäne von CD16 (niedrigaffiner Fc-Rezeptors Fc γ RIII) und der zytoplasmatischen Domäne des T-Zell-Oberflächenantigens CD7 zusammensetzt. Das Konzept des CD16/CD7-Fusionsanteils ist im Labor von B. Seed entwickelt und für funktionelle Studien der T-Zell-Signaltransduktion verwendet worden (Kolanus W. *et al.*, 1993). Die extrazelluläre Domäne von CD16 wurde wegen der Verfügbarkeit eines hochaffinen und hochspezifischen monoklonalen Antikörpers sowie der fehlenden Expression von CD16 in T-Zellen gewählt, die transmembrane Domäne von CD7 wegen ihrer Ladungsfreiheit. Zur Präzipitation von Immunkomplexen und Immunglobulin-Fusionsproteine wurde Protein A, das hochaffin an den Fc-Teil vieler Immunglobuline bindet, oder - im Fall der CD16/CD7-Fusionsproteine - anti-Maus-IgG verwendet, welche an einer polymeren Matrix immobilisiert waren.

War ein Zellysat für die Immuno-Copräzipitation von Proteinen vorgesehen, wurde zur Lyse in der Regel ein nicht-ionisches Detergenz verwendet. Erfolgte die Expression der zu präzipitierenden Proteine in COS-Zellen, wurde in der Regel eine 50% konfluente 100 x 15 mm-Kulturschale (5×10^5 Zellen) pro Präzipitationsansatz mit den entsprechenden Konstrukten in CDM- oder p5C7-Vektoren transfiziert. 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Gummispatel vom Boden der Kulturschalen abgelöst, für 5 Minuten bei 1100 rpm in einer Laborzentrifuge pelletiert und in PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch 5-10 minütige Inkubation in 500 μ l eiskaltem Lysepuffer. Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der klare Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die Inkubation mit einem löslichen Antikörper erfolgte für 1 $\frac{1}{2}$ Stunden bei 4°C. Verwendet wurden 0,5-1,0 μ g Antikörper in 500 μ l Lysat. Präzipitiert wurde durch Zugabe von 25 μ l der Matrix-gekoppelten Agentien und 1 $\frac{1}{2}$ -stündiger Inkubation bei 4°C unter ständiger Invertierung der Gefäße. Die Suspension der Protein A-gekoppelten Matrix (Agarose oder Sepharose-Kügelchen) hatte dabei eine Bindekapazität von 10 μ g humanem Immunglobulin pro μ l, die anti-Maus IgG-Matrix-Suspension eine Kapazität von 0,4 μ g mIgG pro μ l. Die präzipitierenden Komponenten des Ansatzes befanden sich demnach in mindestens 10-fachem Überschuß. Nach erfolgter Inkubation wurde die partikuläre Matrix abzentrifugiert (14000 rpm bei 4°C in einer Tischzentrifuge) und 2-3 mal mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer gewaschen. Für eine anschließende Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen

schloß sich daran die Zugabe von 15 µl 3 x SDS-Probenpuffer sowie 20 µl bidest. Wasser zu den pelletierten Kügelchen an.

NP-40 Lysepuffer: 100 mM Tris/HCL pH 8.0
150 mM NaCl
2 mM EDTA pH 8.0
1 % (v/v) NP-40

Kurz vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml PMSF

3.4.5 *In vitro* Kinase-Assay

Ein *in vitro*-Kinase-Assay ermöglicht die Detektion von Protein-Kinase-Aktivität in Präzipitaten und kann zudem Hinweise darüber liefern, ob ein copräzipitiertes oder exogen zugesetztes Protein unter *in vitro*-Bedingungen ein Kinase-Substrat darstellt. Prinzipiell basiert der Assay auf der Beobachtung, das eine gereinigte Proteinkinase nach Supplementierung von zweiwertigen Kationen und ATP *in vitro* aktiv sein kann und Proteine phosphoryliert, die auch unter physiologischen Bedingungen präferentielle Kinase-Substrate darstellen. Bei Verwendung von γ -³²P-ATP und nachfolgender Autoradiographie lassen sich ausschließlich Phosphorylierungsereignisse detektieren, die erst im Verlauf des Assays eingetreten sind. Demgegenüber detektiert man bei Verwendung von unmarkiertem ATP und anschließendem anti-Phosphotyrosin Westernblot die Gesamt-Tyrosinphosphorylierung der im Ansatz enthaltenen Proteine, erfaßt also auch Phosphorylierungen, die bereits in der lebenden Zelle stattgefunden haben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden ein *in vitro*-Kinase-Assay in einem Ansatz durchgeführt, bei dem die Kinase zusammen mit einem potentiellen Substrat in Jurkat T-Zellen coexprimiert und aus dem Lysat präzipitiert worden war. Hierzu wurden Lysate wie beschrieben (Abschnitt 3.4.4) präpariert und überexprimierte ZAP-70 Moleküle präzipitiert und gewaschen. Ein weiterer Waschschriff zur Äquilibrierung des Ansatzes erfolgte in 1 ml 20 mM HEPES pH 8,0. Es folgte die Resuspendierung der Matrix-Kügelchen in 20 µl Reaktionspuffer sowie die Zugabe von 0,5 µmol γ -³²P-ATP. Die anschließende Inkubation erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 10 µl 3 x SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion beendet. Es folgte die Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel, Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran und deren Autoradiographie.

Reaktionspuffer: 20 mM HEPES pH 8.0
10 mM MgCl₂
10 mM MnCl₂

Sterilisation durch Filtrierung

3.4.6 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde in Zuge dieser Arbeit ausschließlich die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) eingesetzt. Saturierende SDS-Konzentrationen führen dabei zur vollständigen Denaturierung von Proteinen und erzeugen einen negativen Ladungsüberschuß, der proportional zur Molekulargewicht des Gesamtmoleküls ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-haltigen Gelen ist somit alleine durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine kann der Vernetzungsgrad eines Gels durch die Verwendung verschiedener Mengen an Acrylamid/Bisacrylamid variiert werden. Durch Einsatz eines Sammelgels, in dem die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe hinter einer Chloridionen-Lauffront fokussiert werden, erreicht man eine Bandenschärfung der Proteinkomplexe.

Die Polyacrylamid-Lösungen wurden wie unten angegeben hergestellt und mit Hilfe einer Gießapparatur (Hoefer Tall Mighty Small Minigel-System) zwischen zwei Glasplatten zur Polymerisation gebracht. Dabei wirkt TEMED als Katalysator der Freisetzung von Radikalen aus APS, welche die Copolymerisation von Acrylamid und Bis-Acrylamid initiieren. Das zunächst gegossene Trenngel wurde während der etwa 10 Minuten in Anspruch nehmenden Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Die Höhe des Sammelgels betrug etwa 0,5 cm.

Die Zellysate wurden wie beschrieben aufbereitet und vor dem Gellauf für 5 Minuten im Wasserbad aufgeköcht. Nach erneuter Pelletierung der Matrix wurde eine Spur des Gels, das in eine mit Laufpuffer befüllte Mini-Gel-Apparatur transferiert worden war, in der Regel mit 15 µl ($1/2$ Vol.) einer Probe beladen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 300 V für 90-120 Minuten, bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war.

In der Regel schloß sich an die Gelelektrophorese der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran an. Im Anschluß daran wurden zur Analyse der Transfereffizienz die im Gel verbliebenen Proteine durch 15 minütliches Schwenken in Coomassie-Färbelösung angefärbt und der Farbhintergrund des Gels über Nacht durch Inkubation in Entfärbungslösung entfernt. Die Trocknung der Gele erfolgte nach Transfer auf ein Filterpapier für 60 Minuten bei 80°C in einem Vakuum-Trockner.

Acrylamid-Konzentration	linearer Trennbereich [kD]
5.0%	57-212
7.5%	36-94
10%	16-68
15%	12-43

Tabelle 3.2: Effektiver Trennbereich von SDS-Polyacrylamidgelen

Trenngel:	8% [ml pro Gel]	10% [ml pro Gel]	12% [ml pro Gel]
H ₂ O	2.3	1.9	1.6
30% Acrylamid-Mix	1.3	1.7	2.0
1.5 m Tris pH 8.8	1.3	1.3	1.3
10% SDS	0.05	0.05	0.05
10% APS	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.003	0.002	0.002

Tabelle 3.3: Polyacrylamid-Gellösungen Trenngel

Sammelgel:	5% [ml pro Gel]
H ₂ O	1.4
30% Acrylamid-Mix	0.33
1.0 m Tris pH 6.8	0.25
10% SDS	0.02
10% APS	0.02
TEMED	0.002

Tabelle 3.4: Polyacrylamid-Gellösungen Sammelgel

30%Acrylamid-Mix:	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bis-Acrylamid
10x SDS-Laufpuffer:	250 mM Tris pH 8.3 bei 25°C 2.5 M Glycin 1% (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 2.6 g/l Coomassie Blau R-250
Entfärbelösung:	10% (v/v) Essigsäure 20% (v/v) Isopropanol

3.5 Immunologische Arbeitstechniken

3.5.1 Westernblot

Zur nachfolgenden Detektion mit Antikörpern wurden Proteine mittels Elektrobplot aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Hierzu wurde das Gel auf drei Lagen 3 MM Filterpapier (Whatman) gelegt, mit der Nitrozellulosemembran über-

schichtet und letztere wiederum mit drei Lagen 3 MM Filterpapier überschichtet. Diese Anordnung wurde in eine Naßblotapparatur gespannt, welche mit Transferpuffer gefüllt worden war. Die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe wandern in einem elektrischen Feld bei 70 Volt für 3 h oder 20 V über Nacht in Richtung der Kathode zur Nitrozellulosemembran. Diese wurde nach erfolgtem Transfer in der Regel mit einer 1 %-igen (w/v) Lösung von Gelatine in PBS für 2 h bei RT blockiert. Die Antikörperinkubation erfolgte in TBST (0,05 % Tween 20 in TBS), die Detektion eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers mittels des ECL-Reagenzes (Amersham Pharmacia Biotech).

3.5.2 Immuofluoreszenz-Mikroskopie

Zur Detektion der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden Zellen meist auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern immobilisiert, für 15 min mit einer 2%-igen (w/v) Lösung von Paraformaldehyd in PBS fixiert, freie reaktive Gruppen mit einer 2%-igen (w/v) Lösung von Glycin in PBS abgesättigt und die Zellen mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Eine geeignete Verdünnung von Antikörpern wurden daraufhin in 2 % FCS in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Deckgläsern überschichtet und deren Fluoreszenz in einem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica TCS) analysiert.

3.5.3 Durchflußzytometrie

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression eines Proteins wurden Zellen in der Regel nicht fixiert und permeabilisiert, sondern in Zellkulturmedium für 1 h mit Antikörper versetzt, in PBS gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. Zur Quantifizierung der Expression eines zytoplasmatischen Proteins wurden Zellen wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben fixiert und permeabilisiert oder mit einer gleichvolumigen Mischung aus Methanol und Azeton. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte wiederum in 2 % FCS in PBS für 1 h bei RT. EGFP exprimierende Zellen wurden in der Regel unfixiert in PBS aufgenommen und durchflußzytometrisch analysiert (Coulter Epics XL). Die Bestimmung der Expressionsrate und -effizienz von Antigenen erfolgte automatisch mit dem Steuerungsprogramm, meist in Form eines Histogramms von Zellzahl und logarithmischer Fluoreszenzintensität.

3.5.4 ELISA

Die ELISA Technik ermöglicht eine Quantifizierung von Proteinmengen in Lösung. Zwei spezifische, nicht-kompetitive Antikörper gegen das zu analysierende Protein müssen hierzu vorhanden sein, mittels derer das Antigen zunächst immobilisiert und später detektiert werden

kann. Der detektierende Antikörper ist in einer Weise modifiziert, die eine enzymatische Nachweisreaktion ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich eine Proteinkonzentration auf diese Weise bestimmt, nämlich die von murinem IL-2. Der zur Proteinisolation aus Zellkultur-Überständen (Abschnitt 3.6.3) eingesetzte anti-IL-2 Antikörper wurde hierzu nach Herstellerangaben (BD-Pharmingen, OptEIA-Set, 2641KI) in Carbonatpuffer (pH 9,5) auf Plastikplatten mit 96 Vertiefungen aufgebracht. Nach mehreren Waschrufen mit TBST (0,05 % Tween 20 in TBS) wurden die Platten für 1,5 h mit den zu analysierenden Zellkultur-Überständen inkubiert, wiederum gewaschen und mit dem detektierenden anti-IL-2 Antikörper versetzt, welcher mit Peroxidase konjugiert war. Nach einem vierfachen Waschrufen wurden mit löslichen, chromogenen Substraten der Peroxidase (ABTS, Boehringer Mannheim; OPG, Sigma P9187) eine Detektion des immobilisierten Proteins ermöglicht, welche anhand von standardisierten IL-2 Verdünnungen quantifiziert werden konnte.

Carbonatpuffer: 0.1 M Carbonat (8,4 g/l NaHCO₃; 3,56 g/l Na₂CO₃; pH 9,5)

3.6 T-Zell Funktionsanalysen

3.6.1 Calcium-Influx

Unmittelbar nach der Stimulation mit Antigen kann in T-Zellen an der Kontaktstelle zur antigenpräsentierenden Zelle eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration festgestellt werden. Die Calcium-Ionen strömen zunächst aus intrazellulären Speicherstätten ins Zytoplasma, später werden auch durch selektive Kanäle Calcium-Ionen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen. Die Messung dieses Calcium-Influsses geschieht in der Regel durch Fluoreszenzfarbstoffe, deren Fluoreszenzintensität oder Emissionsspektren sich abhängig von der Calcium-Ionen Konzentration verschieben.

Änderungen der Fluoreszenzintensität können im Durchflußzytometer kinetisch und quantitativ analysiert werden. T-Zellen wurden in diesem Fall allerdings nicht durch Kontakt mit Antigen stimuliert, sondern durch antikörpervermittelte Quervernetzung der extrazellulären Anteile von Fusionsproteinen, deren intrazelluläre Domänen aus der TCR- ζ Kette oder aus Tyrosinkinase bestand (Kolanus W. *et al.*, 1993). Vor der Stimulation wurden die Zellen für 1 h in HBSS nach Herstellerangaben mit dem membranpermeablen, Calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 beladen. Nach etwa 30 sekundiger Erfassung der Fluoreszenzintensität von ruhenden Zellen wurde die Messung unterbrochen, die Zellen durch Zugabe von Antikörper stimuliert und die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität für weitere 3-4 min fortgesetzt. Die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität aller innerhalb eines kurzen Zeitraums analysierten Zellen erfolgte unter Verwendung des Programms Mtime (Phoenix).

3.6.2 Promotoraktivierungsstudien

Die transkriptionelle Aktivierung des IL-2 Promotors ist ein häufig herangezogener Parameter zur Quantifizierung der Stimulation von T-Helfer-Zellen, da eine effiziente Produktion dieses autokrinen Wachstumsfaktors mit dem Eintritt in den Zellzyklus und damit der Expansion der T-Zelle einhergeht. Die Bestimmung der Promotoraktivität wird durch Expression eines Reportergens erleichtert, wegen der höheren Sensitivität in der Regel eines heterolog exprimierten Enzyms. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei Promotorkonstrukte mit Luziferase als Reporter gen zur Anwendung. Zum einen wurde der gesamte humane IL-2 Promotor (Basenpaare -577 bis +53) in die Mlu-I und Hind-III Schnittstellen des Vektors pGL2 (Promega) inseriert, zum anderen wurde ein von Edgar Serfling (Würzburg) zur Verfügung gestelltes Konstrukt verwendet, das drei Kopien der distalen NF-AT Bindungsstelle des humanen IL-2 Promotors enthielt.

Promotoraktivierungsstudien konnten in transient transfizierten Jurkat T-Zellen und Syk-defizienten DT-40 B-Zellen erfolgen, was im Vergleich zur stabilen Transfektion klonale Schwankungen vermied. Etwa 12 h nach der Elektroporation mit typischerweise 10 µg Reporterplasmid und 20 µg Expressionsplasmid wurden die Zellen mit den geeigneten Reagenzien für 8 Stunden im Brutschrank stimuliert, in der Regel mit Antikörpern gegen den Fusionsanteil exprimierter Proteine (2 µg/ml), gegen den T-Zell- oder B-Zell-Rezeptor (1 µg/ml) oder mit pharmakologischen Agenzien wie dem Calcium Ionophor A23187 (0,5 µg/ml) oder dem Phorbol ester PMA (50 ng/ml). Als maximale Stimulierbarkeit eines Transfektionsansatzes wurde jeweils die synergistische Promotoraktivierung in Gegenwart von PMA und Ionophor bestimmt, die als unabhängig von den exprimierten Rezeptorfusionsproteinen oder Tyrosinkinasen angesehen wurde. Die stimulierten Zellen wurden durch Zugabe von 5 x Reporter-Lysis-Puffer (Promega) für 10 min bei RT lysiert, was in der Regel durch einmaliges Einfrieren bei -20°C unterstützt wurde. Die Luziferaseaktivität von 30 µl Lysat wurde nach Zugabe von 100 µl Luziferase-Reagenz (Promega) im Szintillationszähler oder Luminometer gemessen.

3.6.3 Antigenabhängige T-Zell Aktivierung

Die antigenabhängige Stimulation von T-Zellen erfordert eine kultivierbare T-Zelllinie mit definierter Antigenspezifität. Der T-Zell-Rezeptor dieser Zelllinie muß also eine bekannte Kombination aus Peptid und MHC-Molekül erkennen und hierdurch aktiviert werden. Da im vorliegenden Fall der Beitrag von CD4 zur antigenabhängigen T-Zell Aktivierung untersucht werden sollte, wurde darüber hinaus ein CD4-abhängiges, aber gleichzeitig defizientes experimentelles System benötigt, in dem CD4-Expression durch stabile Transfektion rekonstituiert werden konnte. Ein solches System wurde unserer Arbeitsgruppe vom Labor von Dan Littman (Universität von New York) zur Verfügung gestellt. Es umfaßt murine 171 T-Zellen, deren TCR ein Peptidanalogen eines Fragments des Hühnereiweiß-Lysozyms (Aminosäuren

74 bis 88; NLANIPASALLSSDI; synthetisiert bei MWG Biotech) erkennt, welches von A^b MHC-Klasse-II Molekülen präsentiert wird, die wiederum von der fibroblasten-ähnlichen Zelllinie FT7.1 heterolog exprimiert werden (Abbildung 6.15; Gleichenhans N. *et al.*, 1991). Nach Stimulation exprimieren CD4-positive 171 T-Zellen detektierbare Mengen an IL-2 abhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration, ohne die Rekonstitution von CD4 war unter den gleichen Bedingungen jedoch keine IL-2 Produktion meßbar (Abbildung 6.17; Gleichenhans N. *et al.*, 1991). Dieses System konnte daher zur Charakterisierung der costimulatorischen Funktion von CD4 oder Mutanten davon eingesetzt werden.

CD4-defiziente 171 T-Zellen wurden mit einem neu konstruierten Expressionsplasmid (pEF-IRESpuro) stabil transfiziert. Die uni-cistronische, IRES-gekoppelte Expression von CD4 bzw. dessen Mutanten mit dem Selektionsmarker resultierte in der Regel in einer relativ einheitlichen Oberflächenexpressionsdichte von CD4 in der gesamten Zellpopulation, welche nach Elektroporation von pEF-IRESpuro-Derivaten eine etwa 10-tägige Selektion mit 2 µg/ml Puromycin überlebte (Abbildung 6.16). Die Zellpopulation konnte somit unmittelbar für funktionelle Studien verwendet werden, ohne daß eine Vereinzelnung der Klone nötig gewesen wäre. Zur antigenabhängigen Stimulation wurden 1×10^6 171 T-Zellen mit der gleichen Anzahl von FT7.1 Zellen in je 100 µl RPMI in einer Kulturplatte mit 96 Vertiefungen gemischt und mit einer Verdünnungsreihe des synthetischen Peptids versetzt (100 µl mit 0,012 bis 50 µM Endkonzentration in RPMI). Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die IL-2 Konzentration der Zellkultur-Überstände mittels ELISA bestimmt (Abschnitt 3.5.4), wodurch eine Quantifizierung der antigenabhängigen T-Zell Aktivierung und somit der costimulatorischen Funktion von CD4 ermöglicht wurde. In einigen Versuchen wurde parallel dazu noch die metabolische Aktivität der Zellen jedes Stimulationsansatzes mit dem MTT-Reagenz (Promega) bestimmt, um so die Vitalität der Zellpopulation am Endpunkt der Stimulation zu kontrollieren.

4 Ergebnisse zu ZAP-70

Zielsetzung der hier dokumentierten Analysen war eine detaillierte Charakterisierung der Regulation und Funktion der Tyrosinkinase ZAP-70 während der Aktivierung von T-Zellen. Ein Schwerpunkt bildete dabei die Identifikation potentieller *in vivo* Substrate von ZAP-70. Die Komplexität der Signaltransduktionsprozesse, die als Folge einer Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) initiiert werden, stellt hierfür das größte methodische Hindernis dar.

Zwei unabhängige experimentelle Ansätze wurden verfolgt, um trotz fehlender Techniken zur Analyse von *in vivo* Kinasespezifität zum besseren Verständnis dieser Prozesse beizutragen: Zum einen wurde versucht, die Komplexität des TCR-gekoppelten Signaltransduktionsapparates auf die wesentlichen Elemente zu reduzieren, also auf diejenigen Komponenten zu limitieren, welche noch hinreichend für eine Aktivierung des IL-2 Promotors sind (Abschnitt 2.5). Zum anderen wurde nach einer konstitutiv aktiven ZAP-70 Mutante gesucht, deren Expression ohne äußere Stimulation des T-Zell-Rezeptors Signaltransduktionsprozesse induzieren kann (Abschnitt 4.2). Von einer derartigen ZAP-70 Variante konnten sowohl neue Erkenntnisse zum Regulationsmechanismus von ZAP-70 erwartet werden (Abschnitt 4.3), als auch Hinweise auf Tyrosinphosphorylierungsereignisse erhalten werden, welche spezifisch der ZAP-70 Aktivierung nachgeschaltet sind (Abschnitt 4.4).

4.1 Mechanismen der Kooperativität zwischen ZAP-70 und p56^{lck}

Befunde aus den Laboren von Brian Seed, Arthur Weiss und anderen hatten deutlich gemacht, daß die Komplexität des T-Zell-Rezeptors (TCR) keine unmittelbare Voraussetzung für die Induktion rezeptorproximaler Signaltransduktionsprozesse ist. So ließ sich beispielsweise ein vergleichbarer Calcium-Influx, ein ähnliches Muster tyrosinphosphorylierter Proteine sowie die zytolytische Effektor Funktion CD8 positiver T-Lymphozyten nicht nur nach Stimulation des gesamten TCRs mit Antigen, sondern auch nach Aggregation isolierter Komponenten des TCR Komplexes beobachten. Die ITAMs der akzessorischen CD3- und ζ Ketten sowie die damit interagierenden Tyrosinkinasen der Syk Familie wurden mittels dieser experimentellen Strategie als entscheidende und hinreichende Mediatoren der frühen TCR induzierten Signaltransduktion erkannt (Irving B.A. und Weiss A., 1991; Romeo C. *et al.*, 1992; Chan A.C. *et al.*, 1992; Kolanus W. *et al.*, 1993).

Überraschenderweise ergab jedoch die Analyse der ZAP-70 Tyrosinkinase, daß diese erst nach Coaggregation mit Kinasen der src-Familie die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate sowie Zytolyse von Zielzellen zu induzieren vermag. Die Ursache hierfür ist nicht geklärt, könnte aber in der im Verhältnis zu p72^{Syk} deutlich geringeren intrinsischen *in vitro* Kinaseaktivität von ZAP-70 begründet sein. Diese wird durch Phosphorylierung des Tyrosinrests 492 in der Aktivierungsschleife der ZAP-70 Kinasedomäne massiv gesteigert (Chan A.C. *et al.*, 1995). Unerwartet waren deshalb Befunde von Michael Knoll in unserem Labor

sowie analoge Studien der Antigen induzierte T-Zell Aktivierung im Labor von Dan Littman, welche demonstrierten, daß für diese funktionelle Kooperativität von src-Kinasen mit ZAP-70 nicht wie erwartet der Kinasedomäne, sondern den SH2- und SH3-Domänen von lck und fyn die entscheidende Rolle spielen. Diese Ergebnisse ließen im Hinblick auf eine der Zielsetzungen dieser Arbeit vermuten, daß funktionell relevante Substrate von den Proteinadapterdomänen der src-Kinasen rekrutiert und durch Quervernetzung in unmittelbare Proximität zu Syk-Kinasen gebracht werden.

4.1.1 IL-2 Promotoraktivierung nach Aggregation von ZAP-70 und p56^{lck}

Ausgehend von dieser Annahme wurde zunächst analysiert, ob sich die erwähnte Reduzierbarkeit des TCRs auf eine Aggregation von ZAP-70 und src-Kinasen auch für einen distalen Prozeß der T-Zell Aktivierung bestätigen lassen würde, nämlich für die transkriptionelle Induktion des IL-2 Promotors. Hierzu wurde ein Modellsystem etabliert, welches in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt ist. Die durch Antikörpergabe induzierte Aggregation transmembraner Fusionsproteine in transient transfizierten Jurkat T-Zellen sollte hierbei zu Signaltransduktionsprozessen führen, welche in der transkriptionellen Aktivierung des IL-2 Promotors resultieren und mittels eines Reportergens quantifiziert werden können.

Wie in Abbildung 4.2 gezeigt, konnte tatsächlich nach Aggregation von TCR- ζ , p72^{Syk} oder von ZAP-70 mit p56^{lck} eine signifikante Induktion des IL-2 Promotors beobachtet werden. Diese war quantitativ der nach TCR Stimulation durch den anti-CD3- ϵ Antikörper OKT3 zu beobachtenden Aktivierung vergleichbar (nicht gezeigt). Die Gesamtexpressionsmenge aller Fusionsprotein war auf Proteinebene ähnlich, wenngleich die Oberflächenexpressionsdichte der Syk- und ZAP-70 Konstrukte deutlich geringer war als die der übrigen Fusionsproteine (nicht gezeigt; Kolanus W. al., 1993 und Knoll M., Dissertation).

Diese Ergebnisse bestätigten, daß die Aggregation isolierter Komponenten des T-Zell-Rezeptors oder deren assoziierter Tyrosinkinase auch hinsichtlich Genaktivierung für eine Stimulation des TCR Gesamtkomplexes substituieren kann.

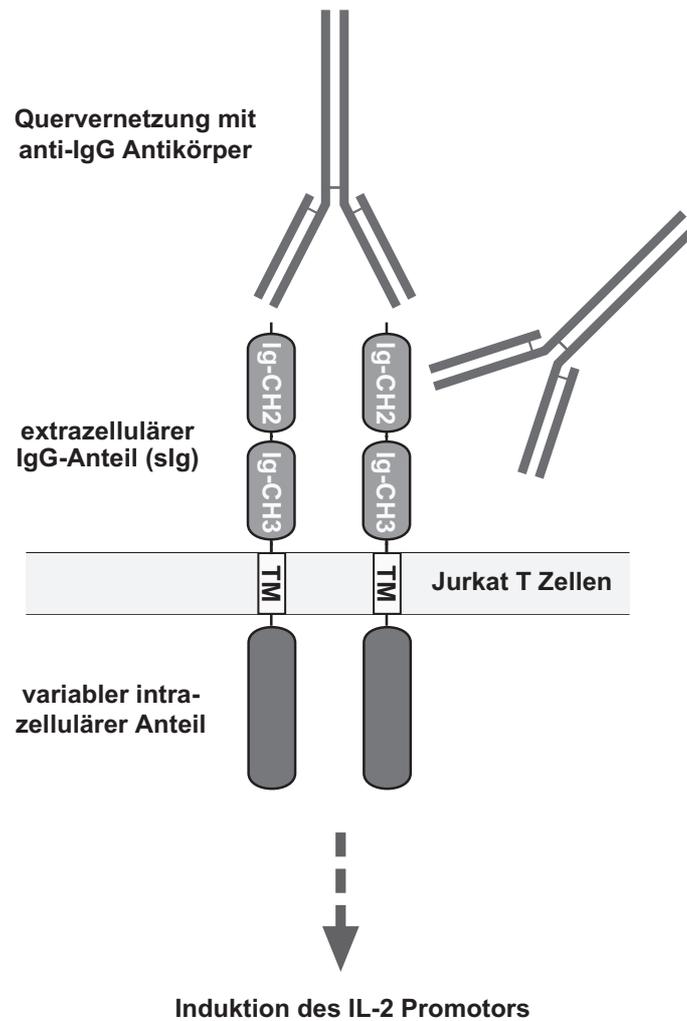


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung eines Modellsystems zur Analyse rezeptorvermittelter Signaltransduktionsprozesse: IL-2 Promotorinduktion durch Aggregation transmembraner Fusionsproteine in transfizierten Jurkat T-Zellen. Details zur Methodik sind in Abschnitt 3.6.2 beschrieben. Die transiente Transfektion von Expressions- und Luziferase-Reporterplasmiden in Jurkat T-Zellen wurde mittels Elektroporation bewerkstelligt. Der extrazelluläre Anteil der Fusionsproteine umfasst zwei Immunglobulin-domänen und ermöglicht somit eine effiziente, antikörpervermittelte Aggregation. Quantifiziert wird die resultierende Induktion des IL-2 Promotors durch Messung der Luziferaseaktivität in Zellysaten.

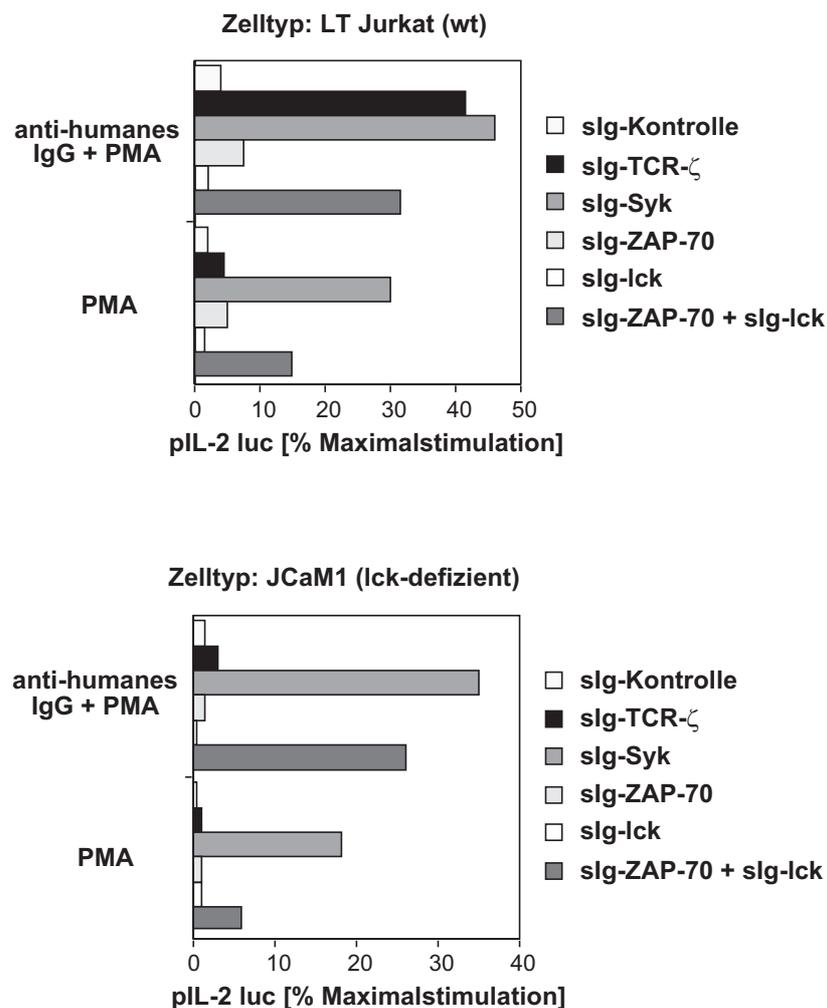


Abbildung 4.2: **Aggregation von ZAP-70 mit p56^{lck} resultiert sowohl in Jurkat T-Zellen als auch in lck-defizienten JCaM1 Zellen in einer signifikanten Induktion des IL-2 Promotors.** Beide Kinasen wurden in Form transmembraner Fusionsproteine mit extrazellulären IgG Domänen (sIg-ZAP-70 bzw. sIg-lck) durch transiente Transfektion exprimiert und mittels eines polyklonalen, gegen humanes IgG gerichteten Serums quervernetzt. Aggregation eines p72^{Syk} Fusionsproteins resultierte in beiden Zelltypen in signifikanter Aktivierung des Promotors, während Aggregation eines TCR- ζ Fusionsproteins nur in Anwesenheit von p56^{lck} effektiv war. Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte durch Expression von Luziferase als Reporter gen. Die Luziferaseaktivitäten sind relativ zur Maximalstimulation des IL-2 Promotors in Anwesenheit eines Calcium-Ionophors und eines Phorbolesters angegeben und repräsentieren die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit einer Standardabweichung unter 15%. Die Expressionsdichte der verschiedenen Konstrukte wurde durch Westernblotanalyse oder Durchflußzytometrie bestimmt (nicht gezeigt).

4.1.2 Die Protein-Interaktionsdomänen von p56^{lck} kooperieren funktionell mit ZAP-70

Die Analyse von Tyrosinphosphorylierungsereignissen nach Aggregation transmembraner Fusionsproteine in Wildtyp Jurkat Zellen hatte ergeben, daß das resultierende Muster an Phosphoproteinen noch immer zu komplex war, um Schlußfolgerungen über spezifische Substrate von ZAP-70 zu ermöglichen (nicht gezeigt). Hilfreich erschien in dieser Hinsicht der Befund, daß eine Aggregation von ZAP-70 mit p56^{lck} auch in der JCaM1 Zelllinie zu einer signifikanten Induktion von rezeptorproximalen Signaltransduktionsereignissen (W. Kolanus,

persönliche Mitteilung) sowie zur Induktion des IL-2 Promotors (Abbildung 4.2) führte. Das als JCaM1 bezeichnete Derivat der Jurkat T-Zelllinie exprimiert aufgrund der Mutation eines Spleißübergangs keine nachweisbaren Mengen der src-Kinase p56^{lck} und weist wie alle Derivate der Jurkat E6 Zelllinie nur geringe Aktivität der p59^{lyn} Kinase auf (Straus D.B. und Weiss A., 1992; Rouer E. *et al.*, 1999). Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, resultierte demgegenüber die Quervernetzung von TCR- ζ in JCaM1 Zellen in keiner signifikanter Induktion des transkriptionell vom IL-2 Promotor regulierten Reportergens. Dies deutet darauf hin, daß src-Kinasen in diesem Zelltyp für eine Phosphorylierung von ITAMs und damit für die Initiation von Signaltransduktion durch die akzessorischen Ketten des T-Zell-Rezeptors essentiell sind.

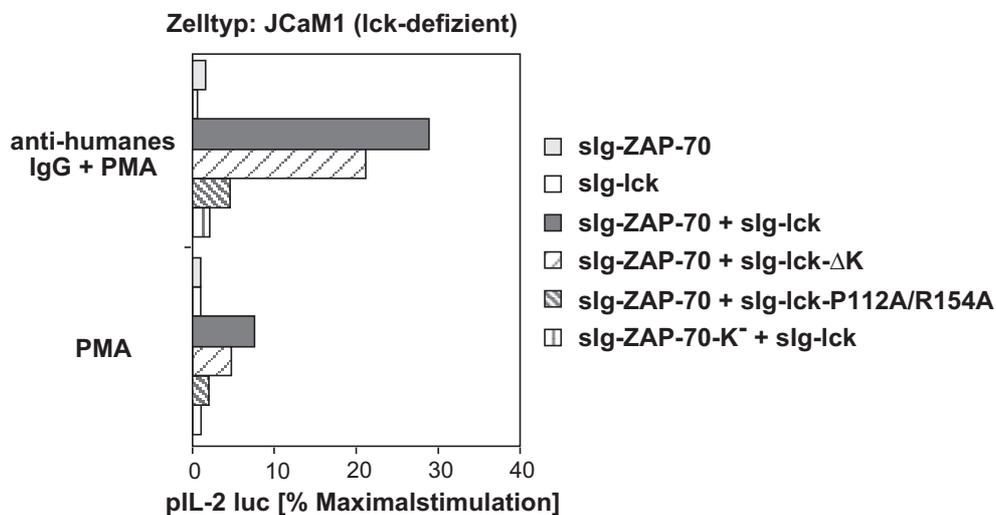


Abbildung 4.3: **Die Protein-Adapterdomänen SH2 und SH3 sind essentiell und hinreichend für die Induktion des IL-2 Promotors nach Aggregation mit katalytisch aktiven ZAP-70 Fusionsproteinen.** Quervernetzung von ZAP-70 mit einer Deletionsmutante von p56^{lck}, der die gesamte Kinasedomäne fehlt (slg-lck- Δ K), resultiert in einer effizienter Aktivierung des Promotors, welche gegenüber einer Quervernetzung mit der lck Wildtypform nur geringfügig reduziert war. Demgegenüber ist eine Mutante von p56^{lck} inaktiv, deren SH2- und SH3-Domänen durch jeweilige Punktmutationen ihre generische Funktion als Protein-Interaktionsdomänen verloren haben (slg-lck-P112A/R154A). Als slg-ZAP-70-K ist eine Punktmutante von ZAP-70 bezeichnet, deren enzymatische Kinaseaktivität - aufgrund fehlender Bindung von ATP - nicht nachweisbar ist. Die vergleichbare Oberflächenexpression der Wildtypformen und ihrer entsprechenden Mutanten war über Durchflußzytometrie kontrolliert worden (nicht gezeigt). Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Wie aufgrund der in Abschnitt 4.1 erwähnten Befunde erwartet, induzierte die Aggregation von ZAP-70 mit einer Deletionsmutante von lck, der die gesamte Kinasedomäne fehlte (slg-lck- Δ K), die Aktivität eines IL-2 Promotor Reportergens in ähnlicher Weise wie nach Quervernetzung mit Fusionsproteinen des p56^{lck} Gesamtmoleküls (Abbildung 4.3). Für die funktionelle Aktivität der transmembranen Syk-Kinasen Fusionsproteine scheint demnach die Kinaseaktivität von src-Kinase keine Voraussetzung zu sein (Knoll M., Dissertation). Demgegenüber führte die Punktmutation der - für die Adapterfunktion der SH2- und SH3-Domänen entscheidenden - Reste P112 und R154 nach Alanin (slg-lck-P112A/R154A) zu

einer deutlichen Reduktion der Genaktivierung, welche durch Aggregation mit ZAP-70 induzierbar war. Die Kinaseaktivität von ZAP-70 war für diesen Effekt ebenfalls essentiell, da die Expression einer Kinase-inaktiven Punktmutante von ZAP-70 (sIg-ZAP-70-K⁻) zu einer signifikanten Reduktion der Signalintensität nach Quervernetzung mit p56^{lck} führte.

Somit war die weitestmögliche Minimalisierung der Signaltransduktionsfunktion des T-Zell-Antigenrezeptorkomplexes definiert: Eine nahezu vollständige Aktivierung des IL-2 Promotors konnte allein durch die Quervernetzung von ZAP-70 mit den SH2- und SH3-Proteinadapterdomänen von p56^{lck} in JCaM1 Zellen erreicht werden.

4.1.3 Potentielle Substrate des minimalisierten T-Zell-Antigenrezeptors

Die funktionelle Aktivität des minimalen TCR-Signaltransduktionskomplexes hinsichtlich der Induktion des IL-2 Promotors ließ erwarten, daß potentielle *in vivo* Substrate von ZAP-70 aufgrund ihrer Interaktion mit den Protein-Adapterdomänen von p56^{lck} in den quervernetzten Komplex rekrutiert werden. Um eine für biochemische Experimente hilfreiche hohe Expressionsrate transmembraner Fusionsproteine zu erzielen, wurden JCaM1 Zellen mit Hilfe rekombinanter Vaccinia Viren transfiziert. Bereits im Labor verfügbar waren rekombinante Viren, welche ZAP-70 und die Deletionsmutante lck-ΔK (siehe voriger Abschnitt) in Form von Fusionsproteinen mit dem extrazellulären Anteil von CD16 und der transmembranen Domäne von CD7 zur Expression bringen (Kolanus W. *et al.*, 1993). Die Quervernetzung dieser beiden Fusionsproteine wurde mittels des monoklonalen anti-CD16 Antikörpers 3G8 sowie eines anti-murinen IgG-Serums aus Kaninchen als sekundärem Reagenz erreicht. Nach Aggregation des ZAP-70- und des lck-ΔK-Fusionsproteins für 5 Minuten bei 37°C (bzw. zur Kontrolle bei 4°C) wurden die quervernetzten Komplexe an Protein A Sepharose präzipitiert und im Westernblot auf Phosphotyrosin enthaltende Proteine hin analysiert. Wie aus Abbildung 4.4 zu ersehen, wiesen die Fusionsproteine von ZAP-70 und lck-ΔK selbst nach Aggregation bei 37°C (Spur 4-6) kaum phosphorylierte Tyrosinreste auf, wohingegen mehrere Phosphoproteine spezifisch mit dem aggregierten Komplex copräzipitierten (Spur 5). Dominierend war ein Protein von 76 kD apparentem Molekulargewicht in denaturierender Gelelektrophorese. Drei weitere copräzipitierende Proteinbanden schwächerer Intensität migrierten mit 34 kD, 36 kD und 95 kD. Ein möglicher Komplex dieser Proteine ist schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt, wobei lediglich die tyrosinphosphorylierten Komponenten erfaßt wurden.

Zelltyp: JCaM1
 IP: 3G8 (anti-CD16)
 Detektion: 4G10 (anti-Phosphotyrosin)

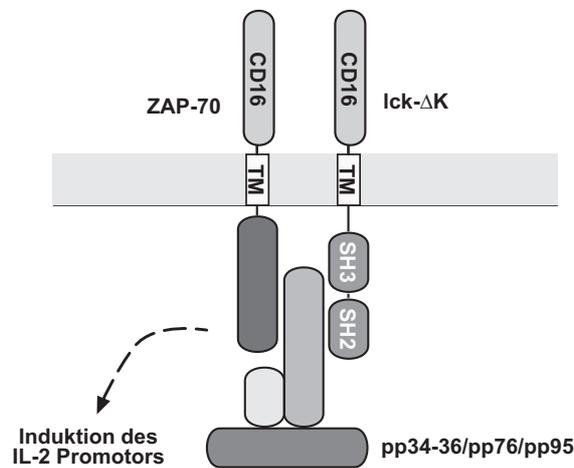
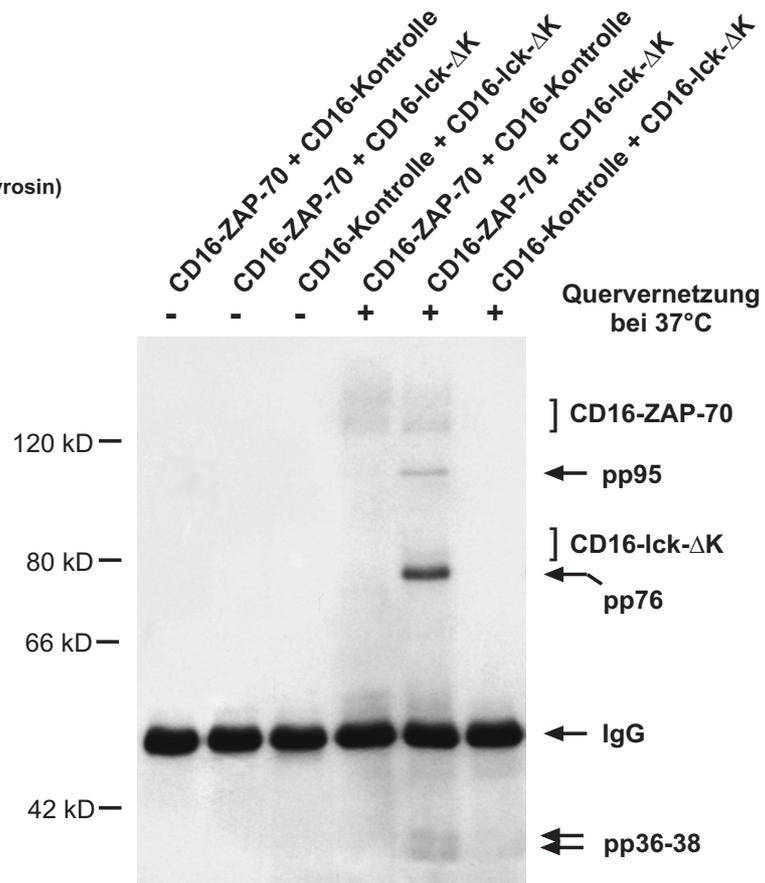


Abbildung 4.4: **Copräzipitation tyrosinphosphorylierter Proteine mit dem aggregierten Komplex aus ZAP-70 und Ick-ΔK.** Die Aggregation und Präzipitation beider Proteine wurde durch deren Expression als transmembrane Fusionsproteine mit der extrazellulären Domäne von CD16 in JCaM1 Zellen ermöglicht. Quervernetzung von ZAP-70 mit Ick-ΔK resultiert in der Tyrosinphosphorylierung mehrerer assoziierter Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 34 bis 36 kD, 76 kD und 95 kD. Deren Detektion erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der anti-CD16-Präzipitate mittels 10%-iger, denaturierender PAGE, Transfer der Proteine auf Nitrozellulose und Inkubation mit dem - gegen Phosphotyrosin gerichteten - monoklonalen Antikörper 4G10.

Die unmittelbare Assoziation dieser vier tyrosinphosphorylierten Proteine mit dem Komplex aus Kinase-aktiven ZAP-70- und aus Kinase-inaktiven p56^{lck}-Molekülen legt nahe, daß es sich potentiell um direkte Substrate von ZAP-70 handeln könnte. Die mögliche Identität dieser Phosphoproteine ist in Abschnitt 5.3.1 diskutiert.

Einschränkend muß erwähnt werden, daß die Expression von ZAP-70 und der p56^{lck}-Deletionsmutante in Form transmembraner Fusionsproteine sowie deren erzwungene Aggregation eventuell anfällig für unphysiologische Effekte sein mag. Dies gilt im Besonderen für die Phosphorylierung alternativer Substrate durch mögliche subzelluläre Fehl-Lokalisation des transmembranen ZAP-70-Fusionproteins (siehe Kolanus W. *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurden zur Evaluierung dieser potentiellen Phosphotyrosinsubstrate unabhängige Experimente mit löslichen, hyperaktiven Mutanten von ZAP-70 und Syk durchgeführt, welche im Folgenden beschrieben sind.

4.2 *In vivo* Funktionsanalysen von Tyrosin-Substitutionsmutanten der Syk-Kinasen

Wie bereits einleitend erwähnt, enthalten ZAP-70 und Syk mehrere konservierte Tyrosinreste, deren Phosphorylierungszustand sowohl die Kinaseaktivität als auch die Rekrutierung phosphotyrosinbindender Proteine moduliert. Einige der in Frage kommenden Tyrosinreste wurden zu Phenylalaninresten mutiert mit der Zielsetzung, hyperaktive Mutanten von ZAP-70 und Syk zu generieren, deren Substrate zu identifizieren und bislang unbekannte Regulationsmechanismen der Syk-Kinase Aktivität zu untersuchen.

Abbildung 4.5 zeigt schematisch die Position der substituierten Tyrosinreste innerhalb der Domänenstruktur von ZAP-70 und Syk. Die Mutation des Tyrosinrests 292 zu Phenylalanin war bereits als moderat hyperaktive Mutation beschrieben worden, ohne daß jedoch eine Hyperphosphorylierung spezifischer Phosphoproteine *in vivo* dokumentiert worden wäre (siehe Abschnitt 5.2.1). Die Mutation des in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne lokalisierten Tyrosinrests 492, resultiert in gesteigerter Kinaseaktivität *in vitro* (vergleiche Abbildung 4.10) und in verstärkter *in vivo* Genaktivierung in einem häufig verwendeten Modellsystem für Syk-Kinasefunktion, einer Syk-defizienten B Zelllinie aus dem Huhn (siehe Abschnitt 5.2.1).

Zum damaligen Zeitpunkt nicht beschrieben waren Konsequenzen der Substitution auffallend konservierter Tyrosinreste, welche sich proximal zu der jeweiligen Kinasedomäne von ZAP-70 und Syk befinden (Reste 597 und 598 in humanem ZAP-70 bzw. 624 bis 626 in humanem Syk). Die entsprechenden Tyrosinstitutionsmutanten wurden - wegen ihrer Lokalisation nahe der Carboxytermini beider Proteine - als ZAP YF-C bzw. Syk YF-C bezeichnet. Als Negativkontrollen wurden des weiteren hypoaktive Mutanten beider Kinasen verwendet, in denen jeweils ein für die ATP- Bindung essentieller Lysinrest gegen Alanin substituiert worden war (Kolanus W. *et al.*, 1993). Durchgeführt wurden die entsprechenden

Mutagenesereaktionen von Charles Romeo, Waldemar Kolanus, Birgit Bossenmeier und Michael Knoll.

4.2.1 Transiente Überexpression von ZAP-70 und Syk Mutanten

Als Modellsystem für die im Folgenden beschriebenen T-Zell Aktivierungsstudien wurden erneut die Jurkat T-Zelllinie gewählt, in erster Linie wegen der deutlichen Induzierbarkeit des IL-2 Promotors in diesem Zelltyp sowie der relativ hohen Transfektionseffizienz nach Elektroporation. Abbildung 4.6 dokumentiert die Westernblotanalyse der etwa 10- bis 20-fachen Überexpression der ZAP-70 Mutanten nach transienter Transfektion von Jurkat Zellen relativ zur endogen exprimierten Menge (Spur 1). Die Syk Mutanten wurden - wegen fehlender Verfügbarkeit eines spezifischen anti-Syk Antikörpers - durchweg als Fusionsproteine exprimiert, entweder fusioniert mit zytoplasmatisch exprimierten Immunglobulin Domänen (cIg-Syk) oder als flag-markierte Proteine (vergleiche Abbildung 6.6). Die Relation von endogenem zu überexprimiertem Syk konnte hierdurch allerdings nicht bestimmt werden.

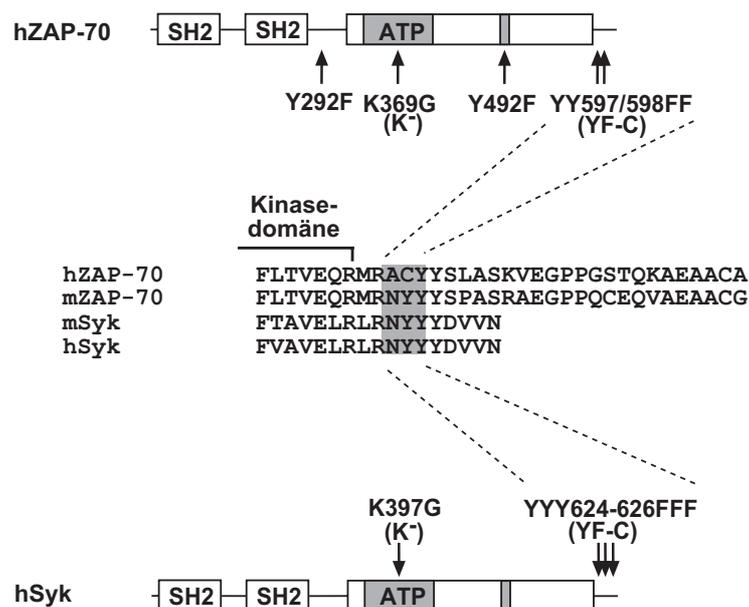


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der verwendeten Tyrosinstitutionsmutanten von humanem ZAP-70 und Syk. Die als YF-C bezeichneten Mutationen betreffen Tyrosinreste, welche carboxyterminal der Kinasedomäne beider Proteine lokalisiert sind und deren Position in humanen und murinen Syk-Kinasen konserviert ist. Bereits beschriebene Tyrosinstitutionsmutationen in ZAP-70 betreffen den - in der Interdomäne B lokalisierten - Tyrosinrest 292 sowie den in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne befindlichen Tyrosinrest 492 (siehe Abschnitt 5.2.1). Substitution der Lysinreste 369 bzw. 397 in der ATP-bindenden Untereinheit der Kinasedomänen von ZAP-70 bzw. Syk resultieren im Verlust katalytischer Aktivität (K⁻).

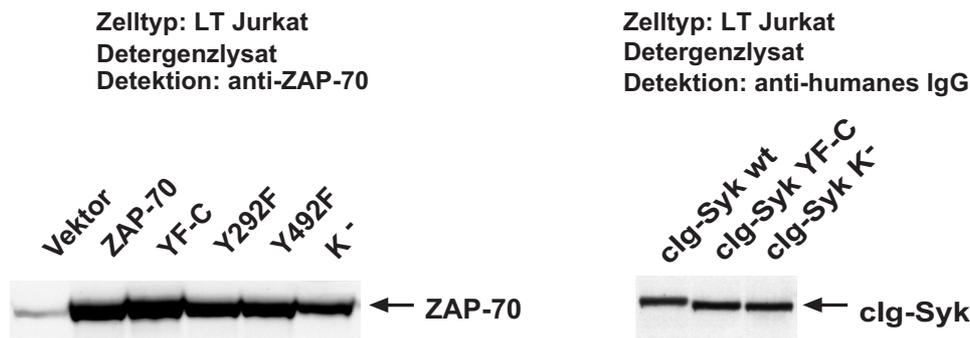


Abbildung 4.6: Exemplarische Darstellung der Überexpression der analysierten ZAP-70 und Syk Varianten in Jurkat Zellysaten. Alle Variante von ZAP-70 und Syk wurden nach transienter Transfektion von Jurkat Zellen in vergleichbarer Menge exprimiert. Die Relation von endogen vorhandenem ZAP-70 zu den überexprimierten ZAP-70 Varianten wurde mit Hilfe des - gegen ZAP-70 gerichteten - monoklonalen Antikörpers 2F3.2 abgeschätzt und lag in einer Größenordnung von 1:20 bei einer Transfektionseffizienz von etwa 50% (analysiert über Durchflußzytometrie; nicht gezeigt). Somit sollten die überexprimierten Varianten effizient mit der endogenen Wildtypform von ZAP-70 kompetieren können, beispielsweise um die Bindung phosphorylierter ITAMs des T-Zell-Rezeptorkomplexes. Die Varianten von p72^{Syk} wurden wegen der fehlenden Nachweismöglichkeit der nativen Kinase in Form von Immunglobulin-Fusionsproteinen exprimiert.

4.2.2 Die ZAP YF-C Mutante ist in funktioneller Hinsicht konstitutiv aktiv

T-Zell Aktivierung resultiert in transkriptionell regulierter Neusynthese von Interleukin-2, das als auto- und parakriner Wachstumsfaktor für T-Zell Proliferation essentiell ist. Die Induktion des IL-2 Promotors ist deshalb ein vielfach analysierter Parameter zur Quantifizierung der T-Zell Aktivierung. Durch Cotransfektion eines Reporterplasmids, von welchem Luziferase unter der Kontrolle eines IL-2 Promotorfragments (-577 bis +53) exprimiert wird, läßt sich in transient transfizierten Jurkat T-Zellen der Effekt einer Überexpression von ZAP-70, Syk und deren Mutanten charakterisieren. Bereits einleitend wurde erwähnt, daß für die transkriptionelle Induktion des IL-2 Promotors in Jurkat Zellen insbesondere der Transkriptionsfaktorkomplex NF-AT (Nukleärer Faktor in aktivierten T-Zellen) verantwortlich ist. DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität des NF-AT Komplexes läßt sich - außer durch T-Zell Aktivierung - auch mittels zweier synergistischer Stimuli induzieren, nämlich durch Behandlung von T-Zellen mit einem Calcium-Ionophor, welches eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration bewirkt, bei gleichzeitiger Costimulation mit Phorbolestern, welche unter anderem bestimmte lipidbindende Kinasen aktivieren können.

Wie im oberen Diagramm der Abbildung 4.7 dargestellt, konnte die Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch Aggregation mittels des monoklonalen anti-TCR- ϵ Antikörpers OKT3 für sich genommen lediglich eine etwa 3-fache Induktion des IL-2 Promotors bewirken, der Phorbolster PMA lediglich eine etwa 5-fache Induktion. Costimulation durch beide Reagenzien resultierte demgegenüber in synergistischer, etwa 25-facher Induktion gegenüber der unstimulierten Aktivität des Promotors (Abbildung 4.7; OKT3/PMA). Überexpression der

ZAP YF-C Mutante, bei der zwei C-terminal der Kinasedomäne liegende Tyrosinreste zu Phenylalanin substituiert wurden, aktivierte für sich genommen den IL-2 Promotor (5-fach). Am deutlichsten war die - durch Expression von ZAP YF-C induzierte - Aktivierung jedoch in Gegenwart von PMA. Unter diesen Bedingungen entsprach sie quantitativ derjenigen IL-2 Promotorinduktion, die aus einer Costimulation mit OKT3 und PMA resultierte.

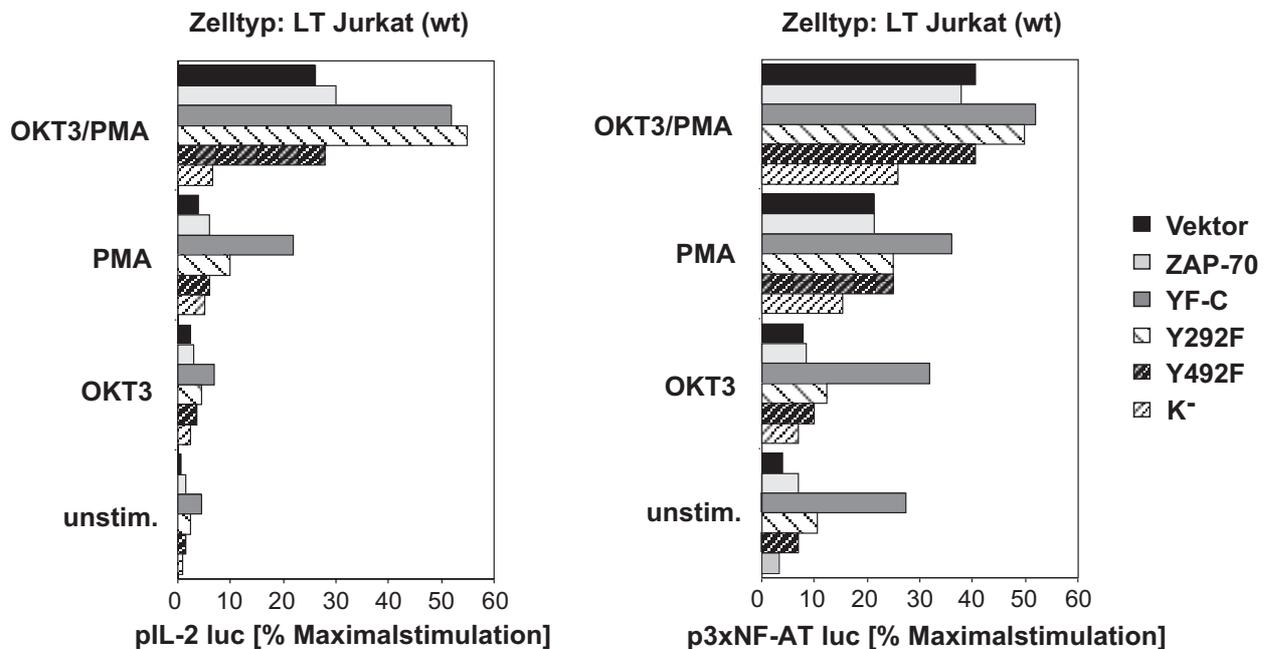


Abbildung 4.7: Gesteigerte transkriptionelle Aktivierung des IL-2 Promotors und von NF-AT-Elementen nach Überexpression der ZAP YF-C Mutante. Die Hyperaktivität der ZAP YF-C Mutante im Vergleich zur Wildtypform von ZAP-70 wurde besonders deutlich durch die Induktion des IL-2 Promotors in Gegenwart von Phorbol ester (PMA), sowie durch die Induktion der Aktivität von NF-AT-Elementen in Abwesenheit äußerer Stimuli. Gabe des OKT3 Antikörpers induziert die Stimulation des T-Zell-Rezeptors über antikörpervermittelte Quervernetzung. Die Luciferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Formal gesehen konnte somit die Überexpression der ZAP-70 YF-C Mutante das TCR-induzierte Signal ersetzen, weshalb YF-C als funktionell konstitutiv aktive Variante von ZAP-70 bezeichnet werden kann. Keine der parallel analysierten Mutanten erfüllte dieses Kriterium, wenngleich die Expression der Y292F-Substitutionsmutante in OKT3 und PMA behandelten, prä-stimulierten Zellen eine etwa zweifache Steigerung der IL-2 Promotoraktivität bewirken konnte.

Um die relativ schwachen Effekte auf den IL-2 Promotor zu verifizieren, wurde zum einen das Verhältnis der Überexpression von ZAP YF-C gegenüber endogenem ZAP-70 durch Titration der Menge des Expressionsplasmids variiert. Wie in Abbildung 4.8 dokumentiert, war der hyperaktive Effekt der YF-C Mutation auf die Aktivierung des IL-2 Promotors titrier- und saturierbar, wobei die transfizierten Zellen gleichzeitig mit PMA oder OKT3/PMA costimuliert wurden. Zum anderen wurden parallele Experimente mit einem NF-AT-Reporterplasmid durchgeführt, welches drei Wiederholungen des isolierten NF-AT-Elements

des IL-2 Promotors enthielt (Abbildung 4.7; unteres Diagramm). Dieses konnte alleine durch Cotransfektion von ZAP YF-C etwa 7-fach gegenüber einer Kontrolltransfektion aktiviert werden, ohne daß ein zusätzlicher äußerer Stimulus nötig gewesen wäre. Wiederum war YF-C diejenige Mutation, deren Expression mit Abstand den deutlichsten Effekt aufwies.

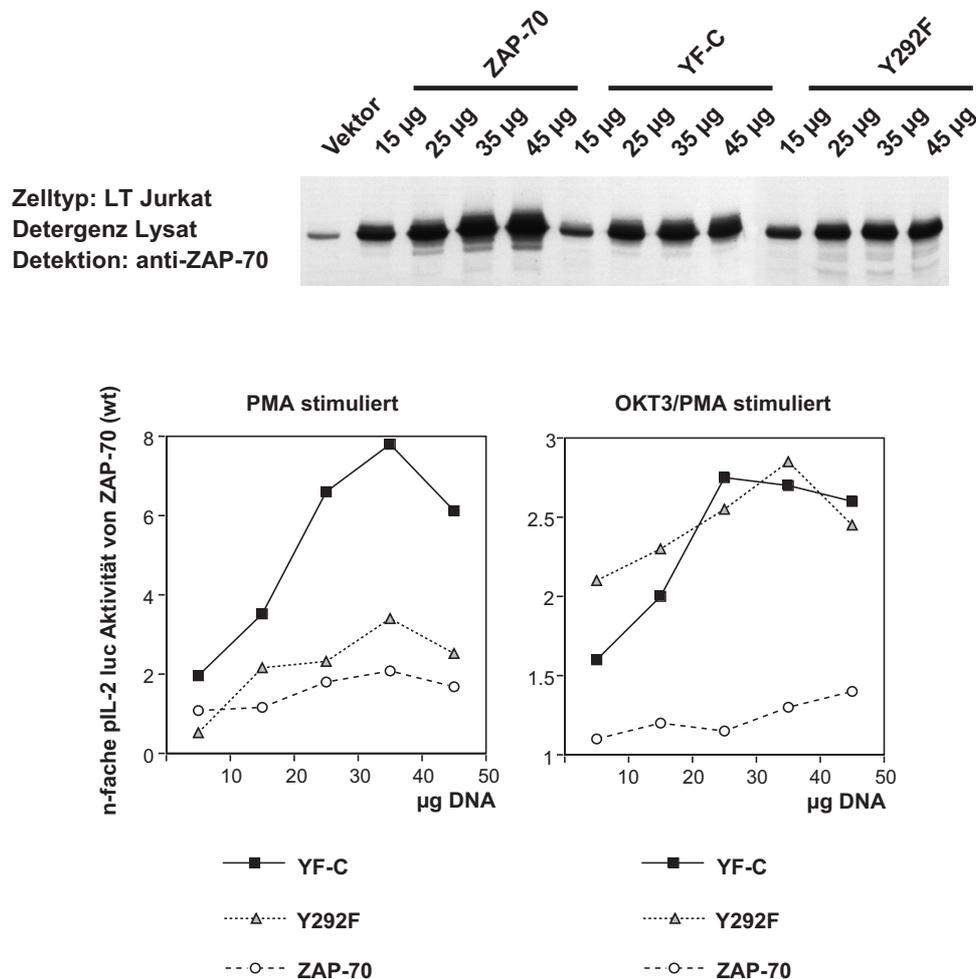


Abbildung 4.8: **Titrationanalyse der IL-2 Promotoraktivierung durch sukzessive Steigerung der ZAP YF-C Expression.** Nach Transfektion von Jurkat Zellen in Gegenwart zunehmender Mengen des ZAP-70 Expressionsplasmids stieg die Menge an überexprimiertem ZAP-70, ZAP YF-C und ZAP Y292F auf Proteinebene an, wie die Westernblotanalyse der Zellysate demonstriert. Der Effekt der ZAP YF-C Expression auf die Induktion des IL-2 Promotors in Gegenwart von PMA oder von OKT3 und PMA war saturierbar und maximal bei etwa 40 µg eingesetztem Expressionsplasmid. Dargestellt ist die Induktion des IL-2 Promotors als die n-fache Luciferaseaktivität der Transfektion in Gegenwart gleicher Mengen des leeren Expressionsvektors. Die Luciferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die YF-C Mutante von ZAP-70 einen funktionell konstitutiv-aktiven Phänotyp hinsichtlich der Induktion transkriptioneller Aktivität von NF-AT Elementen aufweist. Demnach ist der C-Terminus von Syk-Kinasen offenbar an der Regulation deren funktioneller Aktivität beteiligt. Besonders relevant für die angestrebte Identifizierung potentieller *in vivo* Substrate von Syk-Kinasen (Abschnitt 4.4) war der

Befund, daß deren Überexpression die Notwendigkeit von äußerer Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Aktivierung von ZAP-70 umgeht.

4.2.3 Die YF-C Mutation resultiert in funktioneller Hyperaktivität von p72^{Syk}

Anders als ZAP-70, weist Syk eine hohe intrinsische Kinaseaktivität auf, die durch aktivierende Signale - wie z.B. Bindung an phosphorylierte ITAM Sequenzen - nur moderat gesteigert wird. Vermutlich deshalb ließ sich bereits nach Expression der Wildtypform eine deutliche Induktion der IL-2 Promotoraktivität in Jurkat T-Zellen nachweisen (Abbildung 4.9), die sich besonders bei Costimulation durch PMA zeigte. Die YF-C Mutante von Syk wies jedoch dennoch gegenüber der Wildtypform einen funktionell hyperaktiven Phänotyp auf, der unter optimalen Bedingungen einer etwa 2,5-fach gesteigerte Induktion des IL-2 Promotors entsprach. Offenbar hat die Substitution der konservierten Tyrosinreste 597 und 598 in ZAP-70 bzw. 624 bis 626 in Syk ähnliche Konsequenzen auf die Induktion transkriptioneller Aktivität beider Kinasen, daß heißt auf deren funktioneller Aktivität *in vivo*.

Dieser Befund deutet auf einen gemeinsamen potentiellen Regulationsmechanismus von Kinasen der Syk-Familie hin, welchem die funktionelle Hyperaktivität beider YF-C Varianten zugrunde liegen könnte.

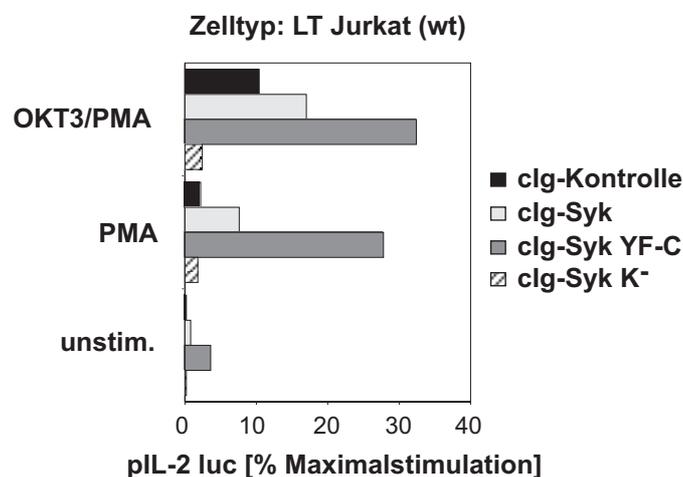


Abbildung 4.9: Syk YF-C Expression resultiert in gesteigerter transkriptioneller Aktivität des IL-2 Promotors im Vergleich zur Wildtypform von Syk. Die Syk Varianten wurden, wie in Abbildung 4.6 dargestellt, aus Gründen der Nachweisbarkeit in Form von Fusionsproteinen mit einem zytoplasmatisch lokalisierten Immunglobulinanteil exprimiert (cIg-Syk). Die Induktion des IL-2 Promotors durch Expression von Syk YF-C resultiert in Gegenwart von PMA in 2,5-fach gesteigerter Aktivität im Vergleich zur Induktion durch Expression der Syk Wildtypform. Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

4.3 Analysen zum Mechanismus der funktionellen Hyperaktivität von YF-C Mutanten der Syk-Kinasen

Wie im vorigen Abschnitt dargestellt, resultierte die Substitution C-terminaler Tyrosinreste in funktioneller Hyperaktivität beider Kinasen der Syk-Familie hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierung von Genexpression. Prinzipiell kann eine veränderte Funktionalität von Syk-Kinasen sowohl auf einer Modulation deren intrinsischer, enzymatischer Aktivität als Tyrosinkinase beruhen oder deren *in vivo* Funktion als Adapterprotein betreffen, daß heißt über die Wechselwirkung mit weiteren Proteinen vermittelt werden. Bekannte Interaktionspartner von ZAP-70 und Syk sind zum einen die akzessorischen Ketten des T-Zell-Rezeptor Komplexes, deren phosphorylierte ITAMs mit den SH2 Domänen der Syk-Kinasen interagieren, zum anderen rekrutieren phosphorylierte ZAP-70- und Syk-Moleküle aber auch die src-Kinase p56^{lck}. Neben diesen beiden intensiv charakterisierten Interaktionspartnern kommen selbstverständlich auch bislang unbekannte Protein-Liganden von Syk-Kinasen in Betracht.

Die enzymatische Kinaseaktivität gereinigter ZAP YF-C Moleküle wurde deshalb *in vitro* analysiert und mit der verschiedener anderer ZAP-70 Varianten verglichen (4.3.1). Die Rolle der beiden bekannten Bindungspartner von ZAP-70 wurden demgegenüber auf genetischer Ebene analysiert unter Zuhilfenahme von Zelllinien, welche defizient für die Expression des T-Zell-Antigenrezeptors (4.3.3), von p56^{lck} (4.3.4) oder beider Faktoren (4.3.2) waren.

4.3.1 *In vitro* Kinaseaktivität der ZAP-70 Mutanten

Zunächst wurden *in vitro* Kinaseassays durchgeführt, bei denen die Katalyse des Transfers von radioaktiv markierten Phosphatgruppen von ATP auf exogen zugegebenes Substrat untersucht wird, im vorliegenden Fall auf ein bakteriell exprimiertes und gereinigtes Fragment (SAM-C) des Proteins SAM-68. Die Analysen beschränkten sich auf Mutanten von ZAP-70, da für die Y492F Mutation bereits eine *in vitro* Hyperaktivität beschrieben worden war, die als Positivkontrolle und zur Standardisierung der Effekte dienen konnte (Wange R.L. *et al.*, 1995). Nach Reinigung der - wiederum in Jurkat T-Zellen überexprimierten - ZAP-70 Mutanten mittels eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers wurden die Präzipitate mit jeweils gleichen Mengen an gereinigtem Substrat sowie radioaktiv markiertem ATP versetzt. Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, resultierte, ähnlich wie von Wange *et al.* beschrieben, die Substitution des Tyrosinrestes 492 in einer etwa 5-fach gesteigerten katalytischen Aktivität der Kinase. Demgegenüber wies die ZAP YF-C Mutante nur eine etwa 1,6-fach gesteigerte Aktivität im Vergleich zur ZAP-70 Wildtypform auf. Ein ähnliches Verhältnis zeigte sich bei der Analyse der Autophosphorylierung gereinigter cI γ -Fusionsproteine der ZAP-70 Mutanten (Abbildung 4.10, rechte Hälfte).

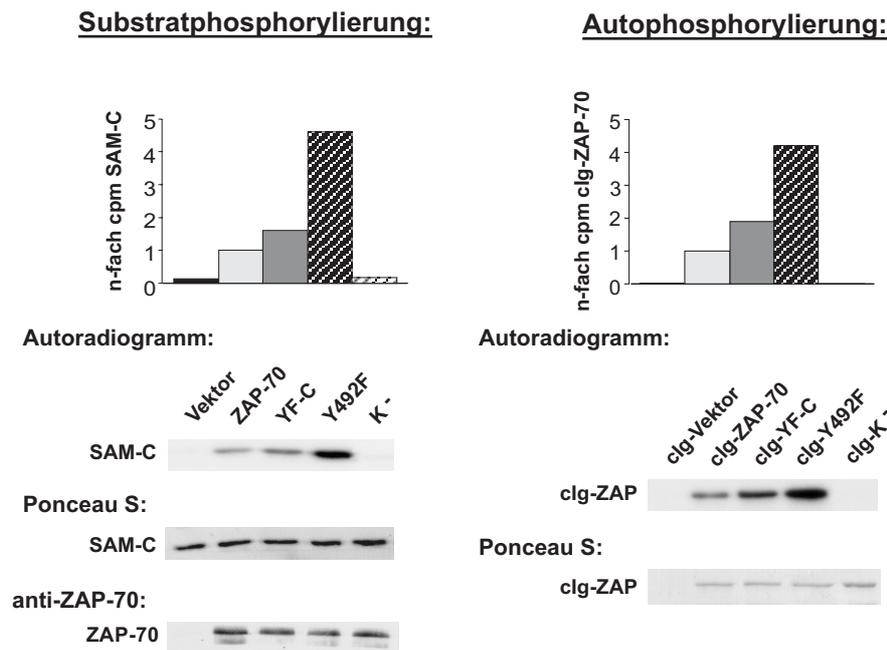


Abbildung 4.10: **Katalytische Aktivität von ZAP-70 Varianten *in vitro*.** Der enzymatisch katalysierte Transfer einer radioaktiv markierten Phosphatgruppe von ATP auf ein exogen zugegebenes Substrat, einem C-terminalen Fragment des Proteins SAM68, wurde zur Analyse der *in vitro* Aktivität der ZAP-70 Mutanten herangezogen, welche über Immunpräzipitation aus transfizierten Jurkat Zellen gereinigt worden waren. Die Quantifizierung des Transfers erfolgte durch Bestimmung der Schwärzung eines Films durch das elektrophoretisch aufgetrennte, phosphorylierte Substrat. ZAP YF-C wies eine etwa 1,6-fach gesteigerte Aktivität gegenüber der Wildtypform von ZAP-70 auf, während die Aktivität durch die Y492F Mutation etwa 5-fach zunahm. Ähnliche Ergebnisse brachte die Quantifizierung der Autophosphorylierung von clg-Fusionsproteinen dieser ZAP-70 Varianten in Abwesenheit von exogen zugegebenem Substrat. Die eingesetzten Mengen an gereinigten Kinasen und Substrat wurde durch Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose und Antikörper vermittelter Detektion oder Ponceau S Färbung bestimmt.

Offenbar resultiert die Substitution der Tyrosinreste 597 und -98 gegen Phenylalanin tatsächlich in einer moderaten Erhöhung der katalytischen Aktivität der Kinase. Allerdings ist keine Korrelation der *in vitro* Kinaseaktivität von ZAP-70 Mutanten zu ihrer *in vivo* Funktion zu beobachten (siehe voriger Abschnitt), da die katalytisch aktivste Y492F Mutante in T-Zellen keinerlei signifikanten *in vivo* Effekt gegenüber der Wildtypform aufwies. Dies stand im Gegensatz zu *in vivo* Genaktivierungsstudien in einer B-Zelllinie aus Huhn, welche von mehreren Laboren (wegen Verfügbarkeit einer Syk-defizienten Variante) zur funktionellen Mutationsanalyse von ZAP-70 und Syk herangezogen wurde.

4.3.2 Funktionelle Analyse in Syk-defizienten DT40 Zellen

Die Analyse der Aktivität mutierter ZAP-70 Formen in der DT40 B-Zelllinie aus dem Huhn wurde in erster Linie wegen der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen initiiert. Eine Syk-defizienten Variante dieser Zelllinie war im Labor von T. Kurosaki generiert worden und wurde bereits in mehreren veröffentlichten Studien zur funktionellen

Analyse von ZAP-70 Mutanten herangezogen. Die heterologe Expression von ZAP-70 kann in diesem Zelltyp die Aktivität von Syk nach B-Zell-Rezeptorstimulation hinsichtlich der Induktion des NF-AT-Transkriptionsfaktors rekonstituieren (Buerstedde J.M. und Takeda S., 1991; Takata M. *et al.*, 1994). Kong *et al.* analysierten in diesem System die Funktionalität der ZAP-70 Y492F Variante (Kong G.H. *et al.*, 1996), Zhao und Weiss diejenige der Y292F Mutante (Zhao Q. und Weiss A., 1996). Beide Mutanten wiesen einen hyperaktiven Phänotyp auf, daß heißt sie induzierten nach B-Zell-Rezeptorstimulation mittels eines spezifischen Antikörpers effizienter als die ZAP-70 Wildtypform die transkriptionelle Aktivität von NF-AT-Elementen.

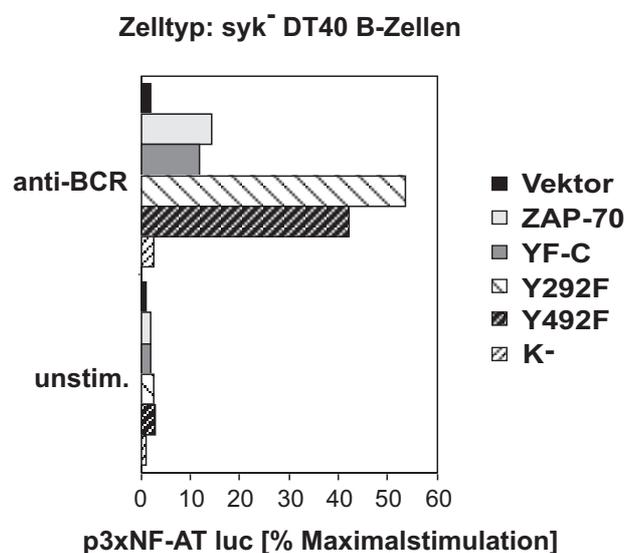


Abbildung 4.11: **Die funktionelle Aktivität von ZAP YF-C und der ZAP-70 Wildtypform ist in DT40 B Zellen ähnlich.** Die Syk defiziente Variante der B Zelllinie DT40 aus Huhn wurde durch Elektroporation mit Expressionskonstrukten verschiedener ZAP-70 Varianten transfiziert. Die resultierende transkriptionelle Aktivität des NF-AT-Elements wurde aus unstimulierten Zellen und aus Zellen ermittelt, welche mittels des monoklonalen Antikörpers M4 gegen die IgM-Kette des B-Zell-Antigenrezeptors stimuliert worden waren (anti-BCR). Während die Rekonstitution mit ZAP YF-C und mit der Wildtypform von ZAP-70 nach BCR-Stimulation zu einer ähnlichen Induktion der transkriptionellen Aktivität des NF-AT-Elements führte, resultierte die Expression der ZAP Y292F und der ZAP Y492F Mutante in einer etwa 4-fach gesteigerten Aktivität gegenüber der Wildtypform. Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Diese veröffentlichten Ergebnisse konnten reproduziert werden, wie in Abbildung 4.11 gezeigt. Die Y292F Mutante war etwa 4-fach effizienter als die Wildtypform von ZAP-70, die Y492F Mutation resultierte in einer etwa 3-fachen Steigerung der Funktionalität. Demgegenüber verhielt sich die YF-C Mutante unter diesen Bedingungen ähnlich wie die ZAP-70 Wildtypform, daß heißt ein funktionell hyperaktiver Phänotyp wie in Jurkat Zellen war in DT40 B-Zellen nicht zu beobachten.

Mögliche Ursache hierfür sind T-Zell-spezifische Faktoren, welche die Aktivität von ZAP-70 modulieren und für die Ausprägung des YF-C Phänotyps essentiell sein könnten. Zwei der in Frage kommenden T-Zell-spezifischen Faktoren wurden im Folgenden genetisch

analysiert, nämlich der T-Zell-Rezeptor selbst und $p56^{\text{lck}}$, die beide essentiell für die Aktivierung der ZAP-70 Wildtypform sind.

4.3.3 Funktionelle Analyse in TCR-defizienten Jurkat T3.5 Zellen

Eine als J.RT3-T3.5 bezeichnete Variante der Jurkat E6 Zelllinie exprimiert - aufgrund der fehlenden TCR- β Untereinheit - keine nachweisbaren Mengen des T-Zell-Antigenrezeptors auf der Zelloberfläche, da dieser nur in Form des Gesamtkomplexes an die Plasmamembran transportiert wird (Weiss A. und Stobo J.D., 1984). Diese Zelllinie wurde mit Expressionsvektoren für ZAP-70 bzw. ZAP YF-C transfiziert, um so den Einfluß der defekten Expression des T-Zell-Rezeptors auf die Ausprägung des hyperaktiven YF-C Phänotyps zu untersuchen. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, resultiert die Expression von ZAP YF-C in Jurkat T3.5 Zellen nicht in meßbarer Induktion des IL-2 Promotors bei gleichzeitiger Costimulation durch Phorbol ester. Offenbar ist die - in Abbildung 4.7 dokumentierte- Aktivierbarkeit des Promotors durch Expression von ZAP YF-C in der Wildtypform der Jurkat Zelllinie abhängig vom Vorhandensein des T-Zell-Rezeptors an der Plasmamembran.

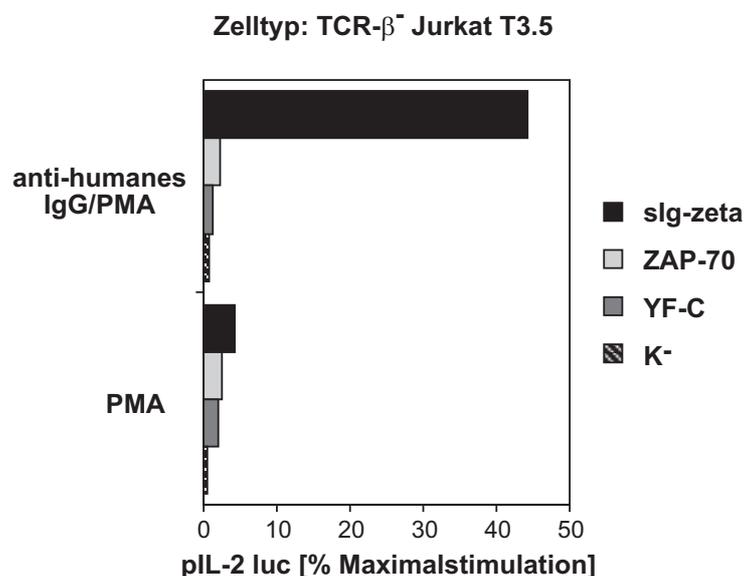


Abbildung 4.12: **Oberflächenexpression des T-Zell-Antigenrezeptors ist essentiell für die Ausprägung des hyperaktiven Phänotyps von ZAP YF-C.** Die J.RT3-T3.5 Variante der Jurkat E6 Zelllinie ist defizient für die Oberflächenexpression des T-Zell-Antigenrezeptors. Expression von ZAP YF-C in Gegenwart von PMA resultiert in diesem Zelltyp anders als in normalen Jurkat Zellen in keinerlei meßbarer Stimulation des IL-2 Promotors. Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Die Rekonstitution der Jurkat T3.5 Zelllinie durch Re-Expression der β -Kette des T-Zell-Rezeptors konnte wegen fehlender Expressionskonstrukte nicht durchgeführt werden. Wie in

Abschnitt 4.1 erwähnt, läßt sich die Signaltransduktionsaktivität des TCRs allerdings größtenteils durch Quervernetzung der TCR- ζ Kette substituieren. So führte die Aggregation eines transmembranen Immunglobulin Fusionsproteins der TCR- ζ Kette (sIg-TCR- ζ) auch zu deutlicher Induktion des IL-2 Promotors in T3.5 Zellen (Abbildung 4.12), wodurch deren Potential zur transkriptionellen Aktivierung des Promotors dokumentiert werden konnte. Überraschenderweise führte eine Coexpression von sIg-TCR- ζ mit ZAP YF-C jedoch nicht zur Rekonstitution des hyperaktiven Phänotyps dieser ZAP-70 Mutante (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß für die Ausprägung des YF-C Phänotyps andere Komponenten des T-Zell-Rezeptorkomplexes als die zytoplasmatische Domäne von TCR- ζ essentiell sein könnten.

4.3.4 Funktionelle Analyse in Lck-defizienten JCaM1 Zellen

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 erwähnt, existiert von der Jurkat E6 Zelllinie ein - als JCaM1 bezeichnetes - Derivat, welches eine Kinase-inaktive und destabilisierte Form der Tyrosinkinase p56^{lck} exprimiert. Die Aktivität dieser src-ähnlichen Kinase ist für antigen-induzierte T-Zell Aktivierung essentiell, weshalb die antikörpervermittelte TCR-Stimulation in diesem Zelltyp mit dem Ausfall wichtiger Signaltransduktionsereignisse korreliert. So resultiert eine TCR Stimulation in JCaM1 Zellen beispielsweise nicht in signifikantem Calcium-Influx, in der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine oder in transkriptioneller Aktivierung. Nach Rekonstitution der Zellen mittels Transfektion von lck-Expressionsplasmiden kann indes eine nahezu vollständige Antwort wiederhergestellt werden, so auch die Aktivierung des IL-2 Promotors nach TCR Stimulation mit OKT3 bei gleichzeitiger Anwesenheit von Phorbolster (Abbildung 4.13).

Die Expression der hyperaktiven ZAP YF-C Mutante resultierte in Abwesenheit von p56^{lck} ebensowenig wie die der ZAP-70 Wildtypform in meßbarer Induktion des IL-2 Promotors. Demgegenüber rekonstituierte die Re-Introduktion von lck - neben der Aktivierbarkeit über TCR Stimulation - auch die Induktion des IL-2 Promotors durch Expression von ZAP YF-C in ähnlicher Weise (Abbildung 4.13; unteres Diagramm). Folglich war die konstitutive Aktivität der YF-C Variante von ZAP-70 abhängig von der Anwesenheit der p56^{lck} Tyrosinkinase.

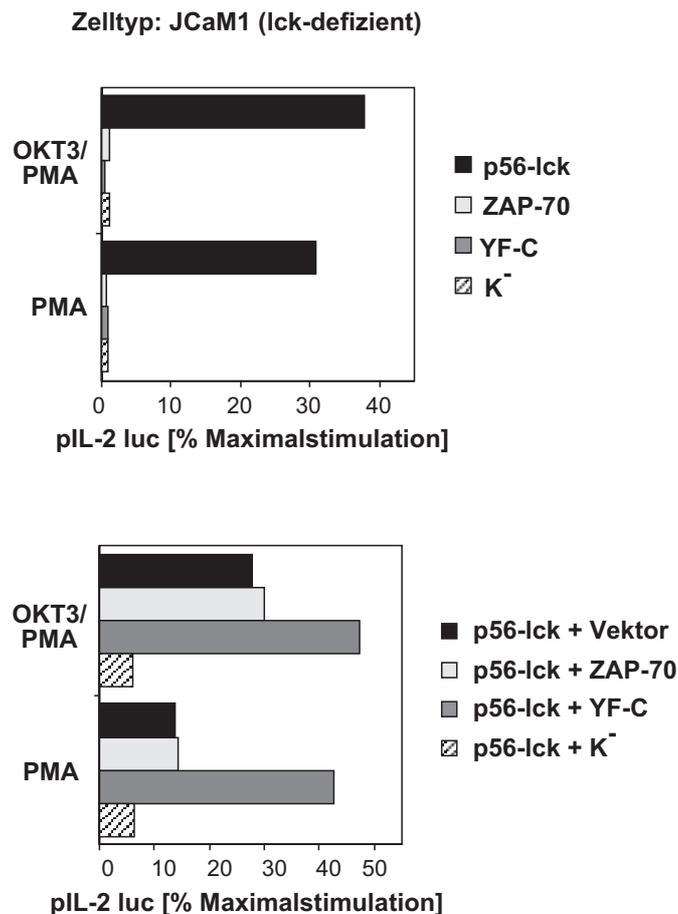


Abbildung 4.13: Expression von p56^{lck} ist Voraussetzung für die Ausprägung des hyperaktiven Phänotyps der ZAP YF-C Mutante hinsichtlich IL-2 Promotoraktivierung. Die JCaM1 Variante der Jurkat E6 Zelllinie ist defizient für die Expression von p56^{lck}. Expression von ZAP YF-C in Gegenwart von PMA resultiert in diesem Zelltyp nur nach Rekonstitution der lck-Expression in einer Aktivierung des IL-2 Promotors, welche etwa 3-fach über der Induktion durch die Wildtypform von ZAP-70 liegt. Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben, ist die Kinaseaktivität von Syk in deutlich geringerem Maße von der Stimulation durch src-Kinasen abhängig als die von ZAP-70, weshalb Syk bei Expression in Form eines transmembranen Fusionsproteins (sIg-Syk) selbst in JCaM1 Zellen transkriptionelle Aktivität des IL-2 Promotors induzieren konnte (siehe Abbildung 4.9). Die Expression eines löslichen, zytoplasmatisch lokalisierten Ig-Fusionsproteins von Syk (cIg-Syk) resultierte in diesem Zelltyp hingegen nur in einer schwachen Aktivierung des IL-2 Promotors, welche jedoch für die Syk YF-C Mutante hoch signifikant gesteigert war (Abbildung 4.14). Zumindest im Fall von Syk war demnach das Vorhandensein von p56^{lck} keine Voraussetzung für die Ausprägung des hyperaktiven YF-C Phänotyps. Falls die Hyperaktivität von ZAP YF-C und Syk YF-C auf einem gemeinsamen Mechanismus beruhen sollten, wäre dieser zumindest prinzipiell auch für ZAP-70 unabhängig von p56^{lck}, sobald eine basale Aktivierung der Kinase gewährleistet ist.

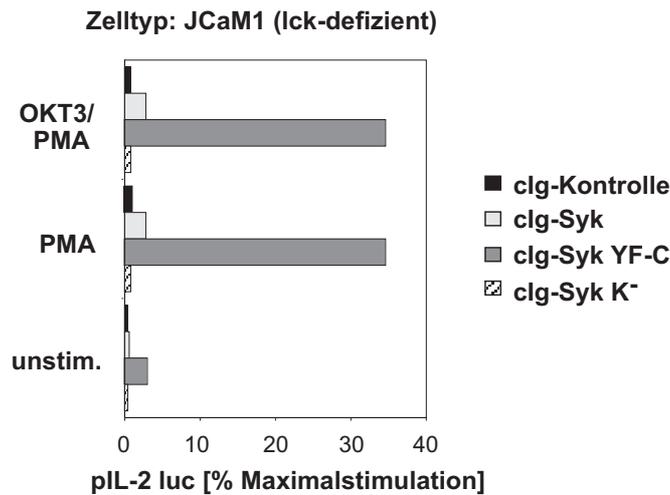


Abbildung 4.14: **Die Ausprägung des hyperaktiven Phänotyps der Syk YF-C Mutante ist unabhängig von p56^{lck}.** Expression des zytoplasmatisch lokalisierten Ig-Fusionsproteins von Syk YF-C induzierte die massive Aktivierung des IL-2 Promotors in JCaM1 Zellen, während die Wildtypform unter den gleichen Bedingungen eine etwa 10-fach geringere Aktivierung zur Folge hatte. Die Luziferaseaktivitäten wurden entsprechend der in Abbildung 4.2 dargestellten Vorgehensweise ermittelt.

Die bisher dargestellten *in vivo* Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität der Syk Kinasen beschränkten sich auf die Analyse von Genaktivierung. Zur Bestätigung des hyperaktiven Phänotyps in einer unterschiedlichen experimentellen Anordnung, wurde der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration untersucht, welcher essentieller Bestandteil der von ZAP-70 und Syk initiierten Signaltransduktionskaskaden ist. Von Kolanus *et al.* ist beschrieben worden, daß Expression und Quervernetzung transmembraner Fusionsproteine von Syk in einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels resultiert, welcher über calcium-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe quantifiziert werden kann (Kolanus W. *et al.*, 1993). Dieser experimentelle Ansatz wurde genutzt, um die Hyperaktivität der Syk YF-C Variante gegenüber der Wildtypform zu bestätigen. Wegen der hierzu nötigen hohen Transfektionseffizienz, wurden JCaM1 Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert, welche in einer vergleichbar hohen Expressionsdichte von Syk und Syk YF-C Fusionsproteinen mit dem extrazellulärem Anteil von CD16 resultierte (vergleiche Abbildung 4.4). Die Quervernetzung der Fusionsproteine wurde zunächst mit einem monoklonalen anti-CD16 Antikörper initiiert und 60 Sekunden später mittels eines sekundären anti-IgG Reagenz verstärkt. Wie aus Abbildung 4.15 zu ersehen, bewirkte die Aggregation in des Syk YF-C Fusionsproteins im Vergleich zur Syk Wildtypform eine sowohl qualitativ als auch (im analysierten Zeitraum) quantitativ deutlich erhöhte Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration, welche als Funktion der Fluoreszenzintensität des Calcium-abhängigen Farbstoffes Fluo-3 dargestellt ist. So resultierte in Gegenwart des Syk YF-C Fusionsproteins bereits die Zugabe des monoklonalen anti-CD16 Antikörpers in der Induktion von Calcium-Influx, während dies bei Expression der Wildtypform erst zeitverzögert und nach Zugabe des sekundären Antiserums der Fall war, der zur Verstärkung der Aggregation eingesetzt wurde. Somit bestätigte sich die

Hyperaktivität der Syk YF-C Mutante auch im Hinblick auf die Induktion von Calcium-Influx nach Aggregation von Syk Fusionsproteinen.

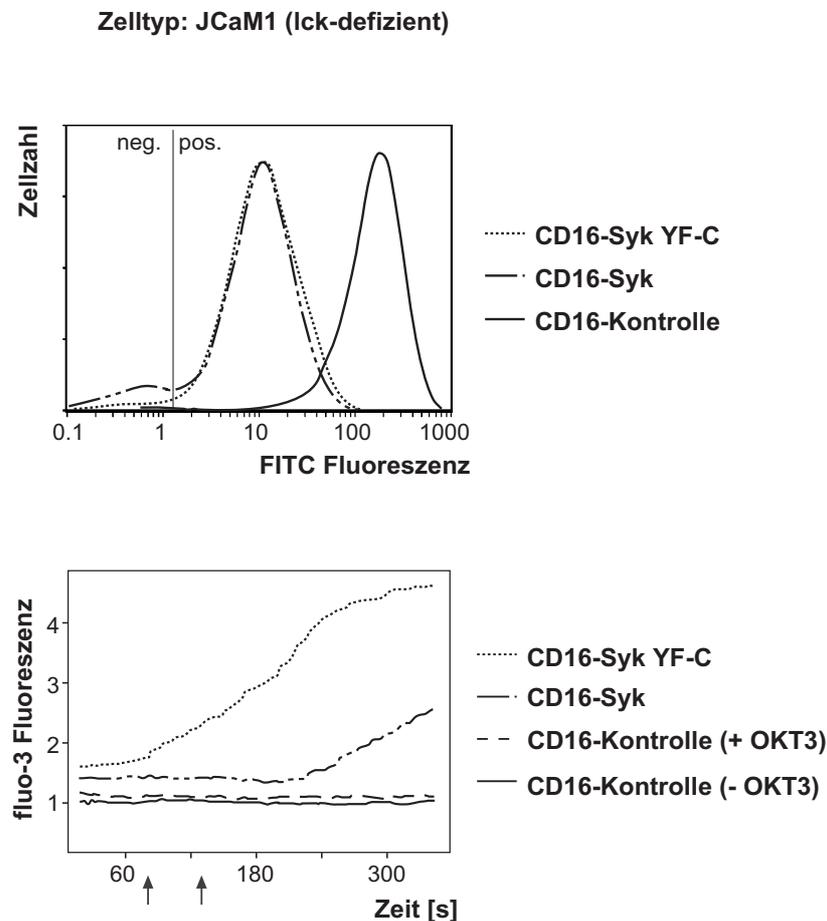


Abbildung 4.15: Die Syk YF-C Mutante weist hinsichtlich der Induktion von Calcium-Influx in JCaM1 Zellen einen hyperaktiven Phänotyp auf. Die Oberflächenexpression transmembraner Fusionsproteinen der Syk Wildtypform und der Syk YF-C Variante war nach Transfektion von JCaM1 Zellen mittels rekombinanter Vaccinia Viren vergleichbar, wie die durchflußzytometrische Analyse zeigte. Aggregation dieser Fusionsproteine führte zur Induktion von Calcium-Influx, welcher im Fall des Syk YF-C Fusionsproteins bereits nach Zugabe des primär quervernetzenden Antikörpers (90 Sekunden nach Beginn der Messung) einsetzte, während im Fall der Syk Wildtypform die Gabe eines sekundär quervernetzenden Antikörpers nötig war, um ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (240 Sekunden nach Beginn der Messung) zu bewirken. Die relative Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte mittels des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-3 im Durchflußzytometer.

Zusammenfassend läßt sich aus den hier dargestellten Analysen zum Mechanismus der Hyperaktivität der ZAP YF-C Mutante schlußfolgern, daß die Anwesenheit zweier T-Zell-spezifischer Regulatoren der ZAP-70 Aktivität, nämlich der von $p56^{lck}$ und der des T-Zell-Rezeptorkomplex, Voraussetzung für die Ausprägung des hyperaktiven ZAP YF-C Phänotyps sind. ZAP YF-C ist demnach nicht konstitutiv aktiv im Sinne einer Entkopplung von aktivierenden Signalen. Dieses Kriterium trifft jedoch für $p72^{Syk}$ zu, deren Aktivität zumindest partiell unabhängig von stimulatorischen Signalen ist. Anhand der YF-C Mutante von Syk konnte gezeigt werden, daß der hyperaktive Phänotyp von Syk YF-C alleine durch

Aggregation und in Abwesenheit von p56^{lck} zu beobachten war, also zumindest im Fall von Syk unabhängig von aktivierenden Signalen war. Demnach konnte mit molekulargenetischen Methoden der Mechanismus des YF-C Phänotyps zwar nicht geklärt, aber zumindest auf einen von aktivierenden Signalen durch p56^{lck} entkoppelten, intrinsischen Mechanismus eingegrenzt werden.

4.4 Identifikation potentieller *in vivo* Substrate von ZAP und Syk YF-C

Wie in Abschnitt 4.2 dargestellt, resultiert die Expression der ZAP und Syk YF-C Mutanten in konstitutiver Aktivierung transkriptionell regulierter Genexpression, im Besonderen der durch NF-AT regulierten Promotoren. Diese Befunde implizieren, daß durch Expression konstitutiv aktiver Syk-Kinasen unter anderem funktionell relevante Substrate tyrosinphosphoryliert werden, die in der Aktivierung physiologischer Signaltransduktionskaskaden und letztlich in der Induktion transkriptioneller Aktivität resultieren. Auf Grund dessen wurde der Analyse tyrosinphosphorylierter Proteine nach Expression von ZAP und Syk YF-C große Bedeutung beigemessen.

4.4.1 Expression der YF-C Mutanten induziert die Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine

In Abbildung 4.16 ist eine repräsentative Darstellung der Anti-Phosphotyrosin Detektion eines Westernblots von Gesamtzelllysaten transfizierter Jurkat Zellen mittels des monoklonalen Antikörpers 4G10 gezeigt, welcher gegen ein Phosphotyrosin-Epitop gerichtet ist. Die Expression der Wildtypform von ZAP-70, welche zu keiner meßbaren Genaktivierung führte, resultierte lediglich im Auftreten einer zusätzlich tyrosinphosphorylierten Proteinbande im Bereich von 70 bis 80 kD, welche vermutlich in erster Linie dem überexprimierten Protein entsprach (siehe Abbildung 4.20). Demgegenüber induzierte die Expression von ZAP YF-C die Phosphorylierung weiterer zellulärer Proteine von 21 bis 23 kD, von 34 bis 36 kD, von 56 kD, von 90 bis 95 kD und von 150 kD apparentem Molekulargewicht. Darüber hinaus war auch die Proteinbande im Bereich von 70 bis 80 kD deutlich intensiver phosphoryliert, obwohl die exprimierten Proteinmengen aller ZAP-70 Mutanten vergleichbar war (siehe Abbildung 4.6). Einige der durch Expression von ZAP YF-C induzierten Phosphoproteinbanden traten auch nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors mittels des anti-CD3 Antikörpers OKT3 auf, wiewohl hierbei häufig mit höherer Intensität (Abbildung 4.16; Spur 6).

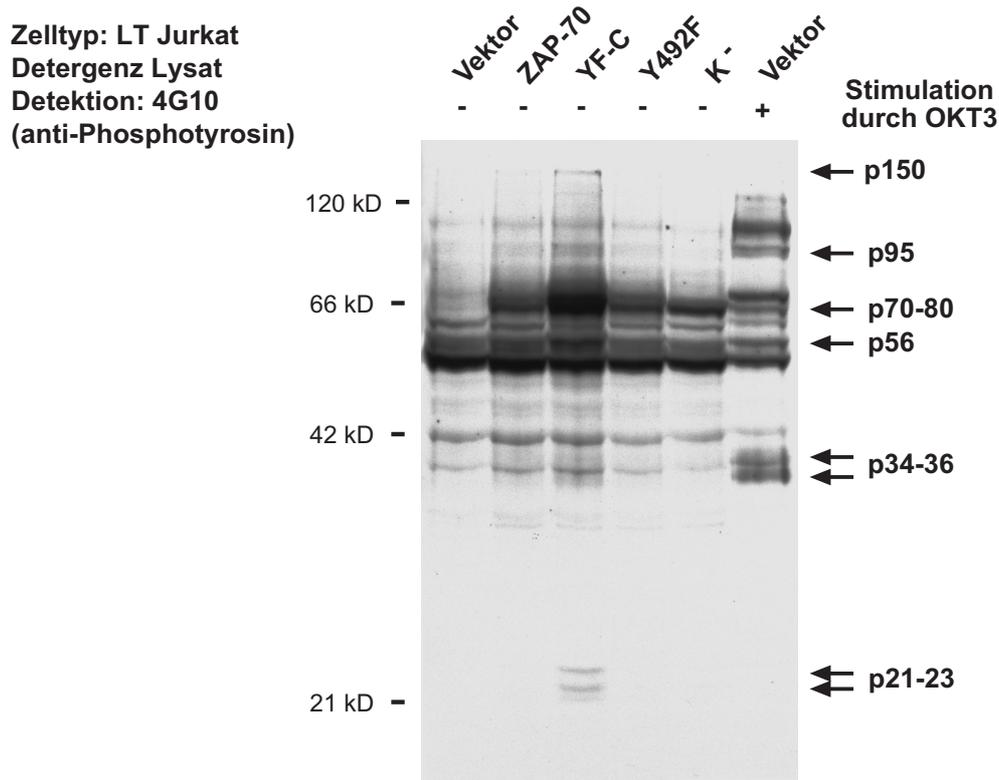


Abbildung 4.16: **Überexpression der ZAP YF-C Mutante in Jurkat T-Zellen resultiert in Tyrosinphosphorylierung spezifischer zellulärer Proteine.** Expressionskonstrukte verschiedener ZAP-70 Varianten wurden mittels Elektroporation in Jurkat T-Zellen transfiziert, wodurch alle Varianten in vergleichbarer Menge überexprimiert wurden (gezeigt in Abbildung 4.6). Detergenzlysate dieser Zellen wurden mittels 12 %-iger, denaturierender PAGE, Transfer der Proteine auf Nitrozellulose und Inkubation mit dem gegen Phosphotyrosin gerichteten monoklonalen Antikörper 4G10 analysiert. Die Expression von ZAP YF-C induziert die Hyperphosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 21 bis 23 kD, 34 bis 36 kD, 56 kD, 70 bis 80 kD, 95 kD und 150 kD. Einige dieser Phosphoproteine wurden effizienter phosphoryliert als nach Stimulation untransfizierter Zellen mittels Quervernetzung des TCRs durch OKT3 (Spur 6).

Die Expression von Syk und dessen Mutanten erfolgte aus Gründen der Detektierbarkeit in Form N-terminaler flag-Fusionsproteine (Abbildung 4.17; untere Darstellung), da zum Zeitpunkt dieser Analyse kein anti-Syk Reagenz verfügbar war. Die Expression der Wildtypform von Syk resultierte neben einer Proteinbande von 72 bis 80 kD, die wahrscheinlich erneut größtenteils dem überexprimierten Protein entsprach, auch im Auftreten von weiteren Phosphoproteinbanden bei 34 bis 36 kD, bei 56 kD, bei 95 kD und bei 110 bis 120 kD apparentem Molekulargewicht (Abbildung 4.17; obere Darstellung; Vergleich zwischen Spur 2 und Spur 4). Demgegenüber induzierte die Expression der Syk YF-C Mutante eine massive Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate, von denen viele nach OKT3 Stimulation nicht nachweisbar waren (Spur 1 und 3). Besonders stark tyrosinphosphorylierte Proteine comigrierten mit 21 bis 23 kD, mit 34 bis 36 kD, mit 56 kD, mit 95 kD sowie mit 110 bis 120 kD.

Offensichtlich eignet sich demnach die ZAP YF-C Mutante besser für die angestrebte Identifikation potentieller Substrate, da die induzierte Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine spezifischer als im Fall von Syk YF-C zu sein schien.

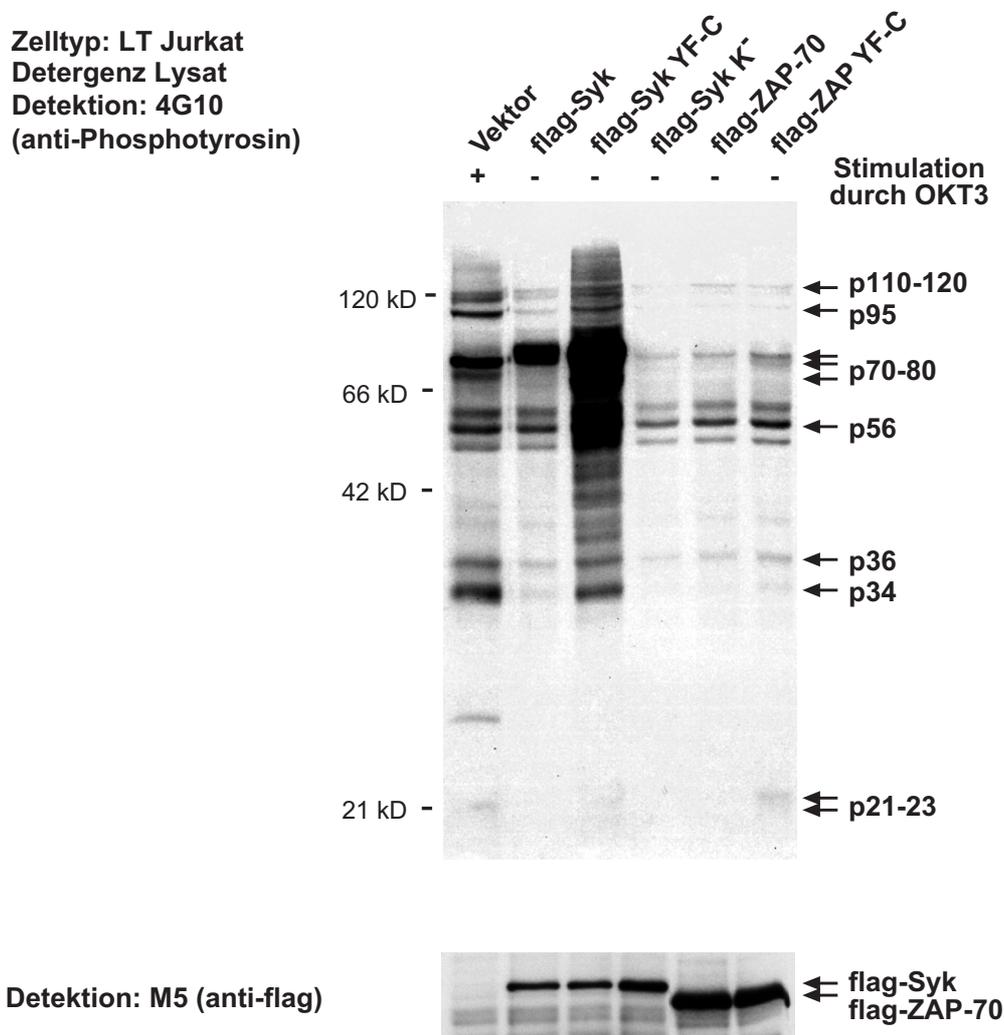


Abbildung 4.17: **Hyperphosphorylierung zellulärer Proteine nach Expression von Syk YF-C.** Syk und Syk YF-C exprimierende Jurkat T-Zellen wurden analog der in Abbildung 4.16 dargestellten Weise analysiert, wobei alle Varianten aus Gründen der Nachweisbarkeit N-terminal mit dem flag-Epitop fusioniert exprimiert worden waren. Expression von Syk YF-C resultierte in Tyrosinphosphorylierung diverser zellulärer Proteine, von denen viele in Lysaten OKT3 stimulierter Zellen nicht nachweisbar phosphoryliert vorlagen (Spur 1). Die Expression der Wildtypform von Syk induzierte demgegenüber lediglich Phosphorylierung spezifischer Substrate mit apparentem Molekulargewicht von 34 bis 36 kD, 56 kD, 70 bis 80 kD, 95 kD und 110 bis 120 kD.

4.4.2 ZAP YF-C assoziiert mit Phosphoproteinen von 21 und 23 kD

Da Syk Kinasen nach der Phosphorylierung interner Tyrosinreste auch als Adaptoren für die Rekrutierung phosphotyrosinbindender Proteine dienen, wurde im Folgenden analysiert, welche der nach Expression von ZAP YF-C phosphorylierten Proteine mit ZAP YF-C

interagieren konnten. Aufgrund der Proximität zu den assoziierten Kinasen kommen interagierende Proteine mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit als deren physiologische Substrate in Betracht.

Die Expression von ZAP-70 und ZAP YF-C erfolgte hierzu in Form von zytoplasmatisch exprimierten Immunglobulin Fusionsproteinen (cIg-ZAP-70), da diese mit hoher Effizienz an immobilisiertem Protein A präzipitierbar sind. Wie aus Abbildung 4.18 zu ersehen, war im Präzipitat von cIg-ZAP-70 lediglich ein Phosphoprotein mit einem apparentem Molekulargewicht von 70 kD zu detektieren, welches möglicherweise ein Degradationsprodukt des cIg-ZAP-70 Fusionsproteins darstellt. Demgegenüber copräzipitierten mit cIg-ZAP YF-C ein mit 21 bis 23 kD sowie ein mit etwa 56 kD co-migrierendes Phosphoprotein.

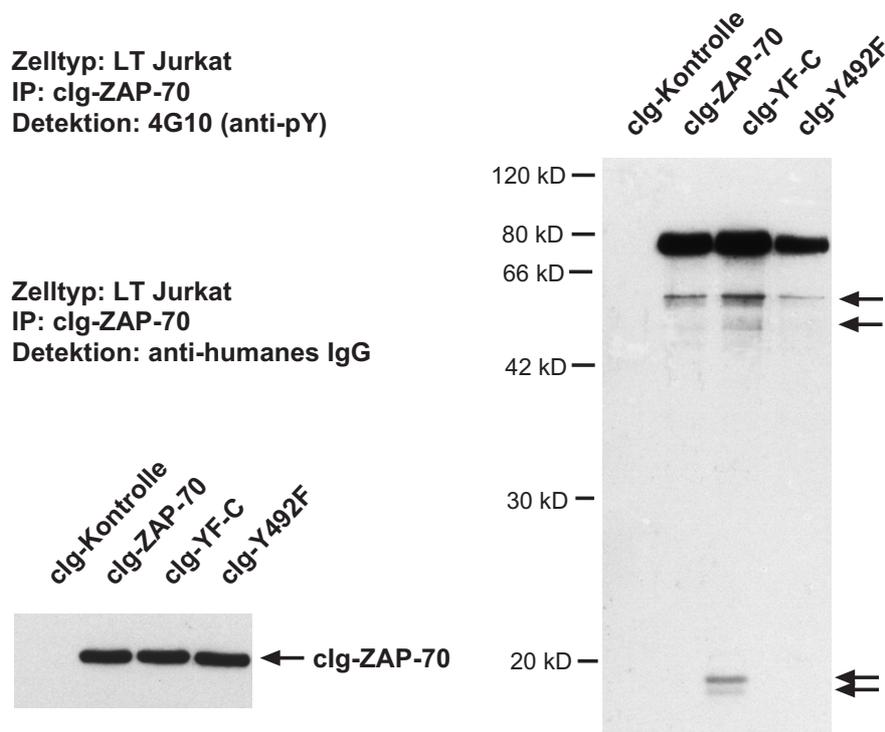


Abbildung 4.18: **Copräzipitation der Phosphoproteine pp21 und pp23 mit ZAP YF-C.** In Jurkat T-Zellen wurden verschiedene ZAP-70 Varianten N-terminal fusioniert mit zytoplasmatisch lokalisierten Immunglobulin Domänen exprimiert (cIg-ZAP-70). Ohne zusätzliche Stimulation wurden die cIg-Fusionsproteine an immobilisiertem Protein A aus Detergenzlysaten gereinigt, mittels 12 %-iger, denaturierender PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem - gegen Phosphotyrosin gerichteten - monoklonalen Antikörper 4G10 analysiert. Neben den phosphorylierten cIg-ZAP-70 Varianten (90 kD), waren im Präzipitat von cIg-ZAP YF-C auch tyrosinphosphorylierte Proteine mit apparentem Molekulargewicht von 21,23, und 56 kD nachweisbar. Die exprimierten Mengen der cIg-ZAP-70 Varianten war vergleichbar (siehe Insert).

4.4.3 Die TCR- ζ Kette wird nach Expression von ZAP YF-C hyperphosphoryliert

Die ζ Untereinheit des T-Zell-Rezeptors weist im unphosphorylierten Zustand ein apparentes Molekulargewicht von 18 kD auf, welches durch Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste Formen zwischen 21 und 23 kD erreicht. Demnach war die TCR- ζ Kette ein

potentieller Kandidat für die durch Expression von ZAP YF-C induzierten und mit cIg-ZAP YF-C copräzipitierenden Phosphoproteinspezies.

Um die Identität von p21 bis p23 mit phosphorylierten Formen der TCR- ζ Kette zu demonstrieren, wurde zunächst der Gesamtkomplex des T-Zell-Rezeptors mittels des gegen CD3- ϵ gerichteten Antikörpers OKT3 aus ZAP YF-C exprimierenden Zellen präzipitiert. Die Zellen wurden hierzu mit dem Detergenz Digitonin aufgeschlossen, wodurch die Integrität des Gesamtkomplexes des T-Zell-Rezeptors erhalten blieb. Somit konnten im Präzipitat stimulierter Zellen nicht nur die phosphorylierte CD3- ϵ Untereinheit bei 27 kD, sondern auch assoziierte Phosphoproteine von p21 und p23 kD nachgewiesen werden, welche vermutlich unterschiedlich phosphorylierten Formen der TCR- ζ -Kette entsprachen (Abbildung 4.19, oberer Teil, Spur 5). Weiterhin wurde in OKT3-Präzipitaten durch den 4G10 Antikörper auch TCR assoziierte, tyrosinphosphorylierte ZAP-70-Moleküle nachgewiesen. Die Expression von ZAP YF-C induzierte im Gegensatz zur Expression der ZAP-70 Wildtypform bereits in unstimulierten Zellen die Phosphorylierung von p21, p23 und p27 (Abbildung 4.19, oberer Teil, Spur 3). Darüber hinaus wurde die nach TCR Stimulation zu beobachtende Phosphorylierung der CD3- und ζ -Untereinheiten durch Überexpression von ZAP YF-C und in geringerem Maße auch durch Überexpression der ZAP-70 Wildtypform verstärkt. Die Unterschiede zwischen ZAP YF-C und ZAP-70 betreffen in stimulierten Zellen insbesondere p23 sowie ein - ausschließlich nach Expression von ZAP YF-C nachweisbares - Phosphoprotein mit etwa 24,5 kD apparentem Molekulargewicht (Abbildung 4.19; oberer Teil, Spur 7). Diese Befunde demonstrierten, daß die Expression von ZAP YF-C in unstimulierten Zellen die Tyrosinphosphorylierung von TCR assoziierten Proteinen mit apparentem Molekulargewicht von 21, 23 und 27 kD induziert.

Zum Zeitpunkt dieser Analysen stand im Labor kein Reagenz zur Verfügung, welches die Identifizierung von TCR- ζ im Westernblot ermöglicht hätte. Um die vermutete Identität der p21 und p23 Proteinspezies mit unterschiedlich phosphorylierten Formen von TCR- ζ dennoch zu verifizieren, konnte aus der Tatsache Nutzen gezogen werden, daß TCR- ζ als einzige der akzessorischen T-Zell-Rezeptor Ketten über extrazelluläre Disulfidbrücken dimerisiert. Demzufolge migrieren TCR- ζ Dimere in denaturierender Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit dem doppelten apparenten Molekulargewicht der Monomere. Wie im unteren Teil der Abbildung 4.19 dargestellt, co-migrierten die durch ZAP YF-C Expression induzierten und durch Präzipitation mittels OKT3 isolierbaren Phosphoproteinspezies in nicht-reduzierender Gelelektrophorese mit einem Molekulargewicht von 27 kD und 40 kD (Abbildung 4.19; untere Darstellung; Spur 3), während im Bereich unterhalb von 27 kD keinerlei Phosphoproteinspezies detektierbar waren. Dies ist konsistent mit der Vermutung, daß Expression von ZAP YF-C die Tyrosinphosphorylierung der TCR- ζ und - ϵ Ketten induziert.

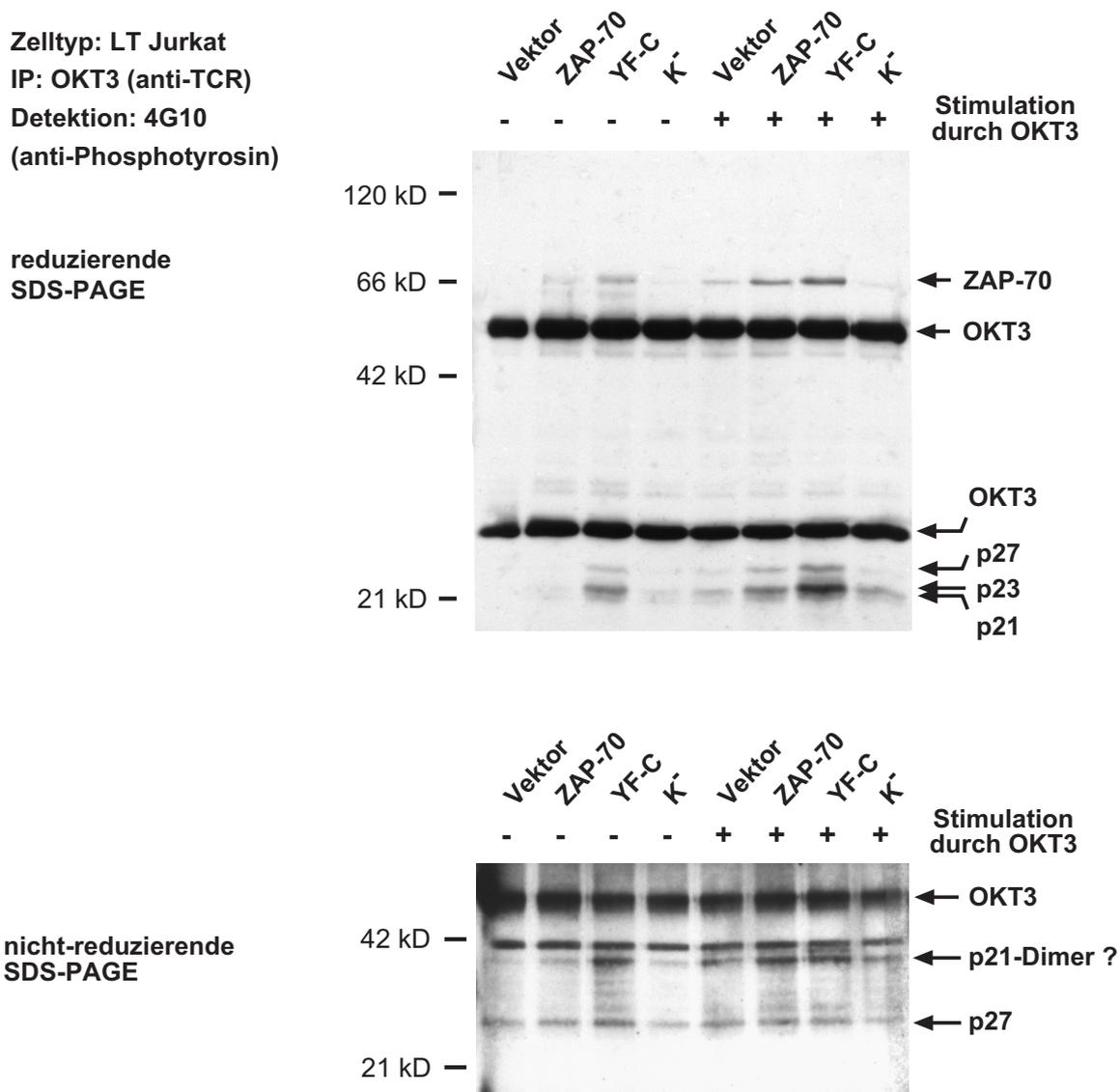


Abbildung 4.19: **Expression von ZAP YF-C induziert ohne zusätzlichen äußeren Stimulus die Phosphorylierung von Untereinheiten des T-Zell-Antigenrezeptor/CD3 Komplexes.** Aus transfizierten Jurkat Zellen wurden Lysate - unter Verwendung von Digitonin als Solvens - präpariert, in dem die Integrität des TCR/CD3-Komplexes erhalten bleibt. Somit wurde durch Immunpräzipitation mittels des anti-CD3 Antikörpers OKT3 der Gesamtkomplex des TCRs gereinigt und nach Auftrennung auf 12 %-igen, denaturierenden PAA Gelen und Transfer auf Nitrozellulose mit dem gegen Phosphotyrosin gerichteten monoklonalen Antikörper 4G10 analysiert. In OKT3 Präzipitaten aus ZAP YF-C exprimierenden Zellen waren Phosphoproteinspezies detektierbar, die unter reduzierenden Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 21, 23 und 27 kD aufwiesen, unter nicht-reduzierenden Bedingungen jedoch 27 und 40 kD. Dieses Laufverhalten ist charakteristisch für die phosphorylierten CD3-ε und TCR-ζ Untereinheiten.

Die fehlende Nachweismöglichkeit von nativem TCR-ζ im Westernblot konnte auch durch die Expression als Fusionsprotein, beispielsweise mit extrazellulären IgG-Domänen (sIg-TCR-ζ), umgangen werden. Wie in Abbildung 4.20 dargestellt, induzierte ZAP YF-C bei Coexpression mit sIg-TCR-ζ in der Tat dessen Hyperphosphorylierung an Tyrosinresten. Nach Präzipitation von sIg-TCR-ζ an immobilisiertem Protein-A wurden nach Inkubation mit

4G10 zwei Phosphoproteinspezies detektiert (Abbildung 4.20; linke Darstellung), die durch anschließende Re-Inkubation des Westernblots mit spezifischen Antikörpern als sIg- ζ und assoziiertes ZAP-70 identifiziert werden konnten (nicht gezeigt). Cotransfektion von ZAP YF-C Expressionskonstrukten resultierte dabei in deutlich intensiverer Tyrosinphosphorylierung von sowohl sIg- ζ als auch ZAP YF-C im Vergleich zur ZAP-70 Wildtypform. In den Gesamtzellsaten der sIg- ζ und ZAP YF-C exprimierenden Zellen waren wiederum die schon in Abbildung 4.16 beschriebenen, charakteristischen Phosphoproteine detektierbar, insbesondere p21 und 23, p56 und p150, sowie mit schwächerer Intensität p36 und p95 (Abbildung 4.20; rechte Darstellung). Die ZAP-70 Wildtypform induzierte bei Coexpression mit sIg- ζ ein ähnliches Muster zellulärer Phosphoproteine, wenngleich diese eine deutlich geringere Intensität aufwiesen als nach Expression von ZAP YF-C.

Folglich scheinen diese Proteine, neben TCR- ζ , weitere Kandidaten für potentielle *in vivo* Substrate der aktivierten ZAP-70 Kinase zu sein. Die Identifizierung dieser weiteren Phosphoproteine mittels entsprechender Reagenzien konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr erfolgen.

Zelltyp: LT Jurkat
 IP: slg-TCR- ζ
 Detektion: 4G10 (anti-Phosphotyrosin)

Zelltyp: LT Jurkat
 Detergenz Lysat
 Detektion: 4G10 (anti-Phosphotyrosin)

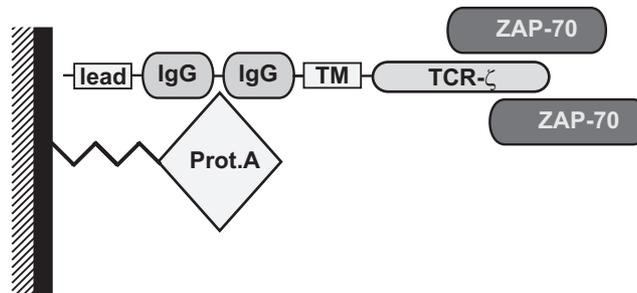
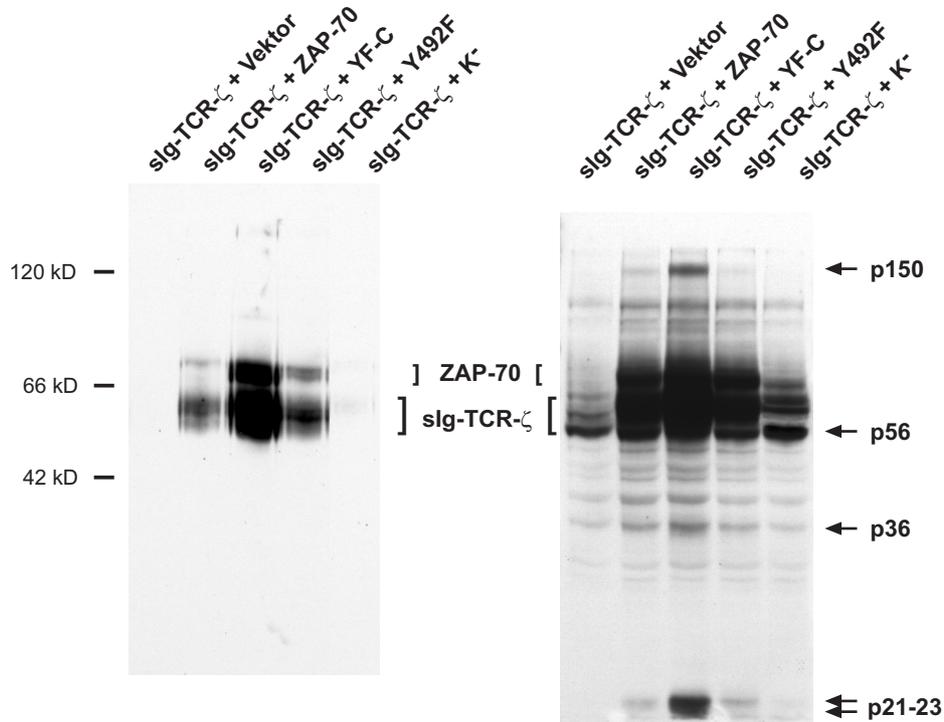


Abbildung 4.20: **Expression von ZAP YF-C induziert die Phosphorylierung eines TCR- ζ Fusionsproteins.** Verschiedene Varianten von ZAP-70 sowie ein transmembranes Fusionsprotein - bestehend aus extrazellulären Immunglobulinomänen und der intrazellulären Domäne aus TCR- ζ (sIg- ζ) - wurden in Jurkat T-Zellen coexprimiert. Expression von ZAP YF-C induziert dabei, wie bereits in Abbildung 4.16 gezeigt, die Tyrosinphosphorylierung spezifischer zellulärer Substrate, unter anderem von Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von 21, 23, 95, und 150 kD. Nach Präzipitation der sIg- ζ Fusionsproteine an immobilisiertem Protein-A konnte - durch Immunodetektion des Westernblots mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper 4G10 - die Tyrosinphosphorylierung von slg- ζ sowie den copräzipitierenden ZAP-70 Varianten nachgewiesen werden. Die Tyrosinphosphorylierung beider Proteine ist in ZAP YF-C exprimierenden Zellen deutlich intensiver als bei Expression der Wildtypform von ZAP-70.

5 Diskussion zu ZAP-70

Die Tyrosinkinase ZAP-70 stellt eine zentrale Komponente der T-Zell-Antigenrezeptor (TCR)-gekoppelten Signaltransduktionsmaschinerie dar. Die essentielle Bedeutung von ZAP-70 für die initialen Prozesse der T-Zell Aktivierung wurde durch eine Vielzahl biochemischer und genetischer Analysen unterstrichen. Wie bereits einleitend erwähnt (Abschnitt 2.4), resultiert nach dem gegenwärtig favorisierten Modell die Stimulation ruhender T-Lymphozyten mit Antigen sukzessive in den folgenden Prozessen: 1) Aktivierung von Tyrosinkinasen der src-Familie und Tyrosinphosphorylierung von ITAMs des T-Zell-Rezeptor Komplexes; 2) Assoziation von ZAP-70 mit phosphorylierten ITAMs; 3) Modifikation diverser Tyrosinreste in ZAP-70 Molekülen durch Autophosphorylierung und Transphosphorylierung durch src-Kinasen; 4) Stimulation der ZAP-70 Kinaseaktivität; 5) Rekrutierung und eventuell Phosphorylierung zellulärer Substrate; 6) Attenuation und Termination dieser Signaltransduktionsprozesse (Abbildung 2.2; Germain R.N. und Stefanova I., 1999; van Leeuwen J.E. und Samelson L.E., 1999; Kane L.P. *et al.*, 2000).

Trotz intensiver Studien sind nach wie vor zahlreiche Aspekte der Regulation von ZAP-70 während der T-Zell Aktivierung unvollständig charakterisiert. So sind beispielsweise mechanistische Details der Stimulation von katalytischer bzw. funktioneller ZAP-70 Aktivität bislang unverstanden (Abschnitte 5.1 bzw. 5.2). Neben seiner enzymatischen Funktion, spielt ZAP-70 aber auch eine wichtige Rolle als Ankerprotein für die Rekrutierung zellulärer Effektormoleküle, deren Identität vor Beginn der hier dokumentierten Analysen größtenteils unbekannt war. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Identifikation von Phosphoproteinen, die als direkte *in vivo* Substrate von ZAP-70 fungieren (Abschnitt 5.3).

5.1 Regulation der *in vitro* Kinaseaktivität von ZAP-70

Die katalytische Aktivität von ZAP-70 nimmt als Folge der Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors zu. Hierfür scheinen einerseits intramolekulare Konformationswechsel bedeutsam zu sein, welche durch Modifikation von Tyrosinresten in ZAP-70 reguliert werden könnten. In der im Folgenden beschriebenen Analyse dieses Aspekts lag besonderes Augenmerk auf der Beteiligung konservierter, carboxyterminal der Kinasedomäne befindlicher Tyrosinreste, welche von anderen Autoren bislang nicht untersucht worden waren (Abschnitt 5.1.2).

Andererseits könnte aber auch die ITAM-Assoziation unmittelbaren Einfluß auf die Aktivierung der enzymatischen Funktion von ZAP-70 haben. Dieser Aspekt wurde mit Hilfe transmembran exprimierter ZAP-70-Fusionsproteine analysiert (Abschnitt 5.1.1).

5.1.1 Membranrekrutierung von Syk- und ZAP-70 substituiert für ITAM Bindung

Noch immer wird von mehreren Autoren kontrovers diskutiert, ob die Bindung an ITAMs unmittelbaren Einfluß auf die Aktivierung der Kinasefunktion von ZAP-70 hat (LoGrasso P.V. *et al.*, 1996; Neumeister E.N. *et al.*, 1995; Magistrelli G. *et al.*, 1999; Visco C. *et al.*, 2000). Im Fall der verwandten Tyrosinkinase p72^{Syk} resultiert offenbar eine Bindung von Peptiden mit phosphorylierten ITAM-Sequenzen an die SH2 Domänen über einen intramolekularen Konformationswechsel in einer deutlichen Steigerung der Kinaseaktivität (Shiue L. *et al.*, 1995; Rowley R.B. *et al.*, 1995; Kimura T. *et al.*, 1996).

Im Zuge der hier dokumentierten Analysen wurde demgegenüber mehrfach dokumentiert, daß Fusionsproteine von Syk, welche konstitutiv an die Plasmamembran rekrutiert und quervernetzt wurden, auch ohne die Bindung an phosphorylierte ITAMs funktionell aktiv waren. So resultierte beispielsweise die Aggregation transmembraner Syk-Fusionsproteine in der Induktion von Calcium-Influx, Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate sowie Aktivierung des IL-2 Promotors in transfizierten T-Zellen (Abbildung 4.2; Abbildung 4.15; Kolanus W. *et al.*, 1993). Auch nach Expression transmembraner Fusionsproteine von ZAP-70 war die resultierende zelluläre Aktivierung durch Quervernetzung unabhängig von ITAM-Phosphorylierung (Kolanus W. *et al.*, 1993; Yamasaki S. *et al.*, 1996). Anders als im Fall von p72^{Syk} resultierte jedoch die homotypische Aggregation von ZAP-70 in keinerlei Induktion von T-Zell Aktivierungsparametern. Diese war allerdings vollständig rekonstituierbar mittels der Co-Aggregation mit Tyrosinkinasen der src-Familie, also ebenfalls unabhängig von einer Bindung an ITAM-Sequenzen (Abbildung 4.2; Abbildung 4.4 ; Kolanus W. *et al.*, 1993). Der Mechanismus der Kooperativität von ZAP-70 und p56^{lck} ist im Abschnitt 5.2.2 diskutiert.

Die genannten Befunde deuten darauf hin, daß eine Stimulation der intrinsischen Kinaseaktivität von Syk-Kinasen durch strukturelle Änderungen nach ITAM-Bindung nicht essentiell für die Induktion zellulärer Aktivierung ist. Möglicherweise ist die quantitative Steigerung der Kinaseaktivität von Syk-Kinasen durch ITAM Bindung allerdings relevant bei limitierender Costimulation durch src-Kinasen, z.B. während der Reifung von Thymozyten (Ashe J.M. *et al.*, 1999; Ulivieri C. *et al.*, 2000) oder in p56^{lck} defizienten Zelltypen (Denny M.F. *et al.*, 2000).

5.1.2 Tyrosinreste regulieren die Kinaseaktivität von ZAP-70

Wie bereits einleitend erwähnt, kann die katalytische Aktivität von ZAP-70 durch Modifikation spezifischer Tyrosinreste sowohl stimuliert als auch inhibiert werden. Zwei Tyrosinreste in ZAP-70 sind bislang intensiv charakterisiert worden, nämlich die Reste 492 und 493 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne von humanem ZAP-70 (Abbildung 4.5; Watts J.D. *et al.*, 1994; Chan A.C. *et al.*, 1995; Wange R.L. *et al.*, 1995; Kong G.H. *et al.*, 1996; Mege D. *et al.*, 1996). Die Substitution dieser Tyrosinreste resultiert in einer

veränderten *in vitro* Kinaseaktivität der entsprechenden ZAP-70 Mutanten. Die Phosphorylierung des Restes 493 wird überwiegend von src-Kinasen katalysiert und erfüllt vermutlich eine positiv-regulatorische Funktion, da dessen Mutation zu Phenylalanin in einer Kinase-inaktiven und somit funktionell dominant negativen Variante von ZAP-70 resultiert. Ähnlich verhält sich auch eine ZAP-70 Variante, deren Kinaseaktivität durch eine Substitution des Lysinrests 369 in der ATP-bindenden Untereinheit der Kinasedomäne inaktiviert wurde (Abbildung 4.5; Qian D. *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu, führt die Substitution des benachbarten Tyrosinrests 492 zu einer Kinase-hyperaktiven ZAP-70 Variante, daß heißt ein gereinigtes Protein transferiert in einer definierten Zeitspanne gegenüber der Wildtypform von ZAP-70 die etwa 5-fache Menge an radioaktiv markierten Phosphatresten von ATP auf ein exogen zugegebenes Substrat (Abbildung 4.10; Wange R.L. *et al.*, 1995). Im Hinblick auf die gegenläufigen Effekte der Phosphorylierung beider Tyrosinreste wurde die sequentiellen Phosphorylierung der Reste 493 und 492 als ein negativer Rückkopplungsmechanismus beschrieben, welcher zunächst zur Stimulation der ZAP-70 Kinaseaktivität führt und zeitverzögert deren Attenuation nach sich zieht (Chan A.C. *et al.*, 1995; Wange R.L. *et al.*, 1995). Ähnliche Modelle waren bereits für die Regulation der Insulin-Rezeptor Kinaseaktivität durch Phosphorylierung zweier Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife deren Kinasedomäne vorgeschlagen worden (Zhang B. *et al.*, 1991; Hubbard S.R. *et al.*, 1994)

Neben den Tyrosinresten 492 und 493 in der Aktivierungsschleife von ZAP-70 wurden von Chan *et al.* nach T-Zell-Rezeptor Stimulation diverse weitere Phosphotyrosinmodifikationen in ZAP-70 beobachtet, deren Position bislang nicht bestimmt wurde (Chan A.C. *et al.*, 1995). Für die verwandte Kinase p72^{Syk} wurden die Autophosphorylierungsstellen indes weit detaillierter analysiert (Furlong M.T. *et al.*, 1997; Keshvara L.M. *et al.*, 1997; Turner M. *et al.*, 2000). Außer den erwarteten Phosphorylierungsstellen in den Interdomäne A und B (siehe Abschnitt 5.1.2) wurden in diesen Studien auch die Tyrosinreste 624 und 625 von gereinigten murinen p72^{Syk} Molekülen autophosphoryliert. Beide Tyrosinreste sind in Syk und ZAP-70 sowie im Menschen und in der Maus konserviert (siehe Abbildung 4.5), was impliziert, daß deren Phosphorylierung an der Regulation von Syk-Kinasen beteiligt sein könnte. Um diesen potentiellen Regulationsmechanismus experimentell zu überprüfen, wurden von Charles Romeo im Labor von Brian Seed (Harvard Medical School) Substitutionsmutanten von ZAP-70 bzw. Syk generiert, in denen die C-terminal zur Kinasedomäne lokalisierten Tyrosinreste 597 und 598 bzw. 624 bis 626 gegen Phenylalanin ersetzt wurden. Expressionskonstrukte dieser - als ZAP YF-C und Syk YF-C bezeichneten - Mutanten wurden unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Ein erster experimenteller Ansatzpunkt zur Charakterisierung dieser mutierten Proteine war eine Analyse der *in vitro* Kinaseaktivität gereinigter Varianten von ZAP-70. Neben der Wildtypform von ZAP-70 wurde ZAP YF-C, ZAP Y492F und die Kinase-inaktive Form R369G aus Lysaten transfizierter Jurkat T-Zellen gereinigt und auf Phosphotransferaseaktivität gegenüber einem exogen zugegebenen Substrat sowie auf Autophosphorylierung untersucht. Die ZAP YF-C Variante wies eine 1,6-fach gesteigerte Kinaseaktivität gegenüber der Wildtypform auf, während sich die hyperaktive Y492F Variante mit einer etwa 5-fach

gesteigerten Aktivität ähnlich verhielt, wie bereits von anderen Autoren beschrieben (Wange R.L. *et al.*, 1995; Kong G.H. *et al.*, 1996). Von einer Analyse der entsprechenden Syk Mutanten wurde abgesehen, da die Kinaseaktivität von Syk intrinsisch sehr hoch ist und offensichtlich weniger durch differentielle Phosphorylierung als durch Bindung an phospho-ITAMs reguliert wird (Shiue L. *et al.*, 1995; Rowley R.B. *et al.*, 1995; Kimura T. *et al.*, 1996).

Die gesteigerte *in vitro* Kinaseaktivität der ZAP YF-C Variante impliziert, daß die Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste 597 und 598 zur Inhibition der Kinaseaktivität von ZAP-70 beitragen könnte. Weiterhin scheint in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß die katalytische Aktivität von Syk durch Zugabe eines gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpers *in vitro* inhibierbar ist (Shiue L. *et al.*, 1995). Zusammengenommen demonstrieren diese Befunde den regulatorischen Einfluß der C-terminalen Aminosäuren auf die *in vitro* Kinaseaktivität von Syk-Kinasen.

Auf welche Weise die YF-C Mutation allerdings die Kinaseaktivität stimuliert, ist bislang nicht geklärt. Da sich beide Reste außerhalb der Faltungseinheit der Kinasedomäne befinden, erscheint es unwahrscheinlich, daß deren Phosphorylierungsgrad unmittelbaren Einfluß auf die Konformation des aktiven Zentrums ausübt, wie dies für die Tyrosinreste 492 und 493 der Fall zu sein scheint. Ein wichtiger Hinweis auf den möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismus wurde allerdings von Thomas Knorr in unserem Labor erarbeitet. Durch Immunpräzipitation partiell gereinigte ZAP YF-C Moleküle autophosphorylierten sich *in vitro* an einem spezifischen Tyrosinrest deutlich effizienter als Moleküle der ZAP-70 Wildtypform (Thomas Knorr, Dissertation). Die Position des hyperphosphorylierten Tyrosinrestes in ZAP YF-C wurde nicht bestimmt, es erscheint aber denkbar, daß diese differentielle Phosphorylierung den stimulierenden Einfluß der YF-C Mutation auf die Kinaseaktivität vermittelt. Diese Befunde belegen eindeutig, daß in dem partiell gereinigten Komplex der ZAP-70 Varianten die Fähigkeit zur differentiellen Phosphorylierung enthalten ist und bieten somit Ansatzpunkte für eine weitergehende Analyse (siehe Abschnitt 0).

5.2 Regulation der funktionellen *in vivo* Aktivität von ZAP-70

Die eben beschriebene Bestimmung der *in vitro* Aktivität von ZAP-70 analysierte nur einen Teilaspekt aller Regulationsmechanismen von ZAP-70, da die funktionelle Aktivität dieser Kinase in intakten Zellen - außer durch die katalytischen Funktion - auch durch die Interaktion mit diversen zellulären Faktoren determiniert wird. Als Maß der funktionellen Aktivität *in vivo* diente dabei die Induktion des IL-2 Promotors in transfizierten Zelllinien. Im Folgenden sind Befunde dargestellt, welche plausibel machen, daß die *in vitro* Kinaseaktivität von ZAP-70 und Syk nur bedingt als Maß für deren *in vivo* Aktivität dienen kann, da beide Parameter nicht korreliert sind (Abschnitt 5.2.1). Vielmehr scheint in lebenden Zellen die Regulation der Proximität von Kinase und Substrat ein dominierendes regulatorisches Potential zu besitzen (Abschnitt 5.2.2).

5.2.1 Die *in vitro* und *in vivo* Aktivitätsmuster von ZAP-70 Mutanten sind nicht korreliert

Größere physiologische Relevanz als die *in vitro* Kinaseaktivität scheint die funktionelle Aktivität der hier untersuchten ZAP-70 Varianten zu besitzen, welche anhand der Induktion des IL-2 Promotors in transient transfizierten Zellen untersucht wurde. Derartige Analysen wurden von mehreren Autoren in einem heterologen Zellsystem durchgeführt, der Syk-defizienten Variante des DT40 B-Zell-Lymphoms aus dem Huhn (Buerstedde J.M. und Takeda S., 1991; Takata M. *et al.*, 1994). Die Expression von ZAP-70 rekonstituiert in diesen Zellen die transkriptionelle Induktion von NF-AT-Elementen nach Stimulation des B-Zell Rezeptors (Kong G.H. *et al.*, 1995; Chan A.C. *et al.*, 1995). Andere Autoren verwendeten Jurkat T-Zellen, in denen allerdings die ZAP-70 Mutanten relativ zum endogenen Protein überexprimiert werden müssen (Kong G.H. *et al.*, 1996; Mege D. *et al.*, 1996; Zhao Q. und Weiss A., 1996; Pelosi M. *et al.*, 1999). Gut charakterisiert wurden in diesen Studien insbesondere die ZAP-70 Varianten Y492F und Y292F, nicht aber die YF-C Mutante.

Zur Reproduktion dieser Studien und zur initialen Analyse der YF-C Variante wurde die funktionelle Aktivität der ZAP-70 Mutanten sowohl in Syk-defizienten DT40 B-Zellen als auch durch Überexpression in Jurkat T-Zellen untersucht. Wie erwähnt, diente zur Quantifizierung der *in vivo* Aktivität die Induktion des IL-2 Promotors und von NF-AT Elementen. In Tabelle 5.1 sind die *in vitro* Kinaseaktivitäten (Abschnitt 5.1.2) der genannten ZAP-70 Varianten den funktionellen Aktivitätsunterschieden in Jurkat T- und DT40 B-Zellen gegenübergestellt:

ZAP-70 Variante	<i>in vitro</i> Kinaseaktivität	<i>in vivo</i> Aktivität in Jurkat T-Zellen	<i>in vivo</i> Aktivität in DT40 B-Zellen
ZAP-70 wt	o	o	o
ZAP YF-C	+	++	o
ZAP Y492F	++	o	++
ZAP Y292F	(o)	+	++
ZAP K ⁻	-	-	-

Tabelle 5.1: Die *in vitro* Kinaseaktivität verschiedener ZAP-70 Varianten korreliert nicht unmittelbar mit deren funktioneller Aktivität *in vivo*, welche zudem Zelltyp-spezifische Unterschiede aufweist. Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Abbildung 4.7, Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11 zusammen. Die Aktivität der Wildtypform von ZAP-70 ist als (o) bezeichnet, eine relative Steigerung der Aktivität mit (+) oder (++) , eine relative Reduktion der Aktivität mit (-). Die Kinaseaktivität der ZAP Y292F Variante wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt, jedoch beschreiben zwei Publikationen diese als unverändert gegenüber der Wildtypform von ZAP-70 (Kong G.H. *et al.*, 1996; Zhao Q. und Weiss A., 1996).

Die in Tabelle 5.1 zusammengefaßten Ergebnisse offenbaren Differenzen zwischen den verschiedenen ZAP-70 Varianten, die einerseits die jeweilige *in vitro* und *in vivo* Aktivität betreffen, welche für keine der Varianten eindeutig korreliert sind. Offenbar kann die *in vitro* Kinaseaktivität gegen ein gereinigtes Substrat nicht als Maß für die funktionelle Aktivität einer ZAP-70 Variante auf transkriptionell regulierte Genexpression dienen. Andererseits

ergaben sich überraschenderweise aber auch zelltyp-spezifische Unterschiede in der funktionellen Aktivität der Varianten. Die molekularen Mechanismen, welche diesen Differenzen zu Grunde liegen, unterscheiden sich demnach offenbar für alle drei untersuchten ZAP-70 Mutanten.

Der molekulare Mechanismus der Hyperaktivität ist am besten charakterisiert für die Variante ZAP Y292F. Kürzlich wurde nämlich gezeigt, daß Phosphorylierung des Tyrosinrestes 292 die Bindung des negativ-regulatorischen Faktors p120-cbl initiiert, welcher möglicherweise die Ubiquitylierung und Degradation aktivierter ZAP-70 Moleküle zur Folge hat (Lupher M.L. *et al.*, 1997; Rao N. *et al.*, 2000; Joazeiro C.A. *et al.*, 1999; Rudd C.E. und Schneider H., 2000). Wegen der fehlenden Negativregulation durch p120-cbl weist die Y292F Mutante einen funktionell hyperaktiven Phänotyp auf, welcher unabhängig vom Zelltyp und einer Stimulation der *in vitro* Kinaseaktivität ist (Tabelle 5.1).

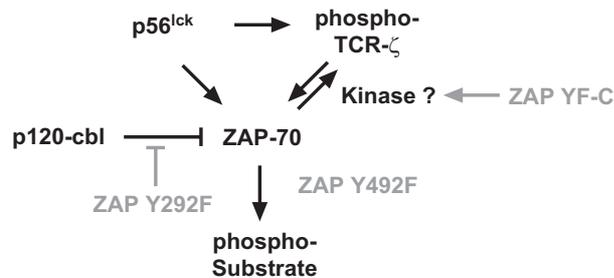
Die ZAP Y492F Mutation scheint demgegenüber direkten stimulierenden Einfluß auf die Kinaseaktivität zu nehmen, der jedoch nur in DT40 Zellen mit einer funktionellen Hyperaktivität korrespondiert (Tabelle 5.1, Kong G.H. *et al.*, 1996; Zhao Q. und Weiss A., 1996). Offenbar existieren Zelltyp-spezifische Faktoren, welche für die Ausprägung eines *in vivo* Phänotyps der Y492F Variante relevant sind.

Im Fall der neuartigen, bisher nicht charakterisierten ZAP YF-C Variante wurden mittels umfangreicher genetischer und biochemischer Analysen untersucht, welche potentiellen molekularen Mechanismen der funktionellen Hyperaktivität zu Grunde liegen könnten. Grundsätzlich denkbar wäre hierzu sowohl eine Stimulation der Kinaseaktivität als auch eine Modulation der Ankerproteinfunktion von ZAP-70 durch Einführung der YF-C Mutation (oder eine Kombination beider Mechanismen). Als Ankerprotein kann ZAP-70 wiederum sowohl positiv-regulatorische als auch negativ-regulatorische Faktoren rekrutieren.

Die in Tabelle 5.1 dargestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß sich die Mechanismen der Hyperaktivität für alle drei analysierten ZAP-70 Varianten unterscheiden. Dies bedeutet, daß eine Stimulation der Kinaseaktivität oder eine reduzierte Negativregulation durch p120-cbl wenig wahrscheinliche Ursachen der funktionellen Hyperaktivität von ZAP YF-C sind. Wie in Abschnitt 5.3.3 diskutiert, könnte demgegenüber insbesondere ein Rückkopplungsmechanismus zwischen der TCR- ζ Kette und ZAP-70 hierfür funktionell relevant sein. Konsistent damit sind auch genetischen Analyse des ZAP YC-F Phänotyps in Derivaten der Jurkat Zelllinie, welche defizient für die Expression des T-Zell-Rezeptors (Abbildung 4.12) oder der src-Kinase p56^{lck} sind (Abbildung 4.13). Möglicherweise erklärt demnach die Abwesenheit T-Zell-spezifischer Faktoren wie p56^{lck} und TCR- ζ die fehlende Hyperaktivität von ZAP YF-C in B-Zellen (Abbildung 4.11). Über welchen molekularen Mechanismus allerdings die ZAP YF-C Variante den Rückkopplungsmechanismus zwischen der TCR- ζ Kette und ZAP-70 stimuliert, ist bislang ungeklärt. In Abbildung 5.1 sind die potentiellen Mechanismen der drei analysierten ZAP-70 Varianten im Kontext von p56^{lck}, TCR- ζ und p120-cbl nochmals graphisch veranschaulicht. Wie in Abschnitt 5.3.3 ausführlich diskutiert, resultiert die Expression der ZAP YF-C Mutante in Jurkat T-Zellen in der Hyperphosphorylierung der TCR- ζ Kette. Denkbare Mechanismen zur Erhöhung des

Phosphotyrosingehalts der TCR- ζ Untereinheit durch die Expression von YF-C sind zum einen die Stimulation einer Kinase (Abbildung 5.1; Szenario 1) oder die Inhibition einer Phosphatase (Abbildung 5.1; Szenario 2). Experimentelle Analysen, welche zwischen diesen Szenarien diskriminieren sollten, sind in Abschnitt 5.3.3 diskutiert.

Szenario 1:



Szenario 2:

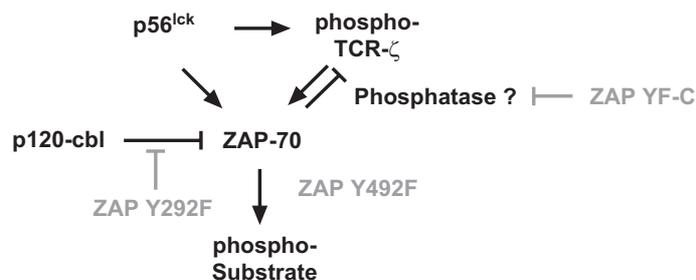


Abbildung 5.1: **Potentielle molekulare Mechanismen der funktionellen Hyperaktivität verschiedener ZAP-70 Tyrosinstitutionsmutanten.** Mit spitzen Pfeilen sind positiv-regulatorische funktionelle Interaktionen im Kontext von ZAP-70, p56^{lck}, TCR- ζ und p120-cbl veranschaulicht, während stumpfe Pfeile inhibitorische Aktivität versinnbildlichen. Dargestellt sind zwei unterschiedliche Szenarien, in denen ZAP-70 die Phosphorylierung der TCR- ζ Kette positiv oder negativ reguliert.

Zusammenfassend konnten folgende Effekte der ZAP YF-C Mutation im Vergleich zur Wildtypform von ZAP-70 heraus gearbeitet werden:

1. Moderate Stimulation der *in vitro* Kinaseaktivität (Abbildung 4.10).
2. Hyperphosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes in ZAP YF-C durch *in vitro* Autophosphorylierung (Thomas Knorr, Dissertation; Abschnitt 5.1.2).
3. Induktion von Tyrosinphosphorylierung durch ZAP YF-C Expression, unter anderem derjenigen der TCR- ζ -Kette (Abbildung 4.16 bis Abbildung 4.20).

4. Assoziation mit der phosphorylierten TCR- ζ -Kette (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.20).
5. Funktionelle Hyperaktivität von ZAP YF-C spezifisch in T-Zellen und in Abhängigkeit von p56^{lck} und dem T-Zell-Rezeptor (Abbildung 4.7 bis Abbildung 4.15).

Diese Charakteristika der ZAP YF-C Mutante implizieren unter anderem, daß andere Mechanismen als die *in vitro* Kinaseaktivität entscheidenden regulatorischen Einfluß auf die funktionelle Aktivität von ZAP-70 haben können. Wie im folgenden Abschnitt diskutiert, könnte die Ankerproteinfunktion von ZAP-70 über eine Modulation der Proximität von Kinase und Substrat entscheidende regulatorische Funktion besitzen.

5.2.2 Proximität zu Substraten reguliert die funktionelle Aktivität von ZAP-70

Im Gegensatz zu p72^{Syk} benötigt ZAP-70 generell die Aktivität von src-Kinasen, um T-Zell Aktivierungsparameter wie Calcium-Influx, Tyrosinphosphorylierung oder die Aktivität des IL-2 Promotors zu induzieren. Der Mechanismus dieser Kooperativität zwischen ZAP-70 und p56^{lck} war bislang unbekannt, könnte aber, wie von mehreren Autoren postuliert, in der intrinsisch relativ geringen Kinaseaktivität von ZAP-70 begründet sein. Für ZAP-70 kann erst nach Phosphorylierung des Tyrosinrests 493 durch src-Kinasen ein deutlicher Anstieg der katalytischer Aktivität gegenüber Substraten festgestellt werden (Chan A.C. *et al.*, 1995). Ein derartiger Mechanismus der Kooperativität wäre somit abhängig von der p56^{lck}-Kinaseaktivität.

Überraschenderweise ergaben jedoch die in 4.1 dargestellten Analysen, daß p56^{lck} unabhängig von seiner Kinaseaktivität funktionell mit ZAP-70 kooperieren kann. Studien in lck-defizienten JCaM1 Jurkat T-Zellen demonstrierten nämlich, daß hinsichtlich der Induktion des IL-2 Promotors nach Co-Aggregation von ZAP-70 mit mutierten p56^{lck} Fusionsproteinen die Funktion der Adapterdomänen von lck essentiell sind, während die Kinaseaktivität von lck lediglich zusätzliche, costimulatorische Funktion besitzt (Abbildung 4.3; Knoll M., Dissertation). Die Aggregation von ZAP-70 mit einer lck-Mutante, deren SH2- und SH3-Domänen durch Punktmutation ihre generische Adapterfunktion verloren hatten (Pawson T., 1995), resultierte in einer massiven Reduktion der IL-2 Promotorinduktion, obwohl die Kinasedomäne dieses lck-Fusionsproteins intakt war (Abbildung 4.3). Diese Ergebnisse demonstrierten die essentielle Beteiligung der Protein-Adapterdomänen an der Kooperativität mit ZAP-70, während die Kinaseaktivität von p56^{lck} zumindest partiell entbehrlich zu sein scheint.

Konsistent mit dieser Interpretation sind sowohl die im Abschnitt 5.3.1 dargestellten Analysen zur Tyrosinphosphorylierung von Komponenten des quervernetzten Komplexes aus ZAP-70 und lck, als auch diverse, bereits an anderer Stelle dokumentierte Ergebnisse. So wurde die Beteiligung der SH2- und SH3-Adapterdomänen an der Vermittlung der Kooperativität zwischen p56^{lck} und ZAP-70 auch durch Studien von Yamasaki *et al.* bestätigt

(Yamasaki S. *et al.*, 1996), die ebenfalls transmembrane Fusionsproteine von ZAP-70 betrafen. Weiterhin in Einklang dazu stehen Resultate in antigenabhängigen T-Zell Aktivierungssystemen. So war die Kinaseaktivität von p56^{lck} für die Kooperativität mit nativen ZAP-70 Molekülen in zwei verschiedene Studien irrelevant (Xu H. und Littman D.R., 1993; Collins T.L. und Burakoff S.J., 1993). In beiden Untersuchungen wurde die costimulatorische Aktivität von Fusionsproteinen untersucht, welche aus den extrazellulären Domänen von CD4 und einem intrazellulären p56^{lck} Anteil bestanden. Unter diesen Bedingungen resultierte eine Deletion der Kinasedomäne der CD4-Fusionsproteine mit lck sogar in einer Verstärkung der antigeninduzierten IL-2 Sekretion.

Im Rahmen der Dissertationsarbeit von Michael Knoll wurde in unserem Labor detailliert der Beitrag isolierter SH2- und SH3-Domänen zur Kooperativität von src-Kinasen mit ZAP-70 untersucht (Knoll M.; 1999). Zusammen mit neueren Befunden anderer Labors deuten die dort dokumentierten Ergebnisse darauf hin, daß vor allem der SH3-Domäne von lck die Rekrutierung von positiv-regulatorischen Adapterproteinen vermittelt, während die SH2-Domäne kontextabhängige Funktion aufweist (Straus D.B. *et al.*, 1996; Denny M.F. *et al.*, 1999). Potentielle Liganden der SH2- und SH3-Domänen von p56^{lck} sind im Zusammenhang mit der Analyse von *in vivo* Substraten für ZAP-70 (Abschnitt 5.3.1) diskutiert.

Zusammengenommen demonstrieren die Studien der funktionellen Aktivität von ZAP-70, daß die Stimulation der katalytischen Aktivität nicht-limitierend und lediglich von untergeordneter Bedeutung für die Regulation von T-Zell Aktivierung zu sein scheint. Vermutlich bedingt unter physiologischen Bedingungen die Kinaseaktivität von p56^{lck} hauptsächlich die Phosphorylierung von ITAMs des T-Zell-Rezeptors und besitzt autoregulatorische Funktion, ist aber nicht essentiell für die Induktion der Kinaseaktivität von ZAP-70. Demgegenüber kommt der Rekrutierung zellulärer Substrate in die Proximität von ZAP-70 offenbar entscheidende regulative Bedeutung zu. Konsistent mit dieser Interpretation ist die - im vorigen Abschnitt beschriebene - funktionelle Charakterisierung der Kinase-hyperaktiven ZAP-70 Mutanten, deren *in vitro* Kinaseaktivität nicht korreliert mit der funktionellen Aktivität *in vivo*. Eine konstitutiv aktive ZAP-70 Variante wie ZAP YF-C könnte demzufolge in erster Linie die Proximität der Kinase zu relevanten Substraten betreffen, wie in Abschnitt 5.3.3 diskutiert. Die Sequestrierung von Kinasen und deren Substraten durch Kompartimentalisierung oder Degradation scheint im übrigen auch unter physiologischen Bedingungen die entscheidende Rolle bei der Kontrolle von T-Zell Aktivierungsprozessen spielen (Langlet C. *et al.*, 2000; Acuto O. und Cantrell D., 2000).

5.3 Potentielle *in vivo* Substrate von ZAP-70

Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors resultiert in der Aktivierung diverser Tyrosinkinasen, welche wiederum eine große Anzahl von Proteinen an Tyrosinresten phosphorylieren. Die Identifikation direkter Substrate einzelner Kinasen wird weiterhin erschwert durch

die Kooperativität verschiedener Tyrosinkinasen, z.B. zwischen Kinasen der Syk- und der src-Familien. Im Folgenden werden zwei Strategien beschrieben, um trotz dieser Komplexität zumindest Hinweise auf Phosphoproteine zu erhalten, welche als Kandidaten für direkte Substrate von ZAP-70 in Frage kommen.

5.3.1 Substrate nach Quervernetzung mit Kinase-inaktiven p56^{lck} Molekülen

Ein Ansatzpunkt zur Identifikation funktionell relevanter ZAP-70 Substrate bot sich aufgrund der im letzten Abschnitt diskutierten Befunde, wonach die Quervernetzung von Kinase-inaktiven p56^{lck} mit ZAP-70 Fusionsproteinen als ein funktionelles Surrogat des T-Zell-Rezeptor gekoppelten Signaltransduktionsapparates aufgefaßt werden kann (Abbildung 4.3). Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, konnten mehrere tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen werden, die nach Quervernetzung von ZAP-70 und einem Kinase-defizienten lck-Fusionsprotein mit dem Komplex beider Proteine assoziierten. Der Phosphotyrosingehalt des ZAP-70 Fusionsproteins selbst stieg demgegenüber nach Quervernetzung mit einem Kinase-inaktivem p56^{lck}-Fusionsprotein nicht merklich an, was darauf schließen läßt, daß Phosphorylierung und Stimulation der Kinaseaktivität von ZAP-70 unter diesen Bedingungen keine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz dazu werden jedoch assoziierte Proteine effizient tyrosinphosphoryliert, welche mit dem Komplex aus quervernetzten ZAP-70 und mutierten lck-Fusionsproteinen interagieren. Aufgrund der geringen Aktivität von src-Kinasen in den verwendeten lck-defizienten JCaM1 Zellen und der Notwendigkeit katalytisch aktiver ZAP-70 Moleküle zur Induktion von Tyrosinphosphorylierung der assoziierten Proteine, scheint es sehr wahrscheinlich, daß diese Proteine direkte Substrate von ZAP-70 darstellen. Diese könnten aufgrund ihrer Assoziation mit den SH2- und SH3-Adapterdomänen von p56^{lck} auch unter physiologischen Bedingungen in unmittelbare Proximität zu ZAP-70 gebracht und somit effizient phosphoryliert werden, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden und schließlich transkriptionelle Aktivität reguliert werden könnte.

Die apparenten Molekulargewichte dieser Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen ermittelt und betragen 36, 38, 76 und 95 kD (Abbildung 4.4). Tatsächlich werden Proteine entsprechenden Molekulargewichts - neben weiteren Phosphoproteinspezies - auch nach Stimulation des gesamten T-Zell-Rezeptor Komplexes tyrosinphosphoryliert, wenn auch teilweise mit unterschiedlicher Intensität (Abbildung 4.16, Abbildung 4.17). Diese Unterschiede ergeben sich vermutlich aufgrund der Aktivität weiterer Tyrosinkinasen, insbesondere der von src-Kinasen.

Unter den vier Phosphoproteinen, welche mit dem Komplex aus quervernetzten ZAP-70 und lck-ΔK Fusionsproteinen assoziiert waren, wies die Proteinbande bei 76 kD in der anti-Phosphotyrosindetektion des Westernblots die größte Signalintensität auf (Abbildung 4.4). Das entsprechende Protein könnte entweder in höherer Stöchiometrie assoziiert sein oder einen höheren Phosphotyrosingehalt aufweisen als die übrigen Komponenten des Komplexes. Die Identität des 76 kD Proteins wurde wegen fehlender Reagenzien nicht ermittelt, es könnte

sich jedoch möglicherweise um das zytoplasmatische Adapterprotein SLP-76 handeln (Jackman J.K. *et al.*, 1995), welches kürzlich als direkter Ligand der SH3-Domäne von p56^{lck} beschrieben wurde (Sanzenbacher R. *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde SLP-76 bereits auf Grund von Befunden aus mehreren experimentellen Ansätzen als potentiell Substrat von ZAP-70 identifiziert (Wardenburg J.B. *et al.*, 1996). SLP-76 scheint als Ankerprotein für eine Vielzahl von Proteinen des TCR-gekoppelten Signaltransduktionsapparates zu fungieren, unter anderem für Grb2, Gads, Itk, PLC- γ , SLAP-130, p62, Nck und Vav (Clements J.L. *et al.*, 1999; Myung P.S. *et al.*, 2000; Kane L.P. *et al.*, 2000). Funktionell scheint SLP-76 nach TCR Stimulation sowohl an der Aktivierung des ras Signalweges als auch an der Erhöhung der intrazellulären Calcium-Ionen Konzentration beteiligt zu sein (Leeuwen J.E. und Samelson L.E., 1999).

Die Interaktion von SLP-76 mit p95^{vav} und Nck könnte für die Reorganisation des Actin-Zytoskeletts von Bedeutung sein, einem essentiellen Prozeß für die nachhaltige Aktivierung von T-Zellen (Wu J. *et al.*, 1996; Tuosto L. *et al.*, 1996; Acuto O. und Cantrell D., 2000; Dustin M.L. und Cooper J.A., 2000). Da p95^{vav} über Tyrosinphosphorylierung reguliert zu werden scheint, entspricht möglicherweise die 95 kD Phosphoproteinbande in Abbildung 4.4 diesem Protein. Offenbar kann p95^{vav} von mehreren Tyrosinkinase an verschiedenen Resten phosphoryliert werden, möglicherweise auch von ZAP-70 (Katzav S. *et al.*, 1994; Huby R.D. *et al.*, 1995; Deckert M. *et al.*, 1996; Michel F. *et al.*, 1998). Vav könnte nicht nur indirekt über SLP-76 in den Komplex aus ZAP-70 und lck rekrutiert werden, sondern interagiert vermutlich über seine SH2-Domäne auch direkt mit dem phosphorylierten Tyrosinrest 315 von ZAP-70 (Wu J. *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung des Tyrosinrest 315 in ZAP-70 wurde allerdings bislang nicht direkt nachgewiesen, sondern lediglich aufgrund der Homologie zu dem autophosphorylierten Tyrosinrest 348 von p72^{Syk} postuliert.

Das nahezu stöchiometrisch mit SLP-76 assoziierte, Grb2-ähnliche Adapterprotein Gads wird selbst nicht an Tyrosinresten phosphoryliert und kann deshalb im Westernblot durch Detektion mit anti-Phosphotyrosin Antikörpern nicht nachgewiesen werden (Myung P.S. *et al.*, 2000). Gads scheint aber über seine SH2-Domäne mit tyrosinphosphoryliertem p36-38 LAT zu assoziieren (Zhang W. und Samelson L.E., 2000).

LAT wurde 1998 als potentiell Substrat von ZAP-70 kloniert (Zhang W. *et al.*, 1998; Weber J.R. *et al.*, 1998) und könnte somit den beiden Phosphoproteinbanden mit 36 und 38 kD apparentem Molekulargewicht entsprechen, welche mit geringer Intensität durch anti-Phosphotyrosin Westernblotanalyse im Komplex von quervernetzten ZAP-70 und p56^{lck} Fusionsproteinen detektierbar waren (Abbildung 4.4). Ähnlich wie SLP-76 scheint auch LAT an der Aktivierung von sowohl PLC- γ als auch ras beteiligt zu sein (Finco T.S. *et al.*, 1998), indem es als Ankerprotein für diverse Komponenten der TCR-gekoppelten Signaltransduktionskaskaden fungieren kann. Tyrosinphosphorylierte LAT-Moleküle scheinen direkt mit PLC- γ , Grb2, Gads, Grap, Shb, 3BP2 sowie der p85 Untereinheit der PI-3-Kinase zu assoziieren (Zhang W. und Samelson L.E., 2000). Für eine Rekrutierung in den quervernetzten Komplex aus ZAP-70, lck, SLP-76 und Gads wäre allerdings eine initiale Phosphorylierung von LAT nötig. Es bleibt somit unklar, wie LAT unter diesen artifiziellen Bedingungen in die

Proximität von ZAP-70 rekrutiert werden könnte. In antigenstimulierten T-Zellen könnten jedoch die MHC-bindenden Corezeptoren CD4 und CD8 diese Funktion ausüben, da LAT unabhängig von Tyrosinphosphorylierung mit diesen Rezeptoren zu interagieren scheint (Bosselut R. *et al.*, 1999).

In Abbildung 5.2 ist ein Modell des putative Komplexes aus ZAP-70, lck Δ K, SLP-76, Vav, Gads und LAT gezeigt, der mit den in Abbildung 4.4 detektierten Phosphoproteinen konsistent ist. Über eine Aktivierung von SOS und PLC- γ könnten diese Adapterproteine zur Stimulation des ras Signalweges bzw. zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen. Die kooperative Aktivität beider Signalwege könnte wiederum die Stimulation des IL-2 Promotors erklären, welcher nach der Quervernetzung von ZAP-70 mit lck Δ K Fusionsproteinen mit der Phosphorylierung assoziierter Proteine korreliert (Abbildung 4.3). Neben den in Abbildung 4.4 detektierten Phosphoproteinen pp36-38, pp76 und pp95 enthält der Komplex sehr wahrscheinlich weitere Komponenten, insbesondere solche, die aufgrund von geringer oder fehlender Phosphorylierung an Tyrosinresten nicht nachweisbar waren. Beispiele hierfür sind die Proteine Gads und Grb-2, die mit SLP-76 bzw. mit phosphorylierten LAT-Molekülen assoziieren können (Myung P.S. *et al.*, 2000; Zhang W. und Samelson L.E., 2000). Wie bereits erwähnt, wurde SLP-76 als Ligand der SH3-Domäne von lck identifiziert und könnte - unter den vorliegenden Gegebenheiten - das zentrale Ankerprotein sein, welches die übrigen Protein in den Komplex aus ZAP-70 und Kinase-inaktiven lck-Molekülen rekrutiert. Die SH2-Domäne von p56^{lck} scheint - zumindest unter diesen Bedingungen - funktionell weniger bedeutsam zu sein als die der SH3-Domäne (Knoll M., Dissertation). Als ein wesentlicher intermolekularer Ligand der SH2-Domäne von lck wurde von mehreren Gruppen tyrosinphosphorylierte ZAP-70 Moleküle detektiert (Duplay P. *et al.*, 1994; Straus D.B. *et al.*, 1996; Pelosi M. *et al.*, 1999; Williams B.L. *et al.*, 1999). Die lck-SH2-Domäne könnte somit nach Stimulation mit Antigen für die Rekrutierung von p56^{lck} in die Proximität von ZAP-70 wichtig sein, welche unter den hier analysierten Bedingungen jedoch durch antikörpervermittelte Aggregation artifiziell forciert wird.

Neben ZAP-70 und SLP-76 wurden diverse weitere Liganden für die SH2- bzw. SH3-Domänen von Kinasen der src-Familie beschrieben, welche in die modellhaften Darstellung in Abbildung 5.2 nicht mit aufgenommen wurden. Beide Adapterdomänen inhibieren beispielsweise durch intramolekulare Wechselwirkungen die Kinaseaktivität von src-Kinasen und stehen erst nach deren Aktivierung für intermolekulare Wechselwirkungen zur Verfügung (Moarefi I. *et al.*, 1997; Xu W. *et al.*, 1999). Dieser Aktivierungsschritt sollte durch die Deletion der Kinasedomäne von p56^{lck} imitiert werden. Als ein potentieller Bindungspartner beider Adapterdomänen von src-Kinasen ist weiterhin das Protein SAM68 beschrieben worden, welches in Lysaten mitotischer Zellen als Ligand von c-Src identifiziert wurde (Taylor S.J. und Shalloway D., 1994; Fumagalli S. *et al.*, 1994). In T-Lymphozyten könnte SAM68 insbesondere mit den Adapterdomänen der src-Kinase p59^{lyn} interagieren (Richard S. *et al.*, 1995; Fusaki N. *et al.*, 1997; Knoll M., Dissertation) und möglicherweise sowohl von src- wie auch von Syk-Kinasen phosphoryliert werden (Lang V. *et al.*, 1997). SAM68 konnte allerdings nicht im Komplex aus quervernetzten ZAP-70 und lck Δ K Molekülen nachgewiesen

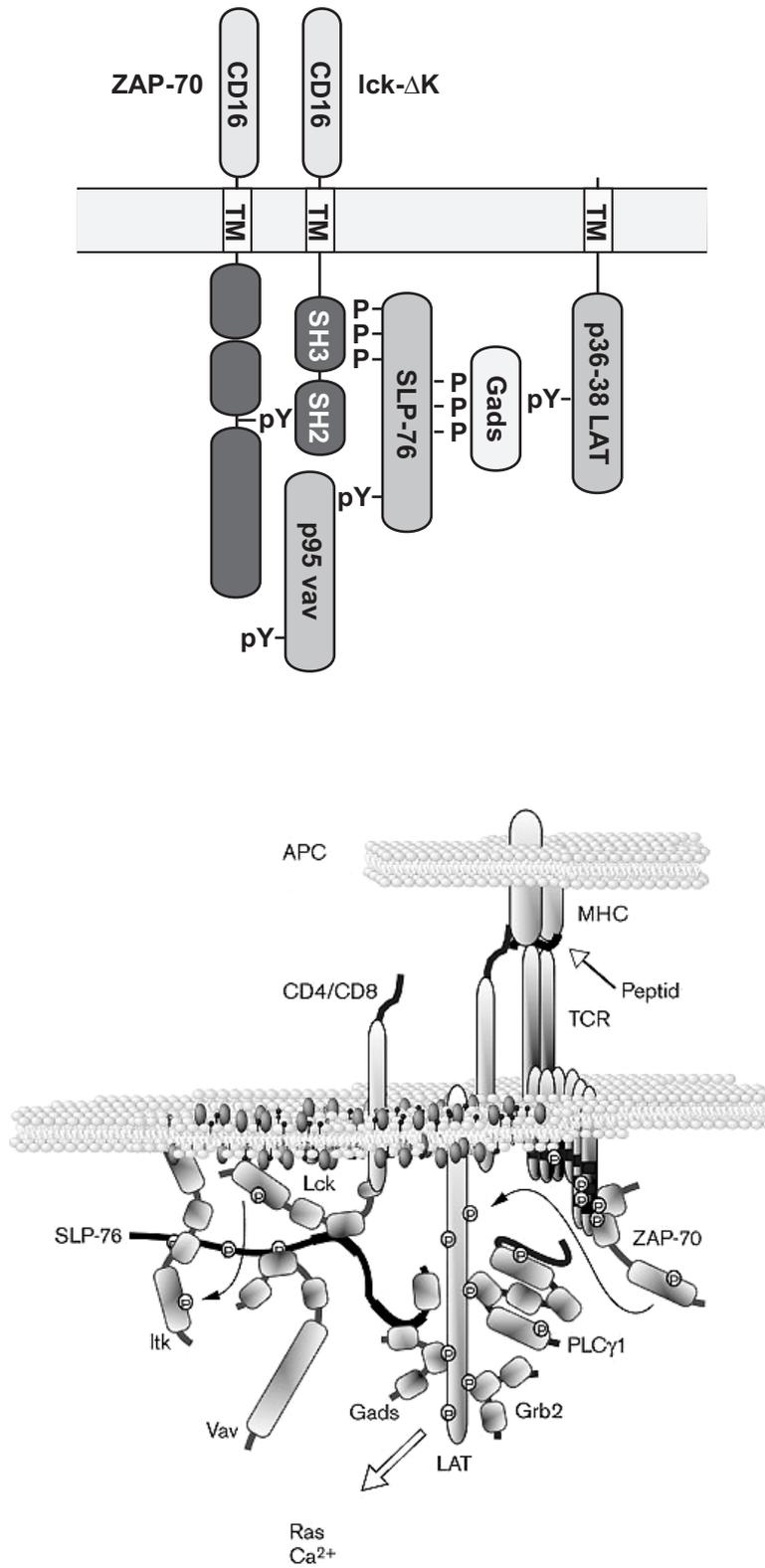


Abbildung 5.2: Vergleichende Darstellung der putativen Substrate des minimalen T-Zell-Rezeptor Signaltransduktionsapparates (oben) mit einem Modell des stimulierten TCR Komplexes (unten, adaptiert nach Kane L.P. *et al.*, 2000).

werden (Abbildung 4.4 und nicht gezeigte Ergebnisse). Weitere potentielle Liganden der SH2-Domäne von p56^{lck} sind unter anderem CD45 (Ng D.H. *et al.*, 1996), p56-62-Dok (Nemorin J.G. und Duplay P., 2000) und p45-Lad (Choi Y.B. *et al.*, 1999). Neben der Rekrutierung positiv-regulatorischer Proteine wurde die SH2-Domäne allerdings auch in die Negativregulation der TCR-gekoppelten Signaltransduktion impliziert, zum Beispiel durch die Rekrutierung der negativ-regulatorischen Tyrosinphosphatase SHP-1 (Germain R.N. und Stefanova I., 1999). Diese gegensätzlichen Funktionen der lck-SH2-Domäne könnten den kontextabhängigen Einfluß auf die im vorigen Abschnitt diskutierte funktionelle Kooperativität mit ZAP-70 bedingen. Die Regulation der Spezifität der SH2-Ligandenbindung könnte wiederum durch sekundäre Modifikationen erfolgen, beispielsweise durch Phosphorylierung von Serinresten in der N-terminalen Region von p56^{lck} (Joung I. *et al.*, 1995; Germain R.N. und Stefanova I., 1999). Weiter potentielle Liganden der SH3-Domäne von p56^{lck} sind neben SLP-76 unter anderem die regulatorische p85 Untereinheit der PI-3-Kinase (Vogel L.B. und Fujita D.J., 1993; Prasad K.V. *et al.*, 1993), LckBP1 (Takemoto Y. *et al.*, 1995) und CD2 (Bell G.M. *et al.*, 1996). Für diese alternativen Liganden ist allerdings kein Zusammenhang zu der Kooperativität zwischen der lck-SH3-Domäne und ZAP-70 zu erkennen.

Wie bereits erwähnt, wurden bisher drei potentielle Substrate von ZAP-70 von anderen Autoren vorgeschlagen: SLP-76, p95^{vav} und p36-38 LAT. Die hier geschilderte Strategie zur Identifikation potentieller Substrate, nämlich die der Reduktion des T-Zell-Rezeptor Signaltransduktionsapparates auf Quervernetzung von Kinase-inaktivem p56^{lck} mit ZAP-70 in JCaM1 Zellen, resultierte in der Detektion dreier Phosphoproteine mit den apparenten Molekulargewichten von 36 bis 38, 76, und 95 kD, die vermutlich den genannten Proteinen entsprechen. Auf einer definitiven Zuordnung dieser Phosphoproteine wurde verzichtet, da über eine unabhängige, im folgenden Abschnitt beschriebene Strategie ein bislang unvermutetes potentielles Substrat von ZAP-70 identifiziert werden konnte.

5.3.2 Substrate der konstitutiv aktiven ZAP YF-C Mutante

Ein zweiter Ansatzpunkt zur Identifikation funktionell relevanter ZAP-70 Substrate bot sich aufgrund der in Abschnitt 4.2 beschriebenen Charakterisierung einer konstitutiv aktiven ZAP-70 Variante. Die Überexpression von ZAP YC-F, in der die Tyrosinreste 597 und 598 der ZAP-70 Wildtypform gegen Phenylalanin substituiert sind, resultierte in einer signifikanten Induktion von NF-AT-Elementen in Abwesenheit exogener Stimuli, insbesondere ohne daß eine zusätzliche Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors notwendig gewesen wäre (Abbildung 4.7). ZAP YF-C war die einzige ZAP-70 Variante, welche in unseren Händen dieses Kriterium einer funktionell konstitutiv-aktiven Mutante erfüllen konnte und somit eine Entkopplung von anderen Tyrosinkinase erhoffen ließ, welche ebenfalls durch TCR Stimulation aktiviert werden. Hierzu muß allerdings einschränkend erwähnt werden, daß für die Ausprägung des konstitutiv aktiven Phänotyps von ZAP YF-C zumindest eine basale Aktivität der src-Kinase p56^{lck} nötig zu sein scheint. Es konnte

demnach aufgrund des experimentellen Ansatzes nicht differenziert werden, welche der nach Expression von ZAP YF-C zu beobachtenden Tyrosinphosphorylierungsereignisse aus der kooperativen Aktivität von ZAP YF-C und p56^{lck} resultierten oder welche der Phosphoproteinen direkte Substrate von ZAP YF-C darstellen könnten. Dennoch erschien es lohnenswert, mögliche Effektoren von ZAP YF-C zu identifizieren, um eventuell Anhaltspunkte für den Mechanismus der ZAP YF-C Aktivität in Abwesenheit von TCR Stimulation zu erhalten.

Die Expression von ZAP YF-C in Jurkat T-Zellen induzierte tatsächlich die Hyperphosphorylierung diverser zellulärer Proteine, insbesondere von Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von 21-23 kD, 36-38 kD, 56 kD, 70-80 kD, 95 kD und 150 kD (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.20). Mögliche Kandidaten für diese Phosphoproteine sind unter anderem erneut die genannten potentiellen Substrate von ZAP-70, nämlich SLP-76, p36-38 LAT und p95^{vav}. Darüber hinaus scheint der Phosphotyrosingehalt von ZAP YF-C deutlich höher zu sein als der anderer ZAP-70 Varianten (Abbildung 4.20). Einige dieser Phosphoproteine wurden nach ZAP YF-C Expression mit unterschiedlicher Intensität tyrosinphosphoryliert als nach antikörpervermittelter TCR Stimulation (Abbildung 4.17). So sind die Phosphoproteine mit 36-38 kD und mit 95 kD in Lysaten von ZAP YF-C exprimierenden Zellen mit relativ geringer Intensität detektierbar, während die Proteine von 21-23 kD und 150 kD im Vergleich zur TCR stimulierten Zellysaten deutlich hyperphosphoryliert vorliegen. Demnach sind diese Proteine möglicherweise spezifisch an der Vermittlung der konstitutiven Aktivität von ZAP YF-C beteiligt. Bei dem hochmolekularen Phosphoprotein p150 könnte es sich um PLC- γ handeln, deren Aktivität über Tyrosinphosphorylierung reguliert werden kann (Kim H.K. *et al.*, 1991). Während PLC- γ von p72^{Syk} sowie von src- und Tec-Kinasen direkt phosphoryliert zu werden scheint, ist bislang nicht geklärt, ob PLC- γ ein direktes Substrat von ZAP-70 darstellt (Law C.L. *et al.*, 1996; Williams B.L. *et al.*, 1999; Bunnell S.C. *et al.*, 2000). Ein konsistent nachweisbares, intensiv tyrosinphosphoryliertes Substrat nach ZAP YF-C Expression war p21-23, dessen mögliche Identität mit unterschiedlich phosphorylierten Formen der TCR- ζ Kette im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

Im Gegensatz zu ZAP YF-C induzierte die Expression der übrigen ZAP-70 Varianten keinerlei Tyrosinphosphorylierung zellulärer Protein mit Ausnahme ihrer selbst (Abbildung 4.17, Abbildung 4.19, Abbildung 4.20). Dies ist konsistent mit einer nicht-konstitutiven, von zusätzlicher exogener Stimulation abhängigen Hyperaktivität der Varianten Y492F und Y292F sowie mit publizierten Befunden anderer Autoren (Kong G. *et al.*, 1996; Zhao Q. *et al.*, 1996).

Zu der vorausgehend beschriebenen Strategie vergleichbar war ein Ansatz zur Identifikation potentieller ZAP-70 Substrate, welchen Wong *et al.* wählten. Durch Fusion der SH2-Domänen von ZAP-70 mit der p72^{Syk} Kinasedomäne wurde eine chimäre Kinase generiert, welche konstitutive funktionelle Aktivität in Jurkat Zellen aufwies. Wie im Fall von ZAP YF-C, war jedoch hierfür die Expression von p56^{lck} Voraussetzung (Wong J. *et al.*, 1998). Die Expression der Chimäre resultierte in einer konstitutiven Phosphorylierung der bereits bekannten ZAP-70 Substrate p36-38, SLP-76 und vav. Da die Kinasedomäne jedoch entscheidend zur Spezifität der ZAP/Syk Chimäre beitragen könnte, repräsentiert die

Phosphorylierung dieser Substrate möglicherweise eher die Aktivität von p72^{Syk} als die von ZAP-70. Phosphoproteine unterhalb von 30 kD wurden in dieser Studie nicht beschrieben. Es erscheint demgegenüber weniger wahrscheinlich, wenn auch nicht auszuschließen, daß eine vergleichsweise konservierende Mutation wie die zweier Tyrosinreste zu Phenylalanin in einer Änderung der Substratspezifität der ZAP YF-C Variante resultieren könnte.

5.3.3 Phosphorylierung der TCR- ζ -Kette in Abhängigkeit von ZAP-70: Ein potentieller Mechanismus zur Signalamplifikation durch positive Rückkopplung

Wie eben beschrieben und in Abbildung 4.17 dargestellt, resultierte die Expression der konstitutiv-aktiven ZAP-70 Variante YF-C in Jurkat T-Zellen in einer Hyperphosphorylierung von Proteinen mit 21 und 23 kD apparentem Molekulargewicht. Als einziges bislang in der Literatur beschriebenes Phosphoprotein dieser Größe war die TCR- ζ Kette ein offensichtlicher Kandidat für beide Proteinbanden im anti-Phosphotyrosin Westernblot. Differentielle Phosphorylierung der TCR- ζ Kette an Tyrosinresten der drei vorhandenen ITAMs ist verantwortlich für das unterschiedliche Laufverhalten in denaturierender Gelelektrophorese (Kersh E.N. *et al.*, 1998). Interessanterweise ist der Phosphorylierungsgrad der TCR- ζ Kette eng korreliert mit dem aktivierenden Potential einer T-Zell-Rezeptor Stimulation durch Peptid-Antigen: während Stimulation mit antagonistischen oder partiell agonistischen Peptiden zu einer unvollständigen Phosphorylierung der ζ -Kette zur p21 Form führt, resultiert die Stimulation mit agonistischen, mitogenen TCR Liganden in der extensiven Phosphorylierung der ζ -Kette zur p23 Form (Sloan-Lancaster J. *et al.*, 1994; Madrenas J. *et al.*, 1995). Der Mechanismus dieser differentiellen Phosphorylierung wurde als unterschiedlich effiziente Rekrutierung von CD4-assoziierten p56^{lck} Molekülen in die Proximität des TCR Komplexes interpretiert (Madrenas J. *et al.*, 1997). Die differentiell phosphorylierten TCR- ζ Ketten könnten alternative intrazelluläre Liganden aufweisen, welche stimulatorische oder inhibitorische Signaltransduktion zur Folge haben (Kersh E.N. *et al.*, 1999; Love P.E. und Shores E.W., 2000). Da die p21 Form offenbar hauptsächlich monophosphoylierte ITAMs enthält, die p23 Form jedoch an beiden Tyrosinresten phosphoryliert zu sein scheint, sollte nur die p23 Isoform beide SH2-Domänen von ZAP-70 binden können. Möglicherweise bewirkt somit erst dieser Komplex aus p23- ζ und ZAP-70 eine effiziente Aktivierung von stimulatorischen Signaltransduktionskaskaden (Kersh E.N. *et al.*, 1998). Die Induktion der p23 Form der TCR- ζ Kette nach Expression von ZAP YF-C würde demzufolge in Einklang stehen mit der zu beobachtenden konstitutiven Stimulation von NF-AT-Elementen (Abbildung 4.7).

Die Identität der durch ZAP YF-C Expression induzierten p21 und p23 Phosphoproteine mit den differentiell phosphorylierten Formen der TCR- ζ Kette wurde durch mehrere experimentelle Ansätze demonstriert:

1. Die p21 und p23 Phosphoproteine wurden durch Immunpräzipitation als Komponenten des T-Zell-Rezeptorkomplexes identifiziert (Abbildung 4.19);
2. Unter nicht reduzierenden Bedingungen migrieren die durch ZAP YF-C Expression induzierten, TCR-assoziierten Phosphoproteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 40 kD, wie von der über Disulfidbrücken dimerisierten TCR- ζ Kette zu erwarten ist (Abbildung 4.19, untere Darstellung);
3. Die p21 und p23 Phosphoproteine sind mit ZAP YF-C Fusionsproteinen copräzipitierbar (Abbildung 4.18);
4. Expression von ZAP YF-C induziert die Tyrosinphosphorylierung eines Fusionsproteins der TCR- ζ Kette (Abbildung 4.20).

Zusammengenommen identifizieren diese Befunde zweifelsfrei die TCR- ζ Kette als eines der tyrosinphosphorylierten Proteine nach Expression der ZAP YF-C Variante. Es ist wegen der oben erwähnten Befunden anderer Labore anzunehmen, daß die Phosphorylierung der TCR- ζ Kette entscheidenden Anteil an der Ausprägung des funktionell hyperaktiven Phänotyps der ZAP YF-C Variante hat (Abschnitt 5.2.1 und Abbildung 5.1). Konsistent mit dieser Interpretation ist die fehlende funktionelle Aktivität von ZAP YF-C in T3.5 Jurkat T-Zellen, welche keine T-Zell-Rezeptor Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren (Abbildung 4.12). Allerdings ließ sich durch Expression von transmembranen TCR- ζ Fusionsproteinen in T3.5 Jurkat T-Zellen die Hyperaktivität der ZAP YF-C Variante nicht rekonstituieren (nicht gezeigt). Möglicherweise sind hierfür weitere Komponenten des T-Zell-Rezeptors essentiell, falls der T3.5 Zelltyp nicht bislang uncharakterisierte Unterschiede zu parentalen Jurkat Zellen aufweist.

Wie bereits ausgeführt, lag es in der Natur des experimentellen Ansatzes, daß keine eindeutige Diskriminierung zwischen einer direkten Phosphorylierung durch ZAP YF-C oder einer indirekten Phosphorylierung durch sekundäre, von ZAP YF-C aktivierte Kinasen möglich war. Als wesentliche Kinasen, welche nach TCR-Stimulation Tyrosinreste in den ITAMs der TCR- ζ Kette phosphorylieren können, wurde bislang die src-Kinasen p56^{lck} und p59^{fyn} impliziert (Iwashima M. *et al.*, 1994; van Leeuwen J.E. und Samelson L.E., 1999). Indizien für alternative Kinasen der TCR ITAMs sind zwar von mehreren Autoren beobachtet worden, jedoch wurden bislang die ITAMs der ζ -Kette nie als direkte Substrate von ZAP-70 impliziert (Chu D.H. *et al.*, 1996; Sunder-Plassmann *et al.*, 1997; Pao L.I. und Cambier J.C., 1997; Ashe J.M. *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist die katalytische Aktivität von ZAP-70 und Syk gegenüber von Tyrosinresten der ITAMs *in vitro* nur sehr gering und auch im Fall von ZAP YF-C nicht erhöht (nicht gezeigt; Isakov N. *et al.*, 1996). Es wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit intensiv untersucht, ob ZAP YF-C möglicherweise eine effizientere Rekrutierung von p56^{lck} ermöglicht als die Wildtypform von ZAP-70, und dies die mechanistische Grundlage der verstärkten TCR- ζ Phosphorylierung und damit eventuell auch der funktionellen

Hyperaktivität ist (Abbildung 5.1; Szenario 1). Leider konnte mit den zu Verfügung stehenden Reagenzien die Interaktion der beiden Kinasen nicht bestätigt werden, weder für die Wildtypform noch für die YF-C Variante von ZAP-70 (nicht gezeigt). Dennoch scheint die Kooperativität zwischen ZAP-70 und p56^{lck} wichtig für die Phosphorylierung der TCR- ζ Kette zur p23-Form zu sein (Madrenas J. *et al.*, 1997), was konsistent ist mit der fehlenden Aktivität der ZAP YF-C Mutante in der lck-defizienten JCaM1 Zelllinie (Abbildung 4.13). Da die analoge YF-C Variante von p72^{Syk} allerdings unabhängig von der lck-Expression einen funktionell aktiveren Phänotyp aufweist als die Syk Wildtypform, könnte p56^{lck} in diesem Fall nur eine indirekte Rolle spielen (Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15). Vorausgesetzt die Hyperaktivität von ZAP YF-C und Syk YF-C beruht auf dem gleichen Prinzip, wäre der eigentliche Mechanismus der Hyperfunktionalität der YF-C Varianten somit lck-unabhängig. Alternativ zu der verstärkten Rekrutierung eines positiv-regulatorischen Faktors - wie der von p56^{lck} - könnte der Effekt der ZAP YF-C Expression auf die Phosphorylierung der TCR- ζ Kette auch auf der verminderten Aktivität eines inhibitorischen Faktors beruhen, beispielsweise auf der Sequestrierung einer putativen, Phosphatase, welche den Phosphotyrosingehalt der TCR- ζ Kette regulieren würde (Abbildung 5.1; Szenario 2). Die Identität einer Phosphatase, welche ITAMs zu dephosphorylieren vermag, ist jedoch bislang nicht geklärt. In jüngster Zeit wurden allerdings Modelle beschrieben, nach denen der initiale Schritt zur Aktivierung von src-Kinasen die Dephosphorylierung eines als p85/cbp/PAG bezeichneten Proteins ist, welches die Membranlokalisierung der negativ-regulatorischen Kinase csk vermittelt (Kawabuchi M. *et al.*, 2000; Brdicka T. *et al.*, 2000). Durch diese und andere Befunde sind Tyrosinphosphatasen als wichtige proximale Komponenten zur Regulation von T-Zell Aktivierung diskutiert worden (Gjorloff-Wingren A. *et al.*, 2000).

Obwohl also zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Differenzierung zwischen den verschiedenen potentiellen Mechanismen möglich ist, welche zur Hyperphosphorylierung der TCR- ζ Kette nach Expression von ZAP YF-C führen, suggerieren die hier diskutierten Befunde dennoch, daß der Phosphotyrosingehalt der TCR- ζ Kette eine mittelbare oder unmittelbare Funktion der Aktivität von ZAP-70 ist. Offenbar existiert ein bislang nicht dokumentierter Rückkopplungsmechanismus zwischen ZAP-70 und der TCR- ζ Kette, welche entscheidend zur Amplifikation der T-Zell-Rezeptor gekoppelten Signaltransduktion beitragen könnte. Diese putative Rückkopplungsschleife ist in Abbildung 5.3 als Ergänzung des einleitend erwähnten Modells von Chan und Shaw dargestellt. Dabei ist von Bedeutung, daß eine Stimulation der ITAM Phosphorylierung nicht nur durch ZAP YF-C in unstimulierten Zellen, sondern auch durch Überexpression der Wildtypform von ZAP-70 in aktivierten Zellen zu beobachten war (Abbildung 4.19). Die YF-C Mutation scheint demnach in unstimulierten Zellen einen Mechanismus zu induzieren, der für die Wildtypform von ZAP-70 als amplifizierendes Signal nach Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors relevant sein könnte. Konsistent mit dieser Interpretation sind die Befunde von Ashe *et al.*, wonach ZAP-70 die Phosphorylierung von ITAMs in Thymozyten verstärken kann, in denen src-Kinaseaktivität limitierend ist (Ashe J.M. *et al.*, 1999).

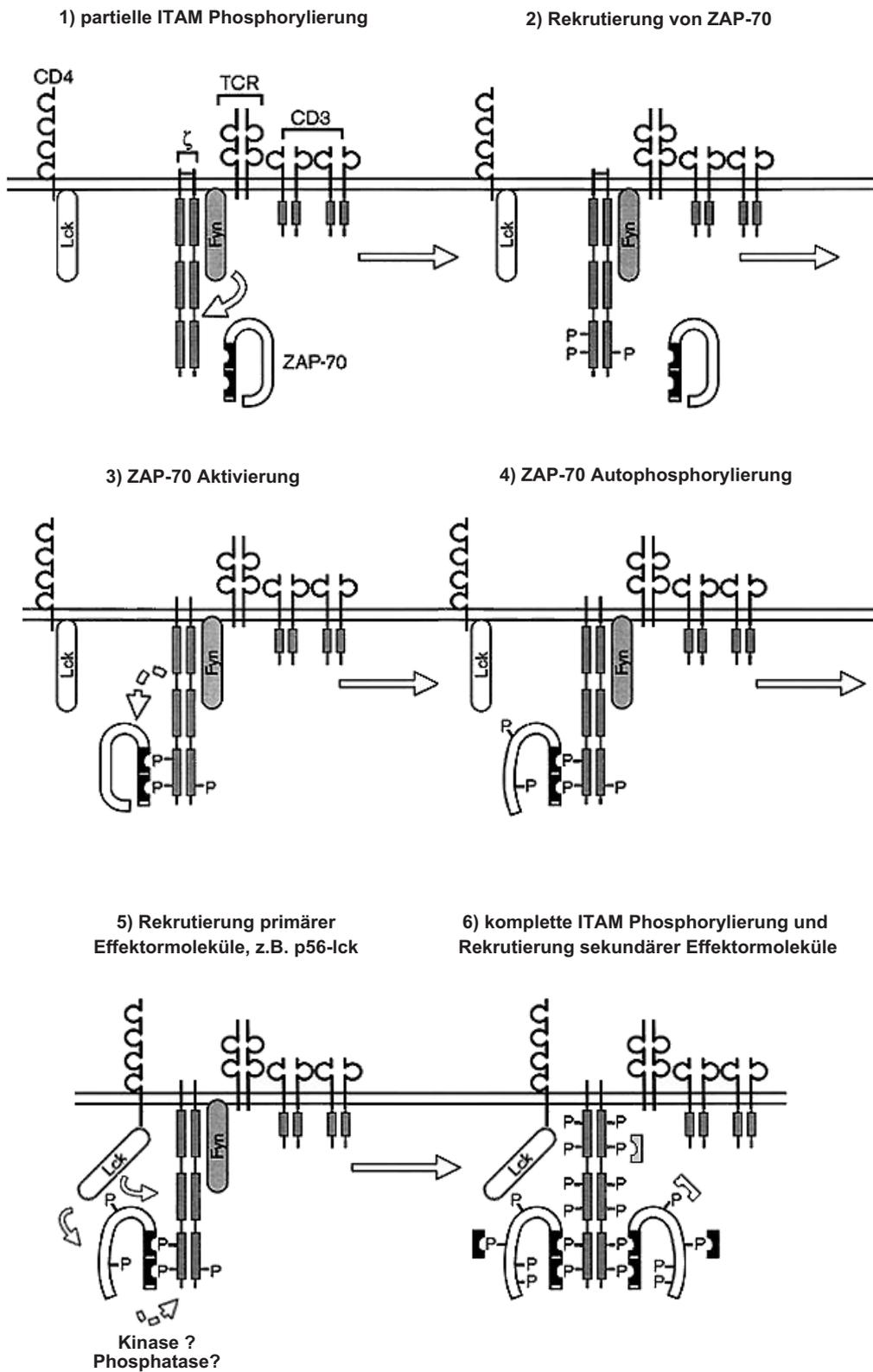


Abbildung 5.3: Erweitertes Modell proximaler Signaltransduktionsereignisse nach TCR-Stimulation (modifiziert nach Chan A.C. und Shaw A.S., 1995; vergleiche Abbildung 2.2).

Zusammenfassend lassen die vorausgehend diskutierten Befunde auf drei neue Prinzipien der Regulation proximaler Signaltransduktionsereignisse nach T-Zell-Rezeptor Stimulation schließen:

1. Die Proximität zu potentiellen Substraten scheint - neben der Rekrutierung an die Plasmamembran und der Stimulation der katalytischen Aktivität - ein bedeutender Mechanismus zur Regulation der funktionellen Aktivität von ZAP-70 zu sein.
2. Die SH3-Domäne von p56^{lck} könnte wesentlichen Anteil an der Rekrutierung potentieller Substrate haben.
3. Der Carboxyterminus von ZAP-70 enthält regulatorisches Potential, welches möglicherweise über eine Phosphorylierung der Tyrosinreste 597 und 598 reguliert wird.
4. ZAP-70 und die TCR- ζ Kette sind Bestandteile einer positiv-regulatorischen Rückkopplungsschleife, mittels derer wenige aktivierte TCR-Moleküle eine effiziente Stimulation von Signaltransduktion bewirken könnten.

5.4 Ausblick

Unklar bleibt vor allem der Mechanismus der Aktivitätsmodulation durch den Carboxyterminus von ZAP-70 und p72^{Syk}. Bislang konnte beispielsweise nicht dokumentiert werden, auf welche Weise die Expression eine Hyperphosphorylierung der TCR- ζ -Kette induziert. Lohnenswert erscheint unter anderem, die Position des Tyrosinrestes zu bestimmen, welcher vermutlich durch Autophosphorylierung in TCR- ζ -gebundenen ZAP YF-C Molekülen hyperphosphoryliert wird (Thomas Knorr, nicht publizierte Ergebnisse). Außerdem könnte detaillierter als bislang die molekularen und strukturellen Erfordernisse bestimmt werden, welche Voraussetzung für die Ausprägung des hyperaktiven Phänotyps der YF-C Varianten sind, beispielsweise in TCR-defizienten T-Zellen. Wünschenswert wäre in diesem Kontext weiterhin eine Evaluierung der physiologischen Relevanz dieses Regulationspotentials, z.B. durch Generierung transgener Organismen.

6 Ergebnisse zu ACP33

Wie bereits einleitend erwähnt, wurde ACP33 mittels der *Two-Hybrid*-Technik als ein Protein identifiziert, welches potentiell mit der zytoplasmatischen Domäne von CD4 interagiert. Da es sich um ein bislang unbekanntes Molekül handelte, wurden zunächst grundlegende Sequenz-, Expressions- und Lokalisationsanalysen durchgeführt (Abschnitt 6.1, 6.2 und 6.4). Weiterhin gaben Copräzipitationsexperimente und Mutationsanalysen Aufschluß über Sequenzmotive in ACP33 und CD4, welche für eine stabile Interaktion beider Proteine essentiell sind (Abschnitt 6.3). In T-Zell Aktivierungsstudien konnten außerdem Evidenzen für eine funktionelle Wechselwirkung beider Proteine gefunden werden (Abschnitt 6.5 und 6.6).

6.1 Sequenzanalyse der ACP33 cDNA

Bereits im Vorfeld der hier dokumentierten Analysen wurde bestätigt, daß der ursprünglich mittels *Two-Hybrid*-Technik klonierte Abschnitt der ACP33 cDNA den gesamten offenen Leserahmen enthält (Lutz Zeitlmann, Diplomarbeit). Die ACP33 cDNA wurde daraufhin in Zusammenarbeit mit Pinar Sirim mehrfach überlappend sequenziert. In Abbildung 6.1 ist der dabei erfaßte Teil der cDNA Sequenz dargestellt und im Bereich des offenen Leserahmens in eine theoretische Aminosäuresequenz übersetzt. Wahrscheinlich ist die uns bekannte cDNA Sequenz am 5'-Ende unvollständig, da die ACP33 mRNA im Northernblot eine Länge von etwa 2 kb aufweist (Waldemar Kolanus, persönliche Mitteilung).

Seit Mai 2000 existiert ein cDNA Sequenzeintrag in der NIH *Genbank*, welcher im translatierten Bereich zu ACP33 identisch ist. Da die entsprechende cDNA aus menschlichem Knochenmark isoliert wurde, bezeichneten die Autoren das putative Produkt als BM-19. Die Zugangsnummer dieses Genbankeintrags ist AF208861 auf Nukleinsäureebene und AAF64275 auf Proteinebene. Weiterhin wird die in unserem Labor ermittelte cDNA Sequenz bestätigt durch den Sequenzeintrag THC326268 der HGI-Sequenzdatenbank (*Human Gene Index*) des Instituts für genomische Forschung (TIGR) in Rockville, Maryland. Die Sequenzeinträge dieser Datenbank stellen automatisch generierte Konsensussequenzen aus überlappenden ESTs dar, welche oft von mehreren cDNA Bibliotheken stammen. Aus diesem Grund gibt dieser Sequenzeintrag Aufschluß über die Gewebsverteilung der ACP33 Expression (siehe Abschnitt 6.2).

6.1.1 Sequenzmotive auf Aminosäure-Ebene

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des ACP33 Proteins wurde mit Hilfe verschiedener, im UW-GCG Paket erhaltener Programme analysiert. Das rechnerische Molekulargewicht wurde mit Hilfe des Programms PEPTIDESORT ermittelt und liegt bei 34,96 kD. Mittels des Programms MOTIFS wurden die ACP33 Aminosäuresequenz nach bekannten Sequenzmotiven durchsucht. Neben mehreren potentiellen Phosphorylierungsstellen der Serin/Threonin Kinasen Casein Kinase II (CK-2) und Protein Kinase C (PKC), weist ACP33 am Tyrosinrest 268 auch ein *bona fide* Phosphorylierungsmotiv für Tyrosinkinase auf. Das über Internet zugängliche Sequenzanalyseprogramm *Psort-II* (psort.nibb.ac.jp) untersucht ein Protein auf bekannte subzelluläre Lokalisationssignale wie einer putativen sekretorischen Signalsequenz, einer transmembraner Helix oder eines nukleären Lokalisationssignals. Innerhalb der ACP33 Sequenz wurde nach diesem Algorithmus kein Motiv identifiziert, welches als subzelluläres Lokalisationssignal interpretiert wurde. Als wahrscheinlichste subzelluläre Lokalisation von ACP33 ermittelte *Psort* demnach das Zytoplasma.

Zwei weitere auffällige Motive, welche jedoch von keinem Suchalgorithmus interpretierte wurden, sind zum einen ein Cluster von vier Aspartatresten, gefolgt von einem Serinrest (Aminosäuren 25 bis 29). Im Zusammenhang mit der Lokalisation bestimmter endosomaler Transportproteine im Endosomalen/Trans Golgi Netzwerk Kompartiment (Abschnitt 6.4) wurden derartige saure Cluster als Lokalisationsmotive beschrieben (siehe Diskussion). Zum anderen enthält ACP33 an Position 107 bis 111 ein Motiv der Sequenzfolge Glycin-X-Serin-X-Glycin (X steht für eine beliebige Aminosäure), welches unter anderem in manchen Serin Hydrolasen zu finden ist (Derewenda, Z.S., Derewenda, U., 1991).

6.1.2 Homologieanalyse

Um Homologieanalysen in Sequenzdatenbanken zu ermöglichen, wurden verschiedene Suchalgorithmen entwickelt, welche die Ähnlichkeit zweier Proteinsequenzen ermitteln und die Wahrscheinlichkeit einer nicht-zufälligen Übereinstimmung quantifizieren. Ein hoher Grad von Übereinstimmung beruht fast immer auf Homologie, daß heißt auf einer evolutionär bedingten Ähnlichkeit der Aminosäureabfolge, während eine geringe Übereinstimmung auch aus Konvergenz resultieren kann (Analogie).

Der Algorithmus *BLASTP* (Altschul S.F. *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov) wurde verwandt, um mit der Aminosäuresequenz von ACP33 die nicht-redundante Proteindatenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) nach homologen Sequenzeinträgen zu durchsuchen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Sept. 2000) wird von *BLASTP 2.0* lediglich ein Protein mit signifikanter Homologie zu ACP33 identifiziert, während drei weitere Sequenzeinträge eine relativ geringe, wenngleich überdurchschnittlich Ähnlichkeit zu ACP33 aufweisen:

NR Eintrag	Spezies	Name	E-Wert
CAB45970	<i>Arabidopsis th.</i>	Putatives Protein	5×10^{-58}
AAD39558	<i>Pseudomonas putida</i>	ähnlich zu Enol-Lacton Hydrolase	0,043
P22862	<i>Pseudomonas fluor.</i>	Aryl-Ester Hydrolase	0,057
AAB62292	<i>Pseudomonas putida</i>	HOMODA Hydrolase	0,057

Tabelle 6.1: **Einträge der NR-Proteindatenbank mit signifikanter Ähnlichkeit zu ACP33.** Der E-Wert bezeichnet die Anzahl der aufgrund der jeweiligen Ähnlichkeit zu erwartenden zufällig von *BLASTP 2.0* ermittelten Einträge, wobei ein Wert $<0,1$ als signifikant interpretiert wurde (Altschul *et al.*, 1997). HOMODA bezeichnet 2-Hydroxy-6-Oxo-7-Methylocta-2,4-Dienoate.

Wie in Tabelle 6.1 dargestellt, handelt sich es bei dem homologen Eintrag um ein putatives Protein unbekannter Funktion aus *Arabidopsis thaliana* mit der NIH *Genbank* Zugangsnummer CAB45970, dessen Aminosäuresequenz von automatischen Algorithmen aus genomischer DNA Sequenz vorhergesagt wurde (siehe: www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/proj_overview.html). Der *BLASTP* Algorithmus ermittelt für ACP33 und CAB45970 in einem Abschnitt von 267 Aminosäuren 120 identische Reste (44%) und 172 ähnliche Reste (63%). Somit erstreckt sich, wie in Abbildung 6.2 veranschaulicht, der zu CAB45970 homologe Bereich über die gesamte Länge des ACP33 Proteins. Zusätzlich dazu enthält CAB45970 aber einen nicht homologen, C-terminalen Anteil von 86 Aminosäuren, in dem interessanterweise eine transmembrane Domäne vom im vorausgehenden Abschnitt erwähnten Sequenzanalyseprogramm *Psort-II* prognostiziert wird.

Neben dem homologen putativen Protein aus *Arabidopsis*, ermittelte *BLASTP* drei weitere Einträge mit überdurchschnittlicher Sequenzähnlichkeit zu ACP33. Die zu ACP33 homologe Region beschränkt sich allerdings in allen drei Fällen auf einen Bereich von etwa 100 Aminosäuren in der Umgebung des Serinrests 109 von ACP33, welcher das erwähnte G-X-S-X-G Motiv einschließt (Abbildung 6.3). Bei den genannten Sequenzeinträgen handelt es sich jeweils um Hydrolasen aus *Pseudomonas putida* oder *fluorescens*, die in den Abbau aromatischer oder epoxidähnlicher Substanzen involviert sind. Keines dieser Enzyme ist bisher intensiv charakterisiert worden, lediglich für die Aryl-Ester-Hydrolase (P22862) wird anhand von Homologien zu verwandten Proteinen eine potentielle katalytische Triade vorgeschlagen, bei der ein konservierter Serinrest als Nukleophil, ein Aspartatrest als saure Gruppe und ein Histidinrest als Protonen Akzeptor fungiert.

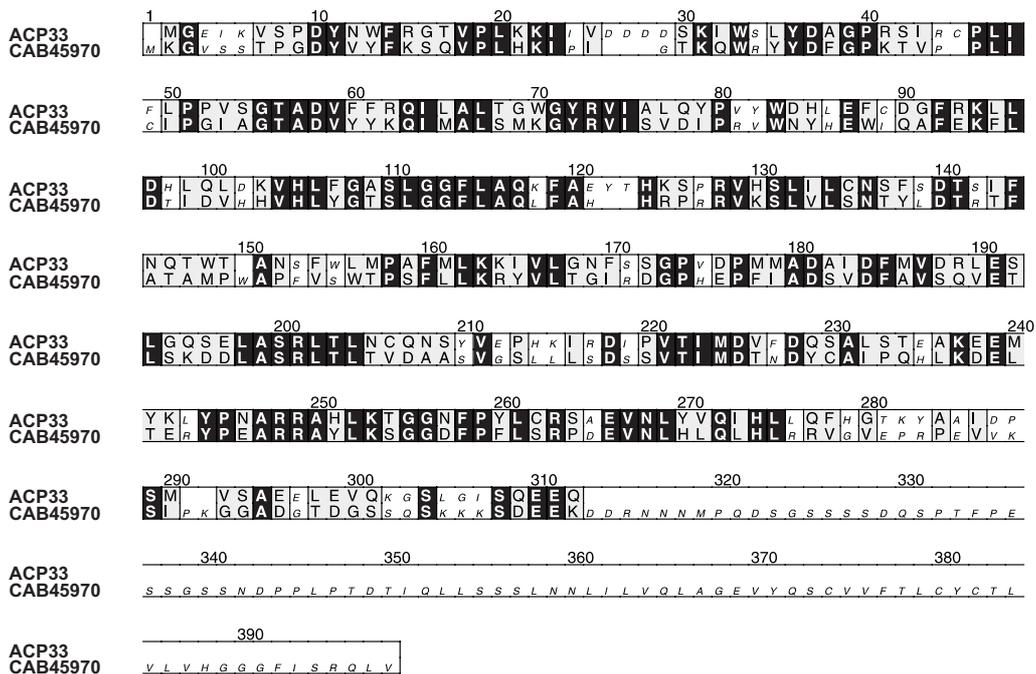


Abbildung 6.2: **Homologieabhängige Sequenzanordnung (alignment) von ACP33 und seinem Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (CAB45970).** Die Anordnung wurde mit dem Programm AMAS (barton.ebi.ac.uk) erstellt, welches identische Reste schwarz und ähnliche Reste grau unterlegt. Der homologe Bereich beider Proteine erstreckt sich über die gesamte Länge des ACP33 Proteins, wobei CAB45970 eine C-terminale Extension von 85 Aminosäuren ausweist.

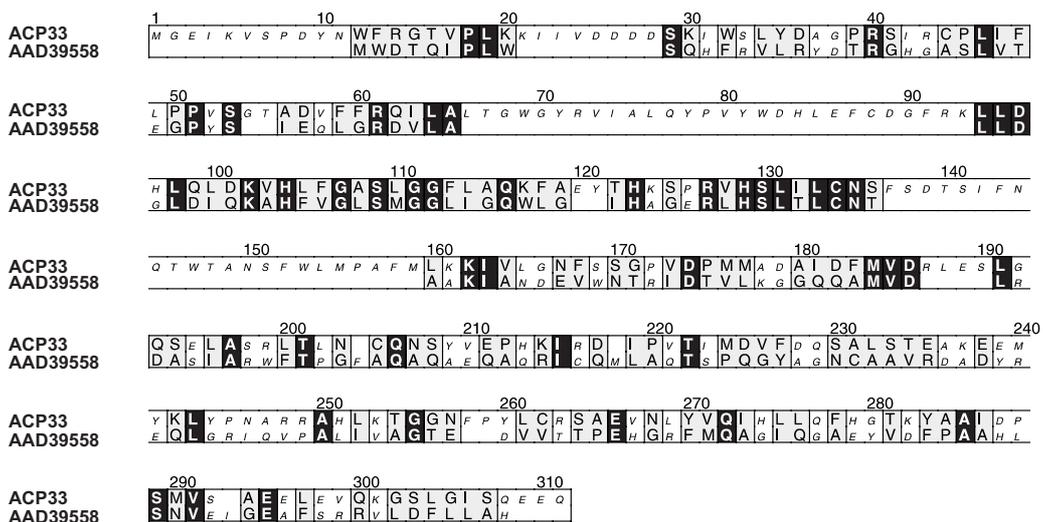


Abbildung 6.3: **Homologieabhängige Sequenzanordnung von ACP33 und einer putativen Hydrolase aus *Pseudomonas putida* (AAD39558).** Die Bereich mit signifikanter Ähnlichkeit beschränkt sich im wesentlichen auf etwa 90 Aminosäuren in Umgebung des ACP33 Serinrests 109 (Methodik siehe Abbildung 6.2).

Alle Hydrolasen mit Ähnlichkeit zu ACP33 sind wiederum untereinander auf Ebene der Aminosäuresequenz ähnlich (nicht gezeigt), was auf Zugehörigkeit zu einer strukturell verwandten Proteinfamilie schließen läßt. Über Internet sind mehrere Datenbanken von Konsensussequenzen strukturell ähnlicher Proteinfamilien und -domänen verfügbar, beispielsweise die *Pfam* Datenbank (Protein family; pfam.wustl.edu) oder die *PROSITE* Datenbank (www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html). Eine Homologieanalyse der Aminosäuresequenzen von ACP33 oder den vier ähnlichen Proteinen identifiziert in der *PROSITE* Datenbank jeweils das Profil PS50187 (*Esterase/lipase/thioesterase active site serine*) als signifikant ähnlich. Die *Pfam* Datenbank unterscheidet demgegenüber verschiedene Klassen von Hydrolasen aufgrund topologischer Gemeinsamkeiten. In Tabelle 6.2 sind Ergebnisse einer Homologieanalyse aller zu ACP33 ähnlichen Proteine gegen die Konsensussequenzen der *Pfam* Datenbank (Version 5.2) erfaßt und in Form der oben definierten E-Werte quantifiziert:

Suchsequenz	Pfam Eintrag	E-Wert
ACP33	abhydrolase (PF00561)	0,0016
CAB45970	abhydrolase (PF00561)	$1,6 \times 10^{-5}$
AAD39558	abhydrolase (PF00561)	$4,2 \times 10^{-27}$
P22862	abhydrolase (PF00561)	$6,1 \times 10^{-40}$
AAB62292	abhydrolase (PF00561)	2×10^{-17}

Tabelle 6.2: Alle bekannten ACP33-ähnlichen Proteine weisen signifikante Homologie zu dem *Pfam* Proteinfamilien Datenbank Eintrag PF00561 auf, der als α/β Hydrolase Strukturmotiv definiert ist. Der E-Wert wurde jeweils mit dem Algorithmus HMM (*Hidden Markov model*) ermittelt, wobei ein Wert $<0,05$ als signifikant interpretiert wurde (siehe: pfam.wustl.edu/help-scores.shtml).

Wie aus Tabelle 6.2 zu ersehen, weisen sowohl ACP33 als auch alle ähnlichen Proteine signifikante Homologie zum *Pfam* Eintrag PF00561 auf, der dem sogenannten α/β Hydrolase Strukturmotiv entspricht. Die entsprechende Proteinfamilie wurde 1992 von Ollis *et al.* aufgrund der topologischen Ähnlichkeit der Raumstruktur 5 verschiedener Hydrolasen definiert, welche trotz unterschiedlicher Substratspezifität und verschiedener nukleophiler Reste (Serin, Cystein und Aspartat) strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen (Ollis D.L. *et al.*, 1992). Eine neuere Definition (Nardini, M. und Dijkstra, B.W., 1999) fordert drei topologische Kriterien, nach denen ein Protein als Mitglied der α/β Hydrolase Strukturmotiv enthaltenden Proteinfamilie anzusehen ist:

- 1) Vorhandensein von mindestens 5 parallelen β -Faltblättern
- 2) Reihenfolge der Reste der katalytischen Triade ist Nukleophil – Saurer Rest – Histidin

- 3) Vorhandensein eines „Nukleophil-Ellenbogens“, bestehend aus einem Strang des β -Faltblattes, gefolgt von einer γ -ähnlichen Wende (*turn*), welche den Nukleophilen Rest enthält, gefolgt von einer α -Helix.

Gemäß dieser engen Definition ist eine definitive Zuordnung zur Proteinfamilie erst anhand der Raumstruktur eines Proteins möglich. Die *SCOP* Datenbank (*Structural classification of Proteins*, scop.mrc-lmb.cam.ac.uk), in der Proteine mit bekannter Raumstruktur aufgrund gemeinsamer topologischer Motive klassifiziert werden, enthält 17 Einträge mit dem Faltungsmotiv α/β Hydrolase, darunter verschiedene Proteasen, Peptidasen, Lipasen und Acteylcholinesterasen. Nach einer weitergefaßten Definition gruppiert die *Pfam* Datenbank allerdings Proteine auf Ebene ihrer Aminosäuresequenz als Mitglieder des PF00561 Profils, und zwar aufgrund ihrer hoch signifikanten Homologie zu α/β Hydrolase Strukturmotiv enthaltenden Proteinen mit bekannter Raumstruktur. Wie aus Tabelle 6.2 zu ersehen, ermittelt der *HMM*-Algorithmus für ACP33 einen signifikanten, aber im - Vergleich zu den bakteriellen Hydrolasen - relativ geringen E-Wert für das PF00561 Profil.

Es ist demzufolge aus Homologieanalysen nicht eindeutig ableitbar, ob ACP33 ein α/β Hydrolase Strukturmotiv enthält oder sogar hydrolytische Aktivität besitzt. In diesem Zusammenhang kann allerdings eine Sekundärstrukturvorhersage weitere Hinweise liefern, da das α/β Hydrolase Strukturmotiv die oben erwähnten topologischen Restriktionen impliziert.

6.1.3 Sekundärstrukturvorhersage

Mit einer homologieabhängigen Sequenzanordnung (*alignment*) mehrerer verwandter Proteine läßt sich eine relativ aussagekräftige Vorhersage der Sekundärstruktur beider Protein erzielen. Verschiedene Algorithmen sind hierfür entwickelt worden, z.B. *PREDATOR* (www.embl-heidelberg.de/predator/predator_info.html) und *Jpred-2* (barton.ebi.ac.uk). In Abbildung 6.4 ist das Resultat einer *Jpred-2* Vorhersage der Sekundärstruktur für ACP33 und seinem Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (CAB45970) dargestellt. Interessanterweise wird für die Region um den ACP33 Serinrest 109 tatsächlich eine Topologie prognostiziert, welche der eines „Nukleophil-Ellenbogens“ von α/β Hydrolase-ähnlichen Proteinen entspricht. Auch die Zusammensetzung des Gesamtproteins aus 8 β -Faltblättern, welche sich in der zentralen Region mit α -Helices abwechseln, erinnert an die Topologie des kanonischen α/β Hydrolase Strukturmotivs (Nardini, M. und Dijkstra, B.W., 1999; Heikinheimo, P. *et al.*, 1999).

Die Resultate der Homologieanalysen und der Sekundärstrukturvorhersage deuten deshalb darauf hin, daß ACP33 strukturell verwandt zur Familie der α/β Hydrolase-ähnlichen Proteine sein könnte. Dem Serinrest 109 von ACP33 käme hierbei besondere Bedeutung zu, da er im putativen Zentrum der Bindungstasche von ACP33 liegen würde und so als nukleophiler Rest fungieren sollte, falls ACP33 katalytische Aktivität beinhaltet.

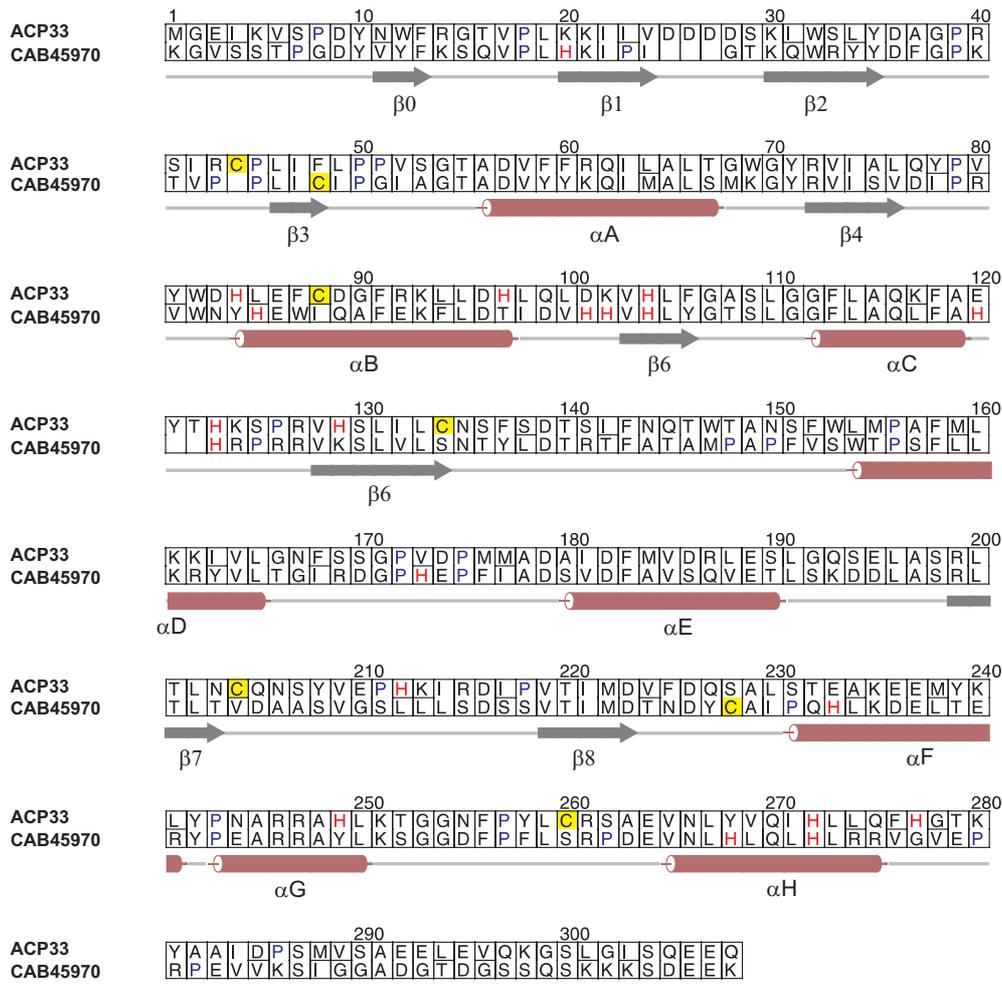


Abbildung 6.4: Sekundärstrukturvorhersage der ACP33 und CAB45970 Proteine mittels des Programms *Jpred-2*. Regionen mit putativer β -Faltblatt Topologie sind als Pfeile unterhalb der Sequenzanordnung dargestellt, putative α -Helices als Zylinder. Die Benennung der Sekundärstruktur Elemente erfolgte in Anlehnung an das kanonische α/β Hydrolase Strukturmotiv (Nardini, M. und Dijkstra, B.W., 1999).

6.2 Expressionsanalysen

Auf mRNA Ebene war sowohl durch Northernblotanalyse (W. Kolanus, persönliche Mitteilung) als auch aus der Dokumentation von ACP33 EST-Sequenzen in Sequenzdatenbanken eine ubiquitäre Gewebsverteilung des ACP33 Transkripts ermittelt worden. Diese sollte nun anhand von Westernblotanalysen auf Proteinebene verifiziert werden. Grundlegendes Hilfsmittel für die Detektion des endogenen ACP33 Proteins war ein monoklonaler Antikörper, mAb 2D5, der im ELISA und Westernblot spezifisch mit rekombinanten ACP33 Fusionsproteinen interagierte, nämlich mit bakteriell exprimierten MBP bzw. GST-Fusionen (Elisabeth Kremmer und Pinar Sirim, persönliche Mitteilung).

6.2.1 Expressionsmuster des endogenen ACP33 Proteins

In Abbildung 6.5 ist dargestellt, daß durch mAb 2D5 in Lysaten diverser Zelllinien im wesentlichen eine 33 kD Proteinbande detektiert wird, die vermutlich dem endogenen ACP33 Protein entspricht. Wie in Abschnitt 6.1.1 erwähnt, weist ACP33 ein rechnerisches Molekulargewicht von 34,96 kD auf. Die verwendeten Zellysate stammten von humanen, murinen bzw. Affen-Zelllinien mit lymphoidem, endothelialelem bzw. fibroblastoidem Ursprung, wodurch die ubiquitäre Expression des ACP33 Proteins bestätigt werden konnte.

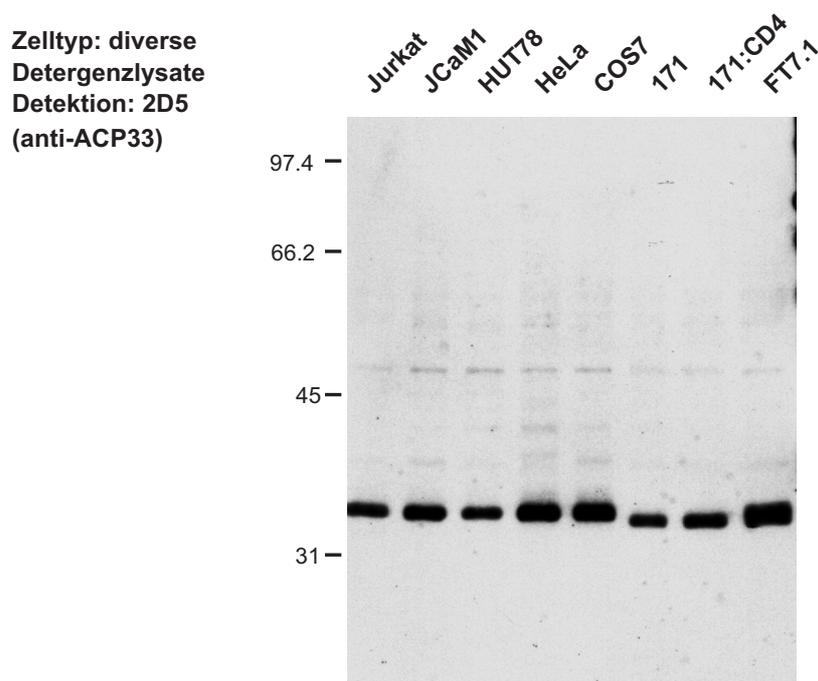


Abbildung 6.5: **Expressionsanalyse des endogenen ACP33 Proteins mittels Westernblot.** Zelllinien diversen Ursprungs wurden in 1 % SDS lysiert, auf einem 10 %-igem PAA Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers mAb 2D5, der gegen ACP33 gerichtet ist. Jurkat, JCaM1 und HUT78 sind humane T-Zelllinien, HeLa sind humane epitheloide Zellen, COS7 sind fibroblastoide Zellen aus der grünen Meerkatze, 171 ist eine murine T-lymphoide Zelllinie und FT7.1 ist ein murines L-Zellen Derivat (siehe Abschnitt 6.5.1).

Die Sequenz des murinen ACP33 Proteins ist bisher unbekannt, kann aber für die gesamte Länge des offenen Leserahmens durch mehrfach überlappende EST-Sequenzen nahezu vollständig abgeleitet werden. Die Aminosäuresequenzen von murinem und humanem ACP33 Protein sind im so ermittelbaren Bereich zu 98% identisch, wodurch die Kreuzreaktivität des anti-ACP33 Antikörpers erklärbar ist.

Das ubiquitäre Expressionsmuster des ACP33 Proteins deutet auf die Existenz weiterer Interaktionspartner neben der zytoplasmatischen Domäne von CD4 hin. Wie aus Vorarbeiten zu den hier dokumentierten Analysen bekannt war, scheint ACP33 bestimmte hydrophobe,

C-terminale Determinanten von Proteinen zu binden. Experimentell wurde jedoch lediglich CD4 als ein Modelligand für ACP33 untersucht.

6.2.2 Expression von ACP33-Fusionsproteinen

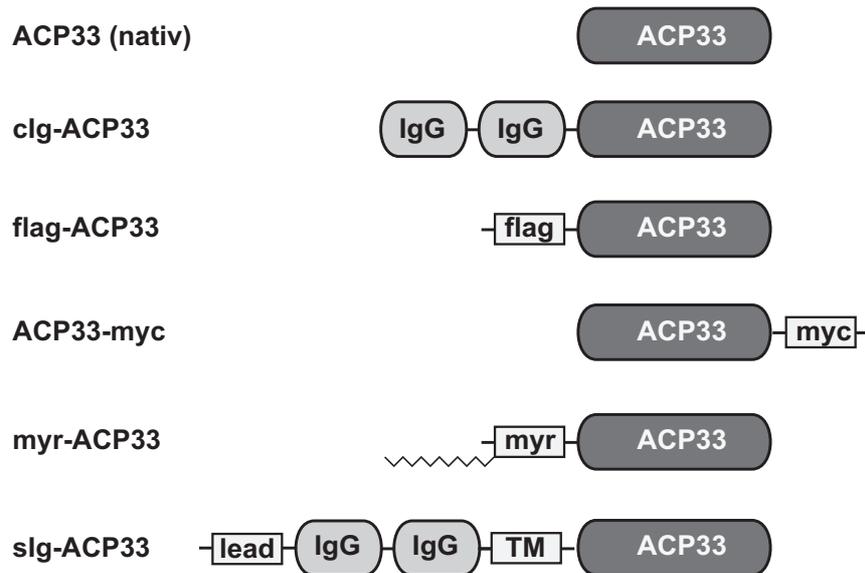
Im Folgenden wurde die Spezifität des gegen ACP33 gerichteten monoklonalen Antikörpers mAb 2D5 anhand der Reaktivität mit mehreren N- und C-terminalen Fusionsproteinen von ACP33 dokumentiert. Hierzu wurden Jurkat T-Zellen mittels Elektroporation transient mit Expressionskonstrukten für die - schematisch in Abbildung 6.6 dargestellten - ACP33-Fusionsproteine transfiziert und Detergenzlysate der Zellen im Westernblot analysiert. Der anti-ACP33 Antikörper detektierte nicht nur endogenes ACP33 bei einem apparenten Molekulargewicht von 33 kD, sondern auch cIg-ACP33 (64 kD), flag-ACP33 (34 kD), ACP33-myc (35 kD), myr-ACP33 (33 kD) und sIg-ACP33 (70 kD). Auffallend sind hierbei Intensitätsdifferenzen zwischen den detektierten Banden, die vermutlich auf die unterschiedlich effiziente Expression der verschiedenen Fusionsproteine zurückzuführen ist. Besonders effizient ließ sich die cIg-ACP33 Chimäre exprimieren, flag-ACP33 und sIg-ACP33 sind mit mittlerer Intensität nachweisbar, während ACP33-myc, myr-ACP33 und natives ACP33 offenbar nur schwach exprimiert werden.

6.3 Enzymtest und Bindungsstudien

Aufgrund der deutlichen Ähnlichkeiten zwischen ACP33 und α/β Hydrolasen auf Ebene der Aminosäuresequenz und der putativer Topologie der Sekundärstruktur (siehe Abschnitt 6.1.3) besteht die Möglichkeit, daß ACP33 enzymatische Aktivität als Hydrolase besitzen könnte. Der Serinrest 109 in ACP33 sollte aufgrund dieser Ähnlichkeiten Bestandteil der katalytischen Triade sein, welche die hydrolytische Aktivität vermittelt. Mutationsanalysen demonstrierten jedoch, daß der Serinrest 109 in ACP für eine stabile Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von CD4 essentiell ist, also vermutlich Teil einer Interaktionsdomäne ist.

6.3.1 Hydrolaseaktivitätsassay

Anhand der Homologieanalysen war es nicht möglich, Vorhersagen über die Natur eines bevorzugten Substrats des putativ katalytisch aktiven ACP33 Proteins zu treffen, da Hydrolasen mit α/β Faltungseinheit diverse Substratspezifitäten aufweisen können. Aufgrund dessen wurde die hydrolytische Aktivität von rekombinantem bzw. durch Immunpräzipitation gereinigtem ACP33 mit einem promiskuen Substrat, p-Nitrophenylbutyrat, untersucht, welches für derartige Analysen häufig verwendet wird (Shirai, K. und Jackson, R.L., 1982; Puente, X.



Zelltyp: Jurkat T Zellen
 Detergenzlysate
 Detektion: 2D5 (anti-ACP33)

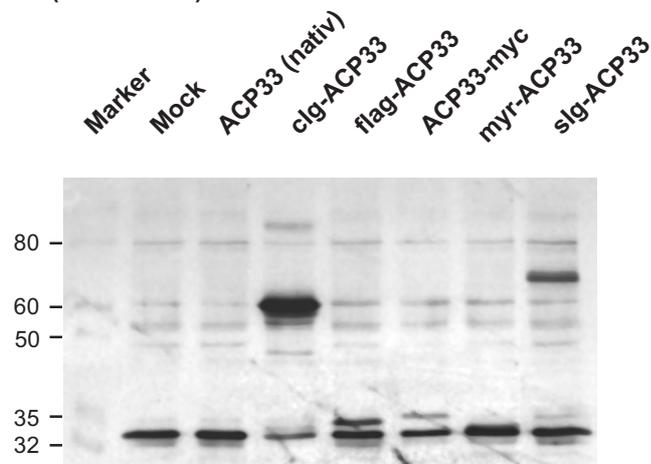


Abbildung 6.6: Expressionsanalyse verschiedener ACP33 Fusionsproteine in transient transfizierten Jurkat T-Zellen. Dargestellt sind schematisch die verwendeten chimären Proteine und ein Westernblot der entsprechenden Zellysate, der mit dem monoklonalen anti-ACP33 Antikörper mAb 2D5 detektiert wurde. Endogenes ACP33 wird in allen Lysaten als 33 kD Bande erkannt, die Fusionsproteine entsprechend ihren theoretisch zu erwartenden Molekulargewichten.

und Lopez-Otin, C., 1995). Durch hydrolytische Spaltung der Esterbindung in *p*-Nitrophenylbutyrat wird *p*-Nitrophenol freigesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Wie in Abbildung 6.7 dargestellt, konnte für keine der analysierten ACP33 Präparationen hydrolytische Aktivität gegen *p*-Nitrophenylbutyrat nachgewiesen

werden. Eingesetzt wurden die bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine in einer Konzentration von 1mM bzw. eine unbekannte Menge von Protein in Form von Immunpräzipitaten, in welchen die jeweils gereinigten Proteine im Westernblot nachweisbar waren (nicht gezeigt). Gereinigtes GST-ACP33 Fusionsprotein wurde von Pinar Sirim zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrolle wurden 1mM und 1 μ M Trypsin sowie Gesamtzelllysate analysiert, welche signifikante Aktivität gegen *p*-Nitrophenylbutyrat aufwiesen.

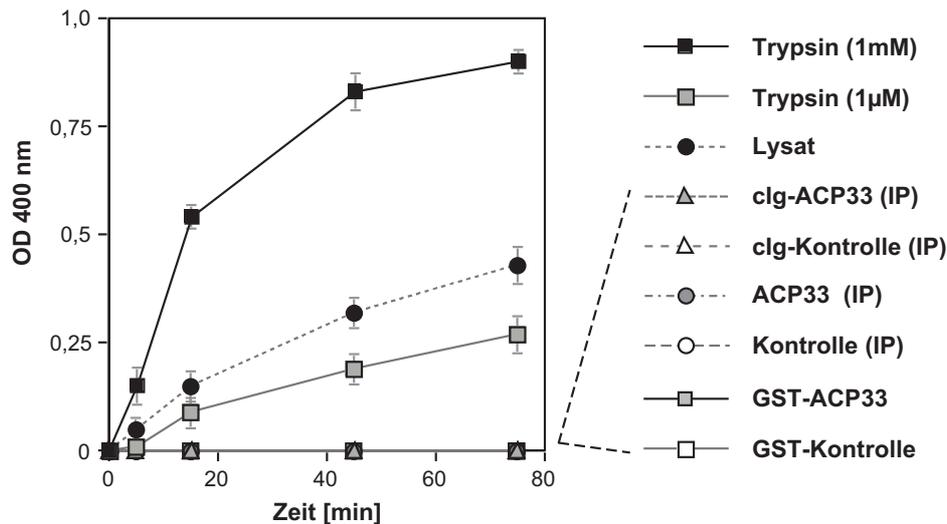


Abbildung 6.7: **Hydrolytische Freisetzung von *p*-Nitrophenol aus *p*-Nitrophenylbutyrat.** Im Gegensatz zu Trypsin und Gesamtzelllysate wies keine der gereinigten ACP33- bzw. Kontrollproteinpräparationen hydrolytische Aktivität gegen *p*-Nitrophenylbutyrat auf, welches als promiskues Substrat für Serinhydrolasen verwendet wird.

6.3.2 Copräzipitation von CD4 mit cIg-ACP33

Durch Copräzipitation sollte analysiert werden, ob ACP33 in lebenden Zellen stabil mit CD4 assoziieren kann. Zunächst wurde versucht, ACP33 zu präzipitieren und CD4 im Präzipitat nachzuweisen. Da der spezifische monoklonale Antikörper gegen ACP33, mAb 2D5, nur geringe Mengen des ACP33 Proteins präzipitiert (nicht gezeigt), wurde hierzu das cIg Fusionsprotein von ACP33 eingesetzt. Dieses Fusionsprotein wird in transient transfizierten T-Zellen effizient hergestellt (siehe Abschnitt 6.2.2), und kann aufgrund seines Ig-Anteils nahezu quantitativ an Protein-A präzipitiert werden. Als Modellsystem wurde eine lymphoblastoide T-Zelllinie, HUT78 gewählt, welche leicht zu transfizieren ist und relativ hohe Mengen an endogenem CD4 exprimiert. Durch Elektroporation wurden HUT78 T-Zellen transient mit Expressionsplasmiden für cIg-ACP33 transfiziert und nach 24 Stunden detergentenlysiert. Durch Zugabe von Protein A Sepharose wurde cIg-ACP33 bzw. ein cIg-Kontrollprotein (cIg7-poly) präzipitiert, in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Wie in Abbildung 6.8 zu erkennen, copräzipitiert endogenes CD4 mit cIg-ACP33 (Spur 1), aber nicht mit dem cIg-Kontrollprotein (Spur 2). Die Stöchiometrie der

Copräzipitation scheint allerdings gering zu sein, da die Menge an copräzipitierenden CD4 Molekülen nicht annähernd der entspricht, die im zehnten Teil des eingesetzten Gesamtzelllysates nachzuweisen war (Spur 3).

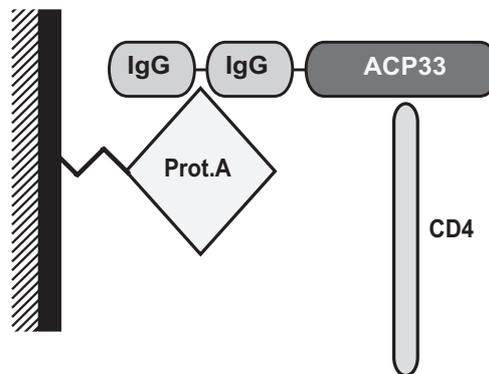
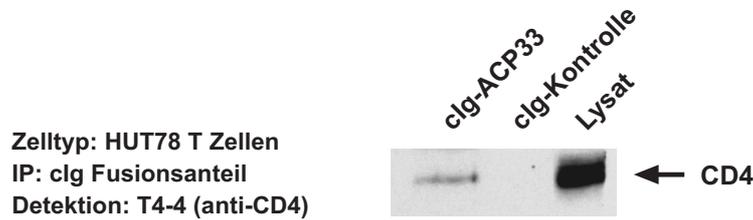


Abbildung 6.8: **Copräzipitation von endogenem CD4 mit clg-ACP33 aus transfizierten HUT78 T-Zellen.** Die clg-Fusionsproteine, clgACP33 bzw. clg-Kontrollprotein, wurden entsprechend der schematischen Darstellung direkt an Protein-A aus den Lysaten präzipitiert. Im Präzipitat und im Ausgangslysat wurde CD4 mittels eines spezifischen CD4 Antiserums (T4-4) nachgewiesen.

6.3.3 Mutationsanalyse der CD4 Interaktion mit clg-ACP33

Wie bereits einleitend erwähnt, gab es durch Voruntersuchungen zu den hier dargestellten Analysen Hinweise auf das minimale Sequenzmotiv, welches für die Interaktion mit ACP33 essentiell ist. So ließen Ergebnisse aus einem *Two-Hybrid-Screen* mit ACP33 darauf schließen, daß ACP33 an bestimmte Kombinationen hydrophober Aminosäuren bindet, welche sich am carboxyterminalen Ende von Proteinen befinden (Lutz Zeitlmann, Diplomarbeit). Die beiden C-terminalen Aminosäuren in CD4, Prolin und Isoleucin, besitzen ebenfalls hydrophoben Charakter, und die Deletion dieser Aminosäure führte zum Interaktionsverlust mit ACP33 im Hefe-*Two-Hybrid* System. Um zu analysieren, ob dieser Befund auch in dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Copräzipitationsansatz aus T-Zell-Lysaten zu verifizieren war, wurde eine von Cosima Baldari (Universität Siena) zur Verfügung gestellte Jurkat T-Zelllinie eingesetzt, die endogen nicht nachweisbare Mengen an CD4 exprimiert (CBJ Zellen). Diese Jurkat Zellen wurden durch Elektroporation transient mit CD4

rekonstituiert bzw. mit einer Deletionsmutante von CD4 transfiziert, welcher die beiden C-terminalen Aminosäuren fehlen (431*). Durch Cotransfektion wurden cIg-ACP33 bzw. ein cIg-Kontrollprotein coexprimiert. Entsprechend dem oben beschriebenen Schema wurden die cIg-Fusionsproteine gereinigt und CD4 im Präzipitat nachgewiesen. Wie aus Abbildung 6.9 zu ersehen, copräzipitiert CD4 mit cIg-ACP33, nicht jedoch die 431* CD4 Mutante.

Zelltyp: CBJ Jurkat T Zellen (CD4-defizient)
 IP: cIg Fusionsanteil / Detergenzlysate
 Detektion: diverse

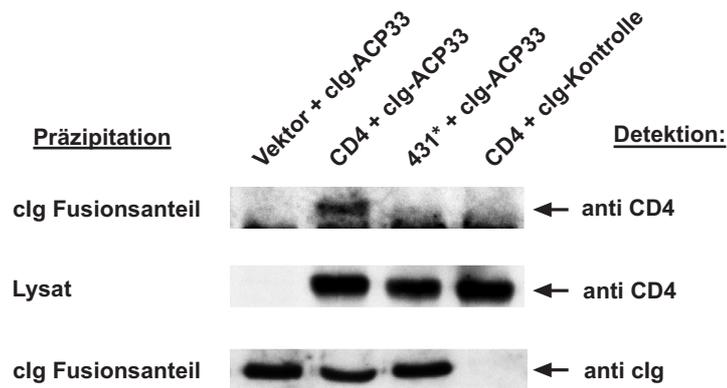


Abbildung 6.9: **Copräzipitation von CD4, nicht aber der CD4 Deletionsmutante 431* mit cIg-ACP33 aus CD4-defizienten CBJ Jurkat T-Zellen.** Die Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert und die cIg-Fusionsproteine entsprechend dem in Abbildung 6.8 dargestellten Schema aufgereinigt. In den beiden unteren Abschnitten der Abbildung sind die vergleichbaren Expressionen von CD4 bzw. cIg-ACP33 dokumentiert.

Eine weitergehende Mutationsanalyse der Interaktion von ACP33 und CD4 wurde in Zusammenarbeit mit Pinar Sirim durchgeführt und wird in ihrer Dissertation ausführlich dokumentiert werden. Das Ergebnis dieser Analysen wurde aus Gründen der Vollständigkeit hier mit aufgenommen. Der in Abschnitt 6.1.3 erwähnte Serinrest 109 in ACP33 ist ein konservierter Rest in Serin-Hydrolasen, welche Ähnlichkeit zu ACP33 aufweisen. Um zu analysieren, ob dieser Serinrest an der Vermittlung der ACP33 Interaktion mit CD4 beteiligt ist, wurde er durch Punktmutation gegen einen Alaninrest substituiert (S109A). Das entsprechende cIg-Fusionsprotein, cIg-ACP33 S109A wurde zusammen mit nativem CD4 in COS7 Zellen coexprimiert und durch Präzipitation gereinigt. Wie in Abbildung 6.10 dargestellt, führt diese Punktmutation zum völligen Interaktionsverlust von ACP33 mit CD4 (Spur 2). Erneut dokumentiert wurden in diesem Experiment der essentielle Charakter der hydrophoben, C-terminalen Reste von CD4 für die Interaktion mit cIg-ACP33 (Spur 9).

clg-ACP33 (wt) ...KVHLFGAS**L**GGFLAQKFAE...
clg-ACP33 (S109A) ...KVHLFGA**A**LGGFLAQKFAE...

CD4 . . . CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT**C**QCPHRFQKTCSPI*
398* . . . CVRCR*
411* . . . CVRCRHRRRQAERMSQIK*
419* . . . CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT*
426* . . . CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT**C**QCPHRF*
429* . . . CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT**C**QCPHRFQKT*
431* . . . CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT**C**QCPHRFQKTCS*

Zelltyp: COS7 Zellen
 IP: clg Fusionsanteil / Detergenzlysate
 Detektion: diverse

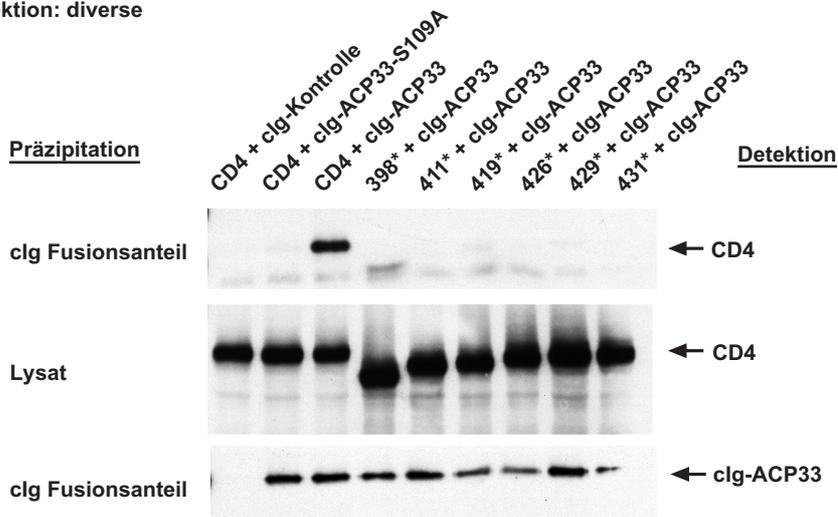


Abbildung 6.10: Copräzipitation von nativem CD4 mit clg-ACP33, nicht aber mit der Punktmutante clg-ACP33 S109A aus Lysaten transfizierter COS7 Zellen. Die Interaktion ist abhängig von Serinrest 109 in clg-ACP33 und den beiden hydrophoben, C-terminalen Resten der CD4 zytoplasmatischen Domäne (deletiert ab Mutante 431*). Weiterhin dokumentiert sind die vergleichbaren Expressionsmengen der clg-ACP33 und clg-ACP33 S109A Fusionsproteine sowie der CD4 Deletionsmutanten (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Pinar Sirim durchgeführt).

Zusammengefasst lässt die Mutationsanalyse der Interaktionsdeterminanten zwischen ACP33 und CD4 darauf schließen, dass dem Serinrest 109 in ACP33 unter den analysierten Bedingungen keine katalytische Funktion zukommt. Demgegenüber scheint er essentiell an der Bindung des hydrophoben, carboxyterminalen Endes der CD4 zytoplasmatischen Domäne beteiligt zu sein.

6.3.4 Copräzipitation von flag-ACP33 mit sIg-CD4

In den vorausgehend beschriebenen Copräzipitationsexperimenten wurde jeweils die in Abbildung 6.8 schematisch dargestellte Anordnung verwendet, das heißt jeweils ein clg-

Fusionsprotein aufgereinigt und CD4 im Präzipitat nachgewiesen. Im folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, ob auch eine Interaktion von CD4 mit nativem, nicht überexprimiertem ACP33 stattfinden kann. Hierzu wurde CD4 wegen der effizienteren Präzipitierbarkeit in Form eines sIg-Fusionsproteins (sIg-CD4) exprimiert. Dieses chimäre Konstrukt ist transmembran verankert und besteht aus einem extrazellulären Immunglobulinanteil und der zytoplasmatischen Domäne von CD4 (siehe Schema in Abbildung 6.11).

Durch transiente Transfektion wurde sIg-CD4 bzw. dessen Deletionsmutanten sIg-431* und sIg-429* (vergleiche Abbildung 6.10) in COS7 Zellen exprimiert und aus Detergenzlysaten an Protein A Sepharose gereinigt. Wie in Abbildung 6.11 dargestellt, kann überexprimiertes flag-ACP33 im sIg-CD4 Präzipitat nachgewiesen werden, nicht jedoch endogenes ACP33. Offenbar interagiert überexprimiertes flag-ACP33 demnach stabil und copräzipitierbar mit der zytoplasmatischen Domäne von CD4, nicht jedoch endogenes ACP33. Das Verhältnis von überexprimiertem flag-ACP33 zum endogenen Protein kann dabei anhand der anti-ACP33 Detektion des Westernblots abgeschätzt werden und beträgt etwa 4 bis 6 bei einer routinemäßig erreichten Transfektionseffizienz von 50% (vorausgesetzt beide Proteine werden gleich gut von mAb 2D5 detektiert).

Auch aus Lysaten verschiedener und zum Teil stimulierter T-Zelllinien konnte bislang kein Komplex der endogenen Proteine isoliert werden (nicht gezeigt). Es bleibt daher fraglich, ob endogenes ACP33 *in vivo* stabil mit CD4 interagiert. Die nachfolgend beschriebene Analyse der subzellulären Lokalisation von ACP33 und CD4 deuteten jedoch zumindest darauf hin, daß beide endogenen Proteine in partiell überlappenden zellulären Kompartimenten lokalisieren, daß heißt nicht intrazellulär sequestriert vorliegen.

6.4 Subzelluläre Lokalisationstudien

Bislang konnte eine stabile Interaktion zwischen ACP33 und CD4 lediglich in Hefe oder durch Copräzipitation überexprimierter Proteine nachgewiesen werden. Durch Bestimmung der subzellulären Lokalisation beider endogenen Proteine sollte analysiert werden, ob eine *in vivo* Interaktion zwischen ACP33 und CD4 eventuell durch Sequestrierung verhindert wird.

6.4.1 Biochemische Zellfraktionierung

Die hohe Spezifität des anti-ACP33 Antikörpers mAb 2D5 im Westernblot (siehe Abschnitt 6.2) ermöglichte die Analyse der Lokalisation des endogenen ACP33 Proteins nach biochemischer Zellfraktionierung. Da CD4 als ein Transmembranprotein vollständig in der Zellmembran zu finden ist, wurden Membranen aus hypotonisch lysierten HUT78 Zellen mit Hilfe einer sogenannten partikulären Fraktionierung von zytoplasmatischen Proteinen abgetrennt und die Partitionierung von endogenem ACP33 verfolgt. Wie in Abbildung 6.12 dargestellt, konnte ACP33 durch Westernblotanalyse sowohl in der zytoplasmatischen Zell-

Zelltyp: COS7 Zellen

IP: sIg Fusionsanteil / Detergenzlysate

Detektion: 2D5 (anti-ACP33)

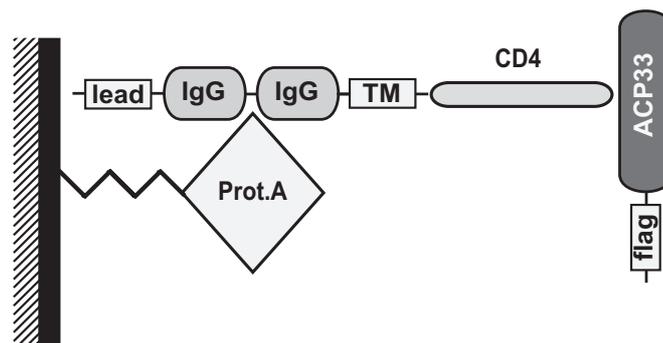
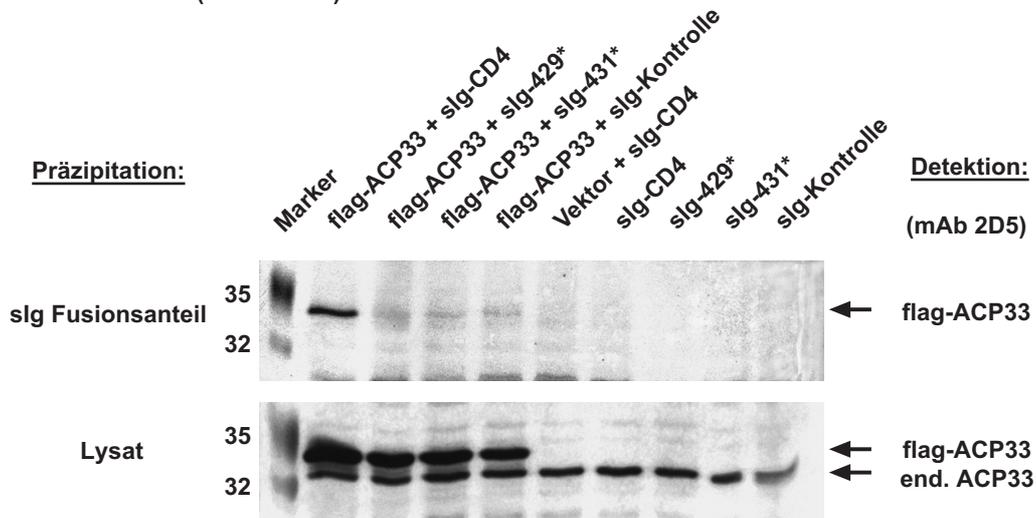


Abbildung 6.11: Copräzipitation von überexprimiertem flag-ACP33, nicht aber endogenem ACP33 mit sIg-CD4 Fusionsproteinen aus COS7 Zellysaten. Entsprechend dem im unteren Teil der Abbildung dargestellten Schema wurde sIg-CD4 bzw. dessen Deletionsmutanten an Protein A gereinigt und das Präzipitat sowie ein Zehntel des Gesamtzellysats im Westernblot auf Reaktivität mit dem anti-ACP33 monoklonalen Antikörper mAb 2D5 untersucht. Nur überexprimiertes flag-ACP33, nicht aber die endogen exprimierte, native Form von ACP33 ist im sIg-CD4 Präzipitat nachweisbar.

fraktion als auch in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden, die im wesentlichen Zellmembranen und Teile des Zytoskeletts enthält. Eine ähnliche Verteilung wie auch das cIg-Fusionsprotein von ACP33 auf, während zytoplasmatisch bzw. transmembran exprimierte Ig-Domänen jeweils als Kontrollproteine des entsprechenden zellulären Kompartiments dienen konnten.

ACP33 könnte demnach partiell mit der zytoplasmatische Seite von zellulären Membranen assoziiert vorliegen, wie für ein CD4 bindendes Protein zu erwarten, oder alternativ dazu mit Komponenten des Zytoskeletts interagieren.

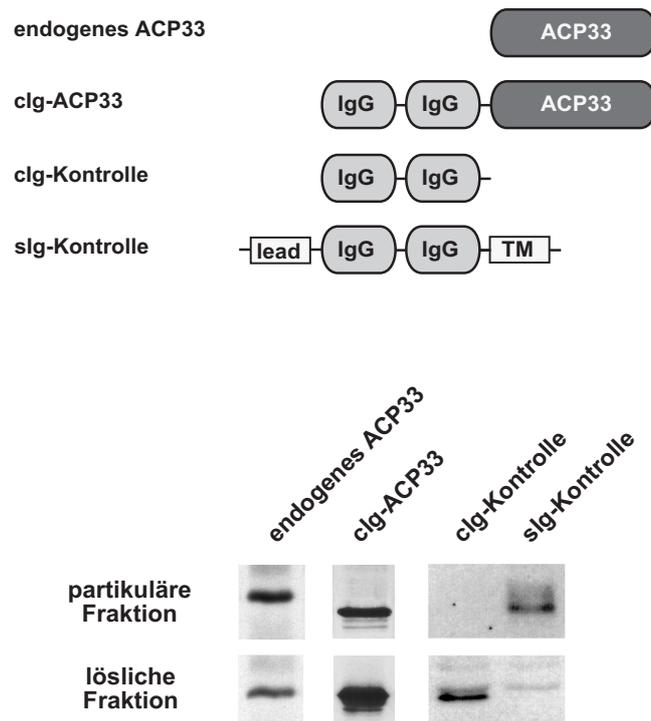


Abbildung 6.12: **Westernblotanalyse von Fraktionen hypotonisch lysierter HUT78 T-Zellen.** Die lösliche Fraktion entspricht dem Zytoplasma, während sich die hypotonisch unlösliche, aber detergentenlösliche (partikuläre) Fraktion aus Membranen und aus Teilen des Zytoskeletts zusammensetzt. Endogenes ACP33 war, wie auch dessen cIg-Fusionsprotein, welches über Elektroporation in HUT78 Zellen exprimiert wurde, in beiden Fraktionen nachweisbar. Zytoplasmatisch (cIg) bzw. transmembran (sIg) exprimierte Immunglobulinomänen dienten als Kontrollproteine.

6.4.2 Immunfluoreszenzanalyse

Um die putative Assoziation von ACP33 mit der zytoplasmatischen Seite von zellulären Membranen zu bestätigen, wurde über Immunfluoreszenz dessen subzelluläre Lokalisation analysiert, wiederum unter Zuhilfenahme des anti-ACP33 Antikörpers mAb 2D5. Die CD4 positive T-Zelllinie HUT78 schien auch hierfür wegen ihrer relativen Größe geeignet. In Abbildung 6.13 wurde ACP33 in fixierten und permeabilisierten HUT78 Zellen detektiert, einerseits als endogenes Protein mittels des mAb 2D5, andererseits als cIg-Fusionsprotein in transient transfizierten Zellen. Das von mAb 2D5 erkannte Epitop lokalisierte tatsächlich hauptsächlich auf intrazellulären Vesikeln, in geringerem Maß wurde aber auch ein zytoplasmatisches Epitop detektiert. Auch das cIg-ACP33 Fusionsprotein wurde vorwiegend auf intrazellulären Vesikeln detektiert, während das cIg-Kontrollprotein eine homogene zytoplasmatische Lokalisation aufwies.

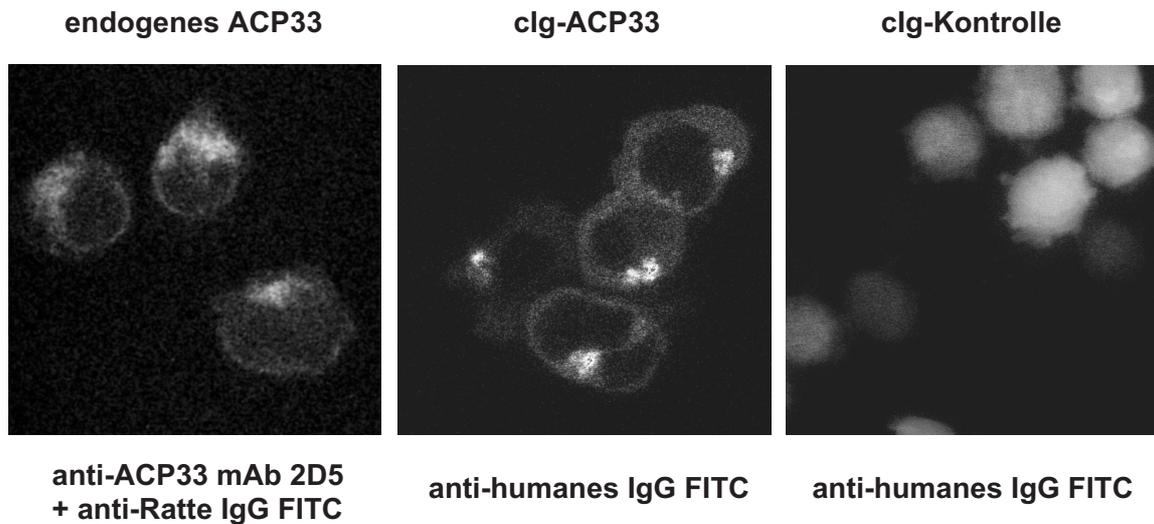


Abbildung 6.13: **Immunofluoreszenzanalyse der subzellulären Lokalisation des endogenen mAb 2D5 Epitops sowie des überexprimierten cIg-ACP33 Fusionsproteins.** Beide Epitope scheinen überwiegend auf intrazellulären Vesikeln zu lokalisieren, sind zum anderen aber auch im Zytoplasma nachweisbar, während das cIg-Kontrollprotein vollständig zytoplasmatisch vorliegt.

Die vergleichbaren Lokalisationen von cIg-ACP33 und des von mAb 2D5 erkannten Epitops ließ einerseits die bereits im Westernblot demonstrierbare Spezifität des Antikörpers für ACP33 (Abschnitt 6.2) auch für die Immunofluoreszenzanalyse plausibel erscheinen. Zum anderen wurde durch die ähnliche subzelluläre Verteilung von endogenem und von überexprimiertem cIg-ACP33 auch dessen Verwendung in den beschriebenen Copräzipitationsexperimenten (Abschnitt 6.3) validiert.

Überraschenderweise unterschied sich die subzelluläre Lokalisation der S109A Variante von cIg-ACP33 nicht merklich von der Lokalisation der Wildtypform (nicht gezeigt). Offenbar ist demnach eine Bindung an CD4 nicht essentiell für die Membranrekrutierung von ACP33. Dieser Befund suggeriert die Existenz einer zweiten, vom Serinrest 109 unabhängigen Interaktionsdomäne des ACP33 Proteins.

Um die Identität der intrazellulären Vesikel, mit denen ACP33 assoziiert zu sein schien, wenigstens grundlegend charakterisieren zu können, und somit eventuell Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von ACP33 zu erhalten, wurde das Ausmaß der Colokalisation des mAb 2D5 Epitops mit definierten vesikulären Strukturen untersucht. Zum einen wurden HUT78 Zellen mit Rhodamin markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA) inkubiert, welches präferentiell Zuckerreste von Proteinen des Golgi Komplexes bindet (Abbildung 6.14 b) . Zum anderen wurden Vesikel des rezyklierenden endosomalen Systems bzw. des lysosomalen Systems durch Rhodamin markiertes Transferrin (Abbildung 6.14 e) bzw. den azidotropen Farbstoff DAMP (Abbildung 6.14 h) angefärbt. Das Signal des mAb 2D5 Epitops wurde jeweils parallel im FITC Kanal eines konfokalen Lasermikroskops aufgezeichnet (Abbildung 6.14 a, d, g) und mit dem Rhodamin Kanal überlagert (Abbildung 6.14 c, f, i). Während die

Signale von ACP33 und Weizenkeimagglutinin kaum Überlappung aufwiesen, colokalisierte das Signal von ACP33 jeweils partiell mit den Signalen von Transferrin und DAMP.

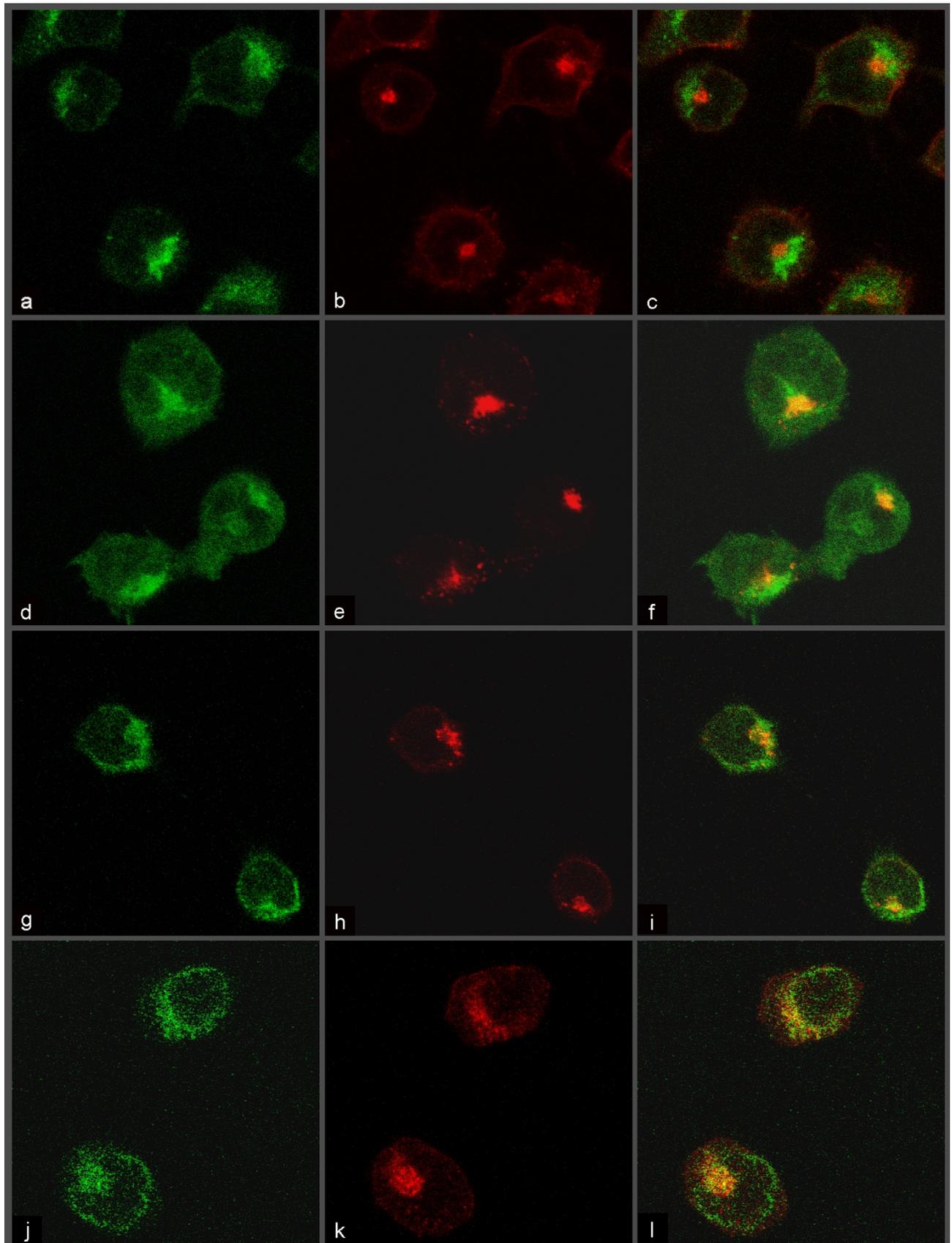
Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse als ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des ACP33 Proteins bei der Regulation von Vesikeltransportprozessen interpretiert werden, insbesondere der Vermittlung von Proteintransport aus endosomalen zu lysosomalen Kompartimenten.

6.4.3 Colokalisation von ACP33 mit CD4 in HUT78 T-Zellen

Von besonderer Relevanz für die Validierung der möglichen Interaktion zwischen ACP33 und CD4 war die Bestimmung der subzellulären Lokalisation beider Proteine. Wie in Abbildung 6.14 k gezeigt, enthalten HUT78 Zellen ungewöhnlich große Mengen an intrazellulärem CD4. Bei den CD4 positiven vesikulären Strukturen könnte es sich um endosomale Kompartimente handeln, da HUT78 Zellen sich von einem aktivierten T-Zell Klon ableiten und somit Aktivierungsmarker wie Ia und CD25 exprimieren. Wie einleitend erwähnt (Abschnitt 2.7), wird CD4 in aktivierten T-Zellen internalisiert und möglicherweise lysosomal degradiert.

In Abbildung 6.14 ist die Überlagerung des CD4 Signals mit dem Signal des mAb 2D5 Epitops gezeigt. Wie schon für Transferrin und dem lysosomalen Marker DAMP demonstriert (siehe vorigen Abschnitt), wiesen beide Signale partielle Überlappung auf. Diese partielle Colokalisation von CD4 und ACP33 erhöht die Wahrscheinlichkeit einer funktionell relevanten Wechselwirkung beider Proteine.

Abbildung 6.14 (Folgende Seite): **Vergleichende Immunofluoreszenzanalyse der subzellulären Lokalisation von endogenem ACP33.** Erkennbar ist partielle Colokalisation des endogenen mAb 2D5 Epitops (a, d, g, j) mit frühen, rezyklierenden Endosomen (e), sauren Vesikeln des endosomalen/lysosomalen Systems (h) und endogenem CD4 (k) in HUT78 Zellen. Kaum Überlappung besteht zwischen der Lokalisation des mAb 2D5 Epitops (a) und dem - durch Färbung mit Weizenkeimagglutinin markierten - Golgi Apparat (b). ACP33 scheint demnach mit Vesikeln des Endosomalen/Trans-Golgi Netzwerkes zu assoziieren.



6.5 Funktionsanalysen von CD4-Deletionsmutanten

Falls einer ACP33 Interaktion mit CD4 physiologische Relevanz zukommt, sollte die Deletion der Interaktionsdeterminante in CD4 in einer veränderten CD4 Funktion, Expression oder Lokalisation resultieren. Wie einleitend und unter Abschnitt 6.3.3 beschrieben, führt bereits die Deletion der beiden C-terminalen Reste der CD4 zytoplasmatischen Domäne zu einem völligen Interaktionsverlust mit verschiedenen überexprimierten ACP33 Fusionsproteinen. Die zwei carboxyterminalen Reste in CD4 sind hinsichtlich ihres hydrophoben Charakters evolutionär konserviert und könnten daher ein relevantes Protein-Protein Interaktionsmotiv darstellen. Expressions- und Funktionsanalysen dieser vergleichsweise kurzen Deletionsmutante schienen daher aussagekräftige Hinweise auf die mögliche funktionelle Relevanz der ACP33 Interaktion mit CD4 liefern zu können.

6.5.1 CD4-Funktion in antigenabhängiger T-Zell Aktivierung

Mutationsanalysen der CD4 Funktion als costimulatorischer Rezeptor der antigenabhängigen T-Zell Aktivierung setzen ein CD4 negatives T-Zell-Hybridom mit bekannter Antigenpezifität voraus. Ein solches System wurde unserer Arbeitsgruppe von Mark Hill und Dan Littman (Universität von New York) zur Verfügung gestellt. Wie in Abbildung 6.12 schematisiert, umfaßt es die murine, CD4 negative T-Zelllinie 171 (Glaichenhaus, N. *et al.*, 1991), in der durch stabile Transfektion ein T-Zell-Rezeptor (TCR) bekannter Spezifität rekonstituiert wurde. Dieser T-Zell-Rezeptor ist gerichtet gegen den Komplex des MHC Klasse II Moleküls A^b mit einem definierten Peptid aus Hühnereiweiß. Als Antigen präsentierende Zelle wurde ein L-Zell Derivat murinen Ursprungs benutzt (FT7.1), welches die beiden Ketten des A^b MHC Moleküls stabil exprimiert (Ronchese, F. *et al.*, 1987). Mit Hilfe dieses Modellsystems wurde von Glaichenhaus *et al.* beschrieben, daß eine Rekonstitution der 171 Zellen mit CD4 Voraussetzung für eine meßbare IL-2 Produktion nach Antigenstimulation darstellt. Außerdem wurde durch Mutationsanalyse die für die Interaktion mit p56^{lck} wichtigen Cysteinreste 420 und 422 als funktionell relevant erkannt (Glaichenhaus, N. *et al.*, 1991).

Um den funktionellen Phänotyp der in Abbildung 6.16 dargestellten CD4 Deletionen zu untersuchen, wurden 171 Zellen mittels Elektroporation stabil transfiziert. Von dem hierzu verwendeten Plasmid wird das Resistenzgen für Puromycin von einer internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) exprimiert, die zusammen mit der CD4-cDNA von einem gemeinsamen Transkript kodiert wird. Hierdurch exprimiert ein sehr hoher Prozentsatz der Puromycin resistenten Zellen vergleichbar hohe Mengen an CD4. In Abbildung 6.16 ist Zelloberflächenexpression von CD4 in der Puromycin resistenten Zellpopulation durch Immunofluoreszenz analysiert worden, zusammen mit einer Bestimmung der CD4 Gesamtmenge im Zellysat. In beiden Fällen erscheint die CD4 Expression aller Mutanten qualitativ und quantitativ relativ hoch und gleichmäßig. Offensichtlich hatte unter diesen Bedingungen

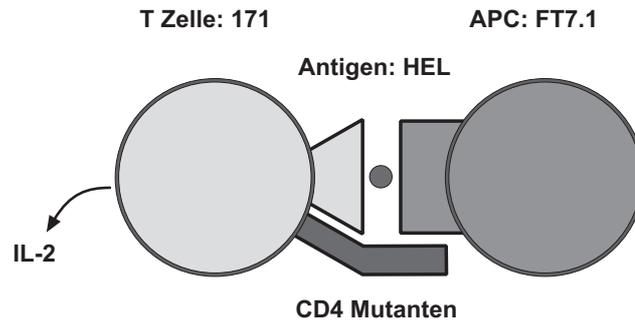


Abbildung 6.15: **Schematisches Modell des antigenabhängigen T-Zell-Aktivierungs-Assays.** Die CD4 negative, murine T-Zelllinie 171 wurde mit CD4 bzw. dessen Mutanten rekonstituiert und erkennt ein Peptidfragment aus Hühnereiweiß (HEL), das von den MHC Klasse II Molekülen A^b auf FT7.1 Zellen präsentiert wird. Zur Quantifizierung der T-Zell Aktivierung wurde sezerniertes IL-2 mittels ELISA bestimmt.

die gesamte zytoplasmatische Domäne keinen erkennbaren Einfluß auf die Dichte der CD4 Oberflächenexpression.

Weiterhin ist in Abbildung 6.16 die Analyse von Präzipitaten aller CD4 Mutanten mittels des polyklonalen T4-4 Serums gezeigt. Westernblotanalyse dieser Präzipitate mit einem Gemisch zweier gegen p56^{lck} gerichteter, monoklonaler Antikörper (lck-01 und lck-04, Vaclav Horejsi) demonstrierte die vergleichbare Assoziation von p56^{lck} mit nativem CD4 (wt) sowie den Deletionsmutanten 431*, 429* und 426*, während erwartungsgemäß keinerlei p56^{lck} Reaktivität in den Präzipitaten der Mutanten 419*, 398*/Pal⁻ sowie lck⁻ zu erkennen ist. Eine parallel durchgeführte Detektion desselben Westernblots mit dem anti-ACP33 Antikörper mAb 2D5 erbrachte keinen erkennbaren Hinweis auf eine Assoziation von CD4 mit nativem ACP33.

In Abbildung 6.17 ist die Menge an produziertem IL-2 quantifiziert, welche die in Abbildung 6.16 charakterisierten 171 Zellpopulationen nach Stimulation mit steigenden Mengen Peptid Antigen in den Überstand sezernieren. Im wesentlichen lassen sich vier Klassen von CD4 Mutationen hinsichtlich ihrer costimulatorischer Kapazität unterscheiden:

1. Zellpopulationen, die mit nativem CD4, 429* oder 426* rekonstituiert worden waren, sezernierten vergleichbare Mengen an IL-2.
2. Die 431* exprimierende Zellpopulation sezernierte im Vergleich zu nativem CD4 bei allen analysierten Peptidkonzentrationen eine etwa drei- bis vierfach höhere Menge an IL-2.

CD4(wt) ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC~~PHRFQKTC~~SPI*
431* ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC~~PHRFQKTC~~S*
429* ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC~~PHRFQK~~T*
426* ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC~~PHRF~~*
419* ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT*
398*/Pal⁻ ...AVRAR*
lck⁻ ...CVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKT~~AQAPHRFQKTC~~SPI*

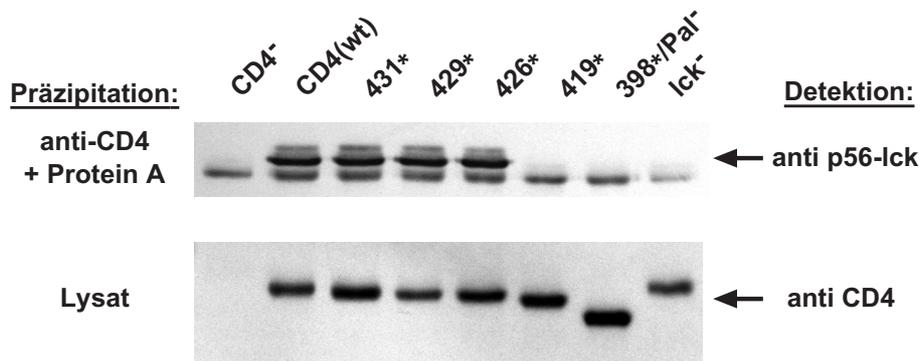
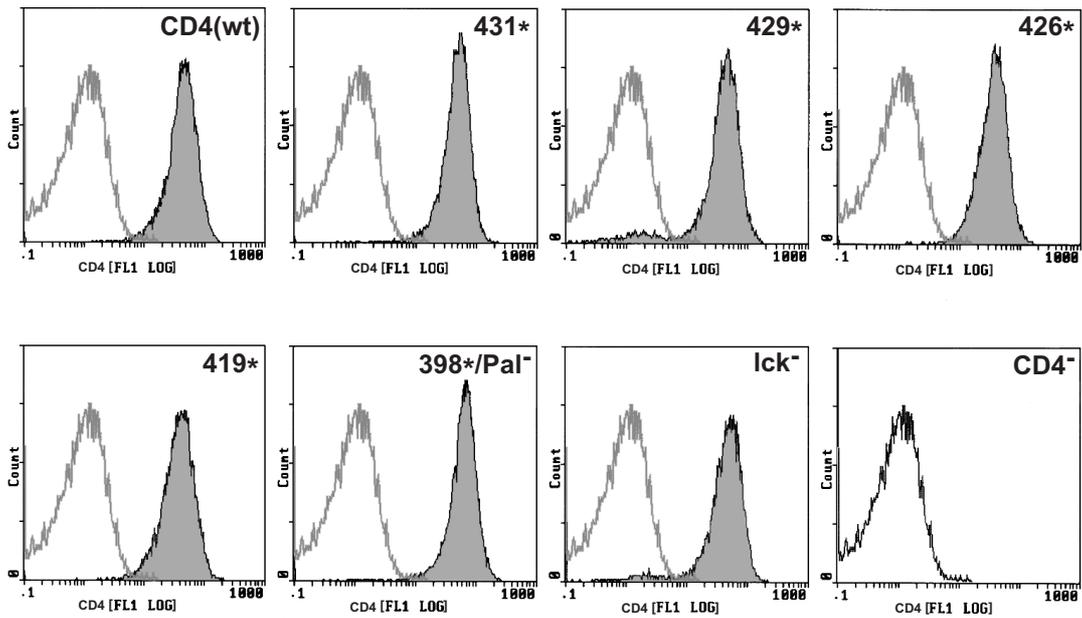


Abbildung 6.16: **Charakterisierung der stabil transfizierten 171 T-Zellpopulationen.** Oberer Teil: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen verschiedener CD4 Deletionsmutanten und Charakterisierung deren Oberflächenexpression in stabil transfizierten 171 T-Zellpopulationen durch Immunofluoreszenz. Die Oberflächenexpressionsdichte aller CD4 Varianten ist in vergleichbarem Rahmen. Unterer Teil: Analyse deren Assoziation mit p56^{lck} durch Copräzipitation. Die Interaktion mit p56^{lck} ist erwartungsgemäß abhängig von den Cysteinen 420 und 422, ist aber vergleichbar zwischen nativem CD4 und den Deletionsmutanten 431*, 429* und 426*.

3. 419*, 398*/Pal⁻ oder lck⁻ exprimierende Zellpopulationen sezernierten bei allen Peptidkonzentrationen eine etwa drei- bis vierfach geringere Menge an IL-2 relativ zu nativem CD4.
4. Die Zellpopulation, in der keine CD4 Expression rekonstituiert worden war (CD4⁻), sezernieren bei keiner der analysierten Peptidkonzentrationen detektierbare Mengen an IL-2.

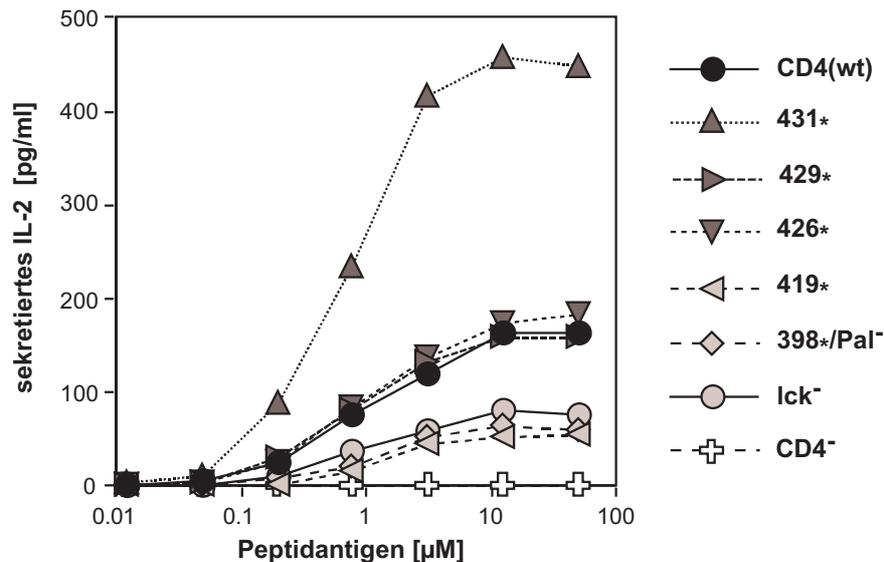


Abbildung 6.17: **Quantifizierung der IL-2 Sekretion verschiedener 171 T-Zell-Varianten nach Stimulation mit steigenden Mengen von Peptid-Antigen.** Die Zellpopulation, welche stabil die 431* Deletionsmutante von CD4 exprimiert, sezerniert bei allen Antigenkonzentrationen die 3- bis 4-fache Menge IL-2 im Vergleich zu den mit nativem CD4, 429* oder 426* transfizierten Zellpopulationen. Demgegenüber haben die 419*, 398*/Pal⁻ und lck⁻ exprimierenden Zellpopulationen ein vermindertes Potential der IL-2 Sekretion. Die CD4 negative Zellpopulation sezerniert bei keiner der analysierten Antigenkonzentrationen nachweisbare Mengen an IL-2. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit einer Standardabweichung unter 15%.

Demzufolge führt die Expression der extrazellulären und transmembranen Domäne von CD4 nur zu einer partiellen Rekonstitution der CD4 Corezeptor Funktion. In Relation dazu scheint die zytoplasmatische Domäne sowohl positiv wie auch negativ-regulatorische Determinanten zu enthalten, die sich durch entsprechende Deletionsmutanten separieren lassen. Eine eindeutig identifizierbare positiv-regulatorische Determinante ist das Doppel-Cystein-Motiv, welches für die Assoziation mit p56^{lck} essentiell ist. Eine weitere positiv-regulatorische Determinante betrifft die Region zwischen den Aminosäuren 431 bis 426, für die andere Mediatoren als p56^{lck} verantwortlich sein könnten. Interessanterweise führte die Deletion der beiden C-terminalen Aminosäuren (431*) zu einer gesteigerten Funktionalität der CD4 Moleküle hinsichtlich ihrer costimulatorischen Aktivität in antigenabhängiger T-Zell Aktivierung. Wie in Abschnitt 6.3.3 gezeigt, entspricht diese Region der ACP33 Inter-

aktionsdeterminante, daß heißt die Bindung von ACP33 korreliert mit einer Negativregulation der CD4 Funktion.

Der Mechanismus dieser putativen ACP33 Funktion hätte unter anderem als eine direkte Beeinflussung der Aktivität von p56^{lck} interpretiert werden können. Wie im folgenden gezeigt, läßt sich allerdings die gesteigerte Funktionalität der 431* Mutante gegenüber nativem CD4 auch in p56^{lck} defizienten T-Zellen reproduzieren, was für einen p56^{lck}-unabhängigen Mechanismus der negativ-regulatorischen Determinante spricht.

6.5.2 Lck-unabhängige CD4 Funktion in JCaM1 Zellen

Die JCaM1 Zelllinie wurde im Labor von Arthur Weiss (Universität von San Francisco) als Derivat der Jurkat E6 T-Zelllinie etabliert. Nach chemischer Mutagenese wurden Zellklone isoliert, die im Vergleich zu den parentalen E6 Zellen reduzierte Calcium-Mobilisation nach T-Zell-Rezeptor Stimulation aufwiesen. Für den JCaM1 Klon wurde später gezeigt, daß die zugrundeliegende Mutation im kodierenden Bereich von p56^{lck} liegt und dessen Destabilisation auf Proteinebene zur Folge hat. Im Westernblot kann in Lysaten der JCaM1 Zelllinie keine Reaktivität mit p56^{lck} nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist der in unserem Labor verwendete Subklon von JCaM1 Zellen auch negativ für CD4 Expression.

Im Zuge der Charakterisierung der bereits erwähnten CD4 Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer costimulatorischen Aktivität wurde zufällig beobachtet, daß die transiente Expression von CD4 in JCaM1 Zellen zu einer mit Phorbol ester synergisierenden Stimulation des IL-2 Promotors führte (dargestellt in Abbildung 6.18). Dieser Befund ließ sich allerdings nicht in den parentalen Jurkat E6 Zellen reproduzieren (nicht gezeigt) und könnte deshalb ein idiosynkratischer Effekt von JCaM1 Zellen sein, dessen physiologische Relevanz unklar bleibt. Dennoch wurde er operational dazu verwendet, die Aktivität der Deletionsmutanten von CD4 in Abwesenheit von p56^{lck} zu untersuchen. Hierzu wurden JCaM1 Zellen mittels Elektroporation transient mit Expressionskonstrukten für die in Abbildung 6.16 schematisch dargestellten CD4 Mutanten transfiziert. In Abbildung 6.18 ist die Oberflächenexpressionsdichte der verschiedenen CD4 Varianten über Immunfluoreszenzanalyse dargestellt. Die Transfektionseffizienz liegt in allen Fällen bei etwa 25% und auch die Expressionsdichte erscheint in vergleichbarem Rahmen. Zur Analyse der stimulatorischen Kapazität wurde jeweils ein Reporterplasmid cotransfiziert, welches ein vom IL-2 Promotor reguliertes Luziferasegen enthielt. Wie in Abbildung 6.18 dargestellt, vermag PMA-Stimulation in Abwesenheit von CD4 keinerlei Induktion des IL-2 Promotors zu bewirken, während sich bei PMA Stimulation von Zellen, in denen natives CD4 (CD4wt) rekonstituiert wurde, die Luziferaseaktivität etwa 14-fach induzieren ließ. Interessanterweise führt die Expression der 431* Deletionsmutante zu einer etwa 24-fachen Induktion durch PMA, was der 1,7-fachen Aktivität von nativem CD4 entspricht. Offensichtlich verhalten sich auch unter diesen Bedingungen die beiden hydrophoben Aminosäuren als negativ-regulatorische Determinante in CD4, wenn auch mit geringer Effizienz als bei der antigeninduzierten T-Zell Aktivierung

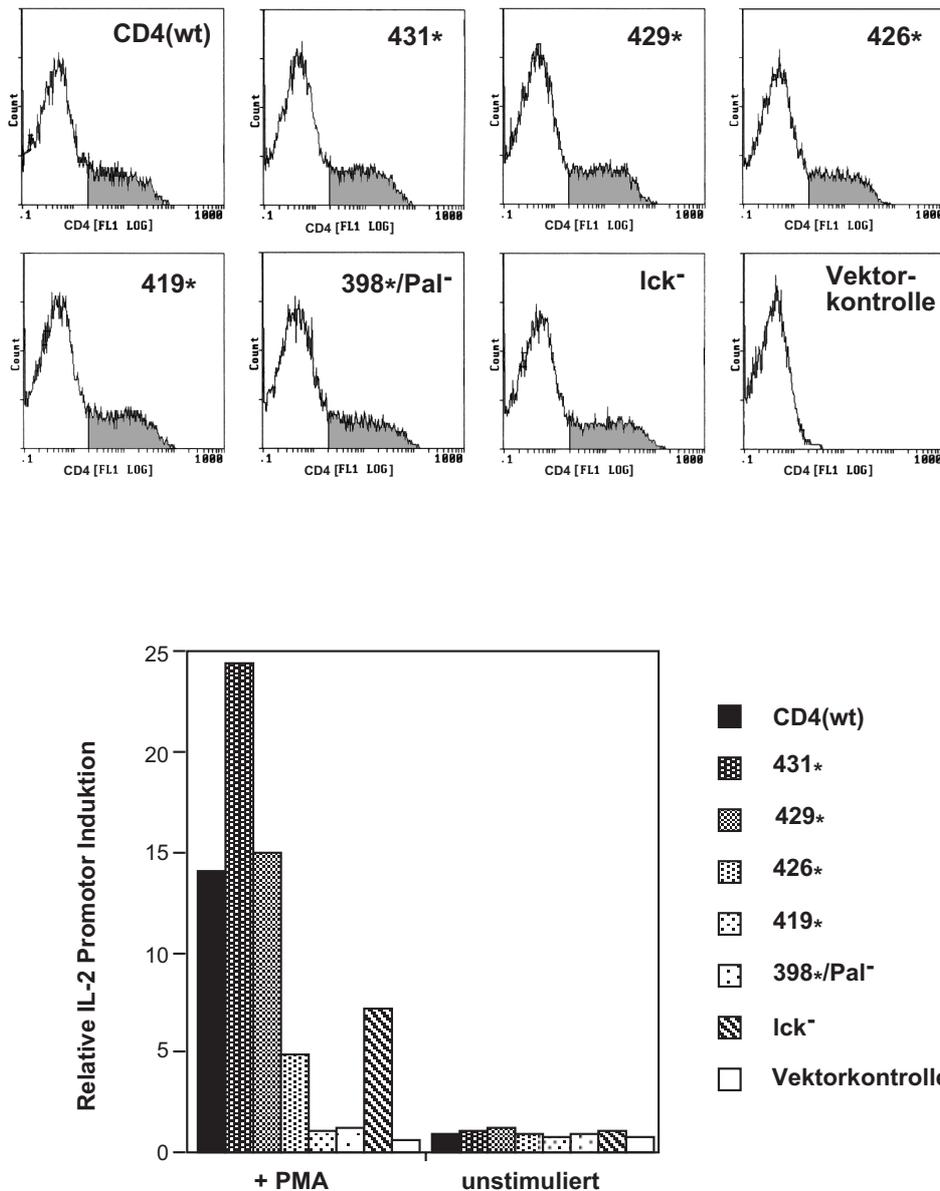


Abbildung 6.18: **IL-2 Promotorinduktion in transfizierten JCaM1.6 Zellen durch synergistische Stimulation über CD4 und Phorbolster (PMA).** Expressionsplasmide für CD4 bzw. dessen Mutanten wurden mit einem IL-2 Luziferasereporterplasmid in JCaM1 Zellen transient cotransfiziert und die resultierende Luziferaseaktivität mit und ohne PMA Stimulation analysiert. Expression von nativem CD4 führt synergistisch mit PMA Stimulation zu einer etwa 14-fachen Induktion des IL-2 Promotors, Expression der 431* Mutante aber zu einer etwa 24-fachen Induktion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit einer Standardabweichung unter 20%. Oberer Teil: Die Oberflächenexpressionsdichte aller CD4 Varianten auf transient transfizierten JCaM1 Zellen ist vergleichbar.

(siehe voriger Abschnitt). Ebenfalls konsistent verhält sich die Mutante 429*, deren aktivatorisches Potential wiederum vergleichbar mit dem nativen CD4s ist. Die Mutanten 426* und lck⁻ haben in JCaM1 Zellen geringeren Effekt als natives CD4, was angesichts der Abwesenheit von p56^{lck} auf eine weitere positiv-regulatorische Determinante hindeutet (siehe

Diskussion). Im Hinblick auf die gesteigerte Funktionalität der 431* Mutante bestätigen die hier dokumentierten Ergebnisse jedoch die Analyse der antigeninduzierten T-Zell Aktivierung und deuten darüber hinaus auf einen von p56^{lck} unabhängigen Mechanismus dieses Effekts hin.

6.6 Funktionsanalysen nach Überexpression von ACP33

Die im vorigen Abschnitt gezeigte funktionelle Charakterisierung von CD4 Deletionsmutanten ließen eine inhibitorische Funktion von ACP33 auf die CD4-abhängige Costimulation von T-Zellen vermuten. Um diese Interpretation zu verifizieren, wurde eine direkte molekulargenetische Analyse der ACP33 Funktion hinsichtlich T-Zell Aktivierung initiiert. Die experimentellen Ansätze hierzu beschränkten sich allerdings auf Überexpressionsstudien, da im Verlauf der hier dokumentierten Analysen keine ACP33 defiziente Zelllinie identifiziert werden konnte. Auch nach Expression von Antisense RNA oder nach Transfektion mit Antisense Oligonukleotiden konnte keinerlei Reduktion der ACP33 Proteinmenge in Zellysaten festgestellt werden (nicht gezeigt). Überexpression gelang aus unbekanntem Gründen lediglich mit N-terminalen Fusionsproteinen von ACP33, insbesondere mit zytoplasmatisch exprimiertem Immunglobulin Fusionsanteil (cIg-ACP33; Abbildung 6.6).

6.6.1 Überexpression von sIg-ACP33 resultiert in T-Zell Aktivierung

Die funktionellen Konsequenzen einer Überexpression von cIg-ACP33 wurde nach transienter Cotransfektion von p56^{lck} und CD4 defizienten JCaM1 Zellen mit CD4 Expressionsvektoren untersucht. Wie in Abbildung 6.18 gezeigt, resultierte die Expression von CD4 in JCaM1 Zellen bei gleichzeitiger Stimulation durch PMA in einer signifikanten Induktion des IL-2 Promotors. Die Coexpression von cIg-ACP33 beeinflusste diese CD4-abhängige Induktion des IL-2 Promotors jedoch nicht maßgeblich (nicht gezeigt).

Eine mögliche Ursache hierfür lag jedoch in der geringen Überexpressionsrate des cIg-ACP33 Proteins, die anhand von Abbildung 6.6 auf etwa 5-fach gegenüber dem endogen exprimierten Protein geschätzt wurde. Um dennoch eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration an seinem putativen Wirkort zu erreichen, wurde ACP33 artifiziell als transmembranes Immunglobulin-Fusionsprotein exprimiert, wodurch dessen konstitutive Membranrekrutierung erreicht wurde (Abbildung 6.6; Abbildung 6.12). Wie in Abbildung 6.19 dargestellt, resultierte die Expression dieses transmembranen ACP33-Fusionsproteins in einer signifikanten, mit PMA synergistischen Aktivierung des IL-2 Promotors. Die Effizienz der Promotorinduktion entsprach etwa derselben Größenordnung, welche auch nach Expression eines transmembranen Fusionsproteins der Syk-Kinase zu beobachten war (siehe auch Abbildung 4.2). Noch deutlicher war die Induktion des IL-2 Promotors nach Expression des sIg-ACP33 Fusionsproteins in JCaM1 Zellen (Abbildung 6.20).

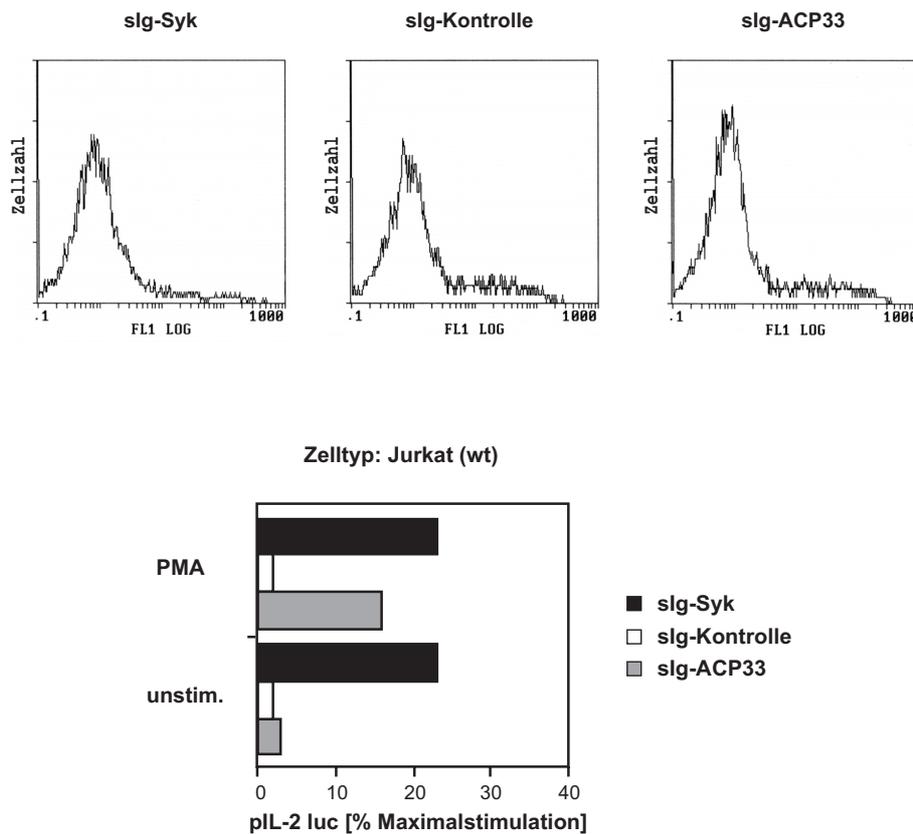


Abbildung 6.19: **Expression eines transmembranen Fusionsproteins von ACP33 (sIg-ACP33) resultiert mit PMA in einer synergistischen Stimulation des IL-2 Promotors in Wildtyp Jurkat Zellen.** Expressionsplasmide für sIg-ACP33, sIg-Syk bzw. eines sIg-Kontrollkonstruktes wurden zusammen mit einem IL-2 Luziferasereporterplasmid in Jurkat Zellen transient transfiziert und die resultierende Luziferaseaktivität mit und ohne PMA Stimulation analysiert. Expression von sIg-Syk bzw. sIg-ACP33 führt synergistisch mit PMA Stimulation zu einer etwa 10-fachen Induktion des IL-2 Promotors. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit einer Standardabweichung unter 20%. Oberer Teil: Die Oberflächenexpressionsdichte aller sIg-Konstrukte auf transient transfizierten Jurkat Zellen ist vergleichbar.

6.6.2 Serinrest 109 und p56^{lck} sind nicht-essentiell für die Aktivität von sIg-ACP33

Wie in Abschnitt 6.3.3 beschrieben, führt die Mutation des Serinrestes 109 von ACP33 zum Verlust der Interaktion mit CD4. Neben CD4 könnten potentiell weitere zelluläre Proteine dieselbe Interaktionsdeterminante im ACP33 Protein binden (Abschnitt 7.1.3). Um zu analysieren, ob die vom Serinrest 109 abhängige Interaktionsdeterminante essentiell für die nach Expression von sIg-ACP33 beobachtete Induktion des IL-2 Promotors ist, wurden steigende Mengen von Expressionsplasmiden für sIg-ACP33 und dessen S109A Variante in JCaM1 Zellen exprimiert. In Abbildung 6.20 ist dargestellt, daß die Substitution des Serinrest 109 keinerlei Einfluß auf das aktivatorische Potential eines transmembranen ACP33 Fusionsproteins auf den IL-2 Promotor hatte. Offensichtlich ist für die Vermittlung dieses funktionellen Effekts die vom Serinrest 109 abhängige putative Interaktionsdeterminante überflüssig. Da N- und C-terminale Deletionen des ACP33 Proteins nicht zu stabil exprimier-

baren Proteinen führten, konnte der - zur Vermittlung des aktivierenden Effekts nötige - Bereich des ACP33 Proteins bislang nicht eingegrenzt werden.

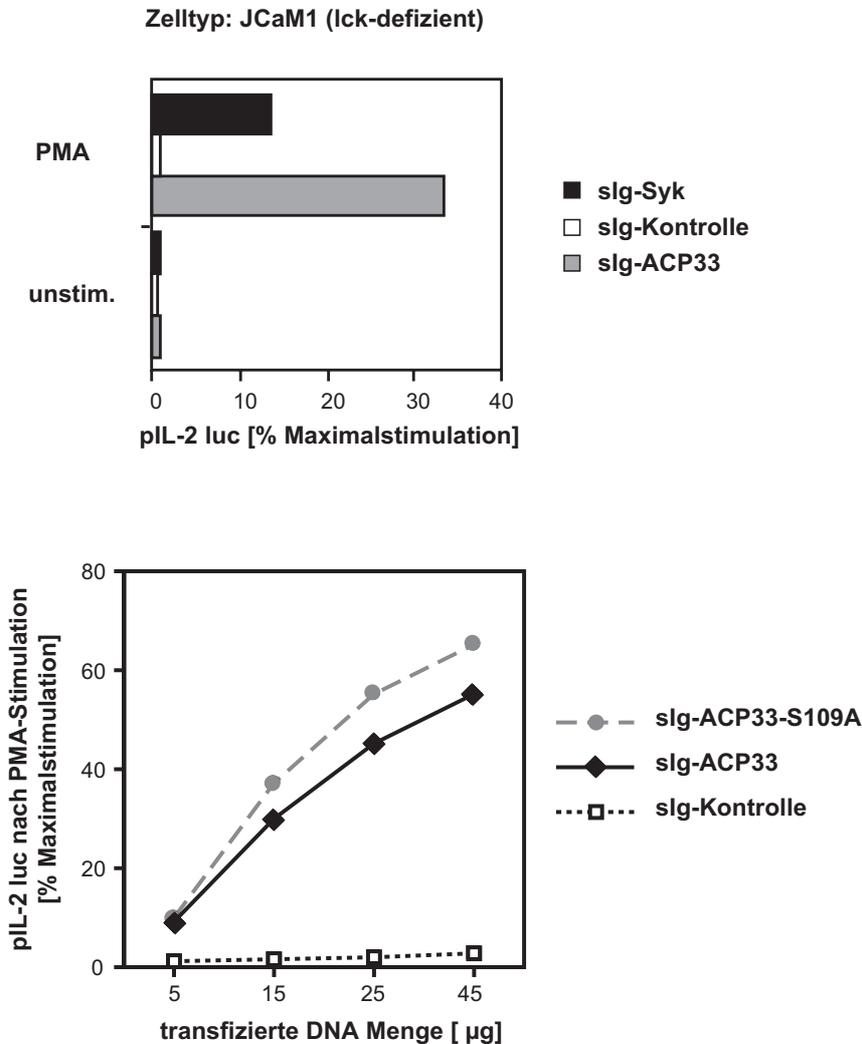


Abbildung 6.20: Expression von sIg-ACP33 und seiner S109A Variante resultiert in einer vergleichbaren Induktion des IL-2 Promotors in p56^{lck} defizienten JCaM1 Jurkat Zellen. Expressionsplasmide für sIg-ACP33, sIg-Syk bzw. eines sIg-Kontrollkonstruktes wurden zusammen mit einem IL-2 Luziferase-reporterplasmid in JCaM1 Jurkat Zellen transient transfiziert und die resultierende Luziferaseaktivität mit und ohne PMA Stimulation analysiert. Expression von sIg-ACP33 führt synergistisch mit PMA Stimulation zu einer etwa 30-fachen Induktion des IL-2 Promotors. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit einer Standardabweichung unter 20%. Unterer Teil: Titration der Expression von sIg-ACP33 und seiner S109A Variante durch steigende Mengen an Expressionsplasmid resultiert in einer vergleichbaren Induktion des IL-2 Promotors in PMA stimulierten JCaM1 Zellen.

7 Diskussion zu ACP33

ACP33 wurde von Waldemar Kolanus mittels des Hefe-*Two-Hybrid* Verfahrens als ein putativer Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von CD4 kloniert. Die isolierte cDNA codierte für ein damals unbekanntes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 33 kD. Ein Cluster von vier sauren Aminosäureresten am N-Terminus war das einzige auffällige Merkmal der Aminosäuresequenz, weshalb das neuartige Protein als ACP33 (*Acidic cluster protein 33 kD*) bezeichnet wurde.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung einer möglichen physikalischen und funktionellen Wechselwirkung zwischen ACP33 und CD4. In Vorarbeiten zu den hier dokumentierten Studien wurde die Bindungsspezifität des ACP33 Proteins analysiert, erneut unter Verwendung der Hefe-*Two-Hybrid* Methodik (Lutz Zeitlmann, Diplomarbeit). Zusammen mit weiteren grundlegenden Studien sind diese Befunde in Abschnitt 7.1 diskutiert. Die Interaktionsmotive in ACP33 und CD4, welche für eine stabile Bindung beider Proteine essentiell sind, wurden mittels Copräzipitation und Mutationsanalyse bis auf einzelne Aminosäuren eingegrenzt (Abschnitt 7.1 und 7.2). Die funktionelle Charakterisierung dieser Punktmutanten erfolgte in Studien zur CD4-abhängigen T-Zell Aktivierung sowie mittels Überexpressionsanalysen (Abschnitt 7.3 und 7.4).

7.1 Grundlegende Charakterisierung des ACP33 Proteins

Da über ACP33 zum Zeitpunkt seiner Klonierung keinerlei Informationen in Proteindatenbanken verfügbar waren, wurden zunächst fundamentale Parameter wie die subzelluläre Lokalisation, das Expressionsmuster und die Bindungsspezifität von ACP33 analysiert.

7.1.1 ACP assoziiert mit Vesikeln des endosomalen/trans-Golgi Netzwerks

Proteinbindungsstudien mittels des Hefe-*Two-Hybrid* Verfahrens berücksichtigen wegen der forcierten Rekrutierung beider Interaktionspartner in den Hefe Zellkern kaum den hohen Grad an Kompartimentierung in eukaryotischen Zellen. Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins limitiert jedoch entscheidend die Zahl seiner möglichen Bindungspartner. Einer Bestimmung der subzellulären Lokalisation des endogenen ACP33 Proteins wurde deshalb - im Rahmen einer Evaluierung der putativen *in vivo* Wechselwirkung zwischen CD4 und ACP33 - große Bedeutung beigemessen.

Um ACP33 auf Proteinebene analysieren zu können, wurden von Pinar Sirim in unserer Arbeitsgruppe in Kollaboration mit Elisabeth Kremmer (GSF München) mehrere spezifisch gegen ACP33 gerichtete, monoklonale Antikörper selektiert. Einer dieser Antikörper, mAb 2D5, detektiert in Lysaten verschiedener humaner und muriner Zelllinien im Westernblot ein

endogenes Protein von 33 kD apparentem Molekulargewicht (Abbildung 6.5). Wie in Abbildung 6.6 dokumentiert, erkennt mAb 2D5 auch diverse ACP33-Fusionsproteine in Lysaten transfizierter Zellen mit hoher Spezifität. Im ELISA wurden von mAb 2D5 darüber hinaus bakteriell exprimierte ACP33-Fusionsproteine in ihrer nicht-denaturierten Form spezifisch nachgewiesen (Pinar Sirim und Elisabeth Kremmer, persönliche Mitteilung). Diese hohe Spezifität für natives und denaturiertes Protein ließ mAb 2D5 für die Analyse der subzellulären Verteilung des endogenen ACP33 Proteins mittels Immunofluoreszenzfärbung geeignet erscheinen.

Die subzelluläre Lokalisation von ACP33 wurde in der CD4 positive T-Zelllinie HUT78 analysiert. Verglichen wurde dabei das durch Detektion mit mAb 2D5 erhaltene Färbemuster des endogenen ACP33 Proteins mit der Lokalisation des exprimierten Immunglobulin Fusionsproteins von ACP33, welches über seinen Fusionsanteil nachgewiesen wurde. Beide Proteine zeigten - unter Aussparung des Zellkerns - sowohl eine diffuse Verteilung über den gesamten Zellkörper als auch eine Konzentration in vesikulären, perinukleären Strukturen (Abbildung 6.13). Keine Assoziation war mit der Plasmamembran zu erkennen. Die biochemische Analyse der subzellulären Lokalisation mittels Fraktionierung hypotonischer Zellysate war konsistent mit einer Segregation beider Proteine zu etwa gleichen Teilen in die zytoplasmatische Fraktion und in die partikuläre Fraktion, welche sich im wesentlichen aus zellulären Membranen zusammensetzt (Abbildung 6.12). Offensichtlich wird ACP33 zytoplasmatisch synthetisiert, besitzt aber die Fähigkeit, mit der zytosolischen Seite intrazellulärer Vesikel zu assoziieren.

Um die Natur dieser intrazellulären Vesikel zu charakterisieren, wurde das durch mAb 2D5 erhaltene Färbemuster verglichen mit dem von Markern für verschiedene vesikuläre Kompartimente. ACP33 colokalisierte sowohl mit frühen Endosomen als auch mit Lysosomen, nicht jedoch mit Markern des zentralen Golgi-Apparates (Abbildung 6.14). Offenbar assoziiert ACP33 demnach mit verschiedenen Vesikeln des endosomalen/lysosomalen/trans-Golgi Netzwerks. Die subzelluläre Lokalisation von CD4 in HUT78 Zellen ist in Abschnitt 7.3.2 diskutiert.

7.1.2 ACP33 ist ubiquitär exprimiert

Hinweise auf ein ubiquitäres Expressionsmuster des ACP33 Gens ergaben sich aus drei methodisch unabhängigen Ansätzen. Zum einen wurde von Waldemar Kolanus die Expression der ACP33 mRNA mittels Northernblot analysiert. Verwendet wurde hierzu ein kommerziell erhältlicher Blot von mRNA Präparationen verschiedener menschlicher Gewebe. Dieser wurde mit der gesamten ACP33 cDNA als markierter Sonde hybridisiert. Die zelluläre mRNA des ACP33 Gens wurde hierdurch in allen analysierten Geweben als einzelne Bande mit einer Länge von etwa 2 kb nachgewiesen (Waldemar Kolanus; persönliche Mitteilung). Graduell am stärksten waren die Signale in den RNA-Präparationen aus Lunge, Leber und Niere.

Eine eingehendere Charakterisierung des ACP33 Expressionsmusters erlaubte zum anderen der Homologievergleich zwischen der Nukleotidsequenz von ACP33 und EST-Datenbanken, insbesondere der *HGI* Datenbank des TIGR, in der überlappende ESTs zu putativen cDNA Sequenzen zusammengefaßt sind. Ein Eintrag dieser Datenbank ist faktisch identisch zu ACP33 und wurde aus ESTs generiert, die aus über vierzig verschiedenen menschlichen Geweben oder Zelltypen isoliert wurden, unter anderem aus mehreren Lymphom Zelllinien (Abschnitt 6.1).

Auf Proteinebene konnte die Expression des endogenen ACP33 Proteins wiederum mittels des spezifischen monoklonalen Antikörpers 2D5 analysiert werden. Wie in Abbildung 6.5 gezeigt, detektiert dieser Antikörper in Lysaten verschiedener humaner und muriner Zelllinien ein Protein von 33 kD apparentem Molekulargewicht, unter anderem in denen mehrerer T-lymphoider Zelllinien.

Im Gegensatz zu CD4 wird ACP33 demnach nicht T-Zell-spezifisch, sondern ubiquitär exprimiert. Falls ACP33 tatsächlich eine proteinbindende Determinante enthält, impliziert dies die Existenz weiterer putativer Interaktionspartner neben CD4.

7.1.3 Hydrophobe C-Termini von Peptiden als Liganden für ACP33

Um Hinweise auf mögliche alternative Interaktionspartner von ACP33 zu erhalten, war bereits im Vorfeld der hier dokumentierten Untersuchungen mittels des Hefe-*Two-Hybrid* Verfahrens nach potentiellen Bindungspartnern von ACP33 gesucht worden. Eine grundsätzliche Limitation dieser Methode besteht jedoch darin, daß als Interaktionspartner in der Regel keine Transmembranproteine isoliert werden können, da diese den Hefe Zellkern nicht erreichen. Dementsprechend konnten - in dieser reversen Anordnung - CD4 und andere Membranproteine nicht als Interaktionspartner von ACP33 erwartet werden. Die Sequenzanalyse der selektierten cDNA Klone ergab jedoch eine auffällige Gemeinsamkeit: alle mit ACP33 interagierenden Polypeptide, deren C-Terminus durch Sequenzierung oder durch Identität mit einem Datenbankeintrag erfaßt werden konnten, wiesen als letzte und vorletzte Aminosäure jeweils zwei Reste mit hydrophoben, nicht-aromatischen Seitenketten auf. Die Mehrzahl der isolierten cDNAs codierten keine Proteine, sondern lediglich kurze Peptide, deren einzige offensichtliche Gemeinsamkeit in dem eben erwähnten hydrophoben Charakter der beiden C-terminalen Aminosäuren bestand. Offenbar fungiert ACP33 unter den Bedingungen des *Two-Hybrid* Verfahrens als ein peptidbindendes Protein, wodurch die Analyse den Charakter einer Peptidselektion annahm.

Die Abbildung 7.1 listet die C-Termini aller Polypeptide auf, welche in der besagten Selektion in Hefe als Interaktionspartner von ACP33 identifiziert wurden. Die am häufigsten auftretende Kombination C-terminaler Aminosäuren war die zweier Isoleucinreste, gefolgt von der Kombination eines präterminalen Isoleucin- oder Prolinrestes mit einem terminalen Valinrest. Offenbar konstituiert ein starkes hydrophobes, aber nicht aromatisches Moment im Kontext des Carboxyanions den bevorzugten Liganden von ACP33. Weniger häufig, wenn-

gleich vertreten war die Kombination eines präterminalen Prolin- mit einem terminalen Isoleucinrest, welche den C-terminalen Aminosäuren von humanem CD4 entspricht. Während an der präterminalen Position auch weniger hydrophobe Aminosäuren wie Prolin, Alanin oder Glycin erlaubt zu sein scheinen, war die C-terminale Aminosäure der ACP33 Liganden stets ein Isoleucin-, Leucin- oder Valinrest.

C-Termini aller Peptid-Liganden von ACP33:

	Präterminale Aminosäure	C-terminale Aminosäure	Zahl unabhängiger Isolate
	Isoleucin	Isoleucin	8
	Isoleucin	Valin	5
	Prolin	Valin	4
hsCD4 →	Prolin	Isoleucin	3
	Valin	Isoleucin	2
mmCD4 →	Leucin	Isoleucin	1
	Alanin	Leucin	1
	Glycin	Leucin	1

C-Termini der CD4 Orthologen verschiedener Säugerspezies:

	400	410	420	430
Homo s.	CVRCRHRRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQC	PHRFQKTC	SPI*	
Pan t.	-----Q-----			
Macaca n.	-----W-----			
Mus m.	-----QQ---A-----		M--SHNL--*	
Rattus n.	-----QQ---A-----		S--M--SHNL--*	
Felis c.	--K-W-----A--H-----		S--L-----N--*	
Canis f.	--K-WR-----		S--I-----L--*	
Oryctolagus c.	--K-----H--Q-----		K-----L---YNLL*	
consensus	CV+Cx+xx+QAxRMSxIK+LLSEKKTQCxHxψQKα.xxψψ*			

Abbildung 7.1: **Bindungsspezifität von ACP33 und Konservierung dieses Interaktionsmotivs in CD4 Orthologen von Säugern.** Mittels einer Hefe-*Two-Hybrid* Selektion waren diverse Peptidliganden von ACP33 identifiziert worden, deren Gemeinsamkeit im hydrophoben, nicht-aromatischen Charakter der beiden C-terminalen Aminosäuren lag. Ein derartiges Motiv ist konserviert in allen bekannten CD4 Orthologen von Säugetieren. Die Kombinationen hydrophober Aminosäuren von humanem und murinem CD4 sind im oberen Abbildungsteil mit Pfeilen markiert.

Dieser Befund warf zwei wesentliche Fragen hinsichtlich der Interaktionsspezifität von ACP33 auf: 1) vermitteln die hydrophoben Aminosäuren Prolin und Isoleucin tatsächlich die ACP33 Bindung an humanes CD4, und ist demnach die Hydrophobizität der C-Termini in CD4 Molekülen anderer Spezies evolutionär konserviert? 2) wie häufig tritt ein

entsprechendes Motiv im Proteom eines Zelltyps oder eines Organismus auf, daß heißt wie viele potentielle Bindungspartner könnte ACP33 besitzen?

Ebenfalls bereits als Vorarbeit zu den hier dokumentierten Ergebnissen wurde die erste dieser Fragen - durch Generierung von Deletionsmutanten der CD4 zytoplasmatischen Domäne - experimentell analysiert. In der Tat war im Hefe-*Two-Hybrid* System zwischen einem verkürzten CD4 Molekül, dem die beiden C-terminalen Aminosäuren Prolin und Isoleucin fehlten, keine Interaktion mit ACP33 nachweisbar (Lutz Zeitlmann, Diplomarbeit). Inzwischen wurden diese initialen Befunde durch Copräzipitationsanalysen verifiziert (Abbildung 6.9 und Abbildung 6.10).

In Abbildung 7.1 sind die zytoplasmatischen Domänen aller bekannten CD4 Moleküle von Säugern dargestellt. Das Interaktionsmotiv mit ACP33, nämlich hydrophobe, nicht aromatischen Seitenketten an beiden C-terminalen Aminosäuren, ist tatsächlich innerhalb der Klasse der Säugetiere in allen bekannten CD4 Orthologen konserviert, was als Hinweis auf die Relevanz der Interaktion mit ACP33 interpretiert werden könnte. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß dem CD4 Ortholog des Huhns dieses Motiv offensichtlich fehlt. Über das Vorhandensein und die eventuelle Bindungsspezifität von ACP33 Orthologen dieser Spezies ist allerdings nichts bekannt, so daß alle Aussagen zur evolutionären Konservierung der ACP33 Interaktion mit CD4 derzeit lediglich spekulativen Charakter haben können.

Bezüglich der Häufigkeit des ACP33 Interaktionsmotivs in anderen Proteinen als CD4 - und damit der Bindungsspezifität von ACP33 - ist von Bedeutung, ob ACP33 innerhalb der Zelle kompartimentiert vorliegt und somit die Zahl potentieller Liganden durch weitere Interaktions- und Lokalisationsdeterminanten innerhalb des ACP33 Proteins restringiert wird. Wie in Abschnitt 6.4 dargestellt, ist ACP33 sowohl im Zytoplasma als auch auf der zytosolischen Seite intrazellulärer Vesikel nachweisbar. Diese Lokalisation scheint aber unabhängig von der Interaktionsdeterminante im ACP33 Protein zu sein, welche die Bindung an CD4 vermittelt (siehe Abschnitt 6.3.3). Darüber hinaus enthält das *Arabidopsis* ACP33 Ortholog eine putative transmembrane Domäne in einem Bereich, der im humanen ACP33 Protein nicht enthalten ist (siehe folgender Abschnitt). Diese Befunde deuten auf eine zweite Interaktionsdeterminante in ACP33 hin, welche die Rekrutierung an zelluläre Membranen zur Folge haben könnte. Falls dies zutrifft, würden möglicherweise zytoplasmatisch exponierte C-Termini transmembraner Proteine bevorzugte Liganden für ACP33 darstellen.

Mittels des Pattern-Algorithmus und den genannten Kriterien ([ILVPAG]-[ILV]>) wurde in den Swiss-Prot und Trembl Proteindatenbanken nach putativen Interaktionspartnern recherchiert. Von 87397 Einträgen der Swiss-Prot Datenbank erfüllten 579 diese Suchkriterien, ohne daß jedoch mit den gängigen Suchmasken die Recherche auf Transmembranproteine limitiert werden konnte. Carboxyterminale Aminosäurereste weisen generell häufiger hydrophilen als hydrophoben Charakter auf, möglicherweise da die C-Termini von Proteinen oft lösungsmittel exponiert sind. In T-Lymphozyten scheinen dennoch neben CD4 einige weitere Membranproteine diese Kriterien zu erfüllen, beispielsweise CD1D, CD44, CD53 und CD122. In anderen Zelltypen könnten ACP33 potentiell interagieren mit einer auffällig hohen Zahl von G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran Rezeptoren (GPCR), beispielsweise mit

dem Alpha-2A adrenergen Rezeptor, dem Adenosin A2B Rezeptor, dem muskarinischen Acetylcholin Rezeptor M3 und dem chemotaktischen C5A Anaphylatoxin Rezeptor. Einschränkend hierzu muß allerdings angemerkt werden, daß GPCRs im gesamten Proteom relativ häufig vertreten sind. Weiterhin könnte ACP33 mit mehreren 4-Transmembran Proteinen interagieren, z.B. mit CD83, IL-TMP sowie mit mehreren Connexin Varianten. Gemeinsamkeiten in der Lokalisation oder Funktion dieser potentiellen ACP33 Liganden sind jedoch nicht erkennbar. Experimentelle Untersuchungen zu alternativen Liganden von ACP33 wurden nicht durchgeführt, da CD4 hinsichtlich Funktion, Struktur und Regulation gut charakterisiert ist und somit als Modellligand für das Studium der ACP33 Funktion geeignet schien.

Hydrophobe C-Termini transmembraner Rezeptoren wurden bereits als Protein-Protein-Interaktionsdeterminanten impliziert, nämlich in der Bindung von Proteinen mit PDZ Domänen (Harrison S.C., 1996; Saras J. und Heldin C.H., 1996; Fanning A.S. und Anderson J.M., 1999). Deren Liganden weisen häufig als Consensus Bindungsmotiv die Sequenz S/TXΨ am Carboxyterminus auf (Ψ entspricht einem hydrophoben, nicht aromatischen Rest, X einem beliebigen Rest). Einzelne PDZ-Domänen können jedoch auch Spezifitäten aufweisen, die vom Consensusmotiv deutlich differieren (Songyang Z. *et al.*, 1997). Interessanterweise überlappt die Bindungsspezifität von PDZ-Domänen in manchen Fällen mit der von ACP33, so zum Beispiel im Fall der zytoplasmatischen Domäne von CD4. Proteinen mit PDZ Domänen sind häufig in Transport- und Oligomerisierungsprozesse von Membranproteinen impliziert worden. Auch andere Proteinlokalisationsmotive basieren häufig auf kurzen, hydrophoben Signalen, beispielsweise das LL-Motiv oder das YXXΨ Motiv (Kirchhausen T. *et al.*, 1997). Die Spezifität dieser Signale entsteht offenbar durch Kooperativität mit weiteren Lokalisationsdeterminanten (Kelly R.B., 1999), wie sie auch für ACP33 zu vermuten sind (siehe oben).

7.2 ACP33: Enzym oder Adapterprotein ?

Im folgenden Abschnitt sind Homologieanalysen der Aminosäuresequenz von ACP33 zusammengefaßt, welche eine schwache Ähnlichkeit zu bakteriellen Hydrolasen offenbarten. Vorläufige experimentelle Evidenzen sprechen jedoch gegen eine mögliche enzymatische Funktion, sondern unterstützen eine Protein-Adapterfunktion von ACP33.

7.2.1 Sequenzanalyse von ACP33

Zum Zeitpunkt der Identifikation von ACP33 als potentieller CD4-bindender Faktor war dessen Sequenz in keiner Datenbank registriert. Mittlerweile existiert ein cDNA Sequenzeintrag unter der Zugangsnummer AF208861 in der Genbank, welcher mit Ausnahme weniger, vermutlich fehlbestimmter Nukleotide Identität mit der in unserem Labor ermittelten

ACP33 cDNA Sequenz aufweist. Da die entsprechende mRNA aus menschlichem Knochenmark isoliert wurde, bezeichneten die Autoren das theoretisch translatierte Genprodukt als BM-019 (Zhao M. *et al.*, nicht publiziert). Wegen des eindeutig ubiquitären ACP33 Expressionsmusters wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung BM-019 nicht übernommen.

Die detaillierte Sequenzierung der ACP33 cDNA erfolgte in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Pinar Sirim. Mit der theoretisch translatierten Aminosäuresequenz wurden Sequenzhomologieanalysen durchgeführt, um eventuell vorhanden Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen zu ermitteln. Als eindeutig signifikant homolog wurde dabei zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich ein putatives Protein aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert, über das jedoch bislang keinerlei weiteren Informationen verfügbar sind (Abbildung 6.2). Wie bereits im Zusammenhang mit der Membranlokalisierung von ACP33 erwähnt, erscheint bemerkenswert, daß dieses ACP33 Homolog mit der Bezeichnung CAB45970 eine carboxyterminale, nicht in ACP33 vorhandene Extension von 86 Aminosäuren aufweist, welche eine putative transmembrane Domäne enthält. ACP33 beinhaltet zwar keine offensichtliche, eventuell jedoch eine kryptische Membranlokalisierungs determinante, von der eine Interaktion mit hydrophoben Protein C-Termini jedoch unabhängig ist (siehe Abschnitt 7.1.3).

Weiterhin existieren derzeit drei Proteindatenbank-Einträge, deren jeweilige Ähnlichkeit zu ACP33 im Grenzbereich einer signifikanten Homologie liegt. Es läßt sich demnach nicht mit Sicherheit ableiten, ob es sich hierbei um verwandte Proteine gemeinsamen Ursprungs oder lediglich um zufällige Ähnlichkeiten handelt. Alle drei Proteine sind bakterielle Hydrolasen einer gemeinsamen strukturellen Klasse, die sich durch ein sogenanntes α/β -Hydrolase Strukturmotiv auszeichnet. Dieses Strukturmotiv konstituiert sich aus mehreren topologischen Gemeinsamkeiten, beispielsweise der sequentiellen Anordnung von Aminosäureresten der katalytische Triade (Abschnitt 6.1.2; Nardini M. und Dijkstra B.W., 1999). Das zu ACP33 homologe Protein CAB45970 aus *Arabidopsis* weist ebenfalls Ähnlichkeit zu Hydrolasen mit α/β -Strukturmotiv auf, welche in diesem Fall sogar eindeutig auf Homologie beruht (nicht gezeigt). Infolgedessen sollte auch zwischen ACP33 und Proteinen mit α/β -Strukturmotiv eine evolutionäre Verwandtschaft bestehen, wenngleich die Homologie nur sehr begrenztes Ausmaß besitzt.

7.2.2 Katalytische Funktion ist nicht nachweisbar

Die strukturelle Ähnlichkeit von ACP33 zu bakteriellen Hydrolasen wirft selbstverständlich die Frage auf, ob ACP33 katalytische Aktivität besitzen könnte. Über die eventuelle Substratspezifität läßt sich aufgrund der Zugehörigkeit zur Klasse der Hydrolasen mit α/β -Strukturmotiv leider keinerlei Rückschlüsse ziehen, da Hydrolasen dieser Klasse strukturell definiert sind und somit diverse Spezifitäten aufweisen können. So finden sich unter den Mitgliedern dieser Klasse unter anderem verschiedene Acetylcholinesterasen, Lipasen,

Peptidasen und Peroxidasen, welche in der ESTER Datenbank zusammengefaßt sind (Cousin X. *et al.*, 1998; [www.ensam.inra.fr /cholinesterase](http://www.ensam.inra.fr/cholinesterase)). Obwohl zur Klasse der Proteine mit α/β -Hydrolase Strukturmotiv auch solche aus höheren Eukaryoten gezählt werden, z.B. die Acetylcholinesterase, weisen diese nur relativ geringe Ähnlichkeit zu ACP33 auf. Die zu ACP33 ähnlichsten Mitglieder waren pseudomoniale Enol-Lacton-, Aryl-Ester- und Dienoat Hydrolasen (Abschnitt 6.1.2).

Zur Charakterisierung von Hydrolasen unbekannter Spezifität wurde von vielen Autoren para-Nitrophenylbutyrat als ein relativ promiskes, leicht zu analysierendes Substrat verwendet. In Abbildung 6.7 ist die Analyse der katalytischen Aktivität diverser ACP33 Proteinpräparationen auf die Hydrolyse von para-Nitrophenylbutyrat dargestellt. Im Gegensatz zu Trypsin wies keine der ACP33 Präparationen detektierbare hydrolytische Aktivität auf. Allerdings schließt dies nicht aus, daß ACP33 auf andere Substrate oder unter veränderten Reaktionsbedingungen dennoch als Hydrolase fungieren kann, insbesondere bei anderen pH-Werten als den analysierten. Da die zytoplasmatische Domäne von CD4 einen potentiellen Liganden von ACP33 darstellt, erscheint diese auch als Kandidat für ein mögliches ACP33 Substrat in Frage zu kommen. Es gibt jedoch weder in der Literatur noch durch die hier dokumentierten Arbeiten Evidenzen für die Existenz von proteolytischen Zwischenprodukten des CD4 Moleküls.

Interessanterweise sind unter den in der ESTER Datenbank erfaßten Proteine mit α/β -Hydrolase Strukturmotiv auch solche, die höchstwahrscheinlich keine katalytische Aktivität besitzen, so zum Beispiel Neurologin, Neurotactin und Glutactin (de la Escalera S. *et al.*, 1990; Hortsch M. *et al.*, 1990; Krejci E. *et al.*, 1991; www.ensam.inra.fr/cgi-bin/ace/family/Achedb?name=Non-catalytic). Diesen Proteinen gemeinsam ist die Substitution eines oder mehrerer Aminosäurereste, welche die katalytischen Triade bilden und somit für die hydrolytische Aktivität unabdingbar sind. Bei den genannten Proteinen handelt es sich interessanterweise um Transmembranproteine, in denen der zu Hydrolasen homologe Bereich im extrazellulären Anteil lokalisiert ist. Es wurde im Fall von Neurotactin postuliert, daß evolutionär durch die Inaktivierung der katalytischen Funktion einer Hydrolase eine neuartige Protein-Interaktionsdomäne geschaffen wurde (Barthalay T. *et al.*, 1990; Krejci E. *et al.*, 1991). Außer für Proteine mit α/β -Hydrolase Strukturmotiv wurde ein ähnlicher evolutiver Mechanismus auch für Transkriptionsfaktoren und Phosphatase-ähnliche Proteine postuliert (Aravind L. und Koonin E.V., 1997; Wishart M.J. und Dixon J.E., 1998).

Diese Befunde unterstützen eine Hypothese, wonach der zu Hydrolasen homologe - nahezu das gesamte Protein umfassende - Abschnitt von ACP33 eine Protein-Protein Interaktionsdomäne darstellt, welche unter anderem für die Bindung an CD4 verantwortlich sein könnte. Möglicherweise sind ein oder mehrere Reste einer ehemals katalytischen Triade in ACP33 gegen Reste substituiert, welche eine enzymatische Funktion nicht länger unterstützen.

7.2.3 Serinrest 109 ist essentiell für Ligandenbindung

Leider können die Reste der potentiellen katalytischen Triade in ACP33 wegen der geringen Ähnlichkeit zu bekannten Hydrolasen nicht zugeordnet werden. Eine Ausnahme bildet jedoch der nukleophile Rest der Triade, welcher bei allen Vertretern von Hydrolasen mit α/β -Strukturmotiv in einer charakteristischen topologischen Anordnung vorliegt, dem sogenannten Nukleophil-Ellenbogen (Ollis D.L. *et al.*, 1992). Dieses Motiv ist gekennzeichnet durch die konservierte Position des nukleophilen Rests innerhalb einer bestimmten Folge von Sekundärstrukturelementen (Abschnitt 6.1.2). Im Fall von ACP33 und dem homologen Protein CAB45970 ergeben Sekundärstrukturvorhersagen für die Region um den Serinrest 109 von ACP33 ein entsprechendes Strukturmotiv (Abbildung 6.4). Aus diesem Grund wurde der ACP33 Serinrest 109 gegen Alanin substituiert und analysiert, ob diese Variante noch Interaktionsfähigkeit mit CD4 besitzt. Diese Untersuchungen geschahen in Zusammenarbeit mit Pinar Sirim, die auch die in Abbildung 6.10 gezeigte Copräzipitationsanalyse aus Lysaten transfizierter COS7 Zellen durchführte. Während ein Immunglobulin-Fusionsprotein der ACP33 Wildtypform unter diesen Bedingungen mit CD4 interagierte, war dies für die ACP33 S109A Variante nicht nachweisbar. Offenbar ist der Serinrest 109 essentieller Bestandteil der Protein-Interaktionsdeterminante in ACP33, welche für die Bindung an CD4 verantwortlich ist (Abbildung 7.2).

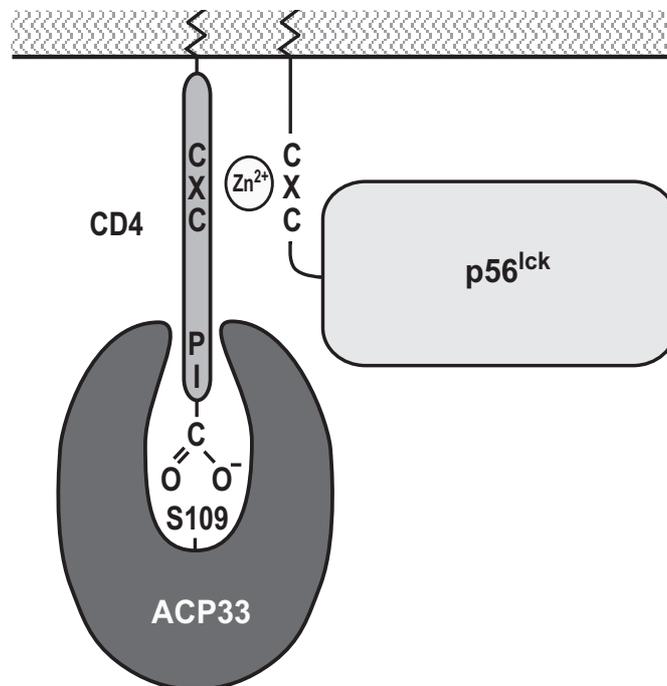


Abbildung 7.2: Schematisches Modell der Interaktionsdeterminanten des putativen Komplexes aus CD4, p56^{lck} und ACP33. Die Bindung von p56^{lck} erfolgt über die Komplexbildung eines Zink-Ions durch zwei Cysteinreste in p56^{lck} und der zytoplasmatischen Domäne von CD4 (Lin R.S. *et al.*, 1998). Die Interaktionsdeterminante für ACP33 stellen offenbar zwei hydrophobe Aminosäuren am Carboxyterminus von CD4 dar. Auf Seiten von ACP33 ist der Serinrest 109 essentiell für eine stabile Bindung an CD4.

Interessanterweise unterschied sich die Lokalisation von Fusionsproteinen der ACP33 S109A Variante nicht erkennbar von derjenigen der Wildtypform. Sowohl durch biochemische Fraktionierungsexperimente als auch durch Immunofluoreszenzanalyse ergaben sich für beide Proteinen eine ähnliche Verteilung zwischen Zytosol und intrazellulären Membranen. Offenbar enthält ACP33 eine bislang nicht identifizierte, weitere Interaktionsdeterminante, welche die Membranrekrutierung unabhängig vom Serinrest 109 vermittelt. Wegen dem Vorhandensein zweier Interaktionsdeterminanten scheint ACP33 die Funktion eines Adapterproteins auszuüben.

Zusammengenommen ergaben sich keinerlei Hinweise für eine hydrolytische Aktivität von ACP33, wohl aber mehrere Evidenzen, welche eine nicht-katalytische Adapterfunktion von ACP33 unterstützen. Hierfür sprechen - neben den bereits erwähnten Bindungsstudien an CD4 - auch die fehlende hydrolytische Aktivität verschiedener ACP33 Präparationen gegenüber einem promisklen Substrat, sowie die mehrfach dokumentierten Beispiele einer evolutiven Konversion von enzymatischer Aktivität in Adapterfunktion. Eine entscheidende Schwäche der bisherigen Interaktionsanalysen liegt jedoch in der Verwendung von überexprimierten Fusionsproteinen von ACP33. Es konnte bislang trotz intensiver Bemühungen keine Interaktion der nativen, endogenen Proteine detektiert werden (Abbildung 6.11 und nicht gezeigt). Weitere Interaktionsanalysen sowie eine Strukturanalyse des ACP33 Proteins erscheinen allerdings notwendig zu sein, um eine aussagekräftigere Differenzierung zwischen einer enzymatischen oder einer Adapterfunktion vornehmen zu können.

7.3 ACP33 als modulierender Faktor der CD4-Funktion

Durch Bindungsstudien im Hefe-*Two-Hybrid* System und durch Copräzipitationsanalysen aus Lysaten transfizierter COS7 Zellen waren die beiden C-terminalen, hydrophoben Reste der CD4 zytoplasmatischen Domäne als essentiell für die Interaktion mit ACP33 identifiziert worden. Es lag daher nahe, eine interaktionsdefiziente CD4 Variante hinsichtlich ihrer costimulatorischen Aktivität in antigeninduzierter T-Zell Aktivierung zu untersuchen, um somit Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von ACP33 an der Regulation der funktionellen Aktivität von CD4 zu erhalten.

7.3.1 Copräzipitationsanalysen von ACP33 und CD4 in T-Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob eine Interaktion von ACP33 mit CD4 auch in T-Zellen detektierbar sein würde. Analog zu den Experimenten in COS7 Zellen (Abbildung 6.10) wurden demnach ein Immunglobulin Fusionsprotein von ACP33 mittels transients Transfektion in der CD4 positiven T-Zelllinie HUT78 exprimiert und dessen Assoziation mit endogenem CD4 über Copräzipitation bestätigt (Abbildung 6.8). Mittels Expression verschiedener CD4 Varianten in einem CD4 defizienten Jurkat T-Zell-Derivat konnte darüber

hinaus verifiziert werden, daß eine Deletion der C-terminalen Aminosäuren der CD4 zytoplasmatischen Domäne auch unter diesen Bedingungen zum Verlust der detektierbaren Interaktion mit dem Fusionsprotein von ACP33 führt (Abbildung 6.9).

Leider konnte jedoch auch in T-Zellen trotz intensiver Bemühungen keine Interaktion der nativen, nicht-überexprimierten Proteine mittels Copräzipitation dokumentiert werden. Es ist deshalb bislang unklar, ob in Zellen endogenes ACP33 tatsächlich in nennenswerter Menge mit CD4 assoziiert vorliegt. Auch nach Stimulation mit Antigen oder mit PMA sowie nach Inhibition lysosomaler Ansäuerung war keine Bindung detektierbar. Es erscheint möglich, daß die dokumentierbare Interaktion von ACP33 Fusionsproteinen mit CD4 auf deren artifizieller Interaktion oder deren veränderter subzellulärer Lokalisation als Folge von Überexpression beruht. Die subzellulären Lokalisationen von endogenem ACP33 und überexprimierten Immunglobulin-Fusionsproteinen unterscheiden sich jedoch in HUT78 Zellen nicht wesentlich (Abschnitt 6.4). Wie im Folgenden diskutiert, unterstützt auch die partiell überlappende Lokalisation von endogenem ACP33 mit CD4 die Möglichkeit einer Interaktion beider Proteine, trotz der bislang fehlenden Dokumentation einer *in vivo* Bindung.

7.3.2 Partielle Colokalisation von ACP33 und CD4 in T-Zellen

Wie in Abschnitt 7.1.1 diskutiert, colokalisiert endogenes ACP Protein mit intrazellulären Vesikeln des endosomalen/trans-Golgi Netzwerks. CD4 wies in HUT78 Zellen ebenfalls eine überwiegend intrazelluläre, vesikuläre Lokalisation auf, während in anderen T-Zelllinien die Mehrzahl der CD4 Moleküle an der Plasmamembran detektierbar war (Abbildung 6.14 k und nicht gezeigte Ergebnisse). Diese Besonderheit könnte in dem konstitutiv aktivierten Phänotyp dieser Zelllinie begründet sein, da CD4 Moleküle in aktivierten T-Zellen mit hoher Frequenz aktiv internalisiert werden (Manger B. *et al.*, 1985; Bowers K. *et al.*, 1997). Die Überlagerung der Immunofluoreszenzsignale endogener CD4 und ACP33 Moleküle demonstrierte eine partielle Colokalisation beider Proteine in intrazellulären, vesikulären Strukturen (Abbildung 6.14 l). Die subzelluläre Lokalisation von CD4 und ACP33 unterstützt die Möglichkeit einer funktionell relevanten Interaktion beider Proteine in T-Zellen, selbst wenn eine direkte physikalische Interaktion nur für überexprimierte Fusionsproteine demonstriert werden konnte. Es erschien demnach lohnenswert, die funktionellen Eigenschaften von CD4 Varianten zu untersuchen, denen die Interaktionsdeterminante zu ACP33 fehlte.

7.3.3 Deletion des ACP33-Interaktionsmotivs steigert die costimulatorische Funktion von CD4

Ein für die Analyse von CD4 Funktion geeignetes Zellsystem wurde unserem Labor von Mark Hill und Dan Littman (Universität von New York) zur Verfügung gestellt. Dieses

System umfaßt die murine T-Zelllinie 171, welche nach antigenspezifischer Stimulation detektierbare Mengen an IL-2 sezerniert (Abbildung 6.15). Die Expression von CD4 auf 171 Zellen ist essentiell für die antigenabhängige Aktivierung, wobei sowohl murine als auch humane CD4 Moleküle costimulatorische Aktivität vermitteln können (Glaichenhaus N. *et al.*, 1991). Verschiedene Deletionsmutanten von humanem CD4 wurden in parentalen, CD4-defizienten 171 Zellen exprimiert und jeweils eine polyklonale Population stabil transfizierter Zellen selektiert (Abbildung 6.16). Polyklonale Zellpopulationen wurden für die funktionelle Analysen verwendet, um klonale Varianzen in der Effizienz der IL-2 Produktion nach Antigenstimulation zu minimieren. Die Oberflächenexpressionsdichte dieser CD4 Varianten und die Gesamtmenge an CD4 Reaktivität in einer Westernblotanalyse der Lysate war in allen Zellpopulationen vergleichbar (Abbildung 6.16). Dies deutet darauf hin, daß zytoplasmatische Faktoren in nicht-aktivierten 171 T-Zellen keinen signifikanten Einfluß auf die Gesamt- und Oberflächenexpressionsdichte von CD4 haben.

Die Effizienz der IL-2 Produktion dieser verschiedenen 171 T-Zellpopulationen wurde nach antigenabhängiger Stimulation mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 6.17). Die Zellpopulation, welche die CD4 Mutante 431* exprimierten, sezernierten nach Stimulation mit saturierenden Antigenkonzentrationen eine etwa dreifach höhere Menge an IL-2 im Vergleich zur Population, welche die CD4 Wildtypform exprimierten. Der CD4 Variante 431* fehlen die beiden C-terminalen, hydrophoben Aminosäuren, welche für die Bindung von ACP33 essentiell sind. Obwohl keine klonalen Varianzen zu erwarten waren, wurde dieser hyperaktive Phänotyp der 431* Mutante in drei weiteren, aus unabhängigen Transfektionen selektierten Zellpopulationen bestätigt. In allen drei Fällen sezernierten die 431* exprimierenden Zellpopulationen nach saturierender Stimulation eine drei bis vierfach höhere Menge an IL-2 als die CD4 exprimierenden Zellpopulationen. Demnach korreliert die Bindung von ACP33 mit einer Attenuation der costimulatorischen Funktion von CD4 in 171 Zellen.

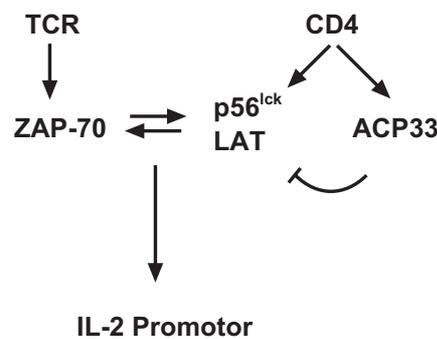
Wie im folgenden Abschnitt erwähnt, konnte dieser Befund auch für CD4 abhängige Signaltransduktion in JCaM1 Zellen bestätigt werden, daß heißt in einem deutlich unterschiedlichen funktionellen Kontext.

7.4 Potentielle Mechanismen der inhibitorischen Aktivität von ACP33

Die beiden hydrophoben, carboxyterminalen Aminosäuren der CD4 zytoplasmatischen Domäne vermitteln offenbar einen attenuierenden Effekt auf T-Zell Aktivierung, welcher möglicherweise mit der Assoziation von ACP33 in Zusammenhang steht. Welche Mechanismen können prinzipiell für die gesteigerte Aktivität der 431* Variante verantwortlich sein? Grundsätzlich in Frage kommen hierfür entweder die unmittelbare Stimulation eines positiv-regulatorischen Signals, dessen verminderter Attenuation oder die Inhibition eines aktiven, negativ-regulatorischen Signals. Die potentiellen Mechanismen der Inhibition

von T-Zell Aktivierung durch ACP33 sind in Abbildung 7.3 veranschaulicht und im Folgenden diskutiert.

1) Inhibition bzw. 2) Attenuation stimulierender Signale:



3) Unabhängige, inhibitorische Signaltransduktion durch ACP33:

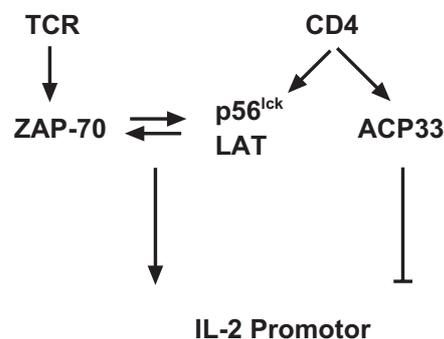


Abbildung 7.3: **Potentielle Mechanismen der Inhibition von T-Zell Aktivierung durch ACP33.** Mit spitzen Pfeilen sind stimulatorische funktionelle Interaktionen im Kontext der TCR- und CD4-vermittelten Signaltransduktion veranschaulicht, während stumpfe Pfeile inhibitorische Aktivität versinnbildlichen. ACP33 könnte zum einen stimulatorische Signale negativ beeinflussen durch (1) direkte Inhibition oder (2) Attenuation, zum anderen aber auch eine (3) unabhängige, inhibitorische Signaltransduktionskaskade initiieren, welche die Aktivierung des IL-2 Promotors unmittelbar reduziert.

7.4.1 Inhibition stimulatorischer Signaltransduktion durch ACP33

Wie einleitend erwähnt, leistet die assoziierte Tyrosinkinase p56^{lck} einen wesentlichen Beitrag zur costimulatorischen Funktion von CD4 (Glaichenhaus N. *et al.*, 1991; Collins T.L. *et al.*, 1992; Xu H. und Littman D., 1993; Ravichandran K.S. *et al.*, 1996). Ein denkbarer Mechanismus des hyperaktiven 431* Phänotyps bestünde daher in einer Stimulation der Aktivität von p56^{lck}, welche möglicherweise bedingt wäre durch den Verlust der

inhibitorischen Wirkung oder der kompetitiven CD4-Interaktion von ACP33. Mehrere Evidenzen sprechen jedoch klar gegen diese Hypothese:

- 1) Die Stöchiometrie der Interaktion zwischen p56^{lck} und der 431* Deletionsmutante ist unverändert gegenüber derjenigen der CD4 Wildtypform (Abbildung 6.16).
- 2) Die ACP33 Bindung an die CD4 zytoplasmatische Domäne beeinflusst offenbar nicht die Interaktion mit p56^{lck}, da ein trimere Komplex dieser Proteine nachweisbar ist, und sich dessen Stöchiometrie nicht erkennbar von derjenigen dimerer Komplexe unterscheidet (Pinar Sirim, persönliche Mitteilung).
- 3) Die 431* Variante von CD4 weist auch nach Expression in p56^{lck} defizienten JCaM1 T-Zellen eine gesteigerte Funktionalität gegenüber der CD4 Wildtypform auf (Abbildung 6.18).

Insbesondere der letztgenannten Befund unterstützt - aufgrund genetischer Evidenzen - einen von p56^{lck} unabhängigen Mechanismus. Transiente Expression der CD4 Wildtypform in JCaM1 Zellen resultierte überraschenderweise in einer signifikanten Induktion des IL-2 Promotors nach Stimulation durch PMA, während in nicht-transfizierten JCaM1 Zellen kein vergleichbarer Effekt zu beobachten war. Expression der 431* Variante hingegen, führte - unter ansonsten gleichen Bedingungen - zu einer etwa 1,7-fach gesteigerten Induktion des IL-2 Promotors im Vergleich zur Wildtypform von CD4. Offenbar existieren demnach zumindest in JCaM1 Zellen p56^{lck} unabhängige Mechanismen, welche stimulatorische Signaltransduktion durch CD4 vermitteln können. Diese putativen Faktoren wären von einem Bereich der CD4 zytoplasmatischen Domäne abhängig, welcher mindestens die Aminosäuren 429 bis 419 umfaßt, also unabhängig von der Assoziation mit ACP33 wäre. Eine Mutation der beiden Cysteinreste 420 und 422 der CD4 zytoplasmatischen Domäne, welche essentiell für die Bindung von p56^{lck} sind, sollte die Wirkung dieser putativen Faktoren auf die Induktion des IL-2 Promotors um etwa 50 % reduzieren (Abbildung 6.18). In der Tat wurde mit p36-38 LAT kürzlich ein CD4- und CD8-bindendes Protein beschrieben, welches die genannten Kriterien erfüllt (Bosselut R. *et al.*, 1999). Die Assoziation von LAT mit der zytoplasmatischen Domäne von CD8 reduziert sich nämlich durch Mutation der entsprechenden Cysteinreste um etwa 70 %. Demnach ist LAT ein wahrscheinlicher Kandidat eines CD4-assoziierten Proteins, welches p56^{lck} unabhängige Signaltransduktion vermitteln könnte. In JCaM1 Zellen würde demnach eine Stimulation der LAT-abhängigen Signaltransduktion ein potentieller Mechanismus der Hyperfunktionalität der 431* Mutante sein. Einschränkend muß erwähnt werden, daß die p56^{lck}-unabhängige Komponente der CD4 vermittelten Signaltransduktion nur in JCaM1 Zellen, nicht aber in antigenstimulierten 171 T-Zellen zu beobachten war. Im Gegensatz zu JCaM1 Zellen wies in 171 Zellen allerdings auch schon die

Expression einer CD4 Variante ohne zytoplasmatische Domäne stimulierende Effekte im Vergleich zur CD4 negativen Zellpopulationen auf (Abbildung 6.17). Zelltyp- oder spezie-spezifische Faktoren sowie die verschiedenen Expressionsdichten der CD4 Varianten in den genannten Zelltypen mögen für diese detaillierten Unterschiede verantwortlich sein.

Wie bereits einleitend erwähnt, sind sowohl p56^{lck} als auch p36-38 LAT in Substrukturen der Plasmamembran angereichert, die sich durch ihre geringe Sedimentationsdichte und ihre Resistenz gegenüber nicht-ionischer Detergenzien auszeichnen (Cinek T. und Horejsi V., 1992; Brdicka T. *et al.*, 1998; Lin J. *et al.*, 1999). Auch die Mehrzahl der CD4 Moleküle scheint unabhängig von der Bindung an p56^{lck} in diese Membrankompartimente rekrutiert zu werden (Cinek T. *et al.*, 1995; Parolini I. *et al.*, 1996; Millan J. *et al.*, 1999). Obwohl die funktionelle Bedeutung der Kompartimentierung zellulärer Membranen nicht verstanden ist, könnte sie in ruhenden T-Zellen unter anderem zur Sequestrierung des CD4-p56^{lck} Komplexes vom T-Zell-Rezeptor dienen und somit regulatorisches Potential besitzen (Horejsi V. *et al.*, 1999; Langlet C. *et al.*, 2000; Kane L.P. *et al.*, 2000). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Vaclav Horejsi (Tschechische Akademie für Wissenschaften, Prag) wurde analysiert, ob sich die Verteilung der CD4 Wildtypform von derjenigen der 431* Variante in stabil transfizierten 171 Zellen unterscheidet. Erschwert wurde diese Analyse durch eine offenbar veränderte Detergenzsolubilität der glykolipidhaltigen Membrankompartimente in murinen 171 T-Zellen im Vergleich zu humanen Zelllinie (Vaclav Horejsi; persönliche Mitteilung). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Verteilung von CD4 und seiner 431* Variante beobachtet werden (V. Horejsi und Kollegen, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird CD4 zum einen über die Interaktion mit p56^{lck} und p36-38 LAT, zum anderen über Palmitoylierung der Cysteinreste 394 und 396 der zytoplasmatischen Domäne von CD4 in detergenzunlösliche Membrankompartimente rekrutiert (Crise B. und Rose J.K., 1992).

7.4.2 Attenuation der CD4-vermittelten Costimulation von T-Zell Aktivierung

Wie erwähnt, könnte - neben der aktiven Stimulation eines positiv-regulatorischen Signals - auch eine Inhibition von Attenuation die Hyperfunktionalität der 431* Mutante hinsichtlich antigeninduzierter IL-2 Produktion bedingen. Bereits einleitend wurde dargelegt, daß eine Attenuation der CD4 abhängigen Costimulation von T-Zellen durch sukzessive Internalisierung und Degradation von CD4 stattfinden könnte. Beide Regulationsmechanismen könnten potentiell durch die hydrophoben, carboxyterminalen Aminosäuren der CD4 zytoplasmatischen Domäne und somit durch die Rekrutierung von ACP33 beeinflusst werden.

Attenuation der CD4 Signaltransduktion erfolgt offenbar durch induzierbare Endozytose von ligandengebundenen CD4 Molekülen, die nachfolgend in lysosomalen Kompartimenten degradiert werden (Marsh M. und Pelchen-Matthews A., 1996). Beide Prozesse werden durch TCR-vermittelte T-Zell Aktivierung induziert (Acres R.B. *et al.*, 1986), können aber imitiert werden durch Quervernetzung mit anti-CD4 Antikörpern (Morel P. *et al.*, 1992), durch

Ganglioside (Garofalo T. *et al.*, 1998) oder durch Stimulation mit Phorbolestern (Triebel F. *et al.*, 1986). Internalisierung und Degradation von CD4 sind entkoppelte Prozesse, da nach Endozytose alternativ zur Degradation auch ein Rücktransport an die Plasmamembran möglich ist (Pelchen-Matthews A. *et al.*, 1993). Die entsprechenden Sequestrierungsprozesse scheinen in spezialisierten frühen endosomalen Kompartimenten stattzufinden (van Ijzendoorn S.C. und Hoekstra D., 1999; Mellman I. und Warren G., 2000; Sonnichsen B. *et al.*, 2000).

Endozytose von CD4 nach PMA-Stimulation von Zellen wird offenbar induziert, indem eine direkte Interaktion der membranproximalen Region der CD4-zytoplasmatischen Domäne mit Clathrin Adapterproteinen gefördert wird (Pitcher C. *et al.*, 1999). Diese Region umfaßt das Di-Leucin Motiv und die beiden Serinreste 408 und 415. Stimulation mit Phorbolestern induziert in Abhängigkeit von PKC die Phosphorylierung dieser Serinreste, die Dissoziation des CD4-p56^{lck} Komplexes und möglicherweise eine Umverteilung von CD4 in detergenez-lösliche Membrankompartimente, wo effiziente Internalisierung über Clathrin vermittelte Endozytose erfolgen kann (Parolini I. *et al.*, 1999). Bestimmte Ganglioside führen jedoch offenbar phosphorylierungsunabhängig zur Internalisierung von CD4, wobei jedoch Mechanismus und physiologische Relevanz hierfür bislang unklar sind (Repke H. *et al.*, 1992; Sorio C. *et al.*, 1993).

Endozytose und Degradation von CD4 bzw. seiner hyperfunktionellen 431* Variante wurde im Laufe der hier dokumentierten Analysen intensiv untersucht und verglichen. Internalisierung wurde durch den anti-CD4 Antikörper B66 und durch Stimulation mit PMA induziert und mittels durchflußzytometrischer Bestimmung der Oberflächenexpressionsdichte des CD4 Epitops quantifiziert. CD4 und seine 431* Variante wurden jedoch in verschiedenen T-Zelllinien und in transfizierten COS7 Zellen mit vergleichbarer Kinetik internalisiert, erst eine Deletion des Di-Leucin Motivs resultierte in einer massiven Reduktion der Endozytose-Rate (nicht gezeigt). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen CD4 und der 431* Variante ergaben sich für deren Degradation nach Stimulation mit Antigen oder PMA, welche mittels Oberflächen-Biotinylierung und Immunpräzipitation von CD4 verfolgt wurde (nicht gezeigt).

7.4.3 Inhibitorische Signaltransduktion durch CD4

Neben Attenuation eines positiv-regulatorischen Signals wurden für CD4 auch eine aktive, negativ-regulatorische Signaltransduktion beschrieben, welche sich inhibitorisch auf T-Zell Aktivierung auswirkt. Auch diese Signale könnten potentiell durch den hydrophoben C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne beeinflußt werden und somit die Hyperaktivität der 431* Variante von CD4 bedingen.

Aktive inhibitorische Signale auf T-Zell Aktivierung vermittelt CD4 offenbar nach TCR/MHC unabhängiger Ligation, beispielsweise nach Bindung von IL-16 (Cruikshank W.W. *et al.*, 1996; Ogasawara H. *et al.*, 1999), von gp17 (Gaubin M. *et al.*, 1999), von HIV

gp-120 (Mittler R.S. und Hoffmann M.K., 1989) oder von anti-CD4 Antikörpern (Bank I. und Chess L., 1985). Auch eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität des HIV LTRs nach CD4 Quervernetzung mittels IL-16 (Maciaszek J.W. *et al.*, 1997) oder mittels bestimmter Antikörper (Lemasson I. *et al.*, 1996) wurde beschrieben.

Die physiologische Relevanz dieser Befunde bleibt bislang jedoch unklar. Ebenso wenig charakterisiert sind die zugrundeliegenden Mechanismen, welche sich aber offenbar für die jeweiligen CD4 Liganden und für verschiedene Zelltypen unterscheiden. In einigen Fällen wurde untersucht, ob die Assoziation von CD4 mit p56^{lck} in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist. Antigeninduzierte, CD4-unabhängige T-Zell Aktivierung wird durch gleichzeitige CD4 Ligation mittels gp-120 oder mittels Antikörper inhibiert (Gratton S. *et al.*, 1998; Bonnard M. *et al.*, 1999). Diese Inhibition ist in beiden Fällen unabhängig von einer Interaktion zwischen CD4 und p56^{lck}. Leider wurde in diesen Studien nicht analysiert, ob die zytoplasmatische Domäne von CD4 für die Vermittlung des inhibitorischen Signals notwendig ist. Auch die bereits erwähnte Inhibition der transkriptionellen Aktivität des HIV LTRs in T-Zellen nach CD4 Ligation mittels spezifischer Antikörper ist offenbar unabhängig von der CD4 Assoziation mit p56^{lck} (Coudronniere N. *et al.*, 1998), benötigt aber die zytoplasmatischen Domäne von CD4 oder von CD8 (Benkirane M. *et al.*, 1995). Demzufolge wurden von Coudronniere *et al.* alternative Liganden der CD4 und CD8 zytoplasmatischen Domänen postuliert, welche diesen inhibierenden Effekt vermitteln können. Mögliche Kandidaten hierfür sind p36-38 LAT und ein weiteres Protein unbekannter Sequenz mit der Bezeichnung CD4IP-MT2 (Mesnard J.M. *et al.*, 1997). Für ACP33 konnte indes keine Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne von CD8 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Ein weiteres Phänomen, welches als CD4-vermittelte, negativ-regulatorische Signaltransduktion verstanden werden kann, ist die Induktion von Apoptose in T-Zellen nach HIV Infektion (Corbeil J. *et al.*, 1996). Ohne gleichzeitige TCR-Stimulation induziert eine Antikörper- oder gp-120-vermittelte Quervernetzung von CD4 Apoptose von ruhenden, peripheren T-Zellen (Algecira A. *et al.*, 1998), möglicherweise als Resultat einer verstärkten Expression pro-apoptotischer Proteine wie Bax (Somma F. *et al.*, 2000) und Fas (Tateyama M. *et al.*, 2000) und einer gleichzeitigen Reduktion der Bcl-2 Expression (Hashimoto F. *et al.*, 1997). Kürzlich wurde gezeigt, daß die Region zwischen den Aminosäuren 402 und 418 der CD4 zytoplasmatischen Domäne notwendig und hinreichend für die Induktion apoptotischer Signale nach HIV Infektion ist, ohne daß jedoch das darin enthaltene Di-Leucin Motiv essentiell gewesen wäre (Moutouh L. *et al.*, 1998). Offenbar ist demnach weder die Assoziation von ACP33 noch die von p56^{lck} oder HIV nef mit der CD4-zytoplasmatischen Domäne für die Ausprägung dieses apoptotischen Effekts essentiell, sondern möglicherweise die Bindung eines bislang unbekanntes Proteins. Weiterhin ist bislang unklar, ob die Induktion von Apoptose in T-Zellen nach HIV Infektion durch virale Faktoren wie gp-120, nef oder vpu beeinflußt wird.

Insgesamt ergeben sich also aus bisher publizierten Befunden keine konkreten Hinweise auf eine Beteiligung des hydrophoben Carboxyterminus der CD4-zytoplasmatischen Domäne

an der CD4-abhängigen inhibitorischen und apoptotischen Signaltransduktion. Auf eine experimentelle Analyse dieser Effekte wurde verzichtet, nicht zuletzt da die genannten Untersuchungen spezifische zelluläre Systeme, Antikörper oder HIV Infektionsstudien verlangt hätten, welche im Rahmen der vorläufigen Charakterisierung von ACP33 nicht verfügbar waren. Darüber hinaus ist die physiologische Bedeutung der inhibitorischen Signaltransduktion durch CD4 unklar.

Zusammengenommen konnten also aufgrund der Analyse CD4-abhängiger Signaltransduktionsmechanismen keine Hinweise erhalten werden, auf welche Weise die Deletion der ACP33 Interaktionsdeterminante die Hyperfunktionalität der 431* Variante von CD4 bedingen könnte. Als alternative experimentelle Strategie zur Beantwortung dieser Frage wurden daraufhin Überexpressionsstudien mit ACP33 Fusionsproteinen durchgeführt.

7.4.4 Funktionelle Analysen nach Überexpression von ACP33-Fusionsproteinen

Direkte genetische Analysen der ACP33 Funktion waren nur in Überexpressionssystemen möglich, da keine ACP33 defiziente Zelllinie identifiziert werden oder durch Antisense Strategien generiert werden konnte. Aus bislang unbekanntem Gründen ließ sich darüber hinaus ACP33 in seiner nativen Form in keinem transienten Transfektionssystem über die endogenen Proteinmengen hinaus exprimieren (Abbildung 6.6). Fusioniert mit N-terminalem, zytoplasmatischem Immunglobulinanteil (cIg-ACP33) wurde demgegenüber merkliche Überexpression beobachtet, während ein N-terminales flag- und ein C-terminales myc-Fusionsprotein mit geringerer Effizienz exprimiert wurden als das endogene Protein. Exprimierbar war weiterhin ein transmembranes Fusionsprotein mit extrazellulärem Immunglobulinanteil und einem zytoplasmatischen Anteil bestehend aus dem ACP33 Protein (sIg-ACP33), welches auf diese Weise konstitutiv an zelluläre Membranen rekrutiert wird.

Analysiert wurden deshalb Effekte einer Überexpression von cIg- und sIg-ACP33 auf die Induktion des IL-2 Promotors in transient transfizierten Jurkat T-Zellen sowie auf die CD4 Oberflächenexpressionsdichte. Durch Überexpression des zytoplasmatisch exprimierten cIg-Fusionsproteins von ACP33 konnte jedoch kein signifikanter Effekt auf die untersuchten Parameter beobachtet werden. So wurde beispielsweise intensiv analysiert, ob bei gleichzeitiger Überexpression von CD4 und cIg-ACP33 in JCaM1 Zellen sich Effekte auf die IL-2 Promotorinduktion durch PMA Stimulation oder auf die Expressionsdichte transfizierter CD4 Moleküle ergeben (entsprechend Abbildung 6.18). Beide Parameter blieben jedoch nach Expression von cIg-ACP33 unverändert. Das Mengenverhältnis von überexprimiertem Fusionsprotein zum endogenen ACP33 Protein lag jedoch nur in einer Größenordnung von etwa fünf zu eins (Abbildung 6.6), was möglicherweise nicht ausreichend für eine Beeinflussung funktioneller Parameter gewesen sein mag.

Da ACP33 offenbar an zelluläre Membranen rekrutiert werden kann, wurde ein transmembran exprimiertes Immunglobulin-Fusionsprotein konstruiert (Abbildung 6.6). Durch

konstitutive Membranlokalisation von ACP33 sollte eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration an einem potentiellen Wirkort erreicht und somit eventuell dessen funktionelle Aktivität verstärkt werden. Die Expression dieser transmembranen Form des ACP33-Immunglobulinfusionsproteins (sIg-ACP33) resultierte überraschenderweise in einer massiven Induktion des IL-2 Promotors bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA (Abbildung 6.19). Wie ebenfalls in Abbildung 6.19 gezeigt, wird sIg-ACP33 mit ähnlicher Effizienz an der Plasmamembran exprimiert wie ein transmembranes Fusionsprotein der Syk Tyrosinkinase. Aus unbekanntem Gründen war dieser Effekt wiederum am deutlichsten nach Transfektion von JCaM1 Zellen (Abbildung 6.20), wo sIg-ACP33 zu einer effizienteren Induktion des IL-2 Promotors führte als Expression von sIg-Syk. Offenbar kooperiert also ein konstitutiv an die Plasmamembran rekrutiertes ACP33 Fusionsprotein mit PMA hinsichtlich der Induktion des IL-2 Promotors. Überraschenderweise war die S109A Variante von sIg-ACP33 hierin ähnlich effizient wie die Wildtypform, was darauf hindeutet, daß diese Funktion unabhängig von der Bindung an CD4-ähnliche Liganden sein könnte (Abbildung 6.20). Offenbar hat eine konstitutiv membrangebundene ACP33 Variante das Potential, direkte Signaltransduktion ohne Vermittlung durch CD4 zu initiieren. Die Determinante des sIg-ACP33 Proteins, welche diese Induktion des IL-2 Promotors vermittelt, konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden.

Wie läßt der stimulierende Effekt einer transmembran exprimierten Variante des ACP33 Proteins auf die Induktion des IL-2 Promotors in Einklang bringen mit dem inhibitorischen Effekt, den die ACP33 Bindungsdomäne auf die costimulatorische Funktion von CD4 aufweist? Ein grundsätzliches Problem von Überexpressionsstudien zur Analyse funktioneller Zusammenhänge betrifft zum einen die veränderte subzelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins, welche im Fall des transmembranen sIg-ACP33 Fusionsproteins bewußt forciert wird. Die Interpretierbarkeit der Befunde wird durch dessen artifizielle, eventuell unphysiologische Lokalisation sicherlich stark eingeschränkt.

Zum anderen führt aber die Überexpression von Proteinen häufig zu artifiziellen dominant-negativen Effekten, z.B. durch Sequestrierung von Stimuli und Effektoren (*sequestration*) oder durch Erschöpfung von positiv-regulatorischen Mechanismen (*exhaustion*). Von einem nicht-katalytischen Adapterprotein ist grundsätzlich eher ein dominant-negativer Effekt auf die Funktionalität des endogenen Proteins zu erwarten, da durch dessen Überexpression in der Regel stimulierende Faktoren und Effektorproteine entkoppelt werden sollten. Eine mögliche Interpretation des dominant-positiven Effekts des transmembranen sIg-ACP33 Fusionsproteins auf die Induktion des IL-2 Promotors könnte somit unter anderem auch ein dominant-negativer Effekt auf unbekannte inhibitorische Signale sein. Mit anderen Worten: die forcierte Membranlokalisation von ACP33 könnte mit der konstitutiven Negativregulation des IL-2 Promotors interferieren und somit - zusammen mit PMA - zu dessen Aktivierung führen. Obwohl die Aussagekraft dieser Experimente limitiert ist, sind somit dennoch alle erhaltenen Befunde konsistent mit einer inhibitorischen Funktion von ACP33 auf T-Zell Aktivierung. Bislang basiert jedoch die Zuordnung von ACP33 zu einer inhibitorischen Funktion lediglich auf Korrelation und bleiben somit spekulativ.

7.5 Ausblick

Weitere funktionelle Analysen sind erforderlich, um den vermutlich inhibitorischen Einfluß von ACP33 auf T-Zell Aktivierung zweifelsfrei zu dokumentieren. Aussagekräftige genetische Evidenzen für die zelluläre und physiologische Funktion von ACP33 könnten beispielsweise mittels Gendisruption in Mäusen oder vergleichbaren Techniken erfolgen. Darüber hinaus bedarf es definitiver Klärung, ob ACP33 enzymatische Aktivität besitzt oder tatsächlich einen katalytisch inaktiven Vertreter der Proteinfamilie mit α/β -Hydrolase Strukturmotiv darstellt. Hierzu scheinen umfangreiche Enzymtests und Strukturbestimmungen unumgänglich. Mit biochemischen und genetischen Methoden könnten auch alternative ACP33 Bindungspartner neben CD4 identifiziert werden. Schließlich sollte die subzelluläre Lokalisation von ACP33 mittels feiner auflösender zellulärer Marker weiter eingrenzbar sein.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

1. **Abraham, N., Miceli, M. C., Parnes, J. R., and Veillette, A.** (1991). Enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Nature* **350**: 62-66.
2. **Acuto, O., and Cantrell, D.** (2000). T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* **18**: 165-184.
3. **Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fleischmann, R. D., Fuldner, R. A., Bult, C. J., Lee, N. H., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Gocayne, J. D., White, O., and et, a. I.** (1995). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* **377(6547 Suppl)**: 3-174.
4. **Algeciras, A., Dockrell, D. H., Lynch, D. H., and Paya, C. V.** (1998). CD4 regulates susceptibility to Fas ligand- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J Exp Med* **187**: 711-720.
5. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
6. **Anderson, R. G., and Pathak, R. K.** (1985). Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. *Cell* **40**: 635-643.
7. **Anton, van, der, Merwe, P, Davis, S. J., Shaw, A. S., and Dustin, M. L.** (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* **12**: 5-21.
8. **Aravind, L., and Koonin, E. V.** (1998). Eukaryotic transcription regulators derive from ancient enzymatic domains. *Curr Biol* **8**: R111-113.
9. **Ashe, J. M., Wiest, D. L., Abe, R., and Singer, A.** (1999). ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck). *J Exp Med* **189**: 1163-1168.
10. **Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P., and Finkel, T. H.** (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* **176**: 1099-1106.
11. **Bank, I., and Chess, L.** (1985). Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J Exp Med* **162**: 1294-1303.
12. **Basmaciogullari, S., Autiero, M., Culerrier, R., Mani, J. C., Gaubin, M., Mishal, Z., Guardiola, J., Granier, C., and Piatier, T. D.** (2000). Mapping the CD4 binding domain of gp17, a glycoprotein secreted from seminal vesicles and breast carcinomas. *Biochemistry* **39**: 5332-5340.
13. **Bell, G. M., Fagnoli, J., Bolen, J. B., Kish, L., and Imboden, J. B.** (1996). The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J Exp Med* **183**: 169-178.
14. **Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M.** (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
15. **Bilder, D., and Perrimon, N.** (1999). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**: 676-680.

16. **Bonnard, M., Haughn, L., and Julius, M.** (1999). CD4-mediated inhibition of IL-2 production in activated T cells. *J Immunol* **162**: 1252-1260.
17. **Bosselut, R., Zhang, W., Ashe, J. M., Kopacz, J. L., Samelson, L. E., and Singer, A.** (1999). Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J Exp Med* **190**: 1517-1526.
18. **Bottarel, F., Feito, M. J., Bragardo, M., Bonisconi, S., Buonfiglio, D., DeFranco, S., Malavasi, F., Bensi, T., Ramenghi, U., and Dianzani, U.** (1999). The cell death-inducing ability of glycoprotein 120 from different HIV strains correlates with their ability to induce CD4 lateral association with CD95 on CD4+ T cells. *Aids Res Hum Retroviruses* **15**: 1255-1263.
19. **Bowers, K., Pitcher, C., and Marsh, M.** (1997). CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 871-875.
20. **Brdicka, T., Cerny, J., and Horejsi, V.** (1998). T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 356-360.
21. **Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., Drbal, K., Kuramitsu, Y., Kornacker, B., Horejsi, V., and Schraven, B.** (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* **191**: 1591-1604.
22. **Brockdorff, J., Williams, S., Couture, C., and Mustelin, T.** (1999). Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1. *Eur J Immunol* **29**: 2539-2550.
23. **Buerstedde, J. M., and Takeda, S.** (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* **67**: 179-188.
24. **Bunnell, S. C., Diehn, M., Yaffe, M. B., Findell, P. R., Cantley, L. C., and Berg, L. J.** (2000). Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* **275**: 2219-2230.
25. **Cammarota, G., Scheirle, A., Takacs, B., Doran, D. M., Knorr, R., Bannwarth, W., Guardiola, J., and Sinigaglia, F.** (1992). Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**: 799-801.
26. **Center, D. M., Kornfeld, H., and Cruikshank, W. W.** (1996). Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* **17**: 476-481.
27. **Center, D. M., Kornfeld, H., Ryan, T. C., and Cruikshank, W. W.** (2000). Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* **21**: 273-280.
28. **Chambers, C. A., and Allison, J. P.** (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 203-210.
29. **Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., and Weiss, A.** (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**: 649-662.
30. **Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T.** (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *Embo J* **14**: 2499-2508.
31. **Chan, A. C., and Shaw, A. S.** (1996). Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* **8**: 394-401.

32. Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R. J., Jang, I. K., Gutkind, J. S., Shevach, E., and Gu, H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* **403**: 216-220.
33. Chirmule, N., Avots, A., LakshmiTamma, S. M., Pahwa, S., and Serfling, E. (1999). CD4-mediated signals induce T cell dysfunction in vivo. *J Immunol* **163**: 644-649.
34. Choi, Y. B., Kim, C. K., and Yun, Y. (1999). Lad, an adapter protein interacting with the SH2 domain of p56lck, is required for T cell activation. *J Immunol* **163**: 5242-5249.
35. Choy, E. H., Kingsley, G. H., and Panayi, G. S. (1998). Anti-CD4 monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **20**: 261-273.
36. Chu, D. H., Spits, H., Peyron, J. F., Rowley, R. B., Bolen, J. B., and Weiss, A. (1996). The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *Embo J* **15**: 6251-6261.
37. Chu, D. H., Morita, C. T., and Weiss, A. (1998). The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* **165**: 167-180.
38. Cinek, T., and Horejsi, V. (1992). The nature of large noncovalent complexes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol* **149**: 2262-2270.
39. Cinek, T., Hilgert, I., and Horejsi, V. (1995). An alternative way of CD4 and CD8 association with protein kinases of the Src family. *Immunogenetics* **41**: 110-106.
40. Clements, J. L., Boerth, N. J., Lee, J. R., and Koretzky, G. A. (1999). Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **17**: 89-108.
41. Collins, T. L., Uniyal, S., Shin, J., Strominger, J. L., Mittler, R. S., and Burakoff, S. J. (1992). p56lck association with CD4 is required for the interaction between CD4 and the TCR/CD3 complex and for optimal antigen stimulation. *J Immunol* **148**: 2159-2162.
42. Collins, T. L., and Burakoff, S. J. (1993). Tyrosine kinase activity of CD4-associated p56lck may not be required for CD4-dependent T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11885-11889.
43. Corbeil, J., and Richman, D. D. (1995). The role of surface CD4 in HIV-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* **374**: 91-99.
44. Corbeil, J., Tremblay, M., and Richman, D. D. (1996). HIV-induced apoptosis requires the CD4 receptor cytoplasmic tail and is accelerated by interaction of CD4 with p56lck. *J Exp Med* **183**: 39-48.
45. Coudronniere, N., Corbeil, J., Robert, H. V., Mesnard, J. M., and Devaux, C. (1998). The Ick protein tyrosine kinase is not involved in antibody-mediated CD4 (CDR3-loop) signal transduction that inhibits HIV-1 transcription. *Eur J Immunol* **28**: 1445-1457.
46. Cousin, X., Hotelier, T., Giles, K., Toutant, J. P., and Chatonnet, A. (1998). aCHEdb: the database system for ESTHER, the alpha/beta fold family of proteins and the Cholinesterase gene server. *Nucleic Acids Res* **26**: 226-228.
47. Couture, C., Baier, G., Altman, A., and Mustelin, T. (1994). p56lck-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72syk by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5301-5305.
48. Couture, C., Baier, G., Oetken, C., Williams, S., Telford, D., Marie, C. A., Baier, B. G., Fischer, S., Burn, P., Altman, A., and et, a. I. (1994). Activation of p56lck by p72syk through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**: 5249-5258.

49. **Cowburn, D.** (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 835-838.
50. **Crise, B., and Rose, J. K.** (1992). Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor. *J Biol Chem* **267**: 13593-13597.
51. **Cruikshank, W. W., Lim, K., Theodore, A. C., Cook, J., Fine, G., Weller, P. F., and Center, D. M.** (1996). IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol* **157**: 5240-5248.
52. **Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., and Center, D. M.** (1998). Signaling and functional properties of interleukin-16. *Int Rev Immunol* **16**: 523-540.
53. **Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., and Center, D. M.** (2000). Interleukin-16. *J Leukoc Biol* **67**: 757-766.
54. **Deckert, M., Tartare, D. S., Couture, C., Mustelin, T., and Altman, A.** (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* **5**: 591-604.
55. **Deen, K. C., McDougal, J. S., Inacker, R., Folea, W. G., Arthos, J., Rosenberg, J., Maddon, P. J., Axel, R., and Sweet, R. W.** (1988). A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* **331**: 82-84.
56. **Denny, M. F., Kaufman, H. C., Chan, A. C., and Straus, D. B.** (1999). The lck SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **274**: 5146-5152.
57. **Denny, M. F., Patai, B., and Straus, D. B.** (2000). Differential T-cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. *Mol Cell Biol* **20**: 1426-1435.
58. **Dianzani, U., Shaw, A., al, R. B., Kubo, R. T., and Janeway, C. J.** (1992). Physical association of CD4 with the T cell receptor. *J Immunol* **148**: 678-688.
59. **Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M. F., Neupert, W., and Brunner, M.** (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* **101**: 401-412.
60. **Duplay, P., Thome, M., Herve, F., and Acuto, O.** (1994). p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J Exp Med* **179**: 1163-1172.
61. **Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van, der, Merwe, Pa, Allen, P. M., and Shaw, A. S.** (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**: 667-677.
62. **Dustin, M. L., and Cooper, J. A.** (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunol* **1**: 23-29.
63. **Falkner, F. G., and Moss, B.** (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* **62**: 1849-1854.
64. **Fanning, A. S., and Anderson, J. M.** (1999). Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 432-439.
65. **Fargnoli, J., Burkhardt, A. L., Laverty, M., Kut, S. A., van, O. N., Weiss, A., and Bolen, J. B.** (1995). Syk mutation in Jurkat E6-derived clones results in lack of p72syk expression. *J Biol Chem* **270**: 26533-26537.
66. **Fernandez, L. J., Merlos, S. A., Urena, J. M., Baselga, J., and Arribas, J.** (1999). A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of proTGF-alpha to the cell surface. *Mol Cell* **3**: 423-433.

67. **Finco, T. S., Kadlecck, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A.** (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**: 617-626.
68. **Fowell, D. J., Magram, J., Turck, C. W., Killeen, N., and Locksley, R. M.** (1997). Impaired Th2 subset development in the absence of CD4. *Immunity* **6**: 559-569.
69. **Fumagalli, S., Totty, N. F., Hsuan, J. J., and Courtneidge, S. A.** (1994). A target for Src in mitosis. *Nature* **368**: 871-874.
70. **Furlong, M. T., Mahrenholz, A. M., Kim, K. H., Ashendel, C. L., Harrison, M. L., and Geahlen, R. L.** (1997). Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* **1355**: 177-190.
71. **Fusaki, N., Iwamatsu, A., Iwashima, M., and Fujisawa, J. i.** (1997). Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* **272**: 6214-6219.
72. **Garofalo, T., Sorice, M., Misasi, R., Cinque, B., Giammatteo, M., Pontieri, G. M., Cifone, M. G., and Pavan, A.** (1998). A novel mechanism of CD4 down-modulation induced by monosialoganglioside GM3. Involvement of serine phosphorylation and protein kinase c delta translocation. *J Biol Chem* **273**: 35153-35160.
73. **Gaubin, M., Autiero, M., Basmaciogullari, S., Metivier, D., Mis, h. Z., Culerrier, R., Oudin, A., Guardiola, J., and Piatier, T. D.** (1999). Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J Immunol* **162**: 2631-2638.
74. **Germain, R. N., and Stefanova, I.** (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* **17**: 467-522.
75. **Gerondakis, S., Grumont, R., Rourke, I., and Grossmann, M.** (1998). The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **10**: 353-359.
76. **Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R.** (1995). Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEp2 cells. *J Cell Biol* **128**: 549-561.
77. **Gjorloff, W. A., Saxena, M., Han, S., Wang, X., Alonso, A., Renedo, M., Oh, P., Williams, S., Schnitzer, J., and Mustelin, T.** (2000). Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur J Immunol* **30**: 2412-2421.
78. **Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R., and Turner, J. M.** (1991). Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* **64**: 511-520.
79. **Goebel, J., Franks, A., Robey, F., Mikovits, J., and Lowry, R. P.** (1999). Attenuation of IL-2 receptor signaling by CD4-ligation requires polymerized cytoskeletal actin but not P56LCK. *Transplant Proc* **31**: 822-824.
80. **Graef, I. A., Holsinger, L. J., Diver, S., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R.** (1997). Proximity and orientation underlie signaling by the non-receptor tyrosine kinase ZAP70. *Embo J* **16**: 5618-5628.
81. **Gratton, S., Julius, M., and Sekaly, R. P.** (1998). lck-independent inhibition of T cell antigen response by the HIV gp120. *J Immunol* **161**: 3551-3556.
82. **Guillerm, C., Coudronniere, N., Robert, H. V., and Devaux, C.** (1998). Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J Virol* **72**: 1754-1761.
83. **Guillerm, C., Robert, H. V., Hibner, U., Hirn, M., and Devaux, C.** (1998). An anti-CD4 (CDR3-loop) monoclonal antibody inhibits human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-induced apoptosis. *Virology* **248**: 254-263.

84. Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803.
85. Hamad, A. R., O'Herrin, S. M., Lebowitz, M. S., Srikrishnan, A., Bieler, J., Schneck, J., and Pardoll, D. (1998). Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J Exp Med* **188**: 1633-1640.
86. Hampl, J., Chien, Y. H., and Davis, M. M. (1997). CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands. *Immunity* **7**: 379-385.
87. Harrison, S. C. (1996). Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* **86**: 341-343.
88. Hashimoto, F., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V. S., and Pahwa, S. (1997). Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2. *Blood* **90**: 745-753.
89. Hatada, M. H., Lu, X., Laird, E. R., Green, J., Morgenstern, J. P., Lou, M., Marr, C. S., Phillips, T. B., Ram, M. K., Theriault, K., and et, a. I. (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**: 32-38.
90. Haughn, L., Gratton, S., Caron, L., Sekaly, R. P., Veillette, A., and Julius, M. (1992). Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the alpha beta T-cell receptor. *Nature* **358**: 328-331.
91. Hernandez, H. G., Sohn, S. J., Rothenberg, E. V., and Alberola, I. J. (2000). Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. *Immunity* **12**: 313-322.
92. Horejsi, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., and Stockinger, H. (1999). GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today* **20**: 356-361.
93. Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L., and Hendrickson, W. A. (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**: 746-754.
94. Huby, R. D., Carlile, G. W., and Ley, S. C. (1995). Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* **270**: 30241-30244.
95. Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**: 113-127.
96. Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., and Sudhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* **81**: 435-443.
97. Irving, B. A., and Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**: 891-901.
98. Isakov, N., Wange, R. L., Watts, J. D., Aebersold, R., and Samelson, L. E. (1996). Purification and characterization of human ZAP-70 protein-tyrosine kinase from a baculovirus expression system. *J Biol Chem* **271**: 15753-15761.
99. Iwashima, M., Irving, B. A., van, O. N., Chan, A. C., and Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**: 1136-1139.
100. Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., and Findell, P. R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* **270**: 7029-7032.
101. Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* **12**: 23-34.

102. **Janeway, C. J.** (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* **10**: 645-674.
103. **Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C.** (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309-312.
104. **Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C.** (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309-312.
105. **Johnson, K. G., Bromley, S. K., Dustin, M. L., and Thomas, M. L.** (2000). A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10138-10143.
106. **Joung, I., Kim, T., Stolz, L. A., Payne, G., Winkler, D. G., Walsh, C. T., Strominger, J. L., and Shin, J.** (1995). Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5778-5782.
107. **Julius, M., Maroun, C. R., and Haughn, L.** (1993). Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol Today* **14**: 177-183.
108. **Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A.** (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* **12**: 242-249.
109. **Katzav, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T., and Weiss, A.** (1994). The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem* **269**: 32579-32585.
110. **Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., and Okada, M.** (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* **404**: 999-1003.
111. **Kelly, R. B.** (1999). Deconstructing membrane traffic. *Trends Cell Biol* **9**: M29-33.
112. **Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M.** (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* **281**: 572-575.
113. **Kersh, E. N., Kersh, G. J., and Allen, P. M.** (1999). Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J Exp Med* **190**: 1627-1636.
114. **Killeen, N., and Littman, D. R.** (1993). Helper T-cell development in the absence of CD4-p56lck association. *Nature* **364**: 729-732.
115. **Killeen, N., and Littman, D. R.** (1996). The regulation and function of the CD4 coreceptor during T lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**: 89-106.
116. **Kim, H. K., Kim, J. W., Zilberstein, A., Margolis, B., Kim, J. G., Schlessinger, J., and Rhee, S. G.** (1991). PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* **65**: 435-441.
117. **Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E., and Siraganian, R. P.** (1996). Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. *Mol Cell Biol* **16**: 1471-1478.
118. **Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S., and Riezman, H.** (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 488-495.

119. **Knoll, M.** (1999). Regulation der Aktivierung CD4-positiver T-Helferzellen durch die nicht-enzymatischen Proteinbindungsdomänen der Src-Kinase Lck. *Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München.*
120. **Kolanus, W., Romeo, C., and Seed, B.** (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* **74**: 171-183.
121. **Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B.** (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**: 233-242.
122. **Kong, G. H., Bu, J. Y., Kurosaki, T., Shaw, A. S., and Chan, A. C.** (1995). Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* **2**: 485-492.
123. **Kong, G., Dalton, M., Wardenburg, J. B., Straus, D., Kurosaki, T., and Chan, A. C.** (1996). Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* **16**: 5026-5035.
124. **Konig, R., Fleury, S., and Germain, R. N.** (1996). The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**: 19-46.
125. **Korthauer, U., Nagel, W., Davis, E. M., Le, B. M., Menon, R. S., Mitchell, E. O., Kozak, C. A., Kolanus, W., and Bluestone, J. A.** (2000). Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *J Immunol* **164**: 308-318.
126. **Krejci, E., Duval, N., Chatonnet, A., Vincens, P., and Massoulie, J.** (1991). Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6647-6651.
127. **Kremmer, E., Sommer, P., Holzer, D., Galetsky, S. A., Molochkov, V. A., Gurtsevitch, V., Winkelmann, C., Lisner, R., Niedobitek, G., and Grasser, F. A.** (1999). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) ORF54 encodes a functional dUTPase expressed in the lytic replication cycle. *J Gen Virol* : 1305-1310.
128. **Krummel, M. F., Sjaastad, M. D., Wulfing, C., and Davis, M. M.** (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* **289**: 1349-1352.
129. **Kupfer, A.** (2000). Breaking up receptor alliances: the parting of CD3 and CD4. *Nat Med* **6**: 1097-1098.
130. **Lang, V., Mege, D., Semichon, M., Gary, G. H., and Bismuth, G.** (1997). A dual participation of ZAP-70 and scr protein tyrosine kinases is required for TCR-induced tyrosine phosphorylation of Sam68 in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* **27**: 3360-3367.
131. **Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., and He, H. T.** (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* **12**: 250-255.
132. **Lanier, L. L.** (2000). Turning on natural killer cells. *J Exp Med* **191**: 1259-1262.
133. **Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.** (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* **12**: 92-98.
134. **Latour, S., Chow, L., and Veillette, A.** (1996). Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and ZAP-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **271**: 22782-22790.
135. **Laurent, C. A., Coccia, E., Krust, B., and Hovanessian, A. G.** (1995). Membrane-expressed HIV envelope glycoprotein heterodimer is a powerful inducer of cell death in uninfected CD4+ target cells. *Res Virol* **146**: 5-17.

136. **Law, C. L., Chandran, K. A., Sidorenko, S. P., and Clark, E. A.** (1996). Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* **16**: 1305-1315.
137. **Lemasson, I., Briant, L., Hague, B., Coudronniere, N., Heron, L., David, C., Rebouissou, C., Kindt, T., and Devaux, C.** (1996). An antibody that binds domain 1 of CD4 inhibits replication of HIV-1, but not HTLV-I, in a CD4-positive/p56lck-negative HTLV-I-transformed cell line. *J Immunol* **156**: 859-865.
138. **Lin, R. S., Rodriguez, C., Veillette, A., and Lodish, H. F.** (1998). Zinc is essential for binding of p56(lck) to CD4 and CD8alpha. *J Biol Chem* **273**: 32878-32882.
139. **Lin, J., Weiss, A., and Finco, T. S.** (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* **274**: 28861-28864.
140. **LoGrasso, P. V., Hawkins, J., Frank, L. J., Wisniewski, D., and Marcy, A.** (1996). Mechanism of activation for ZAP-70 catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12165-12170.
141. **Lopata, M. A., Cleveland, D. W., and Sollner, W. B.** (1984). High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* **12**: 5707-5717.
142. **Love, P. E., and Shores, E. W.** (2000). ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?. *Immunity* **12**: 591-597.
143. **Lupher, M. J., Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C., and Band, H.** (1997). The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* **272**: 33140-33144.
144. **Lupher, M. J., Rao, N., Eck, M. J., and Band, H.** (1999). The Cbl protooncoprotein: a negative regulator of immune receptor signal transduction. *Immunol Today* **20**: 375-382.
145. **Mackett, M., Smith, G. L., and Moss, B.** (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7415-7419.
146. **Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E., and Germain, R. N.** (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* **267**: 515-518.
147. **Madrenas, J., Chau, L. A., Smith, J., Bluestone, J. A., and Germain, R. N.** (1997). The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J Exp Med* **185**: 219-229.
148. **Magistrelli, G., Bosotti, R., Valsasina, B., Visco, C., Perego, R., Toma, S., Acuto, O., and Isacchi, A.** (1999). Role of the Src homology 2 domains and interdomain regions in ZAP-70 phosphorylation and enzymatic activity. *Eur J Biochem* **266**: 1166-1173.
149. **Manger, B., Weiss, A., Weyand, C., Goronzy, J., and Stobo, J. D.** (1985). T cell activation: differences in the signals required for IL 2 production by nonactivated and activated T cells. *J Immunol* **135**: 3669-3673.
150. **Marsh, M., and Pelchen, M. A.** (1996). Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**: 107-135.
151. **Mathy, N. L., Bannert, N., Norley, S. G., and Kurth, R.** (2000). Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J Immunol* **164**: 4429-4432.

152. **Mege, D., Di, B. V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O.** (1996). Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **271**: 32644-32652.
153. **Mellman, I., and Warren, G.** (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**: 99-112.
154. **Mesnard, J. M., Lemasson, I., and Devaux, C.** (1997). Characterization of a novel protein interacting with CD4 in p56lck negative MT-2 cells. *J Allergy Clin. Immunol.* **99**: S210.
155. **Miceli, M. C., von, H. P., and Parnes, J. R.** (1991). Adhesion versus coreceptor function of CD4 and CD8: role of the cytoplasmic tail in coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2623-2627.
156. **Michel, F., Grimaud, L., Tuosto, L., and Acuto, O.** (1998). Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem* **273**: 31932-31938.
157. **Millan, J., Cerny, J., Horejsi, V., and Alonso, M. A.** (1999). CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens* **53**: 33-40.
158. **Mizushima, S., and Nagata, S.** (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* **18**: 5322.
159. **Moarefi, I., LaFevre, B. M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J., and Miller, W. T.** (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**: 650-653.
160. **Moffatt, S. D., and Metcalfe, S. M.** (1999). FK 506 versus cyclosporine in combination with anti-CD4/CD8 monoclonal antibodies. *Transplant Proc* **31**: 2740.
161. **Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F., and Thomas, G.** (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **9**: 28-35.
162. **Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A.** (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**: 82-86.
163. **Morel, P., Vincent, C., Wijdenes, J., and Revillard, J. P.** (1992). Down-regulation of cell surface CD4 molecule expression induced by anti-CD4 antibodies in human T lymphocytes. *Cell Immunol* **145**: 287-298.
164. **Moutouh, L., Estaquier, J., Richman, D. D., and Corbeil, J.** (1998). Molecular and cellular analysis of human immunodeficiency virus-induced apoptosis in lymphoblastoid T-cell-line-expressing wild-type and mutated CD4 receptors. *J Virol* **72**: 8061-8072.
165. **Mustelin, T., Brockdorff, J., Rudbeck, L., Gjorloff, W. A., Han, S., Wang, X., Tailor, P., and Saxena, M.** (1999). The next wave: protein tyrosine phosphatases enter T cell antigen receptor signalling. *Cell Signal* **11**: 637-650.
166. **Myung, P. S., Boerthe, N. J., and Koretzky, G. A.** (2000). Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* **12**: 256-266.
167. **Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J., and Kolanus, W.** (1998). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* **273**: 14853-14861.
168. **Nardini, M., and Dijkstra, B. W.** (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 732-737.
169. **Nemorin, J. G., and Duplay, P.** (2000). Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J Biol Chem* **275**: 14590-14597.

170. **Neumeister, E. N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A. C., and Shaw, A. S.** (1995). Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 3171-3178.
171. **Newell, M. K., Haughn, L. J., Maroun, C. R., and Julius, M. H.** (1990). Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* **347**: 286-289.
172. **Ng, D. H., Watts, J. D., Aebersold, R., and Johnson, P.** (1996). Demonstration of a direct interaction between p56lck and the cytoplasmic domain of CD45 in vitro. *J Biol Chem* **271**: 1295-1300.
173. **Notarangelo, L. D., Villa, A., and Schwarz, K.** (1999). RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol* **11**: 435-442.
174. **Ogasawara, H., Takeda, H. N., Sekigawa, I., Hashimoto, H., Kaneko, Y., and Hirose, S.** (1999). Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* **96**: 215-219.
175. **Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G., and Goldman, A.** (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**: 197-211.
176. **Ota, S., Hazeki, K., Rao, N., Lupher, M. J., Andoniou, C. E., Druker, B., and Band, H.** (2000). The RING finger domain of Cbl is essential for negative regulation of the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* **275**: 414-422.
177. **Pao, L. I., and Cambier, J. C.** (1997). Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45- B cells. *J Immunol* **158**: 2663-2669.
178. **Park, S. H., and Bendelac, A.** (2000). CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature* **406**: 788-792.
179. **Parolini, I., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P., and Peschle, C.** (1996). Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* **87**: 3783-3794.
180. **Parolini, I., Topa, S., Sorice, M., Pace, A., Ceddia, P., Montesoro, E., Pavan, A., Lisanti, M. P., Peschle, C., and Sargiacomo, M.** (1999). Phorbol ester-induced disruption of the CD4^{lck} complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **274**: 14176-14187.
181. **Pelchen, M. A., Parsons, I. J., and Marsh, M.** (1993). Phorbol ester-induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. *J Exp Med* **178**: 1209-1222.
182. **Pelosi, M., Di, B. V., Mounier, V., Mege, D., Pascussi, J. M., Dufour, E., Blondel, A., and Acuto, O.** (1999). Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. *J Biol Chem* **274**: 14229-14237.
183. **Phillips, J. M., Harach, S. Z., Parish, N. M., Fehervari, Z., Haskins, K., and Cooke, A.** (1949). Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic beta cells. *J Immunol* **165**: 1949-1955.
184. **Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J. L., and Trono, D.** (1999). Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* **97**: 63-73.

185. **Pitcher, C., Honing, S., Fingerhut, A., Bowers, K., and Marsh, M.** (1999). Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol Biol Cell* **10**: 677-691.
186. **Portoles, P., de, O. G., Criado, G., Fernandez, C. E., and Rojo, J. M.** (1999). Antibody-induced CD3-CD4 coligation inhibits TCR/CD3 activation in the absence of costimulatory signals in normal mouse CD4(+) T lymphocytes. *Cell Immunol* **195**: 96-109.
187. **Prasad, K. V., Kapeller, R., Janssen, O., Repke, H., Duke, C. J., Cantley, L. C., and Rudd, C. E.** (1993). Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol Cell Biol* **13**: 7708-7717.
188. **Pratt, J. C., Sawasdikosol, S., van, den, Brink, Mr, and Burakoff, S. J.** (1999). Positive and negative signaling pathways. *Transplant Proc* **31**: 772-774.
189. **Qian, D., Mollenauer, M. N., and Weiss, A.** (1996). Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **183**: 611-620.
190. **Racioppi, L., Matarese, G., D'Oro, U., De, P. M., Masci, A. M., Fontana, S., and Zappacosta, S.** (1996). The role of CD4^{lck} in T-cell receptor antagonism: evidence for negative signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10360-10365.
191. **Rahemtulla, A., Fung, L. W., Schilham, M. W., Kundig, T. M., Sambhara, S. R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C. J., Zinkernagel, R. M., and et, a. I.** (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* **353**: 180-184.
192. **Rahemtulla, A., Kundig, T. M., Narendran, A., Bachmann, M. F., Julius, M., Paige, C. J., Ohashi, P. S., Zinkernagel, R. M., and Mak, T. W.** (1994). Class II major histocompatibility complex-restricted T cell function in CD4-deficient mice. *Eur J Immunol* **24**: 2213-2218.
193. **Rand, T. H., Cruikshank, W. W., Center, D. M., and Weller, P. F.** (1991). CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med* **173**: 1521-1528.
194. **Rao, N., Lupher, M. J., Ota, S., Reedquist, K. A., Druker, B. J., and Band, H.** (2000). The linker phosphorylation site Tyr292 mediates the negative regulatory effect of Cbl on ZAP-70 in T cells. *J Immunol* **164**: 4616-4626.
195. **Ravichandran, K. S., Collins, T. L., and Burakoff, S. J.** (1996). CD4 and signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**: 47-62.
196. **Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., and Lee, M. G.** (1996). Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* **20**: 102-110.
197. **Repke, H., Barber, E., Ulbricht, S., Buchner, K., Hucho, F., Kopp, R., Scholz, H., Rudd, C. E., and Haseltine, W. A.** (1992). Ganglioside-induced CD4 endocytosis occurs independent of serine phosphorylation and is accompanied by dissociation of P56lck. *J Immunol* **149**: 2585-2591.
198. **Richard, S., Yu, D., Blumer, K. J., Hausladen, D., Olszowy, M. W., Connelly, P. A., and Shaw, A. S.** (1995). Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol Cell Biol* **15**: 186-197.
199. **Romeo, C., Amiot, M., and Seed, B.** (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* **68**: 889-897.

-
200. **Rouer, E., Brule, F., and Benarous, R.** (1999). A single base mutation in the 5' splice site of intron 7 of the lck gene is responsible for the deletion of exon 7 in lck mRNA of the JCaM1 cell line. *Oncogene* **18**: 4262-4268.
 201. **Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R., and Bolen, J. B.** (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* **270**: 11590-11594.
 202. **Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L., and Schlossman, S. F.** (1988). The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5190-5194.
 203. **Rudd, C. E.** (1999). Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* **96**: 5-8.
 204. **Rudd, C. E., and Schneider, H.** (2000). Cbl sets the threshold for autoimmunity. *Curr Biol* **10**: R344-7.
 205. **Sanzenbacher, R., Kabelitz, D., and Janssen, O.** (1999). SLP-76 binding to p56lck: a role for SLP-76 in CD4-induced desensitization of the TCR/CD3 signaling complex. *J Immunol* **163**: 3143-3152.
 206. **Saras, J., and Heldin, C. H.** (1996). PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* **21**: 455-458.
 207. **Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., and Serafini, T.** (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* **101**: 657-669.
 208. **Seong, R. H., Chamberlain, J. W., and Parnes, J. R.** (1992). Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* **356**: 718-720.
 209. **Shaw, A. S., Chalupny, J., Whitney, J. A., Hammond, C., Amrein, K. E., Kavathas, P., Sefton, B. M., and Rose, J. K.** (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* **10**: 1853-1862.
 210. **Shiue, L., Zoller, M. J., and Brugge, J. S.** (1995). Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *J Biol Chem* **270**: 10498-10502.
 211. **Sleckman, B. P., Peterson, A., Jones, W. K., Foran, J. A., Greenstein, J. L., Seed, B., and Burakoff, S. J.** (1987). Expression and function of CD4 in a murine T-cell hybridoma. *Nature* **328**: 351-353.
 212. **Sleckman, B. P., Peterson, A., Foran, J. A., Gorga, J. C., Kara, C. J., Strominger, J. L., Burakoff, S. J., and Greenstein, J. L.** (1988). Functional analysis of a cytoplasmic domain-deleted mutant of the CD4 molecule. *J Immunol* **141**: 49-54.
 213. **Sloan, L. J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B., and Allen, P. M.** (1994). Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* **79**: 913-922.
 214. **Somma, F., Tuosto, L., Montani, M. S., Di, S. M., Cundari, E., and Piccolella, E.** (2000). Engagement of CD4 before TCR triggering regulates both Bax- and Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J Immunol* **164**: 5078-5087.
 215. **Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., and Cantley, L. C.** (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**: 73-77.
 216. **Sonnichsen, B., De, R. S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M.** (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**: 901-914.

217. **Sorio, C., Saggioro, D., Chieco, B. L., and Berton, G.** (1993). The monosialoganglioside GM1 induces internalisation and degradation of the CD4 antigen in U937 cells: evidence for a novel mechanism of CD4 down-modulation in a p56lck-negative cell line, which is independent of protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 1105-1110.
218. **Straus, D. B., and Weiss, A.** (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**: 585-593.
219. **Straus, D. B., Chan, A. C., Patai, B., and Weiss, A.** (1996). SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* **271**: 9976-9981.
220. **Sunder, P. R., Lialios, F., Madsen, M., Koyasu, S., and Reinherz, E. L.** (1997). Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3zeta-ITAM are functionally distinct. *Eur J Immunol* **27**: 2001-2009.
221. **Swain, S. L.** (1983). T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* **74**: 129-142.
222. **Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T.** (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* **13**: 1341-1349.
223. **Takata, M., Homma, Y., and Kurosaki, T.** (1995). Requirement of phospholipase C-gamma 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis. *J Exp Med* **182**: 907-914.
224. **Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X. K., Strong, S. W., and Hashimoto, Y.** (1995). LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck. *Embo J* **14**: 3403-3414.
225. **Tateyama, M., Oyaizu, N., McCloskey, T. W., Than, S., and Pahwa, S.** (2000). CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood* **96**: 195-202.
226. **Taylor, S. J., and Shalloway, D.** (1994). An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* **368**: 867-871.
227. **Thomas, M. L.** (1999). The regulation of antigen-receptor signaling by protein tyrosine phosphatases: a hole in the story. *Curr Opin Immunol* **11**: 270-276.
228. **Triebel, F., De, R. S., Bernard, A., Blanc, C., and Debre, P.** (1986). CD 1-8 antigens on human diphtheria toxoid T lymphocyte clones: expression and modulation by TPA, sodium butyrate, and 5-azacytidine. *Hum Immunol* **16**: 221-233.
229. **Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O.** (1996). p95^{vav} associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J Exp Med* **184**: 1161-1166.
230. **Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di, S. J., and Tybulewicz, V. L.** (2000). Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* **21**: 148-154.
231. **van, I. S., and Hoekstra, D.** (1999). The subapical compartment: a novel sorting centre? *Trends Cell Biol* **9**: 144-149.
232. **van, L. J., and Samelson, L. E.** (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* **11**: 242-248.
233. **Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., and Bolen, J. B.** (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**: 301-308.

-
234. **Vidal, K., Daniel, C., Hill, M., Littman, D. R., and Allen, P. M.** (1999). Differential requirements for CD4 in TCR-ligand interactions. *J Immunol* **163**: 4811-4818.
235. **Vignali, D. A., and Vignali, K. M.** (1999). Profound enhancement of T cell activation mediated by the interaction between the TCR and the D3 domain of CD4. *J Immunol* **162**: 1431-1439.
236. **Viola, A., Salio, M., Tuosto, L., Linkert, S., Acuto, O., and Lanzavecchia, A.** (1997). Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. *J Exp Med* **186**: 1775-1779.
237. **Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A.** (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**: 680-682.
238. **Virtanen, I., Ekblom, P., and Laurila, P.** (1980). Subcellular compartmentalization of saccharide moieties in cultured normal and malignant cells. *J Cell Biol* **85**: 429-434.
239. **Visco, C., Magistrelli, G., Bosotti, R., Perego, R., Rusconi, L., Toma, S., Zamai, M., Acuto, O., and Isacchi, A.** (2000). Activation of ZAP-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* **39**: 2784-2791.
240. **Vogel, L. B., and Fujita, D. J.** (1993). The SH3 domain of p56lck is involved in binding to phosphatidylinositol 3'-kinase from T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **13**: 7408-7417.
241. **von, H. M., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L.** (1996). CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* **70**: 1072-1079.
242. **Waldmann, H., and Cobbold, S.** (1998). How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu Rev Immunol* **16**: 619-644.
243. **Wan, L., Molloy, S. S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S. L., and Thomas, G.** (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* **94**: 205-216.
244. **Wange, R. L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J. D., Aebersold, R., and Samelson, L. E.** (1995). Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem* **270**: 18730-18733.
245. **Wardenburg, J. B., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A. C., and Findell, P. R.** (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* **271**: 19641-19644.
246. **Watts, J. D., Affolter, M., Krebs, D. L., Wange, R. L., Samelson, L. E., and Aebersold, R.** (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J Biol Chem* **269**: 29520-29529.
247. **Weber, J. R., Orstavik, S., Torgersen, K. M., Danbolt, N. C., Berg, S. F., Ryan, J. C., Tasken, K., Imboden, J. B., and Vaage, J. T.** (1998). Molecular cloning of the cDNA encoding pp36, a tyrosine-phosphorylated adaptor protein selectively expressed by T cells and natural killer cells. *J Exp Med* **187**: 1157-1161.
248. **Weil, R., and Veillette, A.** (1996). Signal transduction by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**: 63-87.
249. **Weiss, A., and Stobo, J. D.** (1984). Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med* **160**: 1284-1299.

250. **Weissenhorn, W., Eck, M. J., Harrison, S. C., and Wiley, D. C.** (1996). Phosphorylated T cell receptor zeta-chain and ZAP70 tandem SH2 domains form a 1:3 complex in vitro. *Eur J Biochem* **238**: 440-445.
251. **Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T.** (1998). Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* **18**: 1388-1399.
252. **Williams, B. L., Irvin, B. J., Sutor, S. L., Chini, C. C., Yacyshyn, E., Bubeck, W. J., Dalton, M., Chan, A. C., and Abraham, R. T.** (1999). Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *Embo J* **18**: 1832-1844.
253. **Wishart, M. J., and Dixon, J. E.** (1998). Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci* **23**: 301-306.
254. **Wong, J., Straus, D., and Chan, A. C.** (1998). Genetic evidence of a role for Lck in T-cell receptor function independent or downstream of ZAP-70/Syk protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **18**: 2855-2866.
255. **Wright, C. S.** (1984). Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J Mol Biol* **178**: 91-104.
256. **Wu, J., Motto, D. G., Koretzky, G. A., and Weiss, A.** (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**: 593-602.
257. **Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T., and Weiss, A.** (1997). The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* **185**: 1877-1882.
258. **Wulfing, C., and Davis, M. M.** (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**: 2266-2269.
259. **Wulfing, C., Bauch, A., Crabtree, G. R., and Davis, M. M.** (2000). The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10150-10155.
260. **Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B.** (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**: 723-732.
261. **Xavier, R., and Seed, B.** (1999). Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* **11**: 265-269.
262. **Xu, H., and Littman, D. R.** (1993). A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* **74**: 633-643.
263. **Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., and Harrison, S. C.** (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**: 629-638.
264. **Yamasaki, S., Takamatsu, M., and Iwashima, M.** (1996). The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol Cell Biol* **16**: 7151-7160.
265. **Yashiro, O. Y., Zhou, X. Y., Toyo, O. K., Tai, X. G., Park, C. S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K., and Fujiwara, H.** (2000). Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J Immunol* **164**: 1251-1259.
266. **Zamoyska, R.** (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* **10**: 82-87.

-
267. **Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P., and Kolanus, W.** (1998). T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem* **273**: 15445-15452.
268. **Zerbib, A. C., Reske, K. A., Lock, P., and Sekaly, R. P.** (1994). CD4-mediated enhancement or inhibition of T cell activation does not require the CD4:p56lck association. *J Exp Med* **179**: 1973-1983.
269. **Zhang, B., Tavare, J. M., Ellis, L., and Roth, R. A.** (1991). The regulatory role of known tyrosine autophosphorylation sites of the insulin receptor kinase domain. An assessment by replacement with neutral and negatively charged amino acids. *J Biol Chem* **266**: 990-996.
270. **Zhang, W., Sloan, L. J., Kitchen, J., Triple, R. P., and Samelson, L. E.** (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**: 83-92.
271. **Zhang, W., and Samelson, L. E.** (2000). The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* **12**: 35-41.
272. **Zhao, Q., and Weiss, A.** (1996). Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol* **16**: 6765-6774.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
amp	Ampicillin (oder: β -Lactamase-Gen)
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> (MHC exprimierende Zelle)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Gruppe von Antikörpern)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie= 3.7×10^{10} Bequerel
CMV	Cytomegalievirus
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreit
dNTP	Desoxy-Nukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> (Nachweis löslicher Antigene)
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EST	<i>expressed sequence tag</i> (cDNA Abschnitt)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflußzytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	Hunanes Immundefizienzvirus

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITAM	<i>immunreceptor tyrosine based activation signal</i> (zytoplasmatisches Tyrosinmotiv in Immunrezeptoren)
JNK	c-Jun Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LAT	<i>linker for activation of T cells</i> (Phosphotyrosin Adapterprotein)
LB	Luria-Boveri
Lck	<i>lymphocyte specific kinase</i> (T-Zell spezifisch exprimierte Kinase)
M	Mol/Liter
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (Monoklonaler Antikörper)
MBP	Maltose-bindendes Protein
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Überschuß infektiöser Partikel)
MPA	<i>mycophenoloc acid</i> (Mycophenolsäure)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-AT	Nukleärer Faktor in aktivierten T Zellen
NK	Natürliche Killer
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP-40	Nichtionisches Detergenz P 40
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysii</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	<i>plaque forming units</i> (infektiöse Partikel)
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>radiations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH	src-Homologie
SLP	SH2-Domänen-Leukozytenprotein
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCR	T-Zell Antigenrezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYM	<i>Tryptone Yeast extract Medium</i>
U	Units
ÜN	Übernacht
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-indoxyl- β -D-Galaktosid
ZAP-70	zeta-assoziiertes Protein von 70 kD Molekulargewicht

8.3 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	<u>Lutz</u> Johannes Zeitlmann
Geburtsort:	München
Geburtsdatum:	10. November 1969
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1976-1980	Grundschule Zwiesel
1980-1989	Gymnasium Zwiesel

Hochschulstudium

1989-1995	Studium der Biologie an der LMU München
Mai 1991	Vordiplom
Mai 1995	Diplom in den Fächern Genetik, Biochemie, Mikrobiologie und Immunologie
Sept. 1994 – Mai 1995	Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. W. Kolanus: „Funktionelle Charakterisierung eines neuartigen, CD4-bindenden Proteins“

Promotion

Sept. 1995 – Okt. 2000	Erstellung der vorliegenden Dissertation
März 2001	Promotion

