

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

**Funktionelle Charakterisierung der  
Signaltransduktionskaskade des LFA-1-Integrins**

**Vorgelegt von Pinar Sirim  
aus Iskenderun (Türkei)**

**März 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 30.03.2001

Pinar Sirim

Dissertation eingereicht am	30.03.2001
1. Gutachter	Prof. Dr. Waldemar Kolanus
2. Gutachter	PD Dr. Michael Meisterernst
Mündliche Prüfung am	30.05.2001

## **DANKSAGUNGEN**

Bei Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus möchte ich mich für die Vergabe des Themas und dem kontinuierlichen Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Für die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen bin ich ihm ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn PD Dr. Michael Meisterernst danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und für seine hilfreichen Ratschläge bei proteinchemischen Fragen.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl für seine stete Unterstützung und sein großes Engagement bei der Leitung des Instituts.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und noch aktiven Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kolanus für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Elisabeth Kremmer, Christine Falk und Lutz Zeitlmann danke ich für den unmittelbaren Anteil an Publikationen zu dieser Arbeit.

Allen übrigen Mitarbeitern des Genzentrums, insbesondere den unermüdlichen Helfern aus der Verwaltung und Werkstatt, danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit danke ich Anja Jestel, Ursula Mangold und Lutz Zeitlmann.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich für ihre Geduld und Unterstützung danken.

Die vorliegenden Studien wurden im Zeitraum vom Oktober 1996 bis Oktober 2000 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus im Laboratorium für Molekulare Biologie am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

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

- 1) 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.*
- 2) Plagge A, Sendtner-Voelderndorff L, Sirim P, Freigang J, Rader C, Sonderegger P, Brummendorf T. The contactin-related protein FAR-2 is a molecular marker for subpopulations of Purkinje cells and climbing fibers during cerebellar development. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*
- 3) Zeitlmann L\*, Sirim P\*, Kremmer E, Kolanus W. Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4. *J Biol Chem* 273:15445-52 (2001).
- 4) Marg A, Sirim P, Spaltmann F, Plagge A, Kauselmann G, Buck F, Rathjen FG, Brummendorf T. Neurotractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. *J Cell Biol* 145:865-76 (1999).
- 5) Zeitlmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem* 273:15445-52 (1998).

---

\* Gleichberechtigte Erstautoren



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Funktion von T-Lymphozyten bei der Immunantwort .....	3
2.2 Mechanismen zur Aktivierung von T-Lymphozyten .....	5
2.3 Bedeutung akzessorischer Rezeptoren für die T-Zell-Aktivierung .....	8
2.4 Allgemeine Funktionen des LFA-1-Integrins.....	11
2.5 Costimulatorischer Beitrag des LFA-1-Integrins .....	13
2.6 Zielsetzung.....	15
<b>3 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1 Spezielle Materialien .....	17
3.1.1 Geräte .....	17
3.1.2 Chemikalien .....	17
3.1.3 Enzyme für Molekularbiologie.....	18
3.1.4 Molekularbiologische Hilfsmittel.....	18
3.1.5 Lösungen und Puffer .....	19
3.1.6 DNA- und Molekulargewichtsstandards .....	19
3.1.7 Oligonukleotide.....	20
3.1.8 Antikörper .....	21
3.1.9 Plasmide .....	21
3.1.10 Bakterienstämme.....	22
3.1.11 Eukaryontische Zelllinien.....	22
3.2 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen .....	23
3.2.1 Adhärente Säugerzellen.....	24
3.2.2 Suspensionszellen.....	25
3.3 Molekularbiologische Techniken .....	25

3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	25
3.3.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im mg-Maßstab.....	26
3.3.3	Ethanolfällung von DNA.....	28
3.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	28
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	29
3.3.6	PCR-Mutagenese.....	30
3.3.7	Enzymatische Spaltung von DNA.....	30
3.3.8	Entfernung überhängender DNA-Enden .....	32
3.3.9	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden .....	32
3.3.10	Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA .....	32
3.3.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose und Ligation.....	33
3.3.12	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mittels CaCl <sub>2</sub> .....	35
3.3.13	Transfektion von COS7-Zellen mittels DEAE-Dextran.....	36
3.3.14	Calcium-Phosphat-Transfektion von CV-1 Zellen.....	37
3.3.15	Transfektion eukaryontischer Zelllinien mittels Elektroporation.....	38
3.3.16	Herstellung und Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren .....	39
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.4.1	Herstellung bakterieller Fusionsproteine.....	41
3.4.2	Gesamtzellsate eukaryotischer Zellen .....	43
3.4.3	Isolierung von Membransubkompartimenten durch Fraktionierung .....	43
3.4.4	Immunpräzipitation .....	44
3.4.5	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.4.6	Coomasie-Blau-Färbung von SDS-PAA-Gelen zum Nachweis der Proteine .....	47
3.4.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	47
3.4.8	Westernblot-Analyse .....	48
3.5	Immunohistochemie .....	49
3.5.1	Immuofluoreszenz-Mikroskopie .....	49
3.5.2	Durchflußzytometrie .....	49
3.6	T-Zell-Funktionsanalysen.....	50
3.6.1	Promotoraktivierungsstudien.....	50
3.6.2	Bestimmung intrazellulärer Calciumkonzentrationen .....	50
3.6.3	Analyse der Zelladhäsion auf ICAM.....	51
3.6.4	Zytolyse-Experimente .....	52



<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1	LFA-1 vermittelte Aktivierung des IL-2-Promotors .....	53
4.2	Signalfunktionen der zytoplasmatischer Domänen des LFA-1-Integrins .....	57
4.2.1	Konstruktion und Expression chimärer sIg-Fusionsproteine.....	58
4.2.2	Analyse des Calciumsignals nach Quervernetzung der LFA-1-Fusionsproteine .....	62
4.2.3	Aktivierung des IL-2-Promotors nach Quervernetzung der CD18-Untereinheit.....	64
4.3	Identifizierung molekularer Komponenten der CD18-Signalkaskade .....	66
4.3.1	Beitrag von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zur CD18-Signaltransduktion .....	67
4.3.2	Abhängigkeit der CD18-Signaltransduktion vom TCR .....	69
4.3.3	Rekonstitution der CD18-Signaltransduktion in TCR-defizienten Jurkat Zellen .....	71
4.3.4	Umverteilung von Membranrezeptoren nach T-Zell-Aktivierung .....	76
4.3.5	Ermittlung der Signalkapazität des mit CD18-assoziierten DNAM-1-Rezeptors .....	80
4.4	Mutationsanalyse des zytoplasmatischen Anteils der CD18-Kette .....	82
4.4.1	Analyse carboxyterminaler Deletionsmutanten der CD18-Untereinheit .....	83
4.4.2	Einfluß des membrandistalen NPXF-Motivs auf die CD18-Signalfunktion .....	86
4.5	Mutation des membrandistalen NPXY-Motivs der CD29-Kette.....	88
4.6	Analyse der CD18-Punktmutanten im Kontext des LFA-1-Moleküls .....	91
4.6.1	Rekonstitution der Adhäsivität CD18-defizienter SK- $\beta$ 2.7 Zellen.....	92
4.6.2	Beitrag des zytoplasmatischen CD18-Anteils zur Zytolyse .....	96
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
5.1	LFA-1 als costimulatorisches Molekül der T-Zell-Aktivierung.....	102
5.1.1	LFA-1 induziert nach ICAM-Bindung den IL-2-Promotor in T-Helfer-Zellen .....	102
5.1.2	T-Zellen benötigen LFA-1 für ihre zytotoxische Aktivität .....	103
5.2	Signaltransduktionskapazität der individuellen LFA-1-Untereinheiten .....	104
5.2.1	Quervernetzung der CD18-Untereinheit induziert zellulären Calcium-Einstrom .....	105
5.2.2	Stimulation der CD18-Kette aktiviert den IL-2-Promotor .....	106
5.3	Mechanismus der CD18-vermittelten Signaltransduktion.....	109
5.3.1	Gegenüberstellung der Signaltransduktionsmechanismen von CD18 und CD28 .....	111
5.3.2	Verknüpfung der Signalkaskaden der CD18-Untereinheit und des TCRs .....	113

5.3.3	Funktionelle Assoziation der Signalkaskaden von CD18 und DNAM-1 .....	116
5.3.4	Unterschiede in der CD18- und CD29-Signalkapazität.....	118
5.4	CD18-Signalfunktion ist abhängig vom membrandistalen NPXF-Motiv .....	119
5.4.1	Das membrandistale NPXF-Motiv ist essentiell für das CD18-Calciumsignal.....	121
5.4.2	Einführung eines NPXF-Motivs in CD29 induziert zellulären Calcium-Einstrom.....	122
5.4.3	Bedeutung des NPXF-Motivs für die Funktion des gesamten LFA-1-Moleküls .....	124
5.5	Ausblick.....	127
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>129</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	129
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	144
6.3	Tabellarischer Lebenslauf.....	149

# 1 Zusammenfassung

Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist ein essentieller Prozeß für die Regulation der adaptiven Immunantwort. Hierbei werden in Folge einer Antigen-Exposition über verschiedene Oberflächenrezeptoren intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse initiiert, welche in einer klonalen Expansion von T-Lymphozyten sowie deren Differenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen resultieren. Die Spezifität dieser Prozesse wird durch die Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) und einem Antigen-beladenen MHC-Molekül vermittelt, einer Interaktion, die allerdings nicht hinreichend für eine vollständige und dauerhafte Aktivierung der T-Zelle ist. Hierzu ist die Aktivierung sogenannter akzessorischer Oberflächenrezeptoren nötig, welche sowohl zur Verstärkung der Zell-Zell-Adhäsion als auch zur Induktion intrazellulärer Signalwege beitragen. Ein costimulatorisches Signal für naive T-Lymphozyten vermittelt zum Beispiel das CD28-Molekül, wodurch der Übergang dieser Zellen in einen anergischen Zustand verhindert und Zellproliferation ermöglicht wird. Zur Verstärkung der Zell-Zell-Interaktion tragen demgegenüber vor allem Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Cadherine und Integrine bei. Der einzige Vertreter der  $\beta$ 2-Integrinfamilie auf Lymphozyten, LFA-1, stand im Zentrum der im Folgenden beschriebenen Analysen.

Es gab bereits Anhaltspunkte dafür, daß LFA-1 neben seiner Adhäsionsfunktion auch in Signaltransduktionsprozesse involviert ist. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der LFA-1-vermittelten Signalwege bislang unvollständig charakterisiert. Dies liegt vor allem darin begründet, daß eine hochaffine Ligandenbindung erst nach einer Konformationsänderung des Integrins erfolgen kann. Eine solche Aktivierung des Integrins wird beispielsweise durch Stimulation der T-Lymphozyten über den T-Zell-Antigenrezeptor induziert, wodurch sich jedoch LFA-1-abhängige Signale mit denen des TCRs überlagern.

Daher wurde im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit ein auf Fusionsproteinen basierendes experimentelles System etabliert, welches eine aktivierungsunabhängige Untersuchung der LFA-1-vermittelten Signaltransduktion ermöglicht. Hierdurch wurde gezeigt, daß in humanen T-Lymphozyten die Aggregation der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta$ 2-Kette (CD18-Untereinheit) zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, zur IL-2-Promotoraktivierung sowie zum Anstiegs des Phosphotyrosingehalts zellulärer Proteine führte. Die Modulation dieser charakteristischen T-Zell-Aktivierungsparameter wird durch die zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ 2-Untereinheit von

LFA-1 induziert, nicht aber durch die intrazellulären Anteile der Integrin  $\alpha$ L- bzw.  $\beta$ 1-Kette. Weiterhin konnte demonstriert werden, daß ein für die  $\beta$ 2-Untereinheit spezifisches NPXF-Sequenzmotiv für deren Signalfunktion erforderlich ist. Dieselbe Region ist ebenso für die Signaltransduktion des nativen LFA-1-Gesamt-moleküls von elementarer Bedeutung. Überdies zeigten Untersuchungen in TCR-defizienten T-Zellen, daß die Oberflächenexpression des T-Zell-Rezeptors für den LFA-1-induzierten Signalweg essentiell ist. Demgegenüber erfolgte die intrazelluläre Calciummobilisierung durch das CD28-Molekül auch unabhängig von einer Expression des TCRs.

Insgesamt konnte durch die vorliegenden Analysen die wesentliche Bedeutung des zytoplasmatischen Anteils der  $\beta$ 2-Untereinheit des LFA-1-Integrins für den Prozeß der T-Zell-Aktivierung dokumentiert werden. Darüberhinaus wurde eine bisher unbekannt funktionelle Kooperativität zwischen LFA-1 und Komponenten des T-Zell-Antigenrezeptors aufgezeigt.

## 2 Einleitung

Durch die vielfältigen Funktionen des Immunsystems können im menschlichen Organismus sowohl körperfremde als auch eigene, entartete Moleküle von den normalen körpereigenen Bestandteilen unterschieden und bekämpft werden. Die hierfür bei den Vertebraten im Laufe der Evolution hochentwickelten Systeme können in zwei große Klassen aufgeteilt werden, nämlich in die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Arten der Immunabwehr besteht darin, daß mittels der angeborenen Immunität nur die Abwehr eines durch genetische Determination limitierten Repertoires an Fremdstoffen erfolgen kann. Dagegen ist durch die erworbene Immunität die spezifische Abwehr von einer sich ständig ändernden Vielfalt körperfremder Substanzen auf eine flexible und anpassungsfähige Weise möglich. Unter den diversen Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs sind Lymphozyten diejenigen, welche für die Einleitung der adaptiven Immunität verantwortlich sind und deren Aktivierung zu einer Immunantwort sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene führen kann. Diese beiden Formen der spezifischen Immunität unterliegen einer strikten Regulation, die durch ein komplexes Zusammenwirken einer Vielzahl molekularer Faktoren und Mechanismen gewährleistet wird. Die Prozesse und die beteiligten Komponenten, welche vor allem bei der Initiation der zellulären Immunantwort eine Rolle spielen, werden in den nächsten Kapiteln näher beschrieben.

### 2.1 Funktion von T-Lymphozyten bei der Immunantwort

Wie bereits erwähnt, erfolgt eine spezifische Immunantwort unter Einbeziehung der Lymphozyten, den einzigen Zelltypen, die zur Erkennung und Unterscheidung verschiedenster Antigene in der Lage sind. Aufgrund der differentiellen Expression charakteristischer Oberflächenproteine, welche die funktionelle Heterogenität der Lymphozyten bedingen können, werden diese in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt, nämlich in die B- und T-Lymphozyten sowie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dabei differenzieren die B-Lymphozyten nach Aktivierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Über die Ontogenese der NK-Zellen sowie über die molekularen Mechanismen, welche zur Aktivierung ihrer Effektorfunktionen führen, ist bisher nur wenig bekannt. Die Reifung der

T-Lymphozyten erfolgt im Thymus, wobei ständig viele Zellen mit einer großen Anzahl unterschiedlicher Spezifitäten generiert werden, um gegen eine sich fortlaufend ändernde, heterogene Vielfalt an Antigenen gewappnet zu sein. Allerdings entstehen hier als Folge dieser zufällig erzeugten Diversität auch autoreaktive und funktionell eingeschränkte Zellen, welche im Verlauf eines als klonale Selektion bezeichneten Prozesses eliminiert werden müssen (negative Selektion). Damit findet die endgültige Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen T-Lymphozyten nur dann statt, wenn diese Toleranz gegenüber eigenen Körperzellen aufweisen, d.h. in der Lage sind zwischen fremden und eigenen Substanzen zu diskriminieren. Durch diesen als positive Selektion bezeichneten Vorgang sind ausschließlich vollständig ausdifferenzierte T-Zellen in der Lage zu proliferieren, durch weitere Differenzierungsprozesse verschiedene Subpopulationen auszubilden und aus dem Thymus auszuwandern. Hierbei können aufgrund funktioneller Unterschiede T-Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität gegenüber Zielzellen von Helfer-T-Zellen unterschieden werden, welche durch das Sezernieren von Lymphokinen zu einer Modulation der Immunantwort beitragen (van Oers, 1999; Akashi *et al.*, 2000).

Eine wesentliche Voraussetzung für den Ablauf positiver und negativer Selektionsprozesse ist die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren mit unterschiedlichen Spezifitäten sowohl auf den Lymphozyten als auch den körpereigenen Zellen. Durch deren Interaktion kann letztlich die Erkennung von eigenen und fremden Antigenen erfolgen. Eine solche Wechselwirkung wird durch das Vorhandensein polymorpher Rezeptoren sowohl auf den Lymphozyten als auch auf den Antigen-präsentierenden Zellen gewährleistet.

In diesem Kontext spielt der aus verschiedenen Protein-Untereinheiten aufgebaute T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) eine essentielle Rolle (Abbildung 2.1). Der TCR erkennt Peptidantigene, welche durch die hochgradig polymorphen Genprodukte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC = major histocompatibility complex) präsentiert werden. Durch die Interaktion des TCRs mit dem Antigen-beladenen MHC-Molekül ist eine Diskriminierung eigener von fremden Substanzen und damit eine selektive Immunabwehr möglich. Zudem ist das Immunsystem mit Hilfe dieser langlebigen Lymphozyten in der Lage, nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen schneller und wirkungsvoller reagieren zu können als bei der erstmaligen Abwehr. Diese Fähigkeit wird auch als molekulares Gedächtnis des Immunsystems bezeichnet.

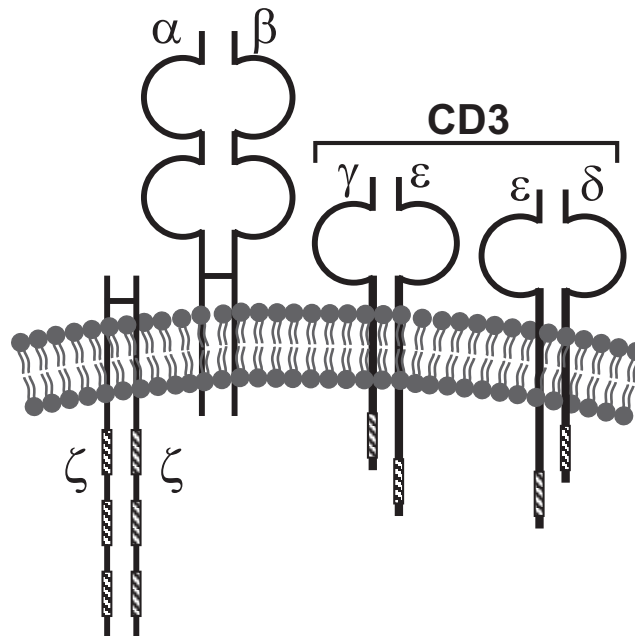


Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung der Komponenten des T-Zell-Antigenrezeptors.** Der TCR setzt sich aus den antigenbindenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten sowie den assoziierten CD3- und TCR- $\zeta$ -Untereinheiten zusammen. Schraffiert dargestellt sind die ITAM-Motive innerhalb der zyttoplasmatischen Regionen der CD3- und TCR- $\zeta$ -Ketten, welche für die transmembrane Signalübertragung ins Zellinnere verantwortlich sind (siehe hierzu Kapitel 2.2).

In den folgenden Kapiteln werden die molekularen Grundlagen der Immunabwehr durch T-Lymphozyten und die Bedeutung akzessorischer Moleküle für den Prozeß der T-Zell-Aktivierung näher erläutert.

## 2.2 Mechanismen zur Aktivierung von T-Lymphozyten

Der TCR weist eine exklusive Spezifität für ein definiertes Peptidantigen auf. Dieses wird ausschließlich im Komplex mit einem genau festgelegten, körpereigenen MHC-Molekül auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle bzw. der Zielzelle erkannt. Die reifen Lymphozyten in der Körperperipherie befinden sich zunächst in einer mitotisch nicht-aktiven Phase. Erst durch Stimulation mit dem passenden Antigen-präsentierenden MHC-Molekül findet im Zellzyklus der T-Lymphozyten ein Übergang von der  $G_0$ - in die  $G_1$ -Phase statt. Hierzu tragen eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse bei, welche unter dem Begriff der

T-Zell-Aktivierung zusammengefaßt werden. Die Bindung des Komplexes aus Antigen und dem MHC-Molekül durch den TCR-Komplex führt zunächst zur Induktion früher Signaltransduktionsereignisse. In deren Folge wird die transkriptionelle Expression vielfältiger T-Zell-spezifischer Gene eingeleitet. Dazu zählt beispielsweise die verstärkte Expression des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2, welcher essentiell für die Einleitung von T-Zell-Proliferation ist. Allerdings findet die Aktivierung des IL-2-Promotors in vielen Zelllinien unabhängig von deren Zellteilungsstadium statt und ist daher ein häufig herangezogener Parameter zur Analyse von T-Zell-Aktivierung. Diese Proliferationsprozesse führen letztendlich zur klonalen Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen, wodurch Effektorfunktionen wie beispielsweise die Aktivierung von Makrophagen oder die Stimulation der Antikörperproduktion durch B-Zellen unterstützt werden.

Die transkriptionelle Aktivierung T-Zell-spezifischer Gene als Folge der Antigen-vermittelten Stimulation setzt jedoch voraus, daß vom TCR empfangene, extrazelluläre Signale zunächst ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern übertragen werden. Bei der Signalweiterleitung spielen die zytoplasmatischen Anteile der CD3- und TCR- $\zeta$ -Untereinheiten eine essentielle Rolle (van Leeuwen und Samelson, 1999; Kane *et al.*, 2000). Ein sehr früh stattfindendes Ereignis im Verlauf der T-Zell-vermittelten Immunantwort ist die Aktivierung von Phosphotyrosinkinasen der Src-Familie wie z.B. p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup>. In T-Lymphozyten zählen zu den Substraten dieser Src-Tyrosinkinasen u.a. auch die CD3- und TCR- $\zeta$ -Ketten, welche durch die Aktivität dieser Kinasen innerhalb definierter, als ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; siehe Abbildung 2.1) bezeichneter Sequenzmotive an Tyrosinresten phosphoryliert werden (Weiss und Littman, 1994; Chan und Shaw, 1996; Cantrell, 1996; Love und Shores, 2000).

Die Phosphorylierung von ITAMs der Ketten des TCR-CD3-Komplexes resultiert wiederum in der Rekrutierung von Tyrosinkinasen der Syk-Familie, welche ebenfalls Substrate von Src-Kinasen sind. Die Tyrosinkinasen Syk und ZAP-70 sind die wichtigsten Mitglieder dieser Familie in Lymphozyten, wobei ZAP-70 ausschließlich in reifen T-Zellen exprimiert wird. Die direkte Assoziation dieser beiden Syk-Kinasen mit den phosphorylierten ITAMs des TCR-Komplexes findet mittels zweier tandemartig angeordneter SH2-Domänen (Src homology domains 2) statt, welche sich aminoterminal der Kinasedomäne befinden (Hatada *et al.*, 1995; Rudd, 1999). Auf diese Weise werden ZAP-70 und Syk durch Tyrosinkinasen der Src-Familie an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert und erlangen somit autokatalytische Aktivität. Der Anstieg des Phosphotyrosingehalts von ZAP-70 führt wiederum zur Rekrutierung und verstärkten Tyrosinphosphorylierung einer Vielzahl von



Adapterproteinen, welche für die intrazelluläre Signalübertragung wichtig sind. Diese sind durch Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen an der Ausbildung eines komplexen Netzwerks an Signalmolekülen beteiligt. Ein Beispiel für die Kopplung intrazellulärer Signalwege an die TCR-Signaltransduktionskaskade ist die Regulation der PLC $\gamma$ 1- (Phospholipase C $\gamma$ 1) Aktivität durch die T-Zell-spezifischen Adapterproteine SLP-76 und LAT (Rudd, 1999; Norian und Koretzky, 2000; Zhang und Samelson, 2000). Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 resultiert in der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Durch die Bindung an den entsprechenden Rezeptor führt IP<sub>3</sub> einerseits direkt zur Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum. Andererseits hat der Calciumausstrom aus diesen Speichern das Öffnen von Calciumkanälen in der Plasmamembran zur Folge, so daß auch auf diesem Wege ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration stattfindet (Meldolesi und Pozzan, 1998). Der wesentliche Beitrag, den intrazelluläres Calcium zur T-Zell-Signaltransduktion leistet, ist die Aktivierung Calcium-sensitiver Proteine wie z.B. der Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin bzw. Proteinkinasen der PKC-Familie, welche an der Regulation von Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, NF- $\kappa$ B bzw. auch von nukleärem CREB beteiligt sind. Zusätzlich wird der Kernimport von zytoplasmatischem NF- $\kappa$ B direkt durch eine PKC-Isoform kontrolliert, deren Aktivität wiederum von DAG reguliert wird (Berridge, 1997; Berridge *et al.*, 1999; Myung *et al.*, 2000).

Insgesamt resultieren die verschiedenen Signalkaskaden, welche schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt sind, im Verlauf der T-Zell-Aktivierung in einer verstärkten Expression spezifischer Genprodukte wie beispielsweise des Lymphokins IL-2 und damit in der Proliferation der Lymphozyten. Dabei dienen Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung sowohl zur Vermittlung von Spezifität und zur Modulation des TCR-vermittelten Signals als auch zum Aufbau eines multimolekularen Signalnetzwerkes.

Auf welche Weise das TCR-Signal unter Beteiligung weiterer Membranproteine moduliert werden kann, wird in den folgenden Kapiteln erörtert.

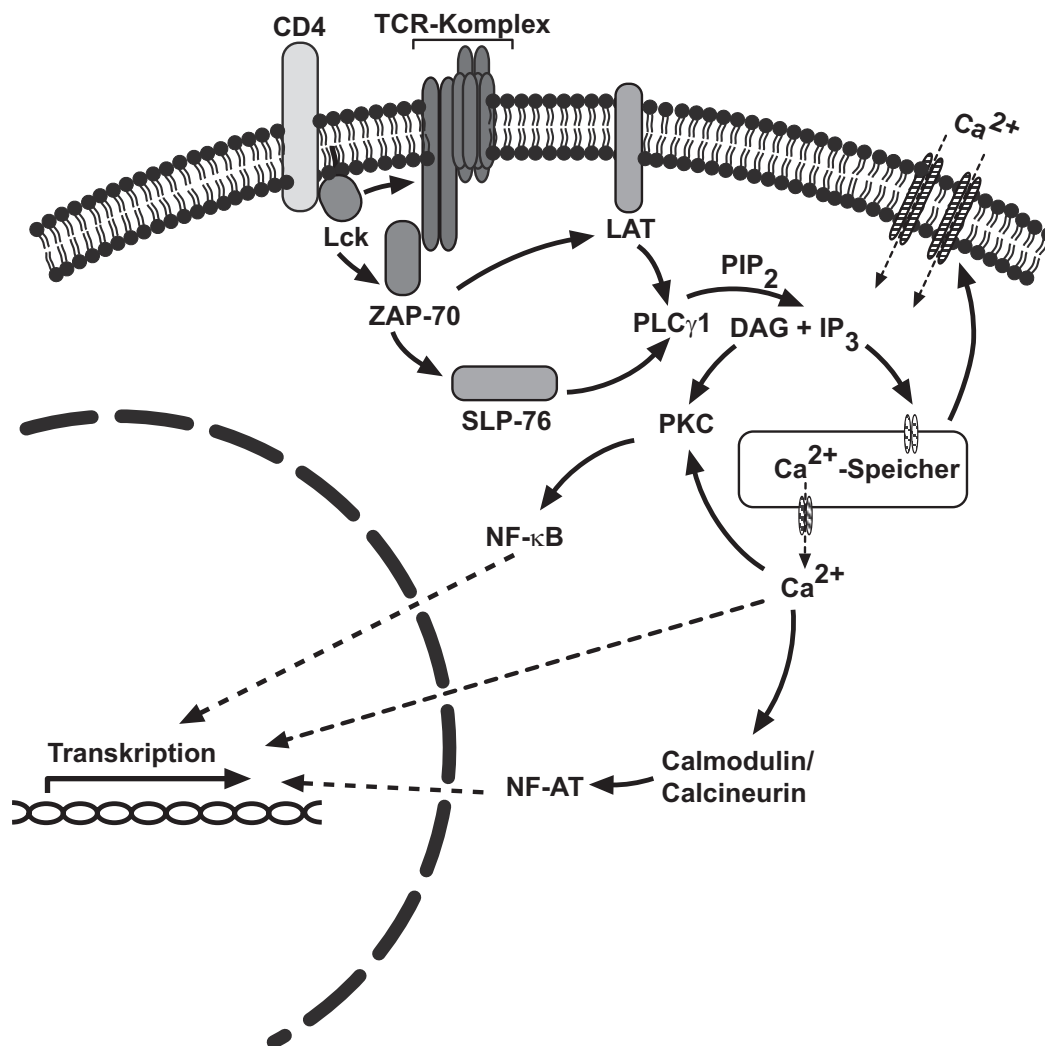


Abbildung 2.2: Intrazelluläre Signalkaskaden des T-Zell-Antigenrezeptors und die Bedeutung der Calciummobilisierung für die Lymphozyten-Proliferation. (modifiziert nach Berridge *et al.*, 2000)

### 2.3 Bedeutung akzessorischer Rezeptoren für die T-Zell-Aktivierung

Die Interaktion des TCRs mit dem Antigen-präsentierenden MHC-Molekül verleiht dem Prozeß der T-Zell-Aktivierung zwar Spezifität, ist jedoch für eine vollständige Aktivierung der TCR-Signalkaskade nicht ausreichend. Daher erfordert eine effektive T-Zell-Immunantwort die Involvierung der Corezeptoren CD4 oder CD8 sowie weiterer akzessorischer Membranproteine wie CD2, CD28 und LFA-1 (Dustin und Chan, 2000; van der Merwe *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur Wechselwirkung zwischen TCR und dem Antigen-beladenen MHC-

Molekül, ist für eine Modulation des TCR-Signals durch costimulatorische Rezeptoren die Spezifität des Antigens nicht ausschlaggebend (Schwartz, 1992; Janeway und Bottomly, 1994).

Je nach Art des akzessorischen Membranproteins kann der costimulatorische Beitrag zur T-Zell-Aktivierung allerdings sehr unterschiedlich sein. Einerseits wird durch Liganden-Rezeptor-Interaktionen die Zell-Zell-Adhäsion verstärkt und somit die Ausbildung eines über einen längeren Zeitraum stabilen Komplexes zwischen dem TCR und der Antigen-präsentierenden Zelle unterstützt. Andererseits kann die Stimulation bestimmter Membranrezeptoren in der Induktion intrazellulärer Signalkaskaden resultieren, welche sowohl zur Aktivierung als auch zur Differenzierung der T-Zellen beitragen (Dustin und Springer, 1991; Schwartz, 1992). Dabei können diese Signaltransduktionsprozesse in die Signalkaskade des TCR-CD3-Komplexes münden und somit in Abhängigkeit vom TCR-Signal an der T-Zell-Aktivierung mitwirken. Andererseits können akzessorische Rezeptoren auch in Unabhängigkeit vom TCR an intrazelluläre Signale vermitteln. Studien mit Cyclosporin A sowie FK506 weisen auf eine derartige, von der TCR-Signalkaskade unabhängige Funktion des CD28-Moleküls hin. Im Gegensatz zur TCR-Signalkaskade ließen sich nämlich die CD28-vermittelten, costimulatorischen Signale durch diese Inhibitoren der Phosphatase Calcineurin nicht vollständig inhibieren (June *et al.*, 1994; Van Gool *et al.*, 1996; Shapiro *et al.*, 1997; Harhaj und Sun, 1998). Die Mechanismen dieser TCR-unabhängigen Signalübertragung sind bisher allerdings weitgehend unbekannt.

Das effiziente Zusammenwirken der vielfältigen Membranrezeptoren und Signalmoleküle während der T-Zell-Aktivierung erfordert eine koordinierte räumliche Anordnung dieser Proteine (Abbildung 2.3). Aufgrund der funktionellen Analogie zum Nervensystem wird die Kontaktstelle zwischen der T- und Antigen-präsentierenden Zelle auch als immunologische Synapse bezeichnet (Dustin und Shaw, 1999; Delon und Germain, 2000). Wie aus neueren Untersuchungen hervorgeht, findet in Folge dieses Zell-Zell-Kontakts eine charakteristische Umverteilung von Membranrezeptoren und zytoplasmatischen Signalmolekülen statt. Dabei werden sowohl der TCR-Komplex als auch akzessorische Rezeptoren wie CD2, CD4, CD28 und LFA-1 sowie essentielle Signalmoleküle wie ZAP-70, p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> in speziellen, hohem Ausmaß organisierten Membransubkompartimenten, den sogenannten SMACs (supramolecular activation clusters), angereichert (Monks *et al.*, 1998; Viola *et al.*, 1999; Penninger und Crabtree, 1999). Im zentralen Bereich dieser SMACs, dem cSMAC (central SMAC), finden sich der TCR selbst, die Rezeptoren CD2 und CD28 sowie die Serin/Threonin-Kinase PKC $\theta$ . Das Integrin LFA-1 und Talin bilden einen äußeren Ring, den

pSMAC (peripheral SMAC), welcher den zentralen Bereich umgibt und somit von der restlichen Membran isoliert (Monks *et al.*, 1998; Brown und Shaw, 1999; Krummel *et al.*, 2000). Der initiale Kontakt zwischen Antigen und TCR findet jedoch im äußeren Ring der sich ausbildenden Synapse statt. Dieser Komplex wird aber innerhalb weniger Minuten in den zentralen Bereich transportiert (Grakoui *et al.*, 1999; Lanzavecchia und Sallusto, 2000).

Die molekularen Mechanismen, welche zur Ausbildung der SMACs führen, sind noch nicht geklärt, jedoch werden hierfür verschiedene Modelle wie die Topologie der Rezeptoren und deren Liganden innerhalb der Membran diskutiert. Demnach sollen Oberflächenmoleküle entsprechend ihrer Länge im Bereich der immunologischen Synapse verteilt sein. Die kürzeren Rezeptoren umgeben den Komplex aus dem TCR und dem Antigen-beladenen MHC-Molekül, längere Moleküle wie LFA-1 bilden eine Ring um diesen zentralen Bereich (Shaw und Dustin, 1997; Dustin *et al.*, 1998; Lanzavecchia und Sallusto, 2000; van der Merwe *et al.*, 2000).

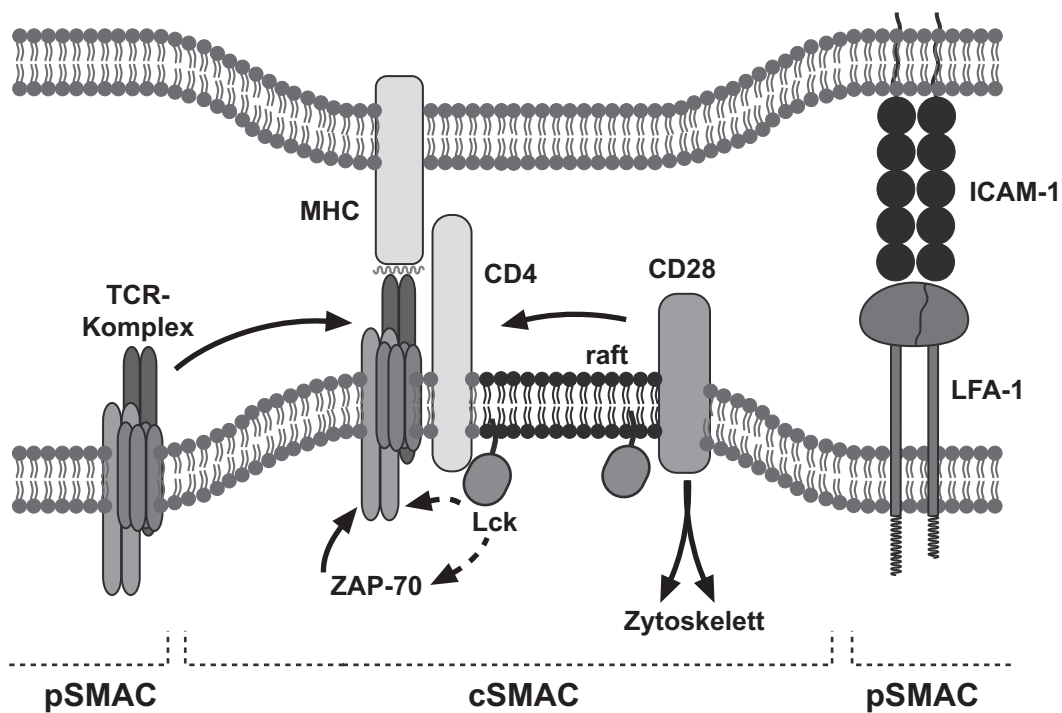


Abbildung 2.3: **Umverteilung von Membranrezeptoren während der T-Zell-Aktivierung.** Die durchgezogenen Pfeile weisen auf die Rekrutierung der entsprechenden Moleküle hin, wogegen mit gestrichelten Pfeilen Phosphorylierungsereignisse dargestellt sind.

Darüberhinaus könnten Änderungen in der Lipidzusammensetzung innerhalb definierter Bereiche der Plasmamembran ebenfalls zur Umverteilung von Rezeptoren und Signalmolekülen während der T-Zell-Aktivierung führen (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Harder *et al.*, 1998, Janes *et al.*, 1999). Diese als *lipid rafts*<sup>1</sup> bezeichneten Membransubkompartimente enthalten Signalmoleküle wie LAT und p56<sup>lck</sup>, welche nach Stimulation von akzessorischen Rezeptoren wie CD28 in die SMACs rekrutiert werden (Viola *et al.*, 1999; Simons und Toomre, 2000). Über diese Membranzusammenhänge könnte auch das Zytoskelett an der Entstehung der SMACs beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, daß der durch Costimulation induzierte aktive Transport von Lipiden und Proteinen zur Zell-Zell-Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle von Komponenten des Zytoskeletts abhängig ist (Xavier *et al.*, 1998; Montixi *et al.*, 1998). Durch Interaktionen mit Komponenten des Zytoskeletts könnte die Flexibilität der *lipid rafts* moduliert werden (Rozelle *et al.*, 2000).

Lipidmoleküle in der Plasmamembran können auch die von Integrinen vermittelten Zelladhäsions- und Signaltransduktionsprozesse beeinflussen (De Deyne *et al.*, 1998; Oliferenko *et al.*, 1999; Green *et al.*, 1999; Krauss und Altevogt, 1999). Die vielfältigen Funktionen des LFA-1-Integrins werden in den nächsten beiden Kapiteln ausführlich erläutert.

## 2.4 Allgemeine Funktionen des LFA-1-Integrins

Die Wechselwirkungen von Zellen mit der extrazellulären Matrix bzw. Zell-Zell-Interaktionen sind für zahlreiche biologische Prozesse, wie z.B. die Embryogenese, Zelldifferenzierung, Wundheilung sowie Immunität von essentieller Bedeutung. Hierbei sind in erster Linie die Integrin-Zelladhäsionsrezeptoren beteiligt. Integrine sind eine Familie heterodimerer Membranproteine, welche jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind. Die Existenz mehrerer verschiedener  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten führt zu einer großen

---

<sup>1</sup>In der Literatur existiert für diese Membransubkompartimente eine Vielfalt weiterer Bezeichnungen: z.B. membrane rafts, DIMs (detergent-insoluble membranes), DRMs (detergent-resistant membranes), DIGs (detergent-insoluble glycolipid-rich membranes), TIFFs (Triton-insoluble floating fraction) oder GEMs (glycosphingolipid-enriched membranes). Diese Bezeichnungen beschreiben in erster Linie die vom übrigen Anteil der Membran abweichende, biochemische Zusammensetzung definierter Regionen innerhalb der Plasmamembran (Brown und London, 1998; Janes *et al.*, 2000).

Zahl potentieller Kombinationen, wodurch die Vielfalt der Integrinfamilie zustande kommt. Eine Klasse Leukozyten-spezifischer Integrine wird aufgrund gleicher  $\beta$ -Untereinheiten als Subfamilie der  $\beta$ 2-Integrine bzw. CD18-Integrine bezeichnet, welche mit einer der vier bislang auf Leukozyten bekannten  $\alpha$ -Untereinheiten, nämlich CD11a, CD11b, CD11c und CD11d, assoziiert sind. Das ausschließlich auf Lymphozyten exprimierte Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) setzt sich aus einer Kombination der CD18-Kette mit der CD11a-Kette zusammen (Hynes, 1992; Stewart *et al.*, 1995; Gahmberg, 1997). Die physiologischen Liganden von LFA-1 sind die transmembranen Proteine ICAM-1, -2 und -3 (intercellular adhesion molecule), welche Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind. Für ICAM-1 konnte eindeutig gezeigt werden, daß es auf der Zelloberfläche als Homodimer vorliegt. Dabei weist das LFA-1 für den dimeren Liganden eine höhere Affinität auf als für monomeres ICAM-1 (Miller *et al.*, 1995; Reilly *et al.*, 1995; Casasnovas *et al.*, 1998)

Die Adhäsionsfunktion des LFA-1-Integrins ist vor allem dann von essentieller Bedeutung, wenn beispielsweise während der konstitutiven Rezirkulation der Lymphozyten diese aus dem Blutkreislauf in die lymphatischen Organe geleitet werden müssen. Ebenfalls von LFA-1 werden diejenigen Zell-Zell-Kontakte vermittelt, welche bei Entzündungsprozessen für eine Migration von Leukozyten aus der Blutbahn durch umgebendes Endothelgewebe hindurch zum Entzündungsherd erforderlich sind. Darüberhinaus unterstützt LFA-1 Zell-Zell-Interaktionen während der Lymphozyten-Aktivierung und damit die Antigen-Präsentation, welche für die Zytolyse sowie die Produktion von Lymphokinen wichtig sind (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999; Dib, 2000).

Die Regulation der LFA-1-vermittelten Zelladhäsivität erfolgt u.a. durch Interaktionen der  $\beta$ 2-Untereinheit mit Komponenten des Zytoskeletts, wie beispielsweise  $\alpha$ -Actinin bzw. Filamin sowie zytoplasmatischen Proteinen wie z.B. Cytohesin-1, einem Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor = GEF) von GTPasen der ARF-Familie (Aplin *et al.*, 1999; Geiger *et al.*, 2000; Knorr *et al.*, 2000). Neueren Untersuchungen zufolge reguliert auch die GTPase Rap1 die Adhäsivität der  $\beta$ 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 (CD11b/CD18) (Katagiri *et al.*, 2000; Caron *et al.*, 2000). Die Interaktion des zytoplasmatischen Anteils der Integrin  $\beta$ 2-Untereinheit mit Rack1 (receptor for activated C-kinases), welches an der Membranrekrutierung der PKC beteiligt ist, hat ebenfalls Auswirkungen auf die Adhäsivität lymphoblastoider Zellen (Liliental und Chang, 1998). Darüberhinaus sind Tyrosinkinase wie ZAP-70, Pyk2, einem Mitglied der FAK- (focal adhesion kinase) Familie sowie die Serin/Threonin-Kinase ILK (integrin linked kinase) in die Modulation LFA-1-

vermittelter Zelladhäsions- bzw. Migrationsprozesse impliziert worden (Soede *et al.*, 1998; Soede *et al.*, 1999; Rodriguez-Fernandez *et al.*, 1999; Dedhar und Hannigan, 1996).

In welchem Ausmaß diese intrazellulären Interaktionen des LFA-1-Integrins auch Signaltransduktionsprozesse während der T-Zell-Aktivierung beeinflussen können, soll im Folgenden Kapitel erörtert werden.

## 2.5 Costimulatorischer Beitrag des LFA-1-Integrins

Die in Abschnitt 2.4 beschriebene enge funktionelle Assoziation des LFA-1-Integrins mit zytoplasmatischen Kinasen wie ZAP-70 und PKC legt die Vermutung nahe, daß LFA-1 neben der Involvierung in Zelladhäsionsprozesse auch zur T-Zell-Signalkaskade beitragen kann. Eine solche Signalfunktion konnte bereits für andere akzessorische Moleküle demonstriert werden. Zum Beispiel tragen CD2, CD28 oder der Corezeptor CD4, neben der Verstärkung von Zell-Zell-Interaktionen während der T-Zell-Aktivierung, auch zu den sich anschließenden Signaltransduktionsprozessen bei (Glaichenhaus *et al.*, 1991; Krummel *et al.*, 2000; Zeitlmann *et al.*, 2001).

Einen costimulatorischen Beitrag des LFA-1-Integrins unterstützen verschiedene Untersuchungen. Diese konnten beispielsweise zeigen, daß durch Stimulation des Integrins mittels gegen die CD18-Untereinheit gerichteter Antikörper die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgt, einem Schlüsselenzym der T-Zell-Signalkaskade, welches bereits unter Abschnitt 2.2 beschrieben wurde (Kanner *et al.*, 1993; Kanner, 1996). Aufgrund ähnlicher Experimente konnte auch die Phosphorylierung von Mitgliedern der FAK-Familie demonstriert werden, was ebenfalls auf eine Signalvermittlungsfunktion des LFA-1-Integrins in T-Zellen hindeutet (Brockdorff *et al.*, 1998; Tabassam *et al.*, 1999). Entsprechend hierzu zeigten frühere Experimente mit neutrophilen Granulozyten, welche hauptsächlich das  $\beta$ 2-Integrin Mac-1 exprimieren, daß sich nach Aggregation der  $\beta$ 2-Untereinheit mit spezifischen Antikörpern intrazelluläre Signalwege wie Calciummobilisierung und Tyrosinphosphorylierung induzieren ließen (Hellberg *et al.*, 1995; Hellberg *et al.*, 1996).

Allerdings könnte LFA-1 auch durch Wechselwirkungen mit anderen Membranrezeptoren indirekt zur Signalvermittlung beitragen. Eine derartige funktionelle Interaktion wurde von LFA-1 mit DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) beschrieben, einem erst kürzlich identifizierten Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Der zytoplasmatische Anteil von

DNAM-1 interagiert in aktivierten T-Zellen mit der Tyrosinkinase p59<sup>fyn</sup> und ist darüber hinaus essentiell für die Interaktion mit LFA-1 (Shibuya *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 1999). Andere Integrin-Subfamilien koppeln ebenfalls über vergleichbare Mechanismen an intrazelluläre Signalkaskaden, zum Beispiel über indirekte Interaktionen mit Rezeptor-Tyrosinkinasen und extrazellulären Proteasen (siehe Abbildung 2.4).

Insgesamt weisen die hier beschriebenen Ergebnisse auf eine Involvierung der  $\beta$ 2-Integrine in Signaltransduktionsereignisse hin. Allerdings sind bislang keine detaillierten Mechanismen der Integrin-vermittelten Signaltransduktion bekannt, da diese unter physiologischen Bedingungen eng an deren Adhäsionsfunktion gekoppelt sind.

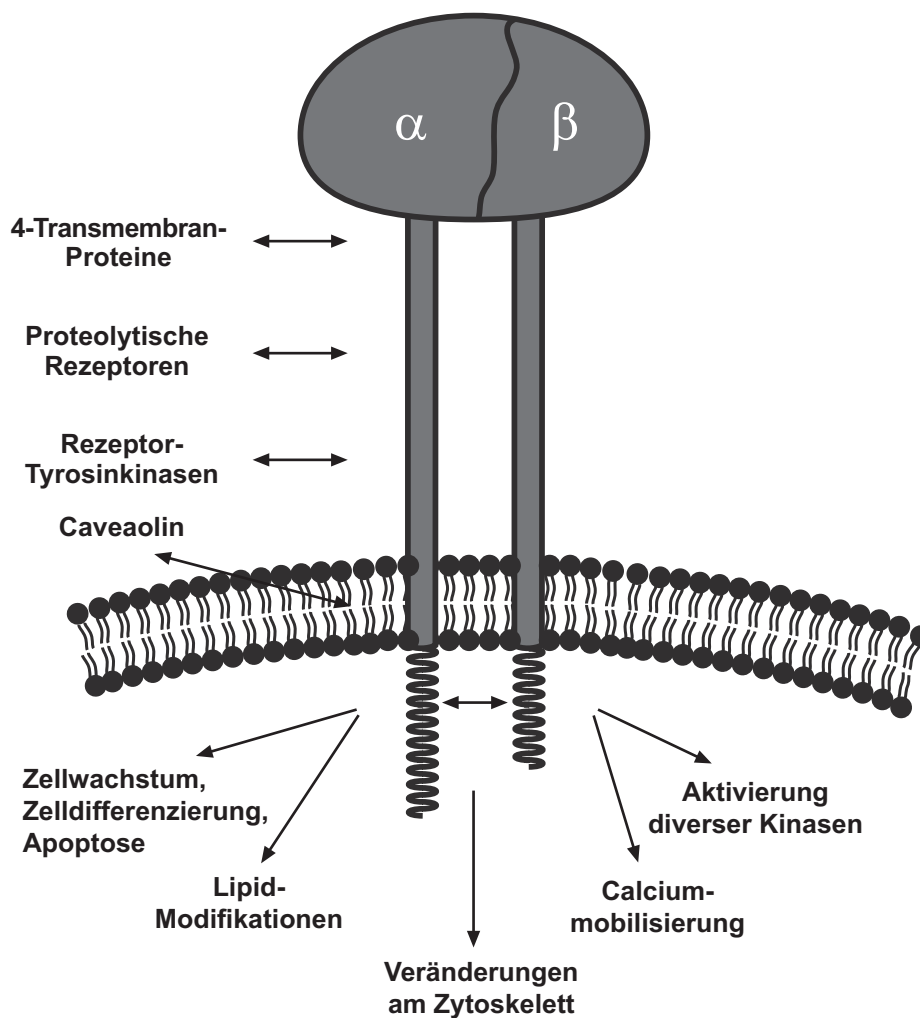


Abbildung 2.4: Schematische Übersicht der Integrin-vermittelten Signalwege (modifiziert nach Yamada, 1997).



## 2.6 Zielsetzung

Obgleich  $\beta$ 2-Integrine, aufgrund ihrer grundlegenden Bedeutung für die Induktion chronischer und akuter Entzündungsprozesse sowie für die Bekämpfung bakterieller und viraler Infektionen, Gegenstand intensiver Untersuchungen sind, ist über die Involvierung dieser Integrin-Subfamilie in Signaltransduktionsprozesse nur sehr wenig bekannt (vergleiche hierzu die Abschnitte 2.4 und 2.5). Demgegenüber gibt es weit mehr Erkenntnisse über die Signalwege der Membranrezeptoren CD2, CD4 und CD28, welche wie LFA-1 bei der T-Zell-Aktivierung eine essentielle Rolle spielen.

Die Schwierigkeiten, welche sich bei einer Analyse der Signaltransduktion von LFA-1 ergeben, resultieren zum einen daraus, daß das Integrin für eine effiziente Ligandenbindung zunächst in die aktive Konformation überführt werden muß. Hierfür ist in der Regel eine Präaktivierung der Zellen über extrazelluläre Stimuli notwendig, beispielsweise durch Behandlung mit Phorbolestern oder mit gegen den TCR-gerichteten Antikörpern. Zum anderen existieren bislang keine geeigneten Zelllinien, welche defizient für die Expression von  $\beta$ 2-Integrinen sind und gleichzeitig eine funktionelle Mutationsanalyse ermöglichen würden. Darüberhinaus sind in den zytoplasmatischen Domänen der beiden LFA-1-Untereinheiten keine charakteristischen Sequenzmotive enthalten, welche in der Lage wären, an bekannte Signalwege zu koppeln. Weiterhin werden Untersuchungen zur Signaltransduktion der  $\beta$ 2-Integrine durch deren dimere Struktur sowie durch dessen ausgeprägten Beitrag zur Zelladhäsion erschwert. Aufgrund dieser Zusammenhänge läßt sich die Signalfunktion einer einzelnen Integrin-Untereinheit nicht isoliert analysieren.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Etablierung experimenteller Ansätze diese Problematik zu umgehen. Zudem sollte die  $\beta$ 2-Integrin-vermittelten Signalprozesse unabhängig von Zell-Zell-Adhäsionsvorgängen untersucht und die daran beteiligten molekularen Faktoren identifiziert werden. Darüberhinaus wurde die Signalkapazität der Integrin  $\beta$ 2-Untereinheit mit derjenigen der Integrin  $\beta$ 1-Kette und des CD28-Moleküls verglichen und auf diese Weise detailliert charakterisiert.



## 3 Material & Methoden

### 3.1 Spezielle Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Agarosegelkammern :	Harnischmacher
Agarosegeldokumentation:	Eagle-Eye II, Stratagene
Durchflußzytometer:	Epics XL, Coulter
Elektroporationsapparat:	EasyJect Plus D2000, Eurogentec
PCR-Gerät:	Thermal Cycler 480, Perkin-Elmer
Lichtmikroskop:	Typ IM 35, Zeiss
pH-Meter:	Mod. 761, Knick
Photometer:	Du 640, Beckman
Protein-Minigel-Apparaturen:	Hoefer
Protein-Elektroblot-Apparaturen:	Biorad
Reinstwasseranlage:	Milli-Q UF plus, Millipore
Szintillationsmeßgerät:	Canberra/Packard

#### 3.1.2 Chemikalien

Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8	Roth
Agarose (LMP-NuSieve)	Biozym
Agarose	Sigma
Ampicillin	Sigma, Roth
Amylose Resin	NEB
Aprotinin	Sigma
BCIP	Biomol
Calcium Ionophor (A23187)	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloro quin-Phosphat	Sigma
CsCl	Biomol
DEAE-Dextran	Sigma
dNTPs	Roche, Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
Fluo-3 AM	Molecular Probes
Gentamicinsulfat	Gibco

Glutathion, reduziert	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia
Glycogen	Roche
HEPES	Biomol
Hypoxanthin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Mineralöl	Sigma
Maltose	Sigma
MPA	Sigma
PMSF	Sigma
NBT	Biomol
NonidetP40	Sigma, ICN
Protein A Sepharose 6MB	Amersham Pharmacia
PMA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat)	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
TEMED	Roth
Triton X-100	Fluka
Trypsin/EDTA	Gibco
Xanthin	Sigma

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

### 3.1.3 Enzyme für Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase 1U/ $\mu$ l	Roche
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 Molekularbiologische Hilfsmittel

Elektroporationsküvetten	Eurogentec
Filterpapier (Whatman 3MM)	Schleicher & Schuell

---

Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Objektträger mit Poly-L-Lysin	Sigma
Pap-Pen	Immunotech

### 3.1.5 Lösungen und Puffer

1xPBS: 140 mM NaCl  
3 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub> mit HCl auf pH 7,2 bis 7,4 einstellen

Poly-L-Lysin Lösung: 500 µg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub>

1xTAE: 40 mM Tris  
1 mM EDTA  
ad H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub> mit konzentrierter Essigsäure auf pH 7,8 einstellen

1xTBS: 100 mM Tris  
150 mM NaCl  
ad H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub> mit HCl einstellen auf pH 7,5 einstellen

1xTE: 10 mM Tris/HCl (pH 7,6)  
1 mM EDTA (pH 8,0)  
ad H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub>

### 3.1.6 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

### 3.1.7 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendungszweck
pGL-1.oli (for)	5'-TGTATCTTATGGTACTGTAAGT-3'	Sequenzierung
pGL-2.oli (rev)	5'-GAAATACAAAAACCGCAGAAGGT-3'	dito
5' pGEXseq	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	dito
CMV seq (for)	5'-CCACTGCTTAACTGGCTTATCG-3'	dito
pRK-rv (rev)	5'-TAAGCTGCAATAAACAAGTTG-3'	dito
pRK5rück.prim	5'-GTAACCATTATAAGCTGC-3'	dito
tkg rev.seq	5'-CCTTCGTTTGCCATACGCTC-3'	dito
DNAM1Hindkozakfor	5'-GCGCGGAAGCTTGCCACCATGGATTATCCT ACTTTACTTTTGGCT-3'	PCR aus NK-Zell-Genbank
DNAM1cytoMlufor	5'-CGGGCGACGCGTAGAAGGAGAGAGAAGA GATCTATTT-3'	dito
DNAM1Notrev	5'-CGGGCGGCGGCCGCTTTAAACTCTAGTCTT TGGTCTGCGAGA-3'	dito
DNAM1seqfor	5'-TACCCACAGGGAAGTTGGCAG-3'	Sequenzierung
CD11dKfor.oli	5'-GCGCGACGCGTGTGGTTTCTTCAAACGG-3'	PCR (Template: PH3M CD11a)
CD11aNotrev	5'-GCGGCCGCGGCCGCTTTAGTCCTTGCC ACCACCACT-3'	dito
CD18-TRfor	5'-GCGGGGACGCGTGTCTGATCCAC CTGAGCG3'	
CD18-notrev.oli	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTAACTCTCAGC-3'	dito
CD18-762 not rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTACATGACCGTCGT GGTGGCGC-3'	dito
CD18-748 not rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA- GTTCCACTGGGACTTGAGC3'	dito
CD29dKfor.oli	5'-GCGCGACGCGTCTTTTAATGATAATTCAT-3'	PCR (Template: sIgCD29, pRK)
(CD29)cyt not rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTATTTCCCTCATA CTTCGGATT-3'	dito
CD29cytexCD18notrev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTAACTCTCAGCAAA CTTGGGGTTCATCACAGTTGTTACGGC-3'	dito
CD29cytY/Fnotrev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTATTTCCCTC AAACTTCGGATTGAC-3'	dito
z3ITAM YF mlu for	5'-GCGGCGACGCGTATTGGGATGAAAGGC GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC-3'	PCR (Template: sIgzeta, pRK)
z3ITAM YF not rev	5'-CGCCGCGCGGCCGCTTTAGGCCTGCATGTG AAGGGCGTCAAGGTGTCCTTGGTGGC-3'	dito
PS12.oli (for)	5'-GCGCGAAGCTTGCCACCATGGACTACA AGGACGACGATGACAAGACGCGTATGG GAGAGATTAAGTCTCT-3'	PCR (Template: CD4it1/pJG4-5, für Flag-Tag)

### 3.1.8 Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Subtyp	Referenz
anti-humanes-CD4	Q4120	Maus IgG1	Sigma
dito	MT151	Maus IgG1	P. Rieber, Dresden
dito	T4-4	polyklonal (Kanninchen)	AIDS Reagent Prog.
anti-humanes CD11a	MEM-83		Knoll und Dustin, 1997
anti-humanes CD11a			DAKO
anti-humanes CD18	MHM-23		DAKO
anti-humanes CD18	MEM-48		V. Horejsi, Prag
anti-humanes CD18	MEM-95		dito
anti-humanes IgG, Fc-spezifisch	-	polyklonal (Ziege)	Dianova
anti-humanes-lck	lck-01	Maus IgG1	V. Horejsi, Prag
dito	lck-04	Maus IgG1	dito
anti-Phosphotyrosin	4G10	Maus IgG2b	UBI
anti-humanes-CD3-ε	OKT3	Maus IgG2b	ATCC
anti-Flag	M5	Maus IgG	Sigma

Nicht gesondert aufgeführte sekundäre Antikörper wurden über die Firma Dianova von Jackson ImmunoResearch bezogen.

### 3.1.9 Plasmide

Verwendung	Bezeichnung	Resistenz	Referenz
eukaryontische transiente Expression	p5C7	amp	Zeitlmann <i>et al.</i> , 1998
dito	pCDM7/8	supF	Aruffo und Seed, 1987
eukaryontische stabile Expression	pEF-IRESpuro	amp, puro	Geiger <i>et al.</i> , 2000
Luziferase-Reporterplasmid	pIL-2 GL2	amp	Zeitlmann <i>et al.</i> , 1998
Vaccinia-Infektion	pTKg	amp	Romeo <i>et al.</i> , 1992
prokaryontische Expression	pGEX-2T	amp	Amersham
dito	pMAL-c2	amp	Biolabs

### 3.1.10 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
MC1061	F <sup>-</sup> , araD139, Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)X74, rpsL(Str <sup>r</sup> ), hsdR2(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ); mcrA, mcrB1	Plasmidamplifikation	Casadaban und 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 <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Nal <sup>r</sup> ), relA1	Plasmidamplifikation, prokaryotische Proteinexpression	Hanahan, 1983
BL21	B F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), gal[dcml], DE3, Cm <sup>r</sup>	Proteinexpression	Lama <i>et al.</i> , 1992

### 3.1.11 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Verwendung	Referenz
CV-1	fibroblastenähnliche Affennieren-Zelllinie	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 und Crabtree, 1992
J.RT3-T3.5	E6-Derivat, TCR-β-defizient	dito	ATCC, TIB-153
SK-β2.7	lymphoblastoider T-Zellklon, CD18-defizientes SKW3-Derivat,	dito	Weber <i>et al.</i> , 1997
234 T-Zellklon	zytotoxischer T-Zellklon	Zytolyse-Experimente (Effektorzellen)	Besser und Wank, 1999
BW-LCL	B-Zell-Lymphom, HLA-A24 <sup>+</sup>	Zytolyse-Experimente (Zielzellen)	dito
DS-LCL	B-Zell-Lymphom, HLA-A24 <sup>-</sup>	Zytolyse-Experimente (Kontroll-Zielzellen)	dito



### 3.2 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen

Die entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden in Form von Dauerkulturen (siehe unten) aufbewahrt. Zur Vermehrung wurden die Bakterien zunächst auf LB-Agarplatten vereinzelt und anschließend in Flüssigmedium überführt. Zur Amplifikation von Vektoren, welche als Selektionsmarker  $\beta$ -Lactamase enthielten, wurden die Stämme MC1061 bzw. DH5 $\alpha$  transformiert und dem Medium 50-100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zugesetzt. Die Transformation von CDM-Vektoren, die ein Gen einer amber-Suppressor-tRNA beinhalten, erfolgte generell in den Stamm MC1061p3. Dem Medium wurde hierbei 12,5  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 7,5  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin zur Selektion zugesetzt. Bei Plasmid-Isolationen aus dem MC1061p3-Stamm wurde M9-Medium für die Präparationen im mg-Maßstab anstelle dem sonst verwandten 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. Das 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  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
1,0% (w/v) NaCl  
pH 7,0

Für die Herstellung fester Nährmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlen auf < 55°C:

Ampicillin-Stocklösung: 100 mg/ml in 50% EtOH

Tetracyclin-Stocklösung: 7,5 mg/ml in 90% EtOH (Lagerung im Dunkeln)

M9-Medium: 10 g/l M9-Salze  
10 g/l Casaminoacids  
ad 990 ml/l H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>

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

10 ml/l 100xM9-Additions

125  $\mu\text{l/l}$  Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)

1 ml/l Tetracyclin-Stammlösung (7,5 mg/ml)

M9-Additions: 70% (v/v) Glycerin  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
100 mM MgSO<sub>4</sub>

Alle Komponenten wurden separat autoklaviert

### 3.2.1 Adhärenente Säugerzellen

Die auf Zellkulturplastik adhärenent wachsenden Zelllinien CV-1 und COS-7m6 wurden aus Dauerkulturen zügig aufgetaut, unverzüglich in 10 ml Medium verdünnt und bei 1100 rpm abzentrifugiert. Je nach Zellmenge wurde das Pellet in 10-20 ml Medium resuspendiert und auf eine entsprechend große Zellkulturplatte verteilt. Unter optimalen Wachstumsbedingungen (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) verdoppelte sich die Zellzahl etwa alle 24 Stunden. Konfluente Platten wurden nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS durch etwa 5 minütige Inkubation in 1/7 Volumenteil Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und entsprechend der gewünschten Zelldichte verteilt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde die Zellen einer konfluente 150 x 20 mm-Gewebekulturschale durch Trypsinisieren abgelöst, mit PBS gewaschen und in 0,9 ml Medium resuspendiert. In ein spezielles 1,8 ml Gefäß (Kryotube) wurde 0,9 ml 30% (v/v) DMSO in FCS vorgelegt und vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet, so daß keine Durchmischung der beiden Phasen stattfand. Die Mischung erfolgte erst unmittelbar vor dem Einfrieren bei -20°C für einige Stunden. Vor der Überführung in flüssigen Stickstoff wurden die Gefäße für 24 Stunden bei -80°C gelagert.

Medium: DMEM (Gibco/LifeTechnologies)  
10% FCS (Gibco/LifeTechnologies; 30min 56°C hitzeinaktiviert)  
0,025% Gentamicin-Sulfat (50 mg/ml)

Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin  
0,2 g/l EDTA  
in HBSS

### 3.2.2 Suspensionszellen

Die verschiedenen Varianten der humanen Jurkat T-Zelllinien wurden in Suspension bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert bis zu einer Zelldichte von 1-1,5x10<sup>6</sup>/ml. Dauerkulturen wurden angelegt, indem 1x10<sup>7</sup> Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 0,9 ml RPMI resuspendiert wurden. Im Weiteren wurde wie für die adhären wachsenden 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 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Für die rasche Gewinnung von bakterieller Plasmid-DNA im µg-Maßstab zur Verwendung in Restriktions- oder Sequenzanalysen wurde diese nach einer als „alkalischen Lyse“ bezeichneten Methode präpariert (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wird das unterschiedliche Renaturierungs- und Löslichkeitsverhalten von zirkulär geschlossener DNA gegenüber chromosomaler DNA und Proteinen ausgenutzt.

Nach Anzucht der Bakterien bei 37°C auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden einzelne Kolonien in 5 ml LB-Medium überführt und mit denselben Selektionsbedingungen bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezogen. In einem entsprechenden Plastikgefäß wurden 1,5 ml der Übernachtskultur bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl der Lösung I resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl der Lösung II und 300 µl der Lösung III. Diese Mischung wurde vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes durchmischt und die unlöslichen Bestandteile (Proteine, Lipide) durch Zentrifugation bei 14000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde in ein frisches Plastikgefäß überführt und

zusammen mit 400 µl TE-gesättigtem Phenol ca. 30 Sekunden geschüttelt. Durch 5 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm wurden die Phasen getrennt. Nach dem Überführen der wäßrigen Phase in ein frisches 1,5 ml Plastikgefäß, wurde diese mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt und durchmischt. Das Präzipitat wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 30-50µl H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub> resuspendiert. Vor der Weiterverarbeitung muß die isolierte Plasmid-DNA mit RNAase behandelt werden. Die Zusammensetzungen der Lösungen I-III sind im Folgenden Kapitel beschrieben.

### **3.3.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im mg-Maßstab**

Zur Gewinnung große Mengen hochreiner Plasmid-DNA, wurde diese durch „alkalischen Lyse“ aus Bakterien isoliert und einer Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Eine Trennung von überspiralierter Plasmid-DNA von linearen Nukleinsäuremolekülen ist möglich, da diese sich aufgrund unterschiedlicher Ethidiumbromid-Inkorporation innerhalb verschiedener Schwebedichten im Caesiumchlorid-Dichtegradienten verteilen. Auf diese Weise gereinigte DNA-Lösungen lassen sich in konzentrierter Form über sehr lange Zeit aufbewahren. Nach einer solchen Aufreinigung wurden mit diesen DNA-Lösungen zudem höhere Transfektionseffizienzen von Säugerzellen erreicht als mit über Ionenaustauschersäulen gereinigter DNA.

Hierfür wurden in einem entsprechenden Kolben 1 l Flüssigmedium mit einer 5 ml Vorkultur angeimpft und 12-19 Stunden bei 37°C unter selektiven, aeroben Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm in einer J6-Zentrifuge (Beckman) geerntet. Das Zellpellet wurde in 40 ml Lösung I resuspendiert. Die Zellyse erfolgte unter vorsichtigem Umschwenken durch Zugabe von 80 ml Lösung II. Durch die Zugabe von 40 ml Lösung III wurden chromosomale DNA, tRNAs, Proteine und Lipide präzipitiert, welche durch 10 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm in einem GS-3-Rotor (Sorvall) abgetrennt wurden. Der Überstand wurde anschließend durch 2 Lagen Mullbinde in 250 ml Zentrifugenbecher filtriert. Nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol wurde diese Lösung durch Invertieren gründlich durchmischt und dann bei 4500 rpm in einem GS-3-Rotor 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in ca. 4,0 ml

Lösung I, so daß ein Endvolumen von 4,4 ml erreicht wurde. Zusammen mit 5,5 g CsCl<sub>2</sub> wurde dann diese Lösung in 13 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch kräftiges Schütteln wird das CsCl<sub>2</sub> vollständig in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromid-lösung (10 mg/ml) wurde die Lösung erneut gründlich durchmischt. Durch 5 minütige Zentrifugation bei 10000 rpm in einem SS-34-Rotor (Sorvall) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde der Überstand in ein QuickSeal-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt. Nach dem Austarieren von je zwei dieser Röhrchen wurden diese verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte für mindestens 4 Stunden bei 80000 rpm in einem VTI-80-Rotor oder einem NVT-90-Rotor (beide von Beckman). Anschließend wurde mit einer 5 ml Spritze die Plasmidbande abgezogen und in ein 13 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Entfernen des Ethidiumbromids wurde die DNA-haltige Lösung mehrmals mit in 1 M NaCl-gesättigtem 1-Butanol geschüttelt. Dann wurde die gesundheitsschädliche Ethidiumbromid-Butanol-Phase abgesaugt und sofort durch 5 M NaOH inaktiviert. Zur Präzipitation der DNA aus der verbleibenden wäßrigen Phase wurde diese mit dem gleichen Volumen 1 M Ammoniumacetat-Lösung und dem zweifachen Volumen 100%-igem Ethanol versetzt und durchmischt. Durch 10 minütige bei 10000 rpm in einem SS-34-Rotor wurde die Plasmid-DNA pelletiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500-1000 µl H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub> resuspendiert.

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 Ethanolfällung von DNA

Zur Erhöhung des Reinheitsgrads wurden DNA-haltige Lösungen in manchen Fällen gefällt. Hierfür wurde die Lösung mit 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumenteilen Ethanol versetzt und 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert um die darin enthaltenen DNA quantitativ zu fällen. Anschließend wurde 15 min lang bei 14.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest.}}$  oder TE-Puffer aufgenommen.

### 3.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm ( $E_{260}$ ). Dabei wurde davon ausgegangen, daß bei längeren, doppelsträngigen DNA-Moleküle die  $E_{260} = 1$  einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bzw. bei längeren, einzelsträngigen DNA-Molekülen 33  $\mu\text{g/ml}$  entspricht. Darüberhinaus wurde durch Messung der  $\text{OD}_{280}$  und  $\text{OD}_{320}$  der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt. Für reine DNA-Lösungen liegt der  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Koeffizient bei 1,8. Meßbare Absorption bei 320 nm deutet auf partikuläre Bestandteile in der Lösung hin.

Die Berechnung der Konzentration kürzerer Oligonukleotide erfolgte durch Bestimmung der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen von einem Programm des Spektralphotometers (Beckman DU-640), dem folgende Formel zugrunde liegt:

$$E_{260} = 16x(\text{A}) + 12x(\text{G}) + 9,6x(\text{T}) + 7x(\text{C}) \text{ entspricht } 1 \text{ mM.}$$

Dabei steht in den Klammern die Anzahl der jeweiligen Base im Oligonukleotid. Unter der Annahme eines durchschnittlichen Basen-Molekulargewichts von 330 g/mol kann die Oligonukleotidmenge berechnet werden.



### 3.3.6 PCR-Mutagenese

Die Mutagenisierung von cDNAs erfolgte ebenfalls durch die PCR. Mittels geeigneter Primer wurden gleichzeitig Mutation und eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle in eine cDNA eingeführt. Hierfür wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Dabei enthielt jeder dieser Ansätze eine Kombination von äußerem Primer und internem Primer, welcher sowohl einzuführende die Mutation als auch die neue Schnittstelle aufwies.

Anschließend wurden die beiden PCR-Produkte gleichzeitig in den gewünschten Vektor kloniert (Dreifach-Ligation). Die Erkennungssequenz der Restriktionseendonuklease wurde dabei so gewählt, daß es auf Aminosäureebene beim PCR-Produkt zu keinem zusätzlichen Austausch kam (*silent mutation*). Falls keine geeignete Restriktionsschnittstelle verfügbar war, wurde auf deren Einführung verzichtet. Statt dessen folgte ein zusätzlicher PCR-Schritt mit den beiden 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.

### 3.3.7 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Menge der DNA-Probe betrug für analytische Spaltungen 0,5-2 µg, für präparative Zwecke je nach Verwendungszweck 1-5 µg Plasmid-DNA in einen wie folgt zusammengesetzten Restriktionsansatz eingesetzt:

0,5-5 µg Plasmid-DNA  
1/10 Vol. NEB-Restriktionspuffer  
0.5-1 µl pro Restriktionsenzym (1-10U)

Bei der Restriktion von Plasmid-DNA, welche wie unter Abschnitt 3.3.1 präpariert wurde, erfolgte die Zugabe von 1µg RNase A



Der Restriktionspuffer und die Inkubationstemperatur wurde entsprechend den Herstellerangaben den jeweils verwendeten Enzymen angepaßt. Die Inkubation erfolgte im Normalfall 2-3 Stunden oder wo dies angemessen erschien auch über Nacht.

NEB-Restriktions-Puffer Nr. 1 : 10 mM Bis Tris Propan-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,0 mM DTT  
pH 7,0 bei 25°C

NEB-Restriktions-Puffer Nr. 2: 10 mM Tris-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
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<sub>2</sub>  
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

### 3.3.8 Entfernung überhängender DNA-Enden

Nach enzymatischer Spaltung von DNA entstehen in der Regel einzelsträngige überhängende Enden. Für die Ligation zweier DNA-Fragmente, welche nicht zueinander komplementäre überhängende Enden aufwiesen, war es erforderlich diese enzymatisch zu entfernen.

Im Fall von 5'-überhängenden Enden wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau eine Mischung aller dNTPs mit einer Konzentration von 0,25 mM und 1 µl Klenow-DNA-Polymerase zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde das Enzym für 20 min bei 70°C inaktiviert und durch eine Protein-Entfernungs-Säule (MoBiTec) zentrifugiert. Im Fall von 5'-zurückgesetzten Enden wurde T4-DNA-Polymerase anstelle des Klenow-Fragments benutzt, um die 3'-überhängenden Enden von der Exonukleaseaktivität dieses Enzyms zu entfernen.

### 3.3.9 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Vor der Ligation wurden in der Regel die 5'-Phosphatgruppen eines enzymatisch gespaltenen Vektors entfernt, um die Wahrscheinlichkeit der Vektor-Rezirkularisierung ohne Insert zu reduzieren. Dies ist vor allem dann die bevorzugte Ligationsreaktion, wenn der Vektor nach der Spaltung komplementäre Enden aufweist. Nach erfolgter Spaltung der Vektor-DNA wurde dem Restriktionsansatz daher 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) zugegeben und anschließend für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe eines speziellen Puffers sowie die Inaktivierung der Phosphatase nicht notwendig. Die Reinigung der so behandelten Vektor-DNA erfolgte mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese.

### 3.3.10 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA bewegt sich aufgrund der negativen Ladungen der Phosphodiester-Gruppen in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Hierbei werden die DNA-Moleküle aufgrund ihrer Länge aufgetrennt, welche durch den Vergleich mit bekannten Referenzen (DNA-Längensstandards) ermittelt werden kann. Zur Visualisierung der DNA kann das Gel Ethidiumbromid

mit Ethidiumbromid gefärbt werden, das in DNA interkaliert und durch UV-Licht (Wellenlänge  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) zur Fluoreszenz angeregt wird. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit DNA-Auftragspuffer versetzt.

Die verwendeten Gele enthielten Agarose in einer Konzentration von 1-5% (w/v). Sowie die Gellösung als auch der Laufpuffer wurden in TAE-Puffer angesetzt. Je nach Länge und Agarose-Anteil des Gels wurden für 20-60 Minuten Spannungen von 80-150 V angelegt.

1xTAE-Elektrophoresepuffer: 40 mM Tris/HCl  
40 mM Essigsäure  
1 mM EDTA  
20  $\mu\text{l/l}$  Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ )  
pH 8,0 bei 25°C

6xDNA-Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol  
30% (v/v) Glycerin  
50 mM EDTA

### 3.3.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose und Ligation

Zur Reinigung und Abtrennung unerwünschter Fragmente nach Restriktionsspaltung von DNA wurde diese vor der Weiterverarbeitung (z.B. Ligation) auf ein niedrigschmelzendes Agarosegel (NuSieve-Agarose, FMC) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Erhitzen wurde der DNA-haltige Agaroseblock geschmolzen und Aliquots konnten so für weitere Klonierungstechniken eingesetzt werden.

In den Fällen, wo ein relativ großes Volumen ( $>20 \mu\text{l}$ ) Agarose ausgeschnitten werden mußte, erfolgte eine Reinigung der DNA-Fragmente über Absorption an Glaskugeln (Gene clean Kit, Bio 101) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

Lösungen des Gene clean-Kits (Bio 101):

6 M Natriumiodid  
Glaskugelsuspension  
New Wash (unbek. Zusammensetzung)

Für den optimalen Verlauf der Ligation sollte das zu inserierenden Fragments im 3-fach molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA vorliegen. Aus diesem Grund wurden jeweils die beiden Restriktionsansätze in äquimolaren Menge auf das präparative Gel aufgetragen und die isolierten Fragmente folgendermaßen in die Ligationsreaktion eingesetzt:

Ligationsansatz:      1,25 µl Vektor-Fragment  
                              3,75 µl zu inserierendes Fragment  
                              5 µl 10xLigationspuffer  
                              0,5 µl T4-Ligase (400U/µl)  
                              ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub>

10x Ligationspuffer:    50 mM Tris/HCl  
                              10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                              10 mM DTT  
                              1 mM ATP  
                              25 µg/ml BSA  
                              pH 7,8 bei 25°C

Hierauf folgte eine 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur. 10 µl dieses Ansatzes wurden direkt für die Transformation von *E. coli* eingesetzt. Um das Ausmaß der Rezirkularisierung des Vektors zu ermitteln, wurde jeweils eine weitere Ligationsreaktion, indem jedoch das zu inserierenden Fragment fehlte. Das Verhältnis der Kolonien die nach Transformation dieser beiden Ansätze in *E. coli* wuchsen, erlaubte Rückschlüsse auf die Effizienz der Ligation.

### 3.3.12 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* mittels $\text{CaCl}_2$

Die im Folgenden beschriebene Methode basiert auf einem von Mike Scott (UCSF) etablierten Protokoll. Damit können Kompetenzen von bis zu  $10^6$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  DNA erreicht werden. Der entsprechende *E. coli*-Stamm wurde auf einer antibiotikafreien LB-Platte vereinzelt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 20 ml TYM (in 250 ml Erlenmeyer-Kolben) mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei  $37^\circ\text{C}$  unter aeroben Bedingungen bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2-0,8 inkubiert. Diese Vorkultur wurde in einen 2-3 l Erlenmeyerkolben überführt, welcher  $37^\circ\text{C}$  warmes 100 ml TYM enthielt. Nach dem Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,9 wurde die Kultur im selben Gefäß durch Zugabe von 380 ml vorgewärmtem TYM auf ein Volumen von 500 ml verdünnt. Sobald eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 erreicht war, wurde die Temperatur durch Schwenken in einem Eis-Wasser-Bad möglichst rasch auf  $4^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$ -Aliquots möglichst rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 5-10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA in gekühlten Plastikgefäßen vermischt. Nach 15-30 Minuten Inkubation im Eis-Wasser-Bad wurden die Ansätze für 5 Minuten einem Hitzeschock von  $37^\circ\text{C}$  ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

TYM:	2 % (w/v) Bacto-Trypton Sterilisation durch Autoklavieren
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,1 M NaCl
	10 mM $\text{MgSO}_4$

TfB I:                    30 mM Kaliumacetat  
                              100 mM KCl  
                              10 mM CaCl<sub>2</sub>  
                              15% (v/v) Glycerin

nach dem Autoklavieren wird zugesetzt: 50 mM MnCl<sub>2</sub> (separat autoklaviert)

TfB II:                    10 mM HEPES pH 7,0    Sterilisation durch Filtration  
                              75 mM CaCl<sub>2</sub>  
                              10 mM KCl  
                              15% (v/v) Glycerin

### 3.3.13 Transfektion von COS7-Zellen mittels DEAE-Dextran

Transfektion der verwendeten COS-Zelllinie diente zur transienten Überexpression von nativen und rekombinanten Proteinen. Diese Zellen, welche humanen Fibroblasten sehr ähneln, erwiesen sich aufgrund ihrer einfachen Wachstumsbedingungen als sehr geeignet. Zudem wurden hierbei sehr gute Transfektionseffizienzen erzielt. Die Transfektionsprozedur beruht auf einem modifizierten Protokoll von Lopata *et al.* (Lopata *et al.*, 1984). 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 eine zu starke Ansäuerung von DNA-enthaltenden Endosomen verhindert wird. Als COS-Zell-Expressionsvektoren wurden CDM- oder p5C7-Konstrukte eingesetzt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vorabend von konfluenten Gewebekulturschalen (10<sup>6</sup> Zellen) durch Trypsinisieren abgelöst in einem Verhältnis auf neue 100x15 mm-Schalen verteilt, so daß hier die Zellen am nächsten Morgen eine Konfluenz von 40-60% aufwiesen. Ausgehend von 100x15 mm-Schalen beträgt dieses Verhältnis erfahrungsgemäß 1:3, von 150x20 mm-Schalen 1:8. Am Tag der Transfektion wurde das Medium durch 5 ml DMEM ersetzt, welches 10% (v/v) NuSerum (Collaborativ Research 55000) enthält. Die geringe Proteinkonzentration dieses Serums minimiert die Bildung von hochmolekularen Protein-DEAE-Komplexen. Zu diesem Medium wurden anschließend je 5 µg der zu trans-

fizierenden Plasmid-DNA pipettiert und gründlich gemischt. 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% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Folge dieser Behandlung, insbesondere aufgrund des Chloroquin-Gehalts der Lösung, beginnen sich die Zellen nach etwa 2 Stunden abzurunden und vom Schalenboden zu lösen. Entscheidend für eine gute 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 2 ml 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% CO<sub>2</sub>. 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  
jeweils in PBS

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

### **3.3.14 Calcium-Phosphat-Transfektion von CV-1 Zellen**

Die Transfektion von CV-1 Zellen erfolgte in der Regel bei der Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren. Zur Transfektion einer konfluenten 100x15 mm-Schale CV-1 Zellen wurden zunächst 500 µl einer 250 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu 10 µg Plasmid-DNA pipettiert. Unter Schütteln dieser Mischung wurden tropfenweise 500 µl einer 2-fach konzentrierten HEBS-Lösung zugegeben und der gesamte Ansatz unter Schwenken auf die Zellen verteilt. Nach 12

h Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand durch normales Zellkulturmedium ersetzt und für weitere 24 h inkubiert.

2x HEBS-Lösung:	270 mM NaCl
	12 mM Glucose
	100 mM KCl
	1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	40 mM HEPES pH 7,1

### 3.3.15 Transfektion eukaryontischer Zelllinien mittels Elektroporation

Elektroporation ist eine universell anwendbare Transfektionsmethode, mit der in allen analysierten eukaryontischen 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 3.6.1). 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  $10^7$  Zellen in 400  $\mu$ l RPMI aufgenommen, gründlich mit etwa 10  $\mu$ g Plasmid-DNA durchmischt, unter den in 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 [ $\mu$ FD]	Effizienz
Jurkat E6	260	1200	ca. 45 %
Jurkat LT	310	1200	ca. 80 %
J.RT3-T3.5	260	1200	ca. 45 %
COS7m6	240	900	ca. 40 %



### 3.3.16 Herstellung und Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren

#### Gewinnung rekombinanter Vaccinia-Viren

Vaccinia-Viren zählen zur Poxvirus-Familie und sind ein geeignetes System zur transienten Genexpression in eukaryontischen Zellen. Die Infektion humaner T-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren ermöglicht eine starke Überexpression rekombinanter Proteine mit nahezu 100%-iger Transfektionseffizienz. Das hier beschriebene Verfahren leitet sich im wesentlichen von publizierten Methoden ab (Falkner und Moss, 1988). Die zu exprimierende cDNA wurde in den Plasmidvektor pTKg kloniert, der über homologe Rekombination in das Tymidinkinase-Gen des Vaccinia-Stammes WR inseriert. Im ersten Schritt wurde eine konfluente 100x15 mm-Schale 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. Anschließend wurde dieser Überstand durch die Zugabe von 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und die Zellen durch die Calcium-Phosphat-Methode mit dem jeweiligen pTKg-Vektor transfiziert. Nach etwa 48 h zeigten die Zellen deutliche Anzeichen der Infektion und wurden mit Hilfe eines Zellschabers vollständig abgelöst, pelletiert und in 300  $\mu$ l 10 mM Tris pH 9,0 bei RT resuspendiert. Durch mehrmaliges Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und Auftauen wurden die Zellen vollständig lysiert.

Die rekombinanten Viren wurde mittels Mycophenolsäure (MPA) selektiert. Diese hemmt die Guanylat (GMP)-Synthese der Zelle. Die Replikation des Wildtyp-Virus kann damit spezifisch gehemmt werden, da die rekombinanten Viren den pTKg-Vektor tragen und somit einen Selektionsvorteil haben. Auf diesem Plasmid ist die Sequenz für das bakterielle gpt-Gen enthalten, welches für die Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT) kodiert. Dadurch kann bei gleichzeitiger Anwesenheit der beiden XGPRT-Substrate Xanthin und Hypoxanthin die Zellkulturmedium die GMP-Synthese auf diesem Wege erfolgen.

#### Selektion der rekombinanten Vaccinia-Viren

Zur Selektion wurden konfluente CV-1 Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen für 4-6 h mit je 2,5 ml des Selektionsmediums vorinkubiert und durch 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit der unterschiedlichen Mengen nicht-selektierten Virensuspension infiziert (Verdünnungsreihe: 1  $\mu$ l unverdünnte, 1:10, 1:50, 1:100).

Nach einer Inkubationszeit von 36-48 h wurden lysierte Zellbereiche sogenannte Plaques sichtbar. Die Plaques wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pippettenspitze aus

Plastik von der Platte entfernt, in 200 µl 10 mM Tris pH 9,5 überführt und für eine erneute Selektionsrunde eingesetzt. Nach weiteren 2 bis 3 Selektionsrunden war in der Regel im rekombinanten Virusstock kein Wildtyp Virus mehr vorhanden und es konnte die Proteinexpression getestet werden.

Selektionsmedium: 190 ml DMEM  
2,5 % (v/v) FCS  
1 ml MPA (400x = 10 mg/ml in 0,1 N NaOH)  
10 ml Xanthin (40x = 10 mg/ml in 0,1 N NaOH)  
3 ml Hypoxanthin (670x = 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>Bidest.</sub>)

### **Identifikation der rekombinanten Vaccinia-Viren**

Die Expression der rekombinanten Proteinen von Zellen in den Bereichen der Plaques wurde über Antikörper nachgewiesen. Handelte es sich hierbei um Oberflächenproteine reichte für die Detektion die einfache Zugabe eines spezifischen Antikörpers aus. Dieser wurde durch dreimaliges Waschen mit Medium ohne Zusätze entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einem direkt mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper inkubiert. Nach etwa einer 30 minütigen Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln, wurden die Zellen etwa dreimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Zur Detektion wurden die Zellen unter Lichtausschluß mit 2,5 ml AP-Puffer inkubiert, welcher zusätzlich 8,25 µl BCIP (50 mg/ml) und 16,5 µl NBT (50 mg/ml) enthielt. Durch das Umsetzen dieser Substrate der alkalischen Phosphatase tritt nach 10-20 Minuten eine violette Färbung auf. Beim Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde die Reaktion mit PBS gestoppt.

Für den Fall, daß es sich um zytoplasmatische Proteine handelt, die mittels rekombinanter Viren exprimiert werden, war es erforderlich vor der Antikörper-Inkubation die Zellmembran zu permeabilisieren (siehe hierzu Abschnitt 3.5.2). Anschließend wurde analog zu der im oberen Abschnitt beschriebenen Weise verfahren allerdings unter Berücksichtigung der Abweichungen, die sich für die Färbung von permeabilisierten Zellen ergeben. In diesem Fall können die den Plaque umgebenden Zellen auch nicht für eine weitere Amplifikation verwendet werden. Dagegen eignen sich die nicht-permeabilisierten Zellen durchaus für weitere Amplifikationsschritte.

AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH 9,5
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>

### **Amplifikation der rekombinanten Vaccinia-Viren**

Die rekombinanten Viren aus diesen Zellysaten wurden in CV-1 Zellen weiter amplifiziert. Hierfür das Medium einer konfluenten 100x15 mm-Schale mit CV-1 Zellen entfernt und durch 2,5 ml Medium ohne Zusätze ersetzt. Nach Zugabe von 100 µl Viren-Suspension wurden die Zellen 1 h lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml Medium mit 10% FCS. Nach Inkubation von 36-48 h waren in der Regel die Zellen gleichmäßig infiziert, was durch ihre abgerundete Form sichtbar ist. Die Zellen wurden geerntet, mit 300 µl Tris/HCl pH 9,5 je Schale lysiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

### **Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren**

Zur Expression von Proteinen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen pelletiert und in 150 µl RPMI ohne Zusätze resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Viren-Suspension, was in der Regel etwa 10 MOI (10 infektiöse Viren pro Zelle) entspricht, wurden die Zellen 1 h lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 5 ml RPMI/10% FCS verdünnt. Nach einer Expressionsdauer von 6-8 h im Brutschrank konnten die Zellen für nachfolgende Analysen eingesetzt werden.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Herstellung bakterieller Fusionsproteine**

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine eignen verschiedene Fusionsanteile. Hierzu zählt beispielsweise die Verwendung eines N-terminaler Fusionsanteils bestehend aus dem Glutathion-S-Transferase Protein (GST) bzw. aus dem Maltose-Bindungsprotein (MBP). Diese werden genetisch an die zu exprimierenden Proteine fusioniert, um deren Aufreinigung zu erleichtern.

### Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung von GST-Proteinen wurden die jeweiligen cDNAs hierzu in den Vektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) subkloniert und in *E. coli* BL21 transformiert. Mir einer Kolonie wird 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und unter aeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wird 1 ml dieser Übernachtskultur mit 500 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) verdünnt und bei RT bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Dann folgte die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM, welches den Promotor des Expressionsplasmids induziert. Nach weiteren 9 h wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte zur Aufreinigung des Proteins wurden bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert (5 ml pro g Naßgewicht) und durch 2x3 minütige Ultraschallbehandlung bei mittlerer Intensität und Pulsbetrieb auf Eis lysiert. Das Abtrennen unlöslicher Bestandteile erfolgte durch zweimalige Zentrifugation bei 14.500 rpm (SS-34, Sorvall). Der klare Überstand wurde mit 1 ml gequollener GSH-Sepharose, welche zuvor mit Lysepuffer äquilibriert worden war, für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer folgte ein Waschschrift unter stringenten Hochsalz-Bedingungen, dem schließlich ein Waschschrift mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 folgte. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte in einem 2 ml Reaktionsgefäß durch die Zugabe von 10 mM reduzierter GSH in 50 mM Tris/HCl pH 8,0. Nach einer Inkubationsdauer von 3x1 h konnte das Protein fast vollständig von der Matrix verdrängt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Bradford-Reagenz (Biorad). In der Regel konnten aus einem Liter Bakterienkultur 2-4 mg Protein isoliert werden.

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

Kurz vor Verwendung erfolgte die Zugabe von 1 mM DTT, 6 µg/ml Aprotinin und 6 µg/ml Leupeptin.

Hochsalz-Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0  
                              500 mM NaCl  
                              1 mM EDTA  
                              0,1 % (v/v) NP-40

### Expression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Die Isolierung von MBP-Fusionsproteinen erfolgte in analoger Weise, allerdings mit folgenden Abweichungen. Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert, welches neben dem Antibiotikum 0,2 % Glucose enthielt. Die Reinigung erfolgte auf einer Amylase-Agarosematrix. Die Elution des Proteins wurde mit 10 mM Maltose in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 durchgeführt.

#### 3.4.2 Gesamtzellysate eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung eines Gesamtzellysats eukaryotischer Zellen wurden diese in der gewünschten Menge aus dem Kulturmedium abzentrifugiert und mehrmalig in PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte in der Regel durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen 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 Volumenteilen 3xSDS-Probenpuffer wurden die Lysate über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt.

3xSDS-Probenpuffer (reduzierend): 150 mM Tris/HCl pH 6,8  
300 mM DTT  
6% (w/v) SDS  
30 % (v/v) Glycerin  
0,3% (w/v) Bromphenolblau

Der Puffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 3.4.3 Isolierung von Membransubkompartimenten durch Fraktionierung

Zur Isolierung der kürzlich identifizierten Membransubkompartimente, welche bei niedrigen Temperaturen bezüglich ihres Löslichkeitsverhaltens eine Resistenz gegenüber nicht-ionischen Detergenzien aufweisen, erfolgten sämtliche Schritte bei 4°C. Zunächst wurden jeweils  $12 \times 10^6$  Jurkat E6 Zellen mit 500 µl hypotonischem Puffer 30 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellkerne bei 14.0000 rpm (4°C, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand 1:1 mit 80 % Sucrose (gelöst in

Lysepuffer) gemischt und 5 ml UZ-Gefäße (Beckman) umgefüllt. Diese Suspension wurde dann mit 3,5 ml einer 30 % Sucrose-Lysepufferlösung und schließlich mit 0,5 ml Lysepuffer überschichtet. Durch 18 h Zentrifugation bei 45.000 (SW 55Ti-Rotor, Beckman) und 4°C wurden die Membranen entsprechend ihrer Schwebedichte aufgetrennt. Bei der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation war es wichtig sowohl beim Start als auch am Ende jeweils die Bremsstufe 4 zu verwenden, da sonst der Gradient aufgewirbelt wird. Nach der Zentrifugation wurden den Röhren ausgehend von oben nach unten 8 Fraktionen à 500 µl entnommen, der Rest wurde verworfen. Zur Analyse wurden Aliquots der jeweiligen Fraktionen entweder direkt einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen oder das zu untersuchende Protein wurde vorher mittels Immunpräzipitation ankonzentriert.

Hypotonischer Lysepuffer:    150 mM NaCl  
                                      20 mM Tris/HCl pH 8,0  
                                      2 mM EDTA pH 8,0  
                                      1% NP40  
                                      ad H<sub>2</sub>O<sub>Bidst.</sub>

Kurz vor Gebrauch 1 mM NaVO<sub>4</sub> sowie jeweils 6 µg/µl Aprotinin und Leupeptin zugeben.

### 3.4.4 Immunpräzipitation

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Fusionsanteile für die Expression in eukaryontischen Zellen eingesetzt. Zur zytoplasmatischen Expression und Immunpräzipitation wurde häufig als N-terminaler Fusionsanteil die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG<sub>1</sub> verwendet (Abbildung 4.2.1). Die Translation wird dabei vom Start-ATG des IgG-Fusionsanteils aus initiiert. Für den Fall, daß eine Signalsequenz (von CD5) und eine transmembrane Domäne (von CD7) eingeschlossen sind, durchläuft das Fusionsprotein den sekretorischen Transportweg von Membranproteinen. Die Fusionsproteine werden sekretiert, falls keine transmembrane Sequenz vorhanden ist. 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. Zur zytoplasmatischen Expression wurden Proteine mit einem N-terminalen Fusionsanteil versehen, der das sogenannte Flag-Epitop umfaßt. Hierbei handelt es sich um

kurzes Peptid (DYKDDDDK), welches von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt wird.

Durch Präzipitation der Proteine mit Hilfe spezifischer gegen den Fusionsanteil gerichteter Antikörper, kann zum einen die Anreicherung des Proteins aus Gesamtzellysaten erreicht werden. Zum anderen können auf diese Weise potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Neben der Präzipitation der Proteine mit einer Protein A Matrix, können diese auch über spezifische auf Plastik immobilisierte Antikörper isoliert werden. Hierfür wurde im Falle der IgG-Fusionsproteine 50 µl anti-humanes Ig-Serum auf eine Mikrotiterplatte mit 96-Vertiefungen verteilt (0,01 ng/µl in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>). Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei RT wurde der überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBST (0,05% Tween in PBS) entfernt. Anschließend wurden für 3 h auf Eis die Zellysate zugegeben (maximales Volumen 250 µl). Ungebundene Proteine wurden dann durch 3xWaschen mit PBS/Triton entfernt. Durch die Zugabe von je 25 µl 1xSDS-Probepuffer je Vertiefung, einfrieren bei -20°C und eine Inkubation von 15 min bei 56°C wurden die Proteine von der Matrix entfernt. Anschließend konnten die Proteine über SDS-Gelelektrophorese und eine Westernblot-Analyse untersucht werden.

### 3.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter Anwendung der diskontinuierlichen, ein-dimensionalen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (1970). 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 Protein-Komplexe.

Die Polyacrylamid-Lösungen wurden wie unten angegeben hergestellt und mit Hilfe einer Gießapparatur (Hoefler 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 nach erfolgter Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Die Höhe des Sammelgels betrug etwa 1 cm.

Die Zellysate wurden wie beschrieben aufbereitet und vor dem Gellauf für 5 Minuten im Wasserbad aufgeköcht. Nach unlöslich Bestandteile wurden vor dem Auftragen durch Zentrifugation pelletiert. Eine Spur des Gels, welches in eine mit Laufpuffer befüllte Mini-Gel-Apparatur transferiert worden war, wurde in der Regel mit 25  $\mu\text{l}$  ( $1/2$  Vol.) einer Probe beladen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 300 V für 90-120 Minuten.

Acrylamid-Konzentration	linearer Trennbereich [kD]
5,0%	57-212
7,5%	36-94
10%	16-68
15%	12-43

**Effektiver Trennbereich von SDS-Polyacrylamidgelen**

Trenngel:	8% [ml pro Gel]	10% [ml pro Gel]	12% [ml pro Gel]
H <sub>2</sub> O	2,3	1,9	1,6
30% Acrylamid-Mix (29:1)	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

**Polyacrylamidgel-Lösungen Trenngel**

Sammelgel:	5% [ml pro Gel]
H <sub>2</sub> O	1,4
30% Acrylamid-Mix (29:1)	0,33
1.0 m Tris pH 6.8	0,25
10% SDS	0,02
10% APS	0,02
TEMED	0,002

**Polyacrylamidgel-Lösungen 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

### 3.4.6 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-PAA-Gelen zum Nachweis der Proteine

Zur Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden das Gel etwa 60 min bei RT auf einem Tischschüttler in der 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.

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

### 3.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration der Protein-haltigen Lösungen wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung basiert auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm im Vergleich zum freien Farbstoff in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Der Farbstoff bindet dabei an basische (jedoch nicht Arginin) und aromatische Aminosäurereste.



## **3.5 Immunohistochemie**

### **3.5.1 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 2x15 min 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.

### **3.5.2 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 3.5.1 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte in diesem Fall in 0,2 % (v/v) Triton X-100 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, in Form eines Histogramms von Zellzahl und logarithmischer Fluoreszenzintensität.

## 3.6 T-Zell-Funktionsanalysen

### 3.6.1 Promotoraktivierungsstudien

Die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors ist ein häufig herangezogener Parameter zur Quantifizierung der Stimulation von T-Helfer-Zellen. Eine effiziente Produktion dieses autokrinen Wachstumsfaktors leitet den Eintritt dieser Zellen in den Zellzyklus ein und führt deren zu Expansion. Die Bestimmung der Promotoraktivität wird durch Expression eines Reportergens erleichtert. In der vorliegenden Arbeit wurde Luziferase als Reportergen angewandt. Bei diesem Konstrukt wurde der gesamte humane IL-2-Promotor (Basenpaare -577 bis +53) in die Mlu-I und Hind-III Schnittstellen des Vektors pGL2 (Promega) inseriert.

Promotoraktivierungsstudien konnten in transient transfizierten Jurkat T-Zellvarianten 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. Hierbei handelte es sich in der Regel um gegen den Fusionsanteil exprimierter Proteine bzw. gegen den T-Zell-Rezeptor gerichteter Antikörper (2 µg/ml) oder um pharmakologische Agenzien wie dem Calcium Ionophor A23187 (0,5 µg/ml) oder dem Phorbolster PMA (50 ng/ml). Als maximale Stimulierbarkeit eines Transfektionsansatzes wurde jeweils die synergistische Promotoraktivierung in Gegenwart von PMA und Ionophor bestimmt. Diese ist unabhängig von den exprimierten Rezeptorfusionsproteinen oder Tyrosinkinase. 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 werden konnte. Die Luziferaseaktivität von 30 µl Lysat wurde nach Zugabe von 100 µl Luziferase-Reagenz (Promega) im Szintillationszähler oder Luminometer gemessen.

### 3.6.2 Bestimmung intrazellulärer Calciumkonzentrationen

Unmittelbar nach der Stimulation mit Antigen kann in T-Zellen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration festgestellt werden. Die Calcium-Ionen strömen zunächst aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma, später werden auch durch selektive Kanäle

Calcium-Ionen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen. Die Messung dieses Calcium-Einstroms 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 durch antikörpervermittelte Quervernetzung der extrazellulären Anteile von Fusionsproteinen stimuliert, deren intrazelluläre Domänen die TCR- $\zeta$ -Kette oder zytoplasmatischen Domänen akzessorischer Membranproteine der T-Zell-Aktivierung umfaßte (Kolanus *et al.*, 1993). Vor der Stimulation wurden die Zellen in HBSS für 30 Minuten bei RT nach Herstellerangaben mit dem membranpermeablen, Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM (Molecular Probes) beladen. Anschließend wurde die Fluoreszenz durchflußzytometrisch bestimmt. Hierfür wurde für etwa 30 Sekunden die Fluoreszenzintensität von ruhenden Zellen gemessen. Dann wurde die Messung pausiert, die Zellen durch Zugabe von Antikörper (2  $\mu$ g) stimuliert und die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität für weitere 3-4 Minuten fortgesetzt. Die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität aller innerhalb eines kurzen Zeitraums analysierten Zellen erfolgte unter Verwendung des Programms Multitime 3.0 (Phoenix Flow Systems).

### 3.6.3 Analyse der Zelladhäsion auf ICAM

Zur Charakterisierung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsivität wurden Zelladhäsionsexperimente durchgeführt. Als Ligand wurde hierfür rekombinant exprimiertes ICAM-1 eingesetzt. Dieses umfaßt die vier extrazellulären Domänen des humanen ICAM-1-Moleküls, an welches carboxyterminal die CH2- und CH3-Anteile des humanen IgG<sub>1</sub> genetisch fusioniert wurden (ICAM-Fc). Mit Hilfe einer CD5-Signalsequenz wurde das Fusionsprotein sekretiert und konnte somit aus dem Zellüberstand isoliert werden. Das rekombinante ICAM kann entweder durch Transfektion von COS7m6 Zellen oder Infektion mittels rekombinanter Vaccinia-Viren von CV-1 Zellen exprimiert werden. Der Protein-haltige Überstand kann dann direkt für weitere Analysen eingesetzt werden.

Zur Immobilisierung des Proteins wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit anti-humanem IgG-Serum beschichtet (0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l in 50  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl pH 9,5) und 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Durch 2xWaschen mit dem zuvor erwähnten Tris-

Puffer und 1 h Inkubation mit 1% BSA in PBS wurden freie Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde mit einer ICAM-Fc-Lösung 1 h bei RT inkubiert (80 µl je Vertiefung). Durch 1x Waschen mit HBSS (37°C) wurde ungebundenes ICAM entfernt.

Die zu analysierenden Zellen wurden mit dem Farbstoff Bisbenzimid H33342 Fluorochrom-Trihydrochlorid (Calbiochem) in einer Endkonzentration von 12 µg/ml in Medium für 30 min bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in HBSS (37°C) so resuspendiert, daß 100 µl Puffer 150.000 Zellen enthielten. Zur Induktion der aktiven Konformation des Integrins wurde 30 min bei 37°C mit unterschiedlichen Agenzien wie Antikörper und Phorbolster stimuliert. Diese Zellen wurden dann auf die ICAM-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und 30-45 min bei 37°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit HBSS (37°C) entfernt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mittels eines CytofluorII-Geräts (Applied Biosystems) bei einer Anregung von  $\lambda = 360$  nm, wodurch eine Emission bei  $\lambda = 460$  nm gemessen werden konnte. Es wurden pro Ansatz 4-fach Bestimmungen durchgeführt, wobei zusätzlich ein Referenzwert (100%-Wert) für die eingesetzte Gesamtzellzahl bestimmt wurde.

### 3.6.4 Zytolyse-Experimente

Zur Durchführung von Zytolyse-Experimenten der 234 T-Zellklon (gegebenenfalls nach Expression von Fusionsproteinen mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren) wurden als Zielzellen entweder HLA24<sup>+</sup> BW-LCL Zellen oder zur Kontrolle HLA24<sup>-</sup> DS-LCL Zellen eingesetzt. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Falk im Labor von Frau Dr. Schendel an der GSF-München nach einer bereits publizierten Vorgehensweise durchgeführt (Schendel *et al.*, 1979). Durch Inkubation der Zielzellen allein mit Medium wurde die spontane Freisetzung des zum Markieren eingesetzten <sup>51</sup>Cr-Isotops bestimmt. Die Gesamtmenge des <sup>51</sup>Cr-Isotops wurde durch direkte Messung der markierten Zellen ermittelt. Nach Durchführung des Experiments wurde die zytotoxische Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{lytische Aktivität [\%]} = \frac{(\text{gemessene Aktivität} - \text{spontan freigesetzter Aktivität})}{(\text{gesamte Aktivität} - \text{spontan freigesetzter Aktivität})} \times 100$$

## 4 Ergebnisse

Wie bereits einleitend erwähnt, werden die heterodimeren Membranrezeptoren der Integrin  $\beta$ 2-Familie ausschließlich auf Leukozyten exprimiert und spielen eine wichtige Rolle im Verlauf von Zell-Zell-Adhäsionsprozessen. Sie bestehen aus einem nicht-kovalent assoziierten Komplex der  $\beta$ 2-Kette (CD18) mit einer variablen  $\alpha$ -Kette (CD11a, CD11b, CD11c oder CD11d). Auf Lymphozyten findet sich normalerweise ausschließlich die Kombination der CD18-Kette mit der CD11a-Kette, die häufig auch als LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1; siehe Abschnitt 2.4) bezeichnet wird und dessen physiologische Liganden die ubiquitär exprimierten Transmembranproteine ICAM-1, -2 und -3 sind. Dabei weist LFA-1 für seinen Liganden ICAM-1 in seiner nativen Struktur eines Homodimers eine höhere Affinität auf als für das entsprechende Monomer (Miller *et al.*, 1995; Casasnovas *et al.*, 1998).

In seiner Funktion als Zelladhäsionsrezeptor unterstützt LFA-1 sowohl die Extravasation von Lymphozyten als auch die primär schwachen Wechselwirkungen zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (Hynes, 1992; Gahmberg, 1997). Andererseits besteht die Möglichkeit, daß LFA-1 auch direkt in Signaltransduktionsprozesse während der T-Zell-Aktivierung involviert sein könnte, wie bereits von anderen Membranrezeptoren wie CD2, CD4 und CD28 bekannt ist. Verschiedene Publikationen weisen bereits auf eine Signaltransduktionsfunktion von LFA-1 hin, jedoch sind bislang nur wenige Informationen über die Mechanismen dieser Signalwege bzw. der daran beteiligten molekularen Komponenten verfügbar (Yamada, 1997; Dib, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die costimulatorische Funktion des LFA-1-Integrins im Kontext der T-Zell-Aktivierung detailliert zu analysieren, sowie Faktoren zu identifizieren, die an der LFA-1-vermittelten Signaltransduktion mitwirken.

### 4.1 LFA-1 vermittelte Aktivierung des IL-2-Promotors

Die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem durch den Haupthistokompatibilitätskomplex- (MHC)-präsentierten Antigen hat die Initiation intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden zur Folge, wodurch beispielsweise die Erhöhung der intra-

zellulären Calciumkonzentration sowie die Stimulation der Proteinkinase C (PKC) induziert werden. Letztlich führen diese verschiedenen Signalwege zur transkriptionellen Aktivierung T-Zell-spezifischer Gene.

Im Verlauf der T-Zell-Aktivierung finden neben der bereits erwähnten Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-Antigen-Komplex auch weitere direkte, physikalische Wechselwirkungen von T-Zell-Corezeptoren sowie akzessorischen Membranproteinen mit ihren entsprechenden Liganden auf den Antigen-präsentierenden Zellen statt. Wie bereits erwähnt, ist der Beitrag dieser costimulatorischen Transmembranrezeptoren für den Prozeß der T-Zell-Aktivierung essentiell. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob LFA-1 bei diesen Vorgängen derartige Signalvermittlungsfunktionen erfüllen kann. Zur Charakterisierung der LFA-1-Signaltransduktion wurde zunächst die Induktion T-Zell-spezifischer Gene analysiert.

Als ein klassisches Beispiel für die transkriptionelle Aktivierung charakteristischer Gene dient häufig die Induktion des IL-2-Promotors. Hierfür wurde ein Modellsystem etabliert, welches in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt ist. Nach transienter Transfektion von Jurkat E6 T-Zellen mit einem Reporterplasmid, welches das Luziferase-Gen als ein dem IL-2-Promotor nachgeschaltetes Reportergen beinhaltet, wurde die Promotoraktivität nach Stimulation des endogen exprimierten LFA-1-Integrins quantifiziert. Die Stimulation des zellulären  $\beta$ 2-Integrins gelang mittels eines rekombinant exprimierten ICAM-1-Proteins, dessen aminoterminaler Anteil die CH2- und CH3-Domänen des humanen IgG<sub>1</sub>-Moleküls umfaßt, während die carboxyterminale Region aus extrazellulären Anteilen des ICAM-1-Moleküls besteht. Unter Zuhilfenahme des Fusionsproteinanteils konnte das ICAM-1-Protein auf einer mit anti-humanem IgG<sub>1</sub> Serum beschichteten Plastikoberfläche immobilisiert werden. Davor erfolgte jedoch eine Behandlung dieser Plastikoberfläche mit dem Kation Poly-L-Lysin. Auf diese Weise konnten in sämtlichen Ansätzen die Zellen zur Adhäsion gebracht werden, auch ohne daß hierzu die Adhäsionsfunktion von LFA-1 notwendig war. Eine isolierte Untersuchung der LFA-1-Signaltransduktionsfunktion sollte somit ermöglicht werden.



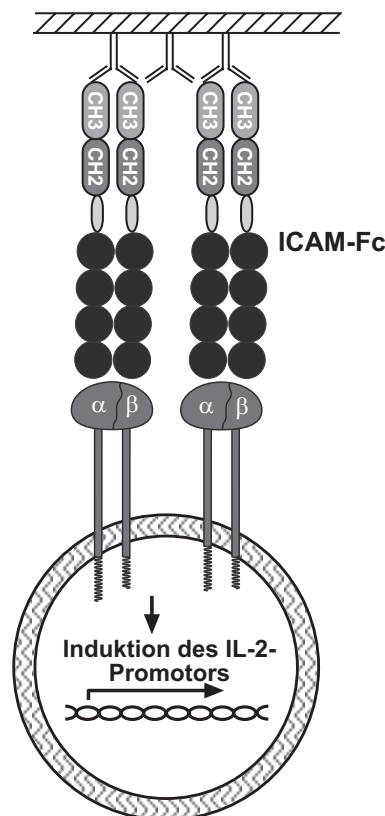


Abbildung 4.1: **Schematische Darstellung des Modellsystems zur Analyse der IL-2-Promotorinduktion nach Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1.** Die transiente Transfektion des IL-2-Luziferase-Reporterplasmids in Jurkat E6 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Die Aggregation von auf der Zelloberfläche exprimierten LFA-1-Molekülen wurde mit Hilfe von rekombinantem ICAM-1-Fusionsprotein (ICAM-Fc) erzielt und resultierte in der Aktivierung des IL-2-Promotors. Das ICAM-Fc-Protein umfaßt vier der fünf extrazellulären Domänen von ICAM-1 sowie einen aminoterminalen Anteil, der sich aus den CH2- und CH3-Domänen von humanem IgG<sub>1</sub> zusammensetzt. Dieser dient zur Immobilisierung des Proteins auf einer Plastikoberfläche. Die Zellen wurden durch Beschichtung des Plastikmaterials mit Poly-L-Lysin konstitutiv zur Adhäsion gebracht.

Wie aus Abbildung 4.2 hervorgeht, konnte in der Tat gezeigt werden, daß durch die Wechselwirkungen zwischen LFA-1 und ICAM-1 eine mehr als dreifache Stimulation des IL-2-Promotors induziert werden konnte, im Vergleich zur basalen Aktivität des IL-2-Promotors nach unspezifischer Adhäsion der Zellen an Poly-L-Lysin. Unter Verwendung von Antikörpern, die sich entweder gegen die  $\alpha$ -Kette oder die  $\beta$ -Kette des Integrins richteten, konnten die durch Integrin-Ligandenbindung ausgelösten Signaltransduktionsvorgänge moduliert werden (Abbildung 4.2). Die Behandlung der transfizierten Zellen mit einem anti- $\beta$ 2 Antikörper mit der Bezeichnung MHM23 hatte allerdings keinen weiteren Einfluß. Dagegen resultierte die Inkubation der Zellen mit dem monoklonalen

Antikörper MEM-48, der sich ebenfalls gegen die  $\beta$ 2-Untereinheit des LFA-1-Integrins richtete, in einem Rückgang der IL-2-Promotoraktivität auf das basale Niveau. Neuere Untersuchungen aus unserem Labor zeigen konnten, daß dieser Antikörper zu einer moderaten Aktivierung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion führt (Geiger *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise konnte die Induktion des IL-2-Promotors mit Hilfe eines gegen die Integrin  $\alpha$ -Untereinheit gerichteten MEM-83 Antikörpers zusätzlich um das Zweifache gesteigert werden. Dieser Antikörper hat wiederum einen stimulierenden Einfluß auf die Zelladhäsivität (Knorr und Dustin, 1997). Im Gegensatz zum MEM-48 Antikörper korreliert im Fall des MEM-83 Antikörpers demnach eine Steigerung der Zelladhäsion mit der verstärkten Induktion des IL-2-Promotors. Die kaum meßbare Luziferaseaktivität in nicht-adhären Zellen im Überstand deutete darauf hin, daß die unspezifische Anheftung der Zellen mittels Poly-L-Lysin nahezu vollständig erfolgte (Abbildung 4.3). Durch die Modulierbarkeit der nach ICAM-Bindung induzierten Signaltransduktion mittels gegen LFA-1-gerichteter Antikörper konnte die Spezifität dieser Prozesse demonstriert werden.

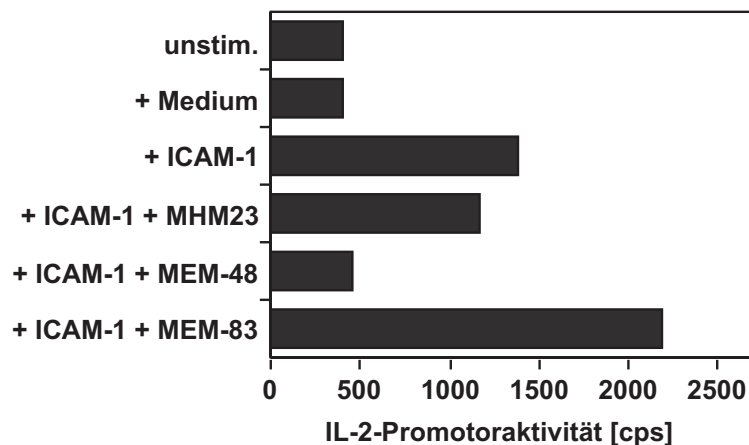


Abbildung 4.2: **Aggregation des endogen exprimierten LFA-1-Integrins mit ICAM-1 resultiert in der Aktivierung des IL-2-Promotors.** Die Induktion des IL-2-Promotors erfolgte durch Quantifizierung der Aktivität eines dem Promotorelement nachgeschalteten Luziferase-Reportergens. Eine aufgrund unspezifischer Adhäsionsprozesse ausgelöste Aktivierung des IL-2-Promotors konnte durch Anheftung der Zellen mit Poly-L-Lysin ausgeschlossen werden. Die Spezifität der nach LFA-1-Quervernetzung erfolgten Induktion des IL-2-Promotors wurde mit Hilfe verschiedener sowohl gegen die LFA-1 CD18-Kette gerichteter Antikörper (MHM23, MEM-48) als auch eines gegen die CD11a-Untereinheit gerichteten Antikörpers (MEM-83) überprüft.

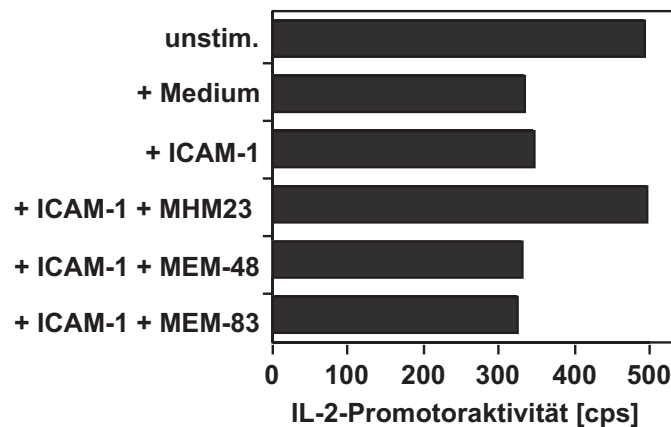


Abbildung 4.3: **Bestimmung der IL-2-Promotoraktivität in nicht-adhärenenten Zellen im Überstand.** Die geringe Aktivität des IL-2-Reportergens in Zellen im Überstand weist darauf hin, daß die unspezifische Anheftung der Zellen mit Hilfe des Polymers Poly-L-Lysin nahezu vollständig erfolgte.

Zwar verdeutlichen diese Experimente die Bedeutung von LFA-1 im Zusammenhang der Lymphozyten-Aktivierung, erlauben jedoch keine Aufklärung der hierbei involvierten molekularen Mechanismen. Allerdings wäre hierfür die getrennte Untersuchung der einzelnen zytoplasmatischen Domänen des Integrins hilfreich, wodurch eine Unterscheidung zwischen der LFA-1-Signalfunktion und der Adhäsionsfunktion unabhängig von den extrazellulären Domänen möglich sein sollte. Daher wurde im Folgenden ein neuer Ansatz gewählt, der auf einer Überexpression von Fusionsproteinen basiert, um somit eine Analyse der Beteiligung der zytoplasmatischen Domänen des LFA-1-Integrins an T-Zell-Aktivierungsprozessen zu ermöglichen.

## 4.2 Signalfunktionen der zytoplasmatischer Domänen des LFA-1-Integrins

Wie bereits einleitend erwähnt, sind Integrine in der nativ exprimierten Form nur schwer analysierbar, da für eine effiziente Ligandenbindung der Übergang in eine aktive Konformation erforderlich ist. Die hierfür notwendigen Stimuli wie Phorbolster oder Antikörper können aber bereits zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden führen. Darüberhinaus ist

durch die Analyse des nativen Moleküls keine eindeutige Zuordnung des spezifischen Beitrags der jeweiligen Untereinheit zur Signaltransduktion des Integrins möglich.

Für die Ermittlung der Signalkapazität des LFA-1-Integrins ist dessen zytoplasmatischer Anteil von zentraler Bedeutung, da dieser im Gegensatz zum extrazellulären Anteil nicht direkt an Zell-Zell-Adhäsionsprozessen beteiligt ist. Daher wurde für eine Analyse der LFA-1-Signaltransduktion ein experimentelles System etabliert, welches sowohl eine individuelle Untersuchung beider Protein-Untereinheiten als auch der Integrin-Signalfunktion ermöglichte. Die Untersuchung des costimulatorischen Beitrages der individuellen LFA-1-Untereinheiten zur Lymphozyten-Aktivierung, in Unabhängigkeit von extrazellulären Interaktionspartnern, wurde durch die Einführung chimärer Fusionsproteine vereinfacht. Zum einen wurden damit Liganden-induzierte Adhäsionsereignisse eliminiert, zum anderen war auf diese Weise eine unabhängige Expression und Stimulation der einzelnen LFA-1-Untereinheiten möglich.

Ein detaillierterer Einblick in die LFA-1-unterstützten Signalwege in Lymphozyten sollte mittels Analyse klassischer T-Zell-Aktivierungsparameter erhalten werden, wie z.B. der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, der IL-2-Promotorinduktion und des Phosphorylierungsgrads zellulärer Proteine. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Identität zytoplasmatischer Faktoren erlauben, welche an der LFA-1-vermittelten Signaltransduktion mitwirken.

#### **4.2.1 Konstruktion und Expression chimärer sig-Fusionsproteine**

Eine detaillierte Analyse der LFA-1-Signaltransduktion unter Umgehung der in Abschnitt 4.1 geschilderten Schwierigkeiten wurde durch die Verwendung transmembraner Fusionsproteinen realisiert. Einerseits ermöglichte die getrennte Expression der beiden LFA-1-Untereinheiten deren individuelle Analyse. Andererseits kann das Integrins ohne die vorherige Induktion der aktiven Konformation durch einfache Quervernetzung des invarianten Anteils des Fusionsproteins stimuliert werden. Durch die Verwendung von Fusionsproteinen konnten bereits komplexe Signaltransduktionswege, wie sie zum Beispiel nach Aktivierung des T- bzw. B-Zell-Rezeptors eingeleitet werden, aufgeklärt werden (Kolanus *et al.*, 1993; Zeitlmann *et al.*, 1998).

Wie in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt, bestehen diese sogenannten sIg-Fusionsproteine aus dem zytoplasmatischen Anteil der CD18- bzw. der CD11a-Kette von LFA-1 und extrazellulären Anteilen des humanen IgG<sub>1</sub> Moleküls. Für die transmembrane Expression der Fusionsproteine erwiesen sich die CD5-Signalsequenz sowie die Sequenz der transmembranen Domäne von CD7 als geeignet, da deren Aggregation früheren Untersuchungen zufolge in T-Zellen keine Signaltransduktionsereignisse induziert (Kolanus *et al.*, 1993). Durch die Verwendung dieser Fusionsproteine war für beide Integrin-Untereinheiten eine effiziente Quervernetzung mit Hilfe eines identischen und zudem löslichen Liganden, nämlich eines gegen humanes IgG<sub>1</sub> gerichteten Antiserums, möglich (siehe Abbildung 4.5). Neben einem Fusionsprotein ohne zytoplasmatische Domäne zur allgemeinen Kontrolle, wurde zusätzlich ein chimäres Protein mit dem intrazellulären Anteil der Integrin  $\beta$ 1-Kette, die auch als CD29-Untereinheit bezeichnet wird, verwendet.

Die Expression der sIg-Proteine in T-Lymphozyten erfolgte mittels Infektion von Jurkat T-Zellen über rekombinante Vaccinia-Viren. Dabei wird durch den Einsatz der chimären Proteine mit konstantem extrazellulären Anteil sowohl die Bestimmung der exprimierten Proteingesamtmenge über Westernblot-Analyse (Abbildung 4.6, oberer Teil) als auch die Quantifizierung der Oberflächenexpression mit Hilfe von Durchflußzytometrie vereinfacht (Abbildung 4.6, unterer Teil).

Insgesamt wurde auf diese Weise ein systematischer Ansatz zur Aufklärung komplexer intrazellulärer Signalwege, wie z.B. der Signaltransduktion des LFA-1-Integrins, etabliert. Darüberhinaus ermöglicht die Verwendung dieser sIg-Fusionsproteine die Ermittlung des Beitrags einzelner zytoplasmatischer Domänen komplexer Rezeptoren.

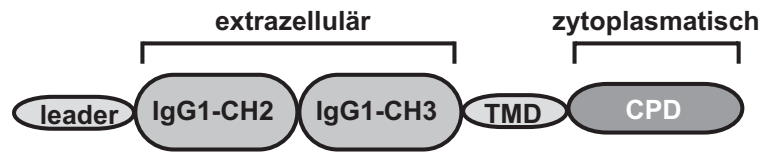


Abbildung 4.4: **Molekularer Aufbau der sIg-Fusionsproteine.** Der extrazelluläre Anteil der chimären Proteine umfasst die CH2- und die CH3-Domänen des humanen IgG<sub>1</sub> Moleküls. Durch das Anfügen einer CD5-Signalsequenz (leader) wird das Fusionsprotein in den sekretorischen Transportweg geleitet. Die Verankerung des Proteins in der Zellmembran erfolgt über den transmembranären Anteil des CD7-Moleküls (TMD). Auf diese Weise bleiben die nachfolgenden zyttoplasmatischen Domänen verschiedener Membranrezeptoren (CPD) zum Zellinneren gerichtet.

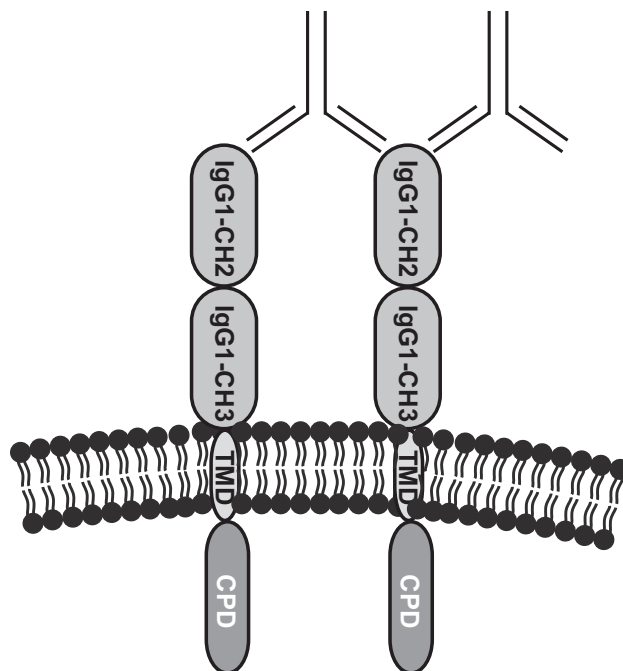


Abbildung 4.5: **Schema der Antikörper-vermittelten Quervernetzung der sIg-Proteine.** Mit Hilfe eines gegen den humanen IgG-Anteil gerichteten Antiserums gelingt die effiziente Aggregation der Fusionsproteine in Unabhängigkeit von physiologischen Liganden.

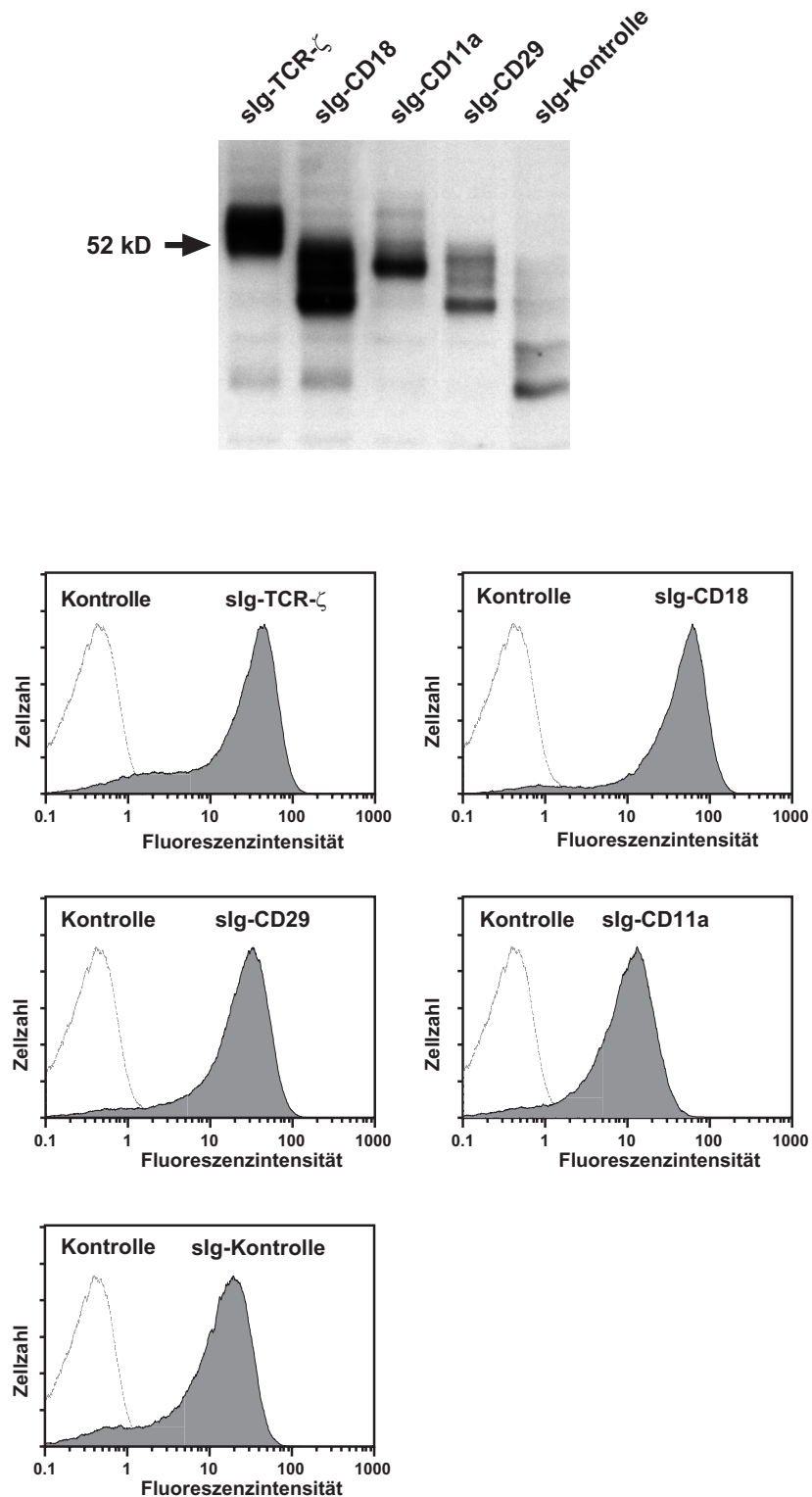


Abbildung 4.6: **Charakterisierung der slg-Fusionsproteine.** Die Expression der chimären Proteine in T-Zellen wurde mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren erreicht. Die Bestimmung der Menge an exprimiertem Fusionsprotein gelang nach Auftrennung von Gesamtzelllysaten auf denaturierenden PAA-Gelen durch Westernblot-Analyse mittels eines anti-humanen IgG Serums (oberer Teil der Abbildung). Durch Anfärbung des IgG-Anteils der chimären Proteine auf der Oberfläche intakter Zellen konnte mittels durchflußzytometrischer Analysen die Expressionsdichte überprüft werden.

#### 4.2.2 Analyse des Calciumsignals nach Quervernetzung der LFA-1-Fusionsproteine

Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist ein wichtiger und häufig herangezogener Parameter zur Untersuchung früher Signaltransduktionsereignisse im Verlauf der Lymphozyten-Aktivierung. Daher wurden zunächst Experimente durchgeführt, die zur Ermittlung der Signaltransduktionskapazität entsprechender Fusionsproteine dienten. Wie bereits durch vorherige Untersuchungen gezeigt wurde, konnte nach Expression und anschließender Antikörper-vermittelter Stimulation eines Kontroll-Fusionsproteins, dessen zytoplasmatischer Anteil dem der TCR- $\zeta$ -Kette entspricht, in T-Lymphozyten ein starkes und lang andauerndes Calciumsignal (über 5 min) induziert werden (Zeitlmann *et al.*, 1998; Abbildung 4.7, oberer Teil). Überraschenderweise ergab jedoch die Analyse der isolierten  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Untereinheiten, CD29 bzw. CD18, daß ausschließlich die Quervernetzung der CD18-Untereinheit des LFA-1-Integrins einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hatte, nicht aber die Aggregation der zytoplasmatischen Domäne von CD29. Der durch die CD18-Kette induzierte Calcium-Einstrom unterschied sich jedoch von dem durch die TCR- $\zeta$ -Kette erzeugten, und zwar sowohl bezüglich des zeitlichen Verlaufs des Signals nach Oberflächenvernetzung der Fusionsproteine als auch in der Amplitude. Darüberhinaus konnte mit Hilfe dieses Ansatzes gezeigt werden, daß die Stimulation der LFA-1  $\alpha$ -Untereinheit, CD11a, im Gegensatz zur  $\beta$ 2-Untereinheit, zu keiner Calciummobilisierung in T-Zellen führt, wie im unteren Teil der Abbildung 4.7 gezeigt ist.

Zur zusätzlichen Unterstützung des Befundes, daß die Stimulation der zytoplasmatischen Domäne von CD18 in der Induktion intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse resultieren kann, wurden im Folgenden Reporter-Experimente durchgeführt.



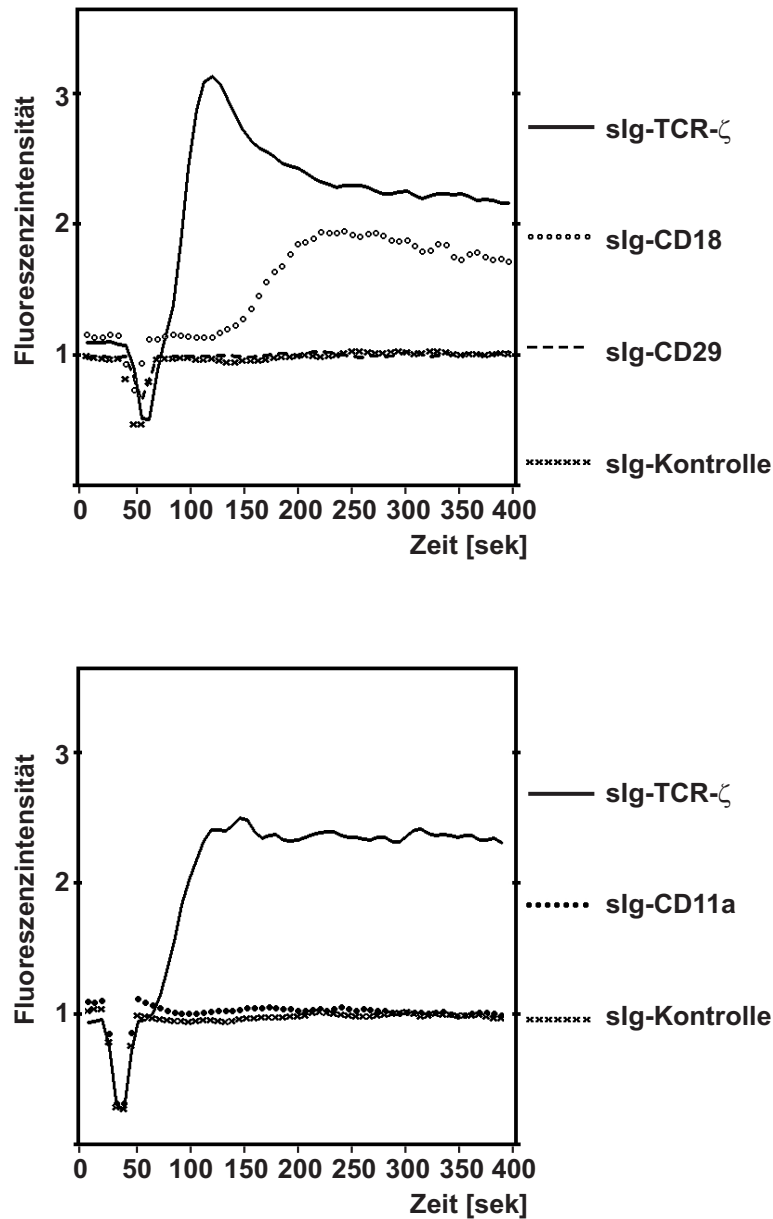


Abbildung 4.7: **Quervernetzung der CD18-Untereinheit von LFA-1 induziert in T-Zellen ein Calciumsignal.** Nach Expression der sIg-Fusionsproteine in Jurkat T-Zellen, wurden diese mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-3 beladen und die relative intrazelluläre Calciumkonzentration mit Hilfe des Durchflußzytometers bestimmt. Die Antikörper-vermittelte Aggregation des CD18 sIg-Proteins resultierte in einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciumsignals, nicht aber die Stimulation der Integrin CD29-Kette. Die Quervernetzung des zytoplasmatischen Anteils der TCR- $\zeta$ -Untereinheit hatte ebenfalls eine massive Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration zur Folge (oberer Teil der Abbildung). Demgegenüber führte die Quervernetzung der  $\alpha$ -Untereinheit von LFA-1 (CD11a) zu keiner Änderung der basalen Calciumkonzentration in der Zelle (unterer Teil der Abbildung).

### 4.2.3 Aktivierung des IL-2-Promotors nach Quervernetzung der CD18-Untereinheit

Eine Bestätigung der Signalvermittlungskapazität der CD18-Kette des LFA-1-Moleküls erfolgte durch Quantifizierung der transkriptionellen Induktion des IL-2-Promotors. Hierfür wurde ein bereits in Kapitel 4.1 beschriebenes Reporter-gen-Plasmid zusammen mit dem sIg-CD18-Expressionskonstrukt in Jurkat T-Zellen transient eingebracht und die Luziferaseaktivität in Abhängigkeit der IL-2-Promotorstimulation bestimmt.

Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die transmembrane Expression und anschließende Quervernetzung einzelner homologer Sequenzmotive innerhalb der zytosplasmatischen Domäne der TCR- $\zeta$ -Kette, in einem der Stimulation der gesamten TCR- $\zeta$ -Kette vergleichbaren Maße für die Induktion von Signaltransduktionsereignissen in T-Lymphozyten ausreichend ist (Romeo und Seed, 1991; Romeo *et al.*, 1992). Im zytosplasmatischen Anteil der TCR- $\zeta$ -Kette finden sich insgesamt drei dieser als ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) bezeichneten Sequenzabschnitte. Die Signalübertragung mittels eines einzelnen ITAMs hängt in erster Linie von der Phosphorylierung zweier Tyrosinreste ab, welche in einem Abstand von 9-11 Aminosäuren aufeinanderfolgen (siehe hierzu auch Einleitung, Abschnitt 2.2). Für einen kontrollierten Ablauf dieser Reporter-gen-Experimente wurde daher ein sIg-Fusionsprotein eingesetzt, dessen intrazellulärer Anteil das am weitesten carboxyterminal lokalisierte ITAM der TCR- $\zeta$ -Kette enthielt (sIg- $\zeta$ -ITAM<sub>3wt</sub>). Zusätzlich wurde für die Ermittlung der basalen IL-2-Promotoraktivität ein als sIg- $\zeta$ -ITAM<sub>3YY/FF</sub> bezeichnetes Fusionsprotein verwandt, bei dem die beiden für die Signalfunktion essentiellen Tyrosinreste durch Phenylalanin substituiert sind. Da auf diese Weise nach Quervernetzung des Fusionsproteins keine Kopplung an nachgeschaltete Signalwege mehr möglich ist, wird der IL-2-Promotor nicht aktiviert.

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, läßt sich der IL-2-Promotor außer durch physiologische Mechanismen auch durch Behandlung der T-Zellen mit unphysiologischen Agonisten maximal induzieren. Eine synergistische Aktivierung des IL-2-Promotors kann in Zellkultur beispielsweise durch gleichzeitige Gabe von Calcium-Ionophor, welches die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht, und von Phorbol ester, der u.a. zur Aktivierung lipidbindender Kinasen führt, erzielt werden. In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse der IL-2-Promotoraktivierung, nach Quervernetzung der sIg-Fusionen, in prozentualen Anteilen der maximalen Stimulationswerte, also nach gleichzeitiger Ionophor- und PMA-Behandlung der Zellen, dargestellt. Wie zu erwarten, führt in Wildtyp Jurkat T-Zellen die transiente Expression von sIg- $\zeta$ -ITAM<sub>3wt</sub>, und die anschließende Stimulation mit anti-humanem IgG

und PMA zu einer nahezu maximalen IL-2-Promotorinduktion. Interessanterweise ist die Expression von sIg-Fusionsproteinen und die Behandlung der Zellen mit PMA bereits ausreichend für die Aktivierung des IL-2-Promotors. Dieser, bei sIg-CD18 noch stärker als bei sIg- $\zeta$ -ITAM3<sub>wt</sub> ausgeprägte Effekt kann in erster Linie damit erklärt werden, daß die Überexpression der transmembranen Proteine zu einer hohen Oberflächendichte führt. Dadurch bilden sich Aggregate der entsprechenden Oberflächenrezeptoren aus, welche ohne zusätzliche Quervernetzung intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können. Dennoch konnte die nach Expression des CD18-Fusionsproteins induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors zusätzlich durch Quervernetzung gesteigert werden. Allerdings erhöhte sich durch Antikörperstimulation auch der basale Wert der IL-2-Promotoraktivität leicht, was durch unspezifische Wechselwirkungen mit Oberflächenproteinen hervorgerufen werden könnte.

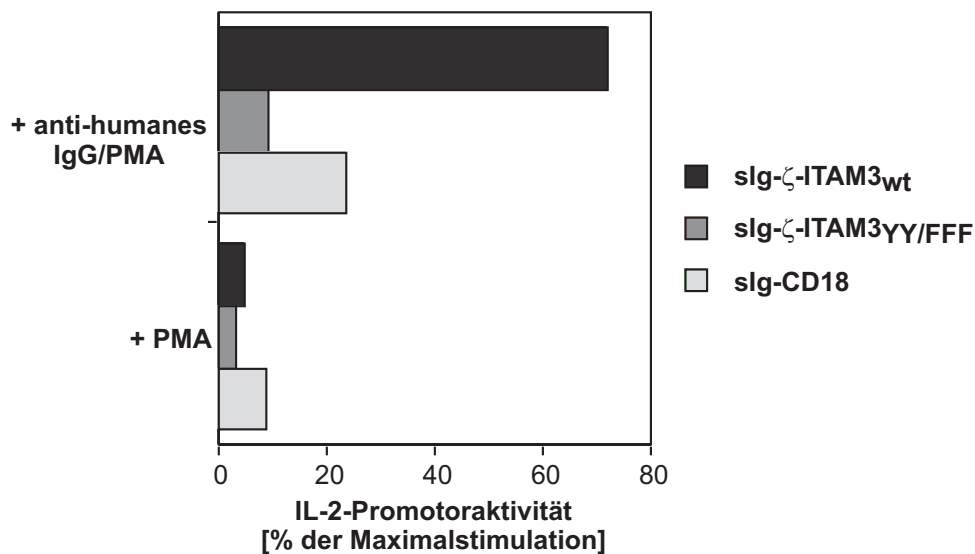


Abbildung 4.8: **Stimulation der CD18-Untereinheit in Jurkat T-Zellen ist ausreichend für die Aktivierung des IL-2-Promotorelements.** Die transiente Expression des CD18-Fusionsproteins in Jurkat T-Zellen resultierte nach Quervernetzung des extrazellulären Anteils mittels eines polyklonalen anti-IgG Serums und gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit PMA in einer deutlichen Induktion des IL-2-Promotors. Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte auch hier durch Expression von Luziferase als Reportergen. Die Luziferaseaktivitäten sind relativ zur Maximalstimulation des Promotorelements nach Behandlung der Zellen mit Calcium-Ionophor und Phorbol ester angegeben. Die Expressionsdichte der verschiedenen Konstrukte wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt (nicht gezeigt).

Alles in allem bestätigen diese Experimente nachdrücklich den bereits in Kapitel 4.2.2 dargelegten Befund über die Signalvermittlungskapazität des zytoplasmatischen Anteils der LFA-1 CD18-Untereinheit in T-Zellen.

### **4.3 Identifizierung molekularer Komponenten der CD18-Signalkaskade**

Wie bereits in den Abschnitten 2.1 und 4.2.3 erwähnt, sind an der eigentlichen Signalweiterleitung des TCRs in erster Linie die ITAM-Elemente innerhalb der intrazellulären Domänen der TCR- $\zeta$ -Kette und der Untereinheiten des CD3-Komplexes beteiligt. Die ITAMs tragen zur Signalweiterleitung bei, indem sie nach TCR-Stimulation an spezifischen Tyrosinresten vermutlich durch Tyrosinkinasen der Src-Familie (p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup>) modifiziert werden. Auf diese Weise sind Interaktionen der ITAM-Elementen mit weiteren Komponenten des T-Zell-Signaltransduktionsapparates möglich, wie z.B. mit den Kinasen der Syk-Familie (Syk, ZAP-70). Die somit aktivierten Kinasen rekrutieren wiederum weitere Effektorproteine der TCR-Signalkaskade, was letztlich einer Kopplung des TCR-Komplexes an intrazelluläre Signalwege entspricht (siehe auch Kapitel 2.2; van Leeuwen und Samelson, 1999; Kane *et al.*, 2000).

Zur Ermittlung molekularer Komponenten, welche am CD18-Signalweg beteiligt sind, wurde im Folgenden zunächst der Beitrag von Komponenten der TCR-Signalkaskade untersucht, wie beispielsweise Vertretern der Src- bzw. Syk-Familie sowie die TCR- $\zeta$ -Kette. Hinweise auf einen potentiellen Mechanismus der CD18-Signalfunktion ergaben sich außerdem durch eine Analyse der Verteilung von Fusionsproteinen innerhalb von Membransubkompartimenten, in denen Signalmoleküle angereichert sind. Darüberhinaus wurde zur weiteren Charakterisierung des CD18-induzierten Calcium-Einstroms die Signalkapazität von DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) untersucht, welches in stimulierten T-Lymphozyten mit LFA-1 interagiert (Shibuya *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 1999).

### 4.3.1 Beitrag von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zur CD18-Signaltransduktion

Publikationen verschiedener Gruppen zufolge, werden im Verlauf von Integrin-unterstützten Signaltransduktionsprozessen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert, welche sowohl Tyrosinreste spezifischer Substrate phosphorylieren können als auch eine Proteinadapterfunktion erfüllen (Yan *et al.*, 1997; Soede *et al.*, 1999; Shibuya *et al.*, 1999; Rodriguez-Fernandez *et al.*, 1999).

In welchem Ausmaß die Mitglieder der Src- und Syk-Familie, p56<sup>lck</sup> (Lck<sub>wt</sub>) bzw. Syk (Flag-Syk<sub>wt</sub>), auch an der Signaltransduktionsfunktion von CD18 in T-Lymphozyten beteiligt sind, wurde durch Modifikation des bereits in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Reporterexperimentes untersucht. Hierbei wurde analysiert, ob die CD18-induzierte IL-2-Promotoraktivierung durch Co-Expression dieser Kinasen beeinflusst werden konnte. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Varianten dieser Kinasen eingesetzt, welche entweder aufgrund einer carboxyterminalen Deletion der Kinasedomäne (Lck<sub>ΔKinase</sub>) oder aufgrund einer Punktmutation innerhalb der Substratbindungsstelle (Flag-Syk<sub>K-</sub>) keine enzymatische Aktivität mehr aufwiesen

Wie aus der Abbildung 4.9 hervorgeht, führte die Aggregation der CD18-Kette zusammen mit der Stimulation durch Phorbolester zu einer mehr als dreifachen Aktivierung des IL-2-Promotors im Vergleich zum Kontroll-Fusionsprotein, ähnlich wie zuvor in Abbildung 4.8. gezeigt. Überraschenderweise zeigten diese Experimente jedoch, daß bereits die Co-Expression von CD18 mit der Wildtypform der p56<sup>lck</sup>-Kinase in einer ungefähr vierfachen Stimulation des IL-2-Reportergens resultierte, welche durch die Zugabe von Phorbolester zusätzlich um das achtfache gesteigert werden konnte. Die Quervernetzung des CD18 Proteins hatte jedoch auf diesen Wert keinen signifikanten Einfluß. Für die Interpretation dieses dominant-positiven Effektes durch Überexpression der katalytisch-aktiven Form der p56<sup>lck</sup>-Kinase bedarf es zusätzlicher Experimente, in denen die Kinasen ohne eine Co-Expression der CD18-Untereinheit analysiert werden müßten.

Demgegenüber resultierte die Co-Expression der p56<sup>lck</sup>-Deletionsmutante zusammen mit dem CD18-Fusionsprotein in der Inhibition der transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promotors, welcher nach Quervernetzung der CD18-Untereinheit induziert wurde. Offenbar hatte demnach die Expression einer Kinase-defizienten Variante der p56<sup>lck</sup>-Tyrosinkinase einen dominant-negativen Effekt auf die CD18-vermittelte Aktivierung des IL-2-Promotors. Diesen Befunden zufolge spielt die p56<sup>lck</sup>-Kinase für die CD18-Signalkaskade eine wichtige Rolle.

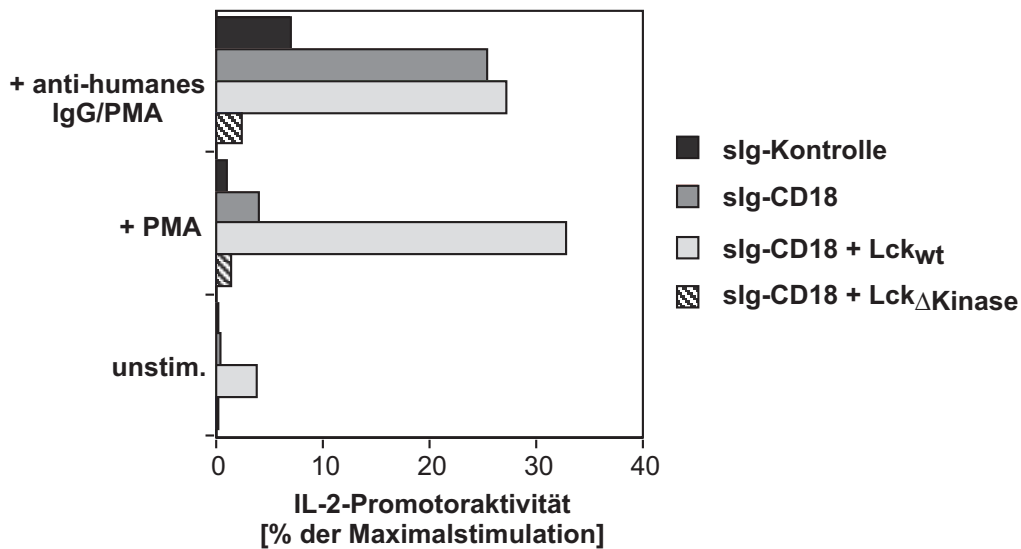


Abbildung 4.9: **Analyse einer potentiellen Involvierung der Src-Kinase p56<sup>lck</sup> in die CD18-Signalkaskade.** Inwiefern Tyrosinkinasen der Src-Familie an den CD18-Signalwegen mitwirken, wurde mit Hilfe von Reporter-Experimenten untersucht. Hierfür wurde das CD18-Fusionsprotein jeweils ohne und zusammen mit der p56<sup>lck</sup>-Tyrosinkinase (Lck<sub>wt</sub>) transient in Jurkat T-Zellen exprimiert. In einem weiteren experimentellen Ansatz erfolgte die Expression des chimären CD18-Proteins gleichzeitig mit einer Variante der Tyrosinkinase, deren Kinasedomäne aufgrund einer Deletion fehlte (Lck<sub>ΔKinase</sub>). Die Induktion eines zusätzlich transfizierten IL-2-Promotorplasmids konnte mit Hilfe eines nachgeschalteten Luziferase-Reportergens, analog der in Abbildung 4.7 beschriebenen Methodik, quantifiziert werden.

Die Untersuchung einer mutmaßlichen Beteiligung von Syk-Tyrosinkinasen mittels analoger Experimente führte, wie in Abbildung 4.10 dargestellt, zu ähnlichen Ergebnissen. Ein auffälliger Unterschied zur p56<sup>lck</sup>-Signalfunktion ist jedoch hierbei, daß nach einer Co-Expression sowohl der katalytisch aktiven Syk-Kinase als auch der Kinase-inaktiven Syk-Variante die durch CD18-induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors um ungefähr 50 % zurückging. Dies mag möglicherweise durch eine Entkopplung zytoplasmatischer Faktoren der CD18-Signalkaskade bedingt sein, deren Regulation über die Adapterproteinfunktion der Syk-Kinase erfolgt.

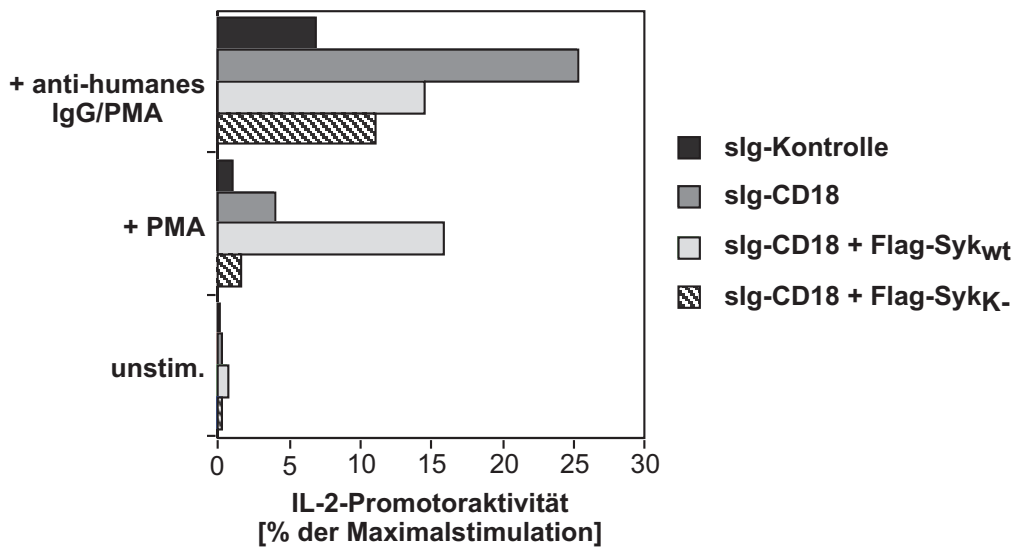


Abbildung 4.10: **Einfluß der Syk-Tyrosinkinase auf die CD18-Signalkaskade.** Entsprechend der in Abbildung 4.9 dargestellten Weise wurde eine mögliche Beteiligung von Tyrosinkinasen der Syk-Familie an der CD18-Signalkaskade ermittelt. Die Expression beider Varianten der Syk-Kinase, welche sowohl in der Wildtyp (Flag-Syk<sub>wt</sub>) als auch in der Kinase-defizienten Form vorlagen (Flag-Syk<sub>K-</sub>), erfolgte hier in Form eines aminoterminalen Flag-Fusionsproteins. Anhand der Quantifizierung der Stimulationswerte eines co-transfizierten IL-2-Promotor Reportergen-Konstruktes, entsprechend der in Abbildung 4.7 beschriebenen Methodik, wurde der Beitrag der Syk-Tyrosinkinase zur CD18-vermittelten Costimulation analysiert.

Zusammengenommen demonstrieren die hier beschriebenen dominant-negativen Effekte der Expression von enzymatisch inaktiven Varianten der p56<sup>lck</sup>- und Syk-Tyrosinkinasen auf die CD18-Signaltransduktion einen potentiellen Synergismus zwischen den Signalfunktionen der CD18-Untereinheit und den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Inwieweit die TCR- $\zeta$ -Kette in die Vermittlung des CD18-Signalwegs involviert ist, wurde im Folgenden Abschnitt untersucht.

### 4.3.2 Abhängigkeit der CD18-Signaltransduktion vom TCR

Die Beteiligung von Corezeptoren und akzessorischen Molekülen an der Vermittlung von Signaltransduktionsabläufen während der Lymphozyten-Aktivierung kann einerseits zur Folge haben, daß die vom TCR ausgehenden Signale zusätzlich amplifiziert werden. Anderer-

seits können diese Rezeptoren aber auch unabhängig vom TCR intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse auslösen (siehe hierzu auch Abschnitt 2.3).

Inwiefern die CD18-Signalvermittlung von der Präsenz eines intakten TCR abhängig ist, wurde mit Hilfe von TCR-defizienten T-Zellen analysiert. Die als J.RT3-T3.5 bezeichnete Variante der Jurkat E6 Zelllinie exprimiert, aufgrund der fehlenden TCR- $\beta$ -Untereinheit, keine nachweisbaren Mengen des TCRs an der Zelloberfläche, da dieser nur in Form des Gesamtkomplexes an die Plasmamembran transportiert wird (Clevers *et al.*, 1988). Zur Ermittlung einer potentiellen TCR-Abhängigkeit der CD18-Signaltransduktion, wurden die sIg-Fusionsproteine in dieser Zelllinie exprimiert und nach Aggregation des extrazellulären Anteils die zytoplasmatische Calciummenge bestimmt. Um sicherzustellen, daß die hierfür eingesetzte TCR-negative Zelllinie keinen weiteren Defekt in ihrer Signaltransduktionskaskade aufweist, wurde in diesen Studien zur Kontrolle ein weiteres sIg-Fusionsprotein untersucht. Der intrazellulärer Anteil dieses chimären Fusionsproteins umfaßt die zytoplasmatische Domäne von CD28, für den verschiedenen Untersuchungen zufolge eine TCR-unabhängige Signalübermittlung diskutiert wird (Shapiro *et al.*, 1997; Harhaj und Sun, 1998).

Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, ergaben Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration in der Tat, daß die Aggregation des zytoplasmatischen Anteils von CD18 in TCR-defizienten Jurkat Zellen nicht zur Induktion eines Calcium-Einstroms führte, wie dies mit der Wildtyp CD18-Variante in Jurkat LT Zellen gezeigt werden konnte (Abbildung 4.7, oberer Teil). Im Gegensatz dazu resultierte die Expression und Quervernetzung des intrazellulären Anteils von CD28 in einem signifikanten Calciumsignal. Weiterhin ergaben diese Untersuchungen, daß in TCR-negativen Jurkat Zellen die konstitutive transmembrane Expression der TCR- $\zeta$ -Kette und die nachfolgende Aggregation ausreichend für die Induktion eines zytoplasmatischen Calciumanstiegs ist.

Somit konnte mittels dieser Untersuchungen in TCR-defizienten Jurkat Zellen eindeutig demonstriert werden, daß für die Signalübertragung mittels CD18 die Oberflächenexpression eines intakten TCRs unbedingt erforderlich ist. Dagegen scheint der costimulatorische Beitrag von CD28 zur T-Zell-Aktivierung zumindest teilweise unabhängig von der Expression des TCRs zu sein.



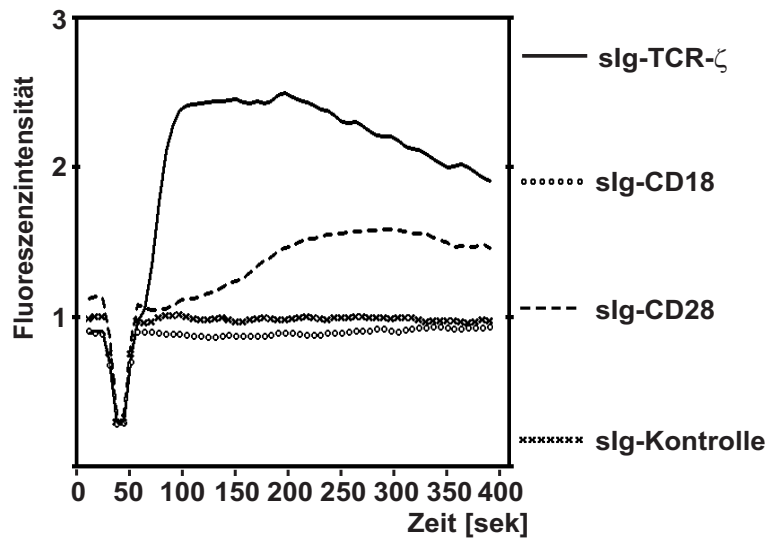


Abbildung 4.11: **In TCR-defizienten Jurkat Zellen induziert die Quervernetzung der CD18-Untereinheit kein intrazelluläres Calciumsignal.** Nach Expression des CD18 sIg-Fusionsproteins in der TCR-negativen Jurkat-Variante J.RT3-T3.5 mittels rekombinanter Vaccinia-Viren, fand in Folge der Antikörper-induzierten Stimulation des IgG-Anteils kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration statt. Demgegenüber war nach Aggregation des CD28-Fusionsproteins in diesen Zellen ein deutliches Calciumsignal meßbar. Nähere Angaben zur experimentellen Vorgehensweise sind unter Abbildung 4.7 aufgeführt.

### 4.3.3 Rekonstitution der CD18-Signaltransduktion in TCR-defizienten Jurkat Zellen

Wie in Abschnitt 4.3.2 erwähnt sowie in Abbildung 4.11 gezeigt, ist die konstitutive transmembrane Expression der TCR- $\zeta$ -Kette ausreichend, den gesamten TCR-Komplex in TCR-negativen Jurkat Zellen zu ersetzen und damit vom TCR-abhängige Signaltransduktionsprozesse zu rekonstituieren. Folglich sollte es möglich sein, durch Rekonstitution dieser TCR-defizienten Jurkat Zellen durch Expression transmembraner TCR-Elemente die CD18-Signaltransduktion wiederherzustellen, falls hierfür tatsächlich ein intakter TCR-Komplex notwendig ist. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres Fusionsprotein eingesetzt, welches den extrazellulären Anteil von CD4 und den intrazellulären Anteil der TCR- $\zeta$ -Kette umfaßt (siehe Abbildung 4.12, oberer Teil). Auf diese Weise war es möglich, den zytoplasmatischen Anteil von CD18 gleichzeitig mit dem TCR- $\zeta$ -Element zu

exprimieren, die CD18-Untereinheit aber unabhängig vom TCR zu stimulieren, wie im unteren Teil der Abbildung 4.12 schematisch dargestellt ist. Somit konnte ein potentiell auftretendes Calciumsignal eindeutig der CD18-Kette zugeordnet werden. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde ein CD4-Fusionsprotein ohne relevanten zytoplasmatischen Anteil verwendet.

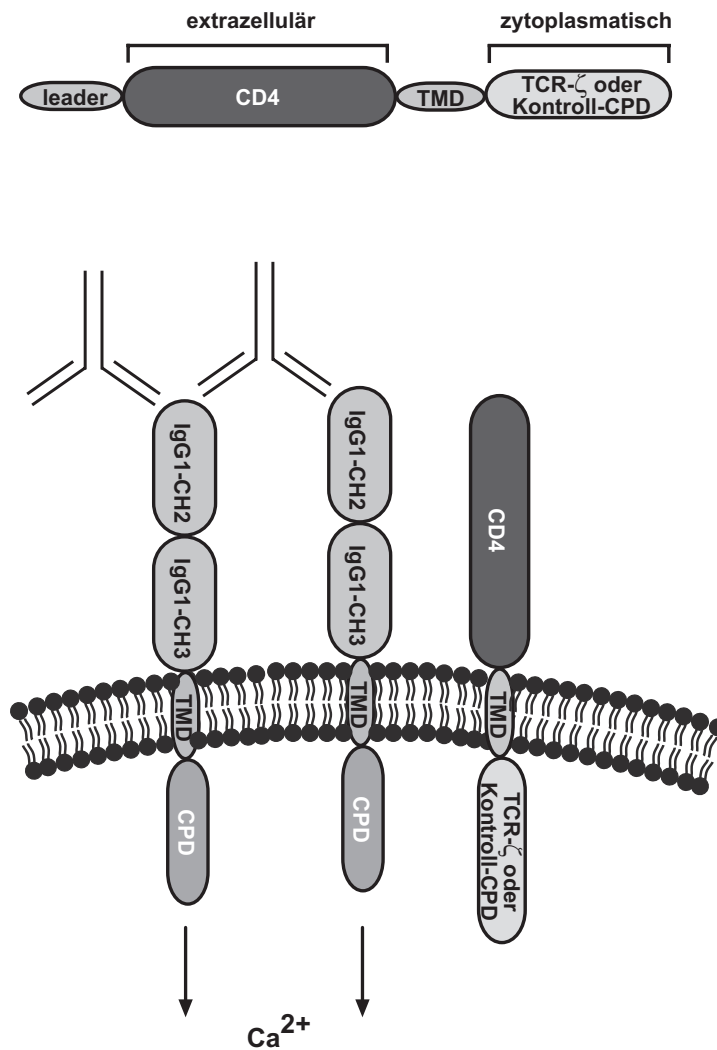


Abbildung 4.12: **Schematische Darstellung der CD4-Fusionsproteine und Prinzip der Rekonstitution von TCR-Komponenten in J.RT3-T3.5 Zellen.** Im oberen Teil der Abbildung ist eine Skizze von CD4-TCR-ζ bzw. der entsprechenden Kontrolle dargestellt (natives CD4). Das TCR-ζ-Fusionsprotein umfasst die extrazellulären Domänen von CD4 sowie den zytoplasmatischen Anteil des TCR-ζ-Elements. Die Oberflächenexpression von CD4-TCR-ζ wird durch Anfügen der CD5-Signalsequenz (leader) sowie der transmembranären Domäne von CD7 (TMD) erreicht. Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch die methodische Vorgehensweise einer Rekonstitution TCR-defizienter Jurkat Zellen mit Hilfe transmembranärer Expression von TCR-Elementen gezeigt. Die gleichzeitig exprimierten sIg-Fusionsproteine können auf diesem Weg unabhängig von den CD4-Fusionsproteinen stimuliert werden.

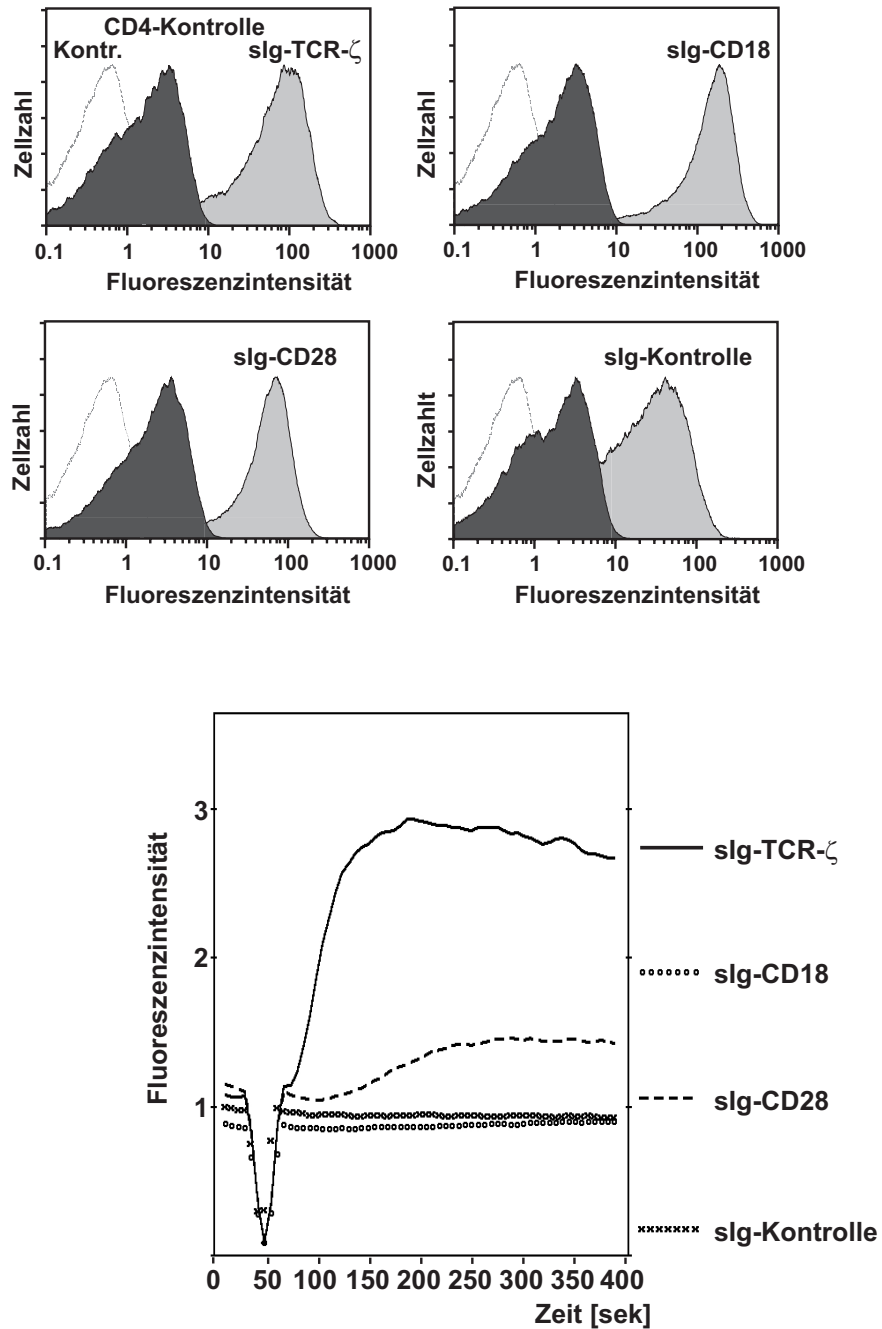


Abbildung 4.13: **Simultane Expression der sIg-Fusionsproteine und der CD4-Kontrolle in TCR-defizienten Jurkat Zellen.** Die Co-Expression der chimären sIg-Proteine zusammen mit dem nativen CD4-Molekül beeinflusste nicht die Oberflächendichte der Fusionsproteine, wie aus der durchflußzytometrischen Analyse im oberen Teil der Abbildung hervorgeht. Darüberhinaus ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt, daß sich die bereits in Abbildung 4.11 demonstrierten Ergebnisse bezüglich der fehlenden Kapazität der CD18-Untereinheit, in TCR-negativen Zellen ein Calciumsignal zu induzieren, durch die Co-Expression von CD4 nicht änderten. Zusätzlich konnte mit dem vorliegenden Experiment nochmals die TCR-Unabhängigkeit der CD28-induzierten Calciummobilisierung bestätigt werden.

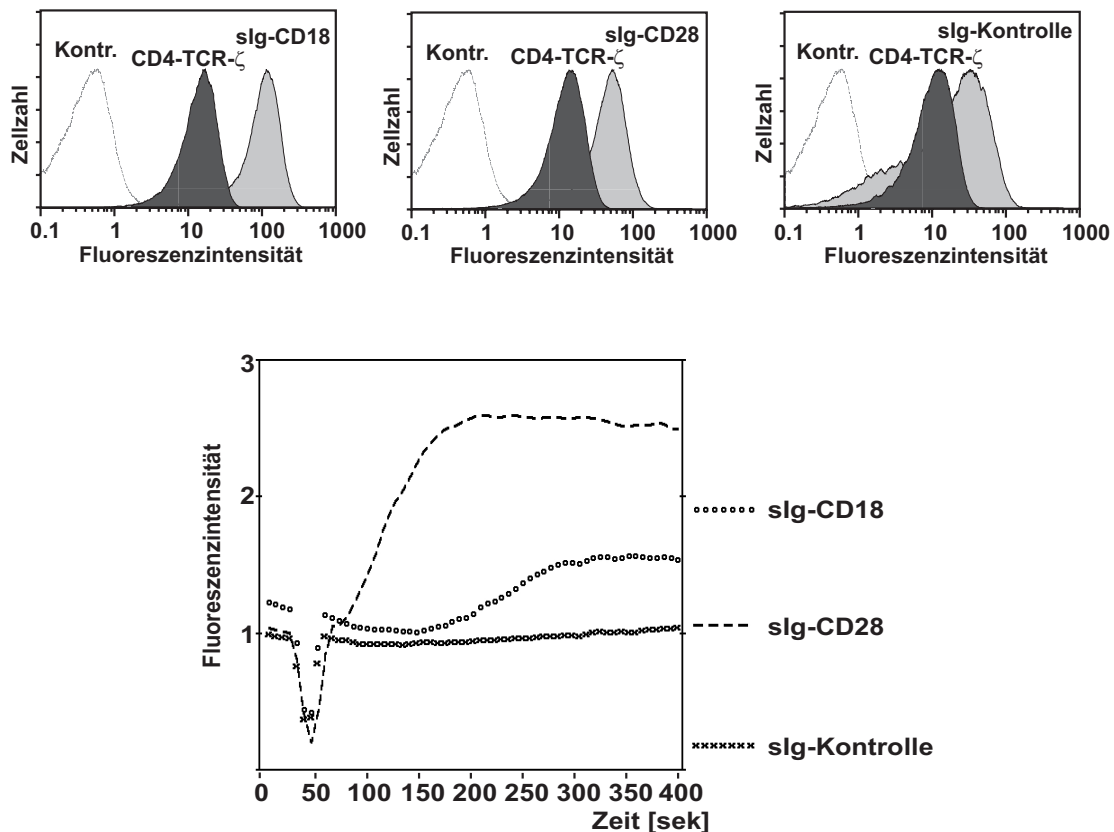


Abbildung 4.14: Die Co-Expression des CD4-TCR- $\zeta$  Fusionsproteins ist hinreichend für die Rekonstitution des CD18-Calciumsignals in TCR-defizienten Jurkat Zellen. Wie aus den durchflußzytometrischen Analysen hervorgeht, war bei gleichzeitiger Expression der slg-Fusionsproteine und von CD4-TCR- $\zeta$  die jeweilige Oberflächendichte vergleichbar. Nach Co-Expression des transmembranen TCR- $\zeta$ -Proteins in TCR-negativen Jurkat Zellen konnte das CD18-induzierte Calciumsignal wiederhergestellt werden. Außerdem war es auf diese Weise möglich, den durch Stimulation von CD28-induzierten intrazellulären Calciumanstieg zu verstärken, verglichen mit dem in nicht-rekonstituierten J.RT3-T3.5 Zellen erzeugten Signal (unterer Teil der Abbildung).

Die Co-Expression dieses Kontroll-CD4-Fusionsprotein zusammen mit den chimären slg-Proteinen in TCR-negativen Jurkat Zellen führte zu keinem anderen Ergebnis als zu dem bereits in Abbildung 4.11 gezeigten (siehe Abbildung 4.13, unterer Teil). Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich ist, reichte hingegen die Expression und Quervernetzung der CD18-Untereinheit zusammen mit der CD4-TCR- $\zeta$ -Kette in der Tat aus, um das CD18-induzierte Calciumsignal in TCR-defizienten Jurkat Zellen wiederherzustellen. Desweiteren konnte somit gezeigt werden, daß in diesen Zellen nach Re-Expression des TCR- $\zeta$ -Elements der durch CD28-Stimulation hervorgerufene Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration noch weiter gesteigert werden konnte, verglichen zum Signal in nicht-rekonstituierten Zellen (siehe Abbildung 4.14). Dieser Befund läßt auf eine zusätzliche, vom

TCR-abhängige Komponente der CD28-vermittelten Signaltransduktion schließen. Die Aggregation der sIg-Kontrolle hingegen führte auch in diesem experimentellen Ansatz zu keiner Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, was ebenfalls die Spezifität des wiederhergestellten CD18-Signals bestätigt.

Neben des Einstroms extrazellulären Calciums, ist der Anstieg des Phosphorylierungsgrads zellulärer Proteinen an Tyrosinresten ein weiterer Prozeß, der bereits früh im Verlauf von Signaltransduktionsvorgängen in T-Lymphozyten stattfindet. Dementsprechend sollte überprüft werden, ob die Rekonstitution von TCR-defizienten Jurkat Zellen mit der TCR- $\zeta$ -Untereinheit nach Co-Expression und Stimulation der CD18-Kette in einer Steigerung des Phosphotyrosingehalts zellulärer Substrate resultiert. Wie aus Abbildung 4.15 zu entnehmen ist, ergab die Westernblot-Analyse von J.RT3-T3.5 Gesamtzelllysaten mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers, daß erst nach Rekonstitution der Zellen mit der TCR- $\zeta$ -Kette die Stimulation der CD18-Untereinheit einen Anstieg tyrosinphosphorylierter Proteine induzierte. Im Gegensatz dazu führte die Quervernetzung der CD18-Kette nach Expression in nicht-rekonstituierten, TCR-negativen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu keiner zusätzlichen Verstärkung der Phosphorylierung zellulärer Proteine an Tyrosinresten. Hierbei induzierte die Quervernetzung von CD18 in rekonstituierten TCR-negativen Zellen, im Gegensatz zu den Kontrollen, ein Auftreten tyrosinphosphorylierter Proteinbanden mit einem apparentem Molekulargewicht von 21 bis 23 kD, von 34 bis 36 kD, von 95 kD und besonders deutlich von einer Bande, die einem Protein von ungefähr 120 kD apparentem Molekulargewicht entspricht. Darüberhinaus führte die Stimulation der CD18-Untereinheit nach Co-Expression des TCR- $\zeta$ -Elements in den J.RT3-T3.5 Zellen zu einer Verstärkung des Phosphotyrosinsignals einer Proteinbande im Bereich von 56 kD sowie einer Doppelbande von 70 bis 80 kD. Vergleicht man diese Banden tyrosinphosphorylierter Proteine mit denen, die nach Quervernetzung des TCR- $\zeta$  sIg-Fusionsproteins in den TCR-defizienten Zellen auftreten, so zeigt sich, daß auch hier die Banden im Bereich höheren Molekulargewichts vorhanden sind. Im Gegensatz zur Stimulation der CD18-Untereinheit induzierte jedoch die Aggregation der TCR- $\zeta$ -Kette im Bereich der Doppelbande von 70 bis 80 kD sowie auf der Höhe der Proteinbande mit apparentem Molekulargewicht von 120 kD Signale mit etwas geringerer Intensität. Die Signale tyrosinphosphorylierter Proteine im unteren Molekulargewichtsbereich, nämlich von 21 bis 23 kD und 34 bis 36 kD ließen sich nach Quervernetzung des TCR- $\zeta$ -Elements entweder aufgrund schwacher Intensität der Phosphotyrosinbanden oder wegen der vollkommenen Abwesenheit dieser Substrate nicht nachweisen.

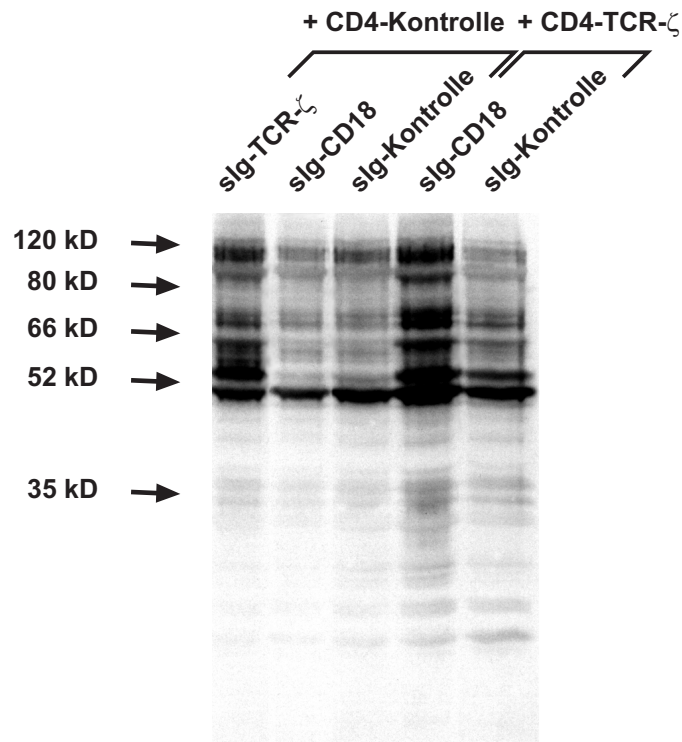


Abbildung 4.15: **Stimulation der CD18-Untereinheit in TCR- $\zeta$ -rekonstituierten J.RT3-T3.5 Zellen resultiert in einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine.** Die Expressionskonstrukte der sIg-Fusionsproteine mit dem zytoplasmatischen Anteil der TCR- $\zeta$ -Kette bzw. der CD18-Untereinheit sowie die entsprechende Kontrolle wurden mittels Elektroporation transient in TCR-negative Jurkat Zellen eingebracht. In unterschiedlichen Ansätzen wurde entweder die CD4-Kontrolle oder das CD4-TCR- $\zeta$  Fusionsproteins co-exprimiert. Im Anschluß an die Antikörper-vermittelte Stimulation der sIg-Proteine wurden Gesamtzelllysate hergestellt und mittels eines denaturierenden, 12%-igen PAA-Gels aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der tyrosinphosphorylierten Proteine mittels des monoklonalen anti-Phosphotyrosin Antikörpers 4G10. Ein Anstieg des spezifischen Phosphotyrosinsignals als Folge der CD18-Stimulation war erst nach Rekonstitution TCR-negativer Zellen mit dem CD4-TCR- $\zeta$  Fusionsprotein zu beobachten.

#### 4.3.4 Umverteilung von Membranrezeptoren nach T-Zell-Aktivierung

Neben der Induktion intrazellulärer Signalkaskaden, ist in Folge der Stimulation des TCR-Komplexes ein komplizierter, strikt organisierter Umverteilungsprozeß membranverankerter bzw. membranproximaler Proteine zu beobachten (Monks *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 1998; Xavier und Seed, 1999). Entgegen dem bisher vertretenen *fluid-mosaic* Modell einer dynamischen, strukturlosen Membran, haben neuere Forschungsergebnisse darüberhinaus gezeigt, daß die eukaryotische Zellmembran Mikrodomänen mit definierter Lipid- und

Proteinzusammensetzung enthält. Deren Reorganisation scheint ebenfalls für die nachfolgenden intrazellulären Signaltransduktionsprozesse von außerordentlicher Bedeutung zu sein (Simons und Toomre, 2000; Simons und Ikonen, 2000).

Je nach Zelltyp finden sich in diesen Mikrodomänen neben großen Mengen an Glycosphingolipiden, Cholesterol und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen auch eine Vielzahl von Src-Tyrosinkinasen, von heterotrimeren G-Proteinen sowie zytosmatischer Proteine, die bislang nur wenig charakterisiert sind. Demgegenüber sind in den Mikrodomänen Phospholipide und transmembrane Proteine weniger häufig vertreten als in der restlichen Membran (Cerny *et al.*, 1996; Brdicka *et al.*, 1998; Horejsi *et al.*, 1999). Die biologische Funktion der Membransubstrukturen ist bisher weitgehend unklar. Jedoch deuten immer mehr Untersuchungen darauf hin, daß sie im Verlauf von TCR-vermittelten Signaltransduktionsprozessen eine überaus wichtige Rolle spielen (Janes *et al.*, 2000; Langlet *et al.*, 2000; Cary und Cooper, 2000).

Untersuchungen unterschiedlicher Forschungsgruppen zufolge verändert sich die strukturelle Zusammensetzung dieser Mikrodomänen nach Stimulation mit bestimmten, gegen den TCR-Komplex bzw. gegen einige Corezeptoren gerichteten Antikörpern. Folglich führt die Umstrukturierung innerhalb der Membransubkompartimente zu einer lokalen Anreicherung von Komponenten des Zytoskeletts sowie tyrosinphosphorylierter Proteine und ist damit eine wichtige Voraussetzung für den korrekten Ablauf von Signalvermittlungsprozessen in Lymphozyten (Monks *et al.*, 1998; Wulfing und Davis, 1998; Viola *et al.*, 1999).

Analysen intakter Zellmembranen an den Kontaktstellen der T- und Antigenpräsentierenden Zelle während der T-Zell-Aktivierung zeigten, daß die hierbei beteiligten costimulatorischen Proteine eine definierte räumliche Anordnung einnehmen. Der zentrale Bereich innerhalb der Membransubdomänen enthält den TCR-Komplex, die Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> und die Proteinkinase C (PKC)  $\theta$ , wohingegen die peripheren Bereiche der Mikrodomänen reich an LFA-1 und dem Zytoskelettprotein Talin sind (Monks *et al.*, 1998; siehe auch Abschnitt 2.2). Weiterhin wurde gezeigt, daß durch den Vorgang der Costimulation ein aktiver Transport von Lipiden und Proteinen innerhalb dieser Membransubkompartimente sowie ein Verschmelzen mehrerer kleinerer Mikrodomänen zu einem größeren Subkompartiment stattfindet (Janes *et al.*, 1999; Janes *et al.*, 2000). Eine weitere strukturelle Eigenschaft dieser speziellen Membranstrukturen ist, daß sie bei niedrigen Temperaturen gegenüber nicht-ionischen Detergenzien eine gewisse Resistenz bezüglich ihres Löslichkeitsverhaltens aufweisen. Aufgrund ihrer geringeren Schwebedichte können sie daher

in Gegenwart dieser Detergenzien mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden.

Dieses Charakteristikum der Mikrodomänen diene in folgenden Experimenten der Analyse, ob eine direkte Quervernetzung der CD18-Kette ebenfalls zu dessen Umverteilung innerhalb von Membransubkompartimenten führt. Dies wäre ein potentieller Mechanismus, über den die Signalfunktion der CD18-Untereinheit mit dem TCR-Komplex in Beziehung stehen könnte. Hierfür wurden die sIg-Fusionsproteinen der CD18-Untereinheit in Jurkat E6 Zellen mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Vor der Lyse mit dem milden, nicht-ionischen Detergenz NP-40 wurde in einem Teil der Zellen die extrazelluläre Domäne des CD18-Fusionsproteins mittels eines spezifischen, gegen humanes IgG gerichteten Antiserums quervernetzt. Ein mengenmäßig gleicher Anteil der CD18-exprimierenden Zellen wurde zur Kontrolle im nicht-stimulierten Zustand lysiert. Zum direkten Vergleich der Umverteilung anderer zytoplasmatischer Domänen von Membranrezeptoren bzw. von Untereinheiten des TCRs als Folge einer Antikörper-vermittelten Quervernetzung, wurde mit den Fusionsproteinen von CD28 sowie der TCR- $\zeta$ -Kette in analoger Weise verfahren.

Nach dem Abtrennen der Zellkerne aus den Lysaten, wurden diese in einem 1:1 Verhältnis mit einer 80%-igen Sucrose-Lösung in Lysispuffer gemischt. Danach wurden in entsprechenden Ultrazentrifugationsgefäßen jeweils 1 ml dieser Suspensionen zunächst mit 3,5 ml einer 30%-igen Sucrose-Lysispuffer-Lösung und zuletzt mit 0,5 ml reinem Lysispuffer überschichtet. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Membranfraktionen entsprechend ihren unterschiedlichen Dichten durch Ultrazentrifugation. Es wurden pro Ansatz insgesamt 8 verschiedene Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 ml abgenommen, deren Dichten vom oberen Teil des Zentrifugats (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 8) zunahmen. Eine effiziente Anreicherung der jeweiligen zytoplasmatischen Domäne aus den verschiedenen Fraktionen wurde mit Hilfe immobilisierter, spezifisch gegen den humanen Immunglobulinanteil des Fusionsproteins gerichteter Antikörper erzielt. Die Präzipitate wurden durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und der invariable Immunglobulinanteil der chimären Proteine unter Verwendung eines spezifischen Antiserums detektiert.

Der in Abbildung 4.16 exemplarisch dargestellte Westernblot zeigt in allen Spuren Proteinbanden mit einem apparentem Molekulargewicht von 50 kD. Diese wird vermutlich durch eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers verursacht und könnte somit der schweren Antikörperkette des anti-humanen Serums zugeordnet werden. Weiterhin treten Signale der Immunglobulinanteile der chimären Fusionsproteine auf. Hierbei zeigten die



analysierten zytoplasmatischen Domänen im stimulierten und unstimulierten Zustand durchaus ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Die CD18-Untereinheit von LFA-1 war im unstimulierten Zustand hauptsächlich in den Membranfraktionen höherer Dichte vorzufinden, nach Aggregation des extrazellulären Anteils des Fusionsproteins fand dagegen eine Anreicherung in den Fraktionen geringerer Membrandichte statt. Obgleich das chimäre Protein mit der zytoplasmatischen Domäne von CD28 insgesamt schwächer exprimiert wurde, zeigte dieses sowohl im unstimulierten als auch nach Quervernetzung ein ähnliches Verteilungsmuster wie CD18. Dagegen war die TCR- $\zeta$ -Kette bereits im nicht-stimulierten Zustand hauptsächlich in den Fraktionen mit einer geringeren Membrandichte detektierbar und nach Stimulation erfolgte eine Umverteilung in die Membranfraktionen höherer Dichte.

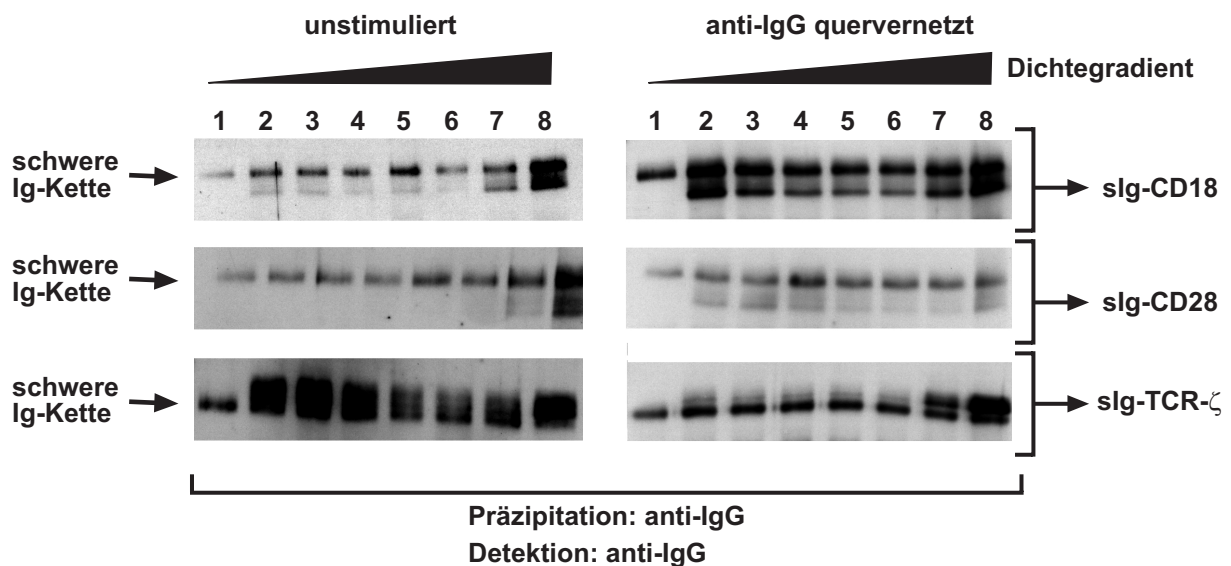


Abbildung 4.16: **Quervernetzung der verschiedenen sIg-Fusionsproteine führt zu deren unterschiedlichen Verteilung in Membransubkompartimenten.** Unter Verwendung von rekombinanten Vaccinia-Viren wurden die chimären sIg-Proteine mit zytoplasmatischen Anteilen der intrazellulären Domänen von CD18, CD28 bzw. von TCR- $\zeta$  in Jurkat E6 Zellen exprimiert und entweder mit anti-humanem IgG Serum stimuliert bzw. nicht stimuliert. Nachdem Detergenzlysate dieser Zellen einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen wurden, erfolgte eine Isolierung der Fusionsproteine aus einzelnen Fraktionen des Zentrifugats anhand des Immunglobulinanteils. Die aufgereinigten Proteine wurden einer 12%-igen PAGE unterzogen und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte ebenfalls anhand des invarianten Immunglobulinanteils.

Demzufolge induzierte die Antikörper-vermittelte Stimulation eindeutig die Umverteilung der verschiedenen Rezeptoren innerhalb von Membranfraktionen unterschiedlicher Dichten. Dabei erfolgte sowohl bei CD18 als auch bei CD28 nach Quervernetzung ein Übergang aus den Fraktionen höherer Schwebedichte in die mit Detergenz unlöslichen Fraktionen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Aggregation der TCR- $\zeta$ -Chimäre einen entgegengesetzten Umverteilungsprozeß. Diesen Ergebnissen zufolge scheint die TCR- $\zeta$ -Kette bereits im nicht-aktivierten Zustand in den Membranmikrodomänen lokalisiert zu sein, während CD18 und CD28 erst nach Aktivierung in diese rekrutiert werden.

#### **4.3.5 Ermittlung der Signalkapazität des mit CD18-assoziierten DNAM-1-Rezeptors**

Bei LAD (leukocyte adhesion deficiency) -Patienten führt ein Defekt im Gen der  $\beta$ 2-Kette zum Verlust der Expression von Integrinen dieser Subfamilie auf Leukozyten, wodurch nur eine eingeschränkte Immunantwort möglich ist. Aus diesem Grund sind die Leukozyten von am LAD-Syndrom erkrankten Patienten zur Ermittlung des Beitrags der  $\beta$ 2-Integrine während der Lymphozyten-Aktivierung von grundlegender Bedeutung. Im Verlauf solcher Untersuchungen konnte mit Hilfe von  $\beta$ 2-Integrin-defizienten Natürlichen Killerzellen aus dem Blut von LAD-Patienten, eine Involvierung von CD18 in die Signalkaskade des DNAM-1-Moleküls demonstriert werden (Shibuya *et al.*, 1999). Es zeigte sich, daß in aktivierten T-Zellen eine physikalische Interaktion von CD18 mit DNAM-1 erfolgen kann, welche von der Phosphorylierung eines Serinrestes in Position 329 in der zytoplasmatischen Region des DNAM-1-Proteins abhängt. Darüberhinaus induzierte diese Wechselwirkung die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne des DNAM-1-Moleküls durch die p59<sup>fyn</sup>-Kinase.

Aufgrund dieser engen Verknüpfung der CD18-Funktion mit DNAM-1 und Komponenten der TCR-Signalkaskade lag es nahe, die Signalkapazität des zytoplasmatischen Anteils des DNAM-1-Rezeptors im Hinblick auf eine potentielle Calciummobilisierung zu analysieren. Wie in Abbildung 4.17 dargestellt ist, führte in Jurkat T-Zellen die Expression und Quervernetzung eines chimären Fusionsproteins, dessen extrazellulärer Anteil dem des CD4-Moleküls entspricht und der zytoplasmatische Anteil dem des DNAM-1-Rezeptors, zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

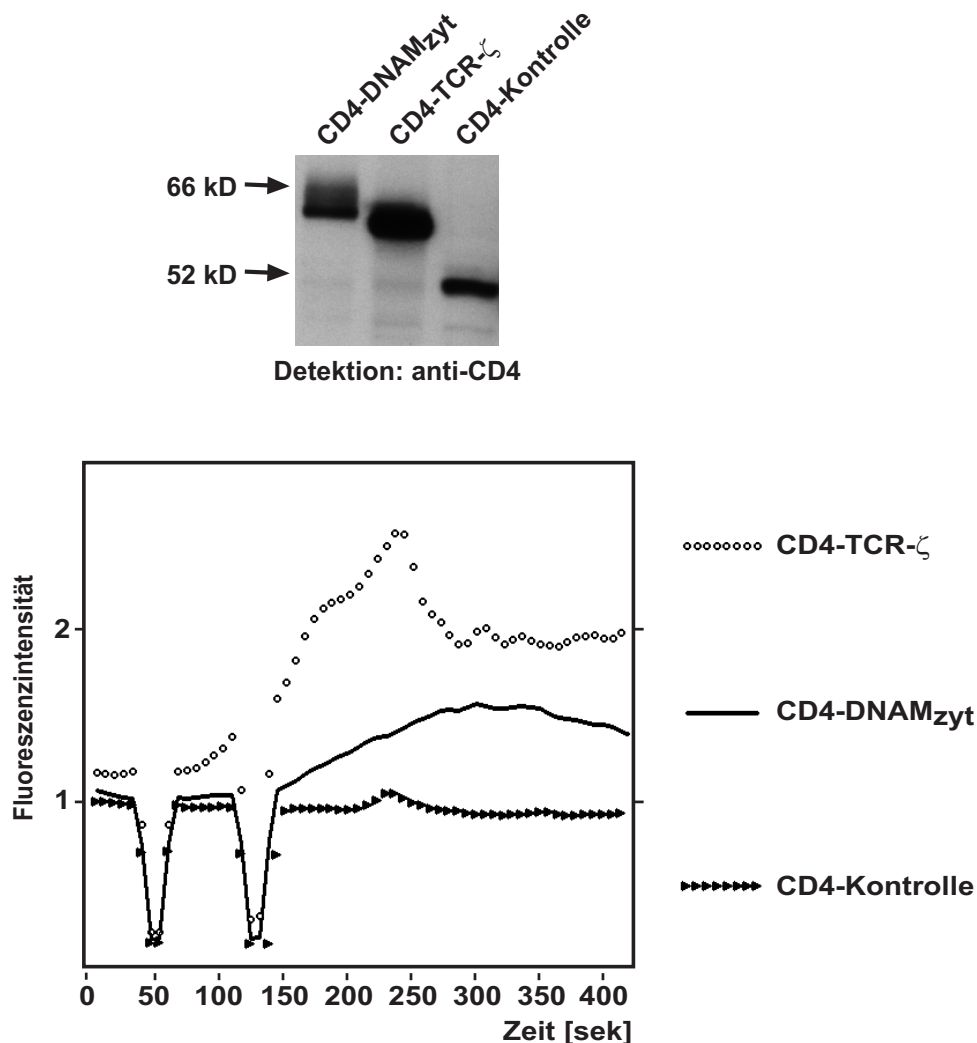


Abbildung 4.17: **Calciummobilisierung in Wildtyp-Jurkat T-Zellen nach Aggregation des DNAM-1-Moleküls.** Die Antikörper-vermittelte Quervernetzung von CD4-DNAM in T-Zellen resultierte in einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine effiziente Aggregation des CD4-DNAM-Proteins wurde durch Stimulation der Zellen mit dem murinen monoklonalen anti-CD4 Antikörper MT151 und der anschließenden Zugabe eines gegen murines Immunglobulin gerichteten Serums erreicht.

Interessanterweise konnte mittels eines analogen experimentellen Ansatzes unter Verwendung einer TCR-negativen Variante dieser Jurkat Zellen demonstriert werden, daß die intrazelluläre Calciummobilisierung nach Quervernetzung des DNAM-Fusionsproteins strikt auf das Vorhandensein eines intakten TCRs angewiesen ist (siehe Abbildung 4.18). Demnach scheint nicht nur die Assoziation von CD18 mit DNAM-1 durch die Stimulation des TCRs induziert werden zu können. Die hier dargelegten Ergebnisse weisen darüberhinaus deutlich auf eine

Abhängigkeit des DNAM-vermittelten intrazellulären Calcium-Einstroms von der TCR- $\zeta$ -Signalkaskade hin.

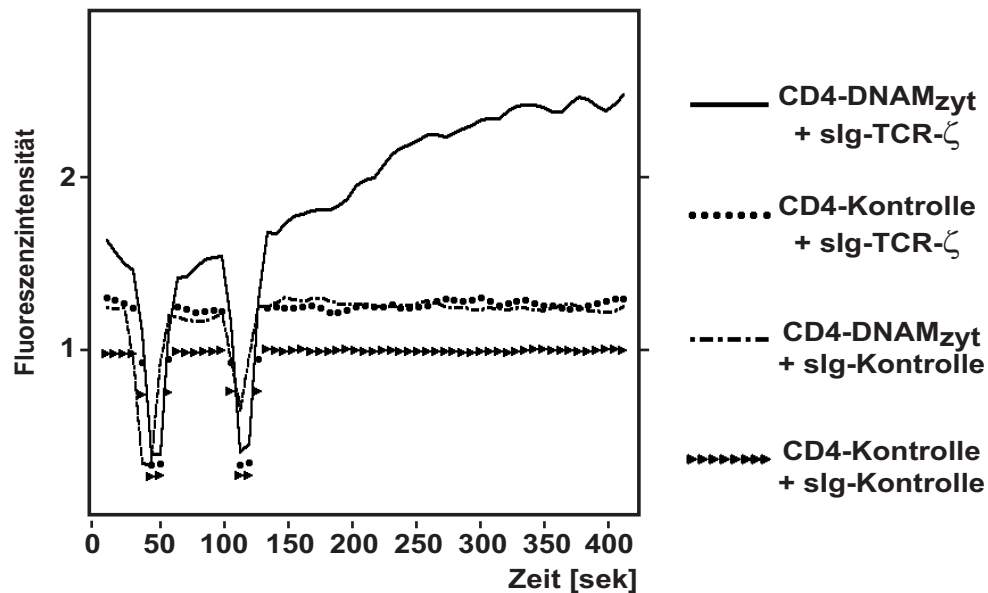


Abbildung 4.18: **Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation des DNAM-1-Rezeptors ist abhängig von der Oberflächenexpression des TCRs.** Die Expression und Quervernetzung des chimären DNAM-1-Proteins in TCR-negativen Zellen führte zu keinem meßbaren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch Rekonstitution der Zellen mit der sIg-TCR- $\zeta$  Kette war es nach Aggregation des CD4-DNAM-Fusionsproteins möglich, ein signifikantes Calciumsignal zu induzieren. Die Quervernetzung des invarianten CD4-Anteils erfolgte wie bereits unter Abbildung 4.17 beschrieben.

#### 4.4 Mutationsanalyse des zytoplasmatischen Anteils der CD18-Kette

Aus dem Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Domänen verschiedener Integrin  $\beta$ -Untereinheiten wie der  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\beta 3$ - sowie der  $\beta 7$ -Kette geht hervor, daß diese über weite Sequenzbereiche homolog sind (Abbildung 4.19). Auffällig sind jedoch gravierende Unterschiede zwischen der Integrin  $\beta 2$ -Kette und der Integrin  $\beta 1$ -,  $\beta 3$ - sowie der  $\beta 7$ -Untereinheit bezüglich zweier tandemartig angeordneter Sequenzabschnitte in der carboxyterminalen Hälfte der zytoplasmatischen Domäne. In der Sequenz des zytoplasmatischen Anteils der LFA-1  $\beta 2$ -Kette finden sich zwei aufeinanderfolgende NPXF-Sequenzabschnitte. Dagegen zeigt der Vergleich anderer Integrin  $\beta$ -Untereinheiten, daß die hierzu homologen Regionen

mindestens ein NPXY-Motiv ( $\beta$ 7-Kette) bzw. NIXY-Motiv ( $\beta$ 3-Kette) oder sogar zwei dieser, jeweils einen Tyrosinrest enthaltenden Motive ( $\beta$ 1-Kette) aufweisen.

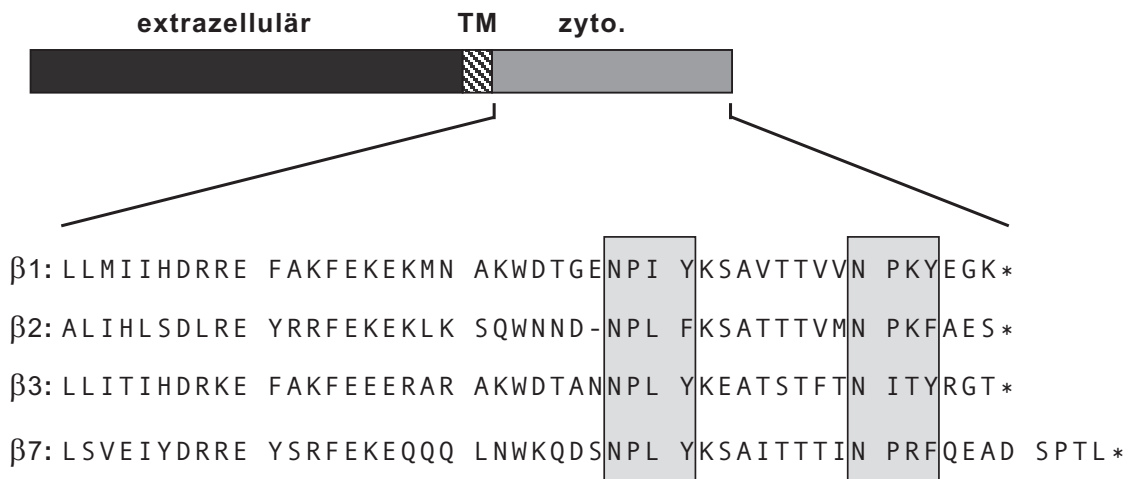


Abbildung 4.19: **Schematische Anordnung der Sequenzabfolge von zytoplasmatischen Regionen verschiedener Integrin  $\beta$ -Untereinheiten.** Die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- sowie der  $\beta$ 7-Kette zeigt neben weiten Bereichen mit hoher Ähnlichkeit auch Unterschiede innerhalb zweier tandemartig angeordneter Sequenzabschnitte. Die in dieser Region lokalisierten Aminosäurereste sind hervorgehoben.

Demnach könnten diese auffälligen Sequenzabweichungen die unterschiedlichen Signalkapazitäten der verschiedenen Subfamilien verursachen. Die im Folgenden dargestellten Experimente wurden durchgeführt um zu ermitteln, welcher Sequenzbereich für die Signalvermittlungskapazität der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ 2- (CD18-) Untereinheit erforderlich ist.

#### 4.4.1 Analyse carboxyterminaler Deletionsmutanten der CD18-Untereinheit

Inwiefern im Carboxyterminus lokalisierte Aminosäuren die Signalvermittlungskapazität der CD18-Kette beeinflussen, sollte mit Hilfe diverser carboxyterminaler Deletionsmutanten der CD18-zytoplasmatischen Domäne ermittelt werden. Wie in Abbildung 4.20 schematisch dargestellt, wurden zwei verschiedene Deletionsmutanten generiert, wobei der als CD18-762\*

bezeichneten Variante der CD18-Untereinheit im Vergleich zur CD18-Wildtypform die sieben carboxyterminalen Aminosäuren fehlen. Dieser Bereich enthält die Region um das membrandistale NPXF-Motiv der CD18-Kette. Bei einer weiteren, als CD18-747\* bezeichneten Version der CD18-Untereinheit fehlt ein sich anschließender Bereich von 15 Aminosäuren, der zusätzlich das mehr zum Aminoterminus hin befindliche NPXF-Motiv beinhaltet.

**CD18-zyt:** ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNNDN PLFKSATTTV MNPKFAES\*  
**CD18-762\*:** ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNNDN PLFKSATTTV M\*  
**CD18-747\*:** ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQW\*

Abbildung 4.20: **Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz carboxyterminaler Deletionsmutanten der CD18-Untereinheit.** Zur Ermittlung, welcher Bereich der zytoplasmatischen Region der CD18-Kette in Signalweiterleitungsprozesse involviert ist, wurden verschiedene carboxyterminale Deletionsmutanten generiert. Die Position der letzten Aminosäure vor dem Stoppcodon ist jeweils angegeben.

Zur funktionellen Analyse der Deletionsmutanten wurden diese in T-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren überexprimiert. In Jurkat T-Zellen zeigten die sIg-Fusionsproteine beider CD18-Versionen sowohl im Vergleich mit der sIg-CD18-Wildtypform als auch der sIg-Kontrolle ähnliche Expressionsdichten, wie aus dem oberen Teil der Abbildung 4.21 zu entnehmen ist. Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Quervernetzung der sIg-CD18 Varianten ergab, daß bereits die Deletion der sieben carboxyterminalen Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne von CD18 zu einem vollständigen Verlust des Calciumsignals führte (Abbildung 4.21, unterer Teil). Die Deletion weiterer Aminosäuren hatte keinen Einfluß auf dieses Ergebnis, was die Notwendigkeit dieser carboxyterminalen Region für einen einwandfreien Verlauf der CD18-Signaltransduktion dokumentiert.

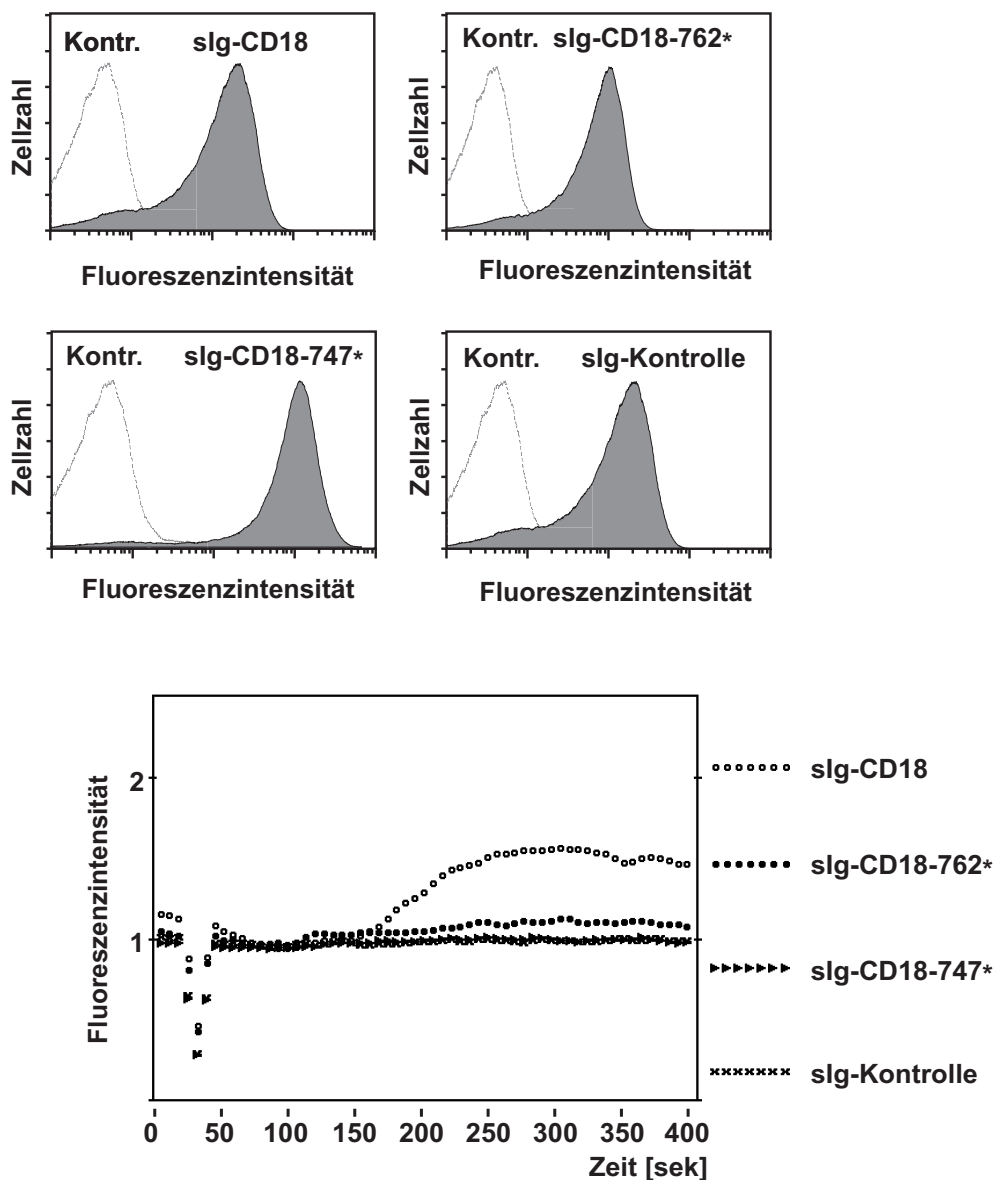


Abbildung 4.21: **Analyse der Signalfunktion der carboxyterminalen CD18-Deletionsmutanten in T-Zellen.** Unter Verwendung rekombinanter Vaccinia-Viren wurden sIg-Fusionsproteine carboxyterminaler CD18-Deletionsmutanten in Jurkat T-Zellen exprimiert. Wie die durchflußzytometrische Analyse zeigt, wurden die Fusionsproteine der CD18-Wildtypform und der beiden mutierten Versionen mit einer vergleichbaren Oberflächendichte exprimiert (oberer Teil der Abbildung). Aus der Analyse der Kapazität der verschiedenen CD18-Varianten, einen Anstieg der intrazellulären der Calciumkonzentration zu erzeugen, ging hervor, daß bereits durch eine Deletion von sieben carboxyterminalen Aminosäureresten das CD18-vermittelte Calciumsignal unterbunden wurde (unterer Teil der Abbildung).

#### 4.4.2 Einfluß des membrandistalen NPXF-Motivs auf die CD18-Signalfunktion

Der fehlende Bereich innerhalb der CD18-762\*-Deletionsmutante beinhaltet unter anderem das membrandistale NPXF-Motiv der zytoplasmatischen Domäne von CD18. Es lag daher nahe, hier die Aminosäure Phenylalanin mittels gerichteter Mutagenese durch ein Tyrosin zu substituieren (CD18-F766Y) und so diese Region in Übereinstimmung mit den zytoplasmatischen Sequenzen anderer Integrin  $\beta$ -Untereinheiten wie z.B. der  $\beta$ 1-Kette, CD29, zu bringen. Zusätzlich wurde auf analoge Weise eine Substitutionsmutante generiert, deren Sequenz anstelle des Phenylalanins an Position 766 einen Alaninrest aufweist (CD18-F766A, Abbildung 4.22).

↓

CD18-zyt:   ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNNDN PLFKSATTTV MNPKFAES\*

CD18-F766Y: ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNNDN PLFKSATTTV MNPKYAES\*

CD18-F766A: ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNNDN PLFKSATTTV MNPKAAES\*

Abbildung 4.22: **Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von Punktmutanten der CD18-Untereinheit.** Zur detaillierten Analyse der Bedeutung zytoplasmatischer Bereiche der CD18-Untereinheit für deren Signalkapazität, wurde hier das membrandistale NPXF-Motiv mutiert. Die Position des entweder durch Tyrosin oder Alanin substituierten Phenylalaninrestes in Position 766 ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Für eine funktionelle Analyse der beiden CD18-Substitutionsmutanten wurden diese als sIg-Fusionsproteine in Jurkat T-Zellen exprimiert und nach Quervernetzung ihre Kapazität zur Induktion eines zytoplasmatischen Calciumanstiegs ermittelt. Hinsichtlich der Oberflächenexpressionsdichte beider CD18-Substitutionsmutanten unterschieden sich diese weder von der CD18-Wildtypform noch von der sIg-Kontrolle, wie im oberen Teil der Abbildung 4.23 gezeigt ist. Dagegen ergaben Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration, daß nach Stimulation der CD18-F766Y-Substitutionsmutante ein bereits deutlich reduziertes Signal auftrat verglichen mit der CD18-Untereinheit in seiner Wildtypsequenz. Nach Quervernetzung der CD18-F766A-Mutante war überhaupt kein Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration mehr meßbar (Abbildung 4.23).



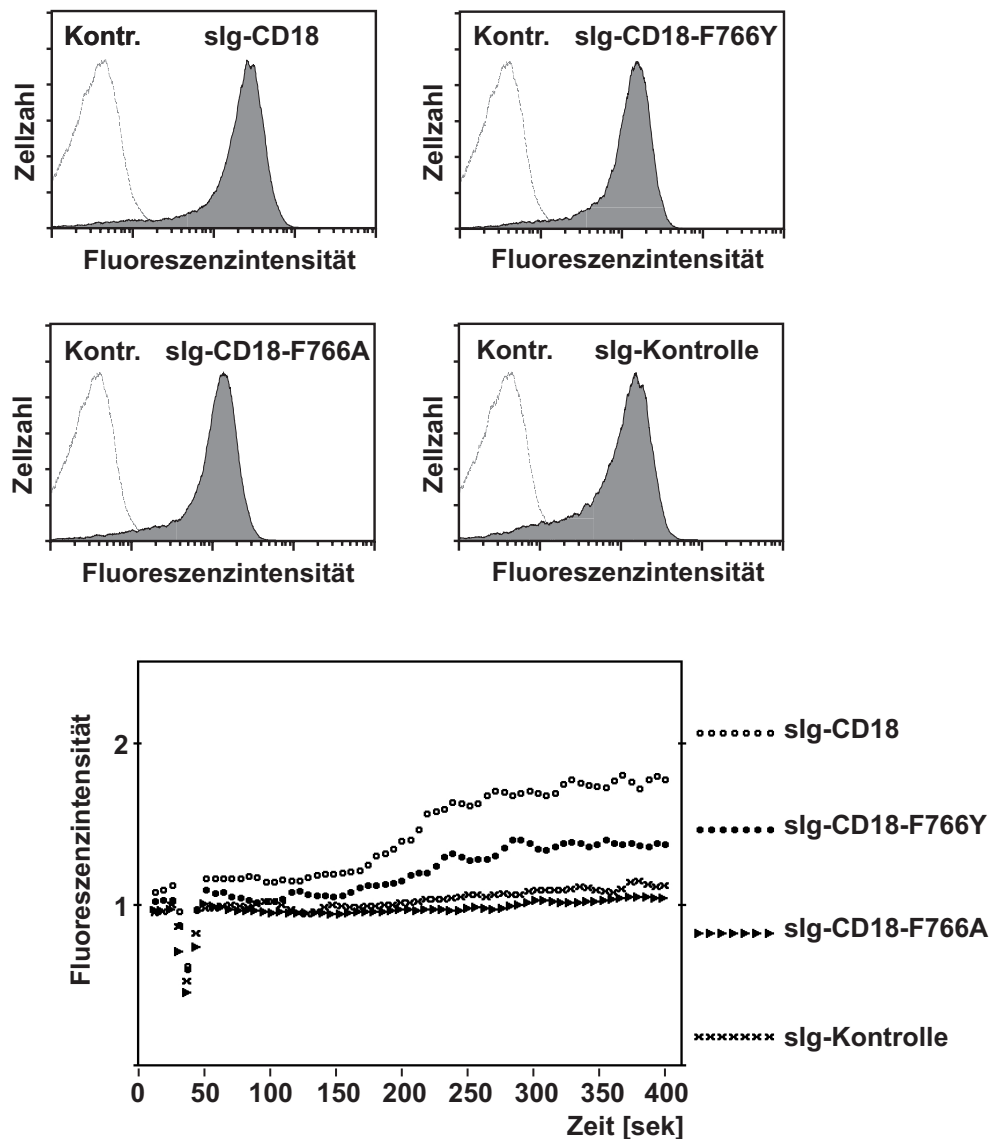


Abbildung 4.23: **Ermittlung der Signalfunktion von CD18-Substitutionsmutanten in T-Zellen.** Die Expression der sIg-Fusionsproteine in Jurkat T-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren zeigte, daß bezüglich der Oberflächendichte der Proteine keine Unterschiede festzustellen waren (oberer Teil der Abbildung). Die Substitution des Phenylalaninrestes 766 im membrandistalen NPXF-Motiv durch Tyrosin (sIg-CD18-F766Y) führte zu einer drastischen Reduktion des CD18-Calciumsignals. Dieses konnte durch den Austausch desselben Phenylalaninrestes durch Alanin vollständig unterbunden werden (unterer Teil der Abbildung).

Auf diese Weise wurde demonstriert, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CD18 zum Verlust wichtiger Parameter der T-Zell-Aktivierung führt. Für die Signalvermittlungskapazität der CD18-Kette ist das

Vorhandensein einer intakten Sequenz im Bereich des membrandistalen NPXF-Motivs unbedingt erforderlich.

#### 4.5 Mutation des membrandistalen NPXY-Motivs der CD29-Kette

Wie in Abschnitt 4.4 demonstriert werden konnte, ist die Sequenz im Bereich des carboxy-terminalen NPXF-Motivs notwendig für einen einwandfreien Ablauf der CD18-Signaltransduktion. Dieses Sequenzmotiv könnte entweder für Interaktionen mit zellulären Faktoren der T-Zell-Signaltransduktionskaskade oder für die Induktion einer aktiven Konformation des Moleküls benötigt werden. Innerhalb dieser Region gibt es zwischen CD18 und CD29 essentielle Unterschiede, wie ebenfalls bereits in Kapitel 4.4 erwähnt wurde.

↓

```

CD18-zyt:    ...ALIHLSD LREYRRFEKE KLKSQWNN-D NPLFKSATTT VMNPKFAES*
CD29-zyt:    ...LLMIIHD RREFAKFEKE KMNAKWDTGE NPIYKSAVTT VVNPKYEGK*
CD29-Y795F: ...LLMIIHD RREFAKFEKE KMNAKWDTGE NPIYKSAVTT VVNPKFEGK*
CD29-zyt/ex: ...LLMIIHD RREFAKFEKE KMNAKWDTGE NPIYKSAVTT VMNPKFAES*

```

Abbildung 4.24: **Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen der CD18-Untereinheit, der CD29-Untereinheit sowie der CD29-Substitutionsmutanten.** Zur Analyse der Bedeutung des membrandistalen NPXY/F-Motivs für die funktionellen Unterschiede von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen, wurde der entsprechende, in den Sequenzen beider Integrinfamilien variierende, Tyrosinrest in Position 795 der CD29-Untereinheit durch Phenylalanin substituiert. Dies erfolgte zum einen durch den Austausch des entsprechenden Tyrosinrestes oder durch Substitution eines carboxyterminalen Bereichs von insgesamt 8 Aminosäureresten. Durch den Pfeil wird die Position des entsprechenden Phenylalaninrestes in der CD18-Sequenz markiert.

Inwiefern Sequenzunterschiede der beiden zytoplasmatischen Domänen für die funktionelle Divergenz von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen verantwortlich sind, sollte im Folgenden mittels CD29-Substitutionsmutanten analysiert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze

gewählt. Zum einen wurde im membrandistalen NPXY-Motiv von CD29 der Tyrosinrest an Position 795 durch ein Phenylalanin substituiert, entsprechend der Region innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CD18. Zum anderen wurde durch Substitution einer ganzen Gruppe von Aminosäuren innerhalb der CD29-Sequenz durch die analogen Aminosäurereste der CD18-Sequenz ein homologer Bereich erzeugt. Dieser beinhaltet neben dem carboxy-terminalen NPXF-Motiv noch weitere Aminosäurereste der CD18-Sequenz (Abbildung 4.24). Die resultierenden CD29-Mutanten, CD29-Y795F sowie CD29-cyt/ex, wurden in Form chimärer sIg-Proteine in Jurkat T-Zellen exprimiert (Abbildung 4.25, oberer Teil; Expression der CD29-cyt/ex-Mutante nicht abgebildet) und eine potentielle Beteiligung an costimulatorischen Signaltransduktionsprozessen analysiert. Die Bestimmung des intrazellulären Calciumspiegels wurde auch hier als Parameter zur Untersuchung dieser Prozesse herangezogen. Die Quervernetzung der CD29-Y795F-Mutante resultierte in der Tat in einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, wie aus dem unteren Teil der Abbildung 4.25 zu entnehmen ist. Verglichen mit dem durch CD18-ausgelösten Calcium-Einstrom setzte allerdings das Calciumsignal nach Quervernetzung der CD29-Punktmutante zeitlich verzögert ein und erreichte lediglich eine deutlich niedrigere Amplitude. Demgegenüber führte die Quervernetzung der CD29-cyt/ex-Substitutionsmutante zu keinem meßbaren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und unterschied sich in diesem funktionellen Aspekt nicht von der CD29-Wildtypform (nicht gezeigt).

Diesen Experimenten zufolge ist das membrandistale NPXF-Motiv nicht nur für die CD18-Signalvermittlungskapazität von außerordentlicher Bedeutung, sondern auch maßgeblich an der Entfaltung spezifischer Aufgaben der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine beteiligt. Die Spezifität geht jedoch vermutlich nicht nur von dem Tyrosin bzw. dem Phenylalanin innerhalb des NPXY/F-Motivs aus, vielmehr spielt hierbei vermutlich auch die Umgebung dieses Sequenzabschnitts eine essentielle Rolle.

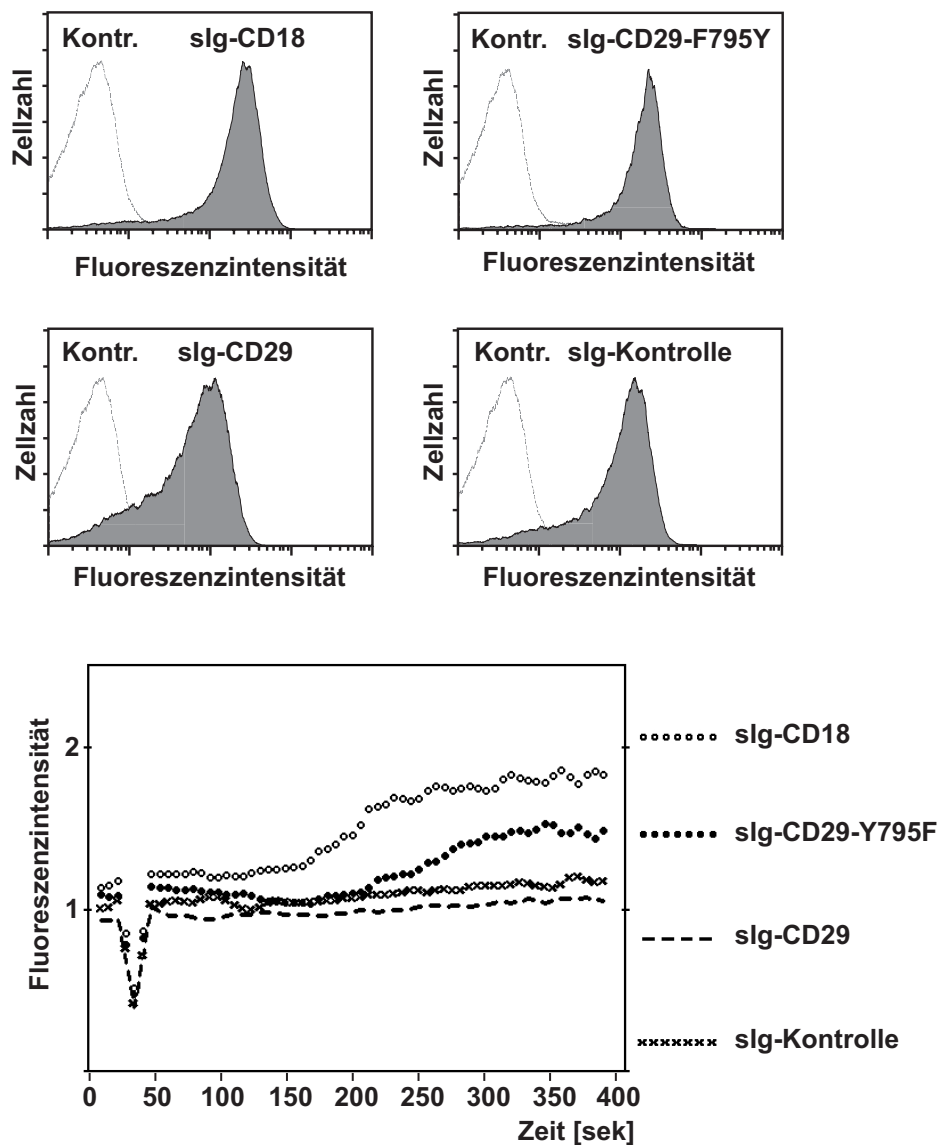


Abbildung 4.25: **Funktionelle Analyse der CD29-Substitutionsmutante.** Die Oberflächenexpressionen der Fusionsproteine der beiden CD29-Varianten, der CD18-Untereinheit sowie der Kontrolle waren nach Transfektion von Jurkat T-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren vergleichbar (oberer Teil der Abbildung). Demgegenüber zeigten Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration nach Quervernetzung des jeweiligen Fusionsproteins, daß die Stimulation der CD29-Substitutionsmutante (sIg-CD29-Y795F) im Gegensatz zur CD29-Wildtypform in einem deutlich detektierbaren Calciumsignal resultierte (unterer Teil der Abbildung).

## 4.6 Analyse der CD18-Punktmutanten im Kontext des LFA-1-Moleküls

In den vorherigen Abschnitten wurde mit Hilfe chimärer Fusionsproteine die spezifische Beteiligung der zytoplasmatischen Domänen beider LFA-1-Untereinheiten an Signaltransduktionsprozessen im Verlauf der T-Zell-Aktivierung analysiert. Der membrandistalen NPXF-Region der CD18-Untereinheit konnte mittels Punktmutanten hierbei eine essentielle Rolle zugeordnet werden. Inwiefern diese Mutationen sich auf die unterschiedliche Funktionen des LFA-1-Gesamtmoleküls auswirken können, nämlich sowohl auf dessen Adhäsionsfunktion als auch auf dessen Signaltransduktionsfunktion, wurde im Folgenden experimentell ermittelt.

Die Untersuchung der CD18-Mutanten im Kontext des gesamten LFA-1-Moleküls erfordert ein experimentelles Zellsystem, welches defizient für die Expression der CD18-Untereinheit ist. In diesen Zellen könnte dann entweder durch transiente oder stabile Expression verschiedener CD18-Varianten analysiert werden, inwieweit die Expression der Punktmutanten, verglichen mit der Wildtypform, die separaten Funktionen des LFA-1-Integrins rekonstituieren können. Die Verwendung von sogenannten SK- $\beta$ 2.7 Zellen, die aufgrund von Mutagenese und Selektionskriterien keine CD18-Untereinheit exprimieren, erwies sich hierbei als die Methode der Wahl (Weber *et al.*, 1997). Diese Zellen weisen kein LFA-1-Integrin auf der Oberfläche auf, da die Assoziation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit eine essentielle Voraussetzung für die endgültige Prozessierung der beiden Ketten zum Integrin-Heterodimer ist. Ein Transport der beiden Untereinheiten an die Zelloberfläche erfolgt jedoch nur in Form eines Heterodimers.

Während die Analyse des gesamten Integrins im Hinblick auf die Zelladhäsion mit Hilfe von CD18-defizienten SK- $\beta$ 2.7 Zellen sowie rekombinant exprimierten Liganden wie z.B. ICAM-1 relativ unkompliziert erfolgen kann, gestalten sich die Möglichkeiten zur Untersuchung der Signalfunktion des Gesamtmoleküls weitaus schwieriger. Eine Analyse der Signaltransduktion des gesamten LFA-1-Moleküls in analoger Weise erscheint in SK- $\beta$ 2.7 Zellen nicht sinnvoll, da diese CD18-defiziente Zelllinie keine nachweisbaren Mengen des TCR-Komplexes exprimiert (Geiger *et al.*, 2000). Die Expression einer intakten TCR- $\zeta$ -Kette ist jedoch für eine Signalinduktion durch CD18 unbedingt erforderlich, wie bereits in den Abschnitten 4.3.2 sowie 4.3.3 demonstriert werden konnte.

Neben der Rekonstitution der CD18-Untereinheit in entsprechend defizienten Zellen, bietet die Analyse dominant-negativer Effekte nach Überexpression der isolierten zytoplasmatischen Domänen von LFA-1 eine sinnvolle Möglichkeit zur Bestimmung einer

Signalfunktion des Gesamtmoleküls. Diese Effekte basieren vermutlich auf der Sequestrierung zytoplasmatischer Faktoren, welche an der CD18-vermittelten Signalweiterleitung beteiligt sind.

Eine Untersuchung des Beitrags des LFA-1-Integrins im Verlauf der Zytolyse erwies sich hierfür als geeignetes System, da bei diesem Prozeß neben Adhäsionsvorgängen auch Signaltransduktionsereignisse eine grundlegende Rolle spielen könnten.

#### **4.6.1 Rekonstitution der Adhäsivität CD18-defizienter SK- $\beta$ 2.7 Zellen**

Inwieweit Mutationen innerhalb membrandistalen NPXF-Motivs der CD18-Untereinheit die vom gesamten LFA-1-vermittelte Zelladhäsion beeinflussen, wurde mit Hilfe der CD18-defizienter SK- $\beta$ 2.7 Zelllinie analysiert. Hierfür wurden sogenannte Zelladhäsionsexperimente (*adhesion assay*) durchgeführt, wobei ein rekombinantes ICAM-1-Fusionsprotein über einen carboxyterminalen IgG-Anteil mittels eines entsprechenden Antiserums auf einer Plastikoberfläche immobilisiert werden kann (siehe Abschnitt 4.1). Wie in Abbildung 4.26 schematisch dargestellt, wird auf diese Weise eine spezifische Matrix erzeugt, die ausschließlich eine Adhäsion von Zellen erlaubt, welche an ihrer Oberfläche sowohl intakte als auch aktivierbare LFA-1-Moleküle exprimieren. Nach Entfernen unspezifisch gebundener Zellen durch mehrere Waschzyklen, kann direkt über die Anzahl der mit hoher Affinität gebundenen Zellen auf die spezifisch LFA-1-vermittelte Adhäsionsfähigkeit dieser Zellen geschlossen werden.

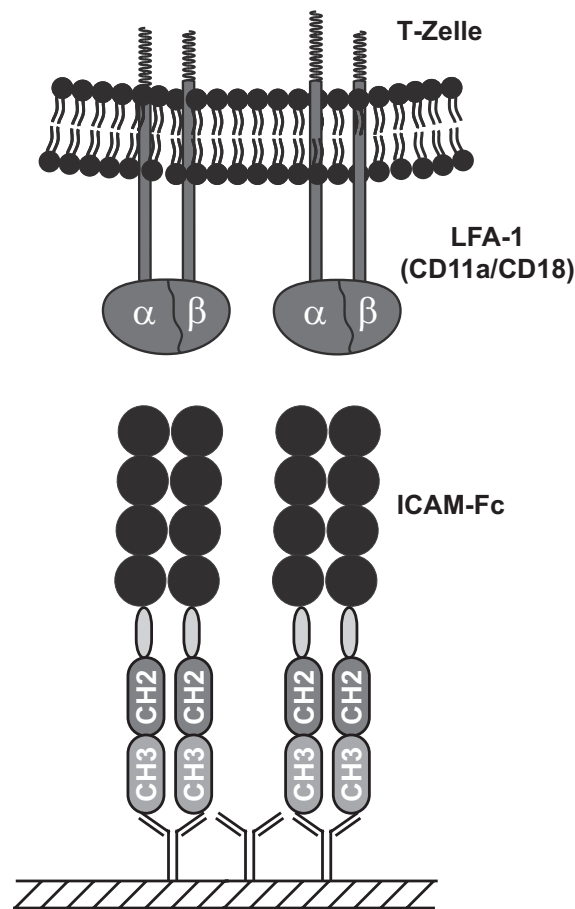


Abbildung 4.26: **Schematische Darstellung des Zelladhäsionsexperiments.** Ein rekombinant exprimiertes Fusionsprotein des Integrin-Liganden ICAM-Fc wird mittels des carboxyterminalen Immunglobulinanteils auf Plastik immobilisiert. Ausschließlich Zellen, die eine aktivierte Form des LFA-1-Integrins exprimieren, sind in der Lage, spezifisch auf dieser Matrix zu adhären.

Die Oberflächenexpression des LFA-1-Integrins in CD18-defizienten SK- $\beta$ 2.7 Zellen ist nach Re-Expression der CD18-Untereinheit rekonstituierbar. Demnach ist es mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes möglich, den Einfluß der verschiedenen CD18-Varianten, deren individueller Beitrag zu Signaltransduktionsprozessen bereits in Abschnitt 4.4.2 beschrieben wurde, im Hinblick auf die Adhäsivität des gesamten LFA-1-Moleküls zu untersuchen. In Abbildung 4.27 ist ein solches Zelladhäsionsexperiment exemplarisch dargestellt. Mit Hilfe von rekombinanten Vaccinia-Viren wurden verschiedene Versionen der gesamten CD18-Untereinheit in SK- $\beta$ 2.7 Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils im unstimulierten bzw. im PMA-stimulierten Zustand bezüglich ihrer Fähigkeit, auf einer mit

ICAM-beschichteten Matrix zu adhären, untersucht. Wie im oberen Teil der Abbildung 4.27 gezeigt, reichte die Re-Expression der CD18-Kette aus, um die Oberflächenexpression beider LFA-1-Untereinheiten zu rekonstituieren. Aus dem unteren Teil der Abbildung 4.27 geht hervor, daß SK- $\beta$ 2.7 Zellen ohne Rekonstitution der CD18-Untereinheit nach PMA-Stimulation nur marginal auf der mit ICAM-beschichteten Unterlage adhären konnten. Dagegen zeigten SK- $\beta$ 2.7 Zellen, welche die Wildtypform der CD18-Untereinheit exprimierten, eine starke Zunahme in ihrer Adhäsionsfähigkeit nach PMA-Stimulation. Demgegenüber reichte weder die Expression der CD18-F766Y- noch der CD18-F766A-Version der  $\beta$ 2-Untereinheit aus, um die Adhäsivität der SK- $\beta$ 2.7 Zellen wiederherzustellen, obgleich sich deren Oberflächenexpressionsdichte nicht von derjenigen der CD18-Wildtypform unterschied. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine CD18-Variante verwendet, die eine Tripple-Mutation innerhalb der zytoplasmatischen CD18-Sequenz aufweist, welche weiter zum Aminoterminus hin gelegen ist als der bisher untersuchte Region. Bei dieser, als CD18-TRG bezeichneten Variante, sind in der zytoplasmatischen Domäne der CD18-Kette in den Positionen 723 bis 725 insgesamt drei Aminosäurereste, nämlich Tryptophan, Lysin und Alanin, durch Threonin, Arginin sowie Glycin substituiert. Dieser Bereich innerhalb der CD18-Untereinheit konnte in einem anderen Kontext als die Bindungsregion eines als Cytohesin-1 bezeichneten Interaktionspartners der CD18-Kette identifiziert werden (Geiger *et al.*, 2000).

Wie in diesem Zusammenhang bereits publiziert und ebenfalls in Abbildung 4.27 gezeigt, reichte die Expression dieser Mutante ebenfalls nicht aus, um die SK- $\beta$ 2.7 Zellen spezifisch auf ICAM adhären zu lassen. Bemerkenswerterweise zeigen diese Resultate, daß die Expression keiner der bislang analysierten, von der Wildtypform abweichenden CD18-Varianten zur Rekonstitution der Adhäsivität der SK- $\beta$ 2.7 Zellen führt. Neben des Verlusts der vom gesamten LFA-1-Molekül vermittelten Adhäsionsfunktion, führen sowohl die CD18-F766Y- als auch die CD18-F766A-Versionen dabei auch zur Inhibition der CD18-Signaltransduktion (siehe Abschnitt 4.4.2). Durch diese Mutationen der CD18-Untereinheit könnte entweder der Übergang des gesamten LFA-1-Integrins in den aktiven Zustand verhindert werden oder die intrazelluläre Signalweiterleitung beeinträchtigt sein.



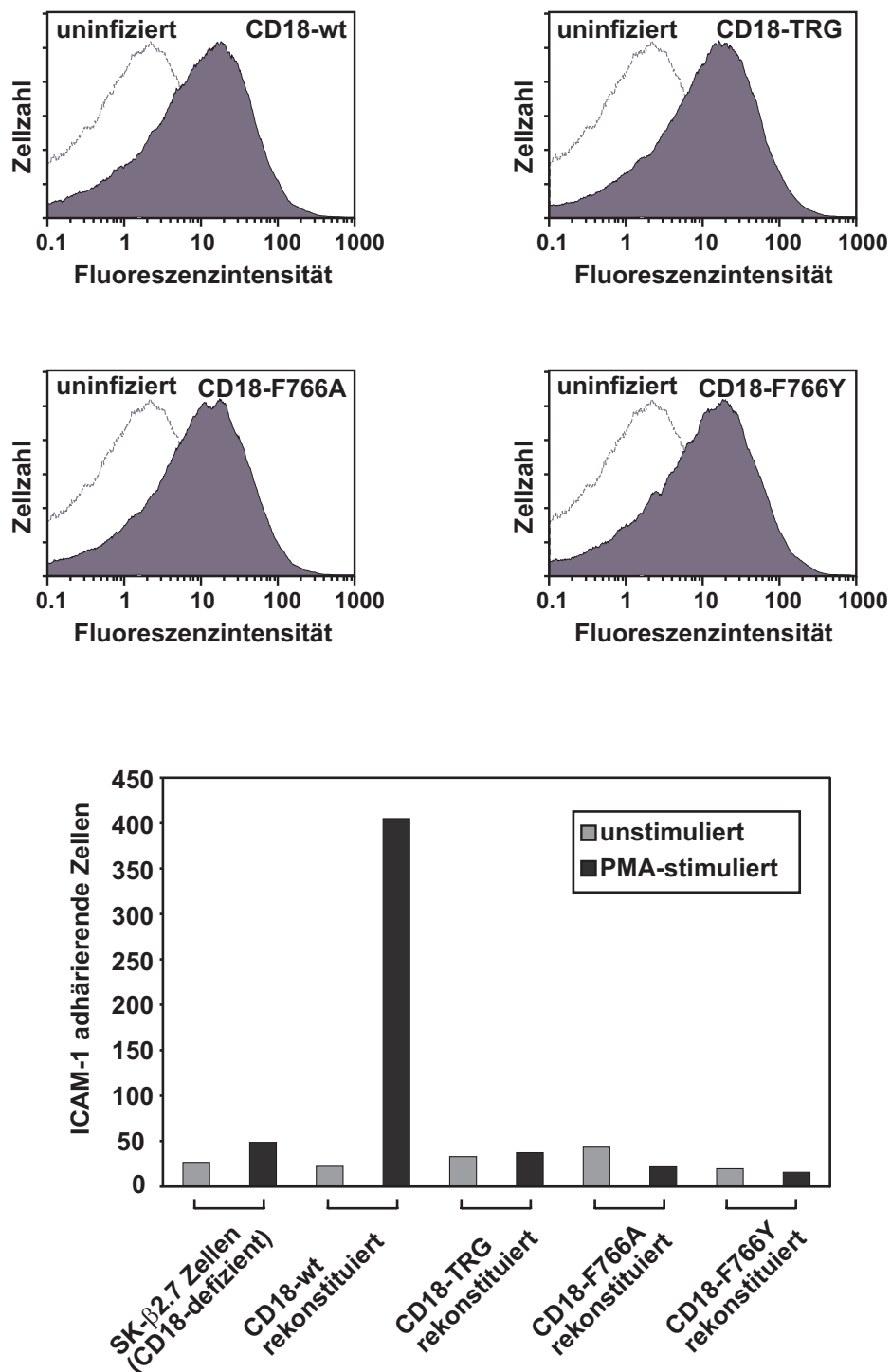


Abbildung 4.27: Ermittlung des Beitrags der verschiedenen CD18-Varianten zur Adhäsionsfunktion von LFA-1 in SK-β2.7 Zellen. Nach Rekonstitution CD18-defizienter Zellen mit verschiedenen CD18-Varianten konnten diese mit einer vergleichbaren Expressionsdichten auf der Zelloberfläche detektiert werden (oberer Teil der Abbildung). In welchem Ausmaß die verschiedenen Varianten der CD18-Untereinheit nach Stimulation der Zellen mit PMA den Übergang von LFA-1 in den aktivierten Zustand beeinflussen, wurde anhand von Adhäsionsexperimenten auf einer mit ICAM-beschichteten Matrix gezeigt (unterer Teil der Abbildung).

#### 4.6.2 Beitrag des zytoplasmatischen CD18-Anteils zur Zytolyse

Eine Analyse des spezifischen Beitrags der CD18-Untereinheit zur Signaltransduktionsfunktion des gesamten LFA-1-Moleküls durch einfache Quervernetzung des Integrins mittels löslichem Liganden bzw. Antikörpern ist aufgrund eines fehlenden CD18-defizienten Zellsystems nicht möglich. Es lag daher nahe, durch Überexpression von verschiedenen Varianten der zytoplasmatischen CD18-Domänen eine Sequestrierung zellulärer Faktoren zu erreichen, welche an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Allerdings könnten sich diese intrazellulären Wechselwirkungen zusätzlich auch auf die Adhäsivität des gesamten LFA-1-Integrins auswirken, was die für dessen Funktion notwendigen Zell-Zell-Interaktionen beeinträchtigt würde.

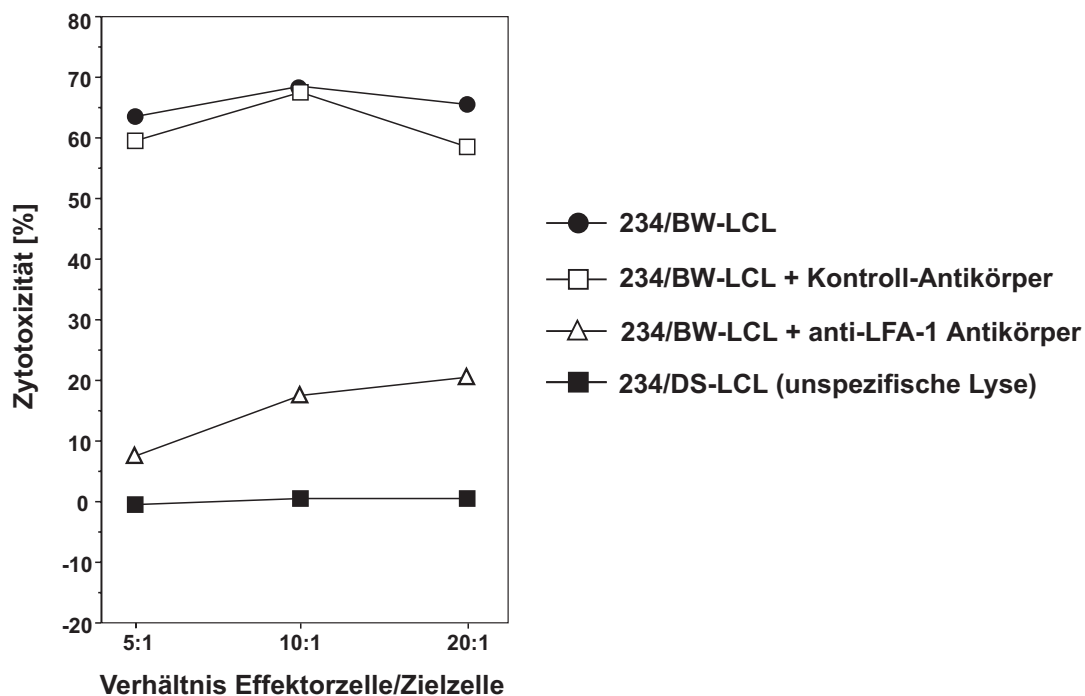


Abbildung 4.28: **Bedeutung des LFA-1-Integrins für die Haplotyp-spezifische Zytolyse von Zielzellen.** Die zytotoxische Aktivität des 234 T-Zellklons wurde durch den Einsatz gegen LFA-1-gerichteter Antikörper wie beispielsweise MEM-95 drastisch reduziert. Dagegen blieb die Haplotyp-spezifische Zytolyse der BW-LCL Zellen nach dem Einsatz eines unspezifischen Kontrollantikörpers weitgehend unbeeinflusst. Die Quantifizierung der zytolytischen Aktivität der Effektorzellen erfolgte durch Markierung der Zielzellen mit dem radioaktiven  $^{51}\text{Cr}$ -Isotop, welches nach Lyse der Zellen freigesetzt wird.

Wie bereits durch vorherige Arbeiten gezeigt werden konnte, ist die Zytolyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Untersuchung dominant-negativer Effekte ein geeignetes System (Romeo *et al.*, 1992; Kolanus *et al.*, 1993). Darüberhinaus konnte durch verschiedene Veröffentlichungen belegt werden, daß LFA-1 während der Zytolyse eine elementare Rolle spielt (Schmits *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 1999). Die Bedeutung des LFA-1-Integrins für die Allotyp-spezifische Zytolyse von Zielzellen in dem hier verwandten Zellsystem ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

In diesem sowie in den folgenden Experimenten wurde die zytolytische Aktivität des T-Zellklons 234 untersucht, welcher alloreaktiv gegen Zielzellen des Haplotyps HLA-A24 ist. Durch die Verwendung gegen die CD18-Untereinheit des LFA-1-Integrins gerichteter Antikörper, wie z.B. MEM-95, konnte die Effektorfunktion des 234 T-Zellklons spezifisch und auf signifikante Weise reduziert werden. Es erfolgte kaum noch die Lyse von BW-LCL Zellen, obgleich diese den korrekten Haplotyp HLA-A24 exprimieren. Die zytolytische Aktivität des T-Zellklons ging dabei nahezu auf den Bereich der unspezifischen Lyse zurück, was durch den Einsatz von DS-LCL Zielzellen, welche nicht den richtigen Haplotyp aufweisen, demonstriert werden konnte (Abbildung 4.28). Demgegenüber hatte die Verwendung eines Kontrollantikörpers nahezu keinen Einfluß auf die lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen, sofern die Zielzellen den korrekten Haplotyp exprimierten.

Diese Experimente belegen deutlich die Notwendigkeit der Interaktion von LFA-1 mit ICAM für einen ordnungsgemäßen Ablauf der Zytolyse. In welchem Ausmaß nun die zytoplasmatische Domäne von CD18 zu diesem Prozeß beiträgt, wurde durch den Einsatz der chimären sIg-Fusionsproteine bestimmt. Ein schematisches Modell zu dieser experimentellen Vorgehensweise ist in Abbildung 4.29 gezeigt.

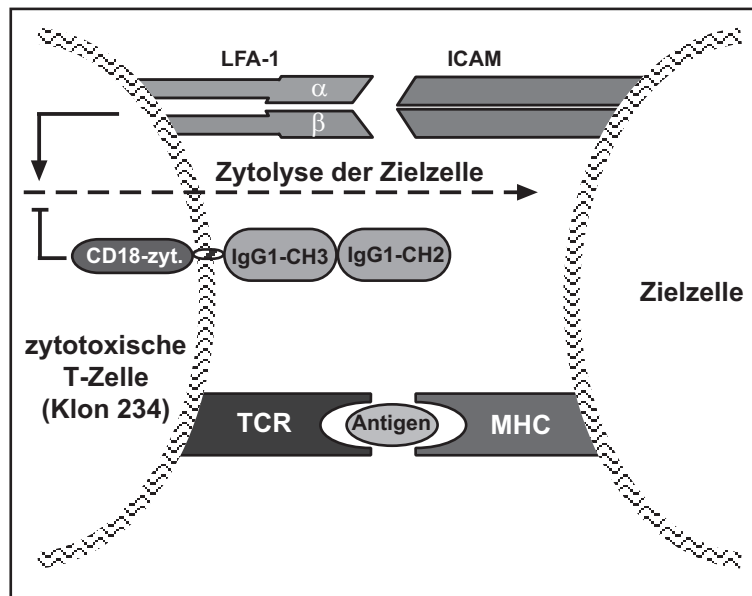


Abbildung 4.29: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Ermittlung des spezifischen Beitrags der zytoplasmatischen Domäne von CD18 zur Zytolyse. Durch die Überexpression des intrazellulären Anteils der CD18-Untereinheit als sIg-Fusionsprotein in den 234 Effektorzellen sollten an der Zytolyse von Zielzellen beteiligte zytoplasmatische CD18-Interaktoren sequestriert werden. Die Effekte auf die LFA-1-unterstützte zytolytische Aktivität dieser Zellen wurden analog der in Abbildung 4.28 beschriebenen Vorgehensweise quantifiziert.

Mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren wurden verschiedene Versionen der CD18-Untereinheit in den zytotoxischen 234 T-Zellen exprimiert. Anschließend wurden diese Zellen für die im Folgenden beschriebenen Zytolyse-Experimente eingesetzt, welche in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Falk im Labor von Frau Prof. Schendel an der GSF-München durchgeführt wurden. Hierfür wurden zytotoxische T-Zellen und Zielzellen gemischt, wobei zur Bestimmung des für einen optimalen Ablauf der Zytolyse notwendigen Zellverhältnisses unterschiedliche Ansätze mit steigender Effektorzellzahl durchgeführt wurden. Die Ermittlung der zytotoxischen Aktivität erfolgte anhand der freigesetzten Menge des radioaktiven Isotops  $^{51}\text{Cr}$ , mit welchem die Zielzellen vor Durchführung des Zytolyse-Experiments markiert worden waren. Aus dem oberen Teil der Abbildung 4.30 geht hervor, daß sich die chimären sIg-Fusionsproteine in den 234 T-Zellen mit einer vergleichbaren Oberflächendichte exprimieren ließen.

Wie aus dem unteren Teil der Abbildung 4.30 zu ersehen ist, führte allein die Überexpression der zytoplasmatischen Domäne der CD18-Wildtypform in den 234 T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der zytolytischen Aktivität dieser Zellen. Im Gegensatz dazu

beeinflusste die Expression der CD18-F766Y-Version nicht die Zytotoxizität des 234 T-Zellklons. Die Fähigkeit zur Lyse der entsprechenden Zielzellen wurde durch die Expression der slg-Kontrolle in den Effektorzellen ebenfalls nicht beeinträchtigt.

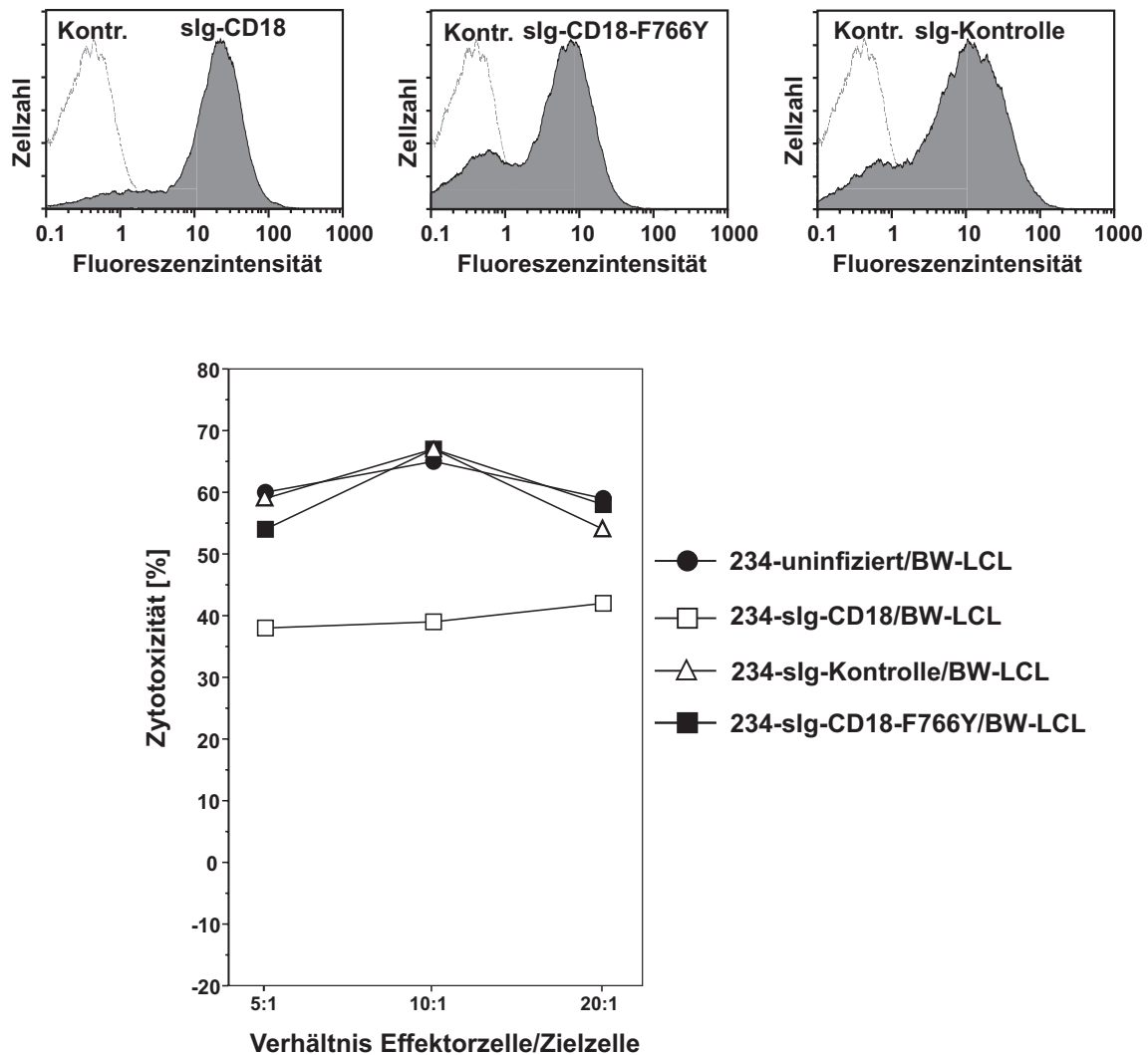


Abbildung 4.30: **Analyse des spezifischen Beitrags der intrazellulären Domäne von CD18 zur Zytolyse.** Unter Verwendung rekombinanter Vaccinia-Viren wurden verschiedene Varianten der CD18-Untereinheit in Form von slg-Fusionsproteinen in 234 T-Zellen überexprimiert. Wie im oberen Teil der Abbildung gezeigt, ergaben durchflußzytometrische Messungen für sämtliche verwandten slg-Proteine eine vergleichbare Oberflächenexpression. Aus dem im unteren Teil der Abbildung dargestellten Zytolyse-Experiment geht hervor, daß durch die Expression der Wildtypform des CD18-Fusionsproteins die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen gegenüber entsprechenden Zielzellen (BW-LCL Zellen) spezifisch reduziert werden kann. Die Quantifizierung der Effekte auf die LFA-1-unterstützte zytolytische Aktivität dieser Zellen erfolgte wie unter Abbildung 4.28 beschrieben.

Diese Befunde sprechen dafür, daß durch die Expression der zytoplasmatischen Domäne von CD18 intrazelluläre Faktoren sequestriert werden, die für den korrekten Ablauf der Zytolyse von grundlegender Bedeutung sind. Weiterhin zeigen diese Untersuchungen, daß die Integrität der carboxyterminalen NPXF-Region der CD18-Untereinheit für die Funktionalität des endogenen LFA-1-Integrins im Kontext eines dominant-negativen Effekts auf die Zytolyse essentiell ist. Dies deutet auf eine funktionell wichtige direkte oder indirekte Interaktion von zytoplasmatischen Faktoren mit dieser Region innerhalb der CD18-Untereinheit hin.

## 5 Diskussion

Wie bereits einleitend erwähnt, trägt das LFA-1-Integrin in seiner Funktion als wichtigster Adhäsionsrezeptor auf Lymphozyten durch Wechselwirkungen mit seinen physiologischen Liganden ICAM (intercellular adhesion molecule) -1, -2 und -3 zur Regulation von Zell-Zell-Interaktionen bei. Diese sind beispielsweise während der Extravasation oder bei der Bildung der immunologischen Synapse von außerordentlicher Bedeutung (vergleiche hierzu Abschnitt 2.3). Allerdings ist neben dem Beitrag von LFA-1 auch die Beteiligung weiterer akzessorischer Oberflächenmolekülen wie CD2, CD28 und des Corezeptors CD4 zur Verstärkung der Zell-Zell-Adhäsion um die T-Zellen vollständig und dauerhaft zu aktivieren. Solche Membranproteine unterstützen die spezifische Wechselwirkung des TCRs mit dem Antigen-präsentierenden MHC-Molekül, welche zu schwach ist und daher nicht ausreicht, um die vollständige Signaltransduktionskaskade einzuleiten. Darüberhinaus sind diese Membranproteine auch direkt an Signalübertragungsprozessen beteiligt, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Über den detaillierten Mechanismus der LFA-1-vermittelten Signaltransduktion ist bislang kaum etwas bekannt. Dies liegt vermutlich zum einen darin begründet, daß eine effiziente Ligandenbindung der Integrine nur in einer speziellen Konformation erfolgen kann. Die Überführung der Integrine in diesen aktiven Zustand durch Stimulation von T-Lymphozyten z.B. mit Phorbolster bzw. Antikörpern hat jedoch in der Regel die Induktion intrazellulärer Signale zur Folge, welche sich mit der spezifisch durch LFA-1-vermittelten Signalkaskade überlagern. Zum anderen weisen die Sequenzen der zytoplasmatischen Domänen des LFA-1-Integrins keine charakteristischen Motive auf, mit denen bekannte Signalmoleküle der T-Zell-Aktivierung interagieren. Weiterhin werden Untersuchungen zur Signaltransduktion des  $\beta$ 2-Integrins durch dessen dimere Struktur sowie durch den ausgeprägten Beitrag zur Zelladhäsion erschwert.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, bei der Lymphozyten-Aktivierung die von LFA-1-unterstützten Signaltransduktionsprozesse zu charakterisieren sowie daran beteiligte zelluläre Faktoren zu identifizieren. Desweiteren sollte die Signaltransduktion der  $\beta$ 2-Integrine zum einen mit der Rolle der  $\beta$ 1-Integrine bei der T-Zell-Aktivierung und zum anderen mit dem costimulatorischen Beitrag von CD28 verglichen werden.

## 5.1 LFA-1 als costimulatorisches Molekül der T-Zell-Aktivierung

Verschiedenen Untersuchungen zufolge leistet das LFA-1-Integrin während der Lymphozyten-Aktivierung neben der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen ebenfalls einen Beitrag zur Signaltransduktionsprozessen (Van Seventer *et al.*, 1992; Kanner *et al.*, 1993). Dementsprechend zeigten frühere Untersuchungen, daß die Quervernetzung von LFA-1 mit Hilfe bestimmter monoklonaler Antikörper bzw. gereinigtem ICAM-1 in T-Zellen zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt (Ledbetter *et al.*, 1987; Van Seventer *et al.*, 1992; Kanner *et al.*, 1993; Wulfing *et al.*, 1998). Auf diese Weise wurde z.B. durch Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$  (PLC  $\gamma$ ) ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration induziert. Desweiteren konnten verschiedene Studien eine Involvierung von Tyrosinkinasen der FAK- (focal adhesion kinase) Familie in diese Signalwege demonstrieren. Hierzu zählt z.B. die Kinase Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2), einem in hämatopoetischen Zellen exprimierten Vertreter dieser Familie, welche auch unter der Bezeichnung fakB (focal adhesion kinase-related protein B) bekannt ist (Kanner, 1996; Brockdorff *et al.*, 1998; Tabassam *et al.*, 1999).

Diese Studien veranlaßten uns, zu untersuchen, ob diese LFA-1-vermittelte Signaltransduktion eventuell hinreichend ist für eine signifikante transkriptionelle Aktivierung T-Zell-spezifischer Gene.

### 5.1.1 LFA-1 induziert nach ICAM-Bindung den IL-2-Promotor in T-Helfer-Zellen

Die transkriptionelle Induktion spezifischer Gene ist ein charakteristischer Vorgang während der Aktivierung von T-Zellen. Wie in Abschnitt 4.1 dargestellt, wurde mit Hilfe von Reportergen-Experimenten demonstriert, daß durch die Quervernetzung des LFA-1-Integrins mittels rekombinantem ICAM-1 die Transkription des T-Zell-spezifischen IL-2-Gens induziert werden konnte. Durch die konstitutive, unspezifische Anheftung der T-Zellen mittels Poly-L-Lysin war es möglich, die Zellen unabhängig von der ICAM-Bindung zur Adhäsion zu bringen. Aufgrund der Modulierbarkeit der nach ICAM-Bindung induzierten Aktivierung des IL-2-Promotors mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die sich sowohl gegen die Integrin  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Untereinheit richteten, konnte darüberhinaus die LFA-1-Abhängigkeit dieser Prozesse belegt werden.



Die bisher veröffentlichten Ergebnisse deuten auf eine Verstärkung des TCR-Signals durch Costimulation von T-Helfer-Zellen mit ICAM hin (Kanner *et al.*, 1993; Lub *et al.*, 1995; Wulfing *et al.*, 1998). Die hier vorliegenden Daten zeigen jedoch, daß ICAM-Bindung an LFA-1 bereits ohne die direkte Stimulation des TCRs Signaltransduktionsprozesse induzieren kann. Darüberhinaus reichen die durch ICAM-Bindung ausgelösten Signalwege zur transkriptionellen Induktion des IL-2-Gens aus. Der Einfluß der  $\beta$ 2-Integrine auf die zytotoxische Aktivität von T-Zellen wird im Folgenden Abschnitt ausführlich erläutert.

### 5.1.2 T-Zellen benötigen LFA-1 für ihre zytotoxische Aktivität

Die Bedeutung des LFA-1-Integrins für die Aktivität zytotoxischer T-Zellen konnte bereits durch die Ergebnisse sehr früher Veröffentlichungen gezeigt werden. Mittels monoklonaler Antikörper, welche sich gegen die LFA-1-Untereinheiten richteten, war es möglich, die Zytolyse spezifischer Zielzellen zu inhibieren (Krensky *et al.*, 1983; Krensky *et al.*, 1984; Mentzer *et al.*, 1986). Durch diese Ergebnisse wurde überhaupt erst die essentielle Bedeutung des LFA-1-Integrins für die Lymphozyten-Aktivierung erkannt (Springer *et al.*, 1987; Shaw und Luce, 1987; Kishimoto *et al.*, 1989).

Durch die Verwendung eines als 234 bezeichneten T-Zellklons, welcher alloreaktiv gegen Zielzellen des Haplotyps HLA-A24 ist, wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit ebenfalls Zytolyse-Experimente durchgeführt (Besser und Wank, 1999). Mit Hilfe des gegen die CD18-Untereinheit gerichteten MEM-95 Antikörpers war es möglich, die zytolytische Aktivität des 234 T-Zellklons zu inhibieren, wodurch auch hier die elementare Rolle des LFA-1-Integrins bei der Zytolyse demonstriert werden konnte (siehe Abschnitt 4.6.2). Wie in Abbildung 4.30 dargestellt ist, reichte die Überexpression der individuellen zytoplasmatischen Domänen der CD18-Untereinheit des LFA-1-Integrins als sIg-Fusionsprotein ebenfalls zur Inhibition der zytolytischen Aktivität des 234 T-Zellklons aus. Im Hinblick auf die methodische Vorgehensweise stehen diese Ergebnisse damit in Einklang mit Publikationen anderer Gruppen. Durch diese konnte nämlich belegt werden, daß durch die Überexpression isolierter zytoplasmatischer Integrin-Untereinheiten dominant-negative Effekte auf verschiedene Integrin Funktionen wie die Vermittlung von Zelladhäsion bzw. der Phosphorylierung intrazellulärer Proteine ausgeübt werden (Akiyama *et al.*, 1994; LaFlamme *et al.*, 1994; Lukashev *et al.*, 1994; Fenczik *et al.*, 1997; Rey-Ladino *et al.*, 1998). Eine

Interpretationsmöglichkeit des dominant-negativen Effektes auf die Zytolyse allein durch die Überexpression der zytoplasmatischen  $\beta$ 2-Domäne wäre die Sequestrierung zytoplasmatischer Faktoren. Zwar war es mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes möglich, dem zytoplasmatischen  $\beta$ 2-Anteil des LFA-1-Integrins eine essentielle Funktion bei der Zytolyse zuzuordnen. Allerdings konnte nicht unterschieden werden, ob Adhäsions- oder Signaltransduktionsprozesse hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

Wie bei der Interaktion von T-Helfer-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle, wirken Integrine auch während der Zytolyse bei der Verstärkung der relativ schwachen Wechselwirkungen mit und halten die Zellen somit länger in Kontakt. Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, daß für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten allein die von LFA-1-vermittelten Adhäsionsprozesse verantwortlich sind. Normalerweise beteiligen sich hierbei zusätzlich akzessorische Rezeptoren wie beispielsweise CD2 sowie CD28. Daher ist es naheliegender, daß Inhibitionen zytoplasmatischer Signalwege zur Antikörper-vermittelten Blockierung der Zytolyse sowie zu den dominant-negativen Effekten nach Überexpression des zytoplasmatischen  $\beta$ 2-Anteils führen.

## **5.2 Signaltransduktionskapazität der individuellen LFA-1-Untereinheiten**

Zur Analyse der LFA-1-Signalfunktion ist es einerseits wichtig, beide Untereinheiten isoliert voneinander zu untersuchen. Andererseits ist es aber auch vorteilhaft, die Signalkapazität der zytoplasmatischen Domänen der individuellen LFA-1-Untereinheiten getrennt von deren extrazellulären Anteilen zu analysieren, da diese durch Ligandenbindung in erster Linie für die Induktion von Adhäsionsprozessen verantwortlich sind (Hynes, 1992; Springer, 1994).

Durch die Expression der individuellen zytoplasmatischen Anteile der LFA-1-Untereinheiten in Form transmembraner Fusionsproteine wurden die Voraussetzungen für eine systematische Analyse der LFA-1-Signaltransduktionskapazität geschaffen. Die extrazelluläre Domäne dieser auch als sIg-Fusionsproteine bezeichneten chimären Proteine enthält einen konstanten aminoterminalen Immunglobulinanteil, wie aus der schematischen Darstellung in Abbildung 4.4 hervorgeht. Auf diese Weise wurde eine effiziente Oberflächenexpression der individuellen LFA-1-Untereinheiten unabhängig davon erreicht, daß in der nativen Form nur ein gemeinsamer Transport beider Ketten an die Zelloberfläche erfolgen kann. Zudem war es somit möglich, mit Hilfe eines gegen den invarianten Immunglobulinanteil gerichteten

Antikörpers die beiden LFA-1-Ketten unabhängig voneinander quervernetzen (siehe Abbildung 4.5). Diese Art der Stimulation der individuellen Integrin-Untereinheiten ist sehr effektiv, weil hiermit zur ausreichenden Ligandenbindung nicht die Induktion einer aktivierten Konformation erforderlich ist.

Bereits in früheren Studien sind systematische Untersuchungen von Signaltransduktionsprozessen unter Verwendung chimärer Fusionsproteine mit konstantem extrazellulären Anteil durchgeführt worden. Dadurch konnten komplexe Mechanismen, wie sie bei der Aktivierung von Lymphozyten auftreten, analysiert werden. Beispielsweise konnten mittels dieser Methodik wichtige Aspekte über die Involvierung der TCR- $\zeta$ -Kette in den Prozeß der Zytolyse sowie über die Funktion der Tyrosinkinasen Fyn, Syk und ZAP-70 während der Lymphozyten-Aktivierung beschrieben werden (Romeo *et al.*, 1992; Kolanus *et al.*, 1993; Reth und Wienands, 1997; Zeitlmann *et al.*, 1998). Um Rückschlüsse auf die Signalfunktion des LFA-1-Integrins ziehen zu können, lag es daher nahe, in analoger Weise die Signalkapazität der verschiedenen sIg-Fusionsproteine zu analysieren. Durch die Untersuchung charakteristischer Parameter der T-Zell-Aktivierung, wie z.B. des Anstiegs der zytoplasmatischen Calciumkonzentration oder der Induzierbarkeit T-Zell-spezifischer Gene, konnte demonstriert werden, daß von der CD18-Untereinheit tatsächlich ein essentieller Beitrag zu LFA-1-vermittelten Signaltransduktionsprozessen ausgeht (siehe hierfür Abschnitt 4.2).

### 5.2.1 Quervernetzung der CD18-Untereinheit induziert zellulären Calcium-Einstrom

Wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben, konnte durch den Einsatz der chimären Fusionsproteine im Verlauf dieser Arbeit für die CD18-Untereinheit tatsächlich eine Involvierung in Signaltransduktionsprozesse in Wildtyp Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden. Darüberhinaus war es auf diese Weise ebenfalls möglich, zu demonstrieren, daß hierfür weder die extrazellulären Domänen des Integrins noch die Überexpression der CD11a-Kette erforderlich waren.

Bereits veröffentlichte Studien dokumentieren zwar, daß in T-Zellen bzw. neutrophilen Granulozyten nach Antikörper-vermittelter Quervernetzung der CD18-Untereinheit ein Anstieg von intrazellulärem Calcium induziert werden konnte (Ledbetter *et al.*, 1987; Kanner *et al.*, 1993; Gautam *et al.*, 2000). Allerdings zeigen diese Analysen nicht, welche Region des Integrins hierfür verantwortlich ist. Aufgrund der hierbei ermittelten Aktivierung der PLC $\gamma$  1, welche eine essentielle Rolle bei der T-Zell-Aktivierung spielt, ergaben sich jedoch interes-

santerweise aus diesen Studien Hinweise auf einen Mechanismus (Kanner *et al.*, 1993; Kanner, 1996). Für eine Involvierung der PLC $\gamma$  in die CD18-vermittelte Calciummobilisierung sprechen nämlich auch Untersuchungen zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten, welche ebenfalls überwiegend Integrine der  $\beta$ 2-Subfamilie exprimieren. Vergleichbar wie in T-Zellen resultierte auch hier die Stimulation der CD18-Untereinheit mittels monoklonaler Antikörper in einem Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts sowie in der Aktivierung der PLC $\gamma$ 2, einer Isoform der T-Zell-spezifischen PLC $\gamma$ 1 (Hellberg *et al.*, 1996; Molony *et al.*, 1996). Darüberhinaus konnte durch analoge Studien mit Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten, ebenso eine Involvierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase in diese Signalwege demonstriert werden (Roach *et al.*, 1998; Axelsson *et al.*, 2000).

In Ergänzung zu diesen bereits veröffentlichten Befunden konnte im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, daß die spezifische Stimulation des zytoplasmatischen CD18-Anteils in der transkriptionellen Aktivierung T-Zell-spezifischer Gene resultiert. Diese Ergebnisse werden im Folgenden Abschnitt ausführlich dargelegt.

### **5.2.2 Stimulation der CD18-Kette aktiviert den IL-2-Promotor**

Eine der wichtigsten funktionellen Konsequenzen der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium in Lymphozyten ist die Aktivierung Calcium-sensitiver Transkriptionsfaktoren, welche die Expression einer Vielzahl von Genen induzieren. Die verstärkte Expression dieser charakteristischen Gene ist wiederum notwendig für die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten sowie für den regulären Ablauf der T-Zell-Effektorfunktionen (Fraser *et al.*, 1993; Cantrell, 1996, Berridge *et al.*, 2000).

Wie in Abschnitt 4.2.3 dargelegt ist, resultierte die Quervernetzung der CD18-Untereinheit bei gleichzeitiger Gabe von PMA in der transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promotors in T-Zellen. Dieser Befund untermauert zusammen mit den in den vorherigen Abschnitten diskutierten Ergebnissen eine grundlegende costimulatorische Funktion des LFA-1-Integrins bei der T-Zell-Aktivierung. Für diese Signalvermittlung ist in erster Linie der zytoplasmatische Anteil der CD18-Kette verantwortlich. Die unterschiedlichen Signalkapazitäten beider Integrin-Untereinheiten lassen die Vermutung zu, daß die Signalübertragung durch die CD18-Untereinheit einen essentiellen Einfluß auf die Signal-

funktion des LFA-1-Integrins hat. Dagegen könnte die CD11a-Untereinheit eher bei der Regulation der Adhäsivität des LFA-1-Integrins eine Rolle spielen.

Die Annahme, daß die  $\alpha$ -Untereinheit überwiegend an der Ligandenbindung beteiligt ist, wird durch erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten unterstützt (Emsley *et al.*, 2000; Liddington und Bankston, 2000). Mit Hilfe chemischer Co-Aggregation, monoklonaler Antikörper, Mutationsanalysen sowie Techniken wie Computer-gestützte Strukturvorhersagen und Röntgenstrukturkristallographie wurden die für die Ligandenbindung verantwortliche Regionen der Integrine untersucht (Loftus *et al.*, 1994; Qu und Leahy, 1995; Springer, 1997). Demnach scheint ein etwa 200 Aminosäuren umfassendes Motiv, welches in einigen  $\alpha$ -Untereinheiten wie zum Beispiel der CD11a-Kette vorhanden ist, grundlegend an der Bindung extrazellulärer Liganden beteiligt zu sein. Die Struktur dieses, auch als I-Domäne bezeichneten Motivs wurde bereits vor einigen Jahren mit Hilfe der Röntgenstrukturkristallographie aufgeklärt (Lee *et al.*, 1995; Qu und Leahy, 1995). Aktuellere Erkenntnisse demonstrierten nun, daß die Integrin I-Domäne zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen kann. Dies konnte anhand der Unterschiede in den Kristallstrukturen der I-Domäne der  $\alpha 2$ -Kette vor und nach Ligandenbindung eines Collagen-Peptidfragments belegt werden. Diesen Untersuchungen zufolge werden durch die Wechselwirkungen zwischen dem Liganden mit der I-Domänen strukturelle Voraussetzungen geschaffen, welche das Integrin von einem Zustand niedriger Liganden-Affinität in einen hochaffinen Zustand versetzen können. Damit könnte ein allgemeiner Mechanismus für eine stabile Bindung des Liganden an das Integrin formuliert werden, nämlich daß die  $\alpha$ -Kette im niedrigaffinen Zustand die ersten Kontakte mit dem Liganden vermittelt und erst durch strukturelle Veränderungen das Integrin den Liganden mit hoher Affinität binden kann (Emsley *et al.*, 2000; Liddington und Bankston, 2000; Plow *et al.*, 2000). Ein derartiger Mechanismus erscheint auch für die Regulation der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion denkbar. Dies ist zum einen durch die Tatsache begründet, daß in der CD11a-Untereinheit ebenfalls eine I-Domäne vorhanden ist. Zum anderen induzierte die Quervernetzung der CD11a-Kette keinen intrazellulären Calciumanstieg, so daß dieser Integrin-Untereinheit keine Signalvermittlungskapazität zugeordnet werden konnte. Zwar könnte aufgrund einer I-Domänen-ähnlichen Struktur in der Sequenz der  $\beta$ -Kette die Liganden-Affinität des Integrins auch auf diese Weise beeinflußt werden. Allerdings erfolgt verschiedenen Studien zufolge die Regulation der Adhäsivität des gesamten Integrins unter Mitwirkung der  $\beta$ -Kette eher über deren zytosplasmatischen Anteil (Hibbs *et al.*, 1991; Takada *et al.*, 1997; Hughes und Pfaff, 1998). Wie in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist, wäre eine weitere Möglichkeit einer Invol-

vierung beider Integrin-Untereinheiten in die Ligandenbindung dadurch gegeben, daß der erste Kontakt des Liganden mit der  $\alpha$ -Untereinheit erfolgt. Erst dadurch würden in den extrazellulären Domänen beider Untereinheiten die strukturellen Voraussetzungen für eine feste Ligandenbindung geschaffen werden. Durch Interaktionen der  $\beta$ -Untereinheit mit zytoplasmatischen Proteinen bzw. Komponenten des Zytoskeletts wäre dann eine zusätzliche Regulation der Adhäsivität des LFA-1-Integrins möglich (Gahmberg, 1997; Hemler, 1998; Schoenwaelder und Burridge, 1999; van Kooyk und Figdor, 2000). Als Beispiel ist hier die Cytohesin-Familie zu nennen, welche durch Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Anteil der  $\beta$ 2-Untereinheit spezifisch die  $\beta$ 2-Integrin-vermittelte Zelladhäsion regulieren kann (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000). Insgesamt sprechen aber diese Befunde dafür, daß die  $\alpha$ -Kette in erster Linie durch die Interaktion mit dem Liganden die strukturellen Bedingungen für dessen Bindung mit hoher Affinität schaffen kann. Demgegenüber ist der intrazelluläre Anteil der  $\beta$ 2-Kette im Wesentlichen an der Regulation der Adhäsivität mit Hilfe zytoplasmatischer Proteine und Komponenten des Zytoskeletts beteiligt.

Zusammenfassend kann daher die Schlußfolgerung gezogen werden, daß LFA-1 bei der Lymphozyten-Aktivierung ebenso wie bereits für andere akzessorische Proteine wie CD2, CD28 und dem Corezeptor CD4 bekannt ist, sowohl an der Zelladhäsion als auch direkt an der Signaltransduktion beteiligt ist. Jedoch kann sich das Ausmaß der Involvierung in diese beiden Prozesse, je nachdem um welchen Membranrezeptor es sich handelt, stark unterscheiden. Desweiteren scheint dabei der intrazelluläre Anteil der CD18-Untereinheit eine größere Signalvermittlungskapazität zu haben als die zytoplasmatische Domäne CD11a-Kette. Diese ist vermutlich vermehrt für die Ligandenbindung verantwortlich.

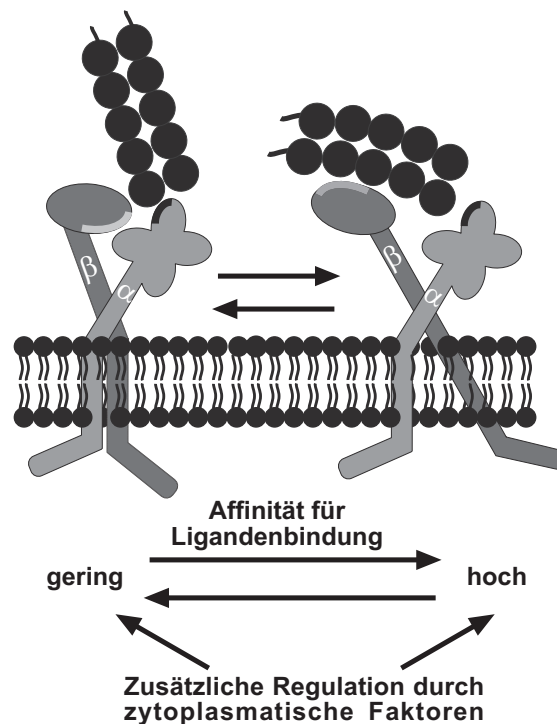


Abbildung 5.1: **Schematische Darstellung der Regulation der Adhäsivität des LFA-1-Integrins durch Konformationsänderungen beider Untereinheiten.** Erst durch die Interaktion des Liganden mit der I-Domäne (dunkel unterlegt) im aminoterminalen Anteil der  $\alpha$ -Kette, könnten im extrazellulären Bereich der  $\beta$ -Kette des Integrins die strukturellen Voraussetzungen für eine feste Ligandenbindung geschaffen werden. Zusätzlich wären die Übergänge des Integrins von einem Zustand der Ligandenbindung mit niedriger zu hoher Affinität und umgekehrt durch zyttoplasmatische Interaktoren der  $\beta$ -Untereinheit regulierbar.

### 5.3 Mechanismus der CD18-vermittelten Signaltransduktion

Wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, ist für die komplette Aktivierung der TCR-Signalkaskade die Wechselwirkung zwischen TCR und dem Antigen-beladenen MHC-Molekül nicht ausreichend. Neben der Signalübertragung durch den TCR-Komplex, ist zur Modulation des TCR-Signals prinzipiell die Beteiligung weiterer Membranproteine notwendig (van der Merwe *et al.*, 2000). Diese als akzessorischen Moleküle und Corezeptoren bezeichneten Proteine können den Prozeß der T-Zell-Aktivierung sowohl in positiver als auch in negativer Weise beeinflussen (Chambers und Allison, 1999). Insgesamt läßt sich daraus folgern, daß eine vollständige T-Zell-vermittelte Immunantwort grundsätzlich immer zwei

unterschiedliche Arten von Signalen erfordert. Dabei wird vorrangig das erste Signal, dessen Induktion strikt von der Erkennung des Antigens abhängt, vom TCR initiiert. Dagegen sind bei der Vermittlung des zweiten Signals in erster Linie Corezeptoren und akzessorische Rezeptoren beteiligt, wobei die Spezifität des Antigens nicht entscheidend ist (Schwartz, 1992; Janeway und Bottomly, 1994).

Der funktionelle Beitrag der costimulatorischen Moleküle und der Corezeptoren kann dabei im wesentlichen aus zwei unterschiedlichen Arten von Signalen bestehen. Einerseits kann durch die Liganden-Rezeptor-Interaktionen die Ausbildung eines über einen längeren Zeitraum stabilen Komplexes zwischen dem TCR und der Antigen-präsentierenden Zelle unterstützt werden. Bei der T-Zell-Aktivierung wird diese Funktion, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, durch jedes an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligte Membranprotein erfüllt. Darüberhinaus können einige dieser Rezeptoren jedoch durch die Induktion eigener costimulatorischer Signalkaskaden sowohl die Aktivierung als auch die Differenzierung der T-Zellen unterstützen (Dustin und Springer, 1991; Schwartz, 1992). Desweiteren kann der Prozeß der Costimulation von der TCR-Signalkaskade abhängig oder unabhängig stattfinden. Diese akzessorischen Rezeptoren können also zusätzliche Transkriptionsfaktoren aktivieren oder an einer beliebigen Stelle in die TCR-Signaltransduktion eingreifen.

Bezüglich der LFA-1-Costimulation konnte im Verlauf dieser Arbeit, neben einer direkten Involvierung in intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse, auch eine strikte Abhängigkeit dieser LFA-1-Funktion von der Anwesenheit eines intakten TCR-Komplexes demonstriert werden (siehe Abschnitt 4.3.2). Darüberhinaus konnten frühere Studien, welche auf die Möglichkeit eines vom TCR-unabhängigen Signalweg von CD28 hinwiesen, bestätigt werden (June *et al.*, 1987; June *et al.*, 1994; Van Gool *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu den Befunden dieser Analysen konnte jedoch eine Beteiligung des CD28-Moleküls an zwei Arten von Signalwegen gezeigt werden, welche einerseits zwar in Unabhängigkeit des TCRs erfolgen kann. Allerdings wird die CD28-Signaltransduktion andererseits durch die Präsenz des TCRs zusätzlich verstärkt. Im folgenden sollen nun die Signaltransduktionskaskaden der CD18-Untereinheit des LFA-1-Integrins und von CD28 miteinander verglichen werden. Desweiteren soll erörtert werden auf welche Weise sich der TCR-Komplex an der LFA-1-vermittelten Signalübertragung beteiligen könnte. Zuletzt folgt eine Gegenüberstellung der Funktionen verschiedener Integrine bei der zellulären Immunantwort anhand der hier analysierten Mitgliedern der  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Subfamilie.



### 5.3.1 Gegenüberstellung der Signaltransduktionsmechanismen von CD18 und CD28

Wie in den Abschnitten 4.3.2 und 4.3.3 beschrieben, konnte nach Expression und Antikörper-vermittelter Quervernetzung der CD18-Kette in den TCR-negativen JRT3-T3.5 Zellen kein intrazellulärer Calciumanstieg induziert werden. Allerdings war es möglich das CD18-Calciumsignal in diesen Zellen mittels transmembraner Expression eines chimären TCR- $\zeta$ -Konstruktes wiederherzustellen. Dadurch konnte die direkte Abhängigkeit der LFA-1-Signaltransduktion von der TCR-Signalkaskade belegt werden.

Dagegen scheint die CD28-Costimulation zwei unterschiedliche Signalwege zu aktivieren. Zum einen erfolgte nämlich in den entsprechenden Zellen nach Stimulation des CD28-Fusionsproteins ein intrazellulärer Calcium-Einstrom auch ohne das Vorhandensein eines intakten TCRs. Zum anderen konnte dieser Calciumanstieg durch die Anwesenheit der TCR- $\zeta$ -Kette verstärkt werden. Letzteres hatte sich bereits durch Untersuchungen anderer veröffentlichter Forschungsarbeiten angedeutet hatte. (June *et al.*, 1987; June *et al.*, 1994; Van Gool *et al.*, 1996). Beispielsweise führte die Verwendung der beiden Immunsuppressiva Cyclosporin A sowie FK506 im Gegensatz zur Signalkaskade des TCRs nicht zu einer vollständigen Inhibition der CD28-Costimulation. Diese beiden Substanzen verhindern den Transport des Transkriptionsfaktors NF-AT in den Zellkern, da sie die Aktivität der Calcium-sensitiven Phosphatase Calcineurin blockieren können. Demzufolge scheint nach Stimulation von CD28 ein weiterer Signalweg für die nukleäre Translokation von NF-AT möglich zu sein (June *et al.*, 1987; June *et al.*, 1994). Analog hierzu konnten weitere Analysen demonstrieren, daß nach CD28-Stimulation die transkriptionelle Induktion des IL-2-Gens durch ein spezielles Promotorelement (CD28RE) reguliert wird, dessen Induzierbarkeit nicht durch FK506 blockiert werden konnte (Shapiro *et al.*, 1997; Harhaj und Sun, 1998). Weitere Analysen konnten ebenso die Existenz einer von der TCR-Aktivierung unabhängigen CD28-Signalkaskade bestätigen und zudem noch zeigen, daß für diesen Signalweg freies, nicht durch CD4 komplexiertes p56<sup>lck</sup> notwendig ist (Siefken *et al.*, 1997; Tacke *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 1999).

Insgesamt läßt sich anhand dieser prinzipiell unterschiedlichen Mechanismen der Costimulation generell für den Prozeß der T-Zell-Aktivierung folgern, daß akzessorische Rezeptoren wie LFA-1 in erster Linie zur Verstärkung des eigentlichen TCR-Signals beitragen. Dabei kann sowohl die Festigung des Komplexes aus TCR und dem Antigen-präsentierenden MHC-Molekül als auch die Amplifikation der TCR-Signalkaskade selbst bei geringer Antigenkonzentration erfolgen. Der Anteil an der Involvierung in Zelladhäsions- und

Signaltransduktionsprozesse kann hier beliebig variieren. Diese Art von Costimulation wird zwar auch vom CD28-Molekül erfüllt. Jedoch muß den Befunden einer TCR-unabhängigen Signalübertragung zufolge für die CD28-Signaltransduktion ein zusätzlicher Mechanismus existieren, welcher beispielsweise in der Vermittlung eines länger anhaltenden TCR-Signals resultieren könnte (Bachmann *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 1998; Sedwick *et al.*, 1999). Für eine solche Annahme sprechen auch Ergebnisse, daß durch CD28-Costimulation die mRNA von Lymphokinen wie IL-2 stabilisiert sowie deren Transkription verstärkt wird (Fraser und Weiss, 1992; Linsley und Ledbetter, 1993).

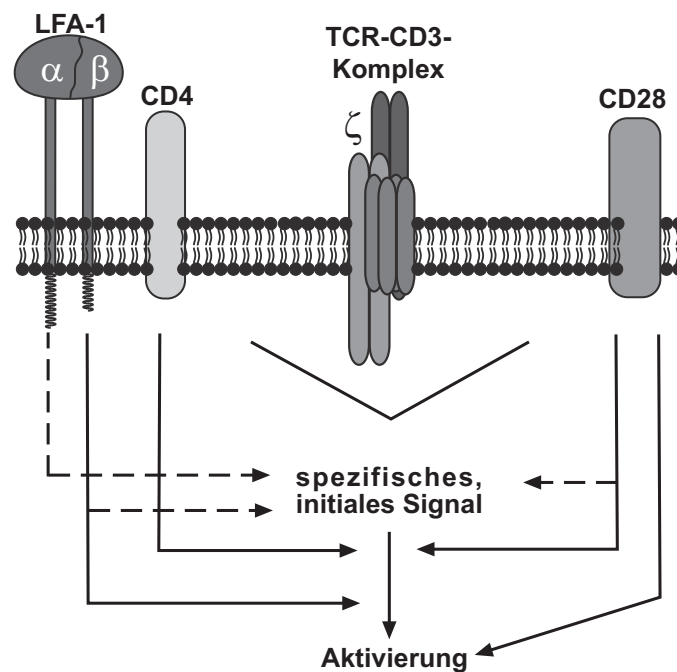


Abbildung 5.2: **Modell der unterschiedlichen Mechanismen der Costimulation durch CD18 sowie CD28.** Der Prozeß zur Aktivierung der T-Zelle wird nach Erkennung des spezifischen Antigens durch den TCR-Komplex initiiert. Die physikalisch schwachen Wechselwirkungen des TCRs mit Antigen-beladenen MHC-Molekül werden durch die Adhäsionsfunktion akzessorischer Proteine auf der T-Zelloberfläche verstärkt, wie z. B. LFA-1, CD28 und dem Corezeptor CD4 (durch die gestrichelten Pfeile dargestellt). Die durchgezogenen Pfeile weisen darauf hin, daß diese Rezeptoren auch direkt in Signalweiterleitungsprozesse involviert sein können. Dabei geht diese Funktion im Falle des LFA-1-Integrins vermutlich vornehmlich von dessen  $\beta$ 2-Kette aus. Im Falle des CD28-Moleküls kann ein weiterer Signalweg in Unabhängigkeit von der TCR-Signalkaskade stattfinden, wie aus den Ergebnissen in Abschnitt 4.3.2 hervorgeht.

Bezüglich der möglichst schnellen und effizienten Initiation der T-Zell-Aktivierung und der Verstärkung des TCR-Signals könnten somit die Funktionen der akzessorischen Rezeptoren LFA-1 und CD28 synergistisch wirken. Darüberhinaus könnten sich die unterschiedlichen, parallel ablaufenden Signalkaskaden des TCRs und CD28-Moleküls komplementieren und auf diese Weise zu einer vollständigen sowie effektiven Immunantwort führen. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt, wie die Kaskaden ablaufen könnten, welche zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle führen. Diese Signalwege beinhalten sowohl Adhäsions- als auch Signaltransduktionsprozesse. Die Möglichkeiten, über welche Mechanismen die Signalkaskaden des LFA-1-Integrins und TCRs zusammenwirken könnten, werden im nächsten Kapitel dargelegt.

### 5.3.2 Verknüpfung der Signalkaskaden der CD18-Untereinheit und des TCRs

Die hier durchgeführten Analysen, welche zur Aufklärung der Mechanismen der CD18-Signalfunktion beitragen, konnten deutlich eine Abhängigkeit der CD18-vermittelten Calciummobilisierung von der Präsenz der TCR- $\zeta$ -Kette demonstrieren (siehe hierzu Abschnitte 4.3.2 sowie 4.3.3). Darüberhinaus scheinen Signalmoleküle der T-Zell-Aktivierungskaskade ebenfalls in die CD18-Signaltransduktion involviert zu sein, wie aus den in Abschnitt 4.3.1 und 4.3.4 daß die Coexpression der Syk-Kinase bzw. einer katalytisch inaktiven Variante der Src-Kinase p56<sup>lck</sup> einen dominant-negativen Effekt auf die CD18-vermittelte Induktion des IL-2-Promotors haben. Allerdings muß im Falle von Syk noch eindeutig geklärt werden, ob sich nicht bereits die Expression der Kinase inhibitorisch auf die Aktivität des IL-2-Promotors auswirken kann. Im Gegensatz dazu konnte aber eindeutig demonstriert werden, daß die durch Quervernetzung von CD18-induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors nach Coexpression einer enzymatisch inaktiven p56<sup>lck</sup>-Variante drastisch reduziert wurde.

Ein weiterer essentieller Hinweis auf einen gemeinsamen Signalweg des TCRs und des LFA-1-Integrins zeigt der Anstieg tyrosinphosphorylierter Proteine nach Quervernetzung der entsprechenden chimären Fusionsproteine. In TCR-negativen Zellen, welche mit der  $\zeta$ -Komponente des TCRs rekonstituiert wurden, nahm nach der TCR-Stimulation der Phosphotyrosingehalt bestimmter Proteine zu. Ein vergleichbares Muster an Phosphoproteinen trat in diesen, auf analoge Weise rekonstituierten Zellen nach Stimulation der

CD18-Kette auf. Diese Ähnlichkeiten sind besonders auffällig im Bereich von 120 kD, welche evtl. der bereits in Abschnitt 5.1 erwähnten Pyk2 entsprechen könnte. Verschiedene Studien belegen die wichtige Rolle von Pyk2 bei der Calciummobilisierung während der T-Zell-Aktivierung (Tsuchida *et al.*, 1999; Berridge *et al.*, 2000). Der Beitrag von Pyk2 zur Integrin-vermittelten Zelladhäsion ist schon seit längerem bekannt (Dedhar und Hannigan, 1996; Aplin *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 1998). Die Bande bei 95 kD könnte zum Beispiel ein Hinweis auf die Tyrosinphosphorylierung des p95<sup>vav</sup> Proteins sein, einem Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor = GEF) von GTPasen der Rho-Familie. Diese wirken ebenfalls an Signaltransduktionsprozessen während der T-Zell-Aktivierung mit (Dustin und Chan, 2000). Eine Involvierung des p95<sup>vav</sup>-Proteins in die Signalfunktion der  $\beta$ 2-Integrinfamilie konnte bereits gezeigt werden, allerdings bisher nur in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Zheng *et al.*, 1996; Roach *et al.*, 1998). Das Auftreten der Doppelbande bei 70 bis 80 kD könnte durch Phosphorylierung der Syk-Kinase ZAP-70, dem Adapterprotein SLP76, sowie im Falle der CD18-Aggregation der zur Rekonstitution der TCR-negativen Jurkat Zellen verwandten CD4-TCR- $\zeta$  Kette erklärt werden.

Eine enge funktionelle Assoziation zwischen LFA-1 und ZAP-70 konnte durch verschiedene Untersuchungen demonstriert werden, allerdings bisher nur im Zusammenhang der Integrin-vermittelten Zellmigration (Soede *et al.*, 1998; Soede *et al.*, 1999). Eine weitere Interpretationsmöglichkeit für das Vorhandensein der Proteinbande bei etwa 70 kD wäre Phosphorylierung des Zelladhäsionsrezeptors DNAM-1. Auf die Bedeutung für die CD18-Signaltransduktion dieses Aspekts wird jedoch im nächsten Kapitel gesondert eingegangen. Desweiteren könnten sowohl nach Aggregation der TCR- $\zeta$ -Kette als auch in rekonstituierten TCR-negativen Zellen nach CD18-Stimulation die Src-Kinase p56<sup>lck</sup> phosphoryliert werden, wie das Vorhandensein eine Bande mit entsprechendem Molekulargewicht vermuten läßt. Die beiden Signale im Bereich von 34 bis 36 kD bzw. 21 bis 23 kD, welche vermutlich aufgrund zu geringer Intensität nach Quervernetzung des TCR- $\zeta$ -Fusionsproteins nicht zu detektieren sind, könnten durch Tyrosinphosphorylierung von LAT bzw. der TCR- $\zeta$ -Kette erklärt werden.

Wie bereits einleitend erwähnt, wäre eine Möglichkeit der Verknüpfung zwischen der CD18- und TCR-Signalkaskade auch durch eine 3-dimensionale Anordnung von Rezeptoren in der Zellmembran gegeben (siehe Abschnitt 2.3). Neuere Studien sprechen für die Existenz einer solchen Organisation von Membranproteinen, die in T-Zell-Aktivierungsprozesse involviert sind. Hierbei konnte mittels mikroskopischer Techniken eine Akkumulation von Membranrezeptoren sowie intrazellulärer Proteine an der Kontaktstelle zwischen den Zell-

membranen von T- und Antigen-präsentierender Zelle nachgewiesen werden. Anstelle einer einfachen Aggregation dieser Signalmoleküle nach Antigen-vermittelten Stimulation des TCRs, erfolgte überraschenderweise jedoch deren strikt organisierte Anordnung innerhalb definierter Membransubkompartimente. Diese werden, wie schon zuvor erwähnt, auch als SMACs (supramolecular activation clusters) bzw. als „immunologische Synapsen“ bezeichnet (Monks *et al.*, 1998; Brown und Shaw, 1999; Dustin und Shaw, 1999; Grakoui *et al.*, 1999; Dustin und Cooper, 2000; Lanzavecchia und Sallusto, 2000).

Eine der Erklärungsmöglichkeiten für die Entstehung solcher SMACs wäre die Anreicherung definierter Bereiche innerhalb der Plasmamembran mit spezifischen Lipiden und Cholesterol, sogenannter *lipid rafts* (Xavier und Seed, 1999; Horejsi *et al.*, 1999; Simons und Toomre, 2000). Auf diese Weise könnten während der T-Zell-Aktivierung Kompartimente in der Membran entstehen, welche die zur Signalverstärkung notwendigen Kooperationen des TCRs mit bestimmten Proteinen wie den Corezeptoren vereinfachen könnten (Brdicka *et al.*, 1998; Janes *et al.*, 1999; Janes *et al.*, 2000). Das Zytoskelett scheint bei der Generierung dieser Membransubkompartimente essentiell beteiligt zu sein Penninger und Crabtree, 1999; Acuto und Cantrell, 2000; Caplan und Baniyash, 2000; Dustin und Cooper, 2000). Dadurch wäre die Rekrutierung des LFA-1-Integrins in diese *lipid rafts* denkbar, wofür ebenfalls verschiedene Studien sprechen (Shaw und Dustin, 1997; Monks *et al.*, 1998; Wulfig *et al.*, 1998; Krauss und Altevogt, 1999; Pande, 2000). Eine Isolierung dieser Membransubkompartimente und damit der darin enthaltenen Proteine ist mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation möglich, da diese aufgrund der besonderen biochemischen Zusammensetzung der Membran eine geringere Schwebedichte aufweisen als die restlichen Anteile zellulärer Membranen. Aus diesem Grund war die unter Abschnitt 4.3.4 beschriebene, in T-Zellen zu beobachtende Umverteilung der CD18-Untereinheit nach Antikörper-vermittelter Quervernetzung in die Membranfraktionen niedriger Dichte ein wichtiges Indiz für die Rekrutierung des LFA-1-Integrins nach Stimulation in diese Membranmikrodomänen. Nach Aggregation der TCR- $\zeta$ -Kette war jedoch eine genau entgegengesetzte Verteilung festzustellen, nämlich ein Übergang von Fraktionen mit geringer Dichte in Fraktionen mit höherer Schwebedichte. Diese Beobachtung war nicht konsistent mit dem Modell, daß T-Zell Aktivierung eine Rekrutierung der TCR- $\zeta$ -Kette in die Membranmikrodomänen induziert soll. Die Gründe hierfür könnten darin liegen, daß durch Überexpression des CD4-TCR- $\zeta$ -Fusionsproteins die T-Zellen aufgrund der daraus resultierenden hohen Oberflächendichte an Komponenten des TCRs bereits voraktiviert waren. Das dann aber nach Quervernetzung dennoch eine Änderung der Membranverteilung induzierbar war, könnte

durch eine Art Attenuationseffekt der Aktivierbarkeit der Zellen oder durch Überbeanspruchung an der Signalübermittlung beteiligter Komponenten erklärt werden. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit hierfür ist, daß die Quervernetzung der TCR- $\zeta$ -Kette deren Assoziation mit dem Zytoskelett induzieren könnte. Dadurch wäre diese unlöslich und somit nicht mehr in den Fraktionen geringerer Dichte nachweisbar. Hierzu gibt es bereits veröffentlichte Untersuchungen. Diese belegen eindeutig, daß in aktivierten T-Zellen die TCR- $\zeta$ -Kette mit dem Zytoskelett assoziieren kann (Caplan *et al.*, 1995; Rozdzial *et al.*, 1995; Caplan und Baniyash, 2000).

Die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Studien zeigen die Involvierung von Phosphotyrosinkinasen in die CD18-Signalkaskaden. Darüberhinaus läßt die Umverteilung der CD18-Untereinheit nach Stimulation in Membranbereiche geringerer Schwebedichte, insgesamt auf eine Rekrutierung des LFA-1-Integrins in Membransubkompartimente schließen (siehe hierzu Abschnitte 4.3.1 sowie 4.3.4). Somit scheint es möglich, daß in diesen Membransubdomänen ankonzentrierte Signalmoleküle die CD18-Signaltransduktion mit Signalwegen der T-Zell-Aktivierung verbinden.

### **5.3.3 Funktionelle Assoziation der Signalkaskaden von CD18 und DNAM-1**

Durch Wechselwirkung des LFA-1-Integrins mit dem Adhäsionsrezeptor DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1), wäre eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung der CD18-Signalübertragung mit der TCR-Signalkaskade gegeben (Shibuya *et al.*, 1996). Einer bereits veröffentlichten Studie zufolge, war es nämlich interessanterweise möglich, durch Stimulation des TCRs die Interaktion zwischen der CD18-Untereinheit und DNAM-1 zu induzieren (Shibuya *et al.*, 1999). Durch diese Studie konnte auch demonstriert werden, daß bei der Zytolyse die Involvierung des LFA-1-Integrins in die Signalfunktion des DNAM-1-Moleküls unentbehrlich ist.

Wie in Kapitel 4.3.5 demonstriert werden konnte, ist für die Induktion eines intrazellulären Calciumanstiegs nach Antikörper-vermittelter Quervernetzung des DNAM-Rezeptors das Vorhandensein eines intakten TCRs erforderlich. Dies konnte bereits ebenso für die CD18-Signaltransduktion eindeutig gezeigt werden. Die TCR-Abhängigkeit der Signalübertragung sowohl durch DNAM-1 als auch durch CD18 läßt auf eine Assoziation dieser Signalwege schließen. Für eine Involvierung des TCRs in diese Signalkaskaden spricht

auch der Befund, daß in aktivierten T-Zellen DNAM mit der Tyrosinkinase  $p59^{\text{fyn}}$  interagiert. Darüberhinaus induziert in diesen Zellen die Quervernetzung der CD18-Kette die Tyrosinphosphorylierung von sowohl DNAM als auch  $p59^{\text{fyn}}$ . Eine Bestätigung der funktionellen Verknüpfung dieser Signalwege wäre aber nur durch die Expression und Stimulation der CD18-Untereinheit in DNAM-defizienten Zellen möglich. Dann nämlich sollte eine Erhöhung der Calciumkonzentration erst nach Rekonstitution des DNAM-Rezeptors meßbar sein. Auf diese Weise könnte dann auch analysiert werden, ob die Aggregation von DNAM bzw. von der CD18-Untereinheit ausreichend ist oder ob die Induktion eines Calciumsignals die Co-Aggregation dieser beiden Proteine erfordert. Dennoch läßt sich aus diesen und den bereits veröffentlichten Ergebnissen ein vorläufiges Modell erstellen, auf welche Weise die LFA-1 und DNAM-1 Interaktion unter Einbeziehung der  $p59^{\text{fyn}}$ -Kinase für die T-Zell-Aktivierung funktionell relevant sein könnte (siehe hierzu Abbildung 5.3).

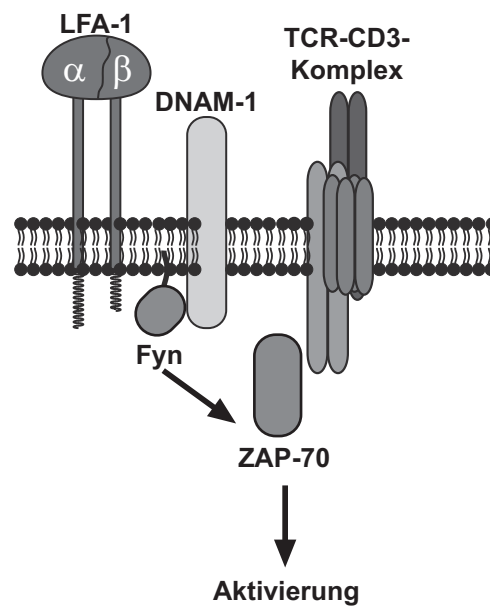


Abbildung 5.3: **Schematisches Modell der funktionellen Assoziation von LFA-1, DNAM-1 und dem TCR.** Durch  $p59^{\text{fyn}}$ , welches mit der zytosomatischen Domäne von DNAM-1 interagiert, könnte die Tyrosinkinase ZAP-70 aktiviert und somit die TCR-Signalkaskade eingeleitet werden. Auf welchem Weg jedoch hierbei die Signalübertragung zwischen LFA-1 und DNAM erfolgt, ist bisher nicht bekannt.

Die spezifischen Wechselwirkungen mit Membranrezeptoren oder zellulären Komponenten könnten auch für die Unterschiede in den Signalkapazitäten der CD18/ $\beta$ 2- und CD29/ $\beta$ 1-Untereinheiten bei der T-Zell-Aktivierung verantwortlich sein. Dieser Aspekt soll nun im nächsten Kapitel genauer erörtert werden.

### 5.3.4 Unterschiede in der CD18- und CD29-Signalkapazität

Das Ausbleiben eines Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Quervernetzung des zytoplasmatischen Anteils der CD29-Untereinheit in T-Zellen, läßt für diese Integrin-Subfamilie auf eine andere Rolle als die der  $\beta$ 2-Familie in diesen Zellen schließen (siehe hierzu Abbildung 4.7).

Zell-Matrix-Interaktionen unter Einbeziehung des  $\beta$ 1-Integrins führen in erster Linie zur Regulation von Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozessen (Giancotti, 1997). Beispielsweise konnte erst kürzlich demonstriert werden, daß in Fibroblasten die Ausbildung eines nukleären Komplexes zwischen dem Proto-Oncoprotein SYT (synovial sarcoma translocation) und p300 (homolog zu CBP: CREB binding protein), einem Cofaktor des Transkriptionsaktivators CREB (cAMP response element binding protein), für die Regulation der  $\beta$ 1-Integrin-vermittelten Zelladhäsion notwendig ist. Hierfür schien jedoch nicht unbedingt ein Übergang der extrazelluläre Domäne des Integrins in die aktive Konformation erforderlich zu sein (Eid *et al.*, 2000). Bei der Regulation der Differenzierung von Makrophagen durch  $\beta$ 1-Integrine konnte demonstriert werden, daß weder Pyk2 noch Src-Kinasen an der Aktivierung des Erk/MAP-Kinasen Signalweges bzw. des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt sind. Letztere scheinen allerdings hier zusammen mit dem zytoplasmatischen Proto-Oncogen p120<sup>c-cbl</sup> für die Koordination von Zelladhäsion und Migration notwendig zu sein (Lin *et al.*, 1997; Meng und Lowell, 1998).

Die Regulation der Zellproliferation durch die  $\beta$ 1-Integrine kann verschiedenen Studien zufolge in Kooperation mit Wachstumsrezeptoren stattfinden (Moro *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 1999). So können zum Beispiel Integrine die PDGF- (platelet-derived growth factor) vermittelte Signalkaskade verstärken, indem sie die Rekrutierung regulatorischer Proteine an den PDGF  $\beta$ -Rezeptor modulieren (DeMali *et al.*, 1999). Demzufolge würden die  $\beta$ 1-Integrinen bei der Kontrolle der Zelldifferenzierung eine vergleichbare Funktion erfüllen wie die  $\beta$ 2-Integrine bei der T-Zell-Aktivierung. In beiden Fällen könnten sie somit zur



Signalverstärkung beitragen. Allerdings kann die Weiterleitung der Signale von Wachstumsfaktoren unter Mitwirkung der  $\beta$ 1-Integrine über die entsprechenden Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgen. Im Falle der  $\beta$ 2-Integrine sind zur Verstärkung des TCR-Signals Komponenten der T-Zell-Aktivierungskaskade notwendig, da die einzelnen Untereinheiten des TCR-Komplexes keine intrinsische enzymatische Aktivität aufweisen.

Daß die Integrin CD29-Untereinheit nicht einfach die komplette CD18-Funktion ersetzen kann, zeigt sich zum Beispiel an Patienten, die am LAD-1 (leukocyte adhesion deficiency) Syndrom leiden. Diese Krankheit wird durch eine Mutation innerhalb des CD18-Gens verursacht, wodurch keine bzw. nur geringe Expression der  $\beta$ 2-Untereinheit stattfindet. Da die vorherige Assoziation beider Integrin-Untereinheiten eine wichtige Voraussetzung für den Transport des LFA-1-Integrins an die Zelloberfläche ist, wirkt sich dieser Defekt auch negativ auf die Expression des gesamten LFA-1-Integrins aus (Weber *et al.*, 1997). Obgleich hierbei sowohl die Expression als auch die Adhäsionsfunktion der CD29-Untereinheit nicht betroffen sind, lassen sich die durch diesen Defekt ausgelösten Beeinträchtigungen der Immunabwehr nicht kompensieren (Hogg *et al.*, 1999).

Wie im Folgenden näher erläutert werden soll, scheint der Unterschied in der Signalvermittlungskapazität zwischen den Integrin CD18- und CD29-Untereinheiten durch Sequenzabweichungen innerhalb der zytoplasmatischen Region verursacht zu werden.

#### **5.4 CD18-Signalfunktion ist abhängig vom membrandistalen NPXF-Motiv**

Aus den Calciummessungen in Abbildung 4.7 geht hervor, daß die Quervernetzung der CD18-Untereinheit zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Im Gegensatz dazu war dies durch Stimulation der CD29-Untereinheit nicht möglich. Hierfür sind vermutlich die Sequenzunterschiede innerhalb des carboxyterminal lokalisierten NPXF/Y-Motives beider Integrin-Subfamilien verantwortlich, wie durch Mutationsanalysen demonstriert werden konnte (vergleiche hierzu Abschnitt 4.4). Wie in Abbildung 5.4 gezeigt, ist das Vorhandensein zweier tandemartig angeordneter NPXF-Motive ein besonders auffälliges Charakteristikum des zytoplasmatischen CD18/ $\beta$ 2-Anteils, an deren Stelle sich in der Integrin CD29/ $\beta$ 1-Untereinheit zwei NPXY-Sequenzabschnitte befinden.

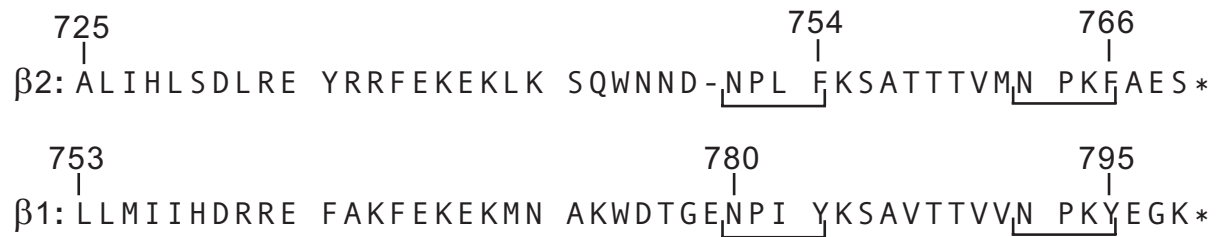


Abbildung 5.4: Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen zytoplasmatischer Anteile der Integrin  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Untereinheiten. Die Positionen der beiden Phenylalanin- bzw. Tyrosinreste innerhalb der Sequenzen der  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Untereinheiten sind angegeben. Die beiden tandemartig angeordneten NPXF/Y-Motive sind mittels eckiger Klammern hervorgehoben.

Wie bereits durch frühere Studien demonstriert werden konnte, scheinen im zytoplasmatischen Anteil von Membranrezeptoren lokalisierte NPXY-Motive eine wichtige strukturelle Voraussetzung für deren Interaktionen mit zellulären Liganden zu sein. Beispielsweise erfolgt die Bindung des Adapterproteins Shc (SH2 containing adapter protein) an den EGF- (epidermal growth factor) Rezeptor über dessen carboxyterminales NPXY-Motiv (Prigent *et al.*, 1995; Farooq *et al.*, 1999). Das intrazelluläre Substrat des Insulin Rezeptors (IRS) interagiert ebenfalls mit dem Insulin Rezeptor (IR) über dessen carboxyterminales NPXY-Motiv (Poltilove *et al.*, 2000). Interessanterweise scheint dieses Motiv in der Sequenz des Amyloid-Vorläufer Proteins bei der Alzheimer Krankheit (APP = Alzheimer's amyloid precursor protein) ebenfalls als eine Protein-Interaktionsdomäne mit zytoplasmatischen Faktoren zu fungieren (Tomita *et al.*, 1999). Neben dieser Funktion konnten weitere Studien zeigen, daß die NPXY-Motive als Signalsequenzen für die Internalisierung von Membranrezeptoren nötig sind, wie beispielsweise für die Endozytose einiger Mitglieder der LDL- (low density lipoprotein) Rezeptorfamilie (Li *et al.*, 2000). Darüberhinaus gibt es unterschiedliche Hinweise in der Literatur, denen zufolge NPXY-Motive im zytoplasmatischen Anteil von Mitgliedern der LDL-Familie an der Interaktion mit dem Dab1 (Disabled) -Protein beteiligt sein sollen. Die Signalkaskaden, welche durch diese Interaktion induziert werden, wie beispielsweise unter Einbeziehung von Rho-GTPasen, könnten für eine zielgerichtete Migration der Neuronen bei der Entwicklung des Neocortex verantwortlich sein (Bothwell und Giniger, 2000; Gilmore und Herrup, 2000). Neben der Assoziation mit ras-GAP (ras GTPase activating protein) erfordert die Regulation von Adhäsions- und Migrationsprozessen

durch zelluläres p62<sup>Dok</sup> (docking protein) auch dessen Interaktion mit NPXY-Motiven von Membranrezeptoren wie z.B. Integrinen (Carpino *et al.*, 1997; Noguchi *et al.*, 1999).

Insgesamt zeigen diese Studien, daß NPXY-Motive aufgrund ihrer Funktion als Protein-Protein-Interaktionsdomänen an zellulären Prozessen wie Zellmigration, zielgerichtetes Auswachsen von Neuronen sowie der Modulation des Zytoskeletts mitwirken können. Inwiefern NPXF/Y-Motive für die verschiedenen Funktionen der individuellen  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Untereinheiten bzw. für die des gesamten LFA-1-Integrins von Bedeutung sind, soll nun im Folgenden diskutiert werden.

#### 5.4.1 Das membrandistale NPXF-Motiv ist essentiell für das CD18-Calciumsignal

Wie bereits einleitend erwähnt, unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Anteils der  $\beta$ 2-Untereinheit von den ansonsten sehr ähnlichen Sequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten anderer Integrin-Subfamilien. Ein wesentlicher Unterschied ist hierbei innerhalb der beiden NPXF-Motive der CD18-Sequenz zu beobachten. Wie bereits erwähnt, weisen die Integrine der  $\beta$ 1- und der  $\beta$ 3-Familie an den entsprechenden Positionen anstelle der beiden Phenylalaninreste jeweils zwei Tyrosinreste auf. Durch carboxyterminale Deletionsmutanten konnte zunächst die essentielle Bedeutung des membrandistalen NPXF-Motivs für die Signalkapazität des CD18-Fusionsproteins demonstriert werden (Ergebnisteil, Abschnitt 4.4.1). Darüberhinaus resultierte die Substitution des Phenylalaninrestes innerhalb dieses Motivs in Anlehnung an die Sequenz der CD29-Untereinheit durch einen Tyrosinrest (F766Y-Mutation) bzw. durch einen Alaninrest (F766A-Mutation), in einer signifikanten Reduktion bzw. im Fall der F766A-Mutation sogar in einem vollständigen Verlust des CD18-Calciumsignals (siehe hierzu Abbildung 4.23).

Die Bedeutung dieses NPXF-Motivs für die Adhäsionsfunktion des LFA-1-Integrins konnte durch eine bereits vor längerer Zeit veröffentlichten Studie demonstriert werden. Interessanterweise zeigte sich hier, daß die Substitution des Phenylalanins an Position 766 durch einen Tyrosinrest keinen Effekt auf die Adhäsivität transfizierter COS-Zellen auf ICAM-1 hatte. Dagegen ging die Anzahl der auf ICAM adhärierenden Zellen nach einem Austausch desselben Tyrosinrestes durch ein Alanin drastisch zurück (Hibbs *et al.*, 1991). Eine derartige, im Falle der F766Y-Mutation zu beobachtende Abweichung von den in Abschnitt 4.6.1 dargestellten Ergebnissen, mag zum einen daran liegen, daß die Unter-

suchungen von Hibbs *et al.* in COS-Zellen durchgeführt wurden. Diese könnten sich bezüglich der LFA-1-Adhäsionsfunktion sehr von den hier verwendeten humanen T-Zellen unterscheiden. So beeinflusste einer aktuelleren Studie zufolge die F766A-Mutation in der CD18-Untereinheit auch nicht in CHO-Zellen deren Adhäsivität bzw. Migrationsverhalten (Fabbri *et al.*, 1999). Zum anderen könnte der Austausch des F766-Restes in der CD18-Sequenz zwar keine signifikanten Folgen auf die Adhäsionsfunktion des LFA-1-Integrins haben, sich jedoch in einer deutlich inhibitorischen Weise auf die Signaltransduktion des Integrins auswirken. Durch die beiden zytoplasmatischen NPXY-Motive wird nämlich im Gegensatz zu den bereits erwähnten Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie nicht die Internalisierung von  $\beta$ 2-Integrinen reguliert (Fabbri *et al.*, 1999).

Welche Funktionen der CD29-Untereinheit durch das membrandistale NPXY-Motiv reguliert werden können, soll nun im nächsten Abschnitt erörtert werden.

#### **5.4.2 Einführung eines NPXF-Motivs in CD29 induziert zellulären Calcium-Einstrom**

Aus bereits veröffentlichten Studien geht hervor, daß durch die beiden NPXY-Motive in der zytoplasmatischen Domäne der CD29-Kette dessen intrazelluläre Lokalisierung und somit die Regulation der Zelladhäsivität erfolgen kann (O'Toole *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1999). Dabei könnte durch die Modifikation der Tyrosinreste innerhalb dieser Motive mittels Phosphorylierung die Affinität des Integrins für dessen Liganden herabgesetzt werden. Mittels einer solche Modifikation wäre es auch möglich Interaktionen mit zytoplasmatischen Signalmolekülen sowie Komponenten des Zytoskeletts zu verhindern. Die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung der NPXY-Motive könnte die Rekrutierung der Integrine in den fokalen Komplex regulieren, wo diese nach Aktivierung zusammen mit Komponenten des Zytoskeletts und Signalmolekülen größere Proteinaggregate ausbilden. In Einklang mit diesem Modell konnten bereits publizierte Ergebnisse demonstrieren, daß die Substitution des membrandistalen Tyrosinrestes durch ein Phenylalanin tatsächlich in einer Akkumulation der fokaler Kontaktstellen sowie einer verstärkten Bindung des Liganden Fibronectin resultierten (Sakai *et al.*, 1999). Anderen Untersuchungen zufolge kann sich innerhalb der membranproximalen und membrandistalen NPXY-Motive der Austausch der beiden Tyrosine des membrandistalen NPXY-Motivs gegen Phenylalaninreste negativ auf die Zelladhäsion auswirken (Stroeken *et al.*, 2000).

Die Substitution des Tyrosinrests, welcher innerhalb des membrandistalen NPXY-Motivs an Position 795 lokalisiert ist, durch einen Phenylalaninrest (Y795F-Mutante) reichte nach Quervernetzung der entsprechenden Mutante zur Induktion eines intrazellulären Calciumanstiegs aus. Dadurch konnte ebenfalls die grundlegende Bedeutung dieser Region für die Funktion der CD29-Untereinheit demonstriert werden (siehe Abbildung 4.25). Interessanterweise ließ sich durch die Aggregation einer analogen Y795A-Mutante dieser Effekt nicht beobachten (nicht im Ergebnisteil gezeigt). Diese unterschiedlichen Signalkapazitäten der Y795F- und der Y795A-Mutante bestätigten wiederum die Untersuchungen einer anderen Gruppe, welche im Kontext der Zelladhäsion zu einem ähnlichen Ergebnis kam. Hierbei wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen durch die Y795F-Mutation kaum beeinflusst. Dagegen konnten die Zellen durch Expression der Y795A-Mutante weder durch PMA noch durch die Aktivierung des TCRs zur Adhäsion auf Fibronectin stimuliert werden. Verglichen mit der basalen Zelladhäsion nach Expression der CD29-Wildtypform bzw. der Y795F-Mutante, wurde diese durch Expression der Y795A-Variante ebenfalls erheblich reduziert (Romzek *et al.*, 1998).

Einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Ursachen für die funktionellen Differenzen zwischen CD18 und CD29 würde die Identifizierung intrazellulärer Faktoren leisten. Die Sequenzunterschiede innerhalb des membrandistalen NPXY/F-Motivs könnten dann unter Umständen für die Spezifität einer solchen Wechselwirkung verantwortlich sein. Ein solcher Kandidat ist z.B. ICAP-1 (integrin cytoplasmic domain-associated protein-1). Durch spezifische Wechselwirkung mit dem membrandistalen NPXY-Motiv der CD29-Untereinheit erfolgt die funktionelle Regulation dieser Integrin-Subfamilie. ICAP-1 interagiert zwar nicht mit der  $\beta 2$ -Untereinheit, allerdings führt ausschließlich die Y795A-Substitution, nicht aber der Y795F-Austausch, zu einem Verlust der Interaktion mit der CD29-Kette. Die Phosphorylierung von ICAP-1 durch Adhäsion der Zellen auf Fibronectin ist ein wichtiger Hinweis auf die regulatorische Funktion des Proteins bei  $\beta 1$ -Integrin-vermittelten Zelladhäsionsprozessen (Chang *et al.*, 1997). Neben der Kapazität, mit unterschiedlichen zellulären Faktoren zu interagieren, könnten diese Modifikationen bzw. Mutationen innerhalb der NPXF/Y-Motive zu Veränderungen in der Integrinstruktur führen. Wie Abbildung 5.5 schematisch dargestellt ist, wäre somit eine Modulation individueller Integrin-Funktionen möglich. Demgemäß ist eine einzige Aminosäure innerhalb der Region des membrandistalen NPXF/Y-Motivs für die spezifische funktionelle Regulation der  $\beta 2$ - und  $\beta 1$ -Integrine verantwortlich.

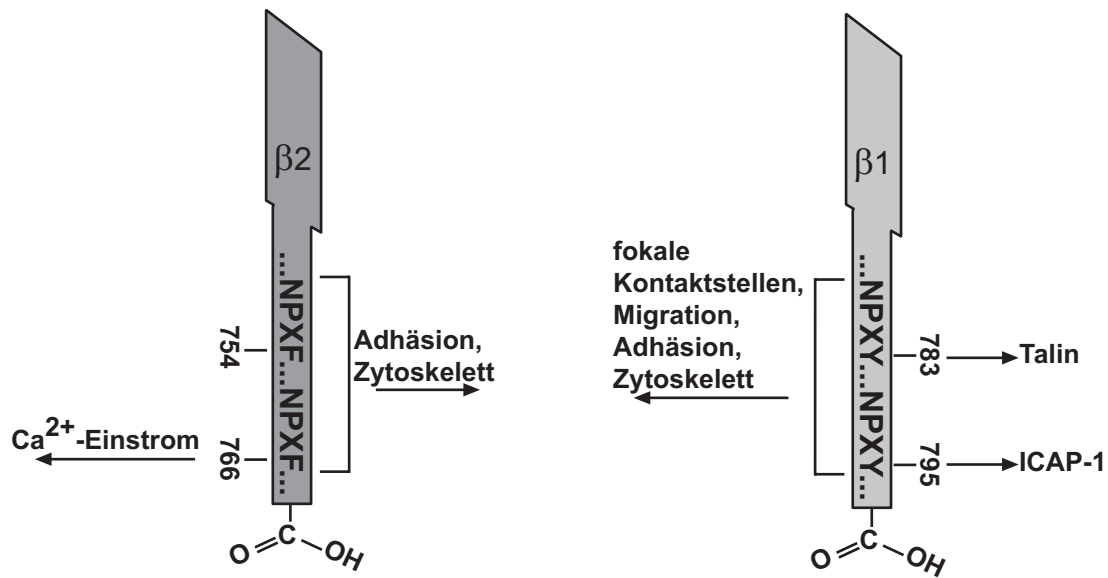


Abbildung 5.5: **Schematische Darstellung unterschiedlicher Bindungspartner der NPXF/Y-Motive von  $\beta 2$ - und  $\beta 1$ -Integrinen.** Die beiden tandemartig angeordneten NPXF/Y-Motive in den Sequenzen der  $\beta 2$ - und  $\beta 1$ -Untereinheiten und ihre bisher bekannten Funktionen sind schematisch dargestellt. Für die Interaktion der Integrin  $\beta 1$ -Untereinheit mit der Zytoskelettkomponente Talin scheint der Tyrosinrest in Position 783, für die Wechselwirkung mit ICAP-1 derjenige in Position 795 notwendig zu sein. Die Induktion des Calcium-Einstroms nach Quervernetzung der  $\beta 2$ -Kette wird den hier vorliegenden Resultaten zufolge durch dessen carboxyterminal lokalisiertes NPXF-Motiv vermittelt.

### 5.4.3 Bedeutung des NPXF-Motivs für die Funktion des gesamten LFA-1-Moleküls

Zur Ermittlung, inwieweit sich die unter Verwendung von Fusionsproteinen erbrachten Ergebnisse auf die native Form des LFA-1-Integrins übertragen lassen, wurden Studien in SK- $\beta 2.7$  Zellen durchgeführt. Diese unter Abschnitt 4.6 beschriebenen Zellen exprimieren aufgrund einer unbekanntenen Mutation keine CD18-Untereinheit. Dadurch kann hier keine Oberflächenexpression von LFA-1 nachgewiesen werden, da Integrine nur in Form eines intakten Heterodimers im Verlauf des sekretorischen Transportwegs vollständig prozessiert werden können (Weber *et al.*, 1997). Die Befunde dieser Untersuchungen demonstrieren eindeutig, daß Abweichungen im carboxyterminalen NPXF-Motiv der CD18-Sequenz die Regulation der Zelladhäsivität beeinflussen. Es zeigte sich nämlich, daß die Expression varianter Formen der  $\beta 2$ -Untereinheit, im Gegensatz zur CD18-Wildtypform, die Adhäsivität

von LFA-1-negativen SK- $\beta$ 2.7 Zellen nicht rekonstituieren konnten (siehe hierzu Abbildung 4.27). Durch Substitution des Phenylalaninrestes an Position 766 durch Alanin bzw. Tyrosin unterscheiden sich die Sequenzen dieser CD18-Varianten innerhalb des membrandistalen NPXF-Motivs von der ursprünglichen CD18-Sequenz. Demnach ist diese Region ebenso in die Regulation der Adhäsionsfunktion involviert. Andererseits konnte bisher keine Region innerhalb des zytoplasmatischen Anteils der  $\beta$ 2-Untereinheit identifiziert werden, deren Mutation keinen Einfluß auf die Adhäsivität des Gesamtintegrins in diesen Zellen hatte. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Rekonstituierbarkeit der Adhäsivität von SK- $\beta$ 2.7 Zellen durch Re-Expression der CD18-Kette die Integrität diverser Bereiche dieser Integrin-Untereinheit erfordert. Diese Möglichkeit wird auch durch den Befund unterstützt, daß die CD18-TRG-Mutation, welche die Binderegion des  $\beta$ 2-spezifischen Interaktors Cytohesin-1 darstellt, ebenfalls die Adhäsivität der SK- $\beta$ 2.7 Zellen nicht wiederherstellen konnte. Da die SK- $\beta$ 2.7 Zellen leider sekundäre Defekte aufweisen, insbesondere das Fehlen eines TCRs auf der Zelloberfläche, konnten Parameter zur T-Zell-Aktivierung wie Induktion charakteristischer Gene oder Calciummobilisierung hierin nicht untersucht werden (Geiger *et al.*, 2000; eigene, nicht gezeigte Ergebnisse).

Aus diesem Grund erfolgte die weitere Analyse einer Involvierung der CD18-Kette in die LFA-1-Signaltransduktion mit Hilfe des 234 T-Zellklons, wie unter Abschnitt 4.6.2 beschrieben ist. Hier zeigt sich, daß der für die Zytolyse notwendige Beitrag des LFA-1-Integrins durch Überexpression des zytoplasmatischen CD18-Anteils inhibiert werden konnte, nicht jedoch durch Expression des sIg-CD18-F766Y Fusionsproteins. Vermutlich interferiert diese Mutation mit der Interaktion zytoplasmatischer Faktoren, welche durch die Überexpression der CD18-Wildtypform von dem endogenen LFA-1-Integrin sequestriert werden. Dabei kann dieser dominant-negative Effekt auf die Haplotyp-spezifische Zytolyse einerseits durch Inhibition der Integrin-Signaltransduktion erfolgen. Durch diese Modulation der Wechselwirkung mit intrazellulären Bindungspartnern der CD18-Kette könnte andererseits der Übergang des Integrins in einen für effiziente Ligandenbindung notwendigen aktiven Zustand beeinflußt werden. Damit würde sich die Expression der isolierten CD18-Untereinheit auf die Adhäsivität des gesamten Integrins auswirken.

Zusammengenommen machen diese Ergebnisse deutlich, daß die NPXY-Regionen multifunktionelle Protein-Interaktionsdomänen darstellen. Deren Regulation kann durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes erfolgen, wodurch wiederum Interaktionen mit zellulären Proteinen moduliert werden können. Unter diesem Aspekt scheint das Vorhandensein zweier Phenylalaninreste innerhalb der CD18-Sequenz anstelle der beiden Tyrosinreste, wie

beispielsweise bei der Integrin CD29-Untereinheit, auf eine generelle Bedeutung dieser Motive in diesem Bereich hinzuweisen. Im Falle des LFA-1-Integrins ist z.B. somit eine Regulationsmöglichkeit durch Tyrosinphosphorylierung erst gar nicht gegeben. Durch diese Variationen in den NPXF/Y-Motive könnte die funktionelle Spezifität der verschiedenen Integrin-Subfamilien erhöht werden, je nachdem in welchem Zelltyp sie exprimiert werden. Zudem wäre dadurch auch regulierbar, in welchem Ausmaß die jeweilige Subfamilie zum Beispiel in die Vermittlung von Zelladhäsivität oder der Signalweiterleitung involviert ist. Wie in Abbildung 5.6 schematisch dargestellt, konnte aufgrund der vorhergehend dargelegten Ergebnisse ein Modell einer möglichen Kopplung von Adhäsions- und Signalfunktion des LFA-1-Integrins entwickelt werden.

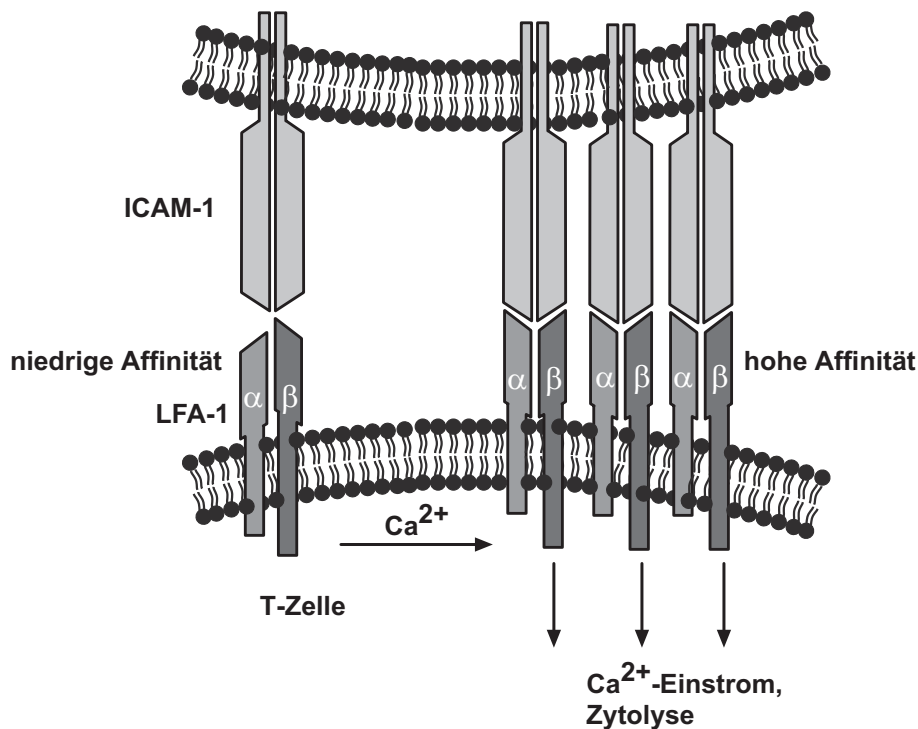


Abbildung 5.6: **Schema einer möglichen Kopplung der Adhäsions- und Signalfunktion der  $\beta$ 2-Integrine.** Der Übergang des Integrins von einer Konformation mit niedriger zu hoher Affinität für Ligandenbindung könnte durch strukturelle Änderungen nach ICAM-Bindung erfolgen. Dadurch könnte durch die Interaktion der  $\beta$ 2-Untereinheit mit dem Liganden ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration stattfinden. In der Folge könnte der Übergang des Integrins in den hochaffinen Zustand beschleunigt werden. Zusätzlich könnte das freigesetzte Calcium zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden beitragen. Durch die Verwendung von sIg-Fusionsproteinen, war es vermutlich möglich, den ersten Schritt zu umgehen und nach Quervernetzung der  $\beta$ 2-Untereinheit direkt intrazelluläre Signalwege einzuleiten.



## 5.5 Ausblick

Ein wichtiger Aspekt zur weiteren Charakterisierung der Rolle des  $\beta 2$ -Integrins bei der T-Zell-Aktivierung wäre die Identifizierung zellulärer Faktoren, welche die Signal- bzw. Adhäsionsfunktion vermitteln. Um die unterschiedlichen Signalkapazitäten der  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Integrine in T-Zellen erklären zu können, ist es dabei wichtig, bereits bekannte Interaktionspartner der NPXF/Y-Motive zu untersuchen. Hierzu müßten gegebenenfalls aber auch neue Faktoren identifiziert werden, deren Bindung an diese Sequenzabschnitte die Signalfunktion beider Integrin-Subfamilien beeinflußt. Weiterhin wäre es in diesem Zusammenhang von essentieller Bedeutung zu analysieren, welche weiteren Elemente der TCR-Signalkaskade neben der TCR- $\zeta$ -Kette in die Signalfunktion der CD18-Untereinheit involviert sind. Dazu zählt ebenso die Aufklärung der Mechanismen, über die Tyrosinkinasen der Syk- und Src-Familie zur CD18-Signaltransduktion beitragen. Desweiteren wäre es von großem Interesse zu ermitteln, auf welchem Weg die Signalübertragung zwischen dem LFA-1-Integrin und dem TCR erfolgt. In diesem Kontext ist es wichtig die Involvierung des DNAM-1-Proteins in die  $\beta 2$ -Integrin-vermittelte Signaltransduktion detaillierter zu untersuchen.

Essentiell wäre auch die Durchführung zusätzlicher Experimente zur Unterscheidung, welche molekularen Grundlagen dem dominant-negativen Effekt auf die Zytolyse nach Überexpression des zytoplasmatischen CD18-Anteils zugrunde liegen. Dabei wäre es von Vorteil, ein für die  $\beta 2$ -Untereinheit-defizientes Zellsystem zu etablieren, in dem nach dessen Rekonstitution mit verschiedenen Varianten der  $\beta 2$ -Untereinheit gleichermaßen die Adhäsions- und Signalfunktion des LFA-1-Integrins analysiert werden könnte.

Darüberhinaus wäre für weitere Analysen der LFA-1-Signaltransduktion die Herstellung eines Mäusestamms von außerordentlicher Bedeutung, in dessen Genom das Gen der  $\beta 2$ -Kette ausgeschaltet ist (knock-out). Durch Wiedereinbringen verschiedener Varianten der  $\beta 2$ -Untereinheit könnten somit die Auswirkungen auf die LFA-1-Signalfunktion untersucht werden.



## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

**Acuto O. und Cantrell D.** (2000). T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* **18**: 165-84.

**Akashi K., Reya T., Dalma-Weiszhausz D. und Weissman I.L.** (2000). Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* **12**: 144-50.

**Akiyama S.K., Yamada S.S., Yamada K.M. und LaFlamme S.E.** (1994). Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. *J Biol Chem* **269**: 15961-4.

**Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K. und Juliano R.L.** (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**: 197-263.

**Aplin A.E., Howe A.K. und Juliano R.L.** (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 737-44.

**Aruffo A. und Seed B.** (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8573-7.

**Axelsson L., Hellberg C., Melander F., Smith D., Zheng L. und Andersson T.** (2000). Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase. *Exp Cell Res* **256**: 257-63.

**Bachmann M.F., McKall-Faienza K., Schmits R., Bouchard D., Beach J., Speiser D.E., Mak T.W. und Ohashi P.S.** (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* **7**: 549-57.

**Bachmann M.F., Zinkernagel R.M. und Oxenius A.** (1998). Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J Immunol* **161**: 5791-4.

**Berridge M., Lipp P. und Bootman M.** (1999). Calcium signalling. *Curr Biol* **9**: R157-9.

**Berridge M.J.** (1997). Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol* **17**: 155-78.

**Berridge M.J., Lipp P. und Bootman M.D.** (2000). Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* **287**: 1604-5.

- Besser M. und Wank R.** (1999). Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol* **162**: 6303-6.
- Birnboim H.C. und Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Bothwell M. und Giniger E.** (2000). Alzheimer's disease: neurodevelopment converges with neurodegeneration. *Cell* **102**: 271-3.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brdicka T., Cerny J. und 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**: 356-60.
- Brockdorff J., Kanner S.B., Nielsen M., Borregaard N., Geisler C., Svejgaard A. und Odum N.** (1998). Interleukin-2 induces beta2-integrin-dependent signal transduction involving the focal adhesion kinase-related protein B (fakB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6959-64.
- Brown D.A. und London E.** (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111-36.
- Brown M.J. und Shaw S.** (1999). T-cell activation: interplay at the interface. *Curr Biol* **9**: R26-8.
- Cantrell D.** (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* **14**: 259-74.
- Caplan S. und Baniyash M.** (2000). Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. *Immunol Today* **21**: 223-8.
- Caplan S., Zeliger S., Wang L. und Baniyash M.** (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4768-72.
- Caron E., Self A.J. und Hall A.** (2000). The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* **10**: 974-8.
- Carpino N., Wisniewski D., Strife A., Marshak D., Kobayashi R., Stillman B. und Clarkson B.** (1997). p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* **88**: 197-204.

- Cary L.A. und Cooper J.A.** (2000). Molecular switches in lipid rafts. *Nature* **404**: 945, 7.
- Casadaban M.J. und Cohen S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**: 179-207.
- Casasnovas J.M., Stehle T., Liu J.H., Wang J.H. und Springer T.A.** (1998). A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4134-9.
- Cerny J., Stockinger H. und Horejsi V.** (1996). Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins. *Eur J Immunol* **26**: 2335-43.
- Chambers C.A. und Allison J.P.** (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 203-10.
- Chan A.C. und Shaw A.S.** (1996). Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* **8**: 394-401.
- Chang D.D., Wong C., Smith H. und Liu J.** (1997). ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* **138**: 1149-57.
- Clevers H., Alarcon B., Wileman T. und Terhorst C.** (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* **6**: 629-62.
- Clipstone N.A. und Crabtree G.R.** (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**: 695-7.
- De Deyne P.G., O'Neill A., Resneck W.G., Dmytrenko G.M., Pumphlin D.W. und Bloch R.J.** (1998). The vitronectin receptor associates with clathrin-coated membrane domains via the cytoplasmic domain of its beta5 subunit. *J Cell Sci* **111**: 2729-40.
- Dedhar S. und Hannigan G.E.** (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 657-69.
- Delon J. und Germain R.N.** (2000). Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* **10**: R923-33.
- DeMali K.A., Balciunaite E. und Kazlauskas A.** (1999). Integrins enhance platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent responses by altering the signal relay enzymes that are recruited to the PDGF beta receptor. *J Biol Chem* **274**: 19551-8.
- Dib K.** (2000). BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* **5**: D438-51.
- Dustin M.L. und Chan A.C.** (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* **103**: 283-94.

- Dustin M.L. und Cooper J.A.** (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunol* **1**: 23-9.
- Dustin M.L., Olszowy M.W., Holdorf A.D., Li J., Bromley S., Desai N., Widder P., Rosenberger F., van der Merwe P.A., Allen P.M. und Shaw A.S.** (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**: 667-77.
- Dustin M.L. und Shaw A.S.** (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* **283**: 649-50.
- Dustin M.L. und Springer T.A.** (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* **9**: 27-66.
- Eid J.E., Kung A.L., Scully R. und Livingston D.M.** (2000). p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion. *Cell* **102**: 839-48.
- Emsley J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J. und Liddington R.C.** (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* **101**: 47-56.
- Fabbri M., Fumagalli L., Bossi G., Bianchi E., Bender J.R. und Pardi R.** (1999). A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *Embo J* **18**: 4915-25.
- Falkner F.G. und Moss B.** (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* **62**: 1849-54.
- Farooq A., Plotnikova O., Zeng L. und Zhou M.M.** (1999). Phosphotyrosine binding domains of Shc and insulin receptor substrate 1 recognize the NPXpY motif in a thermodynamically distinct manner. *J Biol Chem* **274**: 6114-21.
- Fenczik C.A., Sethi T., Ramos J.W., Hughes P.E. und Ginsberg M.H.** (1997). Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* **390**: 81-5.
- Fraser J.D., Straus D. und Weiss A.** (1993). Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol Today* **14**: 357-62.
- Fraser J.D. und Weiss A.** (1992). Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28. *Mol Cell Biol* **12**: 4357-63.
- Gahmberg C.G.** (1997). Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 643-50.

- Gautam N., Herwald H., Hedqvist P. und Lindbom L.** (2000). Signaling via beta(2) integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *J Exp Med* **191**: 1829-39.
- Geiger C., Nagel W., Boehm T., van Kooyk Y., Figdor C.G., Kremmer E., Hogg N., Zeitlmann L., Dierks H., Weber K.S. und 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.
- Giancotti F.G.** (1997). Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 691-700.
- Gilmore E.C. und Herrup K.** (2000). Cortical development: receiving reelin. *Curr Biol* **10**: R162-6.
- Glaichenhaus N., Shastri N., Littman D.R. und Turner J.M.** (1991). Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* **64**: 511-20.
- Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M. und Dustin M.L.** (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**: 221-7.
- Green J.M., Zhelesnyak A., Chung J., Lindberg F.P., Sarfati M., Frazier W.A. und Brown E.J.** (1999). Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* **146**: 673-82.
- Hackel P.O., Zwick E., Prenzel N. und Ullrich A.** (1999). Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 184-9.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P. und Simons K.** (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**: 929-42.
- Harhaj E.W. und Sun S.C.** (1998). I kappa B kinases serve as a target of CD28 signaling. *J Biol Chem* **273**: 25185-90.
- 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. und et al.** (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**: 32-8.

- Hellberg C., Eierman D., Sjolander A. und Andersson T.** (1995). The Ca<sup>2+</sup> signaling capacity of the beta 2-integrin on HL60-granulocytic cells is abrogated following phosphorylation of its CD18-chain: relation to impaired protein tyrosine phosphorylation. *Exp Cell Res* **217**: 140-8.
- Hellberg C., Molony L., Zheng L. und Andersson T.** (1996). Ca<sup>2+</sup> signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. *Biochem J* **317**: 403-9.
- Hemler M.E.** (1998). Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 578-85.
- Hibbs M.L., Jakes S., Stacker S.A., Wallace R.W. und Springer T.A.** (1991). The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* **174**: 1227-38.
- Hogg N., Stewart M.P., Scarth S.L., Newton R., Shaw J.M., Law S.K. und Klein N.** (1999). A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* **103**: 97-106.
- Horejsi V., Drbal K., Cebecauer M., Cerny J., Brdicka T., Angelisova P. und Stockinger H.** (1999). GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today* **20**: 356-61.
- Howe A., Aplin A.E., Alahari S.K. und Juliano R.L.** (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 220-31.
- Hughes P.E. und Pfaff M.** (1998). Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* **8**: 359-64.
- Hynes R.O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Jackson T.R., Kearns B.G. und Theibert A.B.** (2000). Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci* **25**: 489-95.
- Janes P.W., Ley S.C. und Magee A.I.** (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* **147**: 447-61.
- Janes P.W., Ley S.C., Magee A.I. und Kabouridis P.S.** (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* **12**: 23-34.
- Janeway C.A. und Bottomly K.** (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**: 275-85.
- June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M. und Thompson C.B.** (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* **15**: 321-31.



- June C.H., Ledbetter J.A., Gillespie M.M., Lindsten T. und Thompson C.B.** (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* **7**: 4472-81.
- Kane L.P., Lin J. und Weiss A.** (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* **12**: 242-9.
- Kanner S.B.** (1996). Focal adhesion kinase-related fakB is regulated by the integrin LFA-1 and interacts with the SH3 domain of phospholipase C gamma 1. *Cell Immunol* **171**: 164-9.
- Kanner S.B., Grosmaire L.S., Ledbetter J.A. und Damle N.K.** (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7099-103.
- Katagiri K., Hattori M., Minato N., Irie S., Takatsu K. und Kinashi T.** (2000). Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* **20**: 1956-69.
- Kishimoto T.K., O'Conner K. und Springer T.A.** (1989). Leukocyte adhesion deficiency. Aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype. *J Biol Chem* **264**: 3588-95.
- Knorr R. und Dustin M.L.** (1997). The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow. *J Exp Med* **186**: 719-30.
- Knorr T., Nagel W. und Kolanus W.** (2000). Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur J Biochem* **267**: 3784-91.
- Kolanus W., Nagel W., Schiller B., Zeitlmann L., Godar S., Stockinger H. und 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.
- Kolanus W., Romeo C. und Seed B.** (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* **74**: 171-83.
- Kolanus W., Romeo C. und Seed B.** (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* **74**: 171-83.
- Krauss K. und Altevogt P.** (1999). Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* **274**: 36921-7.

- Krensky A.M., Robbins E., Springer T.A. und Burakoff S.J.** (1984). LFA-1, LFA-2, and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J Immunol* **132**: 2180-2.
- Krensky A.M., Sanchez-Madrid F., Robbins E., Nagy J.A., Springer T.A. und Burakoff S.J.** (1983). The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* **131**: 611-6.
- Krummel M.F., Sjaastad M.D., Wulfing C. und Davis M.M.** (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* **289**: 1349-52.
- LaFlamme S.E., Thomas L.A., Yamada S.S. und Yamada K.M.** (1994). Single subunit chimeric integrins as mimics and inhibitors of endogenous integrin functions in receptor localization, cell spreading and migration, and matrix assembly. *J Cell Biol* **126**: 1287-98.
- Lama J., Guinea R., Martinez-Abarca F. und Carrasco L.** (1992). Cloning and inducible synthesis of poliovirus nonstructural proteins. *Gene* **117**: 185-92.
- Langlet C., Bernard A.M., Drevot P. und He H.T.** (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* **12**: 250-5.
- Lanzavecchia A. und Sallusto F.** (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* **12**: 92-8.
- Ledbetter J.A., Gentry L.E., June C.H., Rabinovitch P.S. und Purchio A.F.** (1987). Stimulation of T cells through the CD3/T-cell receptor complex: role of cytoplasmic calcium, protein kinase C translocation, and phosphorylation of pp60c-src in the activation pathway. *Mol Cell Biol* **7**: 650-6.
- Lee J.O., Rieu P., Arnaout M.A. und Liddington R.** (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**: 631-8.
- Leung B.L., Haughn L., Veillette A., Hawley R.G., Rottapel R. und Julius M.** (1999). TCR alpha beta-independent CD28 signaling and costimulation require non-CD4-associated Lck. *J Immunol* **163**: 1334-41.
- Li Y., Paz Marzolo M., van Kerkhof P., Strous G.J. und Bu G.** (2000). The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **275**: 17187-94.
- Liddington R.C. und Bankston L.A.** (2000). The structural basis of dynamic cell adhesion: heads, tails, and allostery. *Exp Cell Res* **261**: 37-43.
- Liliental J. und Chang D.D.** (1998). Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem* **273**: 2379-83.

- Lin T.H., Chen Q., Howe A. und Juliano R.L.** (1997). Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. *J Biol Chem* **272**: 8849-52.
- Linsley P.S. und Ledbetter J.A.** (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* **11**: 191-212.
- Loftus J.C., Smith J.W. und Ginsberg M.H.** (1994). Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J Biol Chem* **269**: 25235-8.
- Lopata M.A., Cleveland D.W. und Sollner-Webb 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**: 5707-17.
- Love P.E. und Shores E.W.** (2000). ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* **12**: 591-7.
- Lub M., van Kooyk Y. und Figdor C.G.** (1995). Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* **16**: 479-83.
- Lukashev M.E., Sheppard D. und Pytela R.** (1994). Disruption of integrin function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **269**: 18311-4.
- Meldolesi J. und Pozzan T.** (1998). The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* **23**: 10-4.
- Meng F. und Lowell C.A.** (1998). A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *Embo J* **17**: 4391-403.
- Mentzer S.J., Bierer B.E., Anderson D.C., Springer T.A. und Burakoff S.J.** (1986). Abnormal cytolytic activity of lymphocyte function-associated antigen-1-deficient human cytolytic T lymphocyte clones. *J Clin Invest* **78**: 1387-91.
- Miller J., Knorr R., Ferrone M., Houdei R., Carron C.P. und Dustin M.L.** (1995). Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* **182**: 1231-41.
- Molony L., Ng-Sikorski J., Hellberg C. und Andersson T.** (1996). Inhibitors of farnesyl and geranylgeranyl methyltransferases prevent beta 2 integrin-induced actin polymerization without affecting beta 2 integrin-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 612-7.

- Monks C.R., Freiberg B.A., Kupfer H., Sciaky N. und Kupfer A.** (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**: 82-6.
- Montixi C., Langlet C., Bernard A.M., Thimonier J., Dubois C., Wurbel M.A., Chauvin J.P., Pierres M. und He H.T.** (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* **17**: 5334-48.
- Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G. und Defilippi P.** (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *Embo J* **17**: 6622-32.
- Mullis K.B. und Faloona F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Myung P.S., Boerthe N.J. und Koretzky G.A.** (2000). Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* **12**: 256-66.
- Noguchi T., Matozaki T., Inagaki K., Tsuda M., Fukunaga K., Kitamura Y., Kitamura T., Shii K., Yamanashi Y. und Kasuga M.** (1999). Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *Embo J* **18**: 1748-60.
- Norian L.A. und Koretzky G.A.** (2000). Intracellular adapter molecules. *Semin Immunol* **12**: 43-54.
- Oliferenko S., Paiha K., Harder T., Gerke V., Schwarzler C., Schwarz H., Beug H., Gunthert U. und Huber L.A.** (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **146**: 843-54.
- O'Toole T.E., Ylanne J. und Culley B.M.** (1995). Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **270**: 8553-8.
- Pande G.** (2000). The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 569-74.
- Penninger J.M. und Crabtree G.R.** (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* **96**: 9-12.
- Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J. und Smith J.W.** (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**: 21785-8.
- Poltilove R.M., Jacobs A.R., Haft C.R., Xu P. und Taylor S.I.** (2000). Characterization of Drosophila insulin receptor substrate. *J Biol Chem* **275**: 23346-54.
- Prigent S.A., Pillay T.S., Ravichandran K.S. und Gullick W.J.** (1995). Binding of Shc to the NPXY motif is mediated by its N-terminal domain. *J Biol Chem* **270**: 22097-100.

- Qu A. und Leahy D.J.** (1995). Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10277-81.
- Reilly P.L., Woska J.R., Jeanfavre D.D., McNally E., Rothlein R. und Bormann B.J.** (1995). The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol* **155**: 529-32.
- Reth M. und Wienands J.** (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**: 453-79.
- Rey-Ladino J.A., Pyszniak A.M. und Takei F.** (1998). Dominant-negative effect of the lymphocyte function-associated antigen-1 beta (CD18) cytoplasmic domain on leukocyte adhesion to ICAM-1 and fibronectin. *J Immunol* **160**: 3494-501.
- Roach T.I., Slater S.E., White L.S., Zhang X., Majerus P.W., Brown E.J. und Thomas M.L.** (1998). The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates integrin-mediated adhesion of macrophages. *Curr Biol* **8**: 1035-8.
- Rodriguez-Fernandez J.L., Gomez M., Luque A., Hogg N., Sanchez-Madrid F. und Cabanas C.** (1999). The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* **10**: 1891-907.
- Romeo C., Amiot M. und Seed B.** (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* **68**: 889-97.
- Romeo C. und Seed B.** (1991). Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* **64**: 1037-46.
- Romzek N.C., Harris E.S., Dell C.L., Skronek J., Hasse E., Reynolds P.J., Hunt S.W. und Shimizu Y.** (1998). Use of a beta1 integrin-deficient human T cell to identify beta1 integrin cytoplasmic domain sequences critical for integrin function. *Mol Biol Cell* **9**: 2715-27.
- Rozdzial M.M., Malissen B. und Finkel T.H.** (1995). Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* **3**: 623-33.
- Rozelle A.L., Machesky L.M., Yamamoto M., Driessens M.H., Insall R.H., Roth M.G., Luby-Phelps K., Marriott G., Hall A. und Yin H.L.** (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**: 311-20.
- Rudd C.E.** (1999). Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* **96**: 5-8.

- Sakai T., de la Pena J.M. und Mosher D.F.** (1999). Synergism among lysophosphatidic acid, beta1A integrins, and epidermal growth factor or platelet-derived growth factor in mediation of cell migration. *J Biol Chem* **274**: 15480-6.
- Sakai T., Zhang Q., Fassler R. und Mosher D.F.** (1998). Modulation of beta1A integrin functions by tyrosine residues in the beta1 cytoplasmic domain. *J Cell Biol* **141**: 527-38.
- Sanchez-Madrid F. und del Pozo M.A.** (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* **18**: 501-11.
- Schendel D.J., Wank R. und Dupont B.** (1979). Standardization of the human in vitro cell-mediated lympholysis technique. *Tissue Antigens* **13**: 112-20.
- Schmits R., Kundig T.M., Baker D.M., Shumaker G., Simard J.J., Duncan G., Wakeham A., Shahinian A., van der Heiden A., Bachmann M.F., Ohashi P.S., Mak T.W. und Hickstein D.D.** (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* **183**: 1415-26.
- Schoenwaelder S.M. und Burridge K.** (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 274-86.
- Schwartz R.H.** (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**: 1065-8.
- Sedwick C.E., Morgan M.M., Jusino L., Cannon J.L., Miller J. und Burkhardt J.K.** (1999). TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol* **162**: 1367-75.
- Shapiro V.S., Truitt K.E., Imboden J.B. und Weiss A.** (1997). CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* **17**: 4051-8.
- Shaw A.S. und Dustin M.L.** (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**: 361-9.
- Shaw S. und Luce G.E.** (1987). The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J Immunol* **139**: 1037-45.
- Shibuya A., Campbell D., Hannum C., Yssel H., Franz-Bacon K., McClanahan T., Kitamura T., Nicholl J., Sutherland G.R., Lanier L.L. und Phillips J.H.** (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **4**: 573-81.

- Shibuya K., Lanier L.L., Phillips J.H., Ochs H.D., Shimizu K., Nakayama E., Nakauchi H. und Shibuya A.** (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* **11**: 615-23.
- Siefken R., Kurrle R. und Schwitzer R.** (1997). CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex. *Cell Immunol* **176**: 59-65.
- Simons K. und Ikonen E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-72.
- Simons K. und Ikonen E.** (2000). How cells handle cholesterol. *Science* **290**: 1721-6.
- Simons K. und Toomre D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews* **1**: 31-9.
- Soede R.D., Driessens M.H., Ruuls-Van Stalle L., Van Hulten P.E., Brink A. und Roos E.** (1999). LFA-1 to LFA-1 signals involve zeta-associated protein-70 (ZAP-70) tyrosine kinase: relevance for invasion and migration of a T cell hybridoma. *J Immunol* **163**: 4253-61.
- Soede R.D., Wijnands Y.M., Van Kouteren-Cobzaru I. und Roos E.** (1998). ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J Cell Biol* **142**: 1371-9.
- Springer T.A.** (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-14.
- Springer T.A.** (1997). Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 65-72.
- Springer T.A., Dustin M.L., Kishimoto T.K. und Marlin S.D.** (1987). The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* **5**: 223-52.
- Stewart M., Thiel M. und Hogg N.** (1995). Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 690-6.
- Stroeken P.J., van Rijthoven E.A., Boer E., Geerts D. und Roos E.** (2000). Cytoplasmic domain mutants of beta1 integrin, expressed in beta 1-knockout lymphoma cells, have distinct effects on adhesion, invasion and metastasis. *Oncogene* **19**: 1232-8.
- Tabassam F.H., Umehara H., Huang J.Y., Gouda S., Kono T., Okazaki T., van Seventer J.M. und Domae N.** (1999). Beta2-integrin, LFA-1, and TCR/CD3 synergistically induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125(FAK)) in PHA-activated T cells. *Cell Immunol* **193**: 179-84.
- Tacke M., Hanke G., Hanke T. und Hunig T.** (1997). CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* **27**: 239-47.

- Takada Y., Kamata T., Irie A., Puzon-McLaughlin W. und Zhang X.P.** (1997). Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol* **16**: 143-51.
- Tomita S., Ozaki T., Taru H., Oguchi S., Takeda S., Yagi Y., Sakiyama S., Kirino Y. und Suzuki T.** (1999). Interaction of a neuron-specific protein containing PDZ domains with Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **274**: 2243-54.
- Tsuchida M., Manthei E.R., Alam T., Knechtle S.J. und Hamawy M.M.** (1999). T cell activation up-regulates the expression of the focal adhesion kinase Pyk2: opposing roles for the activation of protein kinase C and the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *J Immunol* **163**: 6640-50.
- van der Merwe P.A., Davis S.J., Shaw A.S. und Dustin M.L.** (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* **12**: 5-21.
- Van Gool S.W., Vandenberghe P., de Boer M. und Ceuppens J.L.** (1996). CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* **153**: 47-83.
- van Kooyk Y. und Figdor C.G.** (2000). Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 542-7.
- van Leeuwen J. und Samelson L.E.** (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* **11**: 242-8.
- van Oers N.S.** (1999). T cell receptor-mediated signs and signals governing T cell development. *Semin Immunol* **11**: 227-37.
- Van Seventer G.A., Bonvini E., Yamada H., Conti A., Stringfellow S., June C.H. und Shaw S.** (1992). Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4<sup>+</sup> T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J Immunol* **149**: 3872-80.
- Viola A., Schroeder S., Sakakibara Y. und Lanzavecchia A.** (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**: 680-2.
- Weber K.S., York M.R., Springer T.A. und Klickstein L.B.** (1997). Characterization of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)-deficient T cell lines: the alphaL and beta2 subunits are interdependent for cell surface expression. *J Immunol* **158**: 273-9.
- Weiss A. und Littman D.R.** (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-74.



- Wulfig C. und Davis M.M.** (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**: 2266-9.
- Wulfig C., Sjaastad M.D. und Davis M.M.** (1998). Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6302-7.
- Xavier R., Brennan T., Li Q., McCormack C. und Seed B.** (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**: 723-32.
- Xavier R. und Seed B.** (1999). Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* **11**: 265-9.
- Yamada K.M.** (1997). Integrin signaling. *Matrix Biol* **16**: 137-41.
- Yan S.R., Huang M. und Berton G.** (1997). Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol* **158**: 1902-10.
- Zeitlmann L., Knorr T., Knoll M., Romeo C., Sirim P. und Kolanus W.** (1998). T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem* **273**: 15445-52.
- Zeitlmann L., Sirim P., Kremmer E. und Kolanus W.** (2001). Cloning of acp33 as a novel intracellular ligand of cd4. *J Biol Chem* **276**: 9123-32.
- Zhang W. und Samelson L.E.** (2000). The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* **12**: 35-41.
- Zheng L., Sjolander A., Eckerdal J. und Andersson T.** (1996). Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8431-6.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
amp	Ampicillin (oder: $\beta$ -Lactamase-Gen)
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i> (MHC-exprimierende Zelle)
APP	<i>Alzheimer's amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CPD	<i>cytoplasmic domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Gruppe von Antikörpern)
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
Dab1	<i>Disabled</i>
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNAM-1	<i>DNAX accessory molecule-1</i>
Dok	<i>docking protein</i>
DTT	1,4-Dithiotreitol
dNTP	Desoxy-Nukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EtBr	Ethidiumbromid

---

EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflußzytometer)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAP	GTPase activating protein
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GPI-	Glycosylphosphatidylinositol-
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin N'-2-Ethansulfonsäure
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAP-1	<i>integrin cytoplasmic domain-associated protein-1</i>
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IR	Insulin Rezeptor
IRS	Substrat des Insulin Rezeptors
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation signal</i> (zytoplasmatisches Tyrosinmotiv in Immunrezeptoren)
kD	Kilodalton
LAD	<i>leukocyte adhesion deficiency</i>
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)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
M	Mol/Liter
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (Monoklonaler Antikörper)
MBP	Maltose-bindendes Protein
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Anzahl infektiöser Partikel)
MPA	<i>mycophenoloc acid</i> (Mycophenolsäure)

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-AT	Nukleärer Faktor in aktivierten T-Zellen
NK	Natürliche Killer
NP-40	Nichtionisches Detergenz P 40
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysii</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	PolyethylenGlycol
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
Rack	receptor for activated C-kinases
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>radiations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie
Shc	<i>SH2 containing adapter protein</i>
SLP	SH2-Domänen-Leukozytenprotein
SMAC	<i>supramolecular activation cluster</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SYT	<i>synovial sarcoma translocation</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TMD	transmembrane Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYM	<i>Tryptone Yeast extract Medium</i>
U	Units
ÜN	Übernacht-
ÜK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes
ZAP-70	zeta-assoziiertes Protein von 70 kD Molekulargewicht



### 6.3 Tabellarischer Lebenslauf

#### *Persönliche Daten*

Name, Vorname:	Sirim, Pinar
Geburtsdatum:	24. Oktober 1970
Geburtsort:	Iskenderun (Türkei)
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

#### *Schulbildung*

1977-1981	Grundschule Ludwigsburg
1981-1990	Goethe-Gymnasium Ludwigsburg

#### *Hochschulstudium*

1990-1991	Biochemie (Diplom) an der Ruhr-Universität Bochum
1991-1996	Fortsetzung des Biochemie-Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

#### *Prüfungen*

April 1993	Vordiplom
Juni bis Okt. 1995	Diplom-Prüfungen

#### *Diplom- und Doktorarbeit*

Nov. 1995- Aug. 1996	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen unter Anleitung von PD Dr. Thomas Brümmendorf; <b>Thema:</b> Molekularbiologische Charakterisierung von FAR-2, einem Glycoprotein der Immunglobulin-Superfamilie aus dem Nervensystem des Huhns
Okt. 1996-Nov. 2000	Anfertigung der Dissertation im Labor von Prof. Dr. Waldemar Kolanus am Genzentrum der Universität München, <b>Thema der Dissertation:</b> Funktionelle Charakterisierung der Signaltransduktionskaskade des LFA-1-Integrins

