

# **Funktionelle Auswirkungen der 77C→G Mutation im Exon A des CD45-Gens des Menschen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität

Hannover

zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat**

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Hue-Tran Hornig-Do

geboren am 07.10.1976 in Saigon

2005

Referent: Prof. Dr. W. Müller  
Korreferent: Prof. Dr. R. Schwinzer  
Tag der Promotion: 07.02.2005

## Abstract

The tyrosine phosphatase CD45 plays an essential role in T cell receptor (TCR)-mediated signal transduction. The 77C→G mutation in exon A of the human CD45 gene occurs with low frequency (1-2%) in healthy individuals. An enhanced frequency of the mutation has been described in cohorts of patients suffering from multiple sclerosis (MS), systemic sclerosis and autoimmune hepatitis suggesting that the variant allele may contribute to autoimmunity. The hyperreactivity of 77C→G T cells found in this thesis may help to understand these disease associations. The 77C→G mutation leads to a variant expression pattern of CD45RA isoforms on cell types which usually are CD45RA negative (e.g. activated/memory T cells). The detailed functional characterization of 77C→G cells presented here is also of relevance for a better understanding of the role of individual CD45 isoforms in signal transduction. The following results were obtained:

Memory T cells and *in vitro* activated T cells from healthy heterozygous carriers of the 77C→G mutation responded with stronger proliferation and enhanced IL-2 synthesis to stimulation with anti-TCR/CD3 mAb and alloantigen compared to wild type control cells. T cells from MS patients carrying 77C→G also responded stronger to TCR/CD3 activation than CD45 wild-type MS patients. Compared to wild type control T cells 77C→G T cells showed increased phosphorylation of ZAP-70 and TCR- $\zeta$  and greater calcium mobilization upon TCR/CD3 ligation. T cells from individuals carrying the 77C→G mutation exhibited reduced phosphorylation of the negative regulatory tyrosine Tyr505 of the kinase p56<sup>lck</sup> and thereby enhanced p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase activity. Since Tyr505 is dephosphorylated by CD45 both observations indicate an elevated CD45 phosphatase activity in 77C→G cells. No significant effects of 77C→G were found in IL-2 mediated signalling pathway.

These data suggest that the aberrant expression of CD45RA isoforms on activated and memory T cells of individuals carrying 77C→G increases the sensitivity of TCR signal transduction. Due to the resulting T cell hyperreactivity 77C→G might be one of the factors which increase the susceptibility of affected individuals for certain autoimmune diseases.

### Keywords:

CD45, CD45 isoforms, CD45 polymorphism, T cell activation

## Zusammenfassung

Die Tyrosinphosphatase CD45 spielt eine Schlüsselrolle bei der T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelten Signaltransduktion. Die 77C→G Mutation im Exon A des CD45-Gens kommt mit geringer Frequenz in der gesunden Bevölkerung vor (1 bis 2% heterozygote Merkmalsträger). Personen mit der 77C→G Mutation wurden überproportional häufig in Kollektiven von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen (multiple Sklerose (MS), Sklerodermie und autoimmune Hepatitis) gefunden, so dass die Frage, wie die Mutation zum Risikofaktor für Erkrankungen werden kann, derzeit intensiv diskutiert wird. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Hyperreaktivität von 77C→G T-Zellen leistet einen Beitrag hierzu. Die 77C→G Mutation führt zu einer aberranten Expression von CD45RA-Isoformen auf Zellen, die normalerweise CD45RA-negativ sind (z.B. aktivierte oder „memory“ T-Zellen). Die hier vorgelegte Darstellung der funktionellen Besonderheiten von 77C→G T-Zellen ermöglicht daher auch eine weitergehende Einschätzung zur Bedeutung einzelner CD45-Isoformen im Signaltransduktionsgeschehen. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

„Memory“ T-Zellen und *in vitro* aktivierte T-Zellen von gesunden Personen mit 77C→G Mutation reagierten im Vergleich zu CD45-Wildtyp-Kontrollzellen mit verstärkter Proliferation und IL-2-Synthese auf die Stimulation durch TZR/CD3 mAk oder Alloantigen. T-Zellen von MS-Patienten mit 77C→G reagierten ebenfalls stärker auf die TZR/CD3-vermittelte Aktivierung als Zellen von Patienten mit Wildtyp-CD45. Im Vergleich zu T-Zellen von Kontrollpersonen zeigten T-Zellen von Personen mit 77C→G Mutation eine verstärkte Phosphorylierung der Zap-70 Kinase und der TZR-ζ-Kette sowie eine verstärkte Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation. Bei 77C→G T-Zellen wurden eine verminderte Phosphorylierung des inhibitorischen Tyr505 der Kinase p56<sup>lck</sup> und damit einhergehend eine erhöhte Kinase-Aktivität dieses Enzyms beobachtet. Da die Dephosphorylierung von Tyr505 durch CD45 erfolgt, weisen beide Beobachtungen auf eine erhöhte CD45-Phosphatase-Aktivität von 77C→G T-Zellen hin. Bei der IL-2-vermittelten Signaltransduktion wurden keine signifikanten Auswirkungen der 77C→G Mutation gefunden.

Aus diesen Ergebnissen wird der Schluss gezogen, dass die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen auf aktivierten und „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation die Effizienz der TZR-vermittelten Signaltransduktion verstärkt. Durch die damit verbundene erhöhte T-Zellreaktivität könnte 77C→G zu den Risikofaktoren gehören, die die Suszeptibilität der betroffenen Personen für bestimmte Autoimmunerkrankungen steigern.

### Schlagworte:

CD45, CD45-Isoformen, CD45-Polymorphismus, T-Zellaktivierung

# Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Aufbau und Struktur von CD45.....	3
1.3 Funktionen von CD45.....	4
1.3.1 Regulation von Src-Proteintyrosinkinasen durch CD45.....	5
1.3.2 Negative Regulation der Zytokinrezeptorvermittelten Signalwege.....	7
1.4 Die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität.....	8
1.5 Der 77C→G Polymorphismus im Exon A des CD45-Gens.....	10
<b>2 MATERIALIEN.....</b>	<b>13</b>
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Geräte.....	15
2.3 Verbrauchsmaterial.....	16
2.4 Kits und Substrate.....	16
2.5 Antikörper.....	17
2.5.1 Primärantikörper.....	17
2.5.2 Sekundärreagenzien.....	24
2.5.3 Blockierungsreagenzien.....	25
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>26</b>
3.1 Medien und Zellen.....	26
3.1.1 Medien und Kultivierungsbedingungen.....	26
3.1.2 Mononukleäre periphere Zellen von Blutspendern.....	26
3.1.3 PHA-Blasten.....	26
3.1.4 Alloreaktive CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinien.....	27
3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
3.1.6 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	28

3.2	Isolierung von Zellpopulationen.....	28
3.2.1	Isolierung von lymphoiden Zellen aus Leukotrap <sup>®</sup> -Filtern.....	28
3.2.2	Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Vollblut.....	29
3.2.3	Isolierung von Zellsubpopulationen durch MACS.....	29
3.2.3.1	Isolierung von "memory" und "naiven" T-Zellen.....	30
3.2.3.2	Anreicherung von T-Zellen durch positive Selektion.....	30
3.3	Stimulation von Lymphozyten.....	31
3.3.1	Stimulation von T-Zellsubsets mit TZR/CD3 und CD28 mAk.....	31
3.3.2	Stimulation von alloreaktiven Zelllinien mit Alloantigen.....	31
3.3.3	IL-2-induzierte Proliferation von PHA-Blasten.....	32
3.4	Messung der Proliferation.....	32
3.5	Durchflusszytometrische Analytik.....	32
3.5.1	Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen.....	33
3.5.2	Intrazelluläre IL-2-Färbung.....	34
3.5.3	Messung der Konzentration löslicher Zytokine.....	35
3.5.4	Messung des intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Spiegels.....	35
3.6	Nachweis der 77C→G Mutation.....	36
3.6.1	Isolierung der DNA.....	37
3.6.2	Polymerasekettenreaktion.....	37
3.6.3	Spaltung von PCR-Produkten mit dem Restriktionsenzym <i>MspI</i> .....	38
3.6.4	Nachweis der Spaltungsprodukte im Polyacrylamidgel.....	38
3.7	Analyse der Genexpression.....	39
3.7.1	Isolierung der RNA.....	39
3.7.2	RT-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	40
3.7.3	Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese....	41
3.7.4	Quantitative Analyse der PCR-Amplikate.....	42
3.7.5	Semiquantitative Analyse der Genexpression.....	42
3.8	Zell-Lyse.....	43
3.9	Proteinbestimmung nach Bradford.....	43
3.10	Immunpräzipitation.....	44
3.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
3.12	Western-Blot.....	46
3.12.1	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.....	46
3.12.2	Immundetektion.....	47

3.12.3 „Strippen“ der Membran.....	48
3.13 Proteinfärbungen.....	48
3.13.1 Coomassie Brillant Blau G250-Färbung.....	48
3.13.2 Proteinnachweis mittels Ponceau-S-Lösung.....	49
3.14 Proteinkinase-Assay.....	49
3.15 Phosphatase-Assay.....	50
3.16 Statistik.....	50
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
4.1 Darstellung des varianten CD45RA-Expressionsmusters und der 77C→G Punktmutation als molekulare Ursache.....	51
4.2 Funktionelle Konsequenzen der 77C→G Mutation bei gesunden Probanden.....	54
4.2.1 Auswirkungen von 77C→G auf die T-Zellrezeptorvermittelte Aktivierung.....	54
4.2.1.1 Proliferation und Zytokinproduktion nach TZR/CD3- und CD28- vermittelter Stimulation von frisch isolierten T-Zellsubsets.....	54
4.2.1.2 Proliferation und IL-2-Produktion nach Stimulation von CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinien mit Alloantigen.....	61
4.2.1.3 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach T-Zellrezeptorvermittelter Stimulation.....	66
4.2.1.3.1 Induktion von Tyrosinphosphorylierungen.....	66
4.2.1.3.2 Phosphorylierung der TZR-ζ-Kette und Zap-70 Kinase.....	67
4.2.1.3.3 Erhöhung des zytoplasmatischen Ca <sup>2+</sup> -Spiegels.....	70
4.2.2 Auswirkungen der 77C→G Mutation auf die Zytokininduzierte Aktivierung.....	72
4.2.2.1 Proliferation von T-Zelllinien nach Stimulation mit den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-15.....	72
4.2.2.2 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach IL-2-vermittelter Stimulation...	74
4.2.2.2.1 Tyrosinphosphorylierung von JAK1.....	74
4.2.2.2.2 Tyrosinphosphorylierung von STAT5.....	76
4.3 Vergleich der T-Zellreaktivität bei MS-Patienten mit normaler und varianter CD45RA-Expression.....	78
4.4 Einfluss der 77C→G Mutation auf die CD45-Phosphatase-Aktivität.....	80
4.4.1 Phosphatase-Aktivität von CD45-Präzipitaten.....	80

4.4.2	Phosphorylierung von Tyr505 der Kinase p56 <sup>lck</sup> .....	82
4.4.3	Kinase-Aktivität von p56 <sup>lck</sup> .....	83
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
5.1	Die 77C→G Mutation als Ursache für die Hyperreaktivität aktivierter T-Zellen varianter Personen.....	86
5.2	Der molekulare Mechanismus der Hyperreaktivität.....	90
5.3	Die Bedeutung der 77C→G Mutation im Krankheitsgeschehen.....	96
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>106</b>
	Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit.....	113
	Lebenslauf.....	115
	Danksagung.....	116

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.U.	<i>Arbitrary Unit/ Schwärzungseinheit</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute/ Zählimpuls pro Minute</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethylpuyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sobent Assay</i>
ESS	<i>Exonic Splice Silencer</i>
EthBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußzytometer ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )
G	Guanin
G $\alpha$ m	Ziege anti Maus Antikörper
G $\alpha$ rab	Ziege anti Kaninchen Antikörper
GEM	<i>glyosphingolipd enriched membranes</i>
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peoxidase</i> )
<sup>3</sup> H-TdR	Tritiummarkiertes Thymidin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase

KM	Kulturmedium
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i> / Magnetische Zellsortierung
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytoämagglutinin
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
u	<i>Unit</i> /Einheit
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
V	Volt
w/v	Masse/Volumen



# 1. Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Bei der Aktivierung von Lymphozyten wird die antigenspezifische Signaltransduktion durch ein dynamisches Zusammenspiel aus dem TZR/CD3-Komplex, verschiedenen akzessorischen Molekülen (wie z.B. CD4 oder CD8), Tyrosinkinase und Tyrosinphosphatasen vermittelt. Zu diesen Faktoren gehört die auf allen kernhaltigen, hämatopoetischen Zellen vorkommende Tyrosinphosphatase CD45, deren enzymatische Aktivität nicht nur für eine effiziente T- und B-Zellrezeptorvermittelte Signaltransduktion erforderlich ist, sondern auch die Zytokinrezeptorvermittelte Signaltransduktion beeinflusst (Penninger, Irie-Sasaki et al. 2001; Hermiston, Xu et al. 2003). CD45 wird von einem einzelnen Gen mit 35 Exons kodiert. Durch alternative Spleißprozesse von drei variablen Exons (4/A, 5/B und 6/C) können verschiedene CD45-Isoformen generiert werden, die sich in ihrem extrazellulären Anteil unterscheiden. Die Isoformen werden in komplexen Mustern vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand des Leukozyten exprimiert (Thomas and Lefrancois 1988). So exprimieren z. B. naive T-Zellen hochmolekulare Isoformen (CD45RA). Im Zuge der Aktivierung werden diese jedoch herunterreguliert und durch niedermolekulare Isoformen (CD45R0) ersetzt (Trowbridge and Thomas 1994). Obwohl die Bedeutung der Phosphataseaktivität von CD45-Molekülen für Signaltransduktionsprozesse eindeutig nachgewiesen ist, konnte die Funktion einzelner Isoformen bisher noch nicht befriedigend geklärt werden.

Derzeitig verwendete Ansätze zur Klärung der Funktion der CD45-Isoformen sind entweder mit einzelnen Isoformen transfizierte Zelllinien (Irles, Symons et al. 2002) oder Tiermodelle wie z.B. CD45<sup>-/-</sup> Mäuse, die mit einzelnen Isoformen rekonstituiert werden (Ogilvy, Louis-Dit-Sully et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit, die Funktion von CD45-Isoformen - insbesondere beim Menschen - zu untersuchen, besteht in der Identifizierung von CD45-Polymorphismen, Darstellung ihrer phänotypischen und funktionellen Konsequenzen und Untersuchung ihrer möglichen Assoziationen mit Krankheiten. Der 77C→G Polymorphismus, der erstmalig von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, basiert auf einer heterozygoten Punktmutation an der Position 77

des Exons A (Transversion von C zu G) (Schwinzer and Wonigeit 1990; Thude, Hundrieser et al. 1995). Durch die Transversion wird die Sequenz eines regulatorischen *cis*-Spleißelements ESS (*exonic splice silencer*) verändert und dadurch das alternative Spleißen des Exons verhindert (Zilch, Walker et al. 1998; Lynch and Weiss 2001). Bei Personen mit der 77C→G Transversion kommt es dadurch auf Zelltypen zu einer aberranten Expression von CD45RA-Molekülen, die normalerweise keine CD45RA-Isoformen exprimieren. Aufgrund dieser Besonderheit kann der 77C→G Polymorphismus als Modell betrachtet werden, mit dem sich beim Menschen die Funktion einzelner CD45-Isoformen analysieren lässt. In den letzten Jahren wurde über einen Zusammenhang zwischen der 77C→G Mutation und der Entwicklung von Autoimmunitätskrankheiten wie z.B. multipler Sklerose (MS) und viralen Erkrankungen berichtet (Jacobsen, Schweer et al. 2000; Tchilian, Wallace et al. 2001; Ballerini, Rosati et al. 2002; Schwinzer, Witte et al. 2003). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionellen Konsequenzen von 77C→G und der daraus resultierenden aberranten Expression von CD45RA-Isoformen zu analysieren. Durch die Bearbeitung dieser Problematik erwarteten wir zum einen neue Informationen zur Bedeutung einzelner CD45-Isoformen in Signaltransduktionsprozessen. Darüber hinaus zielte das Thema darauf ab, die Rolle von 77C→G als Risikofaktor für bestimmte Erkrankungen besser zu verstehen. Folgende Teilaspekte wurden dabei bearbeitet:

1. Welche Auswirkungen hat die 77C→G Mutation auf die T-Zellrezeptor- und Zytokinrezeptorvermittelte Aktivierung?  
Hierzu wurden zelluläre Funktionen und biochemische Ereignisse der frühen Signaltransduktion nach T-Zellrezeptor- und Zytokinrezeptorvermittelter Stimulation bei „memory“ bzw. aktivierten T-Zellen von Personen mit normaler und aberranter CD45RA-Expression vergleichend untersucht.
2. Falls 77C→G zu veränderten Immunfunktionen führt, welche molekularen Mechanismen sind hierfür verantwortlich?  
Zur Bearbeitung dieser Frage sollte der Einfluss der Mutation auf die Aktivität von Schlüsselenzymen der Signaltransduktionskaskade untersucht werden.
3. Welche funktionellen Besonderheiten varianter T-Zellen können zu einer erhöhten Suszeptibilität von 77C→G Individuen für bestimmte Krankheiten beitragen?

Hierzu wurde die T-Zellreaktivität von MS-Patienten mit normaler CD45RA-Expression mit der von MS-Patienten mit aberranter CD45RA-Expression verglichen.

Das CD45-Forschungsgebiet unterliegt einem kontinuierlichen Erkenntniszuwachs. Im folgenden wird daher ein Überblick über den derzeitigen Wissenstand zur Bedeutung von CD45 gegeben, wobei der Schwerpunkt der Darstellung auf die Funktion von CD45 in der Signaltransduktion und auf die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität gelegt wird.

## 1.2 Aufbau und Struktur von CD45

CD45 wird auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert (Trowbridge and Thomas 1994). Daher wird es auch als das allgemeine Leukozytenantigen LCA (*leucocyte common antigen*) bezeichnet. Auf B- und T-Zellen werden nach Schätzung etwa 10% der Oberfläche von CD45 eingenommen. Es handelt sich dabei um ein Transmembranmolekül aus drei Domänen: Die extrazelluläre Domäne mit 11 bis 16 N-verknüpften Kohlenhydraten setzt sich aus drei Bereichen zusammen, O-verknüpfte Kohlenhydrat-Domäne, eine cysteinreiche Domäne, und drei Fibronectin-Typ-III-Wiederholungen. Daran schließen sich eine Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne an, welche die zwei Phosphotyrosinphosphatase-Domänen (PTPase) D1 und D2 trägt (Tonks, Charbonneau et al. 1988). Die enzymatische Aktivität der CD45-Tyrosinphosphatase ist jedoch in einem hochkonservierten Sequenzmotiv ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G) der membranproximalen Domäne D1 lokalisiert, wobei der Cysteinrest dieses Motivs die zentrale Bedeutung für die spezifische Katalysereaktion hat (Guan and Dixon 1991). Bei D2 handelt es sich dagegen um eine nicht aktive Pseudo-PTPase, da fünf Aminosäuren der Konsensussequenz ausgetauscht sind (Streuli, Krueger et al. 1990). Ihre Anwesenheit steigert jedoch die katalytische Aktivität des CD45 und könnte für die Verfügbarkeit der Substrate eine Rolle spielen.

CD45-Moleküle können als Proteine mit Molekülmassen zwischen 180 kDa und 220 kDa auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Für die Expression und die Stabilität der

Proteine ist die Glykosylierung im Golgi-Apparat von entscheidender Bedeutung. Beim Menschen konnten fünf verschiedene Isoformen identifiziert werden, die durch alternative Spleißprozesse der drei variablen Exons A/4, B/5 und C/6 aus der prä-mRNA entstehen. Katalysiert werden diese Prozesse von allgemeinen, negativ regulatorischen trans-Spleiß-Faktoren (Rothstein, Saito et al. 1992). Im Gegensatz zu den variablen extrazellulären Abschnitten des Proteins ist bei allen Isoformen der intrazelluläre Bereich gleich. Durch monoklonale Antikörper, die mit Exon-spezifischen Sequenzen von CD45 reagieren, können komplexe Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen charakterisiert werden. Diese Antikörper werden gemäß ihrer Reaktivität mit Exon A-, B- oder C-kodierten Sequenzen als CD45RA, CD45RB bzw. CD45RC bezeichnet. Der CD45R0-Antikörper erkennt ein Epitop auf der Isoform, der alle drei Exons A, B und C fehlen. Alle Isoformen werden durch einen CD45-Antikörper detektiert, der einen Teil des invarianten Bereichs erkennt.

Das Expressionsmuster der verschiedenen CD45-Isoformen hängt von dem Zelltyp und von dem Status der Aktivierung und Differenzierung der Zelle ab. So findet man auf reifen, naiven T-Zellen im Menschen hauptsächlich die hochmolekularen Isoformen CD45RA. Im Zuge der Aktivierung werden diese Isoformen herunterreguliert und durch niedermolekulare Isoformen wie CD45R0 ersetzt. Der „Switch“ erfolgt drei bis fünf Tage nach der Aktivierung.

### **1.3 Funktionen von CD45**

Zu den Immunprozessen, in denen CD45 involviert ist, zählen die Zelladhäsionsprozesse bei Makrophagen (Roach, Slater et al. 1997) sowie die durch Galectin-1 induzierte Apoptose bei T- und B-Zellen (Nguyen, Evans et al. 2001; Amano, Galvan et al. 2002). Des Weiteren ist die Degranulierung von Histamin in Mastzellen nach Kreuzvernetzung von Immunglobulin E (IgE) von der CD45-Phosphatase-Aktivität abhängig (Berger, Mak et al. 1994). Als ein wichtiger Regulator in verschiedenen immunologischen Signaltransduktionsprozessen hat die CD45-Phosphatase in der Aktivierung und in der Differenzierung der Lymphozyten eine große Bedeutung (Koretzky, Picus et al. 1990; Kishihara, J. et al. 1993; Byth, Conroy et al. 1996; Kozieradzki, Kündig et al. 1997; Irie-Sasaki, Sasaki et al. 2003). Im

Zusammenhang mit dieser Arbeit wird das Augenmerk nun auf die Funktion von CD45 als Regulator in Signaltransduktionsprozessen gelegt.

### 1.3.1 Regulation von Src-Proteintyrosinkinasen durch CD45

Eine wichtige Funktion von CD45 ist die Desphosphorylierung von Proteintyrosinkinasen (PTK) in der B-Zellrezeptor- (BZR) und T-Zellrezeptor-(TZR) vermittelten Signaltransduktion: Zu den Zielmolekülen von CD45 gehören Tyrosinkinasen der *Src*-Familie wie p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup>, p59-p62<sup>yes</sup>, p55<sup>fgr</sup> und p55<sup>blk</sup>, p56<sup>lyn</sup> und p59<sup>hck</sup>, deren Aktivität durch die Phosphorylierung zweier Tyrosine reguliert wird (Cooper and MacAuley 1988; Eck, Atwell et al. 1994): ein aktivierender Tyrosinrest, der in der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne lokalisiert ist, und ein deaktivierender Tyrosinrest am C-Terminus. Die Phosphorylierung des ersteren ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der *Src*-Kinasen, während die Phosphorylierung des letzteren in einer intramolekularen Bindung des Phosphotyrosins am C-Terminus mit der aktiven SH2-Domäne der Kinase resultiert. Daraus entsteht eine geschlossene Konformation, die die Aktivität der Kinase unterbindet. Daher hat die Phosphorylierung des einen oder des anderen Tyrosins einen gegenläufigen Effekt auf die Aktivität der *Src*-Kinasen.

In einem bis *dato* allgemein anerkannten Modell ist man von einer positiven Regulation der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion durch CD45 ausgegangen. p56<sup>lck</sup> gehört zu den Src-Proteintyrosinkinasen, die durch die CD45-Phosphatase reguliert werden. Die Tyrosinkinasedomäne von p56<sup>lck</sup> enthält eine ATP-Bindungsstelle an der Position 394 (Tyr394). Am COOH-terminalen Ende befindet sich der negativ regulatorische Tyrosinrest Tyr505, deren Interaktion mit der SH2-Domäne die Kinase in einem inaktiven Zustand hält. CD45 dephosphoryliert Tyr505 in p56<sup>lck</sup>, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die eine Phosphorylierung von Tyr394 ermöglicht (Mustelin, Pessa-Morikawa et al. 1992). Die somit aktivierte Kinase kann mit dem Corezeptor CD4 assoziieren und andere Moleküle wie TZR- $\zeta$  phosphorylieren. Eine Folge der Aktivierung der TZR- $\zeta$ -Kette ist die Rekrutierung der Zap-70 Kinase an die TZR- $\zeta$ -Kette. Schließlich resultiert dies über die Verkettung von wichtigen Ereignissen wie der Mobilisierung der „*Second messenger*“ PIP2 und Ca<sup>2+</sup> sowie der

Aktivierung der G-Proteine Vav-1 und Ras in der Transkription bestimmter Gene (Koretzky, Picus et al. 1991). Durch Aktivierung der *Src*-Kinasen durch CD45 können alle weiteren Schritte der Signaltransduktionskette ablaufen und dadurch die Endziele des Signaltransduktionsprozesses wie Zytokinfreisetzung und Proliferation von T-Zellen erreicht werden. Dieses Modell der positiven Regulation der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion durch CD45 wird durch Daten unterstützt, die zeigen konnten, dass Tyr505 am C-Terminus der Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> hyperphosphoryliert waren und die Signaltransduktion in CD45-negativen T-Zelllinien und in Thymozyten von gentechnisch veränderten Mäusen gestört war (Ostergaard, Shackelford et al. 1989; Cahir McFarland, Hurley et al. 1993; Hurley, Hyman et al. 1993; Stone, Conroy et al. 1997).

Andererseits kann CD45 auch Tyr394 dephosphorylieren und dadurch die Signaltransduktion terminieren. In diesem Fall nimmt CD45 die Funktion eines Negativregulators ein. In unreifen WEHI-231 Zellen wurde ein negativ regulatorischer Effekt von CD45 auf die B-Zellrezeptorinduzierte Ca<sup>2+</sup> Mobilisierung und auf die Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase (JNK) und p38 nachgewiesen (Ogimoto, Katagiri et al. 1995; Ogimoto, Arimura et al. 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CD45 sowohl den aktivierenden als auch den deaktivierenden Tyrosinrest der *Src*-Kinasen in T-Zellen sowie in B-Zellen dephosphorylierte und somit diese Kinasen in einen inaktiven Zustand versetzte (Katagiri, Ogimoto et al. 1995; D'Oro, Sakaguchi et al. 1996; D'Oro and Ashwell 1999; Katagiri, Ogimoto et al. 1999), während die Stimulation des Antigenrezeptors die Phosphorylierung beider Tyrosinreste induzierte. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass der Phosphorylierungsstatus von *Src*-Kinasen von ihrer physikalischen Nähe zu CD45 abhängt, welche durch die Stimulation des Antigenrezeptors moduliert wird.

Vor diesem Hintergrund hat die Frage der Präsenz von CD45 in den so genannten „*Lipid rafts*“ bzw. GEMs (*glyosphingolipid enriched membranes*) eine große Bedeutung. In diesen Glykosphingolipid- und Cholesterolreichen Mikrodomänen sind Membranproteine wie z. B. ein Großteil der für die Signaltransduktion essentiellen Moleküle (Komponenten des TZR, die Coreptoren CD4 und CD8, *Src*-Kinasen sowie G-Proteine) konzentriert (Simons and Toomre 2000; Harder 2001). Bei der Aktivierung assoziieren die einzelnen „*Lipid rafts*“ zu makromolekularen Komplexen, den so

genannten immunologischen Synapsen. Dies führt zu einer Aktivitätserhöhung, da in den immunologischen Synapsen die Wahrscheinlichkeit der Interaktion der Moleküle miteinander stark erhöht wird und negativ regulatorische Faktoren wie Phosphatasen ausgeschlossen werden. In früheren Studien, bei denen CD45-Moleküle in den GEM-positiven Membranfraktionen nicht nachgewiesen werden konnten, wurde postuliert, dass CD45-Moleküle aufgrund ihrer Größe und der starken Glykosylierung von der immunologischen Synapse ausgeschlossen werden (Rodgers and Rose 1996; Leupin, Zaru et al. 2000). Dies ließ sich nur schwer mit der Schlüsselfunktion CD45-Moleküle bei der Signaltransduktion vereinbaren. Neuere Studien haben allerdings gezeigt, dass CD45-Moleküle - wenn auch nur in geringer Menge – in immunologischen Synapsen vorkamen (Parolini, Sargiacomo et al. 1996; Edmonds and Ostergaard 2002; Irlles, Symons et al. 2002). Darüber hinaus gab es Hinweise, dass im Zuge der Aktivierung CD45-Moleküle zuerst ausgeschleust und zu einem späteren Zeitpunkt in den GEM-positiven Fraktionen zurück rekrutiert wurden (Gupta and DeFranco 2003).

### **1.3.2 Negative Regulation der Zytokinrezeptorvermittelten Signalwege**

Durch die Bindung von Zytokinen kommt es häufig zur Aggregation des entsprechenden Rezeptors. Daraufhin werden die Januskinasen (JAK) phosphoryliert und aktiviert. Aktivierte Januskinasen können wiederum Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) phosphorylieren. Dieser Schritt ist für die Dimerisierung und für die Translokation der STAT-Moleküle in den Nukleus notwendig, wo sie mit ihrer DNA-Bindedomäne an bestimmte DNA-Sequenzen binden und damit die Transkription spezifischer Gene induzieren können. CD45 wurde vor kurzem als eine JAK-Phosphatase beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass CD45 *in vitro* mit den Januskinasen Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 interagiert, wobei die Bindung an JAK mit Hilfe der zweiten Pseudo-PTPase-Domäne D2 erfolgte (Irie-Sasaki, Sasaki et al. 2001; Irie-Sasaki, Sasaki et al. 2003). CD45 dephosphoryliert die Januskinasen und versetzt diese in einen inaktiven Zustand. Auf diesem Weg wird die JAK-STAT-Signaltransduktion negativ beeinflusst und letztendlich werden Zytokinvermittelte Wachstums- und Differenzierungsprozesse gebremst, deren Rezeptoren dem JAK-STAT-Weg nachgeschaltet sind. Dazu gehören

z.B. die durch Interleukin-3 (IL-3) und durch den Stammzellfaktor (c-kit-Ligand) vermittelte Aktivierung von Jak2 sowie die Proliferation von Mastzelllinien und die Erythropoietin-abhängige Erythropoiese.

#### **1.4 Die Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität**

Ein elegantes Modell zur Regulation von der enzymatischen Aktivität von CD45 basiert auf der Annahme, dass CD45 als Monomer ihre Funktion ausübt, wogegen die Dimerisierung von CD45-Molekülen die Phosphatase-Aktivität abschaltet (Majeti, Bilwes et al. 1998). Anhand der Daten, die durch die Verkopplung von CD45 durch Chimäre (Desai, Sap et al. 1993) oder Antikörper (Trowbridge and Thomas 1994) gewonnen wurden, wurde vermutet, dass die Aktivität dieser Tyrosinphosphatasen durch die Dimerisierung negativ beeinflusst wurde. Durch Kristallstrukturstudien der N-terminalen Domäne einer anderen Phosphatase (PTPa) konnte gezeigt werden, dass ein inhibitorischer Keil der Monomere für die negative Regulation dieser Proteintyrosinphosphatasen durch Dimerisierung verantwortlich war (Bilwes, den Hertog et al. 1996). Der Keil eines Monomers fügt sich in das aktive Zentrum des anderen Monomers ein und blockiert somit den Zugang des Substrats. Eine inaktivierende Punktmutation in diesem inhibitorischen Keil (E613R) der CD45-Phosphatase in Mäusen resultierte in einer Aktivierung der Lymphozyten, die dann zu Lymphoproliferation, spontaner Autoimmunität und schließlich dem Tod führte (Majeti, Xu et al. 2000), was die Bedeutung der Regulation von CD45 durch Homodimerisierung unterstreicht. Heterodimerisierung zwischen verschiedenen CD45-Isoformen und zwischen CD45 und anderen Molekülen wurde ebenfalls beschrieben; die Konsequenzen dieser Interaktion sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Des Weiteren gab es Hinweise, dass die Dimerisierung durch Sialisierung und O-Glykolysierung der extrazellulären Domäne moduliert wurde (Majeti, Bilwes et al. 1998). So können die hochmolekularen CD45-Isoformen (wie z.B. CD45RA) wahrscheinlich aufgrund ihrer negativen Ladungen, die eine elektrostatische Barriere darstellen, schlechter Dimere bilden, während die CD45R0-Isoformen schneller und effizienter dimerisieren können (Xu and Weiss 2002). Es gibt für alle Isoformen ein Gleichgewicht zwischen Dimeren und Monomeren, von dem die Phosphataseaktivität der Zelle bestimmt wird. Die Herunterregulierung von den hochmolekularen

CD45RABC-Isoformen zu den niedermolekularen CD45R0-Isoformen nach der Aktivierung von T-Zellen könnte die Kinetik und die Effizienz der Dimerbildung ändern. Dieser postulierte Regulationsmechanismus liefert eine mögliche Erklärung für die Befunde, die gezeigt haben, dass die Expression von verschiedenen CD45-Isoformen einen Einfluss auf ihre eigene biologische Funktion hatten und somit die Signaltransduktionsereignisse in T-Zellen verändern konnten (Hall, Heffernan et al. 1999). Der postulierte Mechanismus lässt sich nicht mit den Befunden vereinbaren, bei denen gezeigt wurde, dass Zellen mit hohem Anteil an der CD45R0-Isoform wie etwa „memory“ T-Zellen viel sensitiver auf TZR-vermittelte Signale reagierten. Eine mögliche Erklärung bieten Daten, die darauf hinwiesen, dass die großen Isoformen aufgrund der großen, glykolysierten Seitenketten aus der Immunsynapse ausgeschlossen wurden, während die CD45R0-Isoform in den „*Lipid rafts*“ mit den Corezeptoren CD4 und CD8 interagieren und somit die Signaltransduktion positiv regulieren konnte (Dornan, Sebestyen et al. 2002). Weitere mögliche Erklärungen wären Unterschiede zwischen naiven T-Zellen und „memory“ T-Zellen, die nicht von CD45 abhängig sind. Es gibt z.B. einen CD45-unabhängigen Weg der Regulation über p72<sup>syk</sup>.

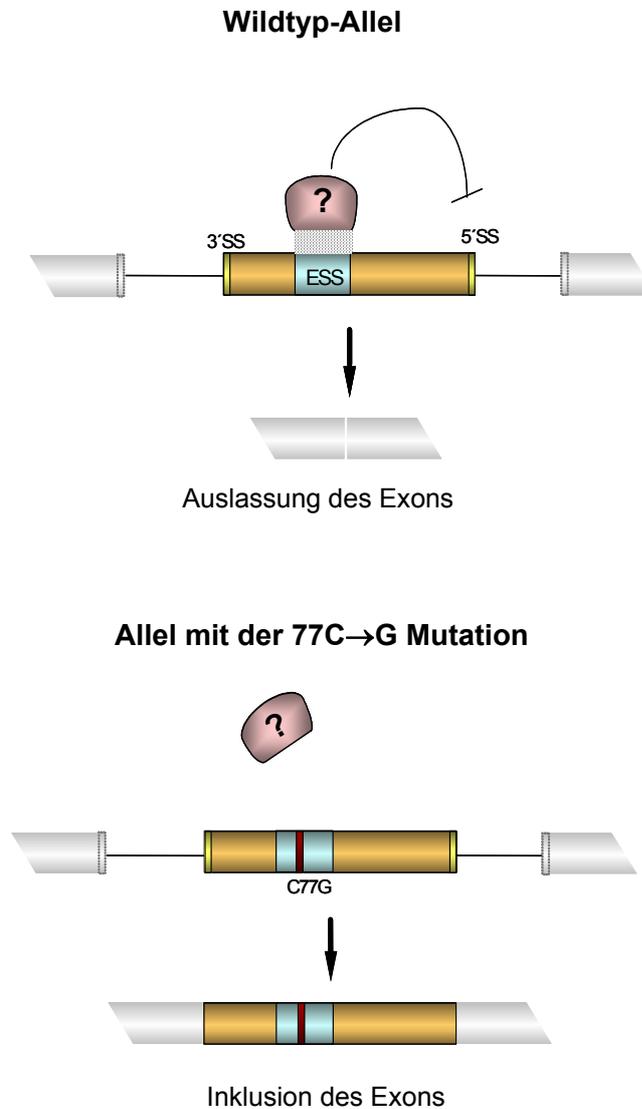
Die Regulation der Funktion von CD45 durch die Bindung möglicher Liganden ist ein weiterer postulierter Mechanismus. Die Bindung eines Liganden könnte z.B. zu Konformationsänderungen der Phosphatasen führen, die den Zugang zu oder von verschiedenen Substraten möglich machen und diese aktivieren. Denkbar ist auch, dass durch Liganden potentielle Oligimerisation der Proteintyrosinphosphatasen forciert wird, was - wie bei der Dimerisierung - zu einem Aktivitätsverlust führt. Die Ig-Superfamilie CD22 $\beta$  wurde als potentieller Ligand für die CD45R0-Isoform identifiziert (Stamenkovic, Sgroi et al. 1991). In weiteren Studien jedoch erwies sich die Interaktion zwischen der genannten Isoform und CD22 als nicht CD45-spezifisch (Sgroi, Varki et al. 1993), da CD22 auch mit anderen Molekülen interagiert. Wie die Galectin-1-Proteine, die Apoptose induzieren und terminale N-Acetyllaktosamin-Motive auf O-Glykanen der CD45-Proteine erkennen, bindet auch CD22 an gewisse Zuckerstrukturen von CD45 (Symons, Cooper et al. 2000), aber nicht an spezifische Strukturen der CD45-Moleküle selbst. Die Bedeutung dieser Interaktionen und der daraus resultierenden physiologischen Relevanz ist bisher noch unklar.

## 1.5 Der 77C→G Polymorphismus im Exon A des CD45-Gens

Das Phänomen, dass bei einigen gesunden Probanden CD45RA-Isoformen nicht herunterreguliert werden können, wurde 1990 erstmals beschrieben (Schwinzer and Wonigeit 1990) und konnte später auf die heterozygote 77C→G Mutation im Exon A des CD45-Gens zurückgeführt werden (Thude, Hundrieser et al. 1995). Die heterozygote Mutation führt zwar nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz, verhindert jedoch das Herausspleißen des Exons (Abb. 1.1). Das alternative Spleißen wird u. a. durch *cis*-Elemente reguliert, die für die Erkennung der Spleißseite wichtig sind. Diese Elemente dienen als Bindungsseiten für *trans*-Faktoren, die sich entweder verstärkend oder unterdrückend auf das Spleißen auswirken. Das Exon A hat eine konstitutive 3'-Spleißseite und eine schwache 5'-Spleißseite, deren Identifizierung und Nutzung durch ein verstärkendes und abschwächendes *cis*-Element kontrolliert wird. Durch den Austausch von Cytosin zu Guanin an der Position 77 im Exon A wird die Sequenz des abschwächenden *cis*-Elements ESS (*exonic splice silencer*) unterbrochen, mit dessen Hilfe die Erkennung der 5'-Spleißseite unterdrückt wird (Zilch, Walker et al. 1998). Die Veränderung der Sequenz des ESS führt dazu, dass der *trans*-Faktor, der bis heute noch nicht identifiziert ist, nicht binden kann. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Nutzung der 5'-Spleißseite, die die Inklusion des betroffenen Exons zur Folge hat. Die 77C→G Transversion verhindert also das alternative Spleißen des Exons A und damit die Herunterregulation von CD45RA-Isoformen (Schwinzer and Wonigeit 1990). Die Punktmutation resultiert in einem varianten CD45RA-Expressionmuster, das sich durch eine permanente Expression von CD45RA-Molekülen auf Zelltypen (z.B. aktivierte T-Zellen) (Schwinzer, Schraven et al. 1992) auszeichnet, die normalerweise CD45RA negativ sind.

Neben dem 77C→G Polymorphismus sind im CD45-Gen des Menschen noch weitere Polymorphismen gefunden worden (Jacobsen, Hoffmann et al. 2002; Stanton, Boxall et al. 2003; Stanton, Boxall et al. 2004). Es handelt sich bei allen um „*Single-Nucleotide*“-Polymorphismen (SNPs), bei denen einzelne Nukleobasen ausgetauscht sind: C59A (His59Ala) in Exon A, G69C (Asp121His) in Exon B, T127A (Ile187Asn) und A138G (Thr191Ala) in Exon C. Unter diesen Polymorphismen ist die 77C→G Mutation der am häufigsten auftretende CD45-Polymorphismus in der kaukasischen

Bevölkerungsgruppe, während die 138A→G Mutation bei der ost-asiatischen Bevölkerungsgruppe am häufigstem vorkommt. Beide Mutationen sind mit der Entwicklung von Krankheiten in Verbindung gebracht worden.



**Abbildung 1.1: Modell der Regulation von Exon A/4 im CD45-Gen durch ein negativ regulatorisches *cis*-Element**

*cis*-Elemente wie ESS (*exonic splice silencer*) beeinflussen die Erkennung der 3'- bzw. 5'-Spleißseite eines Exons (3'SS /5'SS), die durch die letzten drei und die ersten zwei Nukleotide des Exons definiert werden. Das ESS im Exon 4/A unterdrückt die Erkennung und Nutzung der 5'-Spleißseite und führt zu einer Auslassung des Exons (oben). Durch die 77C→G Mutation wird die Sequenz des ESS verändert, so dass das *trans*-Element, das bisher noch nicht identifiziert ist, nicht mehr binden kann. Eine Folge ist, dass die 5'-Spleißseite erkannt und genutzt wird, was zur Inklusion des Exons führt (unten).

Die Korrelation des hier bearbeiteten Polymorphismus mit der Entwicklung gewisser Krankheiten beruht auf der Tatsache, dass die 77C→G Mutation mit einer Häufigkeit von 1 bis 2% bei gesunden Blutspendern vertreten ist, aber die gleiche Mutation mit einer erhöhten Frequenz bei einigen Patientengruppen gefunden wurde, die unter systemischer Sklerose (Schwinzer, Witte et al. 2003), HIV-1 (Tchilian, Wallace et al. 2001) und autoimmuner Hepatitis (Vogel, Strassburg et al. 2003) leiden. Darüber hinaus schien der 77C→G Polymorphismus mit multipler Sklerose in Patientengruppen aus Deutschland und Italien zu assoziieren (Jacobsen, Schweer et al. 2000; Ballerini, Rosati et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch die Assoziation der 77C→G Mutation mit multipler Sklerose in einigen Patientenkollektiven aus Nordamerika und Schweden nicht bestätigen (Barcellos, Caillier et al. 2001; Vorechovsky, Kralovicova et al. 2001). Aus der Diskussion über die Assoziationen der 77C→G Mutation mit verschiedenen Krankheiten ergibt sich die Frage nach den funktionellen Konsequenzen der Mutation. Es ist klar, dass der 77C→G Polymorphismus mit einem veränderten Phänotyp korreliert. Bis heute ist es jedoch noch nicht geklärt, ob die 77C→G Mutation und das daraus resultierende aberrante Expressionsmuster der CD45RA-Isoform bei betroffenen Personen mit veränderten Immunfunktionen einhergeht.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid, N,N'-Methylbisacrylamid (37,5:1)	Applichem, Darmstadt
Agarose, ultra rein	Gibco, Eggenheim
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Merck, Darmsatdt
Ammoniumpersulfat (APS), p.a.	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA
BSA	Serva, Heidelberg
n-Butanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Casein	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
CD45-Phosphatase	Chemicon, Hofheim
Chloroform, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Comassie-Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP	Pharmacia, Freiburg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethylendiamintetraacetat (EDTA Tritriplex)	Merck, Darmstadt
Ficoll	Biochrom, Berlin
Fluo-3-AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fura-Red-AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Glycin	Merck, Darmstadt
Heparin (Liquemin <sup>®</sup> )	Hoffmann-LaRoche, Basel, CH

---

Hexanukleotide [pd(N) <sub>6</sub> ]	Pharmacia, Freiburg
Immobilon P-PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Immunglobulin G, human (Octagam <sup>®</sup> )	Octapharm, Langenfeld
Interleukin-2	Hoffmann-La Roche, Basel, CH
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
L- Glutamin	Seromed, Berlin
Methanol, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
MgCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei	Bio-Rad, München
MW-Marker, prestained	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumvanadat	Sigma, Deisendorf
NP-40	Sigma, Deisendorf
Penicillin	Seromed, Berlin
PHA	Wellcome, Isernhagen
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phytohämagglutinin (PHA)	Wellcome, Isernhagen
PMA	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Protein G-Sepharose Fast Flow:	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Reverse Transkriptase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RPMI 1640 (GIBCO <sup>TM</sup> )	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Saponin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Seromed, Berlin
Szintillatorflüssigkeit für Filtermatte	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
TC199	Flow, Meckenheim
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Thymidin (3H-Methyl-Thymidin)	NEN, Dreieich

Trifast	peQLab, Erlangen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Merck, Darmsatdt
Xylencyanolblau	Sigma, Deisenhofen
φX174 DNA-Marker	Stratagene, La Jolla, CA, USA

## 2.2 Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer:

Wide Mini Sub Cell

Bio-Rad, München

Horizon 58 und Horizon 20-25

Gibco BRL, Karlsruhe

Blotsapparatur (Multiphor II)

Pharmacia, Uppsala, Schweden

SDS Gelelektrophoresekammer (Miniprotean II)

Bio-Rad, München

Spektralphotometer:

Ultrospec II

Pharmacia, Uppsala, Schweden

Biophotometer

Eppendorf, Hamburg

Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600)

Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA

Geltrockner (Modell 583)

Bio-Rad, München

Brutschrank (Cytoperm)

Heraeus, Hanau

Brutschrank

Sanyo, Bezug über Ewald,

Bad Nenndorf

Durchflußzytometer (FACSCalibur®)

Becton Dickinson, Heidelberg

Flüssigkeits-Szintillations-Analysator

LKB Wallac, Turku, Finnland

Horizontalschüttler

GFL, Burgwedel

Magnetrührer (Typ MR 2002)

Heidolph, Bezug über Jürgens,

Hannover

Pipetten:

Pipette 0-20 µl

Abimed, Langenfeld

Pipette 0-100 µl

Abimed, Langenfeld

Pipette 0-200 µl

Abimed, Langenfeld

Pipette 10-1000 µl

Abimed, Langenfeld

Sterilbank (Lamin-Air®)

Heraeus, Hanau

VarioMACS <sup>®</sup>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellkernerntegerät	Inotech, Dottikon, Schweiz
Zentrifugen:	
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Cryofuge 6-4S	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall, Newton, IL, USA
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Varifuge	Heraeus, Hanau

### 2.3 Verbrauchsmaterial

FACS-Röhrchen (Falcon <sup>™</sup> )	Becton Dickinson, Heidelberg
MACS-MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-BS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-CS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Rundboden	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
UVette <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen (250 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.4 Kits und Substrate

CBA-Human Th1/Th2	Becton Dickinson, Heidelberg
ECL-Dura West Detection-Kit	Pierce, Bonn
para-Nitrophenol	Chemicon, Hofheim
Proteintyrosinkinase-Assay	Chemicon, Hofheim
QiaAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 2.5 Antikörper

Die Informationen zu den verwendeten Antikörper sind folgendermaßen gegliedert:

Bezeichnung des Antikörpers

- Spezifität
- Herkunft (Spezies)
- Isotyp (bei monoklonalen Antikörpern)
- Quelle (Firma bzw. von wem zur Verfügung gestellt)
- Verwendung in dieser Arbeit

### 2.5.1 Primärantikörper

AICD45.2 (CD45)

- erkennt ein Epitop auf dem invariablen Gerüst des CD45-Moleküls und erkennt somit alle CD45-Isoformen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. C. Meuer, Heidelberg
- verwendet für Zellfärbung, Immunpräzipitation und Westernblot-Analyse

AICD4.1 (9A4)

- erkennt das humane CD4 Antigen (59 kDa)
- mAk aus der MAUS
- IgG1
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms AICD4.1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S.C. Meuer, Heidelberg
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung durch *MACS*

AICD8.1 (Eri 8)

- erkennt das CD8 Antigen (32-34 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1

- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. C. Meuer, Heidelberg
- verwendet für Zellsortierung durch *MACS*, Zellfärbung und als Negativkontrolle bei der Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels

#### BMA031 (TZR/CD3)

- erkennt eine monomorphe Determinante auf der  $\alpha/\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2b
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Kurrle, Aventis, Frankfurt
- zur Stimulation verwendet

#### CD14

- erkennt das CD14 Antigen (53-56 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2b
- aufgereinigt aus Kultur des B-Zell-Hybridoms CD14
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung durch *MACS*

#### CD3- $\zeta$ (FL-163)

- erkennt die  $\zeta$ -Kette des humanen TZR/CD3-Komplexes von der Aminosäuresequenz 1 bis 163, kreuzreaktiv mit CD3- $\zeta$  der Maus und der Ratte
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- verwendet für Immunpräzipitation

#### CD4-FITC

- erkennt CD4 Antigen (55 kDa)
- mAk aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG1 $\kappa$
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

#### CD8-PE

- erkennt CD8 Antigen (32-24 kDa)
- mAk aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG1 $\kappa$
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

#### HLA-DR

- erkennt HLA-DR, MHC-Klasse II, monomorphe Determinante (28-34 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2a
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet für Zellfärbung und Zellsortierung (MACS)

#### IL-2-PE (5344.111)

- erkennt humanes IL-2
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG1
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für intrazellulären Färbung

#### Jak1

- erkennt JAK1 (130 kDa)
- polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Biosource, Solingen
- verwendet zur Westernblotanalyse

#### Jak 1 (pYpY<sup>10221023</sup>)

- erkennt Phosphopeptide aus einer Region vom JAK1-Protein, die die Tyrosine Tyr1022 und Tyr1023 enthält
- polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Biosource, Solingen
- verwendet zur Westernblotanalyse

L293 (CD28)

- erkennt ein Epitop auf dem CD28-Antigen (44 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet für Stimulation

MEM55 (CD45RB)

- erkennt ein durch Exon B kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches sich auf den CD45-Isoformen CD45R(ABC), CD45R(AB) und CD45RB befindet
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1
- Serotec, Düsseldorf
- zur Zellfärbung und Westernblot-Analyse verwendet

MEM56 (CD45RA)

- erkennt ein durch Exon A kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches sich auf den CD45-Isoformen CD45R(ABC) und CD45R(AB) befindet
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2b
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Horejsi, Prag, Tschechien
- verwendet für Immunpräzipitation, Westernblot-Analyse und Zellfärbung

MEM56-FITC (CD45RA)

- erkennt ein Exon A kodiertes Epitop des CD45 Gens, das in den CD45-Isoformen CD45R(ABC) und CD45R(AB) vorkommt
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Fluoreszein-konjugiert
- IgG2b
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Horejsi, Prag, Tschechien
- verwendet für Zellfärbung

MT2 (CD45RC)

- erkennt ein durch Exon C kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches in den Isoformen CD45R(ABC) und CD45R(AB) vorkommt
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1
- IQ Products, Groningen, Niederlande
- verwendet für Zellsortierung durch *MACS*, Zellfärbung und im Westernblot-Analyse

#### OKT3 (TZR/CD3)

- erkennt ein Epitop auf der CD3-Kette (21 kDa) des humanen TCR/CD3-Komplexes
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2a
- Ortho, Raritan, NY, USA
- verwendet für Stimulation, Zellsortierung durch *MACS* und zur Zellfärbung

#### p56<sup>lck</sup>

- erkennt den N-terminalen Teil des humanen p56<sup>lck</sup>, kreuzreaktiv mit p56<sup>lck</sup> aus Maus
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG<sub>2b</sub>
- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- verwendet für Immunpräzipitation, zur Kinase-Assay und zur Westernblot-Analyse

#### p56<sup>lck</sup>

- erkennt den N-terminalen Teil des humanen p56<sup>lck</sup>, kreuzreaktiv mit p56<sup>lck</sup> aus Maus und Rind
- polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Upstate Biotechnology, Bezug über Biomol, Hamburg
- verwendet für Immunpräzipitation und zur Westernblot-Analyse

#### p56<sup>lck</sup> (pY<sup>505</sup>)

- erkennt die Phosphopetide aus einer Region vom p56<sup>lck</sup>-Protein, die das Tyrosin Tyr505 enthält
- polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Biosource, Solingen
- verwendet zur Immunpräzipitation, Westernblot-Analyse und Zellfärbung

anti-Phosphotyrosin (4G10)

- erkennt Phosphotyrosin-Reste
- biotinylierter monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2b $\kappa$
- Upstate Biotechnology, Bezug über Biomol, Hamburg
- verwendet für Westernblot-Analyse

Stat5

- erkennt STAT5a (92 kDa) und STAT5b (85 kDa) von der Maus, von der Ratte und vom Menschen
- polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen
- Biosource, Solingen
- verwendet zur Westernblotanalyse

Stat5 (pY<sup>694</sup>)

- erkennt STAT5, wenn der Tyrosinrest Tyr694 phosphoryliert ist
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG<sub>1</sub>
- Biosource, Solingen
- verwendet zur Westernblot-Analyse

T199 (CD56)

- erkennt ein Epitop auf dem CD56-Antigen (48 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG1
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Pietsch, Bonn
- verwendet für Zellsortierung durch *MACS* und Zellfärbung

TIA-2 (TZR- $\zeta$ )

- erkennt den cytoplasmatischen Anteil der  $\zeta$ -Kette des humanen TZR/CD3-Komplexes
- monoklonaler Antikörper aus Ascites-Flüssigkeit der Maus

- IgG1 $\kappa$
- Coulter Clone, Krefeld
- verwendet für Westernblot-Analyse

#### UCHL1 (CD45R0)

- erkennt ein Epitop der CD45-Isoform CD45R0, die weder das Exon A noch B oder C enthält
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2a
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. C. L. Beverley, London
- zur Zellfärbung, Zellsortierung durch *MACS* und Westernblot-Analyse verwendet

#### UCHL-1-PE (CD45R0)

- erkennt die CD45-Isoform CD45R0 (180 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Phycoerythrin-konjugiert
- IgG2a
- Pharmingen, San Diego, USA
- verwendet für Zellfärbung

#### ZAP-70 (2F3.2)

- erkennt die SH2-Domäne der humanen ZAP-70 Kinase (Aminosäure 1-254)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG2a
- Upstate Biotechnology, Bezug über Biomol, Hamburg
- verwendet für Immunpräzipitation und Westernblot-Analyse

#### G $\alpha$ M (*Goat anti mouse*)

- erkennt Maus-Immunglobuline: IgG und IgM (schwere und leichte Kette)
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper zur Kreuzvernetzung bei der Stimulation

## 2.5.2 Sekundärreagenzien:

### G $\alpha$ M-FITC

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluoreszein-konjugiert
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper in der FACS-Analyse

### G $\alpha$ Rab-FITC

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Kaninchen-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluoreszein-konjugiert
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper in der FACS-Analyse

### G $\alpha$ M-POD

- erkennt Maus-Immunglobuline: IgG und IgM (leichte und schwere Kette)
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Peroxidase konjugiert
- Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
- verwendet als Sekundärantikörper in der Westernblot-Analyse

### G $\alpha$ Rab-POD

- erkennt Kaninchen-Immunglobuline: IgG und IgM (leichte und schwere Kette)
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Peroxidase konjugiert
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper in der Westernblot-Analyse

### Strep-HRP

- erkennt Biotin-Strukturen
- Streptavidin, Peroxidase konjugiert
- Pierce, Bonn
- verwendet als Sekundärreagenz in der Westernblot-Analyse

### 2.5.3 Blockierungsreagenzien

#### OCTAGAM

- Immunglobulin G vom Menschen
- OCTAPHARMA, Langenfeld
- verwendet zur Blockade von FcR-vermittelter, unspezifischer Antikörperbindung in der FACS-Analyse

#### Normales Maus Serum

- Normales Maus Serum
- Dianova, Hamburg
- verwendet zur Absättigung von freien Valenzen des G $\alpha$ M-FITC Antikörpers in der FACS-Analyse

## **3 Methoden**

### **3.1 Medien und Zellen**

#### **3.1.1 Medien und Kultivierungsbedingungen**

Als Standardkulturmedium (KM) wurde RPMI 1640, das mit 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin supplementiert war, eingesetzt. Vor dem Gebrauch wurde das FCS 30 min lang bei 56 °C inaktiviert. Zum Waschen und kurzfristigen Aufbewahren der Zellen wurden Hepes-gepuffertes TC 199 (pH 7,3) und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,2) verwendet. Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und 95 % gesättigter Wasserdampfatosphäre im Brutschrank.

#### **3.1.2 Mononukleäre periphere Zellen von Blutspendern**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden mit Zellen durchgeführt, die von gesunden Blutspendern aus dem Transplantationslabor der MHH oder von gesunden Blutspendern aus der Blutbank der MHH stammen. Darunter waren drei Personen mit der 77C→G Mutation. Unter den MS-Patienten, die von der Abteilung für Neurologie der MHH rekrutiert wurden, wurden neun heterozygote Träger des varianten Allels identifiziert. Entweder wurden Reaktionsmuster von gesunden varianten Blutspendern mit gesunden Kontrollpersonen oder Reaktionsmuster von varianten MS-Patienten mit MS-Kontrollpatienten, die noch unbehandelt bzw. deren Therapie mindestens schon zwei Jahre zurücklagen, verglichen. Die getesteten Personen sind über Art und Umfang der durchzuführenden Untersuchungen aufgeklärt worden.

#### **3.1.3 PHA-Blasten**

Um Lymphoblasten zu generieren, wurden T-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Z/ml in Kulturmedium aufgenommen, mit 1 µg/ml PHA versetzt und stehend über Nacht kultiviert. Nach dieser initialen Aktivierung wurden die Zellen zweimal gewaschen und unter Zusatz von 20 U/ml IL-2 weiter kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das verbrauchte Kulturmedium ersetzt, so dass sich die Zellzahl nach etwa sieben Tagen

verdoppelt bis verdreifacht hatte. Danach wurden die Zellen intensiv gewaschen und für weitere 48 h ohne IL-2 kultiviert, bevor sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

### 3.1.4 Alloreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien

Alloreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wurden von Blutspendern mit 77C→G Mutation und Kontrollpersonen gleichzeitig generiert. Dazu wurden Lymphozyten von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen über Nacht mit 1 µg/ml PHA aktiviert. Das PHA wurde durch einen Waschschrift (200 x g, 10 min) entfernt, und anschließend wurden die Zellen für sieben Tage mit 20 U/ml IL-2 kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde das verbrauchte Medium ersetzt, während sich die Zellzahl verdoppelt bzw. verdreifacht hatte. Nach dieser Expansionsphase wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS (*magnetic cell sorting*) positiv angereichert. Die isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden dann in 24-Loch-Platten in einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Z/ml ausgesät. Durch Zugabe von bestrahlten allogenen Laz 509 in der gleichen Konzentration wurden die Zellen stimuliert. Die Zellen wurden alle sieben Tage restimuliert und insgesamt über fünf Wochen expandiert. Vor jeder Restimulation wurden die CD4<sup>+</sup> Zellen phänotypisiert. Bei Bedarf wurde die positive Selektion der CD4<sup>+</sup> Zellen wiederholt. Nach der letzten Restimulation fand eine Ruhephase von mindestens 10 Tagen statt, bevor weitere Analysen durchgeführt wurden

### 3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 1 x 10<sup>7</sup> Z in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FCS sowie 10 % DMSO) resuspendiert und in ein steriles Glas-Gewinderöhrchen überführt. Dann wurden die Röhrchen zunächst über Nacht bei –80 °C tiefgefroren und anschließend im flüssigen Stickstoff bei –195°C gelagert. Das Aussalzen des Mediums und die Bildung von Eiskristallen wurde durch die Verwendung von DMSO und das rasche Einfrieren verhindert. Unter leichtem Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad wurde die Zellsuspension aufgetaut. Danach wurden die Zellen langsam zu 10 ml eiskaltem Auftaumedium (TC 199 mit 20 % FCS) gegeben, sofort zentrifugiert (200 x g, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Das restliche für die Zellkultur schädliche DMSO wurde durch zwei weitere Waschschrift

mit TC199 entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und im Brutschrank kultiviert.

### **3.1.6 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität**

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurde 10 µl Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (0,16 % Trypanblau in 0,9 % NaCl) gemischt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei konnten tote oder beschädigte Zellen von den lebenden Zellen dadurch unterschieden werden, dass sie durch die Diffusion des Farbstoffes ins Zellinnere blau gefärbt blieben im Gegensatz zu lebenden Zellen, die den Farbstoff aktiv durch ihre Ionenkanäle ein- und ausschleusen konnten. Aus der Gesamtzahl der Zellen, die gleich 100 % gesetzt wurde, konnte die Vitalität errechnet werden, indem von der Gesamtzellzahl die Anzahl der geschädigten, blau gefärbten Zellen abgezogen wurde. Die Vitalität der frisch isolierten Zellen lag zwischen 90 % und 95 %.

## **3.2 Isolierung von Zellpopulationen**

### **3.2.1 Isolierung von lymphoiden Zellen aus Leukotrap<sup>®</sup>-Filtern**

Zur Isolierung humaner peripherer Blut-Lymphozyten aus in der Blutbank der MHH verwendeten Leukotrap<sup>®</sup>-Filtern wurden die filternahen Schläuche zunächst durchtrennt und an je einen Drei-Wege-Hahn angeschlossen. An den sich in ursprünglichen Durchflussrichtung befindlichen Schlauch wurde eine ungefüllte 50-ml-Spritze angebracht. Eine zweite 50-ml-Spritze wurde mit PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> gefüllt und an den Drei-Wege-Hahn angeschlossen, der sich am Schlauch entgegengesetzt der Durchflussrichtung befand. Nachdem die Drei-Wege-Hähne geöffnet worden waren, wurde das PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> (entgegengesetzt der Pfeilrichtung) durch den Filter gespült. Danach wurden die Drei-Wege-Hähne geschlossen. Das Blut-PBS-Gemisch, das sich nun in der zuvor unbefüllten Spritze befand, wurde in ein Becherglas gegeben. Die entgegengesetzt der Pfeilrichtung befindliche Spritze wurde erneut mit PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> befüllt und die Drei-Wege-Hähne geöffnet. Das PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> wurde nun dreimal mit Druck durch den Filter gespült, bis sich das Blut-PBS-Gemisch wieder in der anfangs unbefüllten Spritze befand und in das Becherglas gegeben werden konnte. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis insgesamt 160 ml

PBS ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  durch den Filter gespült worden waren. Abschließend wurde die entgegengesetzt der Pfeilrichtung angeschlossene Spritze mit Luft gefüllt, die dann mit hohem Druck durch den Filter gepresst wurde, um verbliebende Blut-PBS-Reste aus dem Filter zu entfernen. Das Blut-PBS-Gemisch konnte nun zur Ficoll-Separation verwendet werden.

### 3.2.2 Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Vollblut

Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation entweder aus dem Blut-PBS-Gemisch, das zuvor aus den Leukotrap-Filtern der MHH-Blutbank gespült worden war, oder aus dem Blut, das von Mitarbeitern des Transplantationslabors gespendet worden war, gewonnen. Zur Verbesserung der Trennung im Dichtegradienten wurde das gespendete Blut mit PBS ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  im Verhältnis 1:2 verdünnt. Um die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurde das Blut mit 1 ml Heparin versetzt. 10 ml Ficoll 1077 (mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml bei 10°C) wurden in einem Falcon-Röhrchen vorgelegt. Auf die Trennlösung wurde das verdünnte Blut im Verhältnis von ca. 1:5 geschichtet. Das Röhrchen wurde dann bei 400 x g für 30 min zentrifugiert. Während der Zentrifugation kam es zur Schichtung in Abhängigkeit von der Dichte. Nach der Zentrifugation wurde die Phase oberhalb des Ficolls vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. In dieser Interphase befanden sich die Lymphozyten und Monozyten. Zur Entfernung von Ficollresten und Thrombozyten wurden die Zellen noch zweimal bei 200 x g für 10 min mit TC 199 gewaschen.

### 3.2.3 Isolierung von Zellsubpopulationen durch MACS

Mit Hilfe des MACS (*Magnetic Cell Sorting*) ist es möglich, Zellsubpopulationen aus Gesamtpopulationen anzureichern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden  $CD4^+CD45R0^+$  Zellen und  $CD4^+CD45RA^+$  Zellen durch Depletion isoliert. Zur Charakterisierung von CD45RA-Molekülen wurden T-Zellen mit Hilfe der positiven Selektion angereichert.

### 3.2.3.1 Isolierung von „memory“ und „naiven“ T-Zellen

Durch Depletion von HLA-DR<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> und CD45RC<sup>+</sup>-Zellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation wurden CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>-T-Zellen angereichert. Dazu wurden die Zellen der Interphase auf 1 x 10<sup>6</sup> bis 5 x 10<sup>6</sup> Z/ml in RPMI-Medium eingestellt, in Zellkulturflaschen pipettiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um adhärenente Zellen wie Monozyten zu entfernen. Nach der Inkubation wurden die nicht adhärenenten Zellen in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Nach einem Waschschrift (200 x g, 10 min, RT) wurden die Zellzahl und die Zellvitalität bestimmt. Die Zellen wurden auf 5 x 10<sup>7</sup>/ml in TC199 mit 5 % FCS eingestellt und mit 10 µg/ml αHLA-DR, 26 µg/ml αCD14, 1,27 µg/ml αCD56 und 1,25µg/ml MT2 (αCD45RC)-Antikörpern für 30 min auf Eis vorinkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Dann wurden die Zellen in einem definierten Volumen MACS-Puffer (80 µl Puffer/10<sup>7</sup> Zellen) aufgenommen. 20 µl magnetische GαM-Beads/10<sup>7</sup> Zellen wurden dazugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer (PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, 5 mM EDTA und 0,5 % BSA) resuspendiert und auf eine mit Puffer equilibrierte AS-Säule geladen. Während sich die Säule im MACS befand, wurden HLA-DR<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup> und CD45RC<sup>-</sup> Zellen mit drei bis fünf Säulenvolumen MACS-Puffer eluiert und wiederum gewaschen. CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden auf die gleiche Weise angereichert. Um jedoch CD45RA<sup>+</sup> Zellen anzureichern, wurden CD45R0<sup>+</sup> Zellen depletiert. Anstatt des CD45RC mAk (MT2) wurde der CD45R0 mAk (UCHL-1) eingesetzt. Die Separation der Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Die Anreicherung war in der Regel >96 %.

### 3.2.3.2 Anreicherung von T-Zellen durch positive Selektion

Die positive Selektion wurde zur Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Generierung von alloreaktiven CD4<sup>+</sup> Zelllinien (3.1.4) genutzt. Bei der positiven Selektion wird die Fraktion, die von Interesse ist, mit dem Primärantikörper markiert und mit Hilfe der magnetischen *Beads* in der Säule festgehalten, während die unerwünschten Zellen depletiert werden. Bei der Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde in dieser Arbeit der CD4 mAk AICD4.1 verwendet. Dazu wurden PBMC auf 5 x 10<sup>7</sup> Z/ml in TC 199 mit 5 % FCS eingestellt und mit 10 µg/ml Primärantikörper für 30 min auf Eis vorinkubiert

und anschließend zweimal gewaschen. Dann wurden die Zellen auf  $1 \times 10^8$  Z/ml in MACS-Puffer mit magnetischen *GαM-Beads* eingestellt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen auf eine mit Puffer equilibrierte MS-Säule geladen. Nicht markierte Zellen wurden aus der Säule depletiert, während die Säule sich im MACS befand. Anschließend wurde die Säule aus dem MACS entnommen und markierte  $CD3^+$  Zellen mit Hilfe des Stempels aus der Säule gedrückt. Die eluierte Fraktion wurde nach einmaligem Waschen durchflusszytometrisch auf Reinheit überprüft. Die Anreicherung war in der Regel  $>95\%$ .

### 3.3 Stimulation von Lymphozyten

#### 3.3.1 Stimulation von T-Zellsubsets mit TZR/CD3 und CD28 mAk

Isolierte T-Zellsubpopulationen von Kontrollpersonen und Personen mit der  $77C \rightarrow G$  Mutation ( $CD4^+CD45R0^+$  Zellen und  $CD4^+CD45RA^+$  Zellen) wurden über den TCR/CD3-Komplex mit dem TZR/CD3 mAk (BMA031) in Kombination mit dem CD28 mAk (L293) aktiviert. Beide Antikörper wurden an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden je 200  $\mu$ l der Antikörperlösung in der Konzentration von 0  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml und 3  $\mu$ g/ml in jeweils drei Vertiefungen gegeben. Nach Ablauf von mindestens vier Stunden Inkubationszeit bei 4° C wurde der Überstand aus den Platten abgesaugt und jede Vertiefung mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in jede Vertiefung der Rundboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 72 Stunden. Jede Vertiefung wurde mit 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin-Suspension markiert. Nach weiteren 16 Stunden konnte man den Stimulationsansatz ernten und die Proliferation messen.

#### 3.3.2 Stimulation von alloreaktiven Zelllinien mit Alloantigen

$50 \times 10^3$  alloreaktive T-Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen wurden mit  $25 \times 10^3$  Laz 509 Zellen, die zuvor von einer  $\gamma$ -Strahlenquelle mit einer Energie von 50 Gy bestrahlt worden waren, in Rundboden-Mikrotiterplatten für drei Tage bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  kokultiviert. 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin wurde zu jeder

Vertiefung gegeben und für weitere 16 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnte der Stimulationsansatz geerntet und die Proliferation gemessen werden. Zur Untersuchung der Proliferationskinetik wurde die gemischte Lymphozytenkultur nach 24 h, 48 h und 72 h mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markiert und die Proliferation anhand des Einbaus des  $^3\text{H}$ -Thymidins gemessen.

### 3.3.3 IL-2-induzierte Proliferation von PHA-Blasten

PHA-Blasten wurden extensiv gewaschen in einer Dichte von  $0,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung alleine oder bei zunehmender Konzentration von IL-2 (5, 10 und 20 U/ml) für 72 h kultiviert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus des [ $^3\text{H}$ ]-Thymidins während der letzten 16 h gemessen.

## 3.4 Messung der Proliferation

Als Maß für die Proliferation wurde der in der S-Phase des Zellzyklus bei der DNA-Synthese erfolgte Einbau von Tritium-markiertem Thymidin gemessen. Die Zellen wurden zuerst mit einem Zellkultur-Sammler geerntet, wobei die DNA auf einer Glasfasermatte gesammelt wurde. Nach dem Trocknen im Trockenschrank bei  $58^\circ\text{C}$  wurde die Matte in einer Plastikhülle mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit getränkt und verschweißt. Die Auswertung erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillations-Analysator. Dabei wurde die inkorporierte Tritium-Menge als Zählimpuls pro Minute (cpm; *counts per minute*) gemessen. Für einen Stimulationsansatz wurde der Mittelwert dieser Impulsfrequenzen aus drei Einzelproben bestimmt.

## 3.5 Durchflusszytometrische Analytik

Die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der Lymphozyten wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression und die Dichte von Molekülen auf der Zelloberfläche und innerhalb der Zelle kann mit Hilfe von mAk, an die Fluorochrome gekoppelt sind, untersucht werden. Die Methode ermöglicht die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie bis zu vier verschiedener Fluorochrome für mehrere tausend Einzelzellen.

Im Durchfluss werden die Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm oder 595 nm angeregt. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission. Durch optische und elektronische Detektoren wird das nach vorn (FSC; *forward light scatter*) und das um 90° (SSC=*sideward light scatter*) gestreute Licht gemessen. Der Strahl wird je nach Zelltyp unterschiedlich gestreut. Dabei wird das Signal des FSC hauptsächlich durch die Zellgröße und der Impuls des SSC vorwiegend von der Granularität bestimmt. Die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wird in 90°-Richtung aufgenommen. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) emittiert bei 525/50 nm (FL1) und der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) bei 575/25 (FL2), während der Emissionsbereich des dritten Farbstoffes bei 680/39 nm (FL3) liegt. Die Analysen erfolgten an einem FACS-Calibur™ mit der Software CellQuest™.

### 3.5.1 Phänotypische Analyse von Oberflächenmolekülen

Bei der Ein-Farben-Fluoreszenzanalyse wurde ein Oberflächenantigen entweder mit einem direkt oder indirekt markierten Antikörper detektiert. Es wurden  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz im Rundboden-Mikrotiterplatten ausgesät und für 1 min bei  $200 \times g$  herunterzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgeschüttet. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation:  $200 \times g$ , 1 min, 4 °C/ Waschmedium: PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) wurden die Zellen in 20  $\mu\text{l}$  humanem Intraglobin (Immunglobulin G 10 mg/ml) resuspendiert und für 1 min unter Schütteln inkubiert. Das Intraglobin wurde zum Abblocken von spezifischen Bindungen über  $F_c$ -Rezeptoren der Zellen verwendet. Zu dieser Zellsuspension wurde der spezifischer mAk pipettiert und die Ansätze für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch zwei Waschschriffe ( $200 \times g$ , 1 min, 4 °C) aus der Zellsuspension entfernt. Zu den entsprechenden Proben wurde danach der fluorochrommarkierte Sekundärantikörper (z. B. der FITC-konjugierte Antikörper G $\alpha$ M) gegeben. Die Ansätze wurden für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Proben im Waschmedium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Bei der Zwei-Farben-Fluoreszenzanalyse wurden in jedem Ansatz zwei Oberflächenantigene mittels Antikörper verschiedener Spezifität detektiert. Zur Unterscheidung der beiden Oberflächenantigene war der erste Antikörper

mit FITC und der zweite Antikörper mit PE konjugiert. Bei Färbungen mit ausschließlich direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnten beide Antikörper gleichzeitig zugegeben werden, da sie keine unspezifischen Bindungen miteinander eingehen konnten. Bei den indirekt markierten Ansätzen und bei einigen Drei-Farben-Fluoreszenzfärbungen war es notwendig, die Zellen nach der Färbung mit G $\alpha$ M-FITC Ab als Zweitreagenz mit normalem Mausserum für 15 min bei 4 °C im Dunkeln zu inkubieren, um freie Valenzen der G $\alpha$ M-Antikörper abzusättigen. Danach konnten diese Ansätze mit weiteren, direkt markierten mAk gefärbt werden. Auch diese Proben wurden nach erneutem Waschen in FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 10.000 Zellen pro Ansatz im FACSCalibur bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Laser) analysiert.

### 3.5.2 Intrazelluläre IL-2-Färbung

Die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine ermöglicht die Analyse individueller Zytokin-produzierender Zellen auf Einzelzellniveau bei gleichzeitiger Charakterisierung der Zelle möglich. Um ein im Durchflusszytometer messbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen, ist es notwendig, die Zytokinproduktion der Zellen zunächst zu stimulieren und gleichzeitig die Sekretion der Zytokine zu inhibieren. Die anschließende Fixierung und Permeabilisierung der Zellen ermöglicht die intrazelluläre Markierung der von der Zelle synthetisierten und im Golgi-Apparat akkumulierten Zytokine mit Fluorochrom-konjugierten spezifischen Antikörpern. Mit Hilfe dieser Methode können Angaben über den Prozentsatz oder die Anzahl Zytokin-produzierender Zellen eines bestimmten Zelltyps gemacht werden. Angaben über die Menge des von der Zelle produzierten Zytokins sind jedoch nicht möglich.

In dieser Arbeit wurde der Anteil der alloreaktiven CD4<sup>+</sup> Zellen, die nach einer allogenen Stimulation das Zytokin IL-2 produzierten, mit Hilfe der intrazellulären IL-2-Färbung untersucht. Alloreaktive Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern ( $1 \times 10^5$  Z/Vertiefung) wurden mit Laz 509 ( $0,2 \times 10^5$  Z/Vertiefung) in Rundbodenmikrotiterplatten bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde Brefeldin A mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und gut vermischt. Das Brefeldin A verhindert die Sekretion des Zytokins. Nach einer weiteren Inkubation von drei Stunden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen

anzentrifugiert und in FACS-Puffer mit einer ausreichenden Konzentration an Intraglobin und mit FITC-konjugierten CD4 mAk aufgenommen und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden dann mit 100 µl PBS gewaschen, bevor sie mit 100 µl Fixierungslösung (PBS pH 7,2, 4 % Paraformaldehyd) für 10 min bei 4 °C fixiert wurden. Fixierte Zellen wurden nach einem Waschschrift mit 200 µl PBS pH 7,2, 2 % FCS und 0,2 % Saponin permeabilisiert und mit PE-konjugierten IL-2 mAk für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit dem Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in PBS pH 7,2, 2 % FCS und 0,2 % Saponin aufgenommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

### 3.5.3 Messung der Konzentration löslicher Zytokine

Die Konzentration löslicher Zytokine im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines *Cytometric Bead Arrays* (CBA) bestimmt. In diesem Testsystem werden fünf „Sorten“ unterschiedlich stark fluoreszierender Kunststoffkügelchen (*Beads*), die jeweils mit spezifischen Antikörpern gegen IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  markiert sind, verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzstärke können die fünf unterschiedliche *Bead*-Populationen im Durchflusszytometer im Messbereich von Fluoreszenz 3 voneinander unterschieden werden. Die *Beads* werden zusammen mit der zu analysierenden Probe sowie einem PE-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Aufgrund der Proportionalität der Menge des gebundenen Zytokins zu der im FL2-Messbereich des Durchflusszytometers bestimmten Fluoreszenzintensität der jeweiligen *Beads* können in Proben mit geringem Volumen (50 µl) gleichzeitig bis zu fünf verschiedene Zytokine bestimmt werden. Mit Hilfe entsprechender Standards bekannter Konzentrationen lassen sich die Zytokinkonzentrationen der jeweiligen Proben quantifizieren. Der Test wurde laut Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der speziellen *BD Cytometric Bead Array Software*.

### 3.5.4 Messung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels

Die Konzentration von zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Ionen ( $[Ca^{2+}]_{i*}$ ) kann mit Hilfe Ca<sup>2+</sup>-bindender Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden. Verwendet wurden hier die Farbstoffe Fluo-3-Acetoxymethylester (AM) und Fura Red-Acetomethylester (AM),

wobei das Emissions- und Absorptionsspektrum des ersteren im FL1-Messbereich und das Emissions- und Absorptionsspektrum des letzteren im FL3-Messbereich liegt. Beide Farbstoffe können mit einer Wellenlänge von 488 nm (Argonlaser) angeregt werden. Während die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fluo-3 nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ansteigt, weist dagegen Fura Red ein gegensätzliches Verhalten auf. Die Bindung von Fura Red an  $\text{Ca}^{2+}$  ist mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden.

Die Zellen wurden zunächst in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Z/ml mit 4  $\mu\text{M}$  Fluo-3-AM und 10  $\mu\text{M}$  Fura Red-AM in Kulturmedium ohne FCS 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit dem gleichen Medium die Zelldichte auf  $1 \times 10^6$  Z/ml eingestellt. Die Inkubation wurde um weitere 40 min verlängert. Dabei dringen die Fluoreszenzfarbstoffe aufgrund ihrer Ladungsneutralität ungehindert durch die Zellmembran. Im Zytosol wird das Derivat von unspezifischen Esterasen zu einer tetra-anionischen Form hydrolysiert, die im Zellinnern verbleibt. Um überschüssige, nicht eingedrungene Farbstoffe zu entfernen, wurden die Zellen zuerst zweimal mit Kulturmedium ohne FCS und abschließend mit PBS gewaschen, bevor sie in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Z/ml in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (25 mM HEPES pH 7,2, 140 mM NaCl, 1,8 mM  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 3 mM KCl, 10 mM D-Glucose) aufgenommen wurden. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C im Dunkeln wurden die Zellen für die Messung in FACS-Röhrchen überführt. Zuerst wurde die Basisfluoreszenz aufgenommen. Anschließend wurde zunächst der Sekundärantikörper G $\alpha$ M (20  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugefügt und dann durch Zugabe des TZR/CD3 mAk OKT3 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) die Signaltransduktion gestartet. Dabei wurde die zeitabhängige Zunahme bzw. die Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensitäten (*mean*) aufgezeichnet. Zur Auswertung wurde der Quotient aus den beiden Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

### 3.6 Nachweis der 77C→G Mutation

Da andere Mutationen im CD45-Gen auch zu einer veränderten CD45RA-Expression führen, war es notwendig, zu überprüfen, ob es sich bei Personen mit einer aberranten CD45RA-Expression um Personen mit der 77C→G Mutation handelt. Der Nachweis

erfolgte mit Hilfe einer Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP). Dazu wurde zunächst aus dem Vollblut der untersuchten Personen die DNA isoliert.

### 3.6.1 Isolierung der DNA

Die DNA wurde aus Vollblut der zu untersuchenden Personen mit Hilfe des „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ isoliert. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die an die Silikatmembran der QIAamp-Säulen adsorbierte DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl eluiert. Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurden 50 µl DNA mit 950 µl Wasser verdünnt und die optischen Dichten (E) bei den Wellenlängen  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm gemessen. Über die Formel „DNA [µg/ml]= $E_{260\text{nm}}$  x Verdünnungsfaktor x 50 µg/ml“ wurde die Konzentration der vorliegenden DNA-Lösung bestimmt. Bei einer optischen Dichte von  $E=1$  bei  $\lambda=260$  nm liegt eine Konzentration von 50 µg DNA/ml vor. Als Maß für die Reinheit dient der Quotient  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ . Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

### 3.6.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten *in vitro*. Bei dieser Methode wird mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) und geeigneten Oligonukleotiden (Sense- und Antisense-Primer) in thermischen Reaktionsschritten ein durch die Primerauswahl definierter Bereich der DNA-Proben amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR für den Nachweis der 77C→G Mutation eingesetzt und darüber hinaus nach reverser Transkription von RNA zur Analyse der IL-2 Genexpression verwendet.

Für den Nachweis der Mutation wurde zunächst die Nukleotidsequenzen 1-120 von Exon A amplifiziert. Der PCR-Ansatz umfasst ein 60 µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 300 ng genomischer DNA, 6 µl 10 x PCR-Puffer, 1,2 µl dNTPs (Gemisch aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5 µM 5'- und 3'-Primer und 2 U TaqDNA-Polymerase. Folgende Primer wurden zur Amplifikation der Nukleotidsequenzen 1-120 von Exon A eingesetzt:

Sense: 5'-GATTGACTACAGCAAAGARGC-3'

Antisense: 5'-TTGTGGTCTCTGAGAAGTCA-3'

Nach einer initialen 5-minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden die Amplifikationszyklus folgende Zeiten und Temperaturen verwendet. 55 s Denaturierung bei 94 °C, 60 s Primerhybridisierung bei 60 °C und 60 s Elongation bei 72 °C. Insgesamt wurde diese Zyklusfolge 35 mal wiederholt. Eine 5-minütige Auffüllphase bei 72 °C schloss die PCR-Reaktion ab.

### 3.6.3 Spaltung von PCR-Produkten mit dem Restriktionsenzym *MspI*

Vor der Restriktion wurden zum 50 µl umfassenden PCR-Ansatz 5,5 µl einer 2 M Na-Azetatlösung (pH 5,2) und 140 µl 96%-iger Ethanol gegeben, um die DNA zu fällen. Die Fällung fand über Nacht bei -20 °C statt. Danach wurde die ausgefällte DNA 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert und vorsichtig abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde dann mit 70%-igen Ethanol gewaschen. Nach erneutem 20-minütigen Zentrifugieren bei 10.000 x g wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 90%-igen Ethanol gewaschen und abschließend 10 min bei 10.000 x g sedimentiert. Nach anschließenden Trocknen wurde die DNA in 16 µl autoklaviertem Wasser aufgenommen. Hiervon wurden 8 µl für den RFLP-Ansatz verwendet. Zu diesen 8 µl wurden 1 µl L-Puffer (10 mM/l Tris-HCL, 10 mM/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,5 bei 37 °C) und 1 µl (10 U) Restriktionsendonuklease *MspI* (Erkennungssequenz: CCGG) gegeben. Der Spaltungsansatz wurde bei 2 h bei 37°C inkubiert. Um die Spaltungsreaktion zu stoppen, wurde 2,5 µl 5 x Gelelektrophoresebeladungspuffer (15 % Ficoll Typ 400, 1 % SDS, 50 nM EDTA und 0,3 % Bromphenolblau/Xylencyanol) zum Spaltungsansatz gegeben.

### 3.6.4 Nachweis der Spaltungsprodukte im Polyacrylamidgel

Die Elektrophorese dient sowohl präparativen als auch analytischen Zwecken. Bei diesem Verfahren wird die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Fragmente in Agarosen- und Polyacrylamidgelen aufgetrennt, wobei die

Polyacrylamidgele bei kleinen Fragmenten wie etwa bei den Spaltungsprodukten der *MspI*-Restriktion eine bessere Auftrennung bieten.

Die Auftrennung der Spaltungsprodukte erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamidgel. Das Gel setzte sich aus 33,6 g Harnstoff, der in 32,4 ml Wasser und 8 ml 10 x TBE-Puffer (0,89 M Tris-Borat, 0,89 M Borsäure und 0,02 M EDTA) gelöst wurde, sowie 11,6 ml Acrylamid (38 Teile Acrylamid und 2 Teile Bisacrylamid), 440 µl einer 10%igen APS-Lösung und 25 µl TEMED zusammen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Für die Auftrennung wurde der gesamte Spaltungsansatz mit dem Gelelektrophoresebeladungspuffer auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und 5 h bei 17 V aufgetrennt. Nach einer 3-minütigen Einwirkung einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht und photographisch festgehalten.

### 3.7 Analyse der Genexpression

Um die Genexpression von IL-2 in aktivierten Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation und Kontrollpersonen nach T-Zellstimulation zu untersuchen, wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 24-Loch-Platten mit immobilisierten TZR/CD3 mAk (OKT3, 10 µg/ml) für 0, 1, 2 und 4 Stunden stimuliert. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die IL-2-mRNA-Expression in aktivierten Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen mit Hilfe der semiquantitativen PCR analysiert und verglichen.

#### 3.7.1 Isolierung der RNA

Nach einem Waschschrift (200 x g, 10 min) wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 250 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend mit 750 µl peqGold TriFast<sup>TM</sup> versetzt und gut durchmischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde pro Milliliter Suspension 200 µl Chloroform hinzugefügt, durch kräftiges Schütteln durchmischt und anschließend bei RT 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 12000 x g bei RT zentrifugiert, wodurch es zur Auftrennung in drei Phasen kam: einer oberen, wässrigen Phase mit der RNA, einer mittleren Phase mit der DNA und einer unteren Phase mit den Proteinen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurde das gleiche Volumen

Isopropanol (500 µl) zu den Überständen gegeben. Nach kräftigem Schütteln erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12.000 x g bei 4 °C. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und das RNA-Pellet zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen (7000 x g, 8 min, 4 °C). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet bei RT an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 15 µl RNA-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 56 °C unter Schütteln gelöst. Der Gehalt an Nukleinsäure wurde UV-photometrisch ermittelt. Die Extinktionen (E) der RNA-Lösung wurden bei den Wellenlängen 260 nm (Absorption der Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorption von Proteinen) gemessen. Aus der Extinktion bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration bestimmt (1 OD = 40 µg/ml bei einer Schichtdicke von 1cm). Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm dient zur Abschätzung von Proteinkontaminationen. Die isolierte RNA konnte bei -80 °C aufbewahrt werden.

### 3.7.2 RT-Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Amplifikation von RNA-Transkripten über die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) musste die RNA zunächst in cDNA überführt werden. Die Synthese erfolgte in einem 15 µl umfassenden Reaktionsansatz bestehend aus 0,6 mM dNTPs, 20 pM Hexanukleotiden, 1,5 µl 10 x RT-Puffer, 20 U Moloney Murine Leucemia Virus (MMLV) Reverse Transkriptase (Stratagene). Für ein Experiment wurden jeweils „Mastermixe“ hergestellt. Für alle Proben wurden alle Reagenzien bis auf das Template zusammengegeben. Die RNA wurde anschließend mit entsprechenden Aliquots des Mastermixes versetzt, zunächst für 5 min bei 95 °C denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl MMLV Reverse Transkriptase. Nach der Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes bei 95 °C für 5 min inaktiviert.

Für die Analyse der IL-2 Genexpression wurde die PCR nach reverser Transkription der RNA aus aktivierten Zellen von Kontrollpersonen und varianten Spendern zur Amplifikation der IL-2-Transkripte eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem 20 µl umfassenden Reaktionsvolumen, bestehend aus 3 µl cDNA, 2 µl 10 x PCR-Puffer, 0,4 µl dNTPs (Gemisch aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 2,5 µM 5'- und 3'-Primer und 1,5 U TaqDNA-Polymerase. Die Sequenzen der Primer und der daraus resultierenden PCR-Produkte sind im folgenden dargestellt:

### β-Aktin PCR-Produkt

Als interner Standard der RT-Reaktion wurden Primer für einen 300 Basenpaare langen Abschnitt des konstitutiv exprimierten Gens β-Aktin (*housekeeping gene*) gewählt. In der PCR wurde das folgende Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 62 °C verwendet:

β-Aktin, Senseprimer: 5'-GAA ACT ACC TTC AAC TCC ATC-3'

β-Aktin, Antisenseprimer: 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3'

### IL-2 PCR-Produkt

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 222 Basenpaare langen Abschnitt der IL-2 cDNA. Für das folgende Primerpaar wurde eine Annealingtemperatur bei 55 °C gewählt:

IL-2, Senseprimer: 5'-ACT CAC CAG GAT GCT CAC AT-3'

IL-2, Antisense-Primer: 5'-AGG TAA TCC ATC TGT TCA GA-3'

Nach einer 5-minütigen Initialdenaturierung bei 94 °C wurden im Amplifikationszyklus folgende Temperaturen und Zeiten verwendet. Zunächst hybridisierten Sense- und Antisenseprimer bei der für das jeweilige Primerpaar gewählten Annealingtemperatur für 60 s an komplementäre Sequenzabschnitte, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Bei der darauffolgenden Elongation wurde die Temperatur für 60 s auf 72 °C erhöht. Mit einer erneuten Denaturierung bei 94 °C für 30 s wurde der nächste Zyklus eingeleitet. In Vorexperimenten wurde die geeignete Zyklusanzahl für die Amplifikation des β-Aktin- und IL-2-PCR-Produktes ermittelt. Diese Zyklusabfolge wurde bei der Amplifikation der β-Aktin cDNA 25 mal wiederholt, während die IL-2 cDNA in 30 Zyklen amplifiziert wurde. Abschließend folgte eine 5-minütige Auffüllphase bei 72 °C.

### **3.7.3 Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Für das 2%ige Gel wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,11 %

Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Zu dieser Gellösung werden 100 µl Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gegeben. Nach kurzem Abkühlen wurde die Gellösung auf einen Gelträger gegeben und ein Gelkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Gelkamm entfernt. Das erhärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit 600 ml 1x TAE-Puffer gelegt. Von den PCR-Produkten wurden 10 µl mit 4 µl Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol) in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 60 V. Abschließend wurde die Banden mittels UV-Licht visualisiert und fotografiert. Die Übereinstimmung der Molekulargröße des tatsächlich amplifizierten cDNA-Fragmentes mit dem für das jeweilige Primerpaar erwarteten Wert wurde mit einer DNA-Basenleiter als interner Standard kontrolliert. Alle Proben, die unmittelbar miteinander verglichen wurden, wurden gemeinsam amplifiziert und ausgewertet, um artifizielle Variationen in der Amplifikation zu minimieren.

### **3.7.4 Quantitative Analyse der PCR-Amplikate**

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde von den Gelen ein elektronisches Abbild erstellt. Dies geschah unter Verwendung der Geldokumentationsanlage *Eagle-Eye*. Mit der integrierten Software wurden die sichtbaren Banden markiert und unter Subtraktion des Hintergrundfluoreszenzsignals die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Bande ermittelt.

### **3.7.5 Semiquantitative Analyse der Genexpression**

Da die photometrische Bestimmung der RNA-Isolate nicht zwischen intakter und degradierter Nukleinsäure differenzieren kann und da trotz größter Sorgfalt bei der Reversen Transkription Variationen zwischen den zu vergleichen Proben auftreten können, gelten PCR-Amplifikate nicht als direkt vergleichbar. Um dieses Problem zu lösen, wird ein sogenanntes *housekeeping gene* als interner Standard in der PCR mitgeführt. Wenn gezeigt wird, dass das *housekeeping gene* der zu vergleichenden Proben in der PCR gleiche Mengen an Amplifikat liefert, können PCR-Amplifikate von verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit fungierte  $\beta$ -Aktin als ein solcher interner Standard. Zur Korrektur geringer Abweichungen der  $\beta$ -Aktin Amplifikate wurde der Quotient aus dem Fluoreszenzsignal des Cytokines und des

$\beta$ -Aktins gebildet, und der Wert des Quotienten als Maß für die Genexpression des jeweiligen Gens herangezogen. Da allerdings die Linearität der PCR-Reaktion selbst in der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert wurde, werden die Resultate als semiquantitativ betrachtet.

### 3.8 Zell-Lyse

Um gewünschte Proteine aufzureinigen oder untersuchen zu können, mußten die Zellen erst aufgeschlossen werden. Die Zellen wurden mit detergenshaltigem Puffer lysiert, so dass die Zellmembranintegrität zerstört und die Proteine solubilisiert wurden. In den meisten Fällen wurde entweder NP-40-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und 10 mM NaF (Kinase-Inhibitoren), 1 mM PMSF (Protease-Inhibitor), 10 mM IAA (Redoxreagens), 150 mM NaCl sowie 1 % NP-40) oder RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % NP-40, 0,5 % DOC sowie 0,1 % SDS) als Lysepuffer verwendet, wobei der RIPA-Puffer aufgrund der ionischen Detergenzien DOC und SDS eine stärkere denaturierende Wirkung hat als der nicht ionische NP-40-Puffer.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  Z/ml mit Lysepuffer aufgeschlossen. Die Lyse fand für 45 bis 60 min bei 4 °C in einem Überkopfschüttler statt. Anschließend wurden die unlöslichen Zelltrümmer (z. B. Nuclei) bei 4 °C und  $8000 \times g$  für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann entweder direkt mit 2 x Lämmli-Auftragspuffer (100 mM Tris pH 6,8, 20 % Glycin, 2 % SDS, 0,2 mg/ml Bromphenolblau sowie 0,4 M DTT) versetzt und nach Denaturierung bei 95 °C für 5 min direkt als Gesamtzell-Lysat aufgetragen. Alternativ konnte dieses Lysat einer Immunpräzipitation unterzogen werden. Mit Probenpuffer versetztes Gesamtzell-Lysat konnte bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

### 3.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode mit Hilfe des Bio-Rad-Protein-Assays durchgeführt. Die Bradford-Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm bei Proteinbindung. 100  $\mu\text{l}$  Proteinlösung unbekannter Konzentration in

Dreifachwerten wurde mit 100 µl Farbstofflösung, die zuvor 2:5 mit Wasser verdünnt worden war, gemischt. Als Standardprotein mit bekannter Konzentration wurde Intraglobin mitgeführt. Nach 10 min Reaktionszeit bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm am ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Anhand der Standardkurve des Standardproteins konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

### 3.10 Immunpräzipitation

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zell-Lysat dienen spezifische, an Protein-G-Sepharose gekoppelte Antikörper. Protein G ist ein 18 kD Protein und stellt einen Bestandteil der Zellmembran von *Staphylococcus aureus* dar. Dieses Protein bindet das Fc Fragment von Immunglobulin G, wodurch eine Immobilisierung des Antikörpers erreicht wird, ohne dass die Antigenbindungsstelle blockiert wird.

Vor der Beladung der Protein-G-Sepharose mit Antikörpern wurde diese gewaschen und unspezifische Bindungen abgesättigt. Zur Absättigung wurden 150 µl aufgeschlämmte Protein-G-Sepharose mit 1 ml Tris-HCl (pH 7,5, 0,5 % BSA) versetzt und vermischt. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt. Diese Arbeitsschritte wurden zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Protein G-Sepharose dreimal mit 1 ml Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Protein-G-Sepharose-Kügelchen in 300 µl Tris-HCl (pH 7,5) aufgeschlämmt. Sie wurden in drei Aliquots à 100 µl geteilt. Ein Ansatz wurde mit 2 bis 20 µg mAk versetzt und auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurden die *Beads* dreimal mit Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Um unspezifisch bindende Proteine aus dem Gesamtzell-Lysat zu entfernen, wurde es auf Protein-G-Sepharose-Kügelchen ohne konjugierten Primärantikörper gegeben und für 30 min auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Protein G-Sepharose abzentrifugiert und der Überstand ein weiteres Mal mit der Protein G-Sepharose inkubiert. Nach diesem Verfahren waren die meisten unspezifisch bindenden Proteine aus dem Zell-Lysat eliminiert, so dass das Lysat von  $5 \times 10^6$  bis  $10 \times 10^6$  Zellen zu den mit Primärantikörper beladenen Protein G-Sepharose-Kügelchen gegeben werden konnte. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Ausbildung der spezifischen Antigen-

Antikörperkomplexe. Die Protein G-Sepharose-Kügelchen mit den Antigen enthaltenden Immunkomplexen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand abgesaugt und die Protein G Sepharose-Immunkomplexe viermal mit Tris-HCl (pH 7,5, 0,5 % NP-40) gewaschen. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine sowie der Antikörper von der Protein G-Sepharose durch 10-minütige Inkubation in 2 x Lämmli-Auftragspuffer bei 95 °C gelöst. Der Überstand mit den präzipitierten Molekülen konnte direkt in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen werden.

### 3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die präzipitierten Moleküle konnten in einer anschließenden diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) aufgetrennt und analysiert werden. Durch die Bindung des im Lämmli-Probenpuffer vorliegenden polyanionischen Detergenz SDS an die Aminosäuren der Proteine erhalten diese eine negative Nettoladung, welche alle nativen Ladungen überdeckt und in etwa proportional zur Molekülmasse ist. Die verschiedenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei sich ihre Beweglichkeit  $R_f$  ( $R_f = \text{zurückgelegte Strecke des Proteins} / \text{zurückgelegte Strecke der Lauffront}$ ) linear proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmassen verhält. Durch das Mitführen von gefärbten Standardproteinen bekannter Molekülmasse kann anhand einer Eichgeraden die relative Molekülmasse unbekannter Proteine bestimmt werden.

Die Gele wurden in einer Dicke von 0,75 mm oder 1 mm gegossen. Das Trenngel hatte ein Gesamtvolumen von 6 ml. Je nach Fragestellung und in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 7- bis 15%ige Trenngele (bezogen auf die Acrylamidkonzentration) verwendet. Die Lösung für das Trenngel (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS) wurde mit 75 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung und 10 µl TEMED als Katalysator zum Starten der Polymerisierungsreaktion versetzt. Damit während des Auspolymerisierens eine glatte Gelkante entstand, wurde das Trenngel mit 0,5 ml Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Zuvor wurde das Butanol mit Hilfe eines saugfähigen Papiers entfernt und die Gelkante zweimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült. Das 5%ige Sammelgel (450 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS) hatte ein Volumen von 2,5 ml und

wurde mit 50 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung sowie 5 µl TEMED als Katalysator zum Starten der Polymerisierungsreaktion versetzt. In dieses Gel wurde vor dem Auspolymerisieren ein Probenkamm eingepasst. Die resultierenden Geltaschen wurden nach dem Auspolymerisieren mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um Gelreste zu entfernen. Die Geltaschen fassten in Abhängigkeit von der Dicke des Gels 30 µl bis 45 µl Probenmaterial. Nach dem Beladen des Gels mit den Proben und dem vorgefärbten Molekulargewichtsstandard wurde die Elektrophorese solange mit einer Stromstärke von 15 mA/Gel in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) durchgeführt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht bzw. sich eine einheitliche Lauffront gebildet hatte. Danach wurde die Stromstärke auf 20 mA/Gel erhöht. Der Gellauf war nach 1,5 bis 2,5 h beendet.

### **3.12 Western-Blot**

Durch diese Methode konnten Proteine, welche in einer vorherigen SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt wurden, auf eine proteinbindende Membran transferiert werden. Durch Interaktion von polaren Polymeren der Membran mit Aminosäureseitenketten der Proteine blieben diese an der Membran adsorbiert und konnten anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

#### **3.12.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran**

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch (Semi-Dry-Verfahren) auf eine proteinbindende PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Der Transfer fand senkrecht zur Elektrophorese-Laufrichtung statt. Die Membran befand sich auf der Anodenseite des Gels, da SDS-komplexierte Proteine eine negative Ladung aufweisen und in Richtung der Anode wandern. Das Transportpuffersystem war diskontinuierlich. Man schichtete in einer Graphit-Elektroden-Blotapparatur übereinander auf die Anodenplatte: Zwei in Blotpuffer A (300 mM Tris (pH 10,4), 10 % Methanol), ein in Blotpuffer B (25 mM Tris (pH 10,4), 10 % Methanol) äquilibriertes Stück Filterpapier, zurechtgeschnitten in den Ausmaßen der Membran und des Gels. Darüber wurde die Membran, das Gel sowie weitere drei Stück Filterpapier, getränkt in Blotpuffer C (25 mM Tris (pH 9,4), 10 % Methanol sowie 40 mM ε-Aminocaprinsäure) gegeben. Der Stapel wurde leicht gepresst, um

etwaige Luftbläschen zu entfernen. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 52 mA für 1,5 h transferiert. Der Erfolg des Blottens konnte durch die reversible und unspezifische Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Die spezifische Detektion von adsorbierten Proteinen geschah durch entsprechende Antikörper.

### 3.12.2 Immundetektion

Die Detektion der geblotteten Proteine wurde mittels eines an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers und anschließender verstärkter Chemilumineszenz-Reaktion (*Enhanced chemiluminescence* = ECL) durchgeführt. Diese Methode kann sehr sensitiv antikörpermarkierte Proteine nachweisen. Die Chemilumineszenz ist eine chemische Reaktion, bei der Licht emittiert wird. Dabei wird ein organisches Chromophor, in diesem Fall Luminol, in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von der Peroxidase oxidiert. Das Substrat zeigt nach Oxidation eine starke Emission von Licht im VIS-Bereich, welche durch Auflegen eines Röntgenfilmes auf die PVDF-Membran nachgewiesen werden kann.

Nach Adsorption der elektrophoretisch transferierten Moleküle gab es noch freie proteinkompetente Bindungsplätze, die abgesättigt werden mussten. Ansonsten käme es zu einer unspezifischen Bindung von Antikörpern an die Membran. Diese würde in einem starken Hintergrund auf dem entwickelten Photofilm resultieren. Aus diesem Grunde wurde die Membran in Milchblockpuffer (PBS + 0,05 % Tween + 3 % Milchpulver) für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei Untersuchungen von Tyrosinphosphorylierungen wurde statt des Milchblockpuffers Caseinblockpuffer (PBS + 0,05 % Tween + 1 % Casein) verwendet. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers im Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min lang in PBS + 0,05 % Tween gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Sekundärantikörper in einer geeigneten Verdünnung hinzugegeben, um diejenigen Proteine nachzuweisen, welche mit dem Primärantikörper markiert worden waren. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler bei RT. Um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde dreimal mit PBS + 0,05 % Tween gewaschen. Zuletzt erfolgte eine 5- bis 10-minütige Inkubation der Membran in einer mit bidest. H<sub>2</sub>O fünffach verdünnten Substratlösung, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und als lichtemittierendes

Substrat Luminol (2-Amino-phthalsäurehydrazid) enthält. Die Membran wurde 3 s in bidest. H<sub>2</sub>O gespült und sofort luftblasenfrei in Klarsichtfolie gehüllt. Durch Auflegen eines Filmes in einer Filmkassette konnte so die Antikörperbindung detektiert werden.

### **3.12.3 „Strippen“ der Membran**

Zum Teil war es notwendig, adsorbierte Proteine auf einer PVDF-Membran nach erfolgtem Nachweis mit einem anderen mAk zu färben. Bevor jedoch eine weitere Proteinfärbung erfolgen kann, werden zunächst die zuvor gebundenen Antikörper durch das so genannte „Strippen“ entfernt. Die unspezifische Wechselwirkung zwischen adsorbiertem Protein und proteinbindender Membran unterscheidet sich qualitativ von der Protein-Protein-Wechselwirkung innerhalb von Antigen-Antikörperkomplexen. Das Detergens SDS im 'Stripping'-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) komplexiert Proteine mit einem Polyanion, dieses führt zur Dissoziation von Antigen-Antikörperkomplexen auf der Membran. Zusätzlich vorhandenes  $\beta$ -Mercaptoethanol im „Stripping“-Puffer wirkt reduzierend und erleichtert den Dissoziationsprozess.

Die Membran wurde 30 min bei 50 bis 70 °C in „Stripping“-Puffer inkubiert. Die nun ungebundenen Antikörper können durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,05 % Tween für die Dauer von je 5 min entfernt werden. Das durch den Elektrotransfer adsorbierte Protein auf der PVDF-Membran sollte jedoch noch auf der Membran verbleiben. Die Effizienz der Entfernung von Antikörpern wurde bei Bedarf durch Zugabe von ECL-Substratlösung und Exposition eines Photofilms kontrolliert. Es sollte zu keiner Lichtemission mehr kommen, da kein gebundener Sekundärantikörper (gekoppelt mit POD) mehr vorhanden ist.

## **3.13 Proteinfärbungen**

### **3.13.1 Coomassie Brilliant Blau G250-Färbung**

Um die Qualität und Quantität der aufgetragenen Proben nach dem Lauf zu überprüfen, wurden die Gele einer Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau G250 unterzogen. Das Gel wurde für 10 min in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % Wasser v/v) gewaschen und dann für mindestens 1 h in der Färbelösung (0,05 % in

Fixierlösung) inkubiert. Die Entfärbung des Gels fand in der Entfärberlösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure und 60 % Wasser v/v) statt. Nach der Färbung wurden die Gele im Gelrockner unter Vakuum bei 70 °C innerhalb von 60 min getrocknet.

### 3.13.2 Proteinnachweis mittels Ponceau-S-Lösung

Nach dem Transfer konnten die adsorbierten Proteine auf der PVDF-Membran zur Kontrolle des Transfers durch eine Ponceau-S-Färbung reversibel angefärbt werden. Dazu wurde die noch feuchte Membran in eine 0,2%ige Ponceau S-Lösung getaucht und 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Es kommt zu einer Rotfärbung aller adsorbierten Proteine. Durch sukzessives Waschen mit bidest. H<sub>2</sub>O konnte der Kontrast zwischen Proteinbanden und Hintergrund wie gewünscht eingestellt werden. Dieser Nachweis diente der Kontrolle des ordnungsgemäßen Transfers. Nach der Färbung wurde die Ponceau-S-Lösung mit PBST-Lösung (PBS (pH 7,5), 0,05 % Tween-20) wieder von der Membran gewaschen.

## 3.14 Proteinkinase-Assay

Die p56<sup>lck</sup> Kinase-Aktivität in aktivierten Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen wurde mit Hilfe eines Protein-Tyrosine-Kinase Assays untersucht. Dieses Testsystem basiert auf der Phosphorylierung eines synthetisch biotinylierten Substrates (poly [Glu:Tyr], 4:1), das multiple Tyrosinreste enthält, die von einer Bandbreite von Proteintyrosinkinasen phosphoryliert werden kann. Phosphorylierte Peptide können wiederum durch einen anti-Phosphotyrosin mAk, der mit einer Meerrettischperoxidase (HRP) konjugiert ist, detektiert werden. Die Zugabe von Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) führt zu einer Substrat-Hydrolyse durch die Peroxidase unter Bildung einer blaugefärbten Lösung des reduzierten Substrates. Die Konzentration der Phosphopeptide wird im ELISA-Photometer durch einen Farbumschlag von blau (630 nm) nach gelb (450 nm) bestimmt. Anhand eines mitgeführten Phosphopeptidstandards kann die Aktivität der eingesetzten Kinase bestimmt werden. Es wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in RIPA-Puffer lysiert, und das Lysat wurde einer Immunpräzipitation mit dem p56<sup>lck</sup> mAk (3A5) unterzogen. Der Test wurde laut Anweisungen des Herstellers (Chemicon, Hofheim) durchgeführt.

### 3.15 Phosphatase-Assay

Zur Bestimmung der *in vitro*-Phosphataseaktivität wurde als Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) verwendet. Das farblose pNPP wird von Proteintyrosinphosphatasen zu dem gelben p-Nitrophenolat umgesetzt, das sich anhand seiner Absorption bei 410 nm nachweisen lässt. Dazu wurden die Zellen ( $2 \times 10^7$ ) in 50 mM Tris (pH 7,2), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Brij 90, 0,2 mM PMSF lysiert; die Zell-Lyse erfolgte ohne die Phosphataseinhibitoren NaF und ortho-Vanadat. Anschließend wurden CD45-Moleküle mit Hilfe des CD45 mAk (AICD45.2) präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Präzipitate in Dreifachansätzen in jeweils 100  $\mu$ l Nachweisreagenz (50 mM Tris (pH 7,2), 0,1 mM DTT, 5 mM EDTA, 5 mM p-Nitrophenylphosphat) aufgenommen und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine rekombinante CD45-Phosphatase mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100  $\mu$ l 1 M NaOH beendet, der Überstand in Mikrotiterplatten überführt und die optische Dichte im ELISA-Lesegerät gemessen. Die Konzentration an gebildetem p-Nitrophenol wurde anhand der im ELISA-Lesegerät gemessenen optischen Dichte bei 410 nm über das Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

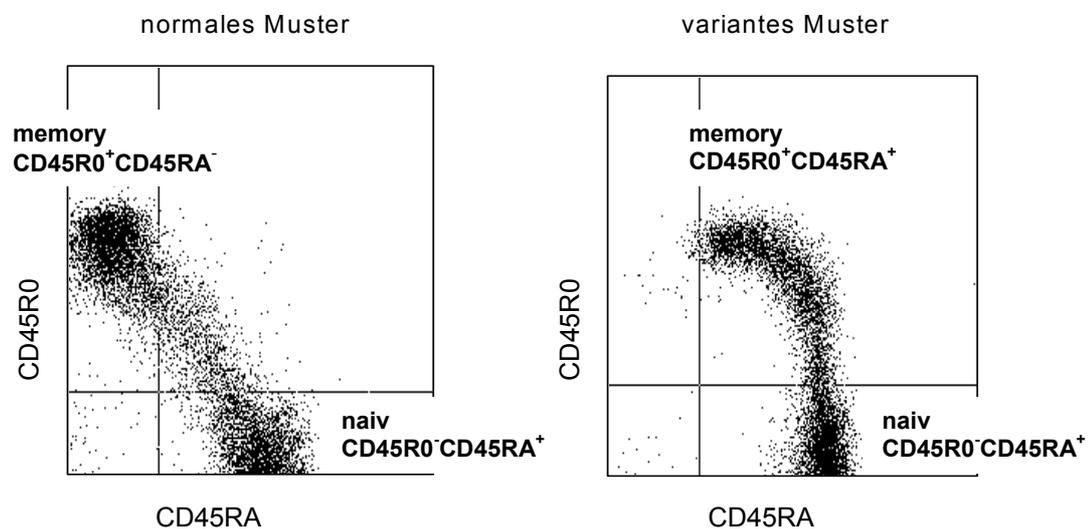
### 3.16 Statistik

Die statische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Programms SPSS fürs Windows 11.5 (Fa. SPSS Inc. USA) durchgeführt. Die Annahme der gleichen Varianz der Daten wurde mit einem Levene Median Test überprüft. Nach Feststellung der gleichen Varianz wurde für den Vergleich eines Parameters zwischen zwei Gruppen der gepaarte Student's-t-Test (t-Test) eingesetzt. Die Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit pro Parameter durchgeführt, das heißt,  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Alle Ergebnisse wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Darstellung des varianten CD45RA-Expressionsmoders und der 77C→G Punktmutation als molekulare Ursache

Mit Hilfe von mAk gegen die Isoformen CD45RA und CD45R0 lassen sich bei 98% bis 99% gesunder Blutspender drei T-Zellsubsets nachweisen (Abb. 4.1 links). CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> gelten dabei als „naive/ nicht sensibilisierte“ Zellen, während die CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup> Subpopulation „memory/ sensibilisierte“ Zellen beinhaltet.



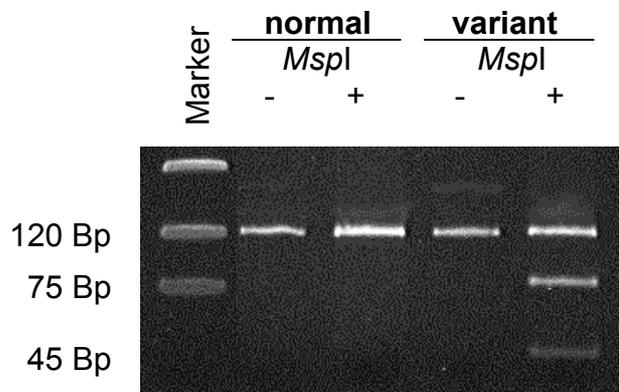
**Abbildung 4.1: Die Expression von CD45RA- und CD45R0-Isoformen auf peripheren Blutlymphozyten von Personen mit normaler und varianter CD45RA-Expression**

0,5 x 10<sup>6</sup> frisch isolierte Blutlymphozyten wurden mit dem FITC-markierten CD45RA-mAb (MEM56) und mit dem PE-markierten CD45R0-mAb (UCHL-1) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der linke Dotplot stellt das CD45RA- und CD45R0-Expressionsmuster einer Kontrollperson dar, während im rechten Dotplot das CD45RA- und CD45R0-Expressionsmuster eines varianten Blutspenders gezeigt ist.

Da CD45RA-Isoformen im Zuge der Differenzierung von „naiven“ zu „memory“ Zellen herunterreguliert werden, wird die kleine CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Population als Übergangsstadium angesehen. Bei etwa 1-2% gesunder Blutspender findet sich jedoch ein variantes Expressionsmuster der beiden Isoformen (Abb. 4.1 rechts). Die CD45R0<sup>+</sup> „memory“ Population ist bei diesen Probanden nicht CD45RA-negativ, sondern koexprimiert beide Isoformen (CD45R0<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Der Phänotyp der „naiven“

Subpopulation unterscheidet sich dagegen nicht markant zwischen varianten und Kontrollpersonen (CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>). Das variante Expressionsmuster wurde ursprünglich in der Arbeitsgruppe identifiziert (Schwinzer and Wonigeit 1990) und ist auf eine Punktmutation im Exon A des CD45-Gens zurückzuführen (Thude, Hundrieser et al. 1995), die ein Spleißen des Exons und damit die Herunterregulation von CD45RA-Isoformen verhindert.

Für die in dieser Arbeit angestrebten Analyse der funktionellen Auswirkungen einer aberranten Expression von CD45RA-Isoformen standen Lymphozyten von drei gesunden Blutspendern mit varianter Expression und Zellen von neun varianten MS-Patienten zur Verfügung. Da kürzlich gezeigt worden ist, dass eine andere Punktmutation im CD45 Exon A (59C→A) einen Phänotyp erzeugt (Jacobsen, Hoffmann et al. 2002), der dem von 77C→G sehr ähnlich ist, war es notwendig, mit Hilfe von RFLP-Analysen zu überprüfen, ob es sich bei den untersuchten Personen mit variantem CD45RA-Expressionsmuster auch um Personen mit der 77C→G Mutation handelte.



**Abbildung 4.2: Nachweis der 77C→G Mutation im Exon A durch eine *MspI* spezifische RFLP-Analyse**

Die DNA wurde aus peripheren Blutlymphozyten von Personen mit variantem CD45RA Expressionsmuster isoliert. Mit Hilfe der PCR-Technik wurden die Nukleotidpositionen 1-120 von Exon A amplifiziert. DNA-Proben wurden unbehandelt belassen (-) oder mit *MspI* (+) verdaut und Fragmente in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde jeweils die DNA einer Person mit normalem CD45RA-Expressionsmuster mitgeführt.

Bei allen untersuchten Personen mit variantem CD45RA-Expressionsmuster wurde die 77C→G Punktmutation nachgewiesen. Nach dem Restriktionsverdau mit *MspI* traten bei varianten Personen drei Banden im Bereich von 120 Bp, 75 Bp und 45 Bp auf (Abb.

4.2). Das Wildtyp-Allel behielt eine Länge von 120 Bp unverändert bei, da es nicht durch *MspI* verdaut wurde. Durch die 77C→G Mutation lag im amplifizierten Bereich eine Schnittstelle für *MspI* (CCCG→CCGG) vor, so dass das mutierte Allel in zwei Fragmente mit einer Länge von 75 Bp und 45 Bp gespalten wurde. Damit wurde gezeigt, dass es sich bei den untersuchten Probanden mit dem varianten CD45RA-Phänotyp um Personen handelte, die bezüglich der 77C→G Mutation heterozygot waren. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit Zellen von drei gesunden, varianten Personen und fünf gesunden Kontrollpersonen bzw. von drei varianten MS-Patienten und drei MS-Kontrollpatienten durchgeführt.

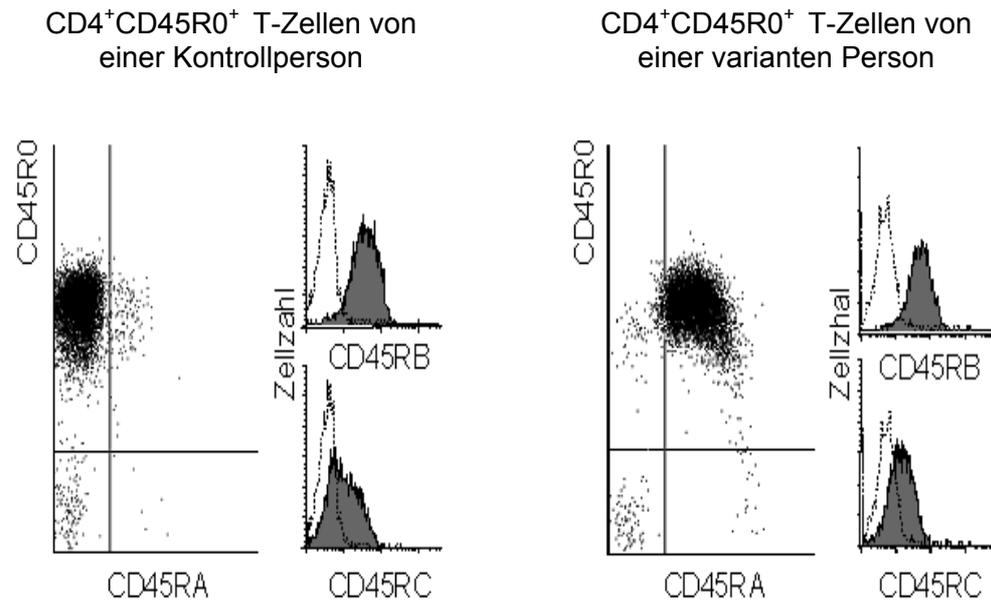
## **4.2 Funktionelle Konsequenzen der 77C→G Mutation bei gesunden Probanden**

Um möglicherweise vorhandene funktionelle Unterschiede zwischen Zellen varianter Blutspender und Kontrollprobanden nachweisen zu können, wurden zunächst die Reaktionsmuster nach T-Zellrezeptorvermittelter Aktivierung verglichen (Abschnitt 4.2.1). Die Untersuchungen fokussierten dabei sowohl auf die Darstellung zellulärer Funktionen (Proliferation und Zytokinsynthese) als auch auf frühe Signaltransduktionsereignisse (Phosphorylierung von TZR- $\zeta$  und Zap-70 sowie Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen). In einem zweiten Block von Experimenten wurde die Frage bearbeitet, ob die variante CD45RA-Expression zu veränderten Reaktionen nach Aktivierung durch Zytokine führt (Abschnitt 4.2.2). Auch hierbei wurden zelluläre Funktionen (Proliferation) und frühe Signaltransduktionsereignisse (Phosphorylierung von JAK1 und STAT5) zwischen varianten und Kontrollzellen verglichen.

### **4.2.1 Auswirkungen von 77C→G auf die T-Zellrezeptorvermittelte Aktivierung**

#### **4.2.1.1 Proliferation und Zytokinproduktion nach TZR/CD3- und CD28-vermittelter Stimulation von frisch isolierten T-Zellsubsets**

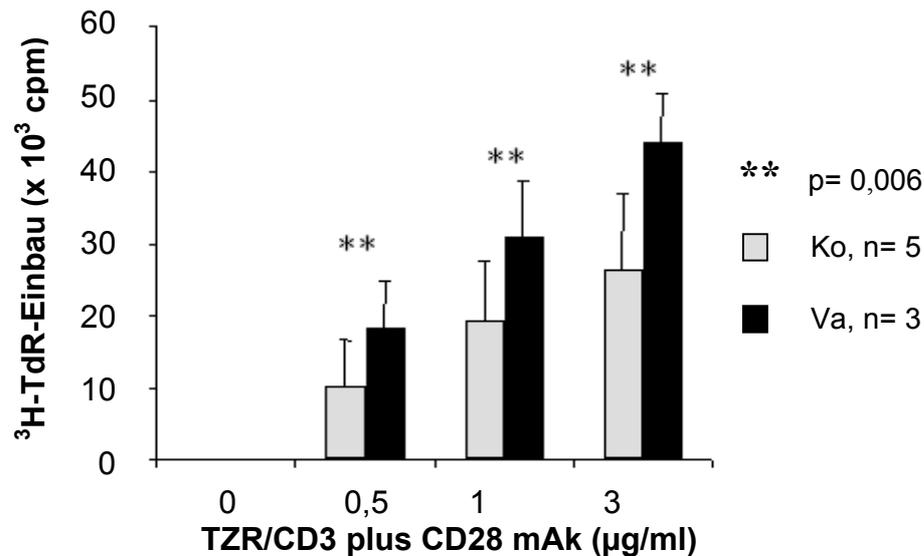
Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, kommt es aufgrund der 77C→G Mutation trotz Aktivierung nicht zur Herunterregulierung von CD45RA-Molekülen auf Zelltypen, die normalerweise CD45RA negativ sind. So wird z.B. auf „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation neben der CD45R0-Isoform ebenfalls die CD45RA-Isoform exprimiert. Aufgrund dieses markanten Unterschiedes zwischen Personen mit der 77C→G Mutation und Personen mit Wildtyp-Allelen lassen sich mögliche funktionelle Konsequenzen der 77C→G Mutation in dieser Population vermuten.



**Abbildung 4.3: Expression von CD45-Isoformen auf „memory“ T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern**

CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation wurden durch Depletion von B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> T-Zellen angereichert. In den Dotplots ist die Expression von CD45RA- und CD45R0-Isoformen dargestellt. Das CD45RA- und CD45R0-Expressionsmuster wurde durch eine gleichzeitige Färbung mit den Antikörpern CD45RA-FITC und CD45R0-PE detektiert. Die Expression von CD45RB- und CD45RC-Isoformen wurde in einer Ein-Farben-Fluoreszenzanalyse durch die Bindung von CD45RB mAk bzw. CD45RC mAk und anschließendem Nachweis mit GαM-FITC bestimmt. Ausgefüllte Kurven zeigen die Reaktivität der Primärantikörper, während die Fluoreszenzintensitäten des Sekundärantikörpers GαM-FITC allein als unausgefüllte Kurven dargestellt sind.

Für die folgenden Experimente wurden daher „memory“ T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern aus PBMC isoliert und mit Hilfe von mAk gegen die Isoformen CD45R0, CD45RA, CD45RB und CD45RC charakterisiert. Auf CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen waren die Isoformen CD45R0 und CD45RB nachweisbar (Abb. 4.3 links). CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von varianten Probanden reagierten mit den mAk gegen die Isoformen CD45R0 und CD45RB, aber zusätzlich dazu mit dem mAk gegen die CD45RA-Isoformen (Abb. 4.4 rechts). CD45RC-Isoformen ließen sich nur in geringer Dichte auf „memory“ T-Zellen von varianten und Kontrollpersonen nachweisen.

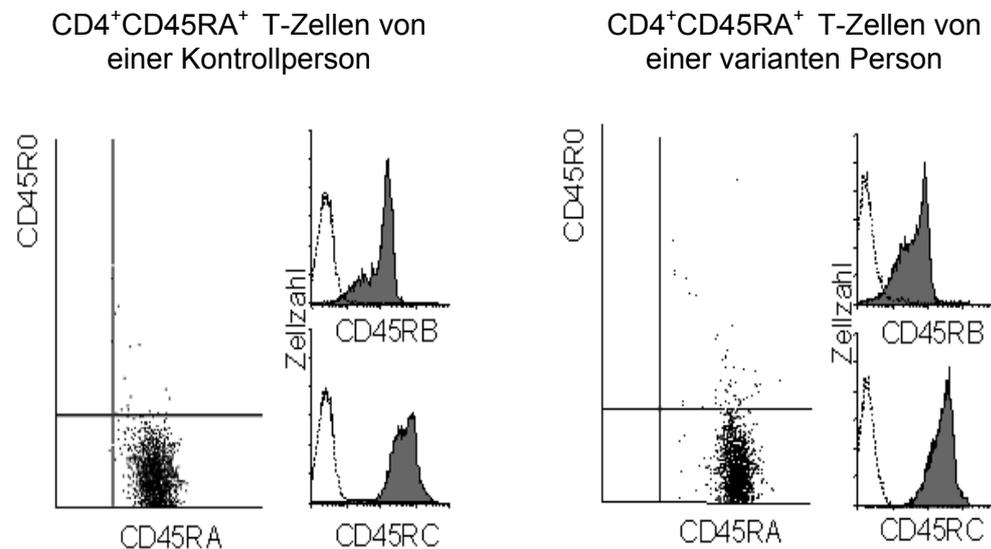


**Abbildung 4.4: Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Zellen von Kontrollprobanden und varianten Personen nach TZR/CD3- und CD28-vermittelter Stimulation**

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von varianten Blutspendern (Va) und Kontrollpersonen (Ko) wurden für drei Tage mit immobilisierten TZR/CD3 mAk (BMA031) und CD28 mAk (L293) inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus fünf unterschiedlichen Experimenten. In den ersten drei Experimenten wurden die Reaktivitäten von Kontrollpersonen Ko1, Ko2 und Ko3 mit denen von varianten Blutspendern Va1, Va2 und Va3 verglichen. Das vierte Experiment wurde mit Va1 und Ko4 und das fünfte Experiment mit Va2 und Ko5 durchgeführt.

Im Hinblick auf die Bedeutung von CD45 in der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion stellte sich die Frage, ob die T-Zellrezeptorvermittelte Stimulation bei T-Zellen mit variantem CD45RA-Muster zu Reaktivitäten führt, die sich von normalen T-Zellen unterscheiden. Dazu wurde die proliferative Antwort der CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen auf eine Stimulation mit TZR/CD3 und CD28 mAk untersucht und verglichen. Frisch isolierte „memory“ T-Zellen wurden für drei Tage mit steigender Konzentration immobilisierter Antikörper inkubiert und die Proliferation anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin nach weiteren 16 Stunden Inkubation gemessen. Die Ergebnisse dieser Proliferationsversuche zeigten, dass die an die Plastikoberfläche gekoppelten Antikörper bei den „memory“ T-Zellen der Kontrollpersonen und varianten Blutspender eine starke proliferative Antwort auslösten (Abb. 4.4). Mit der Zunahme der eingesetzten Antikörperkonzentration stieg auch die Proliferation der „memory“ T-Zellen sowohl bei varianten Blutspendern als auch bei Kontrollpersonen. Auffällig war hierbei, dass variante CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Zellen bei allen Antikörperkonzentrationen eine signifikant

höhere Proliferationsrate aufwiesen als Kontrollzellen. Die proliferative Antwort auf die TZR/CD3- und CD28-vermittelte Stimulation war bei varianten „memory“ Zellen zum Teil doppelt so stark wie bei Kontrollzellen.



**Abbildung 4.5: Expression von CD45-Isoformen auf „naiven“ T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern**

CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation wurden durch Depletion von B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und CD8<sup>+</sup> CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen angereichert. Das CD45RA- und CD45R0-Expressionsmuster wurde durch eine gleichzeitige Färbung mit den Antikörpern CD45RA-FITC und CD45R0-PE detektiert und in den Dotplots dargestellt. Die Expression von CD45RB- und CD45RC-Isoformen wurde in einer Ein-Farben-Fluoreszenzanalyse durch die Bindung von CD45RB mAk bzw. CD45RC mAk und anschließendem Nachweis mit GαM-FITC bestimmt. Ausgefüllte Kurven zeigen die Reaktivität der Primärantikörper, während die Fluoreszenzintensitäten des Sekundärantikörpers GαM-FITC allein als unausgefüllte Kurven dargestellt sind.

Diese Hyperreaktivität varianter CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen warf die Frage auf, ob die verstärkte proliferative Antwort tatsächlich auf die zusätzliche Expression der CD45RA-Isoformen auf diesen Zellen zurückzuführen ist. Um auszuschließen, dass die Zellen der drei untersuchten varianten Blutspender generell eine Hyperreaktivität aufweisen, wurden „naive“ T-Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation angereichert und ihre proliferative Antwort auf die TZR/CD3- und CD28-vermittelte Stimulation vergleichend untersucht. Dafür wurden „naive“ T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation

negativ aus PBMC derselben Blutspender isoliert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.5).

**Tabelle 4.1: CD45RA-Expression auf „naiven“ T-Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation<sup>1)</sup>**

Exp.	Blutspender	CD45RA-Fluoreszenzintensität
1	Va1	477 <sup>2)</sup>
	Ko1	386
2	Va2	495
	Ko2	345
3	Va3	489
	Ko3	344

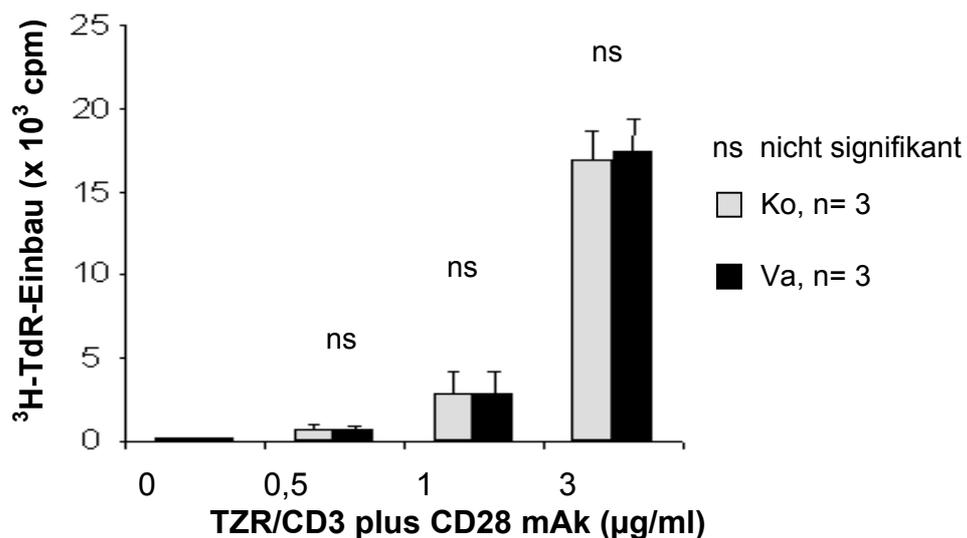
<sup>1)</sup>  $0,5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen von Kontrollpersonen (Ko) und varianten Blutspendern (Va) wurden mit dem Antikörper CD45RA-FITC markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

<sup>2)</sup> Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (arbiträre Einheiten) der CD45RA-positiven Zellpopulation.

CD45RA-, CD45RB- und CD45RC-Isoformen wurden sowohl auf varianten „naiven“ T-Zellen als auch auf „naiven“ Kontroll-T-Zellen detektiert. Zwischen „naiven“ T-Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen schien somit kein Unterschied in der Komposition der CD45-Isoformen zu bestehen, ein Unterschied war jedoch in der CD45RA-Expressionsdichte auf „naiven“ T-Zellen varianter Personen und Kontrollprobanden zu erkennen. Im Vergleich zu „naiven“ T-Zellen von Kontrollpersonen wiesen „naive“ T-Zellen von varianten Personen eine höhere Expressionsdichte von CD45RA-Molekülen auf (Abb. 4.5 und Tab. 4.1).

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Personen wurden nach den gleichen Versuchsbedingungen wie die CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellpopulation mit immobilisierten TZR/CD3 und CD28 mAk für drei Tage stimuliert. Im Gegensatz zu den CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen wurde hier kein Unterschied in dem Reaktionsmuster der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen beobachtet (Abb. 4.6). CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern proliferierten gleich stark auf die

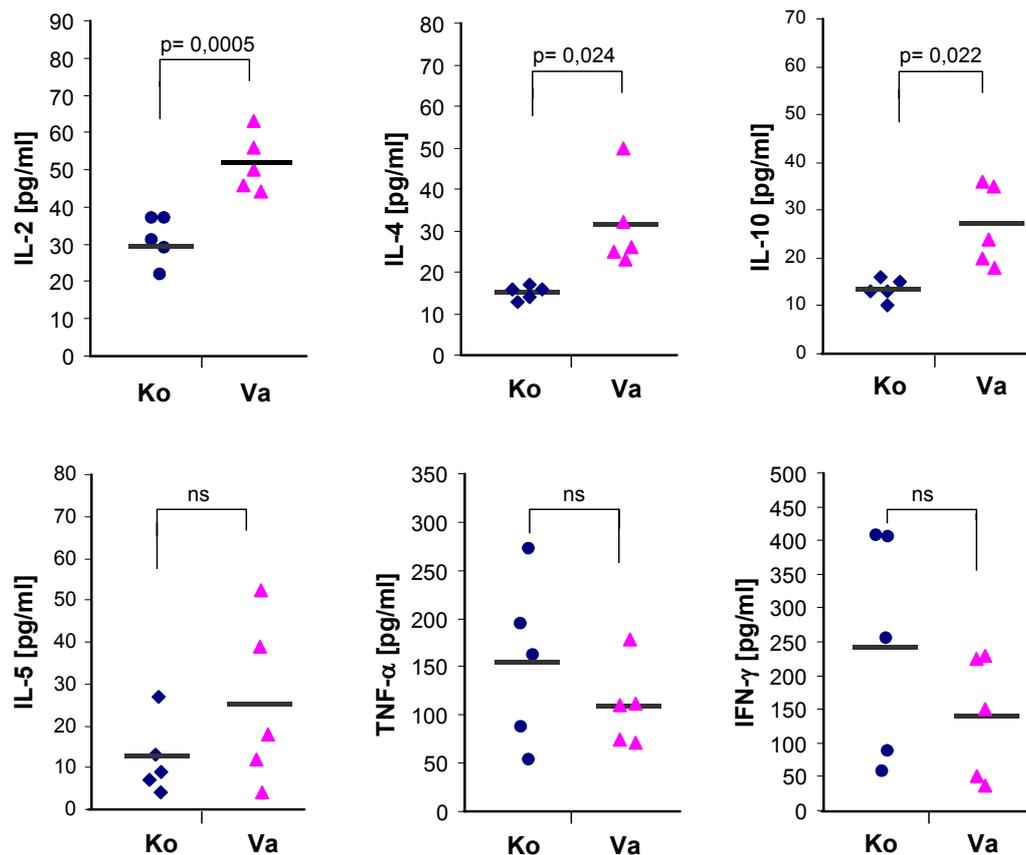
getesteten Stimuli. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Unterschiede in der proliferativen Antwort von  $CD4^+CD45RO^+$  T-Zellen auf eine TZR/CD3- und CD28-vermittelte Stimulation nicht auf einer grundsätzlichen Hyperreaktivität von T-Zellen der drei untersuchten varianten Blutspender basieren, sondern von der zusätzlichen Expression der CD45RA-Isoformen auf diesen Zellen herrühren.



**Abbildung 4.6: Proliferation der  $CD4^+CD45RA^+$ -Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation nach TZR/CD3- und CD28-vermittelter Stimulation**

Isolierte  $CD4^+CD45RA^+$ -T-Zellen von varianten Blutspendern (Va) und Kontrollpersonen (Ko) wurden für drei Tage mit immobilisierten TZR/CD3 mAk (BMA031) und CD28 mAk (L293) inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von  $^3H$ -Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Experimenten. In jedem Experiment wurde die Reaktivität eines varianten Blutspenders mit der einer Kontrollperson verglichen.

Die T-Zellaktivierung führt nicht nur zur Proliferation der T-Zellen, sondern auch zur Produktion von Zytokinen. Die Daten der Proliferationsversuche wiesen auf eine Hyperreaktivität der „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation hin. Um zu überprüfen, ob die variante Expression von CD45RA-Isoformen auch einen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen hat, wurden die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand von „memory“ T-Zellen varianter Personen und Kontrollprobanden nach Stimulation mit TZR/CD3 und CD28 mAk bestimmt und miteinander verglichen.



**Abbildung 4.7: Zytokinproduktion bei „memory“ T-Zellen varianter Blutspender und Kontrollpersonen nach TZR/CD3- und CD28-vermittelter Stimulation.**

Isolierte  $CD4^+CD45R0^+$  T-Zellen von Kontrollpersonen (Ko) und varianter Blutspendern (Va) wurden mit immobilisierten TZR/CD3 mAk (BMA031) und CD28 mAk (L293) für drei Tage stimuliert. Mit Hilfe des CBA-Testsystems wurden anschließend die Konzentrationen von IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen ermittelt. Dargestellt sind die Werte aus fünf Experimenten, die mit Zellen von drei varianter Personen und fünf Kontrollprobanden durchgeführt wurden. In den ersten drei Experimenten wurde die Zytokinproduktion von Kontrollpersonen Ko1, Ko2 und Ko3 mit der von varianter Blutspendern Va1, Va2 und Va3 verglichen. Das vierte Experiment wurde mit Va1 und Ko4 und das fünfte Experiment mit Va2 und Ko5 durchgeführt. Die Mittelwerte der gemessenen Zytokinkonzentrationen aus allen Experimenten sind als schwarze Balken dargestellt.

In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse aller Experimente nach Zytokinen geordnet dargestellt. Für die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 wurden erhöhte Konzentrationen bei varianter Zellen festgestellt, wobei der markanteste Unterschied bei der IL-2-Konzentration beobachtet wurde. In Zellkulturüberständen varianter Zellen war die IL-2-Konzentration etwa um das Zweifache höher als die IL-2-Konzentration in Zellkulturüberständen der Kontrollzellen. Variante Zellen produzierten im Mittel mehr IL-5, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Konzentrationen

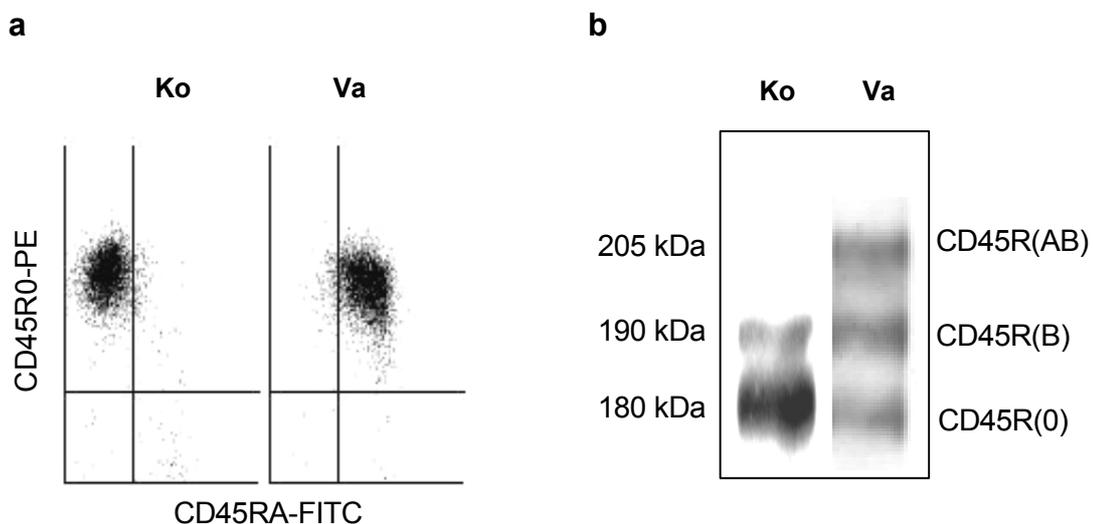
der Zytokine TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  waren bei varianten Zellen tendenziell niedriger als bei Kontrollzellen. Dieser Unterschied war jedoch aufgrund der breiten Streuung der gemessenen Werte auch nicht signifikant. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C $\rightarrow$ G Mutation nach der TZR/CD3- und CD28-vermittelten Stimulation tendenziell mehr Th2-typische Zytokine wie z.B. IL-4 und IL-10 produzieren.

#### **4.2.1.2 Proliferation und IL-2-Produktion nach Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien mit Alloantigen**

Um die Frage zu beantworten, ob die Hyperreaktivität varianter Zellen ebenso nach Stimulation mit einem Antigen wie durch Aktivierung mittels agonistischer Antikörper gezeigt werden kann, wurden allospezifische CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von drei varianten und fünf Kontrollpersonen etabliert. Zur Generierung von T-Zelllinien wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-DR 4, 7-negativen varianten Personen und Kontrollprobanden alle sieben Tage mit der EBV-transformierten B-Zelllinie Laz 509 als Alloantigen stimuliert, die einen HLA-DR 4, 7-positiven Haplotyp aufweist.

Die Analyse der CD45RA-Expression zeigte einen markanten Unterschied zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern. Auf T-Zelllinien der Kontrollprobanden ließen sich CD45RA-Moleküle nicht mehr nachweisen (Abb. 4.8a). Dies steht im Einklang mit publizierten Daten und belegt, dass die CD45RA-Isoformen im Zuge des Aktivierungsprozesses normalerweise herunterreguliert werden. Im Gegensatz zu Kontrollzelllinien blieben variante T-Zelllinien CD45RA positiv. T-Zelllinien, die durch Aktivierung mit dem Mitogen PHA erzeugt wurden, wiesen den gleichen Phänotyp auf wie alloreaktive Zelllinien. Auch hier führte der Aktivierungsprozess zum Verlust von CD45RA-Isoformen bei Kontrollpersonen, während variante Zelllinien CD45RA-positiv blieben. Die Darstellung der CD45-Isoformen mittels Immunpräzipitation ergab, dass Kontroll-T-Zelllinien die Isoformen CD45R(0) und CD45R(B) trugen, während variante T-Zelllinien die CD45R(0)-, CD45R(B)- und zusätzlich die CD45R(AB)-Isoform exprimierten (Abb. 4.8b). Die T-Zelllinien wiesen demnach die gleichen Isoformunterschiede zwischen varianten und Kontrollpersonen wie die „memory“ T-Zellpopulation auf (Abb. 4.3). Es schien daher

wahrscheinlich, dass Auswirkungen der aberranten Expression auch beim Vergleich von varianten und Kontrollzelllinien darstellbar sein sollten. Untersuchungen zu den Reaktionsmustern nach Stimulation mit Alloantigen wurden mit alloreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien durchgeführt; für andere Fragestellungen wurden auch Mitogen-reaktive Zelllinien verwendet.



**Abbildung 4.8: CD45RA-Expression auf T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern**

a) CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wurden durch Stimulation mit bestrahlten allogenen B-Lymphoblasten Laz 509 (HLA-DR 4, 7) erzeugt. Die Zellen wurden alle sieben Tage restimuliert und für mindestens vier Wochen in Kultur gehalten. Vor weiteren Analysen fand eine Ruhephase von zehn Tagen statt. Anschließend wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollprobanden (Ko) und varianten Personen (Va) mit den Antikörpern CD45RA-FITC und CD45R0-PE mit Hilfe der Durchflusszytometrie phänotypisiert. b) Um Mitogen-reaktive T-Zelllinien zu generieren, wurden PBMC über Nacht mit PHA (1 µg/ml) aktiviert und mit IL-2 (20 U/ml) für zehn Tage in Kultur gehalten. CD45-Moleküle wurden aus Lysaten von Mitogen-reaktiven T-Zelllinien varianter Personen (Va) und Kontrollprobanden (Ko) mit Hilfe eines CD45 mAk (AICD45.2) immunpräzipitiert, in einem 8%igen SDS Polyacrylamidgel getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. In einer nachfolgenden Westernblot-Analyse wurden immunpräzipitierte Moleküle mit AICD45.2 nachgewiesen.

Die Proliferationsstärke der alloreaktiven (anti-HLA-DR 4, 7; Laz 509) CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wurde nach Restimulation mit bestrahlten Laz 509 Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zelllinien varianter Blutspender und Kontrollpersonen nach allogener Stimulation sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst. Alloreaktive CD4<sup>+</sup> Zelllinien der untersuchten varianten Individuen reagierten signifikant stärker auf die allogene Stimulation als CD4<sup>+</sup> Zelllinien von Kontrollpersonen. Dabei betrug die Proliferation varianter Zellen ca. das 1,7-fache der

Proliferation der Kontrollzellen ( $p < 0,0005$ ). Wie bei der durch TZR/CD3- und CD28-mAk induzierten Aktivierung konnte auch hier eine Hyperreaktivität bei den Zellen varianter Blutspender festgestellt werden.

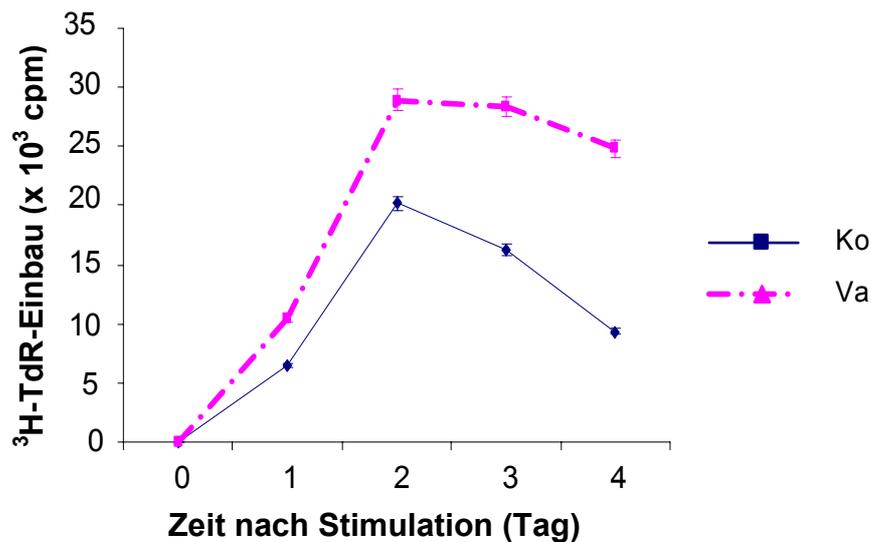
**Tabelle 4.2: Vergleich der Proliferation von varianten Zelllinien und Kontrollzelllinien nach allogener Stimulation<sup>1)</sup>**

Exp.	Donor	Proliferation (cpm)	
		Auf das Medium	auf das Alloantigen
1	Ko 1	415 ± 25	23780 ± 2333 <sup>2)</sup>
	Va 1	434 ± 14	39373 ± 4128
2	Ko 2	498 ± 28	28609 ± 1867
	Va 2	418 ± 61	47122 ± 2776
3	Ko 3	470 ± 29	29979 ± 1570
	Va 1	208 ± 42	48630 ± 1451
4	Ko 4	144 ± 8	15245 ± 2045
	Va 3	208 ± 30	28134 ± 483
5	Ko 5	366 ± 36	28751 ± 1640
	Va 2	353 ± 39	42813 ± 2190

<sup>1)</sup> Alloreaktive CD4<sup>+</sup> Zelllinien von HLA-DR 4/7-negativen Kontrollpersonen (Ko) und von HLA-DR 4, 7-negativen varianten Blutspendern (Va) wurden mit bestrahlten  $0,25 \times 10^6$  Laz 509 Zellen (HLA-DR 4, 7-positiv) für drei Tage restimuliert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen.

<sup>2)</sup> Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (cpm ± SD) aus Dreifachansätzen.

Aus diesem Befund ergab sich die Frage, ob die Hyperreaktivität nur in der Sensitivität des T-Zellrezeptors der varianten Zellen begründet ist und / oder ob variante Zelllinien sich in der Proliferationskinetik von Kontrollzelllinien unterscheiden. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden variante Zelllinien und Kontrollzelllinien über vier Tage mit dem Alloantigen stimuliert. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Proliferation gemessen.



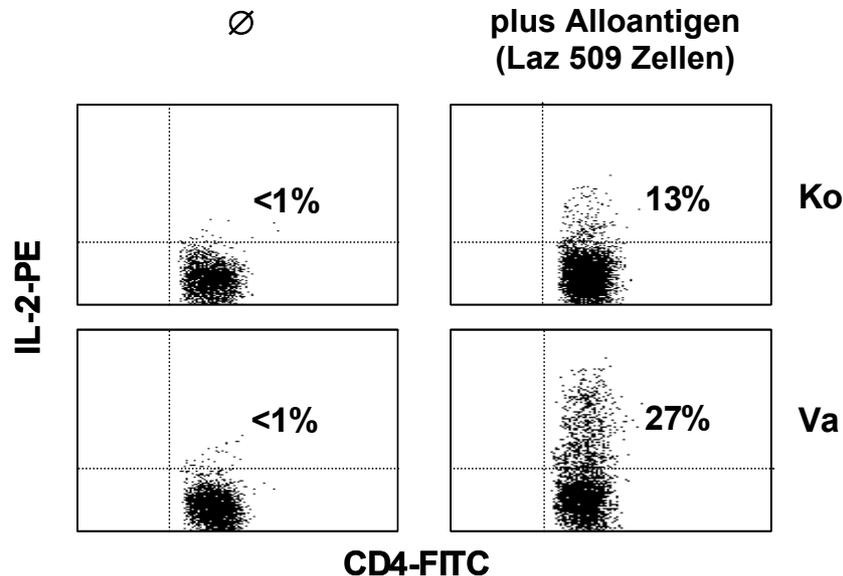
**Abbildung 4.9: Kinetik der Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern nach allogener Stimulation**

CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen (Ko) und von varianten Blutspendern (Va) wurden für vier Wochen in Kultur gehalten, wobei sie alle sieben Tage restimuliert wurden. Nach einer Ruhephase von zehn Tagen wurden die Zellen mit bestrahltem Laz 509 Zellen für die angegebene Zeit stimuliert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (cpm ± SD) von Dreifach-Ansätzen. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

Beim Vergleich der Proliferationskinetik varianter und Kontrollzelllinien wurde deutlich, dass variante Zelllinien eine länger anhaltende proliferative Antwort aufwiesen als Kontrollzelllinien (Abb. 4.9). Die Proliferation erreichte bei beiden T-Zelllinien bereits nach zwei Tagen ihr Maximum. Im Gegensatz zu den T-Zelllinien von Kontrollpersonen, deren Proliferation nach diesem Zeitpunkt rapide abnahm, waren bei T-Zelllinien von varianten Probanden nach vier Tagen immer noch eine starke Proliferation und eine geringere Abnahme der Proliferationsrate nachweisbar.

Im Abschnitt 4.2.1.1 wurde gezeigt, dass „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation im Vergleich zu „memory“ T-Zellen von Kontrollpersonen nach Stimulation mit TZR/CD3- und CD28-mAk mehr IL-2 sezernierten. Um zu untersuchen, ob die erhöhte und länger anhaltende proliferative Antwort der varianten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien mit einer erhöhten IL-2-Synthese einhergeht, wurde die intrazelluläre IL-2-Produktion bei CD4<sup>+</sup> Zelllinien von varianten Personen und Kontrollprobanden

nach Restimulation mit Alloantigen (Laz 509 Zellen) gemessen und miteinander verglichen.



**Abbildung 4.10: Intrazelluläre IL-2 Produktion bei CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation nach allogener Stimulation**

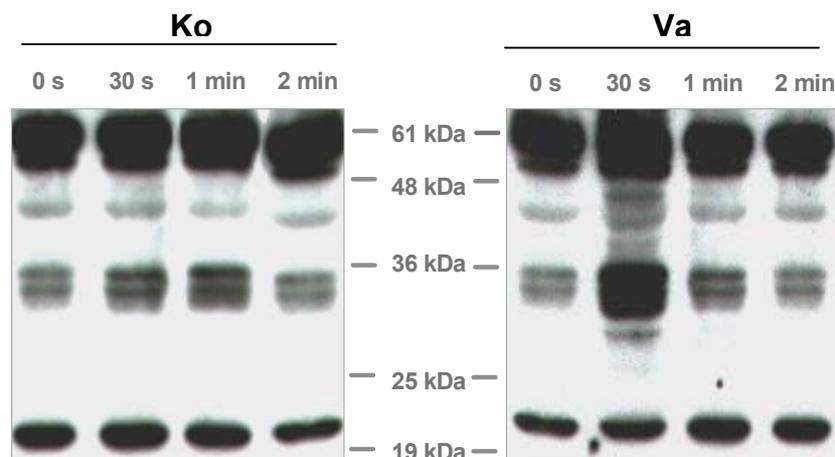
Nach Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollprobanden und varianten Personen mit bestrahlten Laz 509 Zellen für vier Stunden wurde durch intrazelluläre Färbung die Produktion des Zytokins IL-2 analysiert. Die Zahlen repräsentieren den prozentualen Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen, die IL-2 produzieren. Das Ergebnis ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

Hierzu wurden CD4<sup>+</sup> Zelllinien von varianten Blutspendern ebenso wie CD4<sup>+</sup> Zelllinien von Kontrollen mit bestrahlten Laz 509 Zellen für vier Stunden stimuliert und der Anteil an IL-2 produzierenden CD4<sup>+</sup> Zellen jeweils mit Hilfe einer intrazellulären Färbung ermittelt. Wie in der Abb. 4.10 zu erkennen ist, betrug der Anteil der IL-2 produzierenden CD4<sup>+</sup> Zellen in der untersuchten Population bei varianten Personen 27%, während nur 13% der CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen nach allogener Stimulation das Zytokin IL-2 produzierten. Die erhöhte und verlängerte Proliferation varianter T-Zelllinien korrelierte somit mit einer erhöhten Produktion von IL-2.

### 4.2.1.3 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach T-Zellrezeptor-vermittelter Stimulation

#### 4.2.1.3.1 Induktion von Tyrosinphosphorylierungen

In Anbetracht der Bedeutung der CD45-Phosphatase in der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion lag die Vermutung nahe, dass die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen initiale Schritte der T-Zellaktivierung verändert. Die Induktion von Tyrosinphosphorylierungen gehört zu den wichtigen Ereignissen der initialen Signaltransduktion. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung in T-Zelllinien varianter Blutspender und Kontrollprobanden nach T-Zellaktivierung gemessen. CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Personen mit normaler und aberranter CD45RA-Expression wurden mit TZR/CD3 mAk (OKT3) vorinkubiert und durch Zugabe des Sekundärantikörpers G $\alpha$ m unterschiedlich lange stimuliert. Tyrosinphosphorylierte Proteine wurden mit dem anti-Phosphotyrosin mAk 4G10 im Westernblot detektiert.



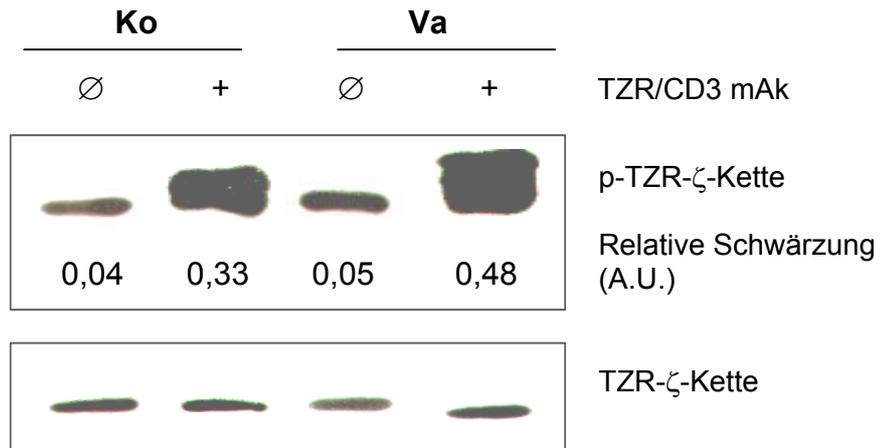
**Abbildung 4.11: Kinetik der Tyrosinphosphorylierungen in CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden unbehandelt belassen bzw. mit TZR/CD3 mAk ( $3 \mu\text{g/ml}$  OKT3) auf Eis vorinkubiert und dann mit  $10 \mu\text{g/ml}$  G $\alpha$ m für die angegebenen Zeiten bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert. Das Lysat von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurde unter reduzierenden Bedingungen mit einem 12,5%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Gezeigt ist ein Westernblot, in dem Tyrosinphosphorylierte Proteine mit dem anti-Phosphotyrosin mAk (4G10) nachgewiesen wurden. Die Position von Standardproteinen ist in der Mitte aufgeführt. Ähnliche Ergebnisse wurden in vier weiteren Experimenten erzielt.

Phosphorylierte Proteine waren schon vor der Stimulation bei T-Zelllinien von varianten Personen und Kontrollprobanden sichtbar, nach der Stimulation wurde in varianten T-Zellen jedoch eine stärkere Phosphorylierung der Proteine beobachtet, die sich in der stärkeren Zunahme der Bandenintensität äußerte (Abb. 4.11). Das Bandenmuster der Tyrosinphosphorylierten Proteine sah bei Kontrollzelllinien und varianten Zelllinien ähnlich aus. Die Banden traten hauptsächlich im Bereich von 20, 30 und 60 kDa auf. Auffällig war jedoch, dass variante Zellen im Gegensatz zu Kontrollzellen eine deutliche Induktion von *de novo* Tyrosinphosphorylierten Proteinen zwischen 40 und 54 kDa zeigten. Darüber hinaus erreichte die Induktion der Tyrosinphosphorylierung in varianten Zellen in weniger als 1 min nach Beginn der Stimulation das Maximum und nahm nach 2 min an Intensität ab. Im Gegensatz dazu war bei Kontrollzelllinien das Maximum der Phosphorylierung erst 1 min nach Beginn der Stimulation erkennbar. Im Vergleich zu Kontrollzelllinien löste die Stimulation mit TZR/CD3 mAk in varianten Zellen somit eine beschleunigte und intensivere Tyrosinphosphorylierung aus.

#### 4.2.1.3.2 Phosphorylierung der TZR- $\zeta$ -Kette und Zap-70 Kinase

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene verstärkte und beschleunigte Tyrosinphosphorylierung in varianten Zellen wies darauf hin, dass die Signaltransduktion in diesen Zellen wahrscheinlich effektiver abläuft als in Kontrollzellen. Zur Beantwortung der Frage, ob auch die Phosphorylierung von Schlüsselmolekülen der initialen Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen von varianten Personen verändert ist, wurde zunächst die Phosphorylierung der TZR- $\zeta$ -Kette in T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern untersucht. Die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung zeigte, dass das Maximum der Phosphorylierung etwa 1 min nach der Stimulation erreicht wurde. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um die Unterschiede in der Phosphorylierung der TRZ- $\zeta$ -Kette zu untersuchen. Zuerst wurden die TZR- $\zeta$ -Ketten aus Lysaten von CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien immunpräzipitiert und anschließend mit dem anti-Phosphotyrosin mAk (4G10) im Westernblot untersucht.



**Abbildung 4.12: Phosphorylierung der TZR-ζ-Kette in CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen vor und nach der Stimulation mit TZR/CD3 mAk**

CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien (10<sup>7</sup> Zellen/ Ansatz) wurden unbehandelt belassen (∅) bzw. mit 3 µg/ml OKT3 (+) auf Eis vorinkubiert und dann mit 10 µg/ml Gαm für 1 min bei 37° C stimuliert. Zellen wurden im NP-40-Puffer lysiert und die TZR-ζ-Kette mit TZR-ζ mAk (TIIA) immunpräzipitiert. Phosphoproteine wurden mit dem 4G10 mAk nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. Anschließend wurde die Membran „gestrippt“ und die TZR-ζ-Kette erneut mit dem TIIA mAk nachgewiesen.

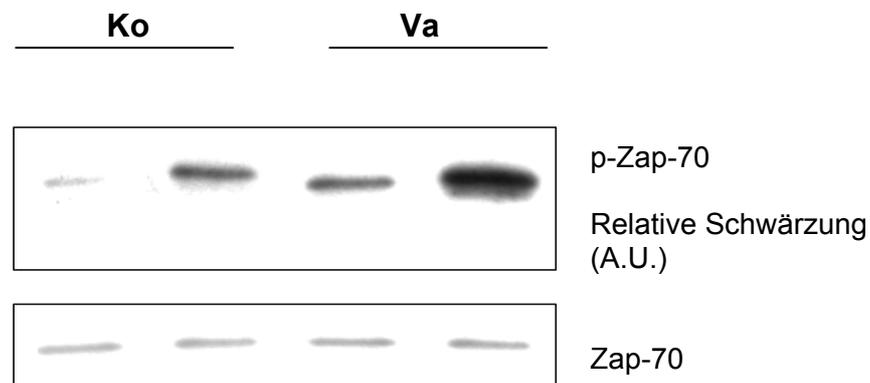
Verglichen mit CD4<sup>+</sup> Kontrollzelllinien erschien die Basalphosphorylierung der TZR-ζ-Kette in varianten CD4<sup>+</sup> Zelllinien etwas stärker (Abb. 4.12). Nach Stimulation wurde dieser Unterschied deutlicher und zeigte nun eine signifikant stärker phosphorylierte TZR-ζ-Kette in varianten Zellen. Dieses Ergebnis wurde in zwei weiteren Experimenten bestätigt. Die unterschiedliche Bandenintensität wurde densitometrisch erfasst und zusammengefasst in der Tabelle 4.3 dargestellt. Die TZR-ζ-Kette war in varianten Zellen zwischen 22 bis 45% stärker phosphoryliert als in Kontrollzellen.

**Tabelle 4.3: Intensität der TZR- $\zeta$ -Phosphorylierung in T-Zelllinien von varianten und Kontrollpersonen nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation<sup>1)</sup>**

Exp.	Intensität der TZR- $\zeta$ -Phosphorylierung ( $10^3$ A.U.)	
	Kontrollperson	varianter Blutspender
1	329 <sup>2)</sup>	478 (145%) <sup>3)</sup>
2	466	574 (123%)
3	301	391 (122%)

- 1) TZR- $\zeta$  wurde aus stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern immunpräzipitiert. Phosphorylierte Proteine wurden anschließend mit dem anti-Phosphoprotein-mAk (4G10) nachgewiesen.
- 2) Intensität der Bandenschwärzung wurde densitometrisch ausgewertet.
- 3) Intensität der TZR- $\zeta$ -Phosphorylierung in varianten Zellen wurde mit der von Kontrollzellen verglichen, die als Referenz (100 %) dient.

Eine Folge der Phosphorylierung der TZR- $\zeta$ -Kette ist die Rekrutierung der zytosolischen Tyrosinkinase Zap-70 an die  $\zeta$ -Kette. Das gebundene Zap-70 kann anschließend durch die p56<sup>lck</sup>-Kinase phosphoryliert und aktiviert werden. Es stellte sich die Frage, ob die verstärkte Phosphorylierung von TZR- $\zeta$  einen Einfluss auf die Zap-70 Kinase hat.



**Abbildung 4.13: Phosphorylierung der Zap-70 Kinase in T-Zelllinien von varianten Blutspendern und Kontrollpersonen vor und nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation**

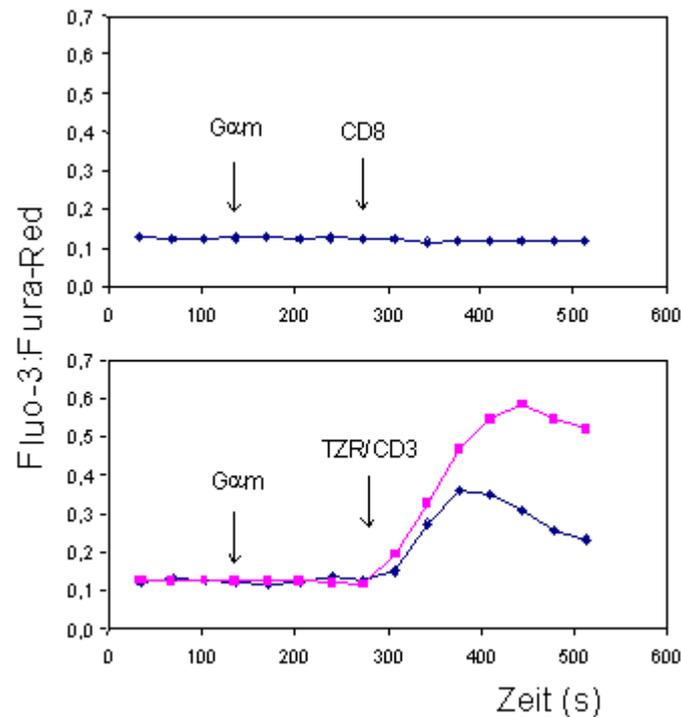
T-Zelllinien von Kontrollpersonen (Ko) und Personen mit der 77C→G Mutation ( $10^7$  Zellen/ Ansatz) wurden unbehandelt belassen (Ø) bzw. mit 3 µg/ml OKT3 (+) auf Eis vorinkubiert und dann mit 10 µg/ml G $\alpha$ m für 1 min bei 37° C stimuliert. Zellen wurden im NP-40-Puffer lysiert und Zap-70 mit dem Zap-70 mAk (2F3.2) immunpräzipitiert. Phosphoproteine wurden mit dem 4G10 mAk nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch gemessen. Anschließend wurde die Membran „gestrippt“ und die Zap-70-Kinase mit dem Zap-70 mAk nachgewiesen.

Zur Bearbeitung dieser Frage wurde die Zap-70 aus T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Probanden immunpräzipitiert und die Phosphorylierung der Kinase in den jeweiligen Zellen verglichen. Die Untersuchung von Zap-70 zeigte markante Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung des Enzyms in Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern (Abb. 4.13). Wie bei der Phosphorylierung der TZR- $\zeta$ -Kette lag die Zap-70 Kinase bei varianten Zellen bereits vor der Stimulation in einem stärker phosphorylierten Zustand vor. Nach der Stimulation unterschieden sich T-Zelllinien von Personen mit der 77C $\rightarrow$ C Mutation bezüglich der Phosphorylierung der Zap-70 Kinase noch deutlicher von Zelllinien der Kontrollprobanden. Dabei wurden keine Unterschiede in der Proteinmenge der untersuchten Kinase gefunden.

#### 4.2.1.3.3 Erhöhung des zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels

Das über die Stimulation des TZR/CD3-Komplexes aus verschiedenen Pools freigesetzte Ca<sup>2+</sup> ist ein wichtiger Parameter für die zytoplasmatische Signalweiterleitung und die Regulation von Aktivierungsereignissen. Zur weiteren Charakterisierung der funktionellen Unterschiede in der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion zwischen varianten Zellen und Kontrollzellen wurde die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration untersucht. Zur Messung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels nach Stimulation über den TZR wurden die Zellen mit den Ca<sup>2+</sup>-bindenden Farbstoffen Fluo-3 und Fura-Red beladen. Die Stimulation erfolgte mit der Zugabe des Sekundärantikörpers G $\alpha$ m und anschließend mit dem TZR/CD3 mAk (OKT3). Eine Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde anhand der Fluoreszenzintensität gemessen, die bei der Bindung von Ca<sup>2+</sup> an Fluo-3 zunahm bzw. bei der Bindung von Ca<sup>2+</sup> an Fura-Red abnahm.

Die Zugabe des Sekundärantikörpers G $\alpha$ m sowie die Zugabe des CD8 mAk (AICD8.1) als Negativkontrolle bewirkten keine Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels (Abbildung 4.14 oben). Dagegen löste die Stimulation mit dem TZR/CD3 mAk sowohl in T-Zelllinien der Kontrollpersonen als auch in T-Zelllinien varianter Personen ein Ca<sup>2+</sup>-Signal aus. Nach der Stimulation wurde bei varianten T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ein stärkerer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom beobachtet (Abb. 4.14 unten).



**Abbildung 4.14: Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in T-Zelllinien von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation**

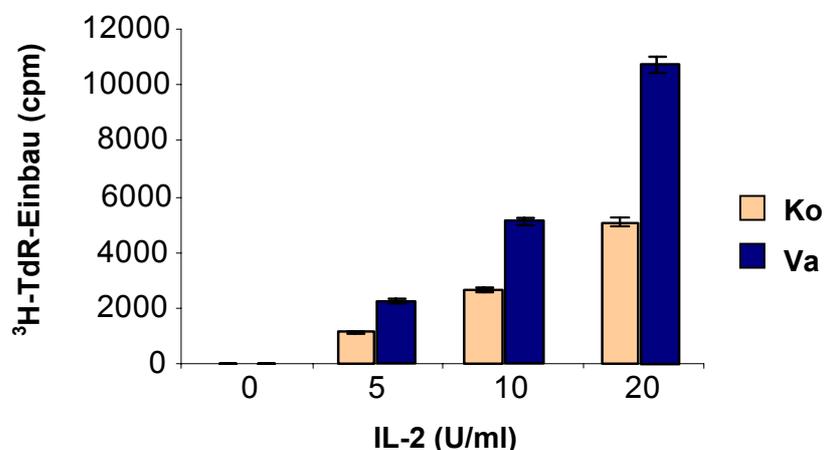
T-Zelllinien wurden mit den Farbstoffen Fluo-3 und Fura-Red beladen. Die Antikörper wurden zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten hinzugegeben. Das obere Diagramm zeigt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel vor und nach der Zugabe des Sekundärantikörpers  $\text{G}\alpha\text{m}$  (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und des Kontrollantikörpers (AICD8.1, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Vor der Zugabe des Stimulus (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  OKT3) erfolgte zuerst die Zugabe von  $\text{G}\alpha\text{m}$  (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Im unteren Diagramm wird die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in aktivierten Zellen von Kontrollprobanden (Ko) und Blutspendern mit der 77C→G Mutation (Va) nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation dargestellt. Das Ergebnis ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

Der relative Anteil der Zellen, die nach der T-Zellrezeptorvermittelten Stimulation eine Mobilisierung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zeigten, war bei varianten Personen und Kontrollpersonen ähnlich groß (31% vs. 27%,  $p > 0,05$ ). Daraus konnte gefolgert werden, dass die verstärkte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht auf eine größere Anzahl an reagierenden Zellen zurückzuführen ist, sondern darauf beruht, dass die Stimulation mit TZR/CD3 mAk in varianten T-Zellen ein stärkeres  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auslöst.

## 4.2.2 Auswirkungen der 77C→G Mutation auf die Zytokininduzierte Aktivierung

### 4.2.2.1 Proliferation von T-Zelllinien nach Stimulation mit den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-15

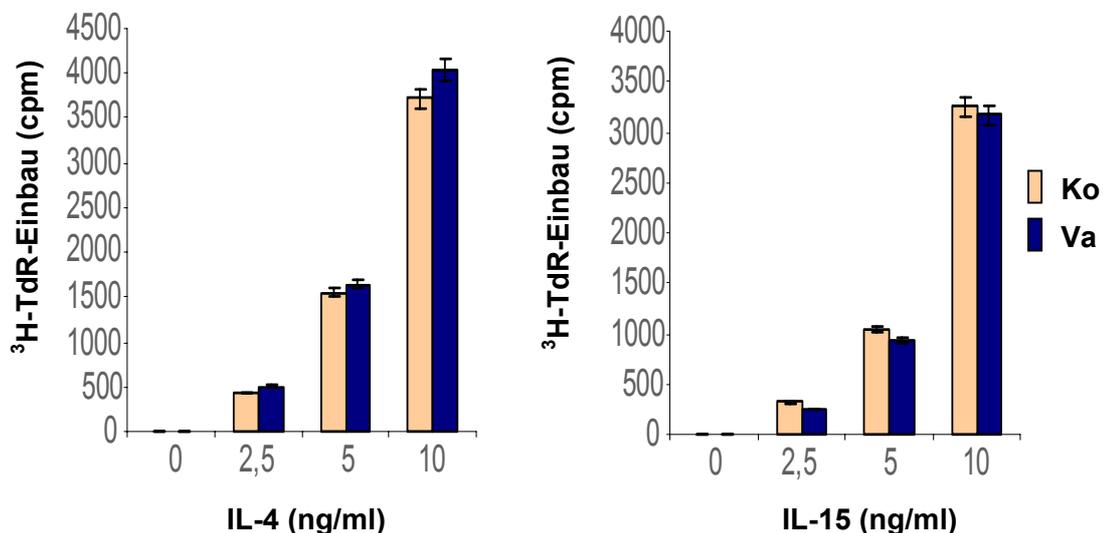
Bei der Untersuchung der Auswirkung der 77C→G Mutation auf die T-Zellrezeptorvermittelte Aktivierung wurden auf verschiedenen Ebenen Unterschiede in zellulären Immunfunktionen und in der Signaltransduktion bei T-Zellen von Kontrollprobanden und varianten Personen beobachtet. CD45 wurde auch als JAK-Phosphatase im JAK-STAT-Signalweg beschrieben (Irie-Sasaki, Sasaki et al. 2001), der von vielen Zytokinrezeptoren zur Signalweiterleitung genutzt wird. Vor diesem Hintergrund schien es möglich, dass die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen einen Einfluss auf die Zytokinrezeptorvermittelte Signaltransduktion bei varianten Zellen hat. Zur Bearbeitung dieser Frage wurden zunächst die proliferativen Antworten von Mitogen-reaktiven T-Zelllinien varianter Personen und Kontrollprobanden nach der Stimulation mit den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-15 verglichen.



**Abbildung 4.15: Proliferation Mitogen-reaktiver T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern nach IL-2-vermittelter Stimulation**

T-Zelllinien ( $50 \times 10^3$  Z/Ansatz) von Kontrollprobanden (Ko) und Blutspendern mit 77C→G Mutation (Va) wurden für 72 Stunden mit IL-2 kultiviert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $\text{cpm} \pm \text{SD}$ ) von Dreifachansätzen. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

Dazu wurden periphere Blutlymphozyten von Kontrollpersonen und varianten Probanden über Nacht mit PHA aktiviert und für weitere sieben Tage mit IL-2 expandiert. Nach einer Ruhephase von zwei Tagen ohne IL-2 wurden die somit erzeugten T-Zelllinien mit den jeweiligen Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Stimulation mit IL-2 induzierte bei varianten T-Zelllinien eine stärkere proliferative Antwort als bei T-Zelllinien von Kontrollpersonen (Abb. 4.20). Die Proliferationsrate varianter T-Zellen war doppelt so hoch wie die Proliferationsrate der Kontroll-T-Zellen. Bei der Stimulation mit den Zytokinen IL-4 und IL-15 wurde dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Probanden beobachtet (Abb. 4.21).



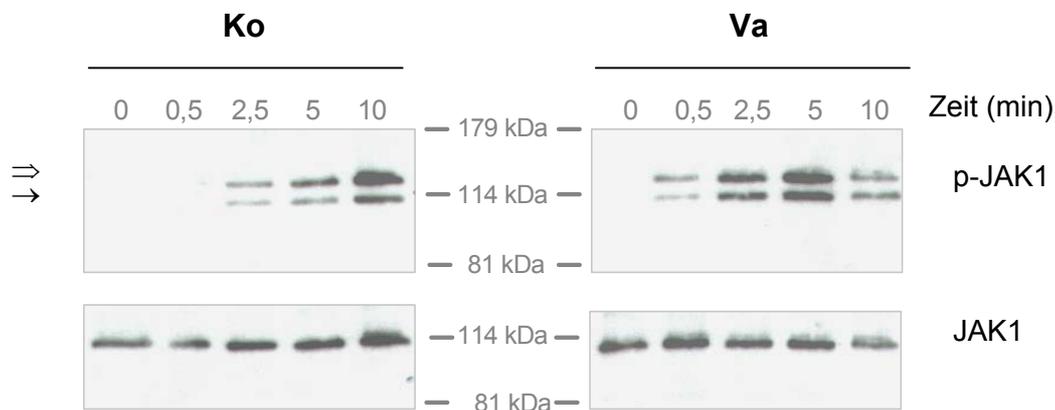
**Abbildung 4.16: Proliferation Mitogen-reaktiver T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern nach Stimulation mit IL-4 und IL-15**

T-Zelllinien ( $50 \times 10^3$  Z/Ansatz) von Personen mit normaler (Ko) und aberranter (Va) CD45RA-Expression wurden für 72 Stunden mit IL-4 bzw. IL-15 kultiviert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin nach 16 Stunden Inkubation gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $\text{cpm} \pm \text{SD}$ ) von Dreifachansätzen. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für vier weitere Experimente.

#### 4.2.2.2 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach IL-2-vermittelter Stimulation

##### 4.2.2.2.1 Tyrosinphosphorylierung von JAK1

Aufgrund der erhöhten Proliferation von varianten Zellen nach IL-2-vermittelter Stimulation wurde vermutet, dass die variante Expression von CD45RA-Molekülen den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung von JAK1 in Mitogen-reaktiven T-Zelllinien varianter Personen und Kontrollpersonen nach der Stimulation mit IL-2 untersucht. T-Zelllinien von varianten Personen und von Kontrollpersonen wurden unterschiedlich lange mit IL-2 stimuliert und anschließend sofort in NP-40-Puffer lysiert. Die Phosphorylierung der Tyrosine Tyr 1022 und Tyr 1023 von JAK1 wurde im Westernblot analysiert.

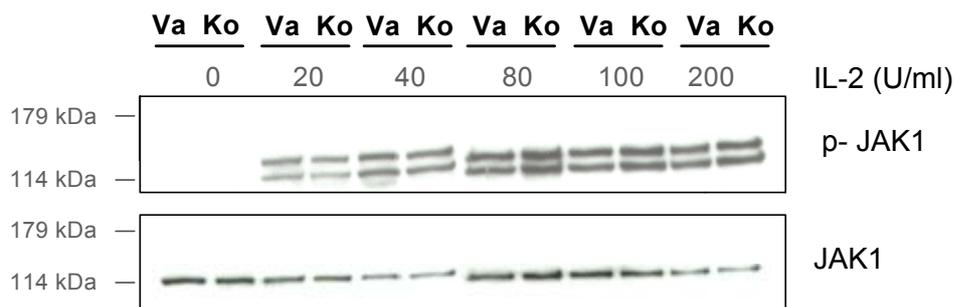


**Abbildung 4.17: Phosphorylierung von JAK1 in T-Zelllinien von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation nach IL-2-vermittelter Stimulation**

T-Zelllinien ( $5 \times 10^6$  Z/ml) von Kontrollpersonen (Ko) und varianten Probanden (Va) wurden mit 100U/ml IL-2 für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend in NP-40-Puffer lysiert. Äquivalente Lysate von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurden in einem 7%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Phosphorylierung von Tyr 1022 und Tyr 1023 von JAK1 wurde mit einem JAK1 pYpY<sup>1022/1023</sup> pAk detektiert. Dieser Antikörper erkennt neben der normalen p-JAK1-Form (⇒) mit 130 kDa auch eine degradierte p-JAK1-Form (→) mit 110 kDa. JAK1 wurde mit einem JAK1 pAk nachgewiesen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei Experimente.

In T-Zelllinien von Personen mit der 77C→G Mutation wurde nach der IL-2-vermittelten Stimulation eine beschleunigte Phosphorylierung von JAK1 beobachtet (Abb. 4.17). Dabei war bei varianten Zellen bereits 0,5 min nach der Stimulation eine deutliche Phosphorylierung von JAK1 sichtbar, während JAK1 bei Kontrollzellen

kaum phosphoryliert war. Darüber hinaus erreichte die Phosphorylierung von JAK1 bei varianten Zellen bereits nach 5 min ihr Maximum, das bei Kontrollzellen erst 10 min nach Stimulation beobachtet wurde. Untersuchungen der Proteinmengen von JAK1 ergaben dabei keinen signifikanten Unterschied, so dass die hier beobachteten Unterschiede in der Phosphorylierung der T-Zelllinien von varianten Personen nicht auf eine unterschiedliche Proteinmenge von JAK1 zurückzuführen sind.



**Abbildung 4.18: Phosphorylierung von JAK1 in T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Probanden nach der Stimulation mit zunehmender IL-2-Konzentration**

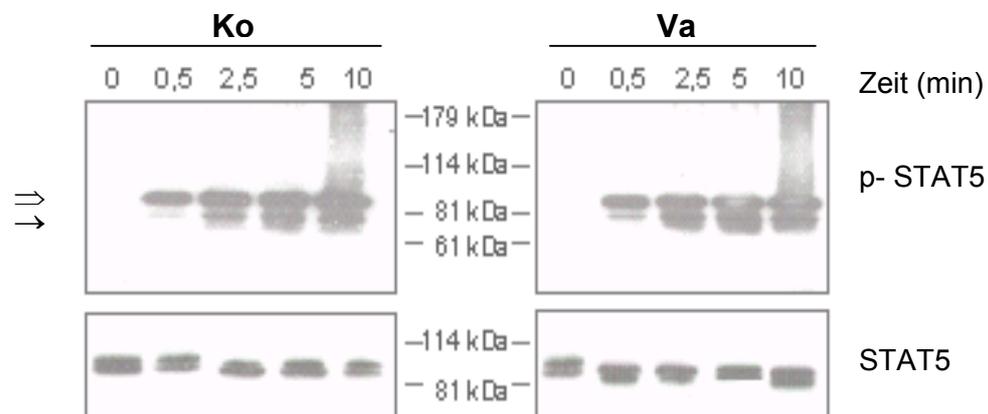
T-Zelllinien ( $5 \times 10^6$  Z/ml) von Kontrollpersonen (Ko) und Personen mit der 77C→G Mutation (Va) wurden mit zunehmender IL-2-Konzentration für 5 min stimuliert und anschließend sofort in NP-40-Puffer lysiert. Lysate von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurden in einem 7%-igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Phosphorylierung von Tyr 1022 und Tyr 1023 von JAK1 wurde mit JAK1 pYpY<sup>1022/1023</sup> pAk detektiert. JAK1 wurde mit einem JAK1 pAk nachgewiesen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei weitere Experimente.

Dieses Ergebnis wurde jedoch nur in zwei von vier Experimenten beobachtet. In den ersten zwei Experimenten zeigten variante T-Zelllinien im Vergleich zu Zelllinien von Kontrollpersonen nach IL-2-vermittelter Stimulation eine beschleunigte Phosphorylierung von JAK1. Bei den nachfolgenden zwei Experimenten wurden dagegen keine eindeutigen Ergebnisse erzielt: In dem einen Experiment war die Phosphorylierung von JAK1 bei varianten Zellen und Kontrollzellen vergleichbar, in dem anderen Experiment war JAK1 bei Kontrollzellen sogar zu einem früheren Zeitpunkt phosphoryliert als bei varianten Zellen. Dadurch ließ sich nur schwer eine Aussage darüber machen, ob die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen die Aktivität der Januskinasen verändert. Aus dem Grund wurde die Phosphorylierung von JAK1 in aktivierten T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern nach Stimulation mit steigenden IL-2-Konzentrationen untersucht. Mit steigender IL-2-Konzentration nahm auch die Phosphorylierung der JAK1 zu, wobei bei einer

Konzentration von 80 U/ml das Maximum der Phosphorylierung erreicht wurde (Abb. 4.22). Markante Unterschiede in der Intensität der Phosphorylierung zwischen T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern waren jedoch nicht erkennbar.

#### 4.2.2.2.2 Tyrosinphosphorylierung von STAT5

STAT5-Moleküle werden von Januskinasen phosphoryliert und aktiviert. Falls die aberrante CD45-Expression einen Einfluss auf die Januskinasen hat, könnten sich Veränderungen in der Phosphorylierung von STAT5 bemerkbar machen. Da bei der Untersuchung der Phosphorylierung von JAK1 keine stabilen Ergebnisse erzielt wurden, wurde die Phosphorylierung von STAT5 nach IL-2-Stimulation näher untersucht, um Rückschlüsse über einen möglichen Einfluss der aberranten Expression von CD45RA-Molekülen auf die Januskinasen ziehen zu können.



**Abbildung 4.19: Phosphorylierung von STAT5 in T-Zelllinien von Kontrollprobanden und varianten Personen nach Stimulation mit IL-2 Stimulation.**

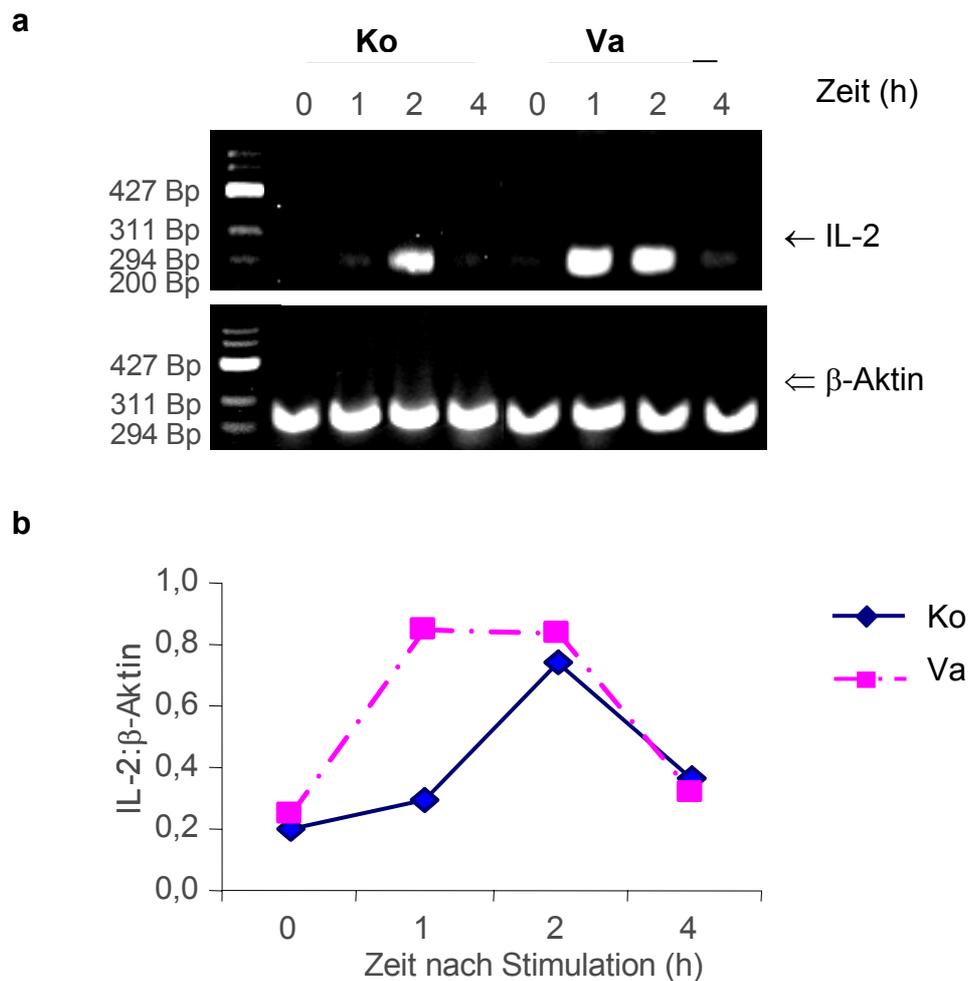
T-Zelllinien ( $5 \times 10^6$ /ml) von Kontrollpersonen (Ko) und varianten Personen (Va) wurden mit IL-2 für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend in NP-40-Puffer lysiert. Äquivalente Lysate von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurden in einem 7%-igen SDS Polyacrylamidgel getrennt. STAT5a (⇒) und STAT5b (→) wurden mit einem STAT5 pAk als Primärantikörper und Görab-Peroxidase als Sekundärreagenz nachgewiesen. Der Nachweis der Phosphorylierung von Tyr 694 von STAT5 erfolgte mit einem STAT5 pY<sup>694</sup> mAk als Primärantikörper und Göm-Peroxidase als Sekundärreagenz.

Dafür wurden Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Personen mit IL-2 für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend die Phosphorylierung des Tyrosins Tyr694 von STAT5a im Westernblot analysiert. Nach Stimulation war eine Zunahme der Phosphorylierung von STAT5a und STAT5b zu erkennen. Zwischen den Zelllinien von varianten Personen und Kontrollpersonen wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Die Stärke der Phosphorylierung von STAT5 war bei T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern vergleichbar.

### 4.3 Vergleich der T-Zellreaktivität bei MS-Patienten mit normaler und varianter CD45RA-Expression

Die 77C→G Mutation wurde mit einer erhöhten Frequenz bei einigen Patientengruppen mit multipler Sklerose (MS) gefunden. Vor diesem Hintergrund war es von besonderem Interesse, den Einfluss der 77C→G Mutation in einem Immunsystem mit einer erhöhten T-Zell-Reaktivität auf Autoantigene zu untersuchen. Daher wurden die Reaktivitäten von MS-Patienten mit der 77C→G Mutation und MS-Kontrollpatienten mit den CD45-Wildtyp-Allelen verglichen. Ergebnisse aus Vorversuchen deuteten daraufhin, dass aktivierte T-Zellen von varianten MS-Patienten stärker auf T-Zellrezeptorvermittelte Aktivierung proliferierten (Daten nicht gezeigt). Da Probenmaterialien von MS-Patienten nur in geringen Mengen verfügbar waren, wurde für eine detaillierte Charakterisierung der Auswirkung der 77C→G Mutation bei varianten MS-Patienten eine semiquantitative PCR etabliert, um die Induktion der IL-2 mRNA Expression in aktivierten Zellen von MS-Patienten mit normaler und varianter CD45RA-Expression nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation zu untersuchen.

Hierzu wurden Mitogen-reaktive T-Zelllinien von MS-Kontrollpatienten und varianten MS-Patienten mit immobilisierten TZR/CD3 mAk (OKT3) für 0, 1, 2 und 4 Stunden stimuliert und die IL-2-mRNA-Expression mit Hilfe der semiquantitativen PCR-Technik quantifiziert. In Übereinstimmung mit den bisher gewonnenen Daten, die darauf hinweisen, dass die Stimulation über den T-Zellrezeptor bei „memory“ T-Zellen bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien gesunder Personen mit der 77C→G Mutation zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von IL-2 führte, konnte auch hier eine stärkere Induktion der IL-2-Gentranskription in Zelllinien von MS-Patienten mit der 77C→G Mutation nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Beim Vergleich der Kinetik war eine beschleunigte Induktion der Gentranskription in varianten Zellen deutlich erkennbar. So erreichte die Induktion der Transkription des IL-2-Gens in aktivierten varianten Zellen ihr Maximum zwischen 1 und 2 Stunden nach Stimulation, während das Maximum der Induktion der IL-2-Gentranskription bei Kontrollzellen bei 4 Stunden nach Stimulation lag. T-Zellen varianter MS-Patienten zeichneten sich wie T-Zellen gesunder Personen mit der 77C→G Mutation durch eine Hyperreaktivität aus.



**Abbildung 4.20: IL-2-mRNA-Expression in aktivierten Zellen von MS-Patienten mit normaler und varianter CD45RA-Expression nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation**

a) T-Zelllinien ( $1,5 \times 10^6$  Z/Ansatz) von Kontrollpersonen (Ko) und varianten Blutspendern (Va) wurden mit auf Plastikoberfläche gekoppelten TZR/CD3 mAk (OKT3  $3\mu\text{g/ml}$ ) für die angegebene Zeit bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert. Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde pro Ansatz  $0,5 \mu\text{g}$  RNA in cDNA überführt. Für die entsprechenden Genprodukte wurden spezifische Sequenzabschnitte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die unter UV-Licht sichtbaren Banden wurden fotografisch festgehalten und densitometrisch ausgewertet. b) Die Resultate der densitometrischen Auswertung sind als Quotient von IL-2- und  $\beta$ -Aktin dargestellt. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für zwei weitere Experimente.

#### 4.4 Einfluss der 77C→G Mutation auf die CD45 Phosphatase-Aktivität

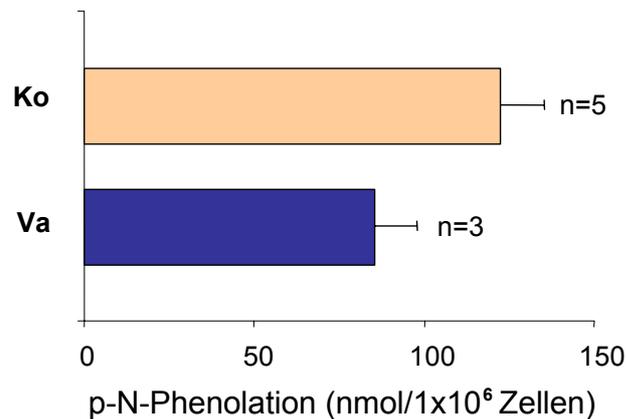
Die bisher beschriebenen Befunde wiesen darauf hin, dass die aberrante Expression von CD45RA-Isomeren die Sensitivität der TZR-vermittelten Signaltransduktion erhöht und damit auch für die verstärkten zellulären Funktionen von varianten T-Zellen verantwortlich ist. Angesichts der entscheidenden Bedeutung der CD45-Phosphatase-Aktivität im TZR-vermittelten Signaltransduktionsgeschehen, stellte sich die Frage, ob die Hyperreaktivität varianter T-Zelllinien mit einer vermehrten Phosphatase-Aktivität erklärt werden könnte. Zur Bearbeitung dieser Problematik wurden drei experimentelle Strategien verfolgt: (i) *In vitro*-Analyse der enzymatischen Aktivität von CD45-Molekülen nach Immunpräzipitation aus varianten und Kontrollzelllinien. (ii) Darstellung des Phosphorylierungsgrades von Tyr505 der Proteinkinase p56<sup>lck</sup>. (iii) Vergleich der Kinase-Aktivität von p56<sup>lck</sup> in T-Zelllinien von Personen mit 77C→G und Wildtyp CD45.

##### 4.4.1 Phosphatase-Aktivität von CD45-Präzipitaten

Der Einsatz von *in vitro*-Phosphatase-Assays mit CD45-Präzipitaten ist ein gängiges Verfahren zur Analyse der enzymatischen Aktivität dieser Moleküle (Takeda, Wu et al. 1992; Takeda, Matsuda et al. 2004). Ein Schwachpunkt dieser Methodik besteht jedoch darin, dass es auch durch die Immunpräzipitation von CD45-Dimeren und/oder Multimeren kommen kann. Da die Phosphatase-Aktivität von CD45 sehr wahrscheinlich durch Dimerisierung reguliert wird, kann die Aktivität von CD45-Präzipitaten nur einen groben Eindruck der *in vivo*-Situation vermitteln. Vor dem Hintergrund, dass ein Vergleich der CD45-Phosphatase-Aktivität zwischen varianten und Kontrollzelllinien demnach nur mit Vorsicht interpretiert werden sollte, wurde die enzymatische Aktivität von CD45-Präzipitaten in einem Phosphatase-Assay anhand des freigesetzten p-Nitrophenols gemessen.

Es zeigte sich, dass die CD45-Moleküle aus Kontrollzelllinien eine höhere Phosphatase-Aktivität aufwiesen als die aus varianten Zellen präzipitierten CD45-Moleküle (Abb. 4.21). Die mengenmäßige Quantifizierung der CD45-Präzipitate ergab jedoch eine um

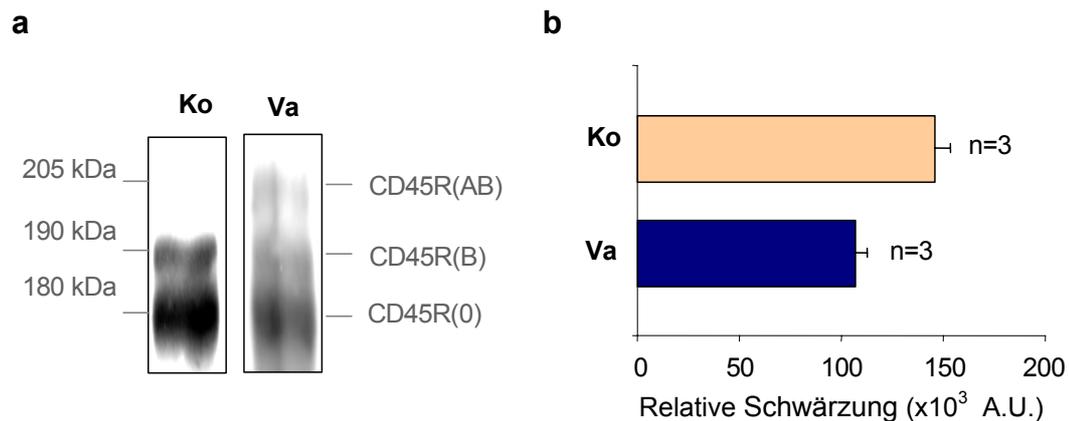
ca. 30% höhere CD45-Konzentration bei Kontrollzellen (Abb. 4.22), korrigiert man die Aktivitätsdaten (Abb. 4.21) um diesen Faktor, ergaben sich mehr oder weniger gleiche Phosphatase-Aktivitäten für die CD45-Präzipitate aus varianten und Kontrollzelllinien. Wie vorne erwähnt, können derartige Vergleiche jedoch nur mit Einschränkungen bewertet werden.



**Abbildung 4.21: CD45-Phosphatase-Aktivität bei T-Zelllinien varianter Personen und Kontrollpersonen**

CD45-Moleküle wurden mit dem CD45 mAk (AICD45.2) aus Lysaten von Mitogenreaktiven Zelllinien immunpräzipitiert. CD45-Präzipitate von Kontrollzellen (Ko) und varianten Zellen (Va) wurden in 100  $\mu$ l Nachweisreagenz, bestehend aus 5 mM p-Nitrophenylphosphat als Substrat, 50 mM Tris (pH 7,2), 0,1 mM DTT und 5 mM EDTA aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine rekombinante CD45 Phosphatase mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100  $\mu$ l 1 M NaOH beendet, der Überstand in Mikrotiterplatten überführt und die optische Dichte im ELISA-Lesegerät gemessen. Die Phosphatase-Aktivität wurde anhand des gebildeten p-Nitrophenols berechnet.

Ferner zeigte die Westernblot-Analyse von CD45-Molekülen auf aktivierten Zellen von Kontrollpersonen und der 77C→G Mutationsträger, dass variante Zellen, wie bereits erwähnt, neben den Isoformen CD45R0 (180 kDa) und CD45RB (190 kDa) die CD45R(AB)-Isoform (205 kDa) auf der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 4.23a). Darüber hinaus war die Schwärzungsintensität der Bande bei 180 kDa bei varianten T-Zellen deutlich schwächer, was daraufhin deutete, dass variante Zellen weniger CD45R0-Isoformen aufwiesen.



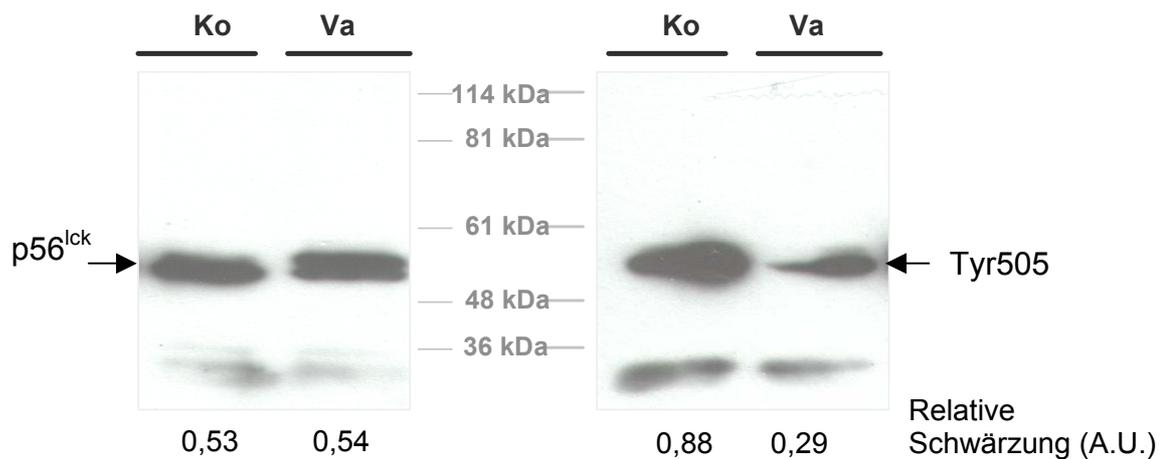
**Abbildung 4.22: Quantitative Analyse der CD45-Expression auf aktivierten T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Personen**

a) CD45-Moleküle wurden mit Hilfe des CD45 mAk (AICD45.2) aus  $5 \times 10^6$  aktivierten Zellen von Kontrollen (Ko) und varianten Probanden (Va) immunpräzipitiert. CD45-Präzipitate wurden in einem 7%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und CD45-Moleküle mit AICD45.2 nachgewiesen. b) Die Intensität der Bandenschwärzung der CD45-Moleküle bei Kontrollpersonen (Ko) und varianten Probanden (Va) wurde densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Bandenschwärzung mit Standardabweichung aus drei Experimenten.

#### 4.4.2 Phosphorylierung von Tyr505 der Kinase p56<sup>lck</sup>

Eine Möglichkeit, den Phosphatase-Aktivierungsgrad von CD45 zu bestimmen, ohne den Dimerisierungsgrad artifiziell zu verändern, besteht in der Analyse der Aminosäure Tyr505 der p56<sup>lck</sup>-Kinase. CD45 entfaltet eine Wirkung in der TZR-vermittelten Signaltransduktion dadurch, dass CD45 den Tyrosinrest Tyr505 von p56<sup>lck</sup> dephosphoryliert. Die Aktivität der Kinase wird durch Tyr505 reguliert, wobei die Dephosphorylierung von Tyr505 die Aktivierung der Kinase zur Folge hat. Anhand des Phosphorylierungsgrades von Tyr505 kann dadurch eine Aussage über die Aktivität der CD45-Phosphatase gemacht werden.

Bei gleicher p56<sup>lck</sup>-Proteinmenge in varianten und Kontrollzelllinien war eine schwächere Phosphorylierung von Tyr505 in varianten Zellen zu erkennen, was darauf hinwies, dass Tyr505 in varianten Zellen stärker durch CD45 dephosphoryliert wurde (Abb. 4.24). Dieser Befund wurde in zwei von drei Experimenten gefunden, im dritten Experiment war bei varianten Zellen und Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied in der Tyr505-Phosphorylierung zu sehen.



**Abbildung 4.23: Expression von p56<sup>lck</sup> und p56<sup>lck</sup> Tyr505 in T-Zelllinien von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation**

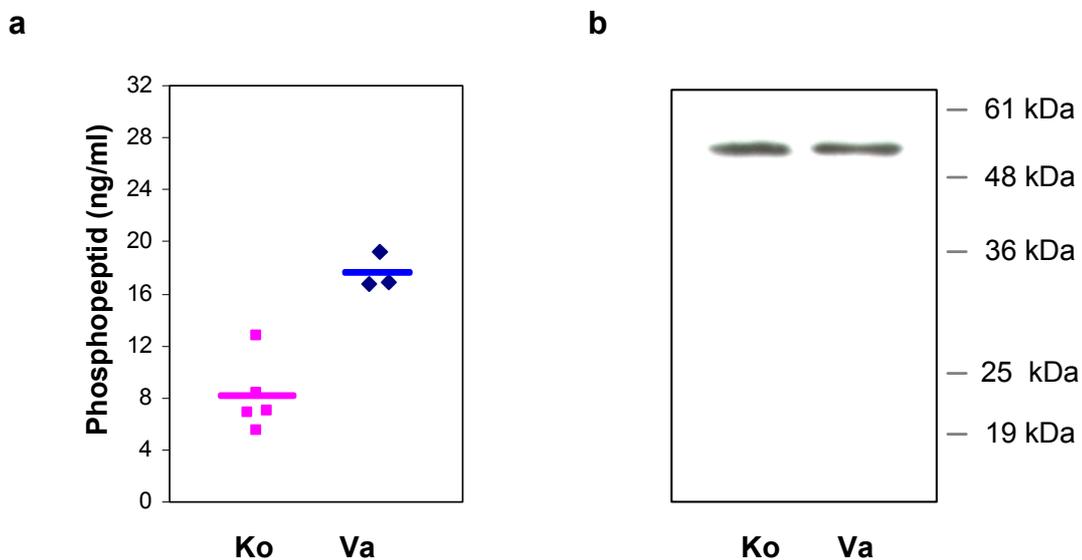
T-Zelllinien ( $10^7$  Z/Ansatz) von Kontrollpersonen (Ko) und varianten Blutspendern (Va) wurden mit NP-40-Puffer lysiert und mit einem p56 mAk aus der Maus (3a5) präzipitiert. p56-Präzipitate von  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in einem 8%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. p56<sup>lck</sup> und p56<sup>lck</sup> Tyr505 wurden in einer anschließenden Westernblotanalyse mit Hilfe eines p56 pAk aus Kaninchen bzw. eines p56<sup>lck</sup> pY505 pAk aus Kaninchen nachgewiesen.

#### 4.4.3 Kinase-Aktivität von p56<sup>lck</sup>

Die bei varianten Zellen beobachtete verminderte Phosphorylierung der p56<sup>lck</sup> Kinase an der Position Tyr505 wies darauf hin, dass p56<sup>lck</sup> sich in einem erhöhten Aktivierungszustand befinden könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die *in vitro*-Phosphorylierungsaktivität der immunpräzipitierten p56<sup>lck</sup>-Kinase von T-Zelllinien varianter Probanden und Kontrollpersonen gemessen. Das verwendete Testsystem enthielt ein Substrat (poly [Glu:Tyr], 4:1), das von der p56<sup>lck</sup>-Kinase phosphoryliert wurde. Phosphorylierte Peptide wurden wiederum durch einen anti-Phosphotyrosin mAk detektiert, der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert war. Die Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin führte zu einer Substrat-Hydrolyse durch die Peroxidase unter Bildung einer blau gefärbten Lösung des reduzierten Substrates. Die Konzentration der Phosphopeptide wurde im ELISA-Photometer durch einen Farbumschlag von blau (630 nm) nach gelb (450 nm) bestimmt.

In den Ansätzen mit der p56<sup>lck</sup>-Kinase varianter T-Zelllinien wurde eine höhere Konzentration an phosphorylierten Peptiden gefunden (Abb. 4.24a). Um

auszuschließen, dass die erhöhte Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase auf eine veränderte Proteinexpression des Enzyms zurückzuführen war, wurde die Proteinmenge von p56<sup>lck</sup> untersucht. Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Menge des p56<sup>lck</sup>-Proteins zwischen varianten Zellen und Kontrollzellen gefunden (Abb. 4.21b). Die erhöhte Aktivität p56<sup>lck</sup>-Kinase war somit nicht durch eine unterschiedliche Menge des Enzyms in den untersuchten Zellen bedingt. Bei der Untersuchung der Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase bei MS-Patienten wurde ein ähnliches Resultat erzielt. Im Vergleich zu aktivierten T-Zellen von MS-Kontrollpatienten wiesen auch T-Zelllinien von MS-Patienten mit der 77C→G Transversion eine erhöhte p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität auf (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.24: Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase und Nachweis der p56<sup>lck</sup>-Proteinmenge bei T-Zelllinien von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern**

a) T-Zelllinien ( $10^7$  Z/Ansatz) von varianten Probanden (Va) und gesunden Kontrollpersonen (Ko) wurden in RIPA-Puffer lysiert und p56<sup>lck</sup> aus den gewonnenen Lysaten immunpräzipitiert. Die Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase wurde anhand der phosphorylierten Peptide gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei varianten Blutspendern und fünf Kontrollpersonen. Mittelwerte sind als Balken dargestellt. b) Aktivierte T-Zellen von varianten Personen und Kontrollprobanden wurden im RIPA-Puffer lysiert. Proteine wurden in einem 7%-igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. p56<sup>lck</sup> wurde mit dem p56 mAk (3a5) detektiert.

Zusammen mit der schwächeren Phosphorylierung von Tyr505 weist dieses Ergebnis daraufhin, dass die CD45 Phosphatase-Aktivität bei aktivierten T-Zellen varianter Personen wahrscheinlich erhöht ist.

## 5 Diskussion

CD45 ist eine Proteintyrosinphosphatase, die für die Differenzierung und Funktion von Lymphozyten notwendig ist. Durch alternatives Spleißen der drei variablen Exons A/4, B/5 und C/6 werden verschiedene Isoformen gebildet. Die Expression der Isoformen in verschiedenen Mustern hängt vom Differenzierungs- und Aktivierungsstatus des Lymphozyten ab und unterliegt einer strengen Regulation. So exprimieren naive T-Zellen beim Menschen hochmolekulare CD45-Isoformen (CD45RA), im Zuge der Aktivierung werden diese jedoch durch niedermolekulare Isoformen (CD45R0) ersetzt. Obwohl klar ist, dass die Phosphatase-Aktivität von CD45-Molekülen für Signaltransduktionsprozesse in T-Zellen von großer Bedeutung ist, ist die Funktion der einzelnen CD45-Isoformen bisher nur unvollständig verstanden. Eine Möglichkeit, die Bedeutung der verschiedenen Kombinationen von CD45-Isoformen beim Menschen zu untersuchen, bietet der 77C→G Polymorphismus im Exon A des CD45-Gens. Die 77C→G Mutation verhindert das normale Spleißen der hochmolekularen (CD45RA) zu niedermolekularen (CD45R0) Isoformen. Die erhöhte Frequenz die 77C→G Mutation in einigen Autoimmunerkrankungen und viralen Erkrankungen hat die Diskussion über die Assoziation der Mutation mit diesen Erkrankungen angeregt.

Mit dem Ziel, grundlegende Funktionen von CD45-Isoformen zu untersuchen und die Bedeutung der 77C→G Punktmutation im Krankheitsgeschehen näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung bearbeitet, welche funktionellen Konsequenzen der 77C→G Polymorphismus nach sich zieht. Die hier erhobenen Befunde weisen auf eine Hyperreaktivität aktivierter T-Zellen von varianten Personen nach T-Zellrezeptorvermittelter Stimulation hin. Daraus ergeben sich für die folgende Diskussion die Fragen, ob (i) die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen tatsächlich die Ursache für die Hyperreaktivität der T-Zellen von varianten Blutspendern ist oder auch andere Ursachen in Frage kommen, (ii) nach welchem Mechanismus die aberrante Expression von CD45RA-Isoformen die T-Zellreaktivität verändert und (iii) wie die funktionellen Besonderheiten varianter T-Zellen zur Suszeptibilität von Personen mit der 77C→G Mutation für bestimmte Krankheiten beitragen können.

## 5.1 Die 77C→G Mutation als Ursache für die Hyperreaktivität aktivierter T- Zellen varianter Personen

Bei der Suche nach möglichen funktionellen Konsequenzen der 77C→G Mutation wurden Zelltypen verwendet, die einen markanten Unterschied im Phänotyp zwischen Personen mit der 77C→G Mutation und Kontrollprobanden aufweisen. So werden bei Personen mit der 77C→G Mutation auf „memory“ und aktivierten T-Zellen drei Isoformen (CD45RB, CD45R0 und CD45RAB) exprimiert, während „memory“ und aktivierte T-Zellen von Kontrollpersonen nur zwei Isoformen (CD45R0 und CD45RB) auf der Oberfläche tragen (Abb. 4.3 und 4.8). Der Vergleich proliferativer Antworten der „memory“ T-Zellen von Kontrollpersonen und Personen mit der 77C→G Mutation auf eine T-Zellrezeptorvermittelte Stimulation zeigte, dass variante T-Zellen eine signifikant höhere Proliferationsrate als Kontroll-T-Zellen aufwiesen. Verglichen mit Kontrollzellen proliferierten variante Zellen sowohl auf die Stimulation mit TZR/CD3 und CD28 mAk als auch auf die Stimulation mit Alloantigen viel stärker (Abb. 4.4 und Tab. 4.2). Im Gegensatz dazu waren die Reaktionsmuster der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Zellen von Personen mit dem 77C→G Polymorphismus und den Kontrollprobanden auf die TZR/CD3- und CD28-vermittelte Stimulation sehr ähnlich (Abb. 4.6). Aus dieser Beobachtung wurde deutlich, dass die Hyperreaktivität nicht auf eine generell erhöhte Reaktivität der Lymphozyten bei varianten Personen zurückzuführen war. Die Tatsache, dass die Hyperreaktivität nur in Zelltypen wie z. B. in „memory“ und aktivierten Zellen, die einen eindeutigen Unterschied im Phänotyp zwischen varianten und Kontrollzellen aufweisen, beobachtet wurde (Abb. 4.4), aber nicht in der CD45RA<sup>+</sup> Zellpopulation derselben Probanden (Abb. 4.6), die sich in der CD45-Isoform Expression nicht unterscheiden (Abb. 4.5), deutete darauf hin, dass die variante Expression mit der Hyperreaktivität zusammenhängt. Wenn die stärkere Proliferation auf andere Ursachen zurückzuführen wäre, sollte die Hyperreaktivität nicht nur bei Zelltypen zu finden sein, bei denen sich variante und Kontrollpersonen markant unterscheiden.

Ohne Zweifel können Unterschiede in zellulären Immunfunktionen auch durch andere Faktoren erklärt werden. So können sie z.B. durch technische Ursachen bedingt sein, zumal *in vitro* Untersuchungen mit menschlichen peripheren Blutlymphozyten schon aufgrund der Variabilitäten zwischen den einzelnen Blutspendern meist mit Heterogenitäten verbunden sind. Um experimentelle Variabilitäten gering zu halten,

wurden in jedem Experiment jeweils die Zellen eines varianten Blutspenders parallel mit den Zellen einer Kontrollperson direkt getestet. Dabei wurden die Reaktivitäten der Zellen eines varianten Blutspenders mehrmals in anschließenden Experimenten mit den Reaktivitäten der Zellen anderer Kontrollpersonen verglichen (Tab.4.2). Da vergleichbare Reaktionen mit varianten Zellen und Kontrollzellen unter gleichen Testbedingungen erzielt wurden, konnten experimentelle Variabilitäten als Ursache für die Hyperreaktivität varianter Zellen ausgeschlossen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die 77C→G Mutation und die daraus resultierende aberrante Expression von CD45RA-Isoformen die Ursache für die Hyperreaktivität varianter T-Zellen ist. Unterstützt wird die Hypothese der Hyperreaktivität auch durch die Beobachtung, dass in einer anderen Gruppe von Personen mit der 77C→G Mutation ein größerer Anteil an Zellen mit aktiviertem Phänotyp gefunden wurde (Boxall, McCormick et al. 2004). Ähnlich wie bei der 77C→G Mutation hat man ferner bei Personen, die bezüglich der 138C→G Mutation in Exon C homozygot sind, ein Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen nachgewiesen, das für einen stärkeren Aktivierungsstatus der mutanten Zellen sprach. Kürzlich wurden in einem Tiermodell mit transgenen Mäusen, die eine hohe CD45RABC Expression und eine geringe CD45R0 Expression aufwiesen, ähnliche Phänomene beschrieben (Tchilian, Dawes et al. 2004). Die T-Zellen dieser transgenen Mäuse zeichneten sich durch einen aktivierten Phänotyp, eine verstärkte Proliferation und sogar eine defekte B-Zelldifferenzierung aus. All diese Befunde sprechen dafür, dass eine veränderte Expression von CD45-Isoformen zu veränderten Immunfunktionen wie z. B. einer Hyperreaktivität führen kann.

In früheren Studien konnten jedoch keine Veränderungen der Immunfunktionen durch die aberrante Expression nachgewiesen werden (Schwinzer and Wonigeit 1990). Eine Erklärung dafür wäre, dass bei diesen Studien die gesamte Lymphozytenpopulation verwendet wurde, das heißt, auch naive T-Zellen, deren CD45-Isoformausrüstung zwischen Kontrollpersonen und varianten Personen sich nicht unterscheidet. Es wäre vorstellbar, dass die hier aufgezeigten Unterschiede sich in der damals betrachteten Gesamtpopulation nicht darstellen lassen. Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit entweder aufgereinigte Subpopulationen oder aktivierte T-Zellen verwendet, die sich phänotypisch klar zwischen den 77C→G Mutationsträgern und Kontrollpersonen unterscheiden. Die hier gewonnenen Daten zeigten eine Hyperreaktivität von „memory“

T-Zellen sowie von aktivierten T-Zellen auf eine T-Zellrezeptorvermittelte Aktivierung. Darüber hinaus war in den Experimenten der Proliferationskinetik zu erkennen, dass variante Zellen nicht nur sensitiver auf eine Stimulation des T-Zellrezeptors reagierten, sondern die Proliferation dieser Zellen auch länger andauerte (Abb. 4.9). Die erhöhte Proliferationsrate bei Personen mit der 77C→G Mutation dürfte damit sowohl auf einer erhöhten Sensitivität varianter T-Zellen auf einen TZR-Stimulus als auch auf einer länger andauernden proliferativen Antwort dieser Zellen basieren.

Aus diesem Befund ergab sich die Frage nach der Ursache für die erhöhte Proliferationsrate varianter T-Zellen. Die T-Zellaktivierung führt über die Genaktivierung und die Transkriptionsregulation im Zellkern unter anderem zur verstärkten Expression von Aktivierungsantigenen und zur Sekretion von Zytokinen. Da das Zytokin IL-2 bei der klonalen Expansion von T-Zellen eine große Rolle spielt, war eine detaillierte Untersuchung von IL-2 von besonderem Interesse. Tatsächlich wurden bei „memory“ T-Zellen von varianten Blutspendern im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen erhöhte IL-2-Konzentrationen im Überstand nachgewiesen (Abb. 4.7). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte bei varianten Zelllinien auch ein größerer Anteil an IL-2 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach allogener Stimulation gefunden werden (Abb. 4.10). In Verbindung damit zeigte die Untersuchung der IL-2-mRNA-Expression in aktivierten T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation und Kontrollpersonen, dass die Transkription der IL-2-mRNA bei varianten Zellen viel schneller induziert wurde (Abb. 4.20). Diese Ergebnisse erlaubten die Schlussfolgerung, dass die im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhte IL-2-Konzentration auf den erhöhten Anteil der IL-2 produzierenden Zellen und auf die frühere Induktion der IL-2-Genexpression und damit auf eine beschleunigte IL-2-Produktion zurückzuführen ist. Da IL-2 nicht nur Proliferation fördert und antreibt, sondern auch Zellen vor Apoptose schützt, liegt der Schluss nahe, dass die erhöhte und lang anhaltende Proliferation varianter Zellen durch die erhöhten IL-2-Konzentrationen bedingt ist.

Ob es zu einer vorherrschend humoralen oder zellvermittelten adaptiven Immunantwort kommt, hängt von der Differenzierung der CD4-positiven T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen ab. Th1-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion des Zytokins Interferon aus, während Th2-Zellen überwiegend IL-4 sezernieren (Hsieh, Heimberger et al. 1992). Die treibende Kraft bei der Differenzierung ist in erster Linie das vorherrschende

Zytokinmuster. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede im Zytokinmuster von „memory“ T-Zellen varianter Blutspender und Kontrollpersonen gibt, wurden die Konzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass variante T-Zellen tendenziell mehr Th2-spezifische und weniger Th1-spezifische Zytokine sezernierten (Abb. 4.7). Die Unterschiede bei den Th1-spezifischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  waren aufgrund der großen Streuung der gemessenen Werte nicht signifikant. Signifikant dagegen waren die Unterschiede bei den Zytokinen IL-4 und IL-6. Die in den Überständen gemessenen Konzentrationen für IL-4 und IL-6 waren bei varianten CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen doppelt so hoch wie die gemessenen Werte der Kontrollzellen. Eine mögliche Ursache für diesen tendenziell gefundenen Unterschied im Zytokinmuster von „memory“ T-Zellen der Personen mit der 77C→G Mutation zu denen der Kontrollpersonen könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der isolierten CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellpopulation sein. Dies würde bedeuten, dass in der CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellpopulation bei varianten Blutspendern Th2-Zellen dominieren. CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollpersonen dürften sich demnach eher aus Th1-Zellen zusammensetzen. Es ist auch vorstellbar, dass gewisse Erkrankungen bei den untersuchten Probanden mit dem 77C→G Polymorphismus zu einer Dysbalance zwischen Th1- und Th2-Zellen geführt haben könnten. So ist es z. B. bekannt, dass eine Interaktion von Parasiten mit dem Komplement Mastzellen aktiviert, die IL-4 ausschütten und somit die Immunantwort auf eine Th2-Reaktion dirigieren (Sher and Coffman 1992). Ferner wurde bei atopischen Erkrankungen ein Ungleichgewicht zu Gunsten der Th2-Zellen gefunden (Maggi, Macchia et al. 1991). Zu der Frage, inwiefern die aberrante CD45RA-Expression zu einem Ungleichgewicht zwischen T-Helferzellpopulationen führen könnte, gibt es folgende Überlegung. Es ist bekannt, dass die Konzentration eines bestimmten Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexes auf antigenpräsentierenden Zellen ebenfalls die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu den verschiedenen Arten von Effektorzellen beeinflussen kann. Dabei stimulieren Peptide, die mit hoher Dichte auf der Oberfläche präsentiert werden, eher Th1-Antworten, während die Präsentation in niedriger Dichte eher Th2-Antworten hervorruft (Pfeiffer, Murray et al. 1991; Murray, Pfeiffer et al. 1992). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation bereits auf eine geringe Konzentration fremder Peptide reagierten, von Bedeutung (Abb. 4.4).

Diese erhöhte Sensitivität varianter CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann möglicherweise ein Faktor sein, der die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th2-T-Zellen unterstützt. Th2-T-Zellen wiederum können erhöhte Konzentrationen für IL-4 und IL-6 verursachen.

## 5.2 Der molekulare Mechanismus der Hyperreaktivität

Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass „memory“ bzw. *in vitro* aktivierte T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation mit verstärkten Antworten auf T-Zellrezeptorvermittelte Stimulation reagierten. Eine Arbeitshypothese bestand darin, dass die Hyperreaktivität auf eine veränderte T-Zellrezeptorvermittelte Signaltransduktion in varianten Zellen zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden biochemische Initialereignisse nach der Stimulation über den T-Zellrezeptor untersucht. *In vitro* aktivierte T-Zellen von varianten Personen zeigten nach Stimulation eine veränderte Tyrosinphosphorylierung, die sich sowohl in der Stärke als auch in der Kinetik von der Tyrosinphosphorylierung bei aktivierten Zellen der Kontrollpersonen unterschieden (Abb. 4.11). Die verstärkte Zunahme und die beschleunigte Kinetik der Tyrosinphosphorylierung führten zu der Vermutung, dass die Signaltransduktion in varianten Zellen effektiver abläuft als in Kontrollzellen. Daher wurde die Phosphorylierung der TZR-ζ-Kette untersucht. Bei der Basalphosphorylierung der TZR-ζ-Kette gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen von varianten Probanden und Kontrollpersonen, aber nach Stimulation wurde bei varianten T-Zellen eine stärkere Phosphorylierung von TZR-ζ beobachtet (Abb. 4.12 und Tab. 4.3). In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte auch bei der Zap-70 Kinase eine stärkere Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Des Weiteren wurde in Übereinstimmung mit den frühen Ereignissen nach T-Zellrezeptorvermittelter Stimulation eine erhöhte Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in aktivierten T-Zellen varianter Personen nachgewiesen (Abb. 4.14). Der erhöhte Anstieg der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen korrelierte mit der beschleunigten Induktion der Transkription des Zytokins IL-2 in varianten Zellen (Abb. 4.20). All diese Daten deuteten darauf hin, dass die aberrante CD45RA-Expression die Signaltransduktion bei aktivierten T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation verstärkt.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der Hyperreaktivität zu verstehen, wurde die Aktivität der Schlüsselenzyme in der T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion untersucht. Die Tyrosinphosphorylierung ist ein metabolisches Ereignis, das hauptsächlich durch die Proteintyrosinkinase (PTK) der *src* Familie vermittelt wird. Eine veränderte PTK-Aktivität könnte daher zu einem veränderten Tyrosinphosphorylierungsmuster und zu Veränderungen der Aktivität der darauf folgenden Substrate der p56<sup>lck</sup>-Kinase führen. Anhand der bisherigen Ergebnisse wurde vermutet, dass die Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase erhöht ist. Tatsächlich wurde bei aktivierten T-Zellen varianter Probanden auch eine erhöhte p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität nachgewiesen. Die Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase war in varianten Zellen mehr als doppelt so hoch wie die p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität in Kontrollzellen (Abb. 4.24).

Die Schlüsselrolle von CD45 bei TZR-vermittelten Signaltransduktionsprozessen erklärt sich dadurch, dass CD45 als Tyrosinphosphatase die Kinase p56<sup>lck</sup> dephosphoryliert und damit aktiviert. Aufgrund der erhöhten Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase lag die Vermutung nahe, dass in aktivierten T-Zellen varianter Probanden die CD45-Phosphatase-Aktivität gesteigert ist. Die Ergebnisse aus den Phosphatase-Assays schienen zunächst im Widerspruch zu der Vermutung zu stehen, da in den Phosphatase-Assays bei varianten T-Zellen eine geringe CD45-Phosphatase-Aktivität gemessen wurde (Abb. 4.21). Es kann jedoch bei der Immunpräzipitation nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Kopplung der CD45-Moleküle an die CD45-Antikörper zu Veränderungen bzw. Störungen der ursprünglichen Interaktionen der verschiedenen CD45-Moleküle untereinander kommt. Das würde bedeuten, dass durch diese Art von Experimenten die *in vivo* CD45-Phosphatase-Aktivität nicht richtig wiedergegeben werden kann. Die beobachtete geringe Phosphatase-Aktivität könnte durch eine verminderte Expression der CD45-Moleküle verursacht werden. Für diese Erklärungsmöglichkeit spricht die im Vergleich zu Kontrollzellen geringe Menge an CD45-Molekülen, die aus aktivierten T-Zellen von Kontrollpersonen und varianten Blutspendern präzipitiert wurden (Abb. 4.22). Eine geringere Expression von CD45-Molekülen wurde durch FACS-Analysen auch durch eine andere Arbeitsgruppe festgestellt (Jacobsen, Schweer et al. 2000). Eine *in vivo* Analyse wäre notwendig, um die *in vivo* Phosphatase-Aktivität genau erfassen zu können. Zur Zeit sind jedoch noch keine Testsysteme für solche *in vivo* Analysen vorhanden.

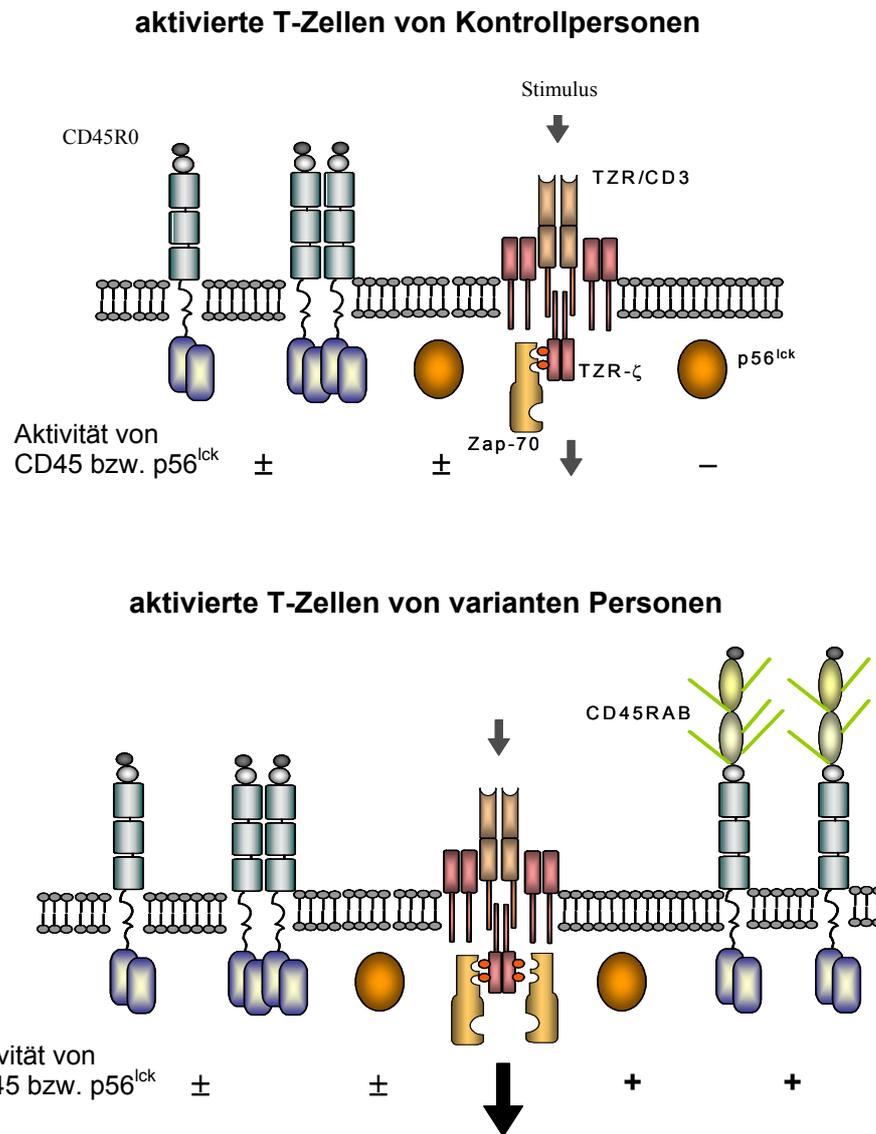
Nach dem heutigen Wissenstand geht man davon aus, dass die Aktivität der CD45-Moleküle durch Dimerisierung reguliert wird. Es gibt auch Hinweise, dass die Dimerisierung zweier CD45-Moleküle in einer Reduzierung der Phosphatase-Aktivität resultiert (Jiang, den Hertog et al. 1999; Takeda, Matsuda et al. 2004). Ausgehend von diesem Konzept besteht die Möglichkeit, dass es aufgrund der zusätzlichen Expression von CD45RA-Molekülen bei varianten Personen zu einer Dysregulation der CD45-Phosphatase-Aktivität kommt. Wenn die Mehrzahl der varianten CD45RA-Moleküle nicht dimerisiert, könnte eine erhöhte Aktivität der CD45-Phosphatase die Folge sein, was wiederum in einer erhöhten p56<sup>lck</sup> Kinase-Aktivität resultiert. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass ein Glykosylierungsmuster bei varianten CD45RAB-Isoformen gefunden wurde, das einen markanten Unterschied zum Glykosylierungsmuster normaler CD45RAB-Isoformen aufwies (Kornfeld, J. 2003). Dieses Glykosylierungsmuster varianter CD45RAB-Isoformen zeichnete sich durch stark geladene Zuckerstrukturen aus, die aufgrund ihrer negativen Ladungen ein sterisches Hindernis bei der Dimerisierung darstellen könnten. Wenn dadurch bei varianten Zellen keine bzw. weniger Dimere gebildet werden, ist es denkbar, dass die Phosphatase-Aktivität in varianten Zellen auf der Einzelzellebene erhöht ist. Ein indirekter Hinweis auf eine erhöhte Aktivität der CD45-Phosphatase bei varianten T-Zellen wurde ferner durch die Untersuchung des negativ regulatorischen Tyrosins Tyr505 der p56<sup>lck</sup>-Kinase gegeben, für dessen Dephosphorylierung die CD45-Phosphatase verantwortlich ist. Sollte die gesamte CD45-Phosphatase-Aktivität in varianten Zellen erhöht sein, so kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer Zunahme der Dephosphorylierung, also zu einer Verminderung der Phosphorylierung von Tyr505 kommt. In der Tat konnte in varianten Zellen eine verminderte Phosphorylierung von Tyr505 gezeigt werden (Abb. 4.23). Da die Phosphorylierung von Tyr505 die inaktive bzw. geschlossene Konformation des Enzyms induziert, würde eine Verminderung der Phosphorylierung dieses negativ regulatorischen Restes zu einer Steigerung der p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität führen. Dies würde auch die in den Protein-Tyrosin-Kinase-Assays beobachtete erhöhte p56<sup>lck</sup>-Aktivität erklären.

Zusammenfassend kann aus den hier erhobenen Befunden der Schluss gezogen werden, dass die aberrante Expression von CD45RA-Isoformen auf aktivierten Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation die Aktivität von Schlüsselenzymen verändert und somit zu einer verstärkten Signaltransduktion führt. Dies kann wiederum veränderte

Immunfunktionen wie etwa die T-Zell-Hyperreaktivität zur Folge haben. Darüber hinaus weisen unsere Daten darauf hin, dass neben der Konzentration der CD45-Moleküle vor allem die Komposition der einzelnen Isoformen für die Funktion von CD45 entscheidend ist. Diese Schlussfolgerung wird durch zwei Befunde unterstützt: Die „naive“ CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellpopulation varianter Blutspender unterscheidet sich in der Kombination der CD45-Isoformen nicht von der „naiven“ T-Zellpopulation der Kontrollpersonen (Abb. 4.5), weist aber im Vergleich zu der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellpopulation von Kontrollpersonen eine etwas höhere Expressionsdichte von CD45RA-Molekülen auf (Tab. 4.1). Ungeachtet des Unterschieds in der Expressionsdichte von CD45RA-Isoformen führte die TZR/CD3- und CD28-vermittelte Stimulation jedoch nicht zu einer veränderten Antwort (Abb. 4.6). Des Weiteren weisen die bisher diskutierten Ergebnisse auf eine erhöhte Phosphatase-Aktivität hin, die zelluläre Funktionen der betroffenen Lymphozyten beeinflusst, obwohl variante Zellen wahrscheinlich weniger CD45-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren.

Ausgehend von den gewonnenen Daten und den derzeitigen Erkenntnissen über die CD45-Funktionen lassen sich die sich daraus ergebenden Vorstellungen bezüglich der veränderten Signaltransduktion bei Personen mit der 77C→G Mutation in einem hypothetischen Modell zusammenfassen (Abb. 5.1): In diesem Modell geht man davon aus, dass die gesamte CD45-Phosphatase-Aktivität einer Zelle sich aus dem Gleichgewicht der einzelnen Aktivitäten der Dimere und Monomere ergibt, wobei die Homodimerisierung von CD45-Isoformen die Funktion von CD45 und damit auch die Signaltransduktion negativ reguliert. Im Laufe der T-Zellaktivierung werden bei Kontrollpersonen die hochmolekularen CD45-Isoformen langsam herunterreguliert und durch niedermolekulare CD45-Isoformen wie z. B. die CD45R0-Isoform ersetzt. Aufgrund ihrer geringen Zuckerstrukturen können CD45R0-Isoformen effizienter Dimere bilden (Xu and Weiss 2002). Die Expression der CD45R0-Isoformen auf aktivierten Zellen verschiebt das Gleichgewicht zu Gunsten der Dimere, wodurch es zur negativen Regulation der CD45-Phosphatase-Aktivität kommt. Durch die Herunterregulierung der hochmolekularen Isoformen wird die Phosphatase-Aktivität der Zelle nicht abgeschaltet, sondern nur reduziert. Wahrscheinlich dient die Herunterregulierung der Phosphatase-Aktivität als negative Rückkoppelungsschleife, die zur Beendigung der Immunantwort beiträgt, um eine Hyperreaktivität und mögliche Gewebeschäden zu vermeiden. Durch Untersuchungen der Ca<sup>2+</sup>- und

Inositolphosphatase-Antworten wurde gezeigt, dass die Stärke der Signaltransduktion in „memory“ T-Zellen bei Menschen und Mäusen reduziert ist (Farber, Acuto et al. 1997; Hall, Heffernan et al. 1999; Xu and Weiss 2002). Die 77C→G Mutation verhindert die Herunterregulierung der hochmolekularen Isoformen, so dass es bei den betroffenen Personen zu einer zusätzlichen Expression von CD45RAB-Isoformen auf aktivierten Zellen kommt, die normalerweise CD45RA negativ sind. Die aberrante Expression von CD45RAB-Isoformen verändert das Gleichgewicht und verursacht damit wahrscheinlich eine Dysregulation der gesamten CD45-Phosphatase-Aktivität der Zelle. Aufgrund der Hypersialisierung können CD45RA-Moleküle vermutlich schlechter dimerisieren. Dies könnte eine erhöhte CD45-Phosphatase-Aktivität auf varianten Zellen zur Folge haben. Die wahrscheinlich erhöhte CD45-Phosphatase-Aktivität resultiert wiederum in einer Steigerung der p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität und damit letztendlich in einer Steigerung der Effizienz der Signaltransduktion in aktivierten Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation. Die zelluläre Auswirkung der verstärkten Signaltransduktion äußert sich in erhöhter IL-2-Produktion und erhöhter Proliferation.



**Abbildung 5.1: Hypothetisches Modell der verstärkten T-Zellrezeptorvermittelten Signaltransduktion auf aktivierten Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation**

Durch die Dimerisierung der CD45R0-Isoformen kommt es auf aktivierten Zellen von Kontrollpersonen zu einer mittelmäßig hohen CD45-Phosphatase-Aktivität ( $\pm$ ), die eine mittelmäßig hohe Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase ( $\pm$ ) nach sich zieht. Daraus resultiert eine moderate Effizienz der Signaltransduktion. Durch die zusätzliche Expression von CD45RAB-Isoformen auf varianten Zellen wird wahrscheinlich die Phosphatase-Aktivität ( $\pm$  und  $+$ ) erhöht, da diese Isoformen aufgrund ihrer Hypersialisierung schlechter dimerisieren. Die erhöhte Phosphatase-Aktivität führt zu einer erhöhten p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität ( $\pm$  und  $+$ ), was letztendlich eine erhöhte Effizienz der Signaltransduktion zur Folge hat, die sich in der verstärkten Phosphorylierung von TZR- $\zeta$  und Zap-70 äußert.

### 5.3 Die Bedeutung der 77C→G Mutation im Krankheitsgeschehen

Seit der Verfügbarkeit der ersten Referenzfassung der humanen Genomsequenzen hat sich die systematische Untersuchung genetischer Prädispositionsfaktoren für Erkrankungen und ihrer Komplikationen zu einem besonders intensiv bearbeiteten Forschungsfeld entwickelt. Vor allem Polymorphismen sind für die Krankheitsursachenforschung von besonderem Interesse, da man in der genetischen Variation auf der Ebene der DNA-Struktur den Schlüssel zu angeborenen Anfälligkeiten für viele Krankheiten sieht. Durch die Untersuchung von genetischen Polymorphismen hofft man, Hinweise auf ihre Bedeutung für die Ätiologie der krankhaften Veränderungen zu erhalten. Die Tatsache, dass bisher nur wenige „Krankheitsgene“ identifiziert worden sind, macht deutlich, dass es nur wenige Krankheiten gibt, die direkt mit einem „Krankheitsgen“ assoziiert sind. Nach bisherigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass einzelne Genvarianten das individuelle Risiko nur wenig modulieren. Vielmehr tragen komplexe Gen-Gen-Umweltinteraktionen zur Entstehung komplexer multifaktorieller Krankheiten bei. Um die Rolle dieser „Modifizier“-Gene zu verstehen, ist das Wissen über funktionelle Konsequenzen erforderlich, die durch einen Polymorphismus erzeugt werden können. Daher haben Untersuchungen zur Charakterisierung möglicher Konsequenzen auf die Immunfunktion eine besondere Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen und „memory“ T-Zellen der Personen mit der 77C→G Mutation hyperreaktiv sind und dass die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen die T-Zellrezeptorvermittelte Signaltransduktion in varianten Zellen verstärkt. Aufbauend auf diesen funktionellen Daten erlauben die hier erhobenen Befunde zum ersten Mal auf funktioneller Ebene eine Einschätzung der Rolle von 77C→G als Risikofaktor für bestimmte Krankheiten.

Die Korrelation zwischen dem 77C→G Polymorphismus und den Krankheiten basiert auf der Beobachtung, dass die 77C→G Mutation nur mit einer Häufigkeit von 1 bis 2% bei gesunden Blutspendern, jedoch mit deutlich erhöhter Frequenz bei Patientengruppen gefunden wurde, die an systematischer Sklerose (Schwinzer, Witte et al. 2003), HIV-1 (Tchilian, Wallace et al. 2001) und autoimmuner Hepatitis (Vogel, Strassburg et al. 2003) leiden. Des Weiteren schien der 77C→G Polymorphismus mit multipler Sklerose

in Patientengruppen aus Deutschland und Italien zu assoziieren (Jacobsen, Schweer et al. 2000; Ballerini, Rosati et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch die Assoziation der 77C→G Mutation mit multipler Sklerose in einigen Patientenkollektiven aus Nordamerika und Schweden nicht bestätigen (Barcellos, Caillier et al. 2001; Vorechovsky, Kralovicova et al. 2001). Als mögliche Erklärungen für diese zum Teil widersprüchlichen Daten wurden Unterschiede bei der Auswahl bzw. der Zusammenstellung der jeweiligen Untersuchungskollektive sowie Unterschiede in geographischen und ethnischen Verteilung der 77C→G Mutation diskutiert (Tchilian, Dawes et al. 2002).

Durch die Diskussion über eine mögliche Assoziation der 77C→G Mutation mit den erwähnten Erkrankungen ist deutlich geworden, dass genetische „Modifier“ Gene direkt oder indirekt miteinander interagieren und auf diese Weise das Risiko für eine Erkrankung beeinflussen können. Obwohl die phänotypischen Konsequenzen der 77C→G Mutation wie die Überexpression von CD45RA-Molekülen bei allen Personen mit der 77C→G Mutation gleich sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die funktionellen Konsequenzen wie z. B. die Hyperreaktivität nur innerhalb eines besonderen genetischen Hintergrunds äußern. Eine gründliche funktionelle Charakterisierung der T-Zellen varianter Personen von anderem geographischen bzw. ethnischen Ursprung wäre hilfreich, um dieses Problem zu lösen. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass bei sechs gesunden Personen mit der 77C→G Mutation aus Großbritannien ein hoher Anteil an aktivierten CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen (Boxall, McCormick et al. 2004) wurde. Obwohl dabei keine funktionellen Experimente durchgeführt wurden, weist dieser Befund auf eine Hyperreaktivität der CD45R0<sup>+</sup> Population und damit auf eine überproportionale Expansion dieser Zellen hin. Wenn die T-Zell-Hyperreaktivität in dieser Gruppe von varianten Personen mit *in vitro* Experimenten bestätigt werden könnte, wäre ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die funktionellen Konsequenzen der 77C→G Mutation unwahrscheinlich.

Um die Rolle der Mutation in einem Immunsystem mit erhöhter Autoreaktivität zu untersuchen, wurden die Reaktivitäten von MS-Patienten mit dem 77C→G Polymorphismus mit MS-Kontrollpatienten verglichen. In Übereinstimmung mit der

Beobachtung, dass die 77C→G Mutation bei gesunden Probanden die Effizienz der TZR-vermittelten Signaltransduktion erhöht, führte die TZR/CD3-vermittelte Stimulation von T-Zellen bei varianten MS-Patienten auch zu einer stärkeren Aktivierung der IL-2 Gentranskription (Abb. 4.20). Wie bei aktivierten T-Zellen von gesunden, varianten Blutspendern wurde eine erhöhte p56<sup>lck</sup>-Kinase-Aktivität in Zellen von varianten MS-Patienten gefunden. Dies lässt vermuten, dass die Mechanismen, die zur Hyperaktivität führen, bei Patienten und Gesunden mit der 77C→G Mutation ähnlich sind. Die Hyperreaktivität ist ein Phänomen, das variante Blutspender mit Patienten, die unter systemischem Lupus Erythematosus (SLE) leiden, gemeinsam haben. So wurden bei T-Zellen von SLE-Patienten verstärkte Antworten auf die Stimulation mit Mitogenen, TZR/CD3-Antikörpern und IL-2 beobachtet (Blasini, Stekman et al. 1994). Ferner wurde wie bei aktivierten T-Zellen von varianten Personen bei T-Zellen von SLE-Patienten eine beschleunigte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation nachgewiesen (Vassilopoulos, Kovacs et al. 1995). Obwohl bei diesen SLE-Patienten eine geringe p56<sup>lck</sup>-Menge gefunden wurde, konnte eine verstärkte p56<sup>lck</sup>-Aktivität als Ursache für die beobachteten Befunde identifiziert werden. Als Erklärung für diese erhöhte Kinase-Aktivität wurde eine verstärkte Interaktion der p56<sup>lck</sup>-Kinase mit der CD45-Phosphatase in den GEMs diskutiert, die zu einer gesteigerten Aktivität der p56<sup>lck</sup>-Kinase führte. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass eine leicht erhöhte Frequenz von der 77C→G Mutation bei SLE-Patienten gefunden wurde (Schwinzer, Witte et al. 2003).

Die beschriebenen Phänomene, die Personen mit der 77C→G Mutation und einige Patienten, die unter Autoimmunerkrankungen leiden, gemein haben, erklären jedoch nicht, in wie fern die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen zur Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen beitragen könnte. Autoimmunerkrankungen sind Krankheiten, in denen das Immunsystem körpereigene Strukturen nicht als „Selbst“ erkennt und sie daher als „Fremd“ bekämpft. Es ist denkbar, dass die variante CD45RA-Expression wichtige Mechanismen verändert, die zu einem Zusammenbruch der immunologischen Toleranz führen könnten, indem z. B. (i) die Schwelle der Reaktivität auf Autoantigene verändert wird und (ii) relevante Prozesse wie etwa T- und B-Zelldifferenzierung, die Apoptose und funktionelle Th1/Th2-Antworten beeinflusst werden.

T-Zellen spielen bekanntlich eine entscheidende Rolle bei den meisten Autoimmunitätskrankheiten. Zum normalen Immunrepertoire des Menschen gehören auch autoreaktive T-Zellen. So kommen z.B. T-Zellen, die enzephalitogene Antigene wie S100 oder das basische Myelinprotein (MBP) erkennen, auch im Immunsystem Gesunder vor (Hafler and Weiner 1995; Wucherpfennig, Hafler et al. 1995; Wekerle, Bradl et al. 1996) und sind *per se* nicht krankheitsspezifisch. Hieraus ließe sich die Hypothese ableiten, dass das autoaggressive Potential dieser Zellen durch die Sensitivität der TZR-Signaltransduktion kontrolliert wird. In diesem Zusammenhang kann die Hyperreaktivität bei varianten Personen für die Entwicklung von Krankheiten dahingehend eine Rolle spielen, dass durch die Hyperreaktivität die Schwelle für die T-Zellaktivierung herabgesetzt wird, wodurch selbstreaktive Zellen leichter aktiviert werden. Dies könnte die Expansion von Klonen mit autoaggressivem Potential begünstigen. Dadurch würde ein verändertes TZR-Repertoire generiert werden, das anfällig für Autoimmunerkrankungen wäre. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass zwischen Personen mit der 77C→G Mutation und Kontrollpersonen markante Unterschiede im TZR-Repertoire gefunden wurden (Do, H.-T. 2002). Die verlängerte Proliferation varianter Zellen (Abb. 4.9) weist ferner darauf hin, dass Mechanismen, die eine T-Zellantwort beenden, gestört sein könnten. Somit hätten autoaggressive variante Effektor-T-Zellen mehr Zeit, um gegen Autoantigene zu agieren, bevor sie von Kontrollmechanismen inaktiviert bzw. eliminiert werden. Eine weitere Konsequenz der niedrigen Aktivierungsschwelle ist ferner, dass der gesamte Aktivierungsstatus der T-Zellpopulation bei Personen mit der 77C→G Mutation erhöht ist. Da aktivierte T-Zellen sich leichter durch HIV-1 Viren infizieren lassen (Chun, Chadwick et al. 1997), könnte ein erhöhter Aktivierungsgrad die erhöhte Frequenz der 77C→G Mutation bei HIV-1-Patienten erklären könnte.

Eine weitere mögliche Ursache für die erhöhte Frequenz der 77C→G Mutation bei Autoimmunerkrankungen könnte in Störungen während der T-Zellreifung im Thymus liegen. Aus der Tatsache, dass die Thymozytenreifung bei CD45-negativen Mäusen im CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Stadium blockiert war (Byth, Conroy et al. 1996; Kung, Pingel et al. 2000), konnte der Schluss gezogen werden, dass die Expression von CD45-Molekülen für die T-Zellreifung eine essentielle Rolle spielt. Kortikale unreife Thymozyten exprimieren

zunächst die CD45R0-Isoform, nach dem Ablauf der positiven und negativen Selektion verlieren sie jedoch die CD45R0-Isoform und tragen nun CD45RA-Isoformen auf der Zelloberfläche (Fujii, Okumura et al. 1992; Zapata, Pulido et al. 1994). Gemäß dieser Entwicklung ist der Großteil der Thymozyten CD45R0 positiv, während nur etwa 5% der Thymozyten CD45RA-Isoformen als Zeichen dafür exprimieren, dass sie nach dem erfolgreichen Abschluss der positiven Selektion als naive T-Zellen in die Peripherie exportiert werden können. Die 77C→G Mutation erzeugt wahrscheinlich auch bei Thymozyten einen signifikanten Phänotyp. In diesem Zusammenhang haben Liao et al. von einem abnormalen CD45RA-Phänotyp bei humanen Thymozyten berichtet (Liao, Montefiori et al. 2000), der sich durch das Fehlen der Herunterregulation von CD45RA-Isoformen bei Thymozyten auszeichnete, so dass es zu einer massiven Überexpression von CD45RA-Molekülen auf fast allen Thymozyten (~90%) kam. Obwohl in dieser Studie nicht definitiv gezeigt ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den untersuchten Probanden um Träger der 77C→G Mutation handelt. Demnach dürften deren kortikale unreife Thymozyten neben der CD45R0-Isoform auch CD45RA-Moleküle exprimieren. Durch die Untersuchungen an CD45R0- und CD45ABC-Mäusen ist gezeigt worden, dass sowohl die niedrig- als auch die hochmolekulare Isoform die Weiterentwicklung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Thymozyten unterstützte. Dennoch ist dabei auch deutlich geworden, dass die CD45R0-Isoform vermutlich an der Regulation der Apoptose bei der positiven und negativen Selektion beteiligt ist. Denkbar ist daher, dass apoptotische Prozesse durch die Überexpression von CD45RA-Molekülen bei varianten Thymozyten gestört sind. Die Konsequenz einer solchen Störung wäre z. B., dass Thymozyten mit einem autoaggressiven Potential trotzdem in die Peripherie entlassen werden. Auch wenn Thymozyten mit einem abnormalen CD45-Phänotyp die Selektionsprozesse im Thymus passiert haben, können mögliche funktionelle Konsequenzen in der Peripherie nicht ausgeschlossen werden. So wurde bei CD45ABC-Mäusen beobachtet, dass die T-Zellen dieser Mäusen nicht in Lage waren, zytotoxische T-Zell-Effektormechanismen wahrzunehmen und neutralisierende Antikörper nach einer viralen Infektion zu generieren (Kozieradzki, Kündig et al. 1997).

Diese Beobachtung und das Ungleichgewicht zwischen T-Helferzellpopulationen bei Personen mit der 77C→G Mutation erlangen in Anbetracht der möglichen Assoziationen der 77C→G Mutation mit viralen Krankheiten eine besondere

Bedeutung. Die Verschiebung des Zytokinmusters hat großen Einfluss auf den Ausgang einer Immunantwort. Th2-Zellen induzieren über die Bildung von Antikörpern humorale Antworten. Die Aktivierung von Th1-Zellen hat dagegen die Eliminierung intrazellulärer Pathogene zur Folge, da zytotoxische Abwehrmechanismen induziert werden. Verminderte Th1-Reaktionen könnten daher eine erhöhte Infektneigung oder auch eine Tumoranfälligkeit zur Folge haben. Demnach wäre die tendenziell verminderte Th1-Reaktion varianter „memory“ T-Zellen eine mögliche Erklärung für die erhöhte Frequenz der 77C→G Mutation bei viralen Infektionen wie HIV. In diesem Zusammenhang ist auch zu diskutieren, ob die durch die 77C→G Mutation erhöhte Anfälligkeit für Infektionen das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen erhöhen könnte. Die genauen Faktoren, die den Autoimmunprozess auslösen, sind meist nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass bestimmte Infektionen z.B. durch Veränderung der Antigenität des infizierten Gewebes bei genetisch empfänglichen Individuen Autoimmunprozesse auslösen können. Durch eine Infektion können Gene, die normalerweise nicht transkribiert werden, „angeschaltet“ werden oder normale Genprodukte werden durch eine Änderung der postranskriptionellen Prozessierung als Autoantigen wirksam. Nach der Hypothese der „molekularen Mimikry“ kann es auch zur Kreuzreaktion von T- und B-Zellen zwischen infektiösem Erreger und Autoantigen kommen. Bei multipler Sklerose gibt es z.B. T-Zellen, die sowohl mit einem Peptid des Autoantigens MBP als auch mit einem Peptid des Epstein-Barr Virus, des Influenzavirus und des humanen Papillomavirus reagieren können (Wucherpfennig, Hafler et al. 1995). Daher ist es vorstellbar, dass die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen auch ein weiterer Risikofaktor für Entwicklung von Autoimmunprozessen darstellen könnte.

Untersuchungen bei Personen mit einem anderen Polymorphismus des CD45 Gens (139A→G im Exon C) unterstützten die Hypothese, dass CD45-Polymorphismen, die die Kombination von CD45-Isoformen verändern, eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen spielen könnten. Im Gegensatz zu der 77C→G Mutation schien das 139A→G Allel jedoch einen protektiven Effekt für die betroffenen Mutationsträger zu bieten, da die Frequenz der Personen, die bezüglich der 138A→G Mutation heterozygot waren, in den Patientengruppen mit Morbus Basedow und Hepatitis B-Infektion reduziert war und homozygote Träger mit derselben Mutation

bei Patientengruppen mit Hashimoto Thyreoiditis sogar gar nicht zu finden waren. Genvarianten können das Krankheitsrisiko nicht nur mit unterschiedlicher Auswirkung beeinflussen, sondern auch auf verschiedenen Ebenen. Die CD45-Genvarianten (sowohl das 77C→G als auch 138A→G Allel) gehören zu der Kategorie von Genen, die das gesamte Reaktionsspektrum des Immunsystems beeinflussen und damit die Suszeptibilität für viele verschiedene Typen von Autoimmunerkrankungen und andere Krankheiten bei betroffenen Personen modifizieren können (Marrack, Kappler et al. 2001).

Obwohl die 77C→G Mutation wahrscheinlich die Suszeptibilität für einige Krankheiten erhöht, ist das variante Allel offensichtlich nicht der Hauptrisikofaktor, da die Mehrzahl der Patienten, die unter multipler Sklerose, systemischer Sklerose und autoimmuner Hepatitis leiden, das gesunde Allel tragen. Es ist daher wahrscheinlich, dass erst im Kontext bestimmter genetischer und vielleicht auch umweltbedingter Faktoren die 77C→G Mutation einen Risikofaktor für gewisse Krankheiten darstellt. Die Art und Weise, wie verschiedene Suszeptibilitätsgene interagieren und somit einen bestimmten Krankheitsphänotyp erzeugen, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Nach dem epistatischen Modell der Geninteraktion werden polygene Krankheiten durch die Kombination von verschiedenen Suszeptibilitätsgenen verursacht, wobei keines der einzelnen Gene absolut notwendig ist (Vyse and Todd 1996). Andererseits können nach dem „Modifier“-Konzept Suszeptibilitätsgene die Effekte anderer Gene beeinflussen. Dabei spielen ein oder mehrere Suszeptibilitätsgene in der Entstehung der Krankheit und im Krankheitsprozess eine zentrale Rolle, während andere Suszeptibilitätsgene einen Einfluss auf die Inzidenz, die Manifestation und den Phänotyp der Krankheit haben (Nadeau 2001). Das Vorkommen der 77C→G Mutation bei gesunden Personen und ihre Assoziation mit verschiedenen Krankheiten weisen darauf hin, dass es sich bei dem 77C→G Allel um einen „Modifier“ handelt. Ein modifizierender Effekt der 77C→G Mutation wurde bisher bei multipler Sklerose jedoch nicht beobachtet. Bei der Analyse der klinischen Verläufe von neun varianten MS-Patienten wurden keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der 77C→G Mutation mit der Schwere der Krankheit gefunden. Obwohl die Hyperreaktivität zu einer erhöhten Suszeptibilität für gewisse Krankheiten führen kann, muss die Frage noch geklärt werden, welche Rolle sie in der Progression und Inzidenz einer Krankheit spielt.

Die Tatsache, dass die Mutation auch bei gesunden Probanden gefunden wird, weist darauf hin, dass die Hyperreaktivität nicht zwangsläufig zu Autoimmunerkrankungen führen muss. Die 77C→G Mutation könnte damit als Teil eines genetischen Hintergrunds angesehen werden, der das Risiko für die Entwicklung von bestimmten Krankheiten erhöhen kann. Die detaillierten Erkenntnisse über die funktionellen Konsequenzen der 77C→G Mutation sind ein wichtiger Schritt zur Identifikation von weiteren Genvarianten, die in Kombination mit 77C→G agieren und dadurch zur Entstehung von multigenetischen Erkrankungen beitragen können.

## 5 Zusammenfassung

Die Tyrosinphosphatase CD45 spielt eine Schlüsselrolle bei der T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelten Signaltransduktion. Die 77C→G Mutation im Exon A des CD45-Gens kommt mit geringer Frequenz in der gesunden Bevölkerung vor (1 bis 2% heterozygote Merkmalsträger). Personen mit der 77C→G Mutation wurden überproportional häufig in Kollektiven von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen (multiple Sklerose (MS), Sklerodermie und autoimmune Hepatitis) gefunden, so dass die Frage, wie die Mutation zum Risikofaktor für Erkrankungen werden kann, derzeit intensiv diskutiert wird. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Hyperreaktivität von 77C→G T-Zellen leistet einen Beitrag hierzu. Die 77C→G Mutation führt zu einer aberranten Expression von CD45RA-Isoformen auf Zellen, die normalerweise CD45RA-negativ sind (z.B. aktivierte oder „memory“ T-Zellen). Die hier vorgelegte Darstellung der funktionellen Besonderheiten von 77C→G T-Zellen ermöglicht daher auch eine weitergehende Einschätzung zur Bedeutung einzelner CD45-Isoformen im Signaltransduktionsgeschehen. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

„Memory“ T-Zellen und *in vitro* aktivierte T-Zellen von gesunden Personen mit 77C→G Mutation reagierten im Vergleich zu CD45-Wildtyp-Kontrollzellen mit verstärkter Proliferation und IL-2-Synthese auf die Stimulation durch TZR/CD3 mAk oder Alloantigen. T-Zellen von MS-Patienten mit 77C→G reagierten ebenfalls stärker auf die TZR/CD3-vermittelte Aktivierung als Zellen von Patienten mit Wildtyp-CD45. Im Vergleich zu T-Zellen von Kontrollpersonen zeigten T-Zellen von Personen mit 77C→G Mutation eine verstärkte Phosphorylierung der Zap-70 Kinase und der TZR- $\zeta$ -Kette sowie eine verstärkte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nach TZR/CD3-vermittelter Stimulation. Bei 77C→G T-Zellen wurden eine verminderte Phosphorylierung des inhibitorischen Tyr505 der Kinase p56<sup>lck</sup> und damit einhergehend eine erhöhte Kinase-Aktivität dieses Enzyms beobachtet. Da die Dephosphorylierung von Tyr505 durch CD45 erfolgt, weisen beide Beobachtungen auf eine erhöhte CD45-Phosphatase-Aktivität von 77C→G T-Zellen hin. Bei der IL-2-vermittelten Signaltransduktion wurden keine signifikanten Auswirkungen der 77C→G Mutation gefunden.

Aus diesen Ergebnissen wird der Schluss gezogen, dass die aberrante Expression von CD45RA-Molekülen auf aktivierten und „memory“ T-Zellen von Personen mit der 77C→G Mutation die Effizienz der TZR-vermittelten Signaltransduktion verstärkt. Durch die damit verbundene erhöhte T-Zellreaktivität könnte 77C→G zu den Risikofaktoren gehören, die die Suszeptibilität der betroffenen Personen für bestimmte Autoimmunerkrankungen steigern.

## 7. Literatur

**Amano**, M., M. Galvan, et al. (2002). "The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1 induced CD45 clustering, phosphatase modulation and T cell death." *J Biol Chem*.

**Ballerini**, C., E. Rosati, et al. (2002). "Protein tyrosine phosphatase receptor-type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population." *Neurosci Lett* 328(3): 325-7.

**Barcellos**, L. F., S. Caillier, et al. (2001). "PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients." *Nat Genet* 29(1): 23-4.

**Berger**, S. A., T. W. Mak, et al. (1994). "Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells." *J Exp Med* 180(2): 471-6.

**Bilwes**, A. M., J. den Hertog, et al. (1996). "Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization." *Nature* 382: 555-558.

**Blasini**, A. M., I. L. Stekman, et al. (1994). "T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus show increased response to interleukin-2 after costimulation with OKT3 monoclonal antibody and phorbol esters." *Clin Immunol Immunopathol* 70(1): 66-72.

**Boxall**, S., J. McCormick, et al. (2004). "Abnormal cell surface antigen expression in individuals with variant CD45 splicing and histiocytosis." *Pediatr Res* 55(3): 478-84.

**Byth**, K. F., L. A. Conroy, et al. (1996). "CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, and in B cell maturation." *J. Exp. Med.* 183: 1707-1718.

**Cahir McFarland**, E. D., T. R. Hurley, et al. (1993). "Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1402-6.

**Chun**, T. W., K. Chadwick, et al. (1997). "Differential susceptibility of naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI." *J Virol* 71(6): 4436-44.

**Cooper**, J. A. and A. MacAuley (1988). "Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12): 4232-6.

**Desai**, D. M., J. Sap, et al. (1993). "Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase." *Cell* 73: 541-554.

- Do, H. T.** (2002). „Untersuchungen zur T-Zellaktivierung und zum T-Zellrepertoire bei Personen mit einem varianten Expressionsmuster der Proteintyrosinphosphatase-Isoform CD45RA“ *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hannover*
- Dornan, S., Z. Sebestyen, et al.** (2002). "Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction." *J Biol Chem* 277(3): 1912-8.
- D'Oro, U. and J. D. Ashwell** (1999). "Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes." *J Immunol* 162(4): 1879-83.
- D'Oro, U., K. Sakaguchi, et al.** (1996). "Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity." *Mol Cell Biol* 16(9): 4996-5003.
- Eck, M. J., S. K. Atwell, et al.** (1994). "Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck." *Nature* 368(6473): 764-9.
- Edmonds, S. D. and H. L. Ostergaard** (2002). "Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes." *J Immunol* 169(9): 5036-42.
- Farber, D. L., O. Acuto, et al.** (1997). "Differential T cell receptor-mediated signaling in naive and memory CD4 T cells." *Eur J Immunol* 27(8): 2094-101.
- Fujii, Y., M. Okumura, et al.** (1992). "CD45 isoform expression during T cell development in the thymus." *Eur J Immunol* 22(7): 1843-50.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon** (1991). "Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate." *J Biol Chem* 266(26): 17026-30.
- Gupta, N. and A. L. DeFranco** (2003). "Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation." *Mol Biol Cell* 14(2): 432-44.
- Hafler, D. A. and H. L. Weiner** (1995). "Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis." *Immunol Rev* 144: 75-107.
- Hall, S. R., B. M. Heffernan, et al.** (1999). "CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T cells differ in their TCR-associated signaling responses." *Eur. J. Immunol.* 29: 2098-2106.
- Harder, T.** (2001). "Raft membrane domains and immunoreceptor functions." *Adv Immunol* 77: 45-92.
- Hermiston, M. L., Z. Xu, et al.** (2003). "CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells." *Annu Rev Immunol* 21: 107-37.
- Hsieh, C. S., A. B. Heimberger, et al.** (1992). "Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6065-9.

- Hurley**, T. R., R. Hyman, et al. (1993). "Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases." *Mol Cell Biol* 13(3): 1651-6.
- Irie-Sasaki**, J., T. Sasaki, et al. (2001). "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling." *Nature* 409(6818): 349-54.
- Irie-Sasaki**, J., T. Sasaki, et al. (2003). "CD45 regulated signaling pathways." *Curr Top Med Chem* 3(7): 783-96.
- Irles**, C., A. Symons, et al. (2002). "CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling." *Nat Immunol* 4(2): 189-97.
- Jacobsen**, M., D. Schweer, et al. (2000). "A point mutation in PTPRC (CD45) is associated with the development of multiple sclerosis." *Nature Gen* 26: 495-499.
- Jacobsen**, M., S. Hoffmann, et al. (2002). "A novel mutation in PTPRC interferes with splicing and alters the structure of the human CD45 molecule." *Immunogenetics* 54(3): 158-63.
- Jiang**, G., J. den Hertog, et al. (1999). "Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-a." *Nature* 401: 606-610.
- Katagiri**, T., M. Ogimoto, et al. (1995). "Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells." *J Biol Chem* 270(47): 27987-90.
- Kishihara**, K., P. J., et al. (1993). "Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice." *Cell* 74: 143-156.
- Koretzky**, G. A., J. Picus, et al. (1990). "Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway." *Nature* 346: 66-68.
- Kornfeld**, J.-W. (2003). „Untersuchungen zur Glykosylierung und Membranverteilung von variant experimentierten Molekülen der Protein-Tyrosinphosphatase-Isoform CD45RA.“ *Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hannover*
- Kozieradzki**, I., T. Kündig, et al. (1997). "T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45." *J. Immunol.* 158: 3130-3139.
- Kung**, C., J. T. Pingel, et al. (2000). "Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease." *Nature Med.* 6: 343-345.
- Laemmli**, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Leupin**, O., R. Zaru, et al. (2000). "Exclusion of CD45 from T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes." *Current Biology* 10: 277-280.

- Liao, H. X., D. C. Montefiori, et al. (2000).** "Linkage of the CCR5 Delta 32 mutation with a functional polymorphism of CD45RA." *J Immunol* 165(1): 148-57.
- Lynch, K. W. and A. Weiss (2001).** "CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer." *J Biol Chem* 276(26): 24341-7.
- Maggi, E., D. Macchia, et al. (1991).** "The IgE response in atopy and infections." *Clin Exp Allergy* 21 Suppl 1: 72-8.
- Majeti, R., A. M. Bilwes, et al. (1998).** "Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge." *Science* 279: 88-91.
- Majeti, R., Z. Xu, et al. (2000).** "An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity." *Cell* 103: 1059-1070.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (2001).** "Autoimmune disease: why and where it occurs." *Nat Med* 7(8): 899-905.
- Murray, J. S., C. Pfeiffer, et al. (1992).** "Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype." *Eur J Immunol* 22(2): 559-65.
- Mustelin, T., T. Pessa-Morikawa, et al. (1992).** "Regulation of the p59fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase." *Eur. J. Immunol.* 22: 1173-1178.
- Nadeau, J. H. (2001).** "Modifier genes in mice and humans." *Nat. Rev. Genet.* 2: 165-174.
- Nguyen, J. T., D. P. Evans, et al. (2001).** "CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans." *J Immunol* 167(10): 5697-707.
- Ogilvy, S., C. Louis-Dit-Sully, et al. (2003).** "Either of the CD45RB and CD45RO isoforms are effective in restoring T cell, but not B cell, development and function in CD45-null mice." *J Immunol* 171(4): 1792-800.
- Ogimoto, M., T. Katagiri, et al. (1995).** "Antigen receptor-initiated growth inhibition is blocked in CD45-loss variants of mature B lymphoma, with limited effects on apoptosis." *Eur. J. Immunol.* 25: 2265-2271.
- Ogimoto, M., Y. Arimura, et al. (2001).** "Opposing regulation of B cell receptor-induced activation of mitogen-activated protein kinases by CD45." *FEBS Lett* 490(1-2): 97-101.
- Ostergaard, H. L., D. A. Shackelford, et al. (1989).** "Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8959-8963.

- Parolini, I., M. Sargiacomo, et al. (1996).** "Signal transduction and glycosphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes." *Blood* 87(9): 3783-94.
- Penninger, J. M., J. Irie-Sasaki, et al. (2001).** "CD45: new jobs for an old acquaintance." *Nature Immunol.* 2: 389-396.
- Pfeiffer, C., J. Murray, et al. (1991).** "Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo-response to human collagen IV." *Immunol Rev* 123: 65-84.
- Roach, T., S. Slater, et al. (1997).** "CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion." *Curr Biol* 7(6): 408-17.
- Rodgers, W. and J. K. Rose (1996).** "Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains." *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1515-23.
- Rothstein, D. M., H. Saito, et al. (1992).** "The alternative splicing of the CD45 tyrosine phosphatase is controlled by negative regulatory trans-acting splicing factors." *J. Biol. Chem.* 267: 7139-7147.
- Sher, A. and R. L. Coffman (1992).** "Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines." *Annu Rev Immunol* 10: 385-409.
- Schwinger, R. and K. Wonigeit (1990).** "Genetically determined lack of CD45R- T cells in healthy individuals. Evidence for a regulatory polymorphism of CD45R antigen expression." *J. Exp. Med.* 171: 1803-1808.
- Schwinger, R., B. Schraven, et al. (1992).** "Phenotypical and biochemical characterization of a variant CD45R expression pattern in human leukocytes." *Eur J Immunol* 22(4): 1095-8.
- Schwinger, R., T. Witte, et al. (2003).** "Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis." *Genes Immun* 4(2): 168-9.
- Sgroi, D., A. Varki, et al. (1993).** "CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin." *J. Biol. Chem.* 268: 7011-7018.
- Simons, K. and D. Toomre (2000).** "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-9.
- Stamenkovic, I., D. Sgroi, et al. (1991).** "The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45R0 on T cells and  $\alpha$ 2-6 Sialyltransferase, CD75, on B cells." *Cell* 66: 1133-1144.
- Stanton, T., S. Boxall, et al. (2003).** "A high-frequency polymorphism in exon 6 of the CD45 tyrosine phosphatase gene (PTPRC) resulting in altered isoform expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5997-6002.

- Stanton, T., S. Boxall, et al. (2004).** "CD45 variant alleles: possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans." *Immunogenetics* 56(2): 107-10.
- Stone, J. D., L. A. Conroy, et al. (1997).** "Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70." *J Immunol* 158(12): 5773-82.
- Streuli, M., N. X. Krueger, et al. (1990).** "Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR." *Embo J* 9(8): 2399-407.
- Symons, A., D. N. Cooper, et al. (2000).** "Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1." *Glycobiology* 10(6): 559-63.
- Takeda, A., J. J. Wu, et al. (1992).** "Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein." *J. Biol. Chem.* 267: 16651-16659.
- Takeda, A., A. Matsuda, et al. (2004).** "CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity." *Blood* 103(9): 3440-7.
- Takeuchi, T., M. Pang, et al. (1997).** "Reduced protein tyrosine phosphatase (PTPase) activity of CD45 on peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)." *Clin Exp Immunol* 109(1): 20-6.
- Tchilian, E. Z., D. L. Wallace, et al. (2001).** "A point mutation in CD45 may be associated with an enhanced risk of HIV-1 infection." *AIDS* 15: 1892-1894.
- Tchilian, E. Z., R. Dawes, et al. (2002).** "A CD45 polymorphism associated with abnormal splicing is absent in African populations." *Immunogenetics* 53(10-11): 980-3.
- Tchilian, E. Z., R. Dawes, et al. (2004).** "Altered CD45 isoform expression affects lymphocyte function in CD45 Tg mice." *Int Immunol* 16(9): 1323-32.
- Thomas, M. L. and L. Lefrancois (1988).** "Differential expression of the leukocyte-common antigen family." *Immunol. Today* 9: 320-326.
- Thude, H., J. Hundrieser, et al. (1995).** "A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A." *Eur J Immunol* 25(7): 2101-6.
- Tonks, N. K., H. Charbonneau, et al. (1988).** "Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase." *Biochemistry* 27: 8695-8701.
- Trowbridge, I. S. and M. L. Thomas (1994).** "CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development." *Annu. Rev. Immunol.* 12: 85-116. 7.

- Vassilopoulos, D., B. Kovacs, et al. (1995).** "TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus." *J Immunol* 155(4): 2269-81.
- Vogel, A., C. P. Strassburg, et al. (2003).** "77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link." *Genes Immun* 4(1): 79-81.
- Vorechovsky, I., J. Kralovicova, et al. (2001).** "Does 77C-->G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus?" *Nat Genet* 29(1): 22-3.
- Vyse, T. J. and J. A. Todd (1996).** "Genetic analysis of autoimmune disease." *Cell* 85: 311-318.
- Wekerle, H., M. Bradl, et al. (1996).** "The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus." *Immunol Rev* 149: 231-43.
- Wucherpfennig, K. W., D. A. Hafler, et al. (1995).** "Structure of human T-cell receptors specific for an immunodominant myelin basic protein peptide: positioning of T-cell receptors on HLA-DR2/peptide complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8896-900.
- Xu, Z. and A. Weiss (2002).** "Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms." *Nat Immunol* 3: 764-771.
- Zapata, J. M., R. Pulido, et al. (1994).** "Human CD45RC specificity. A novel marker for T cells at different maturation and activation stages." *J. Immunol.* 152: 3852-3861.
- Zilch, C. F., A. M. Walker, et al. (1998).** "A point mutation within the CD45 exon A is the cause of variant CD45RA splicing in humans." *Eur. J. Immunol.* 28: 22-29.

## Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

### Publikationen

DO, H.-T., BORNS, K., BAARS, W., SCHWINZER R.  
Functional significance of the 77C→G polymorphism in the human CD45 gene: Enhanced T cell reactivity by variantly expressed CD45RA isoforms. *Transplant. Proc.*: in Druck

DO, H.-T., BAARS, W., BORNS, K., WINDHAGEN, A., SCHWINZER, R.  
The 77C→G mutation in the human CD45 (PTPRC) gene leads to T cell hyperreactivity in healthy individuals and patients with multiple sclerosis. Zur Publikation eingereicht

### Publizierte Abstracts

DO, H.-T., BAARS, W., SCHWINZER R.  
T cells from individuals carrying the C77G mutation in CD45 exon A show particular activation requirements and alterations in the T cell receptor repertoire.  
*Immunobiol.* **206**:93  
33. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Marburg, 25.-28. September 2002

DO, H.-T., BAARS, W., SCHWINZER R.  
Enhanced T cell receptor-mediated signal transduction in individuals carrying the C77G mutation in CD45 exon A.  
*Immunobiol.* **208**:8,  
34. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 23.-26. September 2003

DO, H.-T., KORNFELD, J.-W., SCHWINZER R.  
Enhanced galectin-1-induced apoptosis in activated T cells from individuals carrying the C77G mutation in CD45 exon A.  
*Immunobiol.* **209**:447-448, Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, Niederlande, 20-23. Oktober 2004

**Vorträge/Poster-  
präsentationen**

DO, H.-T, BORNS, K., BAARS, W., SCHWINZER R.  
Functional significance of the 77C→G polymorphism in  
the human CD45 gene: Enhanced T cell reactivity by  
variantly expressed CD45RA isoforms.

2. Treffen des Arbeitskreises

Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft  
für Immunologie, Berlin, 26-27. März 2004 (Vortrag)

DO, H.-T, BORNS, K., BAARS, W., SCHWINZER R.  
Functional significance of the 77C→G polymorphism in  
the human CD45 gene: Enhanced T cell reactivity by  
variantly expressed CD45RA isoforms.

XX International Congress of the Transplantation Society,  
Wien, Österreich, 5-10. September 2004 (Vortrag)

DO, H.-T., KORNFELD, J.-W., SCHWINZER R.  
Enhanced galectin-1-induced apoptosis in activated T  
cells from individuals carrying the C77G mutation in  
CD45 exon A.

Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies  
for Immunology (JAMI), Maastricht, Niederlande, 20-23.  
Oktober 2004 (Poster)

## Lebenslauf

<b>Name</b>	Hornig-Do, geb. Do
<b>Vorname</b>	Hue-Tran
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Geburtstag</b>	07.10.1976
<b>Geburtsort</b>	Saigon, Vietnam
<b>Familienstand</b>	verheiratet seit 16.09.2004
<b>Ehemann</b>	Benjamin Hornig, Diplom-Ingenieur, Zeitsoldat
<b>Eltern</b>	Huy Do, Schuldirektor Su-Nu Dang, Hausfrau
<b>Schule</b>	
Februar 1985	Vorbereitungsklasse für vietnamesische Schüler,
1985-1987	Grundschule Norddeich, Norden II
1988-1989	Grundschule Am Sonnenbrink in Stadthagen
1990-1996	Orientierungsstufe II Stadthagen Ratsgymnasium Stadthagen mit der Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
<b>Studium</b>	
Oktober 1996 bis März 2002	Studium der Biologie an der Universität Hannover
August 1999 bis August 2000	Auslandstudium in der Volksrepublik China an der „Nanjing Normal University“ und an der „Hong Kong University of Science and Technology“
März 2002	Abschluss Diplom Biologin
<b>Dissertation</b>	
seit dem 15.04.2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Transplantationslabor der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover im Rahmen eines Projektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft mit dem Ziel der Promotion zum Dr. rer. nat.

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer danke ich ganz herzlich für die intensive theoretische und experimentelle Betreuung dieser Arbeit, die er mit hilfreichen Denkanstößen motivierend unterstützt hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft hat das Gelingen dieser Arbeit wesentlich gefördert. Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referats. Des weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Wonigeit für die Bereitstellung des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in dem von ihm geleiteten Transplantationslabor danken. Ganz besonders herzlich möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schwinzer danken: Katja Borns und Wiebke Baars haben mich stets bei der praktischen Arbeit unterstützt, Tanja Bedke mit vielen hilfreichen Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Probleme. Danke, dass Ihr mich begleitet habt. Außerdem gilt meinem Dank Herrn Dr. J. Hundrieser. Seine Diskussionsbereitschaft und Hilfsbereitschaft haben ganz besonders zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Transplantationslabors möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein größter Dank gebührt meinem Mann Benjamin Hornig für die intensive Unterstützung während dieser Zeit: Danke für das viele gespendete Blut, Deine Geduld und Dein Verständnis!

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt: Schw437/2) gefördert.