

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Carsten Berges
aus Mainz

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Effekte und Mechanismen nach Inhibition des 26S Proteasoms in humanen dendritischen Zellen und T-Zellen

Gutachter:

Prof. Dr. Günter J. Hämmerling

(Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg)

Prof. Dr. Dr. h.c. Volker Daniel

(Institut für Immunologie, Heidelberg)

Zusammenfassung

Das Proteasom stellt die zentrale proteolytische Maschinerie des hoch konservierten Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) dar. Dieses System ist für die Regulation und Aufrechterhaltung von wesentlichen zellulären Prozessen, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus, Gentranskription und Apoptose erforderlich. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die spezifischen Proteasom-Inhibitoren Bortezomib, Lactacystin und Epoxomicin essentielle Immunfunktionen von aus Monozytengenerierten humanen DCs und von durch allogene DCs aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen supprimieren. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der Apoptose-Induktion in aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch den Proteasom-Inhibitor Bortezomib aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der proteolytischen Aktivität des 26S Proteasoms in humanen unreifen DCs (iDCs) und reifen DCs (mDCs) die Expression wichtiger Zelloberflächenrezeptoren von DCs supprimiert, Apoptose induziert und die Maturation von DCs inhibiert. Dieses wurde anhand der verringerten Expression des Reifungsmarkers CD83 und der Inhibition der nukleären Translokation von RelA und RelB, beides Transkriptionsfaktoren der *nuclear factor-κB* (NF-κB)-Familie, demonstriert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Proteasom-Inhibition die Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose von Antigenen einschränkt und die Synthese von Interleukin (IL)-12p70 und IL-12p40 inhibiert. Als funktionelle Konsequenz zeigten mDCs, welche eine Proteasom-Inhibition überlebten, eine deutlich supprimierte Kapazität, allogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und autologe CD4⁺T-Zellen zu stimulieren.

Ferner konnte diese Arbeit demonstrieren, dass eine Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen Apoptose induziert. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen, die die Proteasom-Inhibition überlebten, zeigten eine Inhibition der Proliferation durch die Induktion eines Zellzyklus-Arrests in der G₁-Phase. Dieses ging einher mit der Akkumulation des Tumor Suppressor-Proteins p53, der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} und einer verminderten Expression von Cyclin A, Cyclin D2 und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), Proteinen, welche bekanntermaßen die Transition des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase steuern. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen nach Proteasom-Inhibition eine verringerte Expression der mit einer Aktivierung assoziierten Zelloberflächenrezeptoren CD25, CD27, CD28, CD120b und CD134, sowie eine verringerte Produktion der Zytokine Interferon-γ (IFN-γ), Tumor

Nekrose Faktor- α (TNF- α), IL-2, IL-4 und IL-5 aufweisen. Die Expression von Cyclinen, CD25, CD40L, CD95L, CTLA-4, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α , Bcl-2, Bcl-XL, IAPs und c-FLIP wird offenbar durch die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und NF- κ B vermittelt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Proteasom-Inhibition die Aktivierung und nukleäre Translokation von NFATc2 und die proteasomale Degradation des *Inhibitor of κ B- α* (I κ B- α) Proteins in aktivierten CD4⁺ T-Zellen inhibiert.

Die Proteasom-Inhibition aktivierte den mitochondrialen Apoptoseweg in aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Dieses erfolgte über eine Störung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptischen Proteinen an der äußeren mitochondrialen Membran. Insbesondere induzierte die Proteasom-Inhibition eine mitochondriale Akkumulation der pro-apoptischen *BH3-only* Proteine PUMA, Noxa, Bim und p53. Dieser Vorgang induzierte die mitochondriale Translokation von aktivierten pro-apoptischen Bax-/Bak-Homodimeren. Im Gegensatz hierzu zeigte ausschließlich Mcl-1 eine mitochondriale Akkumulation der untersuchten anti-apoptischen *Bcl-2-like* Proteine. Aktivierte *Bax-like* Proteine induzierten eine rasche Freisetzung der intramitochondrialen pro-apoptischen Proteine Smac/DIABLO und HtrA2 ins Zytoplasma, wogegen die zytoplasmatische Translokation von Cytochrom *c* und AIF erst später eintrat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Smac/DIABLO und HtrA2 die IAP-vermittelte Inhibition der moderat proteolytisch-aktiven Caspasen eliminierten. Anhand der Präzipitation proteolytisch-aktiver Caspase-Untereinheiten konnte eine Zunahme der Caspase-3-Aktivität vor einer Caspase-9-Aktivitäts-Steigerung demonstriert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Caspase-3 im Verlauf einer Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen den intrinsischen Apoptoseweg initiiert. Caspase-9 fungiert dagegen nur als Apoptose-Verstärker.

Insgesamt demonstriert die vorliegende Arbeit, dass die proteasomale Aktivität für essentielle Funktionen von humanen DCs und aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen benötigt wird und als ein molekulares Ziel für eine Suppression von dysregulierten und unerwünschten Immunantworten definiert werden kann.

Summary

The proteasome constitutes the central proteolytic machinery of the highly conserved ubiquitin-proteasome-system (UPS), required for the maintenance and regulation of basic cellular processes, including differentiation, proliferation, cell cycling, gene transcription and apoptosis. The present thesis aimed to investigate the ability of the specific proteasome inhibitors bortezomib, lactacystin and Epoxomicin to suppress essential immune functions of human monocyte-derived DCs and activated CD4⁺ T cells. In addition, the mechanisms of apoptosis induction of activated CD4⁺ T cells by the proteasome inhibitor bortezomib were elucidated. Inhibition of proteolytic activity of 26S proteasome in human immature DCs (iDCs) and mature DCs (mDCs) suppresses the expression of important cell surface receptors of human iDCs and mDCs. Moreover, proteasome inhibition induces apoptosis and impairs maturation of DCs as shown by decreased cell-surface expression of CD83 and lack of nuclear translocation of RelA and RelB, both transcription factors of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) family. Inhibition of proteasome inhibits macropinocytosis and receptor-mediated endocytosis of antigens in iDCs, and suppresses the synthesis of interleukin (IL)-12p70 and IL-12p40. As a functional consequence, the capacity of mDCs surviving proteasome inhibition is dramatically suppressed with respect to the stimulation of allogeneic CD4⁺ and CD8⁺ T cells and autologous CD4⁺ T cells.

Moreover the present thesis demonstrates that proteasome inhibition induces apoptosis in activated CD4⁺ T cells. Activated CD4⁺ T cells surviving proteasome inhibition undergo inhibition of proliferation as a result of induction of G₁ phase cell cycle arrest, which is accompanied by the accumulation of tumor suppressor protein p53, cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{WAF1/CIP1} and p27^{Kip1} and the disappearance of cyclin A, cyclin D2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), proteins known to regulate G₁ to S phase cell-cycle transitions. Expression of the activation-associated cell surface receptors CD25, CD27, CD28, CD120b and CD134, as well as production of interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-2, IL-4, and IL-5 is suppressed in response to proteasome inhibition in CD4⁺ T cells activated by DCs. Expression of cyclins, CD25, CD40L, CD95L, CTLA-4, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α , Bcl-2, Bcl-XL, IAPs, and c-FLIP is known to be mediated by the transcriptional activity of nuclear factor of activated T cells (NFAT) and NF- κ B. The present thesis demonstrates that proteasome inhibition suppresses activation and nuclear translocation of NFATc2 and causes accumulation of Inhibitor of κ B- α (I κ B- α) in activated CD4⁺ T cells.

Proteasome inhibition activates the mitochondrial pathway of apoptosis in activated CD4⁺ T cells by disrupting the equilibrium of pro- and antiapoptotic proteins at the outer mitochondrial membrane. In particular, proteasome inhibition provokes mitochondrial accumulation of the proapoptotic BH3-only proteins PUMA, Noxa, Bim, and p53. This event induces mitochondrial translocation of activated proapoptotic Bax/Bak homodimers. In contrast, of all investigated antiapoptotic Bcl-2-like proteins only Mcl-1 shows similar mitochondrial accumulation. Activated Bax-like proteins induce rapid release of intramitochondrially located proapoptotic Smac/DIABLO and HtrA2, whereas cytoplasmic translocation of cytochrome *c* and AIF is delayed. In addition, it is shown that cytoplasmic Smac/DIABLO and HtrA2 eliminate IAP-mediated inhibition of partially activated caspases. The present thesis demonstrates, on the basis of precipitation of proteolytic active caspase subunits, an increase of caspase-3 activity before caspase-9-activity is enhanced. Thus, this study suggests that caspase-3 in CD4⁺ T cells in response to proteasome inhibition initiates the intrinsic apoptosis pathway. In contrast, caspase-9 functions only as an accelerator of apoptosis.

In summary, this thesis shows that proteasomal activity is required for essential functions of human DCs and activated human CD4⁺ T cells. Thus, inhibition of proteasomal activity can be defined as a novel molecular strategy for the suppression of deregulated and unwanted immune responses.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	5
Einleitung	13
1 Dendritische Zellen (DCs)	13
1.1 Historischer Überblick.....	13
1.2 DC-Subtypen.....	14
1.3 Antigen-Aufnahme	15
1.3.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose	16
1.3.2 Makropinozytose.....	16
1.3.3 Phagozytose.....	16
1.4 Ausreifung von DCs.....	16
1.5 Prozessierung und Präsentation von Antigenen.....	18
1.6 <i>In vitro</i> DC-Differenzierung.....	18
2 T-Lymphozyten	19
2.1 <i>In vivo</i> Differenzierung von T-Zellen.....	19
2.2 T-Zell Subtypen	20
2.3 Interaktion von T-Zellen mit DCs.....	20
3 DCs und die Kontrolle des Immunsystems.....	22
4 DCs in der klinischen Anwendung	23
5 Ubiquitin-Proteasom-System	23
5.1 Historischer Überblick.....	24
5.2 Aufbau des UPS	26
5.2.1 Ubiquitinierung von Proteinen.....	26
5.2.2 Das Proteasom.....	27
5.2.2.1 Funktionen des Proteasoms	30
5.2.2.2 Störungen des UPS	31
5.2.3 Proteasom-Inhibitoren.....	32
6 Apoptose – der programmierte Zelltod	36
6.1 Caspasen.....	37

6.2	Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg	39
6.2.1	Extrinsischer (Rezeptor-vermittelter-) Apoptoseweg	39
6.2.2	Intrinsischer (mitochondrialer) Apoptoseweg.....	40
7	Fragestellung.....	44
Material und Methoden		46
1	Material.....	46
1.1	Häufig verwendete Puffer	46
1.2	Nährmedien	48
1.3	Antikörper.....	49
1.3.1	Antikörper für Durchflusszytometrie.....	49
1.3.2	Antikörper für Western Blot	50
1.4	Geräte	51
2	Methoden.....	51
2.1	Zellbiologische Methoden	51
2.1.1	Gewinnung von humanen Monozyten und T-Zellen	51
2.1.1.1	Isolation CD14 positiver Monozyten mittels Adhärenz	51
2.1.1.2	Isolation CD14 ⁺ Monozyten mittels negativer Isolation	52
2.1.1.3	Isolation von CD4 ⁻ und CD8 ⁺ T-Zellen mittels negativer Isolation	53
2.1.2	Generierung dendritischer Zellen (DC).....	54
2.1.3	Allogene und autologe T-Zell-Stimulation	55
2.2	Aktivierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	56
2.3	Proteasom-Inhibitoren	56
2.4	Durchflusszytometrie	57
2.4.1	Zelloberflächenprotein-Analyse.....	57
2.4.2	Apoptose-Analyse	57
2.4.3	Zellzyklus-Analyse	58
2.4.4	Analyse von Endozytose und Makropinozytose	59
2.5	Wright-Färbung.....	60
2.6	T-Zell Proliferationsanalyse	60
2.7	ELISA aus mDCs.....	60
2.8	ELISA, Proliferation und Oberflächenrezeptoren aus Restimulations-T-Zell-Kultur	60

3	Proteinchemische Methoden	61
3.1	Herstellung von Zelllysaten	61
3.1.1	Herstellung von Ganzzelllysaten.....	61
3.1.2	Nukleus- und Zytoplasma-Extraktion	62
3.1.3	Mitochondrien- und Zytoplasma-Extraktion.....	62
3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
3.2.1	In situ trapping von proteolytisch-aktiven Caspasen	62
3.2.2	Western Blot.....	63
3.2.2.1	Detektion gebundener Proteine	64
3.2.3	Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren durch Affinitätsmarkierung der proteolytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten	64
3.2.4	Densitometrische Analyse.....	65
3.3	Statistik.....	65
 Ergebnisse.....		66
1	Suppression essentieller Immunfunktionen von DCs durch Proteasom- Inhibition	66
1.1	Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren in mDCs	66
1.2	Einfluss der proteasomalen Aktivität auf die Expression von relevanten DC- Oberflächenrezeptoren	68
1.2.1	Funktion der untersuchten Oberflächenrezeptoren	68
1.2.1.1	Differenzierung von Monozyt zu iDC	70
1.2.1.2	Differenzierung von iDC zu mDC	71
1.2.1.3	Ausdifferenzierte mDCs	72
1.2.2	Intrazelluläre Analyse der MMR- und HLA-DR-Expression im Western Blot..	73
1.3	Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die nukleäre Translokation von RelA und RelB	74
1.4	Analyse der Apoptose-Induktion durch Bortezomib	75
1.5	Einfluss der Proteasom-Inhibition auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose .	77
1.6	IL-12 Produktion in mDCs bei Proteasom-Inhibition	78
1.7	Untersuchung der T-Zell-Aktivierungs-Eigenschaften von mDCs nach Proteasom-Inhibitor durch Bortezomib	79
2	Suppression essentieller Immunfunktionen von CD4⁺ T-Zellen durch Proteasom-Inhibition	82
2.1	Reinheit der CD4⁺ T-Zellen	82

2.2	Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren in aktivierten T-Zellen.....	83
2.3	Akkumulation mono- und polyubiquitinerter Proteine bei Proteasom-Inhibition	85
2.4	Proteasom-Inhibition supprimiert die Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	86
2.5	Proteasom-Inhibition induziert Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	87
2.6	Induktion von G-1-Arrest durch Proteasom-Inhibition bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	90
2.7	Supprimierte Expression von funktionellen T-Zell Oberflächenmolekülen durch Proteasom-Inhibition	94
2.8	Analyse von Bortezomib-inkubierten aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen.....	96
2.8.1	Proliferation.....	96
2.8.2	Zytokin-Produktion	97
2.8.3	Oberflächenproteine	99
2.9	Proteasom-Inhibition verhindert die Aktivierung von NF-κB und die Translokation von NFATc2 in den Nukleus.....	101
3	Mechanismen der Apoptose-Induktion in aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Bortezomib.....	103
3.1	Untersuchung des Spaltungszustands von Caspasen	103
3.2	Untersuchung des Spaltungszustands von Caspase-Substrat-Proteinen	106
3.3	Identifizierung aktiver Caspasen durch <i>in situ</i> trapping mittels bVAD-fmk	109
3.4	Der Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk verringert Bortezomib-vermittelte Apoptose, Proliferationsabnahme und CD25-Expressionsabnahme.....	112
3.5	Expressions-Analyse natürlicher Caspase-Inhibitoren.....	115
3.6	Untersuchung der Translokation intramitochondrialer pro-apoptotischer Proteine.....	117
3.7	Untersuchung von MOMP-induzierenden Bax-like-Proteinen bei Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	119

3.8	Untersuchung der Beteiligung von ROS-Produktion bei der Bortezomib-induzierten Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	120
3.9	Untersuchung von pro-apoptischen <i>BH3-only</i>- und anti-apoptischen <i>Bcl-2-like</i>-Proteinen bei Bortezomib-inkubierten, aktivierten CD4⁺ T-Zellen	122
	Diskussion.....	126
1	Beurteilung der Methoden.....	126
2	Dendritische Zellen	129
2.1	Effekte auf die Expression von DC-Oberflächenmolekülen.....	129
2.2	Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die nukleäre Translokation von RelA und RelB	130
2.3	Induktion von Apoptose in DCs	131
2.4	Suppression funktioneller Eigenschaften von DCs.....	131
3	CD4⁺ T-Zellen	133
3.1	Effekte auf Proliferation und Induktion von Apoptose	134
3.2	Effekt auf den Zellzyklus	134
3.3	Effekte auf die Expression von Oberflächenrezeptoren und Zytokin-Produktion.....	136
3.4	Effekte auf NFAT und IκB-α.....	137
3.5	Anti-apoptische Funktionen proteolytisch-aktiver Caspasen in aktivierten CD4⁺ T Zellen.....	139
3.6	Apoptose-Mechanismus nach Proteasom-Inhibition bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen.....	142
3.6.1	Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs	143
3.6.2	Rolle von p53 bei der mitochondrialen Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	144
3.6.3	Freisetzung pro-apoptischer mitochondrialer Proteine durch Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	145
3.6.4	Antagonisierung von IAPs durch zytoplasmatisches Smac/DIABLO nach Proteasom-Inhibition.....	148
3.6.5	Aktivierung von Caspasen durch freigesetzte pro-apoptische intramitochondriale Proteine	149

3.6.6	Spaltung von Caspase-Substraten	150
3.7	Modell der Bortezomib-vermittelten Apoptose	151
4	Klinische Relevanz	152
	Anhang.....	155
	Literatur	155
	Publikationsverzeichnis	193
	Abkürzungen.....	195
	DANKSAGUNG	199
	Erklärung	200

Einleitung

1 Dendritische Zellen (DCs)

DCs repräsentieren eine äußerst heterogene Population professionell Antigen-präsentierender Zellen, die eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem darstellen. Durch die von ihnen zahlreich exprimierten Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRR: *pathogen recognition receptors*) detektieren sie Pathogene und induzieren und regulieren durch Interaktion mit NK-, B- und T-Zellen eine angemessene Immunantwort (Banchereau und Steinman, 1998).

DCs patrouillieren im unreifen Stadium im Blutstrom in fast allen Geweben und Organen, wie Haut, Leber, Schilddrüse, Pankreas, Niere und Herz (Hart D, 1997). In Abwesenheit eines inflammatorischen Signals nehmen sie dort konstitutiv Selbst- und Fremd-Antigene auf und präsentieren diese in prozessierter Peptidform auf MHC Klasse I und II Molekülen. DCs sammeln sich im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion am Ort einer Entzündung, rekrutiert durch die von neutrophilen Granulozyten oder anderen Immunzellen des Immunsystems ausgeschütteten Zytokine (McWilliam *et al.*, 1994).

Nach Aufnahme von pathogenen und körpereigenen Antigenen migrieren sie über die afferent lymphatischen Systeme in die T-Zell Regionen der sekundär lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz, wo sie entweder eine primäre T-Zell-vermittelte Immunantwort oder aber Toleranz durch Deletion von autoreaktiven T-Zellen vermitteln (Fossum S, 1988; Randolph *et al.*, 2005; Steinman und Nussenzweig, 2002). Bisher konnten keine DCs in efferent lymphatischen Gefäßen nachgewiesen werden (Pugh *et al.*, 1983; Spry *et al.*, 1980). Deshalb geht man davon aus, dass DCs nach Übermittlung der Antigene in den Lymphknoten sterben.

1.1 Historischer Überblick

Im Jahre 1868 beschrieb der deutsche Pathologe Paul Langerhans erstmals Zellen in der Haut, die er aufgrund ihrer Morphologie mit langen verästelten, zytoplasmatischen Ausläufern fälschlicherweise als kutane Neurone einstufte. Etwa 100 Jahre später identifizierten Ralph Steinman und Zanvil Cohn (Steinman und Cohn, 1973) eine neue, morphologisch ähnliche Zellart in sekundär lymphatischen Organen von Mäusen und bezeichnete sie wegen ihrer charakteristischen Erscheinungsform als dendritische (griech. δένδρον = Baum) Zellen (DC). Erst in späteren Versuchen, in welchen man die DCs als Antigen-präsentierende Zelle (APZ) in der gemischten Leukozytenreaktion (*mixed*

leucocyte reaction, MLR) einsetzte, erkannte man die außergewöhnliche, bisher nicht gekannte immunostimulatorische Potenz der DCs (Steinman und Witmer, 1978). Jedoch konnte erst 1985 gezeigt werden, dass die sowohl nach ihrem Entdecker benannten Langerhans-Zellen (LCs), als auch die von Steinman und Cohn beschriebenen DCs zum gleichen Immunzelltypus gehören (Schuler *et al.*, 1985).

Aufgrund der geringen Zahl zirkulierender DCs (nur etwa 0,1 % der Leukozyten, Fay J, 1998) und der aufwändigen Isolationsmethode war es über Jahre hinweg schwierig, Aufschluss über die vielseitigen funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von DCs zu erlangen. Seit aber spezielle *in vitro* Methoden entwickelt wurden, um sowohl aus hämatopoetischen CD34⁺ Vorgängerzellen als auch aus peripheren CD14⁺ Blut-Monozyten DCs zu generieren, konnte die komplexe Biologie dieser Zellen entschlüsselt werden (Inaba *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1994; Romani *et al.* 1996). Die DC-Generierung aus Vorläuferzellen hat durch eine ständige Optimierung der Protokolle inzwischen eine derartige Effizienz erreicht, dass Immunotherapien mit DCs gegen Krebs, Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin bereits Anwendung finden (Tacke *et al.*, 2007; O'Neill HC, 2006; Lu and Thomson, 2002).

1.2 DC-Subtypen

Man unterscheidet DCs myeloiden und lymphoiden Ursprungs. Das Konzept der myeloiden und lymphoiden DC-Subtypen basiert auf unterschiedlichen funktionellen Charakteristika, anatomischer Lokation und Oberflächenmarker-Expression. Alle Subtypen entstammen einer gemeinsamen hämatopoetischen CD34⁺ Progenitorzelle (HPZ). Die HPZ differenziert über gemeinsame myeloide Progenitorzellen (GMP) und gemeinsame lymphoide Progenitorzellen (GLP) in die inzwischen vier bekannten humanen DC-Subtypen: Aus der myeloiden Linie stammen die monozytären DCs (MoDCs), die interstitiellen DCs (IDCs) und die LCs, wogegen die plasmazytoiden DCs (PDCs) lymphoiden Ursprungs sind. Jeder Subtyp erfüllt seine Funktion in einem anderen Gewebe: LCs wandern in die Epidermis, während IDCs eher in tieferen Hautschichten zu finden sind. Dagegen migrieren MoDCs und PDCs im Blutstrom (s. Abb. 1).

Alle DCs sind *lineage-negativ*, was bedeutet, dass sie keinen typischen Pan-Marker, wie es für T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19) oder NK-Zellen (CD16) bekannt ist, exprimieren. So beobachtet man bei allen myeloiden DCs (IDCs, MoDCs und LCs) eine Expression von CD1a, CD11c, CD33, CD80, CD86, TLR1-6 und TLR8. Zusätzlich zeigen LCs die Expression von charakteristischen Molekülen wie Lag-antigen, E-cadherin und die im Zytoplasma befindlichen, elektronenmikroskopisch sichtbaren, Birbeck-Granulae

(Valladeau *et al.*, 2000). Bei PDCs lymphoiden Ursprungs kann keine Expression von CD1a, CD11c und CD33 beobachtet werden, jedoch ist eine hohe Expression von CD123 (IL-3-Rezeptor), TLR7, TLR9, BDCA-2 und BDCA-4 vorhanden (Liu YC, 2001). Auch neigen MoDCs und PDCs im unreifen Zustand (iMoDC und iPDC), im Vergleich zu IDCs und LCs nur zu eher schwachen Expression von kostimulierenden Molekülen. Während der Differenzierung zu mDCs (MoDCs und PDCs) ändert sich dieses Expressionsmuster jedoch grundlegend.

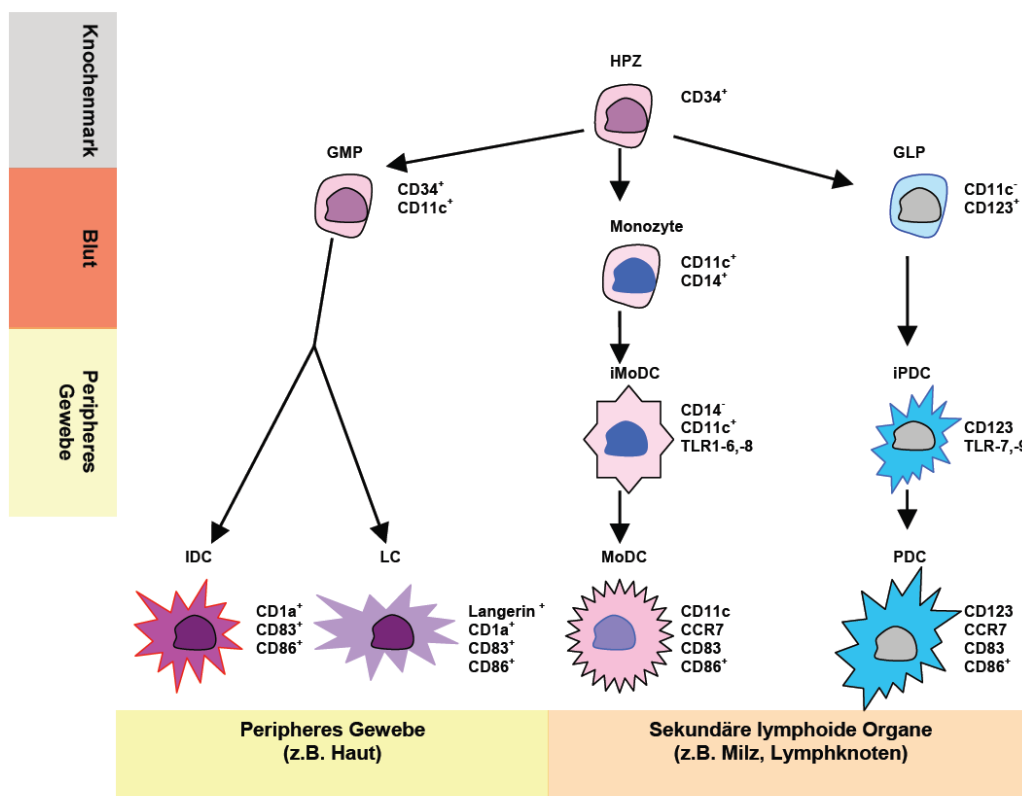


Abb. 1: Ontogenese von DCs. Die HPZ im Knochenmark differenzieren entlang myeloiden und lymphoiden Linien über verschiedene Zwischenstufen (gemeinsamer lymphoider Progenitor (GLP), gemeinsamer myeloider Progenitor (GMP) zu vier DC-Subtypen. Diese unterscheiden sich in ihrer anatomischen Lokalisation, ihrem Phänotyp und ihrer Funktion. Während IDCs und LCs in verschiedenen Bereichen der Haut lokalisiert sind, patrouillieren iMoDCs und iPDCs im peripheren Gewebe und migrieren erst nach Antigen-Aufnahme und Differenzierung zu reifen MoDCs und PDCs in sekundäre lymphoide Organe.

1.3 Antigen-Aufnahme

Die Antigen-präsentierenden und endozytotischen Eigenschaften von DCs sind stark von ihrem Differenzierungsstadium abhängig. Zur effizienten Aufnahme von Antigenen sind nur unreife DCs befähigt. Die höchste Antigen-Aufnahme weisen iDCs kurz nach Detektion des Ausreifungsstimulus auf (Trombetta *et al.*, 2003). Die Aufnahme von

Antigenen erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose, Makropinozytose (Sallusto *et al.*, 1995) und Phagozytose (Reis e Sousa C, 2006).

1.3.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose können Makromoleküle über spezialisierte Regionen, die so genannten *coated pits*, aufgenommen werden. Zu den wichtigen Endozytose-Rezeptoren, die auf iDCs exprimiert werden, gehören die Fc-Rezeptoren (FcγRI – III), die *heat shock protein* bindenden Rezeptoren und die C-Typ Lektin-Rezeptoren, wie der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR, CD206) und das *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN, CD209) (Fanger *et al.*, 1996; Arnold-Schild *et al.*, 1999; Geijtenbeek *et al.* 2000; Basu *et al.*, 2001).

1.3.2 Makropinozytose

Lösliche Antigene werden von iDCs über den energieabhängigen Mechanismus der Makropinozytose aufgenommen (Norbury *et al.*, 1997; Norbury CC, 2006). Diese Fähigkeit der Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen und der darin gelösten Substanzen über die Zellmembran geschieht bei iDCs im Gegensatz zu Makrophagen konstitutiv und wird durch die Expression der Aquaporine 3 und 7 vermittelt (de Baey und Lanzavecchia, 2000).

1.3.3 Phagozytose

Durch Phagozytose nehmen iDCs makromolekulare unlösliche Partikel wie, z. B. apoptotische oder nekrotische Zellfragmente (Albert *et al.*, 1998; Rubartelli *et al.*, 1997), Viren (Inaba *et al.*, 1993) oder Bakterien (Rescigno *et al.* 1999) auf.

Die Eigenschaft der Antigen-Aufnahme geht im Verlauf der Differenzierung zu mDCs verloren. Das ist einerseits auf die verminderte Expression der zur Antigen-Aufnahme notwendigen Rezeptoren, als auch auf die Endozytose- und Makropinozytose-Aktivität selbst zurückzuführen (Sallusto *et al.*, 1994; West *et al.*, 2000; Garrett *et al.*, 2000).

1.4 Ausreifung von DCs

Die Ausreifung von iDCs zu mDCs beinhaltet Veränderungen der funktionellen phänotypischen und strukturellen Eigenschaften. Die DCs transformieren von Antigen-aufnehmenden zu Antigen-präsentierenden Zellen (APC) mit effektiven T-Zell stimulatorischen Fähigkeiten. Diese Umwandlung ist, wie bereits beschrieben eng, an die chemotaktisch-vermittelte Migration von peripherem ins lymphatische Gewebe gebunden (Dieu *et al.*, 1998). Während iDCs die CC-Chemokin-Rezeptoren (CCR) CCR1, CCR2,

CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1 und CXCR4 exprimieren, verringern mDCs die Expression dieser Rezeptoren und zeigen hauptsächlich CCR7-Expression (Dieu *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1999). Die Bildung der typischen, namensgebenden zytoplasmatischen Ausläufer (Dendriten) wird durch drastische Modifikationen des Aktin-Zytoskeletts verursacht.

Bedingt durch die Änderung der funktionellen Eigenschaften wird die Expression von T-Zell kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86, CD40, CD54, CD58 gesteigert. Die bisher intrazellulär in Lysosomen akkumulierten MHC Klasse II Moleküle werden vermehrt auf die Zelloberfläche transportiert, so dass eine verstärkte Antigenpräsentation zu beobachten ist.

Darüber hinaus steuern mDCs die T-Zell-Antwort durch die Sekretion von Zytokinen (z.B.: IL-6, IFN- γ , TNF- α und IL-12 für MoDC, IFN- α für PDC), deren Produktion bei Kontakt mit mikrobiellen Bestandteilen und CD40 Ligand (CD40L) induziert wird (Rescigno *et al.* 1999; Schulz *et al.*, 2000; Cella *et al.*, 1996; Cella *et al.*, 1997b). Insbesondere die Interferone des Typs I und IL-12 spielen eine bedeutende Rolle in der Induktion einer T-Zell-Antwort des Typs I (Th1) (Trinchieri und Scott, 1994).

Die Induktion der Ausreifung kann durch verschiedene, so genannte Gefahrensignale (*danger signals*) ausgelöst werden (Matzinger P, 2002). DCs nehmen diese Signale, bei denen es sich meist um mikrobielle Fragmente oder um Zytokine handelt, durch verschiedene Rezeptoren wahr (Guermónprez *et al.*, 2002).

Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) umfasst bisher 10 Mitglieder (Akira S, 2003). Sie gehören zu den PRR, die Pathogene anhand von spezifischen Mustern (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) detektieren. Dabei können DCs durch die TLRs zwischen unterschiedlichen mikrobiellen Molekülen, wie bakteriellen Peptidoglykanen (TLR2), viraler doppelsträngiger (ds) DNA (TLR3), LPS von gram-negativen Bakterien (TLR4) oder unmethylierten Cytosine-phosphate Guanine-(CpG) Motiven (TLR9) differenzieren (Takeuchi O *et al.*, 1999; Kadowaki *et al.*, 2001; Michelsen *et al.*, 2001; Alexopoulou *et al.*, 2001).

Eine Ausreifung von iDCs zu mDCs kann auch auf indirektem Weg geschehen. Dabei werden Immunzellen, wie z.B. NK-Zellen oder Monozyten, nach Antigen-Kontakt zur Zytokin-Produktion stimuliert. Diese Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1, PGE₂ oder IFN- γ , induzieren über von iDCs exprimierte spezifische Rezeptoren (z.B. TNF-RI und -RII für TNF- α , IL-1R für IL-1) einen Reifungsstimulus. Auch während der Interaktion mit T-

Zellen werden durch die Bindung von CD40L, CD95L und OX40 auf der T-Zell-Oberfläche mit den von DCs exprimierten spezifischen Oberflächenrezeptoren Signalwege aktiviert, die zur Ausreifung der DCs führen (Rescigno et al, 2000; Ohshima *et al.*, 1997).

1.5 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

DCs verwenden sowohl MHC-Klasse I (MHC-I)- (Pamer und Cresswell, 1998) als auch MHC-Klasse II (MHC-II)-Moleküle (Inaba *et al.*, 1998) zur Präsentation von endogen als auch exogen aufgenommenen und prozessierten Antigenen. Somit können sie sowohl CD4⁺ als auch zytotoxische CD8⁺ T-Zell-(CTL-)vermittelte Immunantworten initiieren. Über Endosomen aufgenommene Antigene werden durch endosomale Proteasen zu Oligopeptiden degradiert und auf MHC-II-Molekülen CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Bei iDCs besitzen diese Peptid-MHC-II-Komplexe (pMHCII) auf der Zelloberfläche nur eine kurze Halbwertszeit und werden rasch internalisiert. Die Ausreifung von iDCs zu mDCs führt jedoch zu einer Verstärkung der MHC-II-Synthese und pMHCII-Translokation auf die Zelloberfläche, wo sie einige Tage für die Präsentation gegenüber CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden (Inaba *et al.*, 1997; Cella *et al.*, 1997a). Die MHC-I vermittelte Präsentation gegenüber CTL-Zellen ist generell begrenzt auf Antigene, die von endogen-synthetisierten Proteinen stammen, da in der Regel kein Zugang für exogen aufgenommene lysosomale Antigene zum Ort der Peptid-Beladung von MHC-I-Molekülen (ER) vorhanden ist. Dadurch werden nur Virus-infizierte oder entartete Zellen, wie Tumorzellen, von CTL lysiert. DCs besitzen jedoch die einzigartige Fähigkeit, auch exogen aufgenommene Antigene auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren, was als *cross-presentation* (Norbury *et al.*, 1997) bezeichnet wird und eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren (Huang *et al.*, 1994) und Viren (Sigal *et al.*, 1999) als auch bei Toleranz und Abstoßung von transplantierten Organen spielt (Heath und Carbone, 2001).

1.6 *In vitro* DC-Differenzierung

Infolge des wachsenden Interesses an DCs wurden *in vitro* Verfahren zur Generierung von DCs entwickelt. Dadurch konnten unter anderem auch Informationen über die diversen Differenzierungspfade von DCs gewonnen werden. Hauptsächlich werden DCs *in vitro* aus CD34⁺ Vorläuferzellen oder CD14⁺ Monozyten generiert. Beiden Protokollen liegt ein Zwei-Stufen-Protokoll zugrunde, nach welchem man die Vorläuferzellen zuerst in iDCs differenziert und von diesen ausgehend dann die Maturation einleitet.

Zur Differenzierung von iDCs aus Monozyten verwendet man die Zytokine GM-CSF und IL-4. Nach der klassischen Methode mit Verwendung von Serum benötigen die Monozyten eine 5-tägige Kultur bis zur Differenzierung zu iDCs (Romani *et al.*, 1994). In einem neueren schnelleren Verfahren wird serumfreies Medium verwendet, wodurch eine beschleunigte Differenzierung innerhalb von 2 Tagen erreicht wird (Faries *et al.*, 2001). Die serumfreie Version basiert auf einer Studie von Randolph *et al.* (1998), die eine spontane Differenzierung bei Monozyten durch Serum-Entzug beschrieben. Man geht davon aus, dass dieses Modellsystem einen physiologischen Differenzierungspfad zur raschen Immunantwort durch Rekrutierung von Blut-Monozyten darstellt.

Die Maturation der iDC kann bei beiden Protokollen durch verschiedene Inflammationsmediatoren innerhalb von einem (Faries *et al.*, 2001) bzw. zwei (Romani *et al.*, 1994) Tagen initiiert werden. Zu den Gebräuchlichen gehören die Zytokine TNF- α , IFN- γ , PGE₂, IL-1, IL-6, der Rezeptorantagonist CD40L und LPS.

Zur *in vitro* DC-Generierung werden die CD34⁺ Vorläuferzellen entweder aus Nabelschnurblut oder Knochenmark gewonnen. Diese Zellen differenzieren innerhalb 14-tägiger Kultur in serumhaltigem Medium in Anwesenheit von GM-CSF und TNF- α zu zwei autonomen iDC-Zwischenstufen. Während sich CD14⁺CD1a⁻ iDCs nach Fortsetzung der Kultur zu DCs mit iDC-Charakter weiterentwickeln, zeigen CD14⁺CD1a⁺ iDCs nach Beendigung der GM-CSF/TNF- α -Kultur einen LC-ähnlichen Phänotyp (Caux *et al.*, 1996).

2 T-Lymphozyten

Ein wichtiger Arm des adaptiven Immunsystems wird von T-Zellen gebildet. Man unterscheidet zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Während zytotoxische CD8⁺ T-Zellen z.B. die Aufgabe haben, Virus-infizierte oder entartete Zellen zu eliminieren, regulieren CD4⁺ T-Zellen zelluläre und humorale Immunantworten (Williams *et al.*, 1991; Mescher MF, 1995). T-Zellen spielen darüber hinaus eine prominente Rolle bei der *graft-versus-host disease* (GVHD) und der chronischen und/oder akuten Abstoßungsreaktion von allogenen Organtransplantaten (Rosenberg und Singer, 1992; Alegre *et al.*, 2007).

2.1 *In vivo* Differenzierung von T-Zellen

Alle T-Zellen stammen von CD34⁺ pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark, welche über den Blutstrom in den Thymus wandern. Bereits hier ist der lineage-spezifische T-Zell-Rezeptor (TZR, CD3) vorhanden, der durch beliebige Verknüpfungen von Genabschnitten der Keimbahngene die Grundlage der Diversität der

Antigenerkennung darstellt. Diese $CD3^+$ Zellen differenzieren über Zwischenstadien ($CD4^+CD8^-$ Doppel-Negativ (DN)) zu $CD4^+CD8^+$ Doppel-Positiv (DP)-Prä-T-Zellen. Durch die im Thymus stattfindenden folgenden Selektionsschritte, die man zusammenfassend als zentrale Toleranz bezeichnet, wird die Funktion des TZR überprüft und eine potentielle Autoimmunität gegenüber körpereigenen Proteinen verhindert (Sprent und Kishimoto, 2002). Dabei werden potentiell autoreaktive (negative Selektion) und nicht oder schwach reaktive (positive Selektion) T-Zellen deletiert (Zamoyska und Lovatt, 2004). Nach dieser Selektionsphase differenzieren die DP-T-Zellen über mehrere Übergangsstadien in entweder reife *single* positive $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen (Spits H, 2002). Diese $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nennt man auch naive T-Zellen, da sie noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten.

2.2 T-Zell Subtypen

Nach Antigen-vermittelter Aktivierung durch APZ, wie z.B. DCs, wird die Differenzierung der naiven T-Zelle ausgelöst. Dadurch entstehen unterschiedliche Subpopulationen, die man anhand ihrer Effektorfunktion unterscheidet. Bei naiven $CD4^+$ T-Zellen wird eine Differenzierung in Richtung von Th1- oder Th2-*Inducer*-, Th17-Effektor-Zellen oder regulatorische T-Zellen (Treg) induziert, die man nach ihren funktionellen Eigenschaften und ihren charakteristischen Zytokin-Profilen einteilt. Naive $CD8^+$ T-Zellen entwickeln sich nach Aktivierung entweder zu CTL- oder T-Gedächtniszellen.

Th1-*Inducer*-Zellen (Th1) produzieren Zytokine wie $IFN-\gamma$, IL-12, IL-2 und $TNF-\alpha$, die eng mit der Aktivierung der zellulären Immunantwort verknüpft sind. Im Gegensatz dazu initiieren Th2-*Inducer*-Zellen (Th2) durch die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und $TNF-\beta$ die humorale Immunantwort, indem sie B-Lymphozyten zur Proliferation und Antikörperproduktion anregen. Dementsprechend ordnet man Th1 Zellen der Abwehr von intrazellulären Pathogenen und Th2 Zellen der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen zu. Ferner bewirken die Th1 Zytokine $IFN-\gamma$ und IL-12 eine Suppression der Th2 Antwort, wohingegen Zytokine wie IL-4 und IL-10, die dem Th2-Profil entsprechen, die Th1-Immunantwort hemmen (Seder *et al.*, 1992; Mosmann *et al.*, 1989).

2.3 Interaktion von T-Zellen mit DCs

DCs besitzen unter den APCs die einzigartige Fähigkeit, eine primäre spezifische T-Zell Immunantwort auszulösen, die sich in der klonalen Expansion eines bestimmten T-Effektorzelltyps äußert. DCs induzieren die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-,

Th2-, Treg-, CTL-Zellen und T-Gedächtnis-Zellen (Reis e Sousa, 2006; Steinman *et al.*, 2003). Wie bereits beschrieben, findet die Interaktion zwischen naiver T-Zelle und DC über Zell-Zell-Kontakt in sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz) statt. Die Integrine $\beta 1$ und $\beta 2$ und die Zelloberflächenmoleküle CD2, CD50, CD54 und CD58 zählen zu den Adhäsionsmolekülen, die den Kontakt von DC und T-Zelle vermitteln (Hart D, 1997; Moingeon *et al.*, 1989; Steinman RM, 1991). Durch die lang anhaltende Expression von MHC-Antigen-Komplexen und kostimulierenden Molekülen bieten DCs naiven T-Zellen optimale Bedingungen zur Differenzierung in T-*Inducer*-/Effektor-Zellen (Cella *et al.*, 1997a; Iezzi G *et al.*, 1998; 1999). Die notwendigen Schritte zur Steuerung der T-Zell-Immunantwort zu einem bestimmten T-*Inducer*-/Effektor-Zelltyp finden innerhalb der immunologischen Synapse statt, einem spezifischen molekularen Komplex, der sich aus einem zentralen Bereich mit TCRs und pMHC und einem äußeren ringförmigen Bereich aus Adhäsionsmolekülen zusammensetzt. Vor allem DCs reorganisieren ihr Zytoskelett in Richtung der immunologischen Synapse (Al-Alwan *et al.*, 2003). Innerhalb dieser Struktur werden nun zumindest drei verschiedene Signale übermittelt, die die Art und Stärke der T-Zell-Immunantwort steuern (Abb. 2). Die Bindung des TCRs an passende Antigen-beladene MHC-Moleküle wird als Signal 1 definiert. Damit wird abgesichert, dass nur naive T-Zellen, welche den zum präsentierten Antigen passenden TCR haben, aktiviert werden. Signal 2 wird durch die kostimulierenden Moleküle der B7-Familie auf beiden Zellen übermittelt. Zu den bekanntesten Molekülen gehören CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2) auf der DC- und CD28 auf der T-Zell-Oberfläche. Die Kostimulation induziert die Differenzierung in T-*Inducer*-/Effektor-Zelle und bewirkt deren klonale Expansion. Darüber hinaus kann die Stärke und Art der Kostimulation die Deletion von naiven und autoreaktiven T-Zellen und die Induktion von Tregs verursachen (Krummel *et al.*, 1995; Lenschow *et al.*, 1996; Walunas *et al.*, 1996; Steinman und Nussenzweig, 2002; Reis e Sousa C, 2006). Das dritte Signal wird meistens durch Zytokine übermittelt und gibt den Typ der Immunantwort vor. Die DC-vermittelte Sekretion von IL-12, IL-18 oder IFN- α veranlasst eine Differenzierung zu Th1-Zellen, wogegen die Zytokine IL-4 und IL-10 aktivierte T-Zellen in Th2-Zellen differenzieren lässt (Okamura *et al.*, 1995, Hilkens *et al.*, 1997, Rissoan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Ferner kann die Polarisation zu Th1- oder Th2-Zellen über den T-Zell-Oberflächenrezeptor Notch geregelt werden: Eine Interaktion über den von DC- exprimierten Notch-Liganden Delta bewirkt eine Th1-Immunantwort, während Th2-

Immunantworten durch die Bindung von Jagged an Notch ausgelöst werden (Amsen D, 2004; Tu *et al.*, 2005).

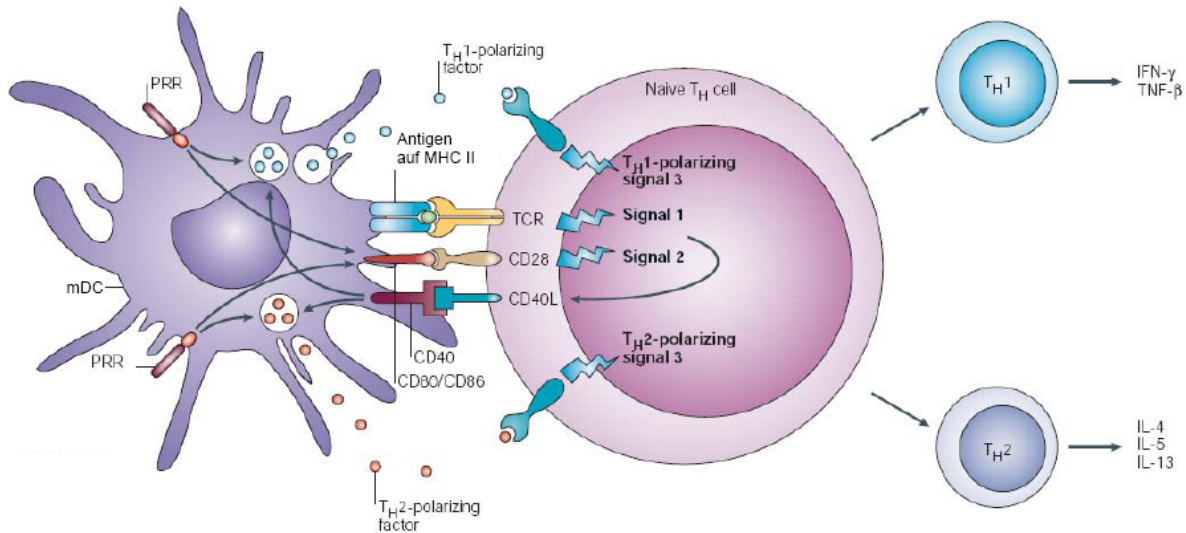


Abb. 2: Interaktion von DCs mit CD4⁺ T-Zellen. Zur Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen (Naive T_H cells) in Th1- oder Th2-Zellen sind 3 Signale notwendig. Signal 1 ist das Antigen-spezifische Signal, welches über Bindung des TZR an Antigen-präsentierende MHC II-Moleküle übermittelt wird. Die Antigene wurden zuvor über *pattern recognition receptors* (PRR) der DC erkannt und internalisiert. Signal 2 stellt die Aktivierung von CD28 durch die kostimulierenden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 dar. Signal 3 induziert die Polarisierung der CD4⁺ T-Zelle in Th1 oder Th2-Zellen (nach Kapsenberg M, 2003)

3 DCs und die Kontrolle des Immunsystems

Neben ihrer Rolle in der T-Zell vermittelten Immunität beeinflussen DCs auch andere Immunzellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems. So regulieren DCs durch IL-12, IL-18, IL-15 oder IFN- α -Produktion die Aktivierung von ruhenden Natürlichen Killer- (NK-) und Natürlichen Killer T- (NKT-) Zellen, wodurch eine Th1- und CTL-vermittelte Immunantwort verstärkt wird. (Fernandez *et al.*, 1999; Gerosa *et al.*, 2005). Darüber hinaus vermitteln DCs die Differenzierung von aktivierten naiven B-Zellen in Plasmazellen durch die synergistische Sekretion von IL-12 und IL-6/sIL-6 α (Dubois *et al.*, 1997; 1998). Jedoch besteht die Aufgabe von DCs nicht allein darin, Immunreaktionen zu initiieren, sondern auch durch Vermittlung von Toleranz überschüssige Immunreaktionen zu verhindern. Dabei integrieren sie unter anderem auch vielfältige Signale anderer Immunzellen, die sie über Zell-Zell-Kontakt oder auf Zytokin-Ebene erhalten. Beispielsweise modifizieren die von Tregs sezernierten Zytokine IL-10 und TGF β 1 funktionell immunogene in tolerogene DCs, ohne jedoch deren Phänotyp zu

beeinflussen (Strobl und Knapp, 1999; Pestka *et al.*, 2004). Dementsprechend können nicht nur iDCs, sondern auch phänotypisch reife DCs mit einem hohem Level an kostimulierenden Oberflächenmolekülen tolerogene Eigenschaften durch Elimination und Inaktivierung von T-Zellen vermitteln (Albert *et al.*, 2001; Menges *et al.*, 2001; Fujii *et al.*, 2004). Bislang hat sich allerdings noch kein zuverlässiger Marker für mDCs gefunden, der auch in gleichem Maße ihre immunogene Potenz anzeigt. Inzwischen gibt es erste Ansätze, das klassische Konzept der Einteilung nach „unreif“ und „reif“ durch die Kombination ihrer Effektor-Funktion zu erneuern (Reis e Sousa C, 2006). Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das Konzept der „phänotypisch reifen = immunogenen“ DC wohl obsolet ist und DCs in ihren funktionellen Eigenschaften eine weitaus höhere Plastizität besitzen als ursprünglich angenommen.

4 DCs in der klinischen Anwendung

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle in der Kontrolle des Immunsystems und ihrer Eigenschaft der effizienten T-Zell-Stimulation wird ein zukünftiger Einsatz von DCs als klinische Anwendung diskutiert. DCs sind bereits zur Immuntherapie gegen Krebs und Autoimmunerkrankungen und zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen experimentell eingesetzt worden (Schuler *et al.*, 2003; Gilboa E, 2007; Tacke *et al.*, 2007).

Darüber hinaus spielen DCs wegen ihrer Kapazität, die fremden Antigene des transplantierten Organs zu präsentieren und eine T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktion einzuleiten, in der Transplantation eine zentrale Rolle. (Thomson und Lu, 1999; Fairchild und Waldmann, 2000; Morelli und Thomson, 2000). Eine der Bestrebungen der aktuellen Transplantations-Forschung ist die immunotherapeutische Verwendung von genetisch-manipulierten DCs oder von immunsuppressiven Wirkstoffen zur Inhibition einer T-Zell vermittelten Immunantwort und zur Induktion von Toleranz gegenüber fremden Antigenen (Hackstein und Thomson, 2004; Morelli und Thomson, 2007). Die meisten der teils beachtlichen und viel versprechenden Erkenntnisse zur Induktion der Transplantat-Toleranz durch DCs basieren bisher jedoch auf tierexperimentellen oder *in vitro* Versuchen.

5 Ubiquitin-Proteasom-System

Das evolutionär hoch konservierte Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der wichtigste proteolytische Funktionskomplex im Zytoplasma und Nukleus eukaryotischer Zellen (Glickman und Ciechanover, 2002; Ciechanover A, 2006). Über 90% aller intrazellulären

Proteine werden durch das UPS prozessiert, modifiziert, aktiviert, inaktiviert oder vollständig abgebaut. Auf diese Weise werden einerseits defekte oder fehlerhaft synthetisierte Proteine eliminiert, andererseits können Funktion, Halbwertszeit und Umsatz intrazellulärer Proteine selektiv gesteuert werden (Ciechanover *et al.*, 2000). Vor allem Proteine zur Regulation essentieller zellulärer Prozesse, wie prä- und postembryonale zelluläre Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus, Apoptose, Gentranskription und Signaltransduktion werden vom UPS durch limitierte oder vollständige Proteolyse aktiviert oder inaktiviert (Hershko und Ciechanover, 1998; Naujokat und Hoffmann, 2002; DeRenzo und Seydoux, 2004; Bowerman und Kurz, 2006; Naujokat und Saric, 2007). Somit stellt das Ubiquitin-Proteasom-System eine zentrale intrazelluläre Regulationseinheit dar.

5.1 Historischer Überblick

Bis etwa Mitte des 20. Jahrhunderts war die vorherrschende Meinung, dass der Körper aus zwei unterschiedlichen Protein-Formen besteht: den relativ statischen Struktur- und Funktions-Proteinen und den Energie-liefernden Nahrungsproteinen, die separat voneinander agieren. Dieses Konzept wurde von Rudolf Schönheimer durch seine Versuche mit radioaktiv markierten Proteinen in den frühen 40er Jahren des letzten Jahrhunderts infrage gestellt (Schoenheimer R, 1939). Er konnte erstmals nachweisen, dass die körpereigenen Funktions- und Strukturproteine aus dietätischen Komponenten synthetisiert werden können und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Protein-Synthese und –Degradation besteht. Bevor man jedoch in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts das UPS als Zellmaschinerie zur Degradierung von Proteinen entdeckte, dachte man, dass der Proteinabbau in den von de Duve im Jahr 1955 entdeckten Lysosomen stattfindet (Gianetto und de Duve, 1955). In diesen durch eine Membran vom Zytoplasma abgetrennten Strukturen befinden sich verschiedene hydrolytische Enzyme, die exogene Proteine durch Heterophagie und endogene Proteine durch Mikro- bzw. Makroautophagie verdauen. Eigentlich war das Konzept des lysosomalen Protein-Abbaus bereits nicht mehr haltbar, als man feststellte, dass die intrazelluläre Proteindegradierung nicht, wie für Proteasen üblich, exergonisch ablief, sondern metabolische Energie verlangte, unterschiedliche Proteine auch verschiedene Halbwertszeiten besaßen und Inhibitoren lysosomaler Proteasen unterschiedliche Effekte auf unterschiedliche Proteinpopulationen hatten. Trotzdem war die Annahme, dass das Lysosom den Abbau intrazellulärer Proteine vermittelt, schlüssig. Es war nicht vorstellbar, dass der Substratabbau der Proteasen ohne den Schutz der lysosomalen Membran frei im Zytosol

stattfind. So schlug man unterschiedliche Hypothesen vor, um das allmählich erodierende Modell des in einer Organelle situierten intrazellulären Proteinabbaus aufrecht zu erhalten (Haider und Segal, 1972; Segal *et al.*, 1974; Dean RT, 1977).

Ein wichtiger Durchbruch für die Hypothese des extralysosomalen Proteinabbaus gelang Rabinovitz und Fisher, die in Kaninchen-Retikulozyten den Abbau von Aminosäureanaloga enthaltendem Hämoglobin nachweisen konnten. Da Retikulozyten ausdifferenzierte rote Blutzellen sind, die keine Lysosomen enthalten, hatte man einen ersten Beweis für den nicht lysosomalen Protein-Abbau (Rabinovitz und Fisher, 1964). Im Jahr 1978 isolierten Aaron Ciechanover und Avram Hershko schließlich zwei Fraktionen aus diesen Kaninchen Retikulozyten und zeigten, dass die Bestandteile aus beiden Fraktionen für den energieabhängigen extralysosomalen Proteinabbau notwendig waren. Daraus schlossen sie, dass das Protein-Abbau-System aus zwei Komponenten bestand (Ciechanover *et al.*, 1978). Kurze Zeit später wurde die aktive Komponente aus Fraktion I als ATP-dependent proteolysis factor-1 (APF1) identifiziert und man fand heraus, dass APF1, dem bereits vorher entdeckten Ubiquitin entsprach, welchem man bislang keine Funktion hatte zuordnen können (Goldstein G, 1974; Hershko *et al.*, 1980; Ciechanover *et al.*, 1980, Wilkinson *et al.*, 1980). In der Folgezeit wurden die Enzyme bestimmt, welche in die Reaktionskaskade der Ubiquitin-Konjugation involviert waren: Enzyme-1 (E1), das Ubiquitin-aktivierende Enzym, E2, das Ubiquitin konjugierende Enzym und E3, die Ubiquitin-Protein-Ligase (Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1983). Die bedeutende Rolle des extralysosomalen Protein-Abbau-Systems für grundlegende zelluläre Funktionen wie den Zellzyklus konnte man erstmals durch Untersuchungen an einer thermolabilen murinen Zelllinien-Mutante nachweisen (Finley *et al.*, 1984). Die Identifizierung der nachgeschalteten Protease, dem 26S Proteasom, fand erst im Jahr 1986 durch Hough *et al.* statt. Dessen Existenz und eine nähere Charakterisierung wurden fast zeitgleich von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt (Waxman *et al.*, 1987).

Mit der Identifizierung aller Bestandteile des UPS fand man in den Folgejahren nun auch die wichtigen zellulären Funktionen des Systems heraus. Man konnte zeigen, dass das UPS im Abbau von beispielsweise Transkriptions-Faktoren, Zellzyklus-Regulatoren, Tumor-Suppressoren und -Promotoren involviert ist (Scheffner *et al.*, 1990; Glotzer *et al.*, 1991, Ciechanover *et al.*, 1991). In der Folgezeit konnte auch der strukturelle Aufbau des 26S Proteasoms entschlüsselt werden.

Bedingt durch die zentrale und regulative Rolle des UPS deckte man mit der Erforschung des UPS die Ursache vieler Krankheiten auf, die auf Dysregulationen, Fehlfunktionen

oder fehlerhaften Komponenten des UPS gründeten (Schwartz und Ciechanover, 1999; Golab *et al.*, 2004; Ciechanover A, 2006, Reinstein und Ciechanover, 2006). Beispielsweise resultieren bestimmte Krebsarten entweder auf Stabilisierung von Onkoproteinen oder der Destabilisierung von Tumor-Suppressoren. Dementsprechend gibt es auch aus medizinischer Sicht das Bestreben, Therapien zu entwickeln, welche die Regulation des UPS beeinflussen. Der Proteasom-Inhibitor Velcade® (Wirkstoff Bortezomib), der im Jahr 2003 (USA) bzw. 2004 (Europa) zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen wurde (Adams J, 2004), stellt einen ersten Schritt zur Bekämpfung von Krankheiten dar, die auf Störungen im UPS basieren.

Aufgrund ihres großen Beitrags zur Aufschlüsselung des Aufbaus und der Funktion des UPS wurden Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin A. Rose im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

5.2 Aufbau des UPS

Das UPS kann in zwei funktionelle Untereinheiten unterteilt werden: das Ubiquitin-System und das 26S Proteasom.

5.2.1 Ubiquitinierung von Proteinen

Das Ubiquitin-System ist für die Modifikation und Markierung intrazellulärer Proteine zuständig und setzt sich aus Ubiquitin und drei verschiedenen Enzymklassen zusammen: Ubiquitin-Aktivierungs-Enzyme (E1), Ubiquitin-Konjugations-Enzyme (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3). Diese drei Enzyme katalysieren in einer mehreren Schritte umfassenden, sequentiellen, enzymatischen Kaskade eine kovalente Isopeptidbindung von Ubiquitin an das für die proteasomale Proteolyse bestimmte Substratprotein (Ciechanover *et al.*, 1981; Hershko *et al.*, 1981; Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1983; Hershko und Ciechanover, 1998).

Im ersten ATP-verbrauchenden Schritt erfolgt eine Aktivierung des 76 Aminosäuren (AS) langen Ubiquitins durch eine Thiolesterbindung zwischen einem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und einem Cysteinrest im aktiven Zentrum von E1. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf E2, das als Trägerprotein fungiert, transferiert und abermals über eine Thiolesterbindung an einen Cysteinrest des E2 konjugiert. Im letzten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin über eine Isopeptidbindung kovalent an einen Lysinrest des Substrat-Proteins oder am Substrat-Protein konjugierten Ubiquitin gebunden. Mehrere Zyklen der als Ubiquitinierung bezeichneten Enzymkaskade führen zu einer Markierung des Substrat-Proteins mit Polyubiquitinketten, die als Signal für die

Erkennung und Proteolyse des Substrat-Proteins durch das 26S Proteasom gelten (Pickart CM, 2001; Pickart und Eddins, 2004).

Das Ubiquitin-System besitzt eine hierarchische Struktur, d.h. ein einzelnes E1 ist für die Aktivierung von Ubiquitin zuständig und überträgt dieses auf die E2s, von denen bisher 25 bekannt sind. Die spezifische Erkennung und Selektion der zu ubiquitinierenden Substrat-Proteine erfolgt jedoch durch mehr als 1000 E3s, die unterschiedliche und multiple Substratspezifitäten inne haben und in drei Gruppen unterteilt werden können: HECT-, RING- und U-box-E3s (Glickman und Ciechanover, 2002; Pickart und Eddins, 2004; Petroski und Deshaies, 2005). Das Ubiquitin-System ist evolutionär konserviert und in allen eukaryotischen Zellen zu finden (Haas und Siepmann, 1997; Hochstrasser, 2000). In Prokaryoten ist es nicht vorhanden. Diese besitzen keine genetisch-homologen Komponenten, jedoch funktionell homologe Systeme des Ubiquitin-Systems (Pickart und Eddins, 2004; Mogk *et al.*, 2007).

Neben der Polyubiquitinierung von Substrat-Proteinen für die proteasomale Degradation reguliert das Ubiquitin-System durch Monoubiquitinierung von Substrat-Proteinen deren Transport und Lokalisation in der Zellmembran, in Endosomen, im endozytotischen und lysosomalen System und im Nukleus, als auch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen (Hoegge *et al.*, 2002; Stelter und Ulrich, 2003; Hicke und Dunn, 2003; Mukhopadhyay und Riezman, 2007).

5.2.2 Das Proteasom

Das eukaryotische 26S Proteasom ist ein 2,5 MDa großer makromolekularer multikatalytischer Proteasekomplex, der polyubiquitinierte Substrat-Proteine ATP-abhängig proteolytisch prozessiert. Das komplette 26S Proteasom besteht aus verschiedenen funktionellen Komplexen, Subkomplexen und Untereinheiten und hat einen Sedimentationskoeffizienten von 26 Svedberg (S), weshalb es auch als 26S Proteasom bezeichnet wird (Yoshimura *et al.*, 1993; Baumeister *et al.*, 1998; Voges *et al.*, 1999; Pickart und Cohen, 2004). Es demonstriert einen modularen Aufbau und besteht grob aus einem 20S katalytischen Kernpartikel (CP) und zwei flankierenden 19S regulatorischen Partikeln (RP), die jeweils in einen Basis-Subkomplex und einen Deckel-Subkomplex unterteilt werden (Abb. 3) (DeMartino *et al.*, 1994). Das 20S CP ist eine zylinderförmige Struktur, die aus vier heptamerisch gestapelten Ringen besteht. Jeder der zwei äußeren Ringe besteht aus sieben genetisch verwandten und strukturell ähnlichen α -Untereinheiten, welche die zwei inneren, aus ähnlich konservierten β -Untereinheiten bestehenden Ringe, beidseitig umschließen, so dass sich eine Stöchiometrie von $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}$.

$\gamma\alpha_{1-7}$ ergibt (Voges *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1999). Die beiden Hälften des 20S CP besitzen eine pseudo-siebenzählige Symmetrie, die über eine zweizählige Rotationssymmetrie zueinander in Beziehung stehen (Kopp *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1997). In jedem der beiden inneren Ringe sind drei proteolytische Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) und vier nicht-proteolytische Untereinheiten ($\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$, $\beta 7$) lokalisiert (Groll *et al.*, 1997; Kopp *et al.*, 1997; Voges *et al.*, 1999). Die katalytisch-aktiven Zentren der proteolytischen $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten befinden sich im Inneren der zentralen katalytischen Kammer des 20S CP und enthalten je ein N-terminales Threonin, dessen Hydroxylgruppe als Nukleophil bei der Hydrolyse der Peptidbindungen des Substratproteins fungiert (Brannigan *et al.*, 1995; Löwe *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1995; Groll *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998; Groll und Huber, 2004).

Durch Verwendung verschiedener synthetischer fluorogener Oligo-Peptid-Substrate und Mutationsanalysen konnte man die proteolytische Aktivitäten der Untereinheiten charakterisieren: $\beta 1$ spaltet nach sauren AS (caspase-ähnlich), $\beta 2$ schneidet nach basischen AS (tryptisch) und $\beta 5$ spaltet Oligopeptid-Ketten nach hydrophoben AS (chymotryptisch) (Orlowski *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1997; 1999; Orlowski und Wilk, 2000; Groll *et al.*, 1999; Groll und Huber, 2004). Unter Einfluß des Zytokins IFN- γ können alternative, genetisch-homologe proteolytische β -Untereinheiten, $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) exprimiert und statt der $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten in das neu assemblierte 20S CP inkorporiert werden (Ortiz-Navarrete *et al.*, 1991; Boes *et al.*, 1994; Fruh *et al.*, 1994; Groettrup *et al.*, 1997; Griffin *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 2003). Bedingt durch den Austausch der konstitutiven Untereinheiten durch die βi -Untereinheiten, verändert sich die proteolytische Aktivität des 20S CP. Insgesamt steigert sich die chymotryptische Aktivität, während die tryptische und die caspase-ähnliche-Aktivität abnehmen. Die im Immunoproteasom generierten Antigene weisen eine höhere Affinität zu MHC-I Molekülen auf (Kloetzel PM, 2001; Yewdel und Bennink, 2001). Da das IFN- γ induzierte Proteasom einen Anstieg der Antigen-Präsentation bewirkt, spricht man auch vom Immunoproteasom (Fruh *et al.*, 1994; Ustrell *et al.*, 1995). Die 20S CPs sind allein nicht in der Lage, gefaltete und polyubiquitinierte Proteine zu prozessieren und benötigen hierfür 19S oder 11S RPs, die an einem der beiden äußeren α -Ringe des 20S CP binden (Baumeister *et al.*, 1998; Adam GM *et al.*, 1998; Pickart und Cohen, 2004; Wolf und Hilt, 2004).

Das v-förmige 19S RP (PA700) des 26S Proteasoms unterteilt sich in zwei weitere Subkomplexe: den Deckel und die Basis (Peters *et al.*, 1993; Yoshimura *et al.*, 1993;

Glickman *et al.*, 1998). Sechs der Untereinheiten des Deckel-Subkomplexes gehören zu den ATPasen der AAA Familie und werden als Rpt 1-6 (*regulatory particle triple-A protein*) bezeichnet, wogegen die zwei nicht-ATPasen Rpn 1 und 2 (*regulatory particle non-ATPase*) genannt werden. Der aus neun Rpn-Untereinheiten (Rpn 3-10, 12, 13) bestehende Deckel-Subkomplex erkennt, selektioniert und bindet polyubiquitinierte Substrat-Proteine (Xie und Varshavsky, 2000; Verma *et al.*, 2004), die anschließend von der Rpn11-Untereinheit des Deckel-Subkomplexes und assoziierten deubiquitinierenden Enzymen hydrolytisch deubiquitiniert werden (Chung und Baek, 1999; Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002; Guterman und Glickman, 2004). Die Rpt-Untereinheiten des Basis-Subkomplexes entfalten das Substrat-Protein (Braun *et al.*, 1999; Navon und Goldberg, 2001) und ermöglichen durch konformationelle Interaktion mit dem α -Ring des 20S CP dessen Öffnung und die Translokation des entfalteten Substrat-Proteins in die zentrale katalytische Kammer (Köhler *et al.*, 2001; Groll *et al.*, 2000a; Pickart und Cohen, 2004).

Alternativ zum 19S RP kann ein 11S RP, das auch als PA28 bezeichnet wird, an den α -Ring des 20S CP binden. PA28 existiert in zwei Isoformen PA28 $\alpha\beta$ und PA28 γ . PA28 $\alpha\beta$ werden analog zu den katalytischen β i-Untereinheiten durch IFN- γ induziert und bilden hetero-oligomere Ringstrukturen aus 7 Untereinheiten (Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992; Realini *et al.*, 1994; Ahn *et al.*, 1995; Kühn und Dahlmann, 1996; Krüger *et al.*, 2003). Die Bindung des PA28 $\alpha\beta$ Hetero-Oligomers an das 20S CP verändert dessen proteolytische Eigenschaften und führt zu einer gesteigerten proteasomalen Produktion von Antigen-Peptiden und deren Präsentation auf MHC-I-Molekülen. Diese Funktionen sind unabhängig von einer Präsenz der β 1i-, β 2i- und β 5i-Untereinheiten im 20S CP (Groettrup *et al.*, 1996; Dick TP *et al.*, 1996; Rechsteiner *et al.*, 2000). PA28 γ formt homo-oligomere Ringstrukturen, die analog zu PA28 $\alpha\beta$ an den α -Ring des 20S CP binden können. Im Gegensatz zu PA28 $\alpha\beta$ wird die transkriptionelle Aktivierung des vor allem im Nukleus vorkommenden PA28 γ nicht durch IFN γ induziert und ist derzeit noch unbekannt. Vor kurzem konnten diverse Gruppen die funktionelle Rolle von PA28 γ entschlüsseln. Man konnte zeigen, dass PA28 γ für den Ubiquitin-unabhängigen Abbau von Proteinen, wie beispielsweise dem Zellzyklus-Regulator p21^{WAF1/CIP1}, aber auch für die Regulation des Ubiquitin-abhängigen Abbaus des Tumorsuppressor-Proteins p53 verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Zhang Z und Zhang R, 2008) und somit eine zentrale Funktion in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose hat (Murata *et al.*, 1999; Barton *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den oligomeren PA28 Komplexen ist das 20S CP aktivierende Partikel PA200 ein einzelnes Polypeptid, dessen Funktion in der DNA-Reparatur und Stressantwort liegt (Ustrell *et al.*, 2002). PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ und PA200 RPs enthalten keine ATPasen und vermitteln Ubiquitin-unabhängige proteolytische Funktionen. Aus Säugerzellen isolierte Proteasome stellen eine heterogene Population von verschiedenen Proteasom-Subtypen dar, die aus einem 20S CP und einem oder zwei RP bestehen. Diese Subtypen können anhand ihres modularen Aufbaus in 19S-20S-19S (26S Proteasom), PA28-20S-PA28, 19S-20S-PA28 (Hybrid-Proteasom), 19S-20S und PA28-20S-Proteasomen unterteilt werden und weisen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation auf (Brooks *et al.*, 2000; Hendil *et al.*, 1998; Tanahashi *et al.*, 2000; Cascio *et al.*, 2002).

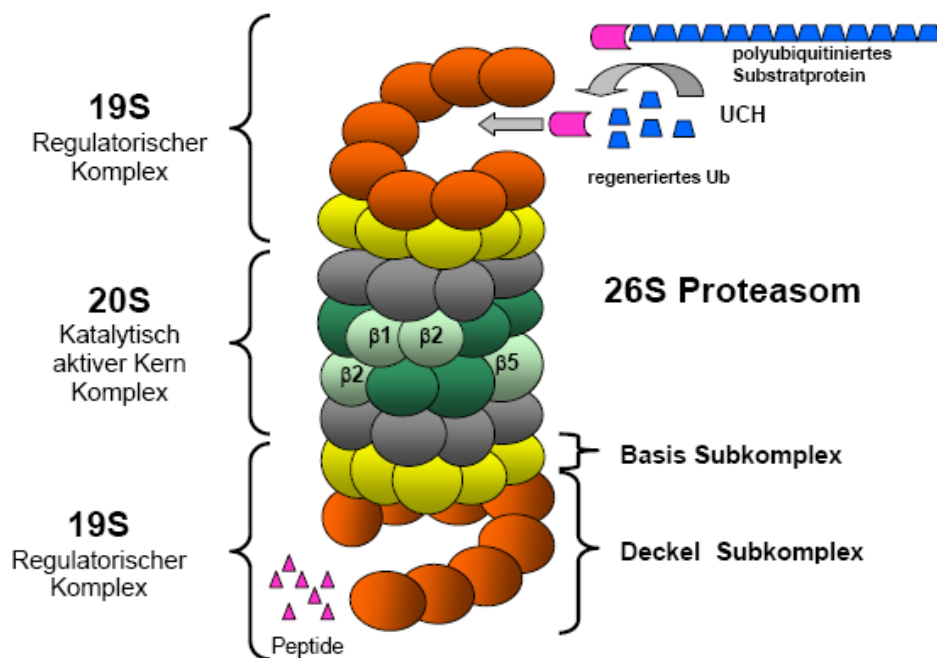


Abb. 3: Struktur des 26S Proteasoms. Erläuterungen s. Text (nach Naujokat C and Sarić T, 2007)

5.2.2.1 Funktionen des Proteasoms

Das UPS ist ein zentraler, essentieller zellulärer Bestandteil. Bis heute sind mehrere hundert Regulationsproteine bekannt, die durch proteasomale Proteolyse abgebaut, aktiviert oder inaktiviert werden. Dazu zählen:

- Zellzyklusregulatoren wie z.B. p21^{WAF1/CIP1}, Cyclin A, Cyclin D (Blagosklonny *et al.*, 1996; Yew PR, 2001; Diehl *et al.*, 1997)

- Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Palombella *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998)
- Signaltransduktionsproteine wie β -Catenin (Aberle *et al.*, 1997; Korink *et al.*, 1997)
- Pro- und anti-apoptotische Proteine wie Bax, Bim, Bid, Bcl-2, *cellular inhibitor of apoptosis-1* (cIAP-1) und *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) (Li und Dou, 2000; Ley *et al.*, 2003; Breitschopf *et al.*, 2000; Dimmeler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000)
- Tumorsuppressor- und Onkoproteine wie p53 und p27^{Kip1} (Maki *et al.*, 1996; Catzavelos *et al.*, 1997)
- Zelloberflächenrezeptoren, Membranproteine und nukleäre Rezeptoren, wie z.B. die TZR- ζ Untereinheit (Cenciarelli *et al.*, 1992; Hicke L, 1999; Hicke und Dunn, 2003)
- Proteine zur Regulation von Reproduktion, prä- und postembryonaler Entwicklung und zellulärer Differenzierung, wie z.B. Cdc26a (Tokumoto T, 1999; Bernardi *et al.*, 2000; Naujokat und Hoffmann, 2002; Bowerman und Kurz, 2006; Naujokat und Saric, 2007).

Darüber hinaus reguliert das 26S Proteasom die zelluläre Immunantwort, indem es mutierte, falsch-synthetisierte und defekte Proteinen zu Antigenen für die Präsentation auf MHC I-Molekülen prozessiert (Rock *et al.*, 2002; Kloetzel PM 2004; Borissenko L und Groll M, 2007).

5.2.2.2 Störungen des UPS

Aufgrund der vielseitigen zellulären Funktionen und Mechanismen, die vom UPS in der Prozessierung intrazellulärer Proteine gesteuert werden, überrascht es nicht, dass das UPS eine wichtige Rolle bei zahlreichen biologischen und physiologischen Prozessen spielt (Hershko und Ciechanover, 1998; Naujokat und Hoffmann, 2002; Bowerman und Kurz, 2006). Aufgrund der enormen Komplexität des gesamten Systems ist es zudem plausibel, dass Dysregulationen, Fehlfunktionen oder fehlerhafte Komponenten des UPS existieren, was direkt oder indirekt zur Pathogenese und Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen und Syndrome des Menschen beiträgt (Chai *et al.*, 1999; Checler *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Ciechanover und Brundin, 2003; Ciechanover und Schwartz, 2004; Ciechanover A, 2006; Dahlmann B, 2007). Beispielsweise führen Mutationen bestimmter E3s oder ihrer Substrate zu den seltenen hereditären Erkrankungen Angelman-Syndrom und Liddle-Syndrom (Liddle *et al.*, 1963; Angelman H, 1965; Ciechanover und Schwartz, 2004; Ciechanover A, 2006). Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, spielt das UPS eine indirekte Rolle. Die zytopathologische Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen sind intraneuronale Einschlüsse

abnormaler Proteinaggregate aus mißgefalteten, toxischen Proteinen oder Bestandteilen des UPS, die aufgrund ihrer Zytotoxizität zur neuronalen Dysfunktion und Apoptose führen (Lam *et al.*, 2000; Bence *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2001; Verhoef *et al.* 2002; Ciechanover und Brundin, 2003; Ciechanover A, 2006).

Es zeigen sich vermehrt Hinweise, dass auch die Pathogenese und Pathophysiologie von verschiedenen Krebsarten durch proteasomale Fehlfunktionen verursacht werden. Dabei kommt es vereinfacht dargestellt durch Stabilisierung von Onkoproteinen und Wachstumsfaktoren und/oder zum erhöhten Abbau von Tumorsuppressorproteinen, proapoptotischen Proteinen und Zellzyklus-inhibierenden Proteinen, die vom UPS inadäquat prozessiert werden (Naujokat und Hoffmann, 2002; Mani und Gelmann, 2005; Ciechanover A, 2006). Beispielsweise konnte in Fällen von Lungen-, Kolorektal-, Brustkarzinomen, Glioblastomen und Lymphomen mehrfach eine gesteigerte proteasomale Degradation von p27^{Kip1} nachgewiesen werden (Catzavelos *et al.*, 1997; Loda *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1997; Piva *et al.*, 1999; Chiarle *et al.*, 2000). Weiterhin wird das zervikale Karzinom durch Hochrisiko-Typen des Humanen Papilloma-Virus (HPV) ausgelöst. Hierbei kommt es durch eine virale E3 zum erhöhten Abbau des Tumorsuppressor-Proteins p53 (Scheffner *et al.*, 1990, Hengstermann *et al.*, 2001).

Ferner konnten tierexperimentelle Studien eine beträchtliche Beteiligung des UPS an der Pathophysiologie von T-Zell- und NF- κ B-vermittelten immunologischen Erkrankungen und Pathologien, wie Polyarthrit, Psoriasis, Multipler Sklerose und *graft-versus-host-disease* (GVHD) aufzeigen (Palombella *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2001; Zollner *et al.*, 2002; Sun K *et al.*, 2004; Vodanovic-Jankovic *et al.*, 2006; Mattingly *et al.*, 2007).

5.2.3 *Proteasom-Inhibitoren*

Die experimentelle Inhibition des UPS ist ein Mittel, um dessen zentrale Rolle in zahlreichen komplexen zellulären Regulationsmechanismen zu verstehen. Die meisten Proteasom-Inhibitoren hemmen selektiv die proteolytischen Untereinheiten des 20S Proteasoms, ohne andere zelluläre Proteasen zu tangieren. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die bekanntesten und gebräuchlichsten Proteasom-Inhibitoren und ihre Einteilung in verschiedene Untergruppen. Proteasom-Inhibitoren teilt man grob in zwei Gruppen: synthetische und biologische Proteasom-Inhibitoren.

Inhibitor Klasse	Wirkstoff	Proteasom-Bindung	Bindung an andere Proteasen	Spezifität und Mechanismus	Referenz
Synthetische Proteasom-Inhibitoren					
Peptid-Aldehyde	MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)	Reversibel	Calpain I, Cathepsine	Kovalente Bindung mit katalytischem Threonin Rest der β -Untereinheiten	Figueiredo-Pereira ME <i>et al.</i> 1994 Wilk und Figueiredo-Pereira, 1993 Palombella <i>et al.</i> , 1994 Rock <i>et al.</i> , 1994
	PSI (Z-Ile-Glu(Oi-Bu)-Ala-Leu-al) MG-115(Z-Leu-Leu-nVal-al) ALLnL ALLnM LLnV CEP1612				
Peptid-Boronate	PS-341 (Bortezomib, pyrazylcarbonyl-Phe-Leu-boronate)	Irreversibel	Bisher keine bekannt	Kovalente Bindung mit katalytischem Threonin Rest der β -Untereinheiten	Adams J <i>et al.</i> , 1998 Iqbal <i>et al.</i> , 1996
	MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-boronate) PS273 (morpholino-naphthylalanine-Leu-boronate; MNLB) DFLB (dansyl-Phe-Leu-boronate)				
Peptid-Vinyl Sulfon	NLVS (Nip-LLL-vs) Ada-(Abx) ₃ -(Leu) ₃ -vinyl sulphon YLVS (YLLL-vs)	Irreversibel	Cathepsine	Kovalente Bindung mit katalytischem Threonin Rest der β -Untereinheiten	McCormack <i>et al.</i> , 1997 Bogyo <i>et al.</i> , 1998 Glas <i>et al.</i> , 1998 Kessler <i>et al.</i> , 2001
Natürliche Proteasom-Inhibitoren					
Peptid epoxyketone	Dihydroponemycin Epoxomicin YU101 (Ac-hFLFL-ex) TMC-86A und B TMC-96	Irreversibel	Cathepsin B (schwach)	Morpholinoring-Bildung mit Thr Resten der β -Untereinheiten	Hanada <i>et al.</i> , 1992 Koguchi <i>et al.</i> , 1999 Sugawara <i>et al.</i> , 1990 Elofsson <i>et al.</i> , 1999
	Lactacystin MLN519 Salinosporamide A (NPI-0052)				
γ -Laktam-Thiol-Ester (Omuramide)		Irreversibel	Cathepsin A, Tripeptidyl peptidase II	Ester-Verbindung mit Thr von β 5	Omura <i>et al.</i> , 1991 Fenteany <i>et al.</i> , 1994; 1995 Imajoh-Ohmi <i>et al.</i> , 1995
Peptid-Makrozykle	TMC95A-D	reversibel	Bisher keine bekannt	Nicht-kovalente Bindung an aktive β -Untereinheiten	Koguchi <i>et al.</i> , 1999 Kohno <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 1: Übersicht über synthetische und biologische Proteasom-Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteasom-Inhibitoren sind:

Bortezomib

Bortezomib gehört zu den Borsäure-Derivaten, die ausgehend vom molekularen Aufbau der Peptid-aldehyde entwickelt wurden (Iqbal *et al.*, 1996). Borsäure-Derivate sind im Vergleich zu Peptid-Aldehyden weitaus potentere und selektivere Proteasom-Inhibitoren und haben durch ihre exzellente Zellpermeabilität und Wasserlöslichkeit den praktischen Vorteil auch für therapeutische Zwecke verwendet werden zu können (Lynas *et al.*, 1998). Die Dipeptid-Borsäure PS-341 (Bortezomib, Velcade®) wurde im Jahr 2003 als erster Proteasom-Inhibitor zur Behandlung des Multiplen Myeloms (MM) von der *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen (Adams J *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2003; Adams und Kauffman, 2004; Montagut *et al.*, 2006; Cavo M, 2006). PS-341 zeigt bei guter Verträglichkeit vielversprechende Ergebnisse in der Monotherapie oder Kombination mit anderen Zytostatika bei der Behandlung von rezidivierenden und refraktärem MM. Für die Behandlung weiterer hämatologischer Neoplasien und solider Tumore befindet sich Bortezomib bereits in klinischen Studien (Hideshima *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2004, O'Connor *et al.*, 2005; Horton *et al.*, 2006) und die Wirksamkeit bei Kolon-, Lungen-, Pankreas-, Brust-, Prostata- und Ovarialkrebs und Non-Hodgkin-Lymphomen wird geprüft.

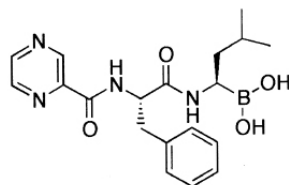


Abb. 4: Bortezomib (PS-341, Velcade®)

Lactacystin

Lactacystin, ein Metabolit aus *Streptomyces lactacystinaeus*, fiel erstmals durch seine Eigenschaft auf, Differenzierung bei der murinen Neuroblastom-Zelllinie Neuro-2a auszulösen, aber auch durch seine Zellzyklus-arretierende und Apoptose-induzierende-Wirkung (Omura *et al.*, 1991; Fenteany *et al.*, 1994; Imajoh-Ohmi *et al.*, 1995). Später konnte gezeigt werden, dass Lactacystin das Proteasom irreversibel hemmt (Fenteany *et al.*, 1995). Der zugrundeliegende Mechanismus wurde im Jahr 1996 aufgeklärt: Lactacystin wandelt sich in wässrigen Lösungen, also auch unter physiologischen Bedingungen, in *clasto*-lactacystin β -lactone um und inhibiert die katalytische Aktivität

des Proteasoms durch eine kovalente Esterbindung mit den N-terminalen Threonin-Resten der $\beta 5$ Proteasom-Untereinheit (Dick LR *et al.*, 1996). Dadurch kommt es zu einer hochselektiven irreversiblen Hemmung der chymotryptischen und tryptischen Proteasomaktivität, wogegen eine nur schwache reversible Inhibition gegenüber der PGPH-Aktivität erreicht wird.

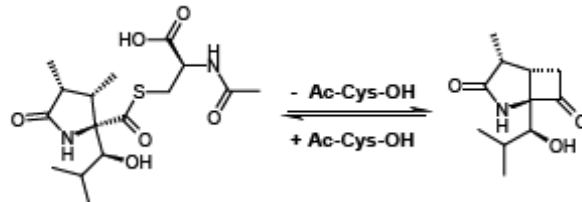


Abb. 5: Struktur von Lactacystin und *clasto*-lactacystin β -lactone

Epoxomicin

Auf der Suche nach einem anti-neoplastischen Wirkstoff konnte mit den α',β' -Expoxyketonen eine weitere natürliche Proteasom-Inhibitor-Klasse identifiziert werden. Epoxomicin, ein lineares Peptid aus dem Actinomyzeten-Stamm Nr Q996-17, zeigte eine spezifische zytotoxische Aktivität bei murinen und humanen Tumorzellen (Hanada *et al.*, 1992). Durch Bildung eines hexameren Morpholinorings mit der proteolytisch-aktiven β -5 Untereinheit hat Epoxomicin eine weitgehend selektive Spezifität für die chymotryptische Proteasomaktivität, inhibiert aber bei höheren Konzentrationen auch die tryptische Aktivität (Meng *et al.*, 1999; Groll *et al.*, 2000b).

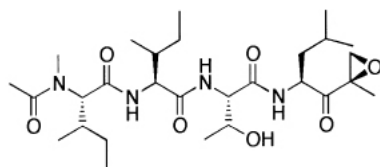


Abb. 6: Struktur von Epoxomicin

6 Apoptose – der programmierte Zelltod

Der Begriff „Apoptose“ (griechisch: *απόπτωση* - von "apo" = "weg" und "ptosis" = "Fall", wie das Fallen der Blätter im Herbst) oder auch programmierter Zelltod genannt, bezeichnet die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die beim kontrollierten Absterben von Zellen eintreten (Kerr *et al.*, 1972). Im Gegensatz dazu läuft die Nekrose, der pathologische Untergang der Zelle, nicht in einem genetisch kontrollierten Vorgang ab und geht mit entzündlichen Prozessen einher. Charakteristisches Merkmal der Apoptose ist dabei die Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität und des osmotischen Gradienten durch Abschnürung von membranumschlossenen Zellbestandteilen (*blebbing*), die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden (*apoptotic bodies*) (Cohen *et al.*, 1993; Abb. 7). Diese werden von benachbarten Zellen phagozytiert, damit keine mit Nekrose einhergehenden entzündlichen Prozesse entstehen (Savill *et al.*, 1993). Erstes messbares Kennzeichen von Apoptose ist die *Scramblase*-vermittelte Translokation von Phosphatidylserinresten an die Außenseite der Plasmamembran (Kagan *et al.*, 2000). Dadurch kommt es bedingt durch Membranstabilität zur Ausstülpung der Zellmembran (*Zeiose*). Trotz Kondensation des Zytoplasmas durch Wasserverlust bleibt die Integrität der Mitochondrien und anderer Organellen hierbei noch weitestgehend erhalten. Im Nukleus aggregiert das Chromatin in der nukleären Peripherie durch Kondensation, und die Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird durch spezielle Endonukleasen (z.B. Caspase-aktivierte Deoxyribonuklease (CAD)) abgebaut. Dieses kann man in der Elektrophorese als charakteristische DNA-Leiter (*Ladder*) nachweisen kann (Wyllie *et al.*, 1980). Die DNA-Fragmente wandern im Endstadium der Apoptose durch Verlust der Zellkernintegrität ins Zytoplasma und akkumulieren dort. Werden die apoptotischen Körperchen nicht durch Phagozytose anderer Zellen beseitigt, kommt es zur Lyse, wodurch entzündliche Prozesse im Gewebe gefördert werden. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „sekundäre Nekrose“ (Leist und Nicotera, 1997). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der Zelltod weitaus komplexer und eine strikte Abtrennung von Apoptose und Nekrose ist kaum möglich. Deshalb geht man davon aus, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sind und die Blockade des apoptotischen Signalwegs zum Zelltod über den nekrotischen Weg führt (Vercammen *et al.*, 1998).

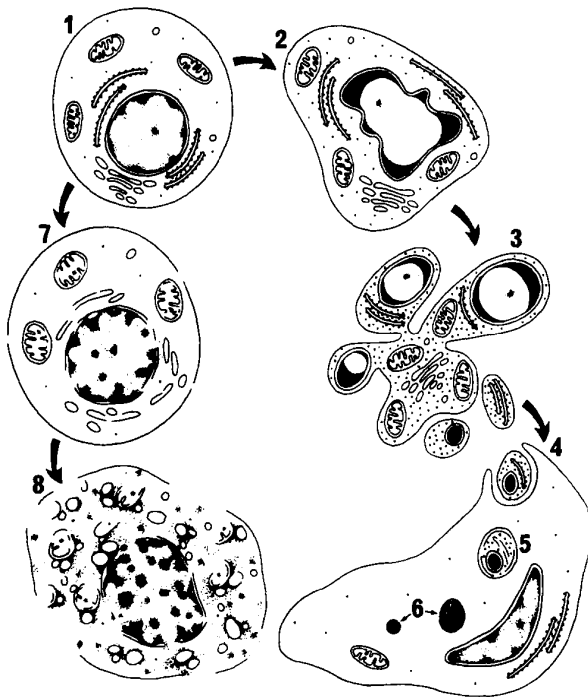


Abb. 7: Ultrastrukturelle Veränderungen der Apoptose (1-6) und Nekrose (7 und 8)

- (1) Normale Zelle
 - (2) Die frühe Apoptose wird durch Kondensation des nukleären Chromatins und des Zytoplasmas und der Ausstülpung der Plasmamembran gekennzeichnet.
 - (3) Später bilden nukleäre Fragmente und Ausstülpungen *apoptotic bodies* (4), die durch benachbarte und phagozytisch-aktive Zellen endozytiert und (5 und 6) in Lysosomen degradiert werden.
 - (7) Die Entwicklung der Nekrose ist mit irregulärem Verklumpen von Chromatin, Anschwellen der Organellen und Zerreißen der Membranen assoziiert.
 - (8) Die Membranen lösen sich auf, aber die Zelle behält noch ihre Form bis sie phagozytiert wird.
- (Abb. aus Kerr *et al.*, 1994)

Apoptose ist ein evolutionär konservierter Prozess, der während der embryonalen Entwicklung und bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase antagonistisch zur Zellproliferation eine entscheidende Rolle spielt. Besonderes Interesse findet die Erforschung der Apoptosemechanismen in der Immunologie, Onkologie, Neurologie und Entwicklungsbiologie (Vaux und Korsmeyer, 1999). Beispielsweise werden autoreaktive und unzureichend aktivierte B- und T-Zellen während der negativen und positiven Selektion im Thymus durch Apoptose eliminiert. Desweiteren werden überschüssig vorhandene, durch klonale Expansion entstandene Antigen-spezifische T-Zellen nach abgeschlossener Immunantwort mittels Apoptose beseitigt (Bouillet *et al.* 2002; Krammer PH, 2000).

Fehlregulationen der Apoptose, die zur mangelhaften Entfernung von entarteten oder autoreaktiven Zellen führen, begünstigen die Entstehung vieler pathologischer Prozesse, wie Autoimmunerkrankungen oder Krebs. Andererseits ist eine unerwünschte, verstärkte Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus-Alzheimer oder Morbus-Parkinson, zu beobachten (Kroemer, 1997; Thompson CB, 1995).

6.1 Caspasen

Fast alle bisher bekannten Apoptosewege werden durch die proteolytische Aktivität der Familie der Caspasen exekutiert. Aus der Beschreibung ihrer enzymatischen Eigenschaften leitet sich ihr Name ab: Caspasen sind Cysteinproteasen mit einem Cystein

im aktiven Zentrum. Sie spalten ihre Substrate vornehmlich hinter einem Aspartat-Rest (S1) (Alnemri *et al.*, 1996) und benötigen eine Erkennungssequenz von 4 AS (S1-4), wobei an der S3 Position ein unverändertes Glutamin bevorzugt wird. Somit kann man die Caspasesubstrat-Spezifität mit der AS-Sequenz X-Glu(E)-X-Asp(D) umschreiben. Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen (Zymogene) vor. Beim Menschen sind bisher 11 Caspasen bekannt, die man anhand von phylogenetischen und funktionellen Analysen in drei Untergruppen einteilen kann:

- I pro-inflammatorische Caspasen
- II pro-apoptotische Initiator-Caspasen
- III pro-apoptotische Effektor-Caspasen

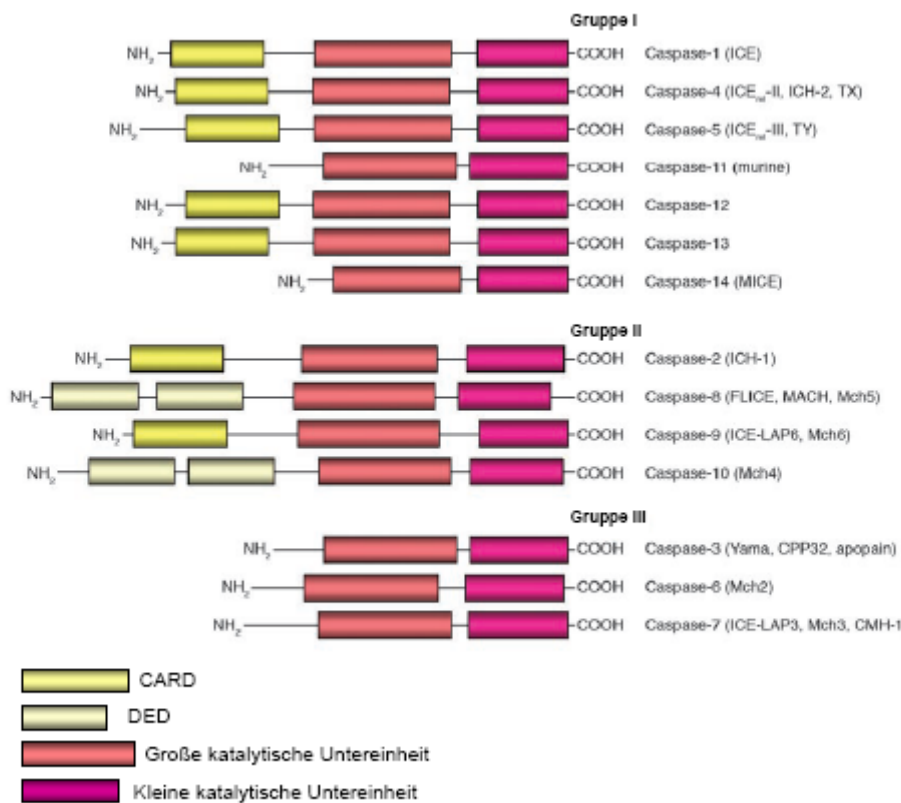


Abb. 8 Die Familie der Caspasen. Caspase-11, -13 und -14 kommen nur bei Mäusen vor (nach Lavrik *et al.*, 2005)

Zur Gruppe I gehören Caspase-1, -4, -5 und -14, die vornehmlich an entzündlichen Reaktionen und der Zytokin-Reifung beteiligt sind (Thornberry und Lazebnik, 1998; Strasser *et al.*, 2000). Gruppe II wird durch die proapoptischen Initiator-Caspasen Caspase-2, -8, -9 und -10 gebildet. Sie sind durch eine lange N-terminale Prodomäne (CARD = Caspase Rekrutierungs Domäne oder DED = *death effector domain*)

gekennzeichnet. Die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und -10 geschieht durch Interaktion der DED-Domäne mit einem DED-enthaltenden Adapterprotein, wodurch eine autoproteolytische Prozessierung ausgelöst wird. Dabei lagern sich je 2 kleine und 2 große Caspase-Untereinheiten zu einem aktiven heterotetrameren Komplex zusammen. (Boatright *et al.*, 2003). Die Initiator-Caspase des intrinsischen Apoptosewegs, Caspase-9, zeigt auch ohne Prozessierung bereits als Procaspase katalytische Aktivität. Hier erfolgt die Aktivierung durch Interaktion der Caspase-9 CARD-Domäne mit der CARD-Domäne des Adaptermoleküls Apaf-1 im Apoptosom (Riedl *et al.*, 2004). Die von den proapoptotischen Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 gebildete Gruppe III präexistiert als inaktives Homodimer. Diese Caspasen werden durch Abspaltung ihrer kurzen Prodomäne an einem spezifischen Asparaginrest von den Initiator-Caspasen aktiviert (Kaufmann und Hengartner, 2001), wodurch es zur Bildung eines aktiven Heterotetramers aus je 2 kleinen und 2 großen Untereinheiten kommt (Riedl *et al.*, 2001b). Durch die Aktivierung der Effektor-Caspasen wird eine vielfache Verstärkung des initialen Signals bewirkt. Die Effektor-Caspasen exekutieren Apoptose durch Spaltung lebenswichtiger Strukturproteine und Enzyme, wodurch die von Kerr *et al.* beobachteten charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle zustande kommen.

6.2 Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg

Es existieren unterschiedliche Apoptosewege. Generell differenziert man zwischen extrinsischem (Rezeptor-vermitteltem) und intrinsischem (mitochondrial-vermitteltem) Weg der Apoptose (Hengartner M, 2000).

6.2.1 Extrinsischer (Rezeptor-vermittelter-) Apoptoseweg

Im Immunsystem wird Apoptose zumeist durch den extrinsischen Weg über sogenannte Todesrezeptoren auf der Zellmembran ausgelöst. Bekanntestes, als erstes und mittlerweile am besten beschriebenes Beispiel ist der CD95 (Fas/APO-1) Rezeptor (Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992). Er gehört zur stetig wachsenden TNF-/NGF-Rezeptorfamilie (Locksley *et al.*, 2001; Bodmer *et al.*, 2002), in welcher die Todesrezeptoren eine Subfamilie bilden.

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch Trimerisierung nach Bindung eines zugehörigen Liganden (Dhein *et al.*, 1992; Barnhart *et al.*, 2004). Das Apoptosesignal wird intrazellulär über Rekrutierung von Adapter-Molekülen, wie z.B. FADD und entweder Caspase-8 oder -10, an den zytoplasmatischen Rezepterteil und durch Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC) weitergeleitet (Kischkel *et al.*, 1995;

Kischkel *et al.*, 2001, Boldin *et al.*, 1996). Dessen genaue Zusammensetzung ist vom Rezeptor- und Zelltyp abhängig (Scaffidi *et al.*, 1999). Zur DISC-Bildung notwendig ist die Präsenz eines konservierten zytoplasmatischen Protein-Protein-Interaktionsmotivs, der *Death Domain* (DD), im C-terminalen Ende des Todesrezeptor-Adaptermoleküls (Aravind *et al.*, 1999). Diese stellt neben DED und CARD am N-terminalen Ende der Initiator-Caspasen die dritte in der Apoptose essentielle homotypische Interaktionsdomäne dar. Es erfolgt die Rekrutierung und Assoziation von inaktiven Procaspase-8- oder -10-Monomeren über die DED-Domäne an den DISC und die anschließende Caspase-aktivierende autoproteolytische Prozessierung (Muzio *et al.*, 1996).

Die Entstehung eines pro-apoptotischen Caspase-8 Homodimers im DISC kann durch die Interaktion mit dem Caspase-8-Homolog c-FLIP verhindert werden. Dieses wird in verschiedenen Spleiß-Varianten exprimiert und interagiert durch seine DED-Domäne direkt mit Caspase-8 (Irmeler *et al.*, 1997; Golks *et al.*, 2005). Procaspase-8 weist als Heterodimer mit c-FLIP nur eine moderate proteolytische Aktivität auf und spaltet c-FLIP_L zu p43-FLIP oder p22-FLIP. Die c-FLIP-Spaltprodukte binden im DISC an verschiedene Adapterproteine, wie RIP und TRAF, und induzieren die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Kataoka und Tschopp, 2004; Golks *et al.*, 2005; Golks *et al.*, 2006).

6.2.2 *Intrinsischer (mitochondrialer) Apoptoseweg*

Beim intrinsischen Apoptoseweg sind Mitochondrien die zentrale Schaltstelle. Die physiologische Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Generierung von ATP durch oxidative Phosphorylierung. Darüber hinaus sind sie am Pyrimidin-, AS-, Häm- und Steroidstoffwechsel beteiligt.

Wirken jedoch unterschiedliche apoptotische Stimuli, wie UV- und γ -Strahlung, Chemotherapie, Viren, Bakterien, Anoikosis, Zytokin- und Wachstumsfaktor-Entzug auf Mitochondrien, kann dadurch das mitochondriale Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$, MTP) empfindlich gestört werden und somit Apoptose initiiert werden.

Das mitochondriale Transmembranpotential (MTP) wird unter normalen physiologischen Bedingungen durch den Elektronentransport der Atmungskette über die innere mitochondriale Membran aufrechterhalten. Es fungiert als Grundlage für die ATP-Bildung durch die oxidative Phosphorylierung. Bei der Erhaltung des MTP spielen Proteine der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle (Cory und Adams; 2002). Die Zugehörigkeit wird durch die Präsenz von 1 bis 4 der Bcl-2-homologen(BH)-Domänen (BH1-4) gegeben. Man unterteilt die Bcl-2 Proteine anhand der Anzahl der BH-Domänen und ihrer Funktionen in 3 Subklassen (Willis *et al.*, 2005):

- a) Pro-apoptotische Proteine, wie z.B. Bik, Bim, Bid, Noxa, PUMA/Bbc3, mit nur einer BH-Domäne (*BH3-only* Proteine)
- b) Pro-apoptotische Proteine, wie Bax und Bak, mit 2 oder 3 BH-Domänen (*Bax-like* Proteine)
- c) Anti-apoptotische Proteine, wie z.B. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, mit 2 bis 4 BH-Domänen (*Bcl-2-like* Proteine)

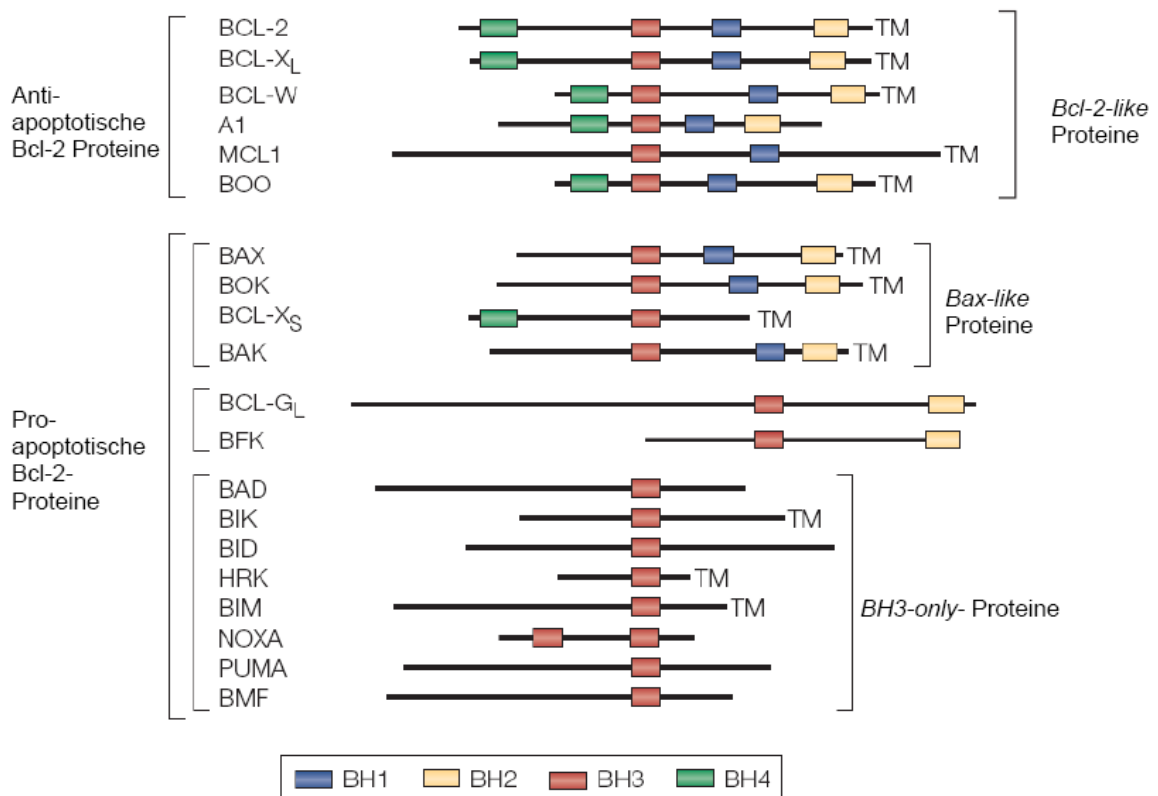


Abb. 9: Übersicht über die Bcl-2 Familie. Die anti-apoptotischen Familienmitglieder, die sogenannten *Bcl-2-like* Proteine, enthalten alle 2 bis 4 BH-Domänen. Die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine werden in die *Bax-like* Proteine, welche alle 2 bis 3 BH-Domänen besitzen, und in die *BH3-only* Proteine, die nur die BH3-Domäne enthalten, eingeteilt. Einige Proteine der Bcl-2-Familie haben zur Membranintegration Transmembran-Domänen (TM) an ihrem C-terminalen Terminus (nach Strasser A, 2005).

Zusätzlich besitzen die Proteine der Bcl-2-Familie meist noch eine C-terminale hydrophobe Transmembran-Domäne, die eine Bindung an die äußere mitochondriale Membran ermöglicht (Abb. 9). Systematische Studien haben ergeben, dass die BH3-Domäne eine Ligand-Funktion besitzt, wobei jedes pro-apoptotische *BH3-only* Protein durch Interaktion mit einer von den BH1-3 Domänen geformten Tasche spezifische Heterodimere mit unterschiedlichen anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteinen bilden kann. Zur antagonistischen Bindung an die anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteine ist eine

vorhergehende Aktivierung der *BH3-only* Proteine notwendig, wobei jedes dieser Proteine auf unterschiedliche zelluläre Stressfaktoren reagiert (Karst und Li, 2007).

So unterliegen PUMA und Noxa der transkriptionellen Regulation durch p53. Dementsprechend werden sie nach DNA-Schädigung durch γ -Strahlung transaktiviert. Die Expression von PUMA wird jedoch auch bei p53-unabhängigen Stimuli, wie Glukokortikoiden und Zytokin-Mangel, initiiert (Villunger *et al.*, 2003; Jeffers *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2001). Auch Bim wird bei Zytokin-Mangel, UV-Strahlung und Bortezomib vermittelter-Inhibition aktiviert (Bouillet *et al.*, 1999; Ley *et al.*, 2003). Bid wiederum dient unter anderem als Apoptose-Verstärker, der die Rezeptor-vermittelte Apoptose mit der mitochondrial-induzierten Apoptose verknüpft (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Das *BH3-only* protein wird erst durch aktivierte Caspase-8 in die verkürzte, „truncated“ (t), aktivierte tBid-Form prozessiert (s.o.).

Bisher konnte noch nicht vollständig geklärt werden, auf welche Weise die Aktivierung der *Bax-like* Proteine erfolgt. Es existieren zwei Modelle:

In einem der Modelle werden aktive pro-apoptotische *Bax-like* Proteine durch anti-apoptotische *Bcl-2-like* Proteine über Bindung an ihre BH3-Domäne neutralisiert (Willis *et al.*, 2005). Zytotoxische Stimuli bewirken eine Aktivierung der pro-apoptotischen *BH3-only* Proteine, die als Ersatz für die *Bax-like*-Proteine an die *Bcl-2-like*-Proteine binden müssen, um eine vollständige Aktivierung der *Bax-like*-Proteine zu gewährleisten.

Ein alternatives Modell (Letai *et al.*, 2002) postuliert, dass alle *BH3-only* Proteine entweder „Aktivatoren“ (*Activators*) oder „Sensibilisatoren“ (*Sensitizers*) sind. Aktivatoren wie t-Bid, Bim und PUMA aktivieren Bax/Bak direkt durch Interaktion, was deren Oligomerisierung bewirkt. Unter normalen Bedingungen sind die Aktivatoren jedoch durch Bindung an *Bcl-2-like* Proteine inaktiv. Erst Sensibilisatoren, wie Noxa, Bad und Bik, können durch Aktivierung nach zytotoxischem Stress die von *Bcl-2-like* Proteinen gebundenen Aktivatoren lösen.

Bei beiden Modellen kommt es zur Aktivierung und Homo-Oligomerisierung von *Bax-like* Proteinen an der äußeren mitochondrialen Membran. Das verursacht durch einen noch nicht geklärten Mechanismus die sogenannte *Mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP), das Öffnen von Megaporen in der äußeren mitochondrialen Membran. Zurzeit existieren zwei Modelle, die die Entstehung von MOMP zu erklären versuchen. Nach einem Modell wird MOMP durch eine Bax-/Bak-abhängige Öffnung von Kanälen in der äußeren mitochondrialen Membran verursacht. Die sogenannte *Permeability Transition Pore* (PTP), umfasst mitochondriale Kanäle, die die innere und

äußere mitochondriale Membranen umspannen. Sie sind für den kontrollierten Transport von Adenin-Nukleotiden oder anderen kleinen Molekülen verantwortlich. Die Hauptkomponenten dieses Kanals sind der *Voltage dependent anion channel* (VDAC) und der Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT). Deren Aktivität wird durch Bcl-2 und Bcl-XL reguliert (Hockenbery *et al.*, 1990; Bossy-Wetzel *et al.*, 1998; Tsujimoto Y und Shimizu S 2000; Shimizu *et al.*, 2000a und b). Man nimmt an, dass die synergistische Wirkung von Bcl-2-/Bcl-XL-Antagonisten und die proteolytische Caspase-Aktivität zur unkontrollierten permanenten Öffnung der PTP notwendig ist (Marzo *et al.*, 1998). Ein zweites MOMP-Modell basiert auf der Bildung von Poren in der äußeren mitochondrialen Membran durch Insertion von Bax- bzw. Bak-Oligomeren. Diese Hypothese gründet sich auf der strukturellen Ähnlichkeit aller Proteine der Bcl-2-Familie mit Poren-formenden bakteriellen Toxinen (Muchmore *et al.*, 1996). Bei beiden Modellen resultiert die Perforierung der äußeren mitochondrialen Membran in einem Einstrom von Flüssigkeit ins Mitochondrium. Die Volumenexpansion bewirkt eine Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran und damit die zyttoplasmatische Freisetzung von ungefähr 30, teils zytotoxischen intramitochondrialen Proteinen (Cheng *et al.*, 2001; Zamzami und Kroemer, 2003; van Loo *et al.*, 2000).

Diese kann man in drei funktionelle Gruppen einteilen:

- a) Nukleasen und Proteasen, wie EndoG und AIF die durch Caspase-unabhängige Mechanismen Apoptose auslösen (Susin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001)
- b) Caspase-Aktivatoren, wie Cytochrom *c*, das darüber hinaus ein essentieller Bestandteil der Atmungskette ist (Li *et al.*, 1997)
- c) *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with a low pI* (Smac/DIABLO) und die Serin-Protease *Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2* (Omi/HtrA2) (HtrA2), die die Inhibition von Caspasen durch die *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP)-Familie antagonisieren (Vaux und Silke, 2003).

Der intrinsische Apoptoseweg initiiert die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom *c*, welches unter ATP-Verbrauch die Oligomerisierung von Apaf-1 induziert (Zou *et al.*, 1999). Dieses bindet als Adapterprotein über eine CARD-Interaktionsdomäne an Procaspase-9 und aktiviert diese unter Bildung eines etwa 700 kDa großen Multiproteinkomplexes, den man auch als Apoptosom bezeichnet (Hu *et al.*, 1999). Zur Aktivierung benötigt Caspase-9 somit keine weitere Prozessierung. Sie ist bereits als

unprozessierte dimere Procaspase-9 proteolytisch-aktiv (Riedl *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004).

Ähnlich wie beim extrinsischen Apoptoseweg kommt es anschließend zur Aktivierung von nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -7, -6) durch Caspase-9.

Die proteolytische Aktivität der Caspasen wird beim intrinsischen Apoptoseweg durch die Familie der IAPs reguliert. Ein Caspase-inhibitorischer Effekt von cIAP-1, cIAP-2 und XIAP, den wichtigsten IAP-Mitgliedern, konnte für Caspase-3, -7 und -9 nachgewiesen werden, während IAPs keine Inhibition von Caspase-6 oder -8 induzieren (Deveraux und Reed, 1999; Salvesen und Duckett, 2000; Deveraux *et al.*, 1997; 1998; Roy *et al.*, 1997). Die Inhibition der Caspase-Aktivität durch IAPs wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen bewirkt: Einerseits hemmen sie die Caspase-Aktivität durch direkte Interaktion mit Caspasen, andererseits agieren sie als E3-Ubiquitin-Ligasen, die Caspasen ubiquitinieren, so dass diese durch das 26S Proteasom degradiert werden (Li *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001a; Huang *et al.*, 2000).

Im Fall eines starken apoptotischen Stimulus existieren mit Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) und HtrA2 (Hegde *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2001c; Verhagen *et al.*, 2002) zwei Proteine, die die Caspase-inhibitorische Wirkung der IAPs antagonisieren. Die zwei intramitochondrialen Proteine translozieren nach MOMP mit anderen pro-apoptotischen Proteinen, wie z.B. Cytochrom *c*, in das Zytoplasma, um direkt mit den IAPs zu interagieren und deren Caspase-inhibitorische Wirkung zu neutralisieren.

7 Fragestellung

Das 26S Proteasom stellt die zentrale proteolytische Maschinerie des hoch konservierten Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) dar. Dieses System ist für die Regulation und Aufrechterhaltung von wesentlichen zellulären Prozessen, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus, Gentranskription und Apoptose erforderlich. Durch Verwendung von selektiven und spezifischen Inhibitoren des 26S Proteasoms konnte veranschaulicht werden, dass die Inhibition des Proteasoms vorzugsweise in schnell proliferierenden und neoplastischen Zellen Apoptose induziert. Dieser Effekt ebnete den Weg von Proteasom-Inhibitoren, wie z.B. Bortezomib, in die Krebstherapie. In Folge von funktionellen Analogien zwischen neoplastischen Zellen und aktivierten Immunzellen ist jedoch auch eine Applikation von Proteasom-Inhibitoren in der Behandlung von dysregulierten Immunantworten denkbar. Sowohl neoplastische als auch aktivierte T-Zellen weisen eine akzelerierte Zellzyklus-Progression, eine gesteigerte Mitose-Rate und eine klonogene

Proliferation auf. Darüber hinaus zeigen DCs und aktivierte T-Zellen analog zu neoplastischen Zellen eine erhöhte Protein- und Zytokin-Expression, eine verstärkte Aktivität von NF- κ B und einen gesteigerten Stoffwechsel. DCs und T-Zellen stellen Schlüsselzellen des Immunsystems dar. Dysregulierte Immunantworten, wie bei Transplantatabstoßungen und Autoimmunerkrankungen, werden durch DCs initiiert und durch T-Zellen exekutiert. Anhand von Langzeit-Studien mit transplantierten Patienten konnte gezeigt werden, dass Standard-Immunsuppressiva, wie Cyclosporine A, das Lymphom-Risiko erhöhen (Opelz und Henderson, 1993; Stewart *et al.*, 1995; Opelz und Döhler, 2004). Deshalb wird nach alternativen immunsuppressiven Therapien gesucht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von Bortezomib als synthetischer und Epoxomicin und Lactacystin als biologische Proteasom-Inhibitoren auf humane, aus Monozyten generierte DCs und aktivierte CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Dabei umfasste die experimentelle Konzeption insbesondere die Analyse der Modulation von funktionellen und zum Teil essentiellen Eigenschaften der beiden Immunzelltypen. Dazu gehören z.B. endozytotische Aktivität und stimulatorische Kapazität bei DCs, Produktion von inflammatorischen Zytokinen für aktivierte CD4⁺ T-Zellen sowie Apoptose, Aktivierung des NF- κ B/Rel- und NFAT-Systems und Expression von relevanten Oberflächenrezeptoren bei beiden Immunzelltypen. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibitoren bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen charakterisiert werden, um einen sicheren therapeutischen Einsatz von Proteasom-Inhibitoren in Aussicht zu stellen.

Insgesamt sollten in der vorliegenden Arbeit die Effekte und Mechanismen nach Proteasom-Inhibition in aktivierten Immunzellen charakterisiert werden. Dieses soll darüber hinaus die Möglichkeit eröffnen, das 26S Proteasom als ein molekulares Ziel für die Therapie von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen definieren und nutzen zu können.

Material und Methoden

1 Material

1.1 Häufig verwendete Puffer

PBS (w/o Ca^+/Mg^+)	PBS (pH 7,4) (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
PBS/BSA:	PBS (pH 7,4) 0,1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, München)
Nicoletti-Puffer	0,1%(w/v) Natriumcitrat (Roth, Karlsruhe) 0,1% (w/v) Triton X-100 (Merck, Darmstadt) 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (Sigma)
2X SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris/HCl (pH 6,8) (Roth) 4% (w/v) SDS (Serva, Heidelberg) 20% (v/v) Glycerin (Roth) 0,02% (w/v) Bromphenolblau (Sigma) 400 mM DTT (Sigma)
4X SDS-Probenpuffer:	(wie 2X SDS-Probenpuffer nur zweifache Menge SDS und Bromphenolblau)
Laufpuffer (Gelelektroph.):	25 mM Tris 200 mM Glycin (Roth) ad 2 l mit aqua dest 0,1% (w/v) SDS zufügen
10x Transferpuffer: (Western Blot)	25 mM Tris 200 mM Glycin ad 2 l mit aqua dest

<i>blocking</i> -Puffer	PBS (pH 7,4) 5% (w/v) BSA 0,1% (v/v) TWEEN [®] (Roth)
RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl (Merck) 1% (v/v) Nonidet p40 (Merck) 0,5% (w/v) Natrium deoxycholat (Sigma) 0,1% (w/v) SDS 1 Tab Complete Mini Protease-Inhibitoren (Roche, Penzberg)
IP-Lyse-Puffer:	wie RIPA-Puffer nur ohne SDS und Protease- Inhibitoren
Zyto-Puffer:	250 mM Saccharose (Roth) 20 mM HEPES (pH 7,4) (Roth) 5 mM MgCl ₂ (Roth) 10 mM KCl (Roth) 1 mM EDTA (Sigma) 0,025% Digitonin (w/v) (Sigma) 1 Tab Complete Mini Protease-Inhibitoren
Mito-Puffer:	25 mM Tris/HCl (pH 7,2) 150 mM NaCl 2% CHAPS (w/v) (Sigma)
<i>stripping</i> -Puffer:	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 2% (w/v) SDS 100 mM 2-Mercapoethanol (Merck)

Homogenisierungs-Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	1 mM DTT
	5 mM MgCl ₂
	2 mM ATP (Amersham, Freiburg)
	250 mM Saccharose

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.2 Nährmedien

FCS-freies Kulturmedium (KM):	RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen)
	100 IU/ml Penicillin (Gibco-Invitrogen)
	100 µg/ml Streptomycin (Gibco-Invitrogen)
	2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München)

2%-FCS-KM:	FCS-freies KM (siehe oben)
	+ 2% (v/v) FCS-500 (Promocell, Heidelberg)

10%-FCS-KM:	FCS-freies KM (siehe oben)
	+ 10% (v/v) FCS-500

MLC-Medium	Medium 199 (Gibco-Invitrogen)
	40 mM HEPES
	100 IU/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	10% (v/v) humanes Serum von Blutgruppe AB ⁺ -Spendern

FCS und AB-Serum wurden vor der Zugabe durch 30 min Inkubation in 56 °C warmem Wasser inaktiviert.

1.3 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind gegen menschliche Proteine gerichtet.

1.3.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Name (Klon)	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CD3 (TZR)	SK7	Ms IgG1	FITC	BD Pharmingen
CD4	SK3	Ms IgG1	R-PE	BD Pharmingen
CD8	SK1	Ms IgG1	R-PE	BD Pharmingen
CD11c	B-ly6	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD14 (LPS-Rezeptor)	MEM-18	Ms IgG1	FITC	AL-immunotools
CD25 (IL-2-Rezeptor α -UE)	M-A251	Ms IgG1	APC	BD Pharmingen
CD27	M-T271	Ms IgG1	FITC	BD Pharmingen
CD28	KOLT-2	Ms IgG1	FITC	AL-Immunotools
CD36 (<i>platelet glycoprotein IV</i>)	IVC7	Ms IgG1	FITC	AL-immunotools
CD38 (ADP-ribosyl cyclase)	HIT2	Ms IgG1	PE	AL-immunotools
CD40 (TNF-R type V)	5C3	Ms IgG1	FITC	BD Pharmingen
CD54 (ICAM-1)	15.2	Ms IgG1	FITC	AL-immunotools
CD69 (<i>activation inducer molecule</i>)	FN50	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD80 (B7-1)	L307.4	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD83	HB15e	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD86 (B7-2)	2331 (FUN-1)	Ms IgG1	FITC	BD Pharmingen
CD95 (FAS/APO-1)	FAS 19	Ms IgG1	FITC	AL-immunotools
CD120b (TNF-R type II)	MR2-1	Ms IgG1	PE	Serotec
CD123 (IL-3R α -UE)	9F5	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD134 (OX40)	ACT35	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD152 (CTLA-4)	BNI3	Ms IgG2a	PE	BD Pharmingen
CD178 (FAS-/APO-1-L)	Alf-2.1a	Ms IgG1	FITC	Ancell, MN, USA
CD206 (MR)	19.2	Ms IgG1	PE	BD Pharmingen
CD209 (DC-SIGN)	DCN46	Ms IgG2b	FITC	BD Pharmingen
HLA-DR	1E5	Ms IgG1	FITC	AL-immunotools

1.3.2 *Antikörper für Western Blot*

Antigen (Klon)	Isotyp	Hersteller
β-Aktin (AC-15)	Maus monoklonal IgG	Sigma
AIF (E-1)	Maus monoklonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg (SC)
Bak (G-23)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Bax (N-20)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Bcl-2 (N-19)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Bcl-x_{S/L} (S-18)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
β1 (MCP421)	Maus monoklonal IgG	Biomol
β1i/LMP 2 (LMP2-13)	Maus monoklonal IgG	Biomol
β2	Maus monoklonal IgG	Biomol
β2/β2i (MECL-1)	Kaninchen polyklonal IgG	Biomol
β5	Kaninchen polyklonal IgG	Biomol
β5i/LMP 7 (LMP7-1)	Maus monoklonal IgG	Biomol
Bid (FL-195)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Bim (H-191)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Caspase 3	Kaninchen polyklonal IgG	Cell Signaling
Caspase 7p20 (B-5)	Maus monoklonal IgG	SC
Caspase 8 (1C12)	Maus monoklonal IgG	Cell Signaling
Caspase 8 (90A992)	Maus monoklonal IgG	SC
Caspase 9	Kaninchen polyklonal IgG	Cell Signaling
Caspase 9p10 (F-7)	Maus monoklonal IgG	Cell Signaling
CD 206 (C-20)	Ziege polyklonal IgG	SC
c-IAP-1 (H-83)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
c-IAP-2 (H-85)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Cyclin A (H-432)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Cyclin D2 (C-17)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Cytochrome c (7H8)	Maus monoklonal IgG	SC
COX IV	Kaninchen polyklonal IgG	Cell Signaling
c-FLIP_{S/L} (G 11)	Maus monoklonal IgG	SC
HLA-DR (Bra22)	Maus monoklonal IgG	SC
HPK1	Kaninchen polyklonal IgG	Cell Signaling
HtrA2 (1B3)	Maus monoklonal IgG	SC
ICAD (FL-331)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
IκBα (H-4)	Maus monoklonal IgG	SC
ILP (XIAP, A-7)	Maus monoklonal IgG	SC
Lamin A/C (H-110)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
Mcl-1 (22)	Maus monoklonal IgG	SC
NFAT c2 (4G6-G5)	Maus monoklonal IgG	SC
Noxa (114C307)	Maus monoklonal IgG	SC
p21 (C-19)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
p27 (F-8)	Maus monoklonal IgG	SC
p53 (DO-1)	Maus monoklonal IgG	SC
PARP (H-250)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
PCNA (FL-261)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
PUMA α/β (FL-193)	Kaninchen polyklonal IgG	SC
RelA/NF-κBp65 (F-6)	Maus monoklonal IgG	SC
RelB (N-17)	Ziege polyklonal IgG	SC
Smac (FL-239)	Kaninchen polyklonal IgG	SC

1.4 Geräte

Gerät		Hersteller
Brutschrank Hera cell 240		Heraeus
Durchflusszytometer FACScan		Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACScalibur		
Gefrierschränke	-20 °C -80 °C	Sanyo Liebherr
Heizbad		Memmert
Heizblock Thermomixer		Eppendorf
Mikroskop		Zeiss
Minigelelektrophoresekammer Mini-Protean III		Bio-Rad
Netzgerät		Bio-Rad
pH-Meter MP225		Mettler-Toledo
Spektrofluoreszenzgerät		Tecan
Sterilarbeitsplatz Sterigard Hood		Baker company
Zentrifugen Mikro 22R Rotanta P Rotixa 50		Hettich

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Gewinnung von humanen Monozyten und T-Zellen

Alle Arbeiten zur Isolation und Kultivierung primärer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Sie wurden daher in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte stets im Brutschrank (Heraeus) bei konstanten Bedingungen (37 °C, 5% CO₂).

2.1.1.1 Isolation CD14 positiver Monozyten mittels Adhärenz

Für die Isolation von humanen Monozyten wurden je nach weiterer Verwendung zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Die klassische Adhärenzmethode wurde verwendet, wenn die Zellen später mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Hierzu wurden zuerst mononukleäre Zellen durch Dichtegradient-Zentrifugation (Tripodi *et al.*, 1971) aus dem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Das mit 25000 IU des Gerinnungshemmers Heparin-Natrium (Braun, Melsungen) versetzte Blut wurde mit RPMI 1640 (Invitrogen) im Verhältnis 1:2 verdünnt. 20 ml Ficoll-Hypaque (Lymphodex®, InnoTrain, Kronberg/Taunus) wurden jeweils mit 30 ml dieses Gemisches in einem Polypropylen-Röhrchen (50 ml, Greiner-bio-one, Frickenhausen) vorsichtig

überschichtet. Anschließend wurde zentrifugiert (2500 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal in warmem PBS gewaschen (je 1000 rpm/8 min/ 20°C/ Bremse auf Stufe 6) und in mindestens 100 ml 2% FCS KM resuspendiert. Um eine Anreicherung von Monozyten zu erlangen, wurden die Leukozyten in sterile Gewebekulturplatten (Nunc, Wiesbaden) verteilt und für 2 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, während die adhärenen Monozyten mit warmem PBS vorsichtig abgespült und mit FCS-freiem KM weiter kultiviert wurden.

2.1.1.2 Isolation CD14⁺ Monozyten mittels negativer Isolation

Wenn die folgenden Analysen eine hochreine homogene Zellpopulation verlangten, wie es beispielsweise bei Western Blot, ELISA oder bei der Bestimmung der Proteasom-Aktivität der Fall ist, wurden die Monozyten mit Hilfe eines immunomagnetischen *bead*-basierten negativen Isolations-Kits von Dynal (Dynal-Invitrogen, Karlsruhe) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Das auf Ficoll-Hypaque überschichtete RPMI1640-Blut Gemisch wurde vor der Abnahme der Leukozyten zweimal zentrifugiert (160 g /20 min/ 20°C/ keine Bremse und 350 g/20 min/ 20°C/ keine Bremse). Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurden 20 ml des Überstandes, der hauptsächlich Thrombozyten enthält, abgenommen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde die vorliegende Leukozyten-Fraktion in ein frisches, steriles Röhrchen überführt. Die Zellen wurden danach dreimal mit eiskaltem PBS/BSA gewaschen (einmal: 400 g/8 min/ 4°C/ Bremse Stufe 7 und zweimal: 225 g/8 min/ 4°C/ Bremse Stufe 7) und auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in PBS/BSA eingestellt. Hierzu wurden 200 μ l/ 1×10^8 Zellen des Blocking-Reagenz und die gleiche Menge des Antikörpermixes hinzugefügt. Das Blocking-Reagenz enthielt γ -Globulin, welches die Fc-Rezeptoren der Monozyten neutralisiert und so eine mögliche unspezifische Bindung von Antikörpern verhindert. Der Antikörpermix enthielt Ms-Antikörper gegen humane CD2-, CD7-, CD16- (spezifisch für CD16a- und CD16b-), CD19-, CD56- und CD235a- (Glycophorin A-) Oberflächenrezeptoren, die somit an alle nicht-CD14 positiven Zellen binden. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen (einmal: 300 g/8 min/ 4°C/ Bremse Stufe 7), in 5 ml PBS/BSA resuspendiert und mit 1 ml/ 1×10^8 Zellen gewaschenen Dynabeads versehen. Dynabeads sind magnetische *beads* (Durchmesser 4,5 μ m) aus Polystyrol, die mit einem monoklonalen humanen anti-Ms Antikörper beschichtet sind und somit eine starke Affinität zu Ms-IgG-basierten Antikörpern haben. Diese Mischung wurde 20 min bei 4°C auf dem Rollenschüttler

inkubiert und anschließend zur Zerstörung von Antikörper-Dynabead-Rosetten mehrmals auf- und abpipettiert. Das Röhrchen wurde nachfolgend für mindestens 2 min in eine Magnetvorrichtung (Dyna) gestellt. Danach wurde der Überstand mit den isolierten CD14⁺ Monozyten in ein frisches Röhrchen pipettiert und die Zellen durch Zentrifugation (300 g/8 min/ 4°C/ Bremse Stufe 7) pelletiert.

Die Reinheit der Monozyten wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse von charakteristischen Zelloberflächenproteinen kontrolliert (Abb. 10).

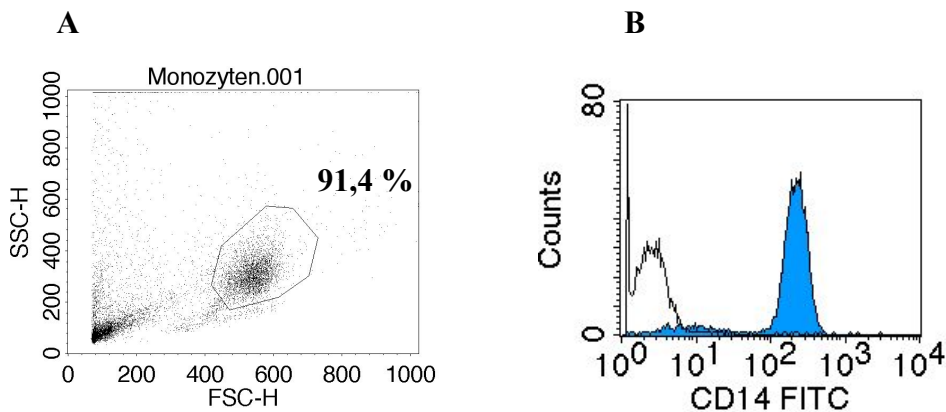


Abb 10: Durchflusszytometrische Kurzcharakterisierung von Monozyten. Nach der negativen Isolation der Monozyten mittels immunomagnetischer *beads* wurde die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurde der Anteil der Zellen mit typischer Lokalisation von Monozyten im FSC/SSC im Vgl zu anderen Zellen (A) und die Expression des charakteristischen Monozyten-Oberflächenproteins CD14 der in (A) eingegrenzten Zellen bestimmt (B). Zur Anfärbung der Zellen wurde der monoklonale Antikörper (mAk) anti-CD14 (MEM-18) verwendet. Die linke Kurve im Diagramm B zeigt die Isotyp-Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zehn unabhängigen Experimenten

2.1.1.3 Isolation von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen mittels negativer Isolation

Um reine Populationen von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen zu erhalten, verwendet man mit der auf immunomagnetischen *beads* basierten negativen Isolation (Dyna) das gleiche Verfahren wie zur Isolation der Monozyten (s. 2.1.1.2). Aufgrund dessen unterscheidet sich das Protokoll nur an wenigen vernachlässigbaren Stellen.

Die Reinheit der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse von charakteristischen Zelloberflächenproteinen kontrolliert (Abb. 11).

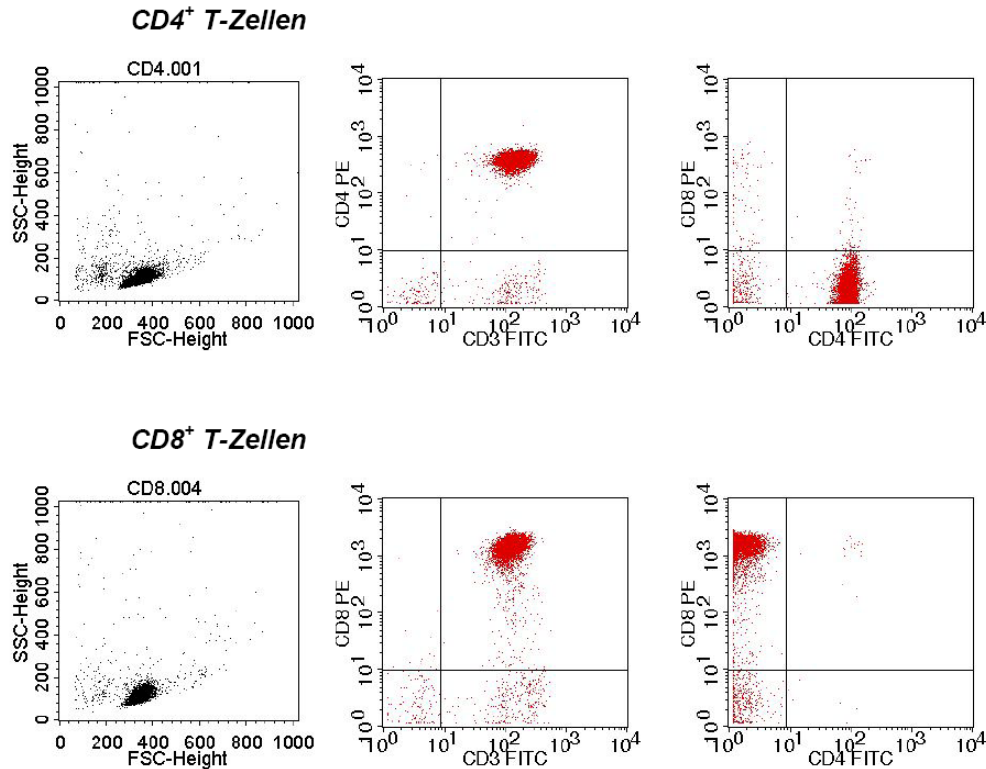


Abb. 11: Durchflusszytometrische Charakterisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Nach der negativen Isolation der T-Zellen mittels immunomagnetischer *Beads* wurde die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurde die Expression von den charakteristischen gegenüber den nicht exprimierten CD4⁺- und CD8⁺- T-Zell-Oberflächenproteinen bestimmt. Die Zellen wurden mit den spezifischen mAk anti-CD3 (SK7), anti-CD4 (SK3) und anti-CD8 (SK1) angefärbt und ohne Verwendung eines gates durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment von zehn unabhängigen Experimenten.

2.1.2 Generierung dendritischer Zellen (DC)

Die Methode der Ausreifung von Monozyten zu unreifen und reifen DCs (iDC und mDC) beruht auf einer von Faries *et al.* beschriebenen Methode (Faries *et al.*, 2001). Das dort beschriebene Verfahren hat gegenüber dem klassischen 7 Tage umfassenden Protokoll zur Generierung von mDCs (Romani *et al.* 1997) den Vorteil, dass man innerhalb von 3 Tagen bereits ausdifferenzierte mDCs zur Verfügung hat. Dazu wurden die frisch isolierten Monozyten mit FCS-freiem-KM gelöst und auf eine Zellkonzentration von 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Um eine Differenzierung der Monozyten zu iDCs zu induzieren wurden zusätzlich 50 ng/ml GM-CSF und 100 ng/ml IL-4 (beides von AL-Immunotools) hinzugefügt. Die Zellen wurden für die nächsten zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Zu der nun folgenden Generierung von mDCs aus iDCs wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurden die iDCs für 24 h mit 50 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF- α (AL-Immunotools) und 1000 IU/ml IFN- γ (AL-Immunotools)

inkubiert, wobei für die letzten 18 h zusätzlich 1 µg/ml CD40L (AL-Immunotools) hinzugegeben wurde. Für die Messung von RelA und RelB sowie zur Aktivierung der T Zellen wurden die iDCs zur Ausreifung für 24 h mit 100 ng/ml LPS (Sigma) und 1000 IU/ml IFN-γ inkubiert.

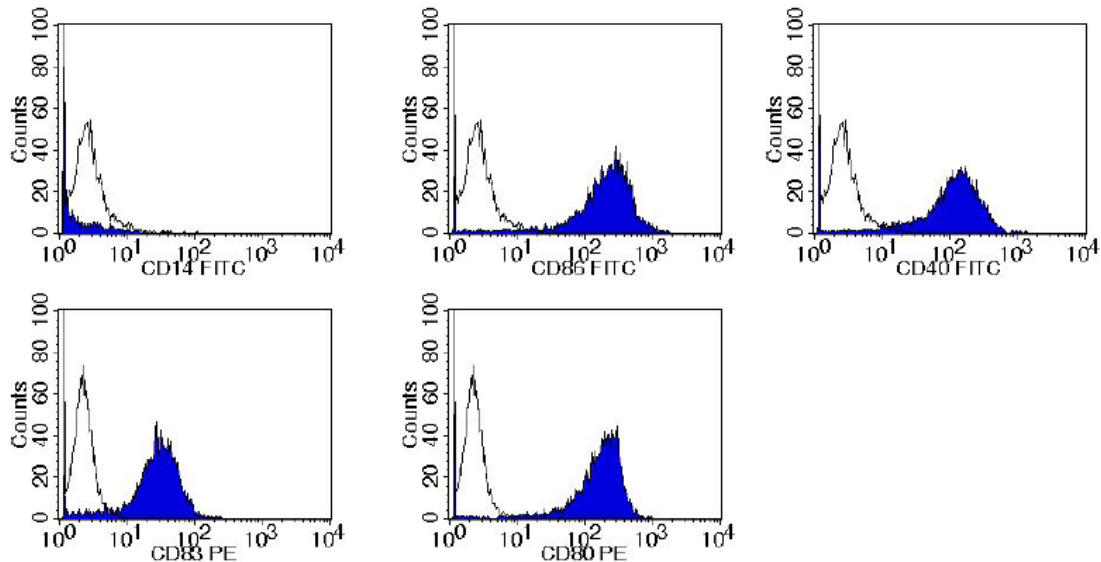


Abb. 12: Durchflusszytometrische Charakterisierung von mDCs. Nach Generierung der mDCs wurde der Reifegrad der Zellen anhand der Expression charakteristischer Oberflächenproteine ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit den spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten mAk anti-CD14 (MEM-18), anti-CD40 (5C3), anti-CD80 (L307.4), anti-CD83 (HB15e) und anti-CD86 (2331 (FUN-1)) angefärbt und die Expression unter Verwendung eines DC-spezifischen gates durchflusszytometrisch bestimmt. Die weiße Fläche unter der Kurve symbolisiert die jeweilige Isotyp-Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zehn unabhängigen Experimenten

2.1.3 *Allogene und autologe T-Zell-Stimulation*

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Proteasom-Inhibition auf funktionelle Eigenschaften von DCs, wurde die Fähigkeit von mDCs zur Aktivierung von allogenen CD4⁺- und CD8⁺- und autologen CD4⁺-T-Zellen bestimmt. Die Aktivierung wurde anhand der T-Zell-Proliferation gemessen, die sich wiederum proportional zur DNA-Synthese verhält. Der Einbau von Tritium-markierten Deoxythymidin ([³H]-Thymidin) in neu synthetisierte DNA ermöglichte die Bestimmung der Zellproliferation. Für die autologe Stimulation wurden DCs und T-Zellen aus dem Blut des gleichen Spenders, bei der allogenen Stimulation DCs und T-Zellen aus dem Blut von zwei HLA-nicht identischen Spendern generiert bzw. isoliert. Um eine Aktivierung von autologen T-Zellen zu gewährleisten, müssen mDCs ein Fremd-Antigen präsentieren. Dazu wurden die Zellen am zweiten Tag der Differenzierung von Monozyten zu iDCs mit 100 µg/ml Ovalbumin (Sigma) versetzt. Die endozytotisch aktiven iDCs nehmen das Ovalbumin auf und prozessieren es zu Antigen-Peptiden. Ausgereifte DCs präsentieren diese Peptide dann

CD4⁺ T-Zellen auf MHC Klasse II-Molekülen. Die mDCs wurden nach Abschluß der Differenzierung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren für 24 h in 10% FCS KM kultiviert. Nach Ernten der Zellen mittels Zellschaber, ausgiebigem Waschen mit warmem PBS (1700 rpm/8 min/20°C/Bremse Stufe 7) und Resuspension in 10% FCS KM, wurde die Anzahl nicht apoptotischer mDCs durch Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Bevor DCs und T-Zellen für 5 Tage im Brutschrank kokultiviert wurden, musste die Zahl der Zellen eingestellt werden. Dabei wurden die T-Zellen nach Isolation auf konstant 2,25 x 10⁶ Zellen/ml in 10% FCS-KM eingestellt und die Anzahl der mDCs so variiert, dass unterschiedliche DC-/T-Zell-Verhältnisse entstanden. Von beiden Zellsuspensionen wurden jeweils 100 µl in eine 96-well Platte pipettiert. Für die letzten 16 h der Kokultur wurden 5 µCi/ml [³H-]Thymidin hinzugefügt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellernter (Inotech, Wohlen, Schweiz) auf Glasfaserfilter (Dunn, Asbach) abgesaugt und der Einbau von [³H-]Thymidin mit einem β-Zähler (Inotech, Wohlen) gemessen.

2.2 Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Die Auswirkungen der Proteasom-Inhibition auf funktionelle und phänotypische Eigenschaften von Immunzellen wurden auch an ruhenden und aktivierten CD4⁺ T-Zellen untersucht. Des Weiteren wurde die Art der Apoptose-Induktion bei aktivierten von CD4⁺-Zellen analysiert. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen erfolgte dazu analog, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, durch allogene Kokultur mit mDCs in 24 bzw. 96 well-Platten (Endvolumen 1 ml bzw. Endvolumen 200 µl, beide Greiner) in einem fixen DC-/T-Zell-Verhältnis von 1:10. Diesmal erfolgte jedoch keine Vorbehandlung der DCs mit Proteasom-Inhibitoren. Stattdessen wurden die Inhibitoren 24 h vor Beendigung der Kokultur, also vom vierten auf den fünften Tag, zur Kokultur hinzugefügt. Naive, ruhende T-Zellen wurden direkt nach der Isolation mit den Proteasom-Inhibitoren in 10% FCS KM inkubiert.

2.3 Proteasom-Inhibitoren

Als Solvent für die Proteasom-Inhibitoren wurde stets DMSO verwendet. Nach Auflösen und Aliquotierung der Inhibitoren wurden diese bei -20°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentration des leicht toxischen DMSO 1% Endkonzentration in der Zellkultur nicht überschritt. Die Inkubationszeit betrug maximal 24 h.

Zur Analyse der Translokation von RelA und RelB bei DCs wurden die Inhibitoren 1 h vor Zugabe der Reifungsstimuli hinzugefügt.

Zur Bestimmung der Caspase-abhängigen CD4⁺ T-Zell-Apoptose wurden die Zellen 1 h vor Bortezomib-Zugabe mit dem Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk (Bachem, Weil am Rhein) inkubiert. Zur Bestimmung der ROS-abhängigen CD4⁺ T-Zell-Apoptose wurden die Zellen 2 h vor Bortezomib-Zugabe mit 1 mM des ROS-Fängers N-Acetylcystein (NAC) oder mit 100 nM des NADH Dehydrogenase (Komplex I)-Inhibitors inkubiert.

2.4 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurde entweder ein FACScan oder ein FACScalibur (beide BD Biosciences) verwendet. Um die Geräte für Mehrfarbenanalysen einzustellen (Kompensation), wurde für jeden verwendeten Fluoreszenzfarbstoff ein Kontrollansatz gemessen, bei dem ein stark exprimiertes Zelloberflächenprotein (z.B. CD3 auf T Zellen, CD14 auf Monozyten, CD86 auf DCs) mit einer anders gefärbten Isotypkontrolle verglichen wurde. Mit diesem Verfahren wurde die Farbkompensation eingestellt.

2.4.1 Zelloberflächenprotein-Analyse

Zur Analyse von Zelloberflächenproteinen wurden stets direkt gefärbte Antikörper benutzt. Dazu wurden die Zellen (je nach Ansatz 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen) mit PBS gewaschen (1300 rpm/8 min/ 20°C/ Bremse Stufe 2) und in PBS resuspendiert. Pro FACS-Röhrchen (Greiner-Bio one, Frickenhausen) wurden 200 µl der Suspension verwendet und die empfohlene Menge (5 – 20 µl) des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und die Zellen anschließend mit 2 ml PBS sedimentiert (1300 rpm/8 min/ RT/ Bremse Stufe 2). Die Zellen wurden abermals in 200 µl PBS resuspendiert und sofort im Durchflusszytometer gemessen.

2.4.2 Apoptose-Analyse

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose von T-Zellen wurde die Bindung von FITC-markiertem Annexin V an der Zelloberfläche sowie die Inkorporation von Propidiumiodid (PI) in die DNA bestimmt. Wenn Zellen in Apoptose gehen, ist die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite der Zellmembran ein frühzeitiges Ereignis (Flip-Flop-Mechanismus). Dies kann durch Fluoreszenzfarbstoff-markiertes Annexin V, das an Phosphatidylserin bindet, gemessen werden kann (Vermes *et al.*, 1995). Während der Nekrose bilden sich Löcher in der Zellmembran, so dass Annexin V an Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran binden und keine Unterscheidung zwischen früher Apoptose und später

Nekrose möglich ist. Deshalb wird die FITC-Annexin V Markierung mit einer PI-Färbung kombiniert. PI kann nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also nekrotische Zellen, eindringen und dort mit der DNA interkalieren. Auf diese Weise kann man apoptotische (Annexin V⁺/PI⁻ und Annexin V⁺/PI⁺) von nekrotischen Zellen (Annexin V⁻/PI⁺) unterscheiden.

Zur Apoptose-Analyse wurden pro Ansatz 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen (1300 rpm/8 min/ RT/ Bremse Stufe 2), in 200 μ l 1X Binding buffer (BD biosciences) resuspendiert und auf FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden jeweils 5 μ l Annexin V-FITC (BD Biosciences) und 10 μ l PI-Lösung (1 mg/ml Endkonzentration, Sigma) hinzugefügt und der Ansatz für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

Um eine möglichst spezifische Bestimmung der Apoptose von Monozyten und DCs zu gewährleisten, war es erforderlich, andere in der Kultur vorkommende Zelltypen von der Messung auszuschließen. Deshalb wurden die Zellen vor dem Apoptose-Ansatz mit einem PE-markierten Antikörper gegen das auf Monozyten und DCs stark exprimierte CD11c angefärbt. Erst danach wurde zur Analyse der Apoptose die Gegenfärbung mit FITC-markiertem Annexin V durchgeführt. Die zusätzliche Färbung mit PI zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose wurde bei der DC-Apoptose-Analyse wegen sich gegenseitig störender Fluoreszenzen von PE mit PI vermieden. In die Auswertung der Daten wurden durch Verwendung einer *regate*-Prozedur nur CD11c⁺ Zellen einbezogen.

Mit folgender Formel nach Dhein *et al.* (2002) wurde die spezifische Apoptose (sA) für die Apoptose-Analyse von CD4⁺ T-Zellen bestimmt:

$$sA(\%) = 100 \times \frac{A_E - A_C}{100 - A_C}$$

A_E = Annexin⁺/PI⁺ Zellen bzw. Annexin⁺/11c⁺ (Experiment)

A_C = Annexin⁺/PI⁺ Zellen Annexin⁺/11c⁺ (Kontrolle)

2.4.3 Zellzyklus-Analyse

Zur Analyse des Zellzyklus von aktivierten und mit Proteasom-Inhibitoren behandelten CD4⁺ T-Zellen wurde eine Methode von Nicoletti *et al.* (1991) verwendet. Hierbei wird der intrazelluläre DNA-Gehalt nach Permeabilisierung der Zellmembran mit einem hypotonen Puffer und Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch

bestimmt. Anhand von charakteristischen Histogrammen kann man die verschiedenen Zellzyklus-Phasen unterscheiden.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen (1300 rpm/8 min/ RT/ Bremse Stufe 2), 400 μ l Nicoletti-Lösung hinzugefügt, die FACS-Röhrchen gevortext und für 30 min bei 4°C im Dunkeln belassen. Der hypotone Puffer rupturiert die Zellmembran, nicht aber die Kernmembran, PI gelangt in den Kern, wo es mit der DNA interkalieren kann. Diese DNA-Anfärbung kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Bei apoptotischen Zellen ist die DNA durch Nukleasen bereits in kleine Fragmente gespalten. Diese erscheinen im Histogramm als flacher hypodiploider Peak (sub-G₁-Phase) vor dem leicht unterscheidbaren diploiden G₁-Peak (2n) und G₂-Peak (4n). Zwischen G₁- und G₂-Peak liegt die S-Phase (>2n), in der die DNA-Synthese stattfindet (Abb. 13).

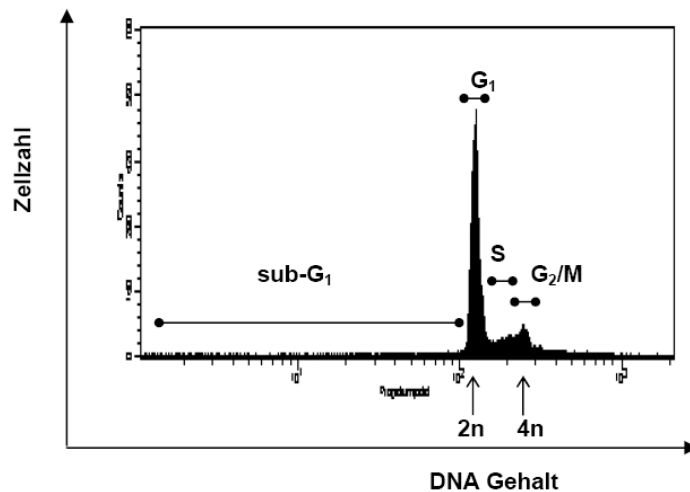


Abb. 13: Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti *et al.* (1991). Erläuterungen s. Text.

2.4.4 Analyse von Endozytose und Makropinozytose

Zur Untersuchung des Effekts von Proteasom-Inhibitoren auf Rezeptor-vermittelte Endozytose und Makropinozytose von iDCs wurden die Zellen 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Danach wurden die Zellen ausgiebig in warmem PBS (1700 rpm/8 min/20°C/Bremse Stufe 7) gewaschen und in 10% FCS KM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mg/ml FITC-markiertem Dextran oder Lucifer Yellow (LY) für 30 oder 60 min bei 4°C im Kühlschrank oder 37°C im Brutschrank inkubiert. Bevor die iDCs durchflusszytometrisch analysiert wurden, mussten die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und intensiv mit kaltem PBS gewaschen (1300 rpm/8 min/ RT/ Bremse Stufe 2) werden.

2.5 Wright-Färbung

Die Eosin-Methylenblau-Färbung nach Wright erlaubt eine Differenzierung zwischen DNA und Zytoplasma der Zelle und wurde zur mikroskopischen Analyse der Morphologie von aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach Proteasom-Inhibition verwendet. Dabei verbindet sich der anionische Farbstoff Eosin mit positiv geladenen Bestandteilen, wie z.B. zytoplasmatischen Proteinen, was ihnen eine rosa bis rote Farbe verleiht. Dagegen interagiert der basische Farbstoff Methylenblau mit negativ geladenen Bestandteilen in den Zellen wie z.B. DNA und Ribosomen und gibt ihnen eine blaue bis violette Farbe.

Aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden auf Objektträgern (OT) ausgestrichen, luftgetrocknet und anschließend mit Methanol fixiert. Die OTs wurden anschließend für zwei min in Wright-Stain-Lösung (6 g Wright-Stain in 3,8 l 99% Methanol) und danach für fünf min in modifiziertem Wright-Puffer (0,4% Wright-Stain-Lösung in Pufferlösung nach Weise, pH 6,8) inkubiert. Nachfolgend wurden die OTs für etwa 1 min in Aqua dest. gespült, luftgetrocknet und schließlich mikroskopisch analysiert.

2.6 T-Zell Proliferationsanalyse

Als Maß der T-Zellproliferation wurde die DNA-Synthese anhand des Einbaus von Tritium-Thymidin ([³H]-Thymidin, Amersham) gemessen. Für den Versuch wurden aktivierte T Zellen in 96 Loch Platten, zu welchen die Proteasom-Inhibitoren bzw. das gleiche Volumen an DMSO als Kontrolle hinzugefügt wurden, verwendet. Nach 6 h Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zugabe von 20 µl einer [³H]-Thymidin-HBSS-Lösung (Endkonzentration 5 µCi/ml) gepulst und die Kokultur für weitere 18 h inkubiert. Die Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporation erfolgte analog wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

2.7 ELISA aus mDCs

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine aus mDC-Kulturüberständen wurde das ELISA Verfahren verwendet. mDCs wurden für 24 h mit Proteasom-Inhibitoren bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zellkulturüberstände durch Zentrifugation gewonnen. Die Durchführung der IL-12p70 und IL-12p40 ELISAs richtete sich nach den Herstellerangaben (R&D Systems, Wiesbaden).

2.8 ELISA, Proliferation und Oberflächenrezeptoren aus Restimulations-T-Zell-Kultur

Da auch DCs einige der von T-Zellen produzierten Zytokine, wie beispielsweise TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-10, in den Zellüberstand sezernieren, verfälscht eine Analyse der

Zytokine direkt aus dem Überstand der DC/T-Zell Kokultur die Ergebnisse. Um dieses zu verhindern, wurden die T-Zellen nach Inkubation mit 1 nM, 5 nM oder 10 nM Bortezomib bzw. DMSO Kontrolle aus der 24-Loch-Platte entfernt, mit PBS gewaschen und die Anzahl nicht apoptotischer Zellen nach Trypanblau-Färbung durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde auch festgestellt, dass die Zahl der noch vorhandenen DCs vernachlässigbar ist. Die T-Zellen wurden in 10% FCS KM resuspendiert, so dass die Zellzahl 5×10^5 Zellen/ml in jedem Ansatz betrug. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 0,5 ml in eine 24 Loch Platte verteilt und mit 0,5 ml der folgenden Suspensionen im Brutschrank inkubiert:

1. $0,25 \times 10^4$ DCs/ml in 10% KM vom gleichen Spender wie in der initialen Kokultur
2. $0,25 \times 10^4$ DCs/ml in 10% KM von einem anderen allogenen Spender
3. 3,9 μ g/ml (in MLC-Medium) *pokeweed* (wiss.: *Phytolacca americana*)-Mitogen (PWM), (Sigma).

Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, abzentrifugiert (10000 g/10 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der resultierende Überstand abermals in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Überstände wurden bis zur ELISA-Analyse bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Zytokine wurde mit ELISA-Kits von R&D (Wiesbaden; IL-2, IL-2 sR α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 2) und Hycult biotechnology (Uden, Niederlande; IFN- γ) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Zusätzlich wurden auch Proliferations- und Zelloberflächenrezeptoren-Ansätze in 96- bzw. 24-well Platten der T-Zell-Restimulations-Kokultur angesetzt, wobei einerseits der Einbau von 3 H-Thymidin in die DNA innerhalb 24 h als auch die Veränderung der Oberflächenrezeptoren durchflusszytometrisch bestimmt wurden (s. 2.4.1 und 2.4.3).

3 Proteinchemische Methoden

3.1 Herstellung von Zelllysaten

3.1.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Die Zellen wurden entweder per Zellschaber (DCs) von der Gewebekulturschale oder durch mehrmaliges Pipettieren (T-Zellen) geerntet und mit kaltem PBS zweimal gewaschen (1700 rpm/8 min/20°C/Bremse Stufe 7). Die entstandenen Pellets wurden anschließend mit RIPA-Puffer resuspendiert und durch Vortexen bzw. wiederholtes Pipettieren lysiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden der nicht lysierte

Zelldebris und die Nuklei durch Zentrifugation (10000 g/10 min/4°C/Bremse Stufe 9) pelletiert und der dem Ganzzelllysat entsprechende Überstand in ein frisches Eppendorf-Tube überführt.

3.1.2 Nukleus- und Zytoplasma-Extraktion

Zur Extraktion von nukleären- und zytoplasmatischen Proteinen wurden die Zellen, wie oben beschrieben, geerntet und der NE-PER[®] Extraktionskit von Pierce (Bonn) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

3.1.3 Mitochondrien- und Zytoplasma-Extraktion

Die Extraktion von mitochondrialen und zytoplasmatischen Proteinen wurde nach der Methode von Nencioni *et al.* (2005) durchgeführt: 5×10^6 Zellen wurden in 100 µl Zytoplasma-Puffer lysiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (1000 g/2 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der Überstand als Zytoplasma-Fraktion in ein frisches Eppendorf-Tube überführt. Das übriggebliebene Pellet wurde in Mito-Puffer durch 1 minütiges Vortexen auf höchster Stufe erneut lysiert, abzentrifugiert (10000 g/2 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der entstandene Überstand als Mitochondrien-Fraktion in ein frisches Eppendorf-Tube überführt. Beide Fraktionen wurden entweder gleich im Western Blot verwendet oder zum Lagern bei -80°C eingefroren.

3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-PA-Gele benutzt. Diese setzen sich aus einem 4% Acrylamid-Sammelgel und 7,5% oder 12% Acrylamid-Trenngelen zusammen und wurden von der Firma BioRad bezogen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des RC DC-Proteinassays von BioRad nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.* 1951) gemäß den Angaben des Herstellers. Vor dem Auftragen der Zellysate auf das Gel wurden sie mit 4X SDS-Probenpuffer (1X Endkonzentration) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer 5436). Zur späteren molekularen Größenbestimmung der Banden wurde ein vorgefärbter Größenstandard (broad-range, BioRad, München) hinzupipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für 2 h.

3.2.1 In situ trapping von proteolytisch-aktiven Caspasen

Zur Detektion und Analyse proteolytisch-aktiver Caspasen wurden Caspase-Aktivitäts-Blots entwickelt. Hierzu wurde der biotinylierte Peptid-basierte Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk (bVAD, Sigma) verwendet. bVAD bindet kovalent und irreversibel an das Cystein des aktiven Zentrums von Caspasen und markiert die proteolytisch-aktiven

Caspase-Untereinheiten (Ekert *et al.*, 1999). Anschließend wurden die proteolytisch-aktiven Caspase-Fragmente durch Verwendung von Streptavidin-beschichteten Sepharose[®]-beads präzipitiert. Hierzu wurden je 2×10^7 aktivierte CD4⁺ T Zellen nach der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren bzw. DMSO-Kontrolle für 1 h mit 20 μ M bVAD im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen (1700 rpm/8 min/20°C/Bremse Stufe 7) und in 500 μ l IP-Lysepuffer, supplementiert mit 20 μ M bVAD, durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert (10000 g/10 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Tube überführt. Um unspezifische Bindungen an Sepharose[®] zu verhindern, wurde das Lysat mit 40 μ l gewaschenen Sepharose[®] 4B beads (Sigma) für 1 h bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Das Lysat wurde dann abzentrifugiert (10000 g/10 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Tube überführt. Dabei wurden 50 μ l als "Input" in ein frisches Röhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Nachdem die Lysate auf die Proteinkonzentration der Probe mit der niedrigsten Proteinkonzentration eingestellt waren, wurden zu jeder Probe 40 μ l gewaschene Streptavidin-beschichtete Sepharose[®]-beads (Zymed-Invitrogen) hinzugefügt. Anschließend wurden die Eppendorf-Tubes unter ständigem Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Streptavidin-beschichteten Sepharose[®]-beads zweimal mit kaltem IP-Lysepuffer ohne Protease-Inhibitoren und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (10000 g/30 s/4°C/Bremse Stufe 9). Die Sepharose[®]-Streptavidin-Bindung wurden durch Zugabe von 80 μ l 2X SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C für 10 min gelöst. Die nach kurzem Anzentrifugieren im Überstand vorhandenen bVAD markierten Proteine wurden sogleich auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.2.2 Western Blot

Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurde das Mini Trans-Blot[®] cell Gerät von BioRad nach dem wet-Transfer-Prinzip verwendet. Dazu wurde entweder eine Nitrocellulose- oder eine zuvor für 20 Sekunden mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran (Hybond-LFP, Amersham) auf das Gel gelegt und dann zusammen mit je zwei Transferpuffer-befeuchtete Supportpads und Filterpapieren in eine Gelhalter-Kassette eingespannt. Die Kassette wurde dann im Trans-Blot-Modul eingesetzt und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank gestellt. Die Immobilisierung der Proteine auf der Membran erfolgte dann entweder 16 h über Nacht bei konstant 90 mA oder für 1 h bei konstant 240 mA. Nach dem Blot wurden die

unspezifischen Bindungsstellen der Membranen durch 1 h Inkubation in *blocking*-Puffer blockiert.

3.2.2.1 Detektion gebundener Proteine

Zur Detektion der Proteine wurden die spezifischen Antikörper entweder in 5% Magermilch/PBS/0,1% TWEEN[®] oder 5% *blocking*-Puffer verdünnt und die Membran unter Schütteln entweder für 2 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen nach der Inkubationszeit dreimal intensiv für 10 min mit PBS/TWEEN[®] gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 1 h bei RT mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern in 5% Magermilch/PBS/0,1% TWEEN[®] unter Schütteln inkubiert, erneut dreimal intensiv gewaschen und abschließend zur Entfernung des bei der Detektion störenden TWEEN[®] in PBS gelagert. Die geblotteten Polypeptide wurden über einen ECL-Detektion-Kit (Super West Femto detection kit, Pierce oder ECL Plus, Amersham) nach Angaben des Herstellers und ECL-sensitive Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham) in einer Entwicklermaschine (Agfa Gevamic 60) sichtbar gemacht.

Sollte bei einer bereits verwendeten Membran eine weitere Immundetektion durchgeführt werden, wurden zuvor die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper wieder abgelöst. Dazu wurde die Membran 30 min bei 50°C in *stripping*-Puffer unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS/TWEEN[®] gewaschen und nach erneuter Blockierung mit *blocking*-Puffer den bereits beschriebenen Inkubations- und Waschschrinen unterzogen.

3.2.3 *Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren durch Affinitätsmarkierung der proteolytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten*

Zur Bestimmung des inhibitorischen Profils und der geeigneten Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren wurde die Methode der Affinitätsmarkierung nach Kessler *et al.* verwendet (2001). Dabei markiert die Aktivitäts-basierte Sonde Ada-Lys(biotinyl)-(Ahx)₃-(Leu)₃-vinyl-sulphon, analog zur Affinitätsmarkierung von proteolytisch-aktiven Caspase-Untereinheiten mit bioALVS (Kapitel 3.2.1) die katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten.

5×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren für 1 h im Brutschrank inkubiert. Zur anschließenden Lyse der Zellen wurde die *bead smashing*-Technik verwendet: etwa 5×10^6 Zellen/ml wurden dreimal in eiskaltem PBS gewaschen (1000 g/5 min/4°C/Bremse Stufe 9) und der Überstand abgenommen. Zu dem

entstandenen Pellet wurde das gleiche Volumen an Glaskügelchen ($\geq 106 \mu\text{m}$, Säuregewaschen, Sigma) und das doppelte Volumen an Homogenisierungs-Puffer hinzugefügt. Danach wurden die Zellen zur Lyse auf höchster Stufe für 1 min gevortext. Glaskügelchen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10000 g/5 min/4°C/Bremse Stufe 9) entfernt. Um restliche intakte Zellen und Nuklei vom Lysat abzutrennen, wurde das entstehende Homogenat ein zweites Mal zentrifugiert (10000 g/20 min/4°C/Bremse Stufe 9). Nachdem die Zelllysate auf 25 μg Protein/Ansatz eingestellt waren, wurden 3 μg der bioALVS hinzugefügt und die Proben für 2 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 4X Probenpuffer (1X Endkonzentration) hinzugefügt, die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und weiter verfahren wie in Kapitel 3.2 (SDS-PAGE) und 3.2.2 (Western Blot) beschrieben. Zur Detektion der Biotin-markierten proteolytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten wurden die Membranen für 1 h mit 1:5000 Streptavidin-HRP (Zymed-Invitrogen, Karlsruhe) oder mit Vectastain in Blocking-Puffer unter Schütteln inkubiert, danach intensiv mit PBS/TWEEN[®] und abschließend mit PBS gewaschen. Die geblotteten und markierten Polypeptide wurden mittels Super Signal West Pico (Pierce) oder ECL-Plus (GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, detektiert.

3.2.4 Densitometrische Analyse

Wenn angegeben, wurde die Software **ImageJ** (Version 1.37, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) zur Quantifizierung der Signalintensitäten von Western Blots verwendet.

3.3 Statistik

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, mindestens dreimal mit Zellen von mindestens drei verschiedenen Spendern wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) von mindestens drei repräsentativen Messungen dargestellt oder es wurden repräsentative Einzelexperimente gezeigt, die als solche in den Abbildungen gekennzeichnet sind. Die Datenanalyse erfolgte über den Student's t-Test mit Hilfe der Excel[®] Software (Microsoft, Unterschleißheim). Die Differenz von Werten mit $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt.

Ergebnisse

1 Suppression essentieller Immunfunktionen von DCs durch Proteasom-Inhibition

1.1 Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren in mDCs

Zur Bestimmung des inhibitorischen Profils der eingesetzten Proteasom-Inhibitoren Bortezomib, LC und EPM bei mDCs wurde die Methode der Affinitätsmarkierung nach Kessler *et al.* (Kessler *et al.*, 2001) verwendet. Diese hat gegenüber der häufig verwendeten Aktivitätsanalyse mit spezifischen fluorogenen Peptid-Substraten den Vorteil, zwischen der katalytischen Aktivität der konstitutiven und den durch IFN- γ induzierten Immunoproteasom-Untereinheiten differenzieren zu können. Des Weiteren erlaubt die Affinitätsmarkierung eine spezifische Zuordnung der Inhibitorwirkung zu einzelnen, katalytisch-aktiven β -Untereinheiten. Die verwendete biotinylierte Aktivitätsbasierte Sonde bioALVS wurde speziell für die Affinitätsmarkierung entwickelt. Sie visualisiert zu gleichen Teilen die katalytische Aktivität aller konstitutiven und immunoproteasomalen β -Untereinheiten. Für die Untersuchung des Wirkungsspektrums der Proteasom-Inhibitoren wurden aus Monozyten generierte und mit LPS und IFN- γ ausgereifte mDCs verwendet.

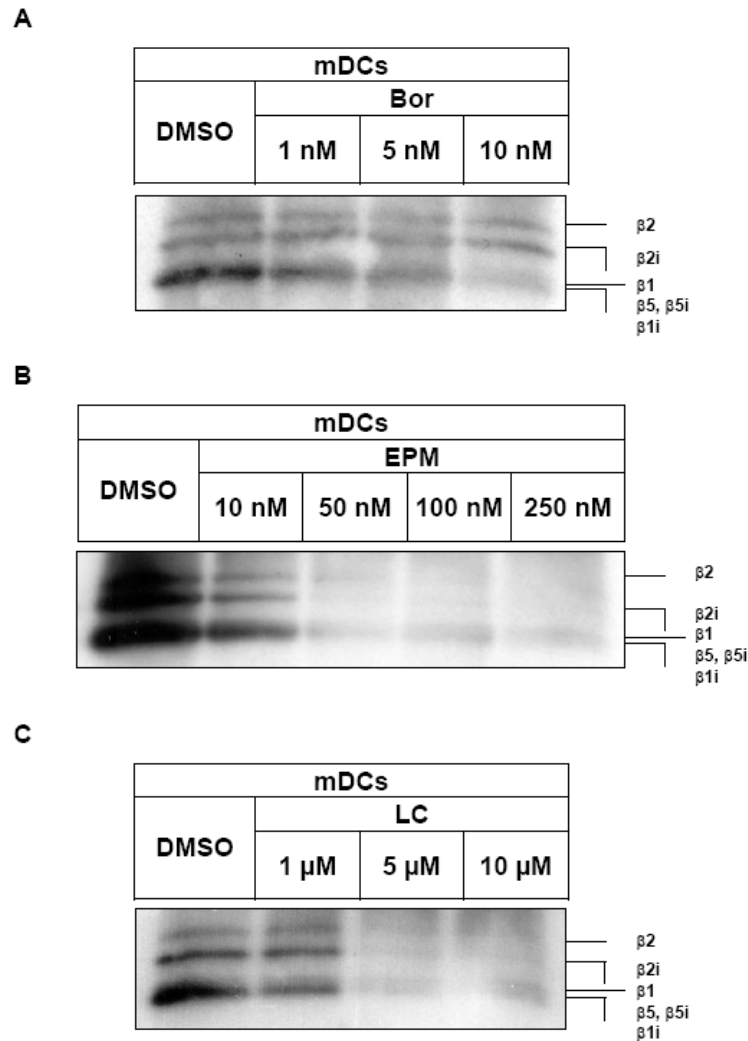


Abb. 14: Bestimmung des inhibitorischen Profils von Bortezomib (Bor) (A), EPM (B) und LC (C) in mDCs durch Affinitätsmarkierung. Mit LPS/IFN- γ ausgereifte mDCs wurden 1 h mit den angegebenen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren oder DMSO vorinkubiert. Nach Zellyse wurden die katalytisch-aktiven konstitutiven und immunoproteasomalen β -Untereinheiten mit der spezifischen Affinitätssonde bioALVS markiert. Die katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten wurden dann mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mit Streptavidin-HRP sichtbar gemacht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von Zellen eines Blutspenders aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten.

Es konnten drei Signale detektiert werden, die man anhand ihres Molekulargewichts den katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten zuordnen konnte (Abb. 14). Dabei zeigte sich, dass LC (Abb. 14C) und EPM (Abb. 14B) eine Abnahme der Intensität aller Signale bewirkten. Im Gegensatz dazu verringerte die Inkubation mit klinisch relevanten Dosen von Bortezomib vor allem die Intensität des untersten Signals (Abb. 14A). Dieses ist mit der Aktivität der β 5-, β 5i-, β 1- und β 1i-Untereinheiten gleichzusetzen (Papandreou *et al.*, 2004). Das Ergebnis war im Einklang mit anderen Studien, die für die beiden biologischen Inhibitoren LC und EPM eine Hemmung aller drei katalytischen Proteasom-Aktivitäten

und für Bortezomib eine Inhibition der katalytischen Aktivität der $\beta 5$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten beschreiben (Fenteany *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1999; Berkers *et al.*, 2005).

Im Folgenden sollte analysiert werden, inwiefern sich die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib, LC und EPM auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften von DCs auswirkten.

1.2 Einfluss der proteasomalen Aktivität auf die Expression von relevanten DC-Oberflächenrezeptoren

1.2.1 Funktion der untersuchten Oberflächenrezeptoren

In den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung zeigen DCs eine charakteristische Expression von Zelloberflächenproteinen, die sie für ihre vielfältigen Aufgaben im Immunsystem, wie beispielsweise Endozytose von Makromolekülen, Stimulation von T-Zellen und Präsentation von Antigenen, benötigen (Banchereau *et al.*, 2000). Um den Effekt der unterschiedlich wirkenden Proteasom-Inhibitoren auf den Phänotyp der DCs zu bestimmen, wurde die Expression dieser spezifischen Oberflächenproteine bei verschiedenen DC-Differenzierungsstadien nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Proteasom-Inhibitoren in der Durchflusszytometrie bestimmt.

In vivo stellen DCs eine heterogene Population von Zellen unterschiedlicher hämatopoietischer Herkunft dar und sind somit lineage negativ. Monozyten und die daraus generierten DCs kann man jedoch anhand ihres myeloiden Ursprungs durch die starke Expression des $\beta 2$ -Integrins CD11c unterscheiden. Um eine korrekte Analyse der Zelloberflächenmarker von DCs zu gewährleisten, wurden Lymphozyten von der Messung durch Verwendung eines CD11c⁺ *gate* (Abb. 15) ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden nur vitale Zellen, die anhand ihrer Lage im FSC/SSC identifiziert wurden, für die Messung berücksichtigt. Nur die im *gate* befindlichen Zellen wurden für die Expressions-Analyse der Zelloberflächenproteine verwendet.

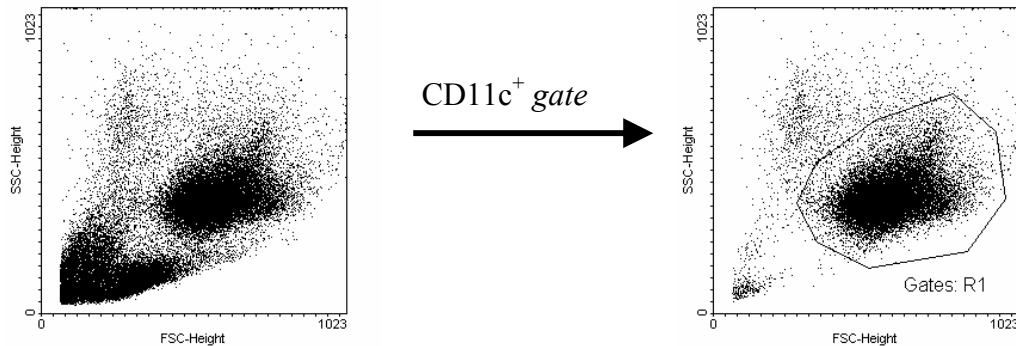


Abb. 15: CD11c⁺ gate. Um andere Zelltypen von der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächen-Rezeptoren auszuschliessen, wurde ein DC-spezifisches *gate* verwendet (rechts). Um dieses zu gewährleisten, wurden die Zellen (links) mit dem anti-CD11c (B-ly6) mAk angefärbt und CD11c⁺ DCs durch eine *regate*-Prozedur identifiziert (rechts). Anhand der Lage im FSC/SSC wurde eine vitale und homogene DC-Population für die Daten-Analyse berücksichtigt (rechts). Dargestellt ist ein repräsentativer *dot blot* von sechs unabhängigen Experimenten.

Bei der Untersuchung von Zellen, die vom monozytären Stadium zu iDC differenzieren, wurden die Proteasom-Inhibitoren an Tag 2 des DC-Generierungsprotokolls zur Zellkultur gegeben.

Die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2) werden von Monozyten schwach exprimiert. Während der Differenzierung zu mDCs über das Stadium der iDCs wird die Expression dieser Oberflächenmoleküle gesteigert. Beide Oberflächenmoleküle können an T-Zellen entweder durch Interaktion mit CD28 oder mit CTLA-4 binden. Nach Bindung von naiven T-Zellen an DCs über den TZR stellt die CD28-Kostimulation das essentielle zweite Signal dar, welches zur Initiierung der T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion notwendig ist (Lindsten *et al.*, 1989; Lenschow *et al.*, 1996).

Das Zelloberflächenmolekül CD40 ist ein Mitglied der TNF-R-Familie. Es wird nur schwach von iDCs, jedoch stark von mDCs exprimiert. Es wird zur Kostimulation und Interaktion mit T-Zellen durch CD40L benötigt. Die Bindung verursacht aber nicht nur eine Aktivierung von T-Zellen, sondern regt DCs zusätzlich zur erhöhten CD86- und CD80-Expression und IL-12-Produktion an und induziert somit eine verstärkte Th1-Zell-Antwort (Caux *et al.*, 1994; McLellan *et al.*, 1996).

Die beiden C-Typ-Lektine CD206 (MMR) und CD209 (DC-SIGN) werden für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Makromolekülen benötigt. Ferner vermittelt DC-SIGN durch Stabilisierung von DC/T-Zell Kontaktzonen die Adhäsion mit T-Zellen (Geijtenbeek *et al.*, 2000), wogegen das MHC II-Molekül HLA-DR zur Präsentation von endozytierten und prozessierten Antigenpeptiden gegenüber CD4⁺ T-Zellen notwendig ist.

CD83, ein Glykoprotein der Ig-Superfamilie, wird überwiegend von mDCs exprimiert und ist dort ein Marker für den Grad der Reife von DCs (Zhou und Tedder, 1995). Das von DCs exprimierte membrangebundene CD83 vermittelt eine Verstärkung der stimulatorischen Kapazität von DCs (Scholler *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2005; Prechtel *et al.*, 2007a und 2007b)

1.2.1.1 Differenzierung von Monozyt zu iDC

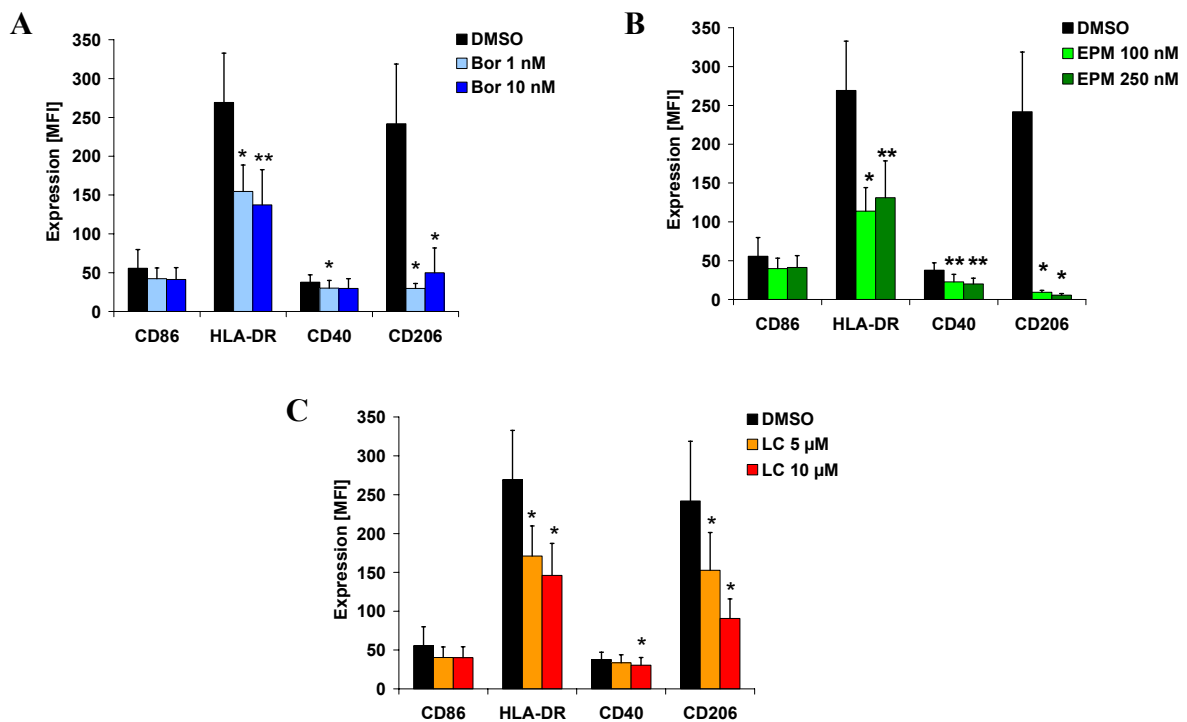


Abb. 16: Inhibition der Expression von charakteristischen DC-Oberflächenrezeptoren während der Differenzierung von Monozyt zu iDC. Während der Differenzierung von Monozyten zu iDCs wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor) (A), EPM (B) und LC (C) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Zelloberflächenproteine durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplet. * $p < 0,036$; ** $p < 0,007$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Eine 24 h Inkubation der Zellen mit den Proteasom-Inhibitoren Bortezomib (Abb. 16A), EPM (Abb. 16B) und LC (Abb. 16C) während der Differenzierung von Monozyt zu iDC bewirkte eine konzentrationsabhängige und teils signifikant verringerte Expression von CD40 und HLA-DR. Dagegen war der supprimierende Einfluss auf die Expression von CD86 schwächer ausgeprägt. Am stärksten war die Wirkung der Proteasom-Inhibition durch Bortezomib, EPM und LC auf den Endozytose-Rezeptor MMR, dessen Expression mit signifikant ($p < 0,035$) und bei Inkubation mit EPM fast vollständig supprimiert wurde.

1.2.1.2 Differenzierung von iDC zu mDC

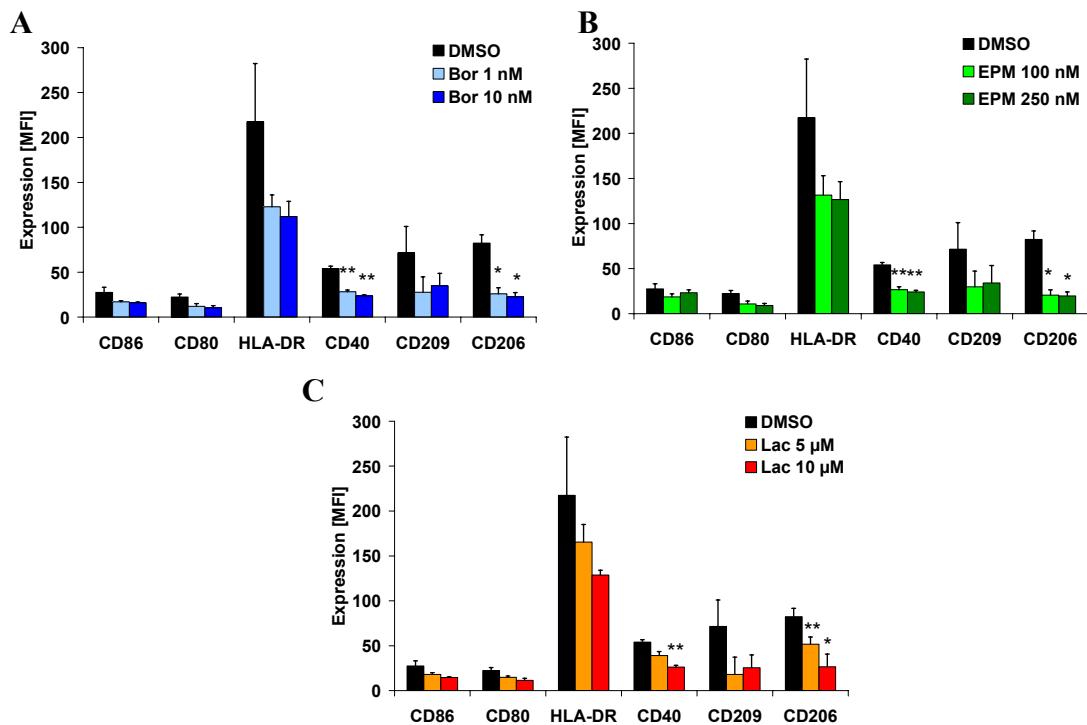


Abb. 17: Inhibition der Expression von charakteristischen DC-Oberflächenrezeptoren während der Differenzierung von iDC zu mDC. Während der Differenzierung von iDCs zu mDCs wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor) (A), EPM (B) und LC (C) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Zelloberflächenproteine durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplett. * $p < 0,023$; ** $p < 0,009$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Während der Differenzierung von iDC zu mDC vergrößert sich das Spektrum an charakteristischen DC-Oberflächenmolekülen. Deshalb wurde die Analyse der Effekte der Proteasom-Inhibition auf weitere Zelloberflächenproteine ausgedehnt. Es zeigte sich ein mit der Untersuchung aus Kapitel 1.2.1.1 vergleichbares Ergebnis. Die Suppression der Expression von CD80, CD86, CD209 und HLA-DR war bei allen eingesetzten Proteasom-Inhibitoren etwa gleich stark. Auch in dieser Phase der Differenzierung zeigten sich die deutlichsten Effekte bei der Expression von CD40 und CD206. Bei diesen Oberflächenrezeptoren konnte eine signifikante Inhibition der Expression demonstriert werden (Abb. 17).

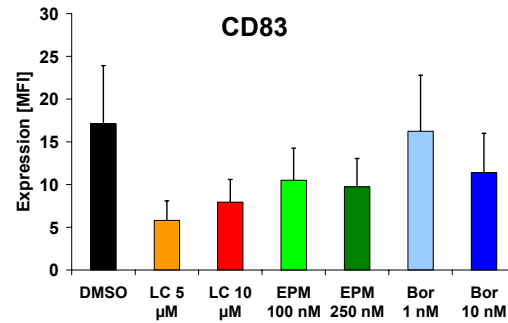


Abb. 18: Inhibition der Expression des DC-Reifungsmarkers CD83 durch Proteasom-Inhibition. Während der Differenzierung von iDCs zu mDCs wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM und LC in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD83 durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Triplet.

Anhand der Expression von CD83 konnte der Einfluss der Proteasom-Inhibition auf die Reifung von DCs bestimmt werden. Es konnte demonstriert werden, dass Proteasom-Inhibition eine verringerte CD83-Expression verursachte (Abb. 18).

1.2.1.3 Ausdifferenzierte mDCs

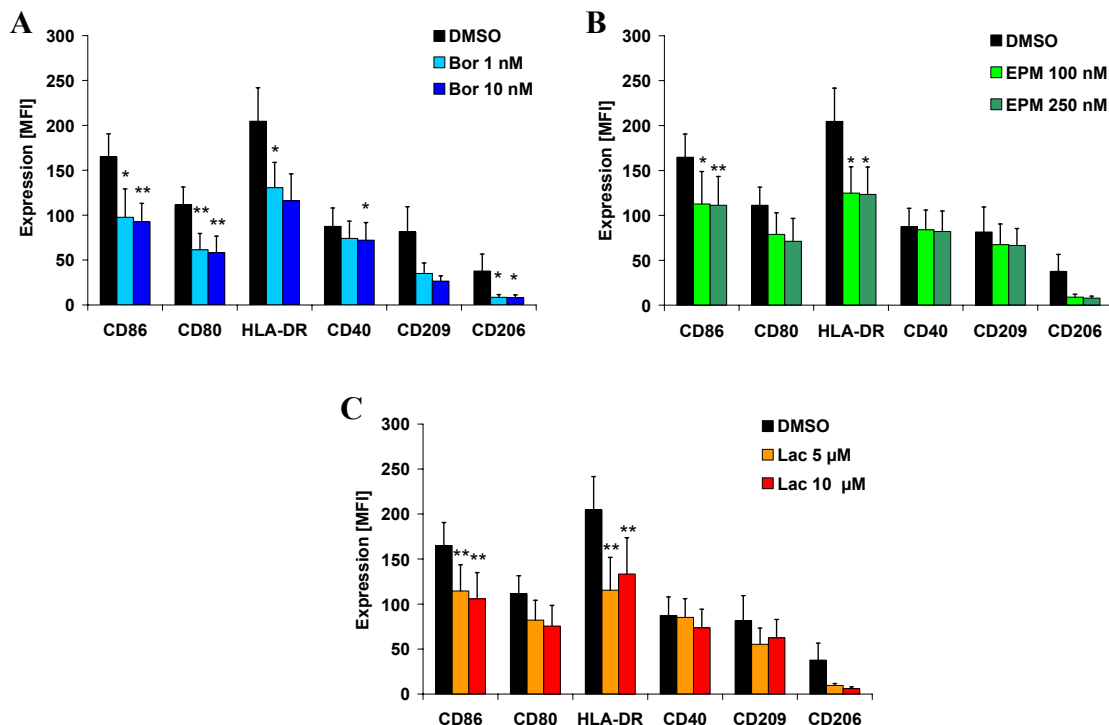


Abb. 19: Inhibition der Expression von charakteristischen DC-Oberflächenrezeptoren auf mDCs. mDCs wurden für 24 h mit Bortezomib (Bor) (A), EPM (B) und LC (C) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Zelloberflächenproteine durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Triplet. * $p < 0,042$; ** $p < 0,009$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Bei der Proteasom-Inhibition in mDCs für 24 h konnten analoge Ergebnisse zu den in Kapitel 1.2.1.1 und 1.2.1.2 dargestellten beobachtet werden. Auch bei diesem Versuchsansatz zeigte sich eine teils hochsignifikant verminderte Expression von allen untersuchten Oberflächenrezeptoren, insbesondere von CD86 und HLA-DR. Auffallend war jedoch der im Vergleich zu den vorausgegangenen Untersuchungen nicht so deutlich ausgeprägte inhibitorische Effekt auf die Expression von CD40 (Abb. 19).

Ziel der durchgeführten Versuche war, einen potentiellen zukünftigen therapeutischen Einsatz von Proteasom-Inhibitoren als Immunsuppressivum zu untersuchen. Da der reversible Proteasom-Inhibitor Bortezomib bei der Therapie von verschiedenen Krebsarten bereits etabliert ist und dort eine gute Verträglichkeit demonstriert, hat er von den drei verwendeten Proteasom-Inhibitoren die besten Chancen, auch als Immunsuppressivum eingesetzt zu werden (San Miguel *et al.*, 2006). Auch demonstrierte Bortezomib in den vorangegangenen Versuchen trotz unterschiedlichen inhibitorischen Profils eine mit LC und EPM vergleichbare Wirkung. Deshalb wurde entschieden, die folgenden Analysen nur noch mit diesem Proteasom-Inhibitor durchzuführen.

1.2.2 Intrazelluläre Analyse der MMR- und HLA-DR-Expression im Western Blot

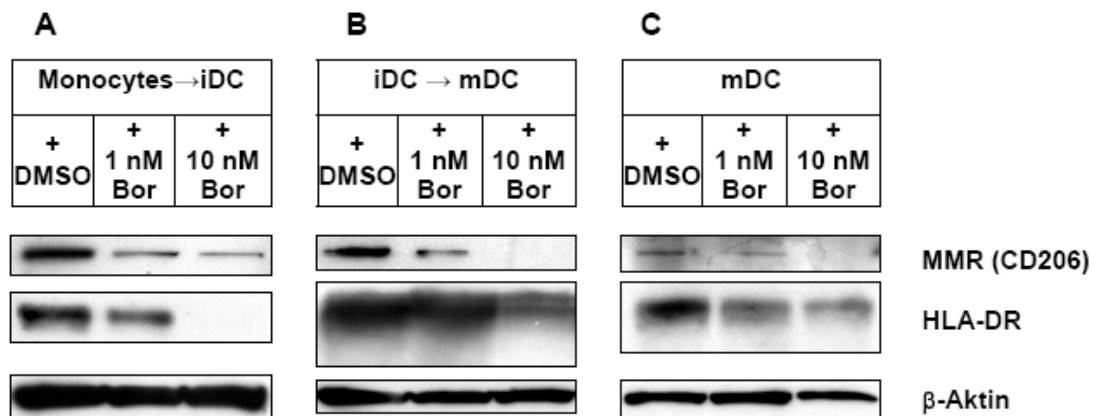


Abb. 20: Inhibition der intrazellulären Expression von MMR und HLA-DR durch Bortezomib (Bor). Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen von Bor inkubiert und anschließend lysiert. Die Ganzzelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Western blot mit Hilfe von anti-HLA-DR (Bra22) und anti-CD206 (C-20) entwickelt. Dazu wurden verwendet: (A) Zellen während der Differenzierung von Monozyten zu iDCs, (B) Zellen während der Differenzierung von iDCs zu mDCs, (C) mDCs. Als Ladekontrolle wurde anti-β-Aktin (AC-15) verwendet. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Die vorausgegangenen Versuche analysierten die Expression von Molekülen, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Da die gemessene Verminderung der Expression der Oberflächenmoleküle beispielsweise auch auf einer Hemmung des Golgi-Apparates bzw.

einem verstärkten Abbau der Oberflächenproteine basieren kann, wurde die intrazelluläre Proteinexpression der entsprechenden Moleküle im Western Blot durchgeführt. Um eine höchstmögliche Reinheit der DCs zu gewährleisten, wurden für diesen Versuchsansatz durch negative Isolation gewonnene Monozyten zur Generierung von mDCs verwendet. Es zeigte sich, dass eine 24 h Inkubation mit 1 bzw. 10 nM Bortezomib die intrazelluläre Expression der von DCs exprimierten funktionellen Oberflächenproteine MMR (CD206) und HLA-DR ähnlich supprimierte, wie schon durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 20).

1.3 Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die nukleäre Translokation von RelA und RelB

Die Entwicklung, Maturation und das Überleben von DCs ist eng mit der Expression und nukleären Translokation der Transkriptionsfaktoren RelA und RelB verknüpft (Ardeschna *et al.*, 2000; Ouaziz *et al.*, 2002; Li und Verma, 2002). Beide Proteine gehören zur Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren, welche aus RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 mit seiner Vorstufe p105) und NF- κ B2 (p52 mit seiner Vorstufe p100) bestehen (Siebenlist *et al.*, 1994; Verma *et al.*, 1995). Die verschiedenen Mitglieder können eine Vielzahl von Homo- und Heterodimere bilden. RelA und c-Rel sind im Zytoplasma mit den inhibitorischen I κ B-Proteinen (I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ϵ) komplexiert. Bei Aktivierung von NF- κ B im klassischen Signalweg führen extrazelluläre Signale von diversen Rezeptoren zur Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und zu proteasomalem Abbau von I κ B, wodurch RelA und c-Rel freigesetzt werden (Karin und Ben-Neriah, 2000). Im Gegensatz zu RelA und c-Rel ist RelB nicht an I κ Bs gebunden, sondern wird durch p100 im Zytoplasma sequestriert. Hierbei ist eine Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs notwendig, um eine Proteasom-vermittelte Prozessierung von p100 zu p52 hervorzurufen, wodurch die Translokation von RelB/p52-Dimeren ausgelöst wird (Solan *et al.*, 2002). Durch Bindung an κ B-Stellen der DNA im Nukleus aktivieren RelA, c-Rel und RelB verschiedene Gene, die für immunologische Funktionen, Überleben und Differenzierung der DCs essentiell sind (Hayden und Ghosh, 2004).

Um zu untersuchen, inwieweit eine Proteasom-Inhibition die Translokation von RelA und RelB bei iDCs während der Differenzierung zu mDCs beeinträchtigt, wurde eine Western Blot-Analyse von nukleären und zytoplasmatischen Fraktionen durchgeführt. Zur Ausreifung wurden die iDCs mit den potenten Reifungsstimuli und NF- κ B-Aktivatoren LPS und IFN- γ stimuliert (Vieira *et al.*, 2000; Nencioni *et al.*, 2006a).

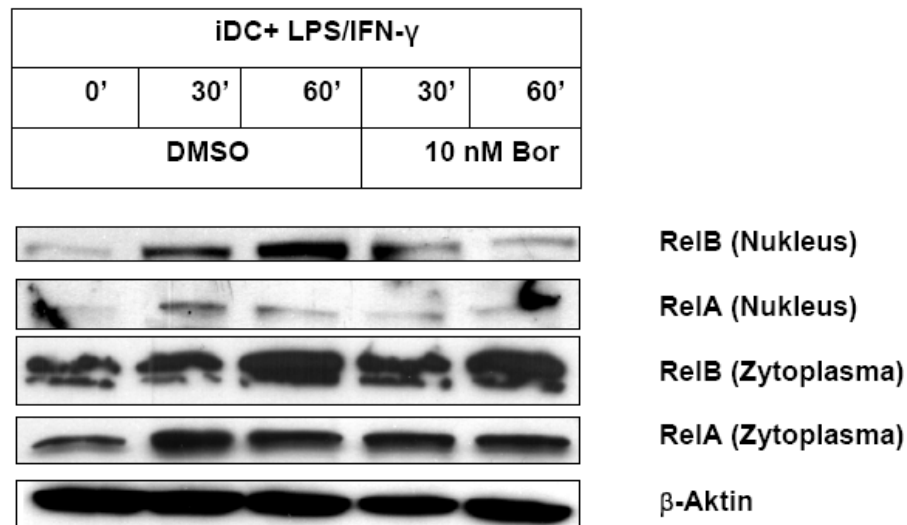


Abb. 21: Inhibition der nukleären Translokation und Akkumulation von RelB und RelA durch Bortezomib (Bor). iDCs wurden für 1 h mit 10 nM Bortezomib (Bor) vorinkubiert. Anschließend wurde die Maturation der iDCs durch Zugabe von LPS und IFN- γ induziert und die Zellen nach den angegebenen Inkubationszeiten geerntet. Nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen wurden generiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Quantität von RelA und RelB in den einzelnen Fraktionen im Western Blot ermittelt. Dazu wurden anti-NF- κ Bp65 (F-6) (RelA), anti-RelB (N-17) und als Ladekontrolle anti- β -Aktin (AC-15) verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Die Analyse von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen zeigte, dass Bortezomib keinen Einfluss auf die zytoplasmatische Expression von RelA und RelB hat, jedoch die nukleäre Translokation von RelA deutlich und von RelB schwach inhibiert und dadurch vermutlich einen supprimierenden Effekt auf die Maturation der DCs ausübt (Abb. 21).

1.4 Analyse der Apoptose-Induktion durch Bortezomib

Durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren konnten die essentiellen Funktionen des Proteasoms im Zellzyklus und bei der Apoptose identifiziert werden. Es ist bekannt, dass hauptsächlich schnell proliferierende und neoplastische Zellen sensitiv gegenüber Proteasom-Inhibition sind, wogegen ruhende oder ausdifferenzierte Zellen nur eine geringe Empfindlichkeit aufweisen (Chen C *et al.*, 2000; Naujokat und Hoffmann, 2002). Deshalb wurde untersucht, ob eine Proteasom-Inhibition durch Bortezomib in Monozyten und differenzierten DCs Apoptose induziert. Dazu wurden frisch isolierte Monozyten, iDCs und mDCs für 24 h mit Bortezomib bzw. DMSO inkubiert. Danach wurde die Apoptose durch Messung der Annexin V⁺/11c⁺ Zellen bestimmt.

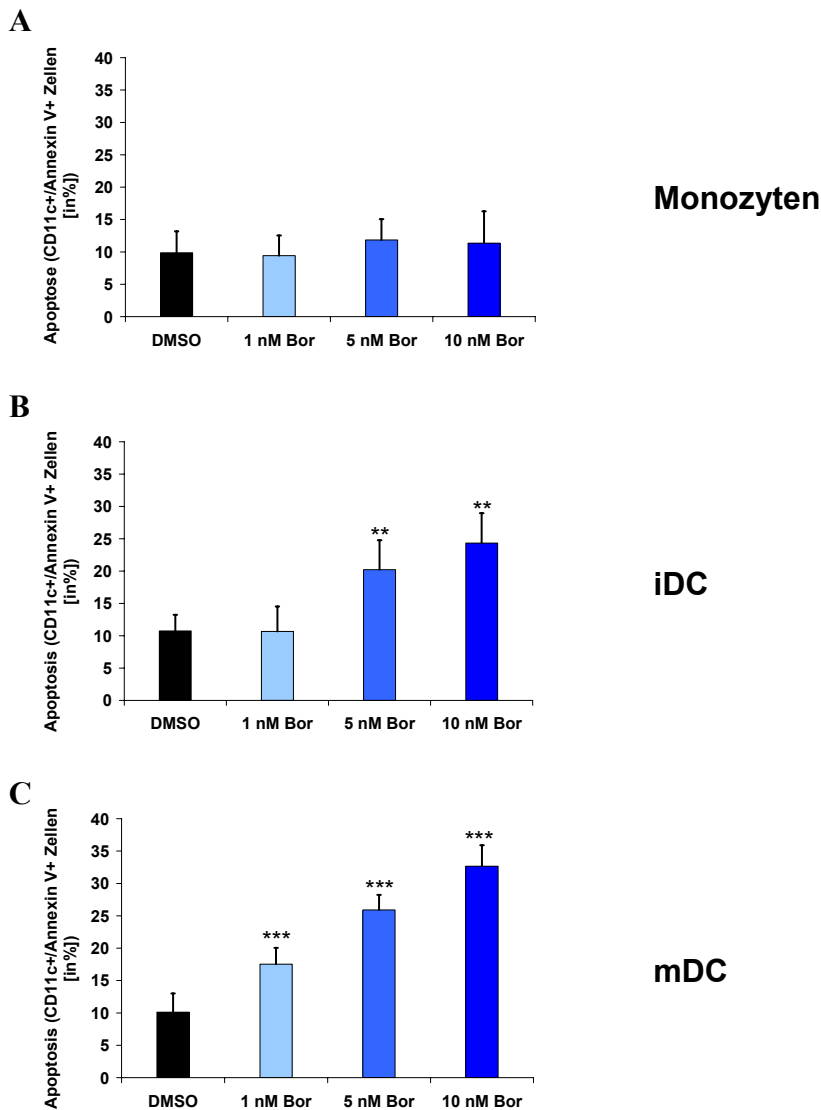


Abb. 22: Induktion von Apoptose in DCs durch Bortezomib (Bor). Monozyten (A), iDCs (B) und mDCs (C) wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen Bortezomib (Bor) inkubiert. Die Bestimmung von Apoptose erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, durch Verwendung einer *regate*-Prozedur nur CD11c⁺ Zellen einbezogen und deren Annexin V-Bindung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt als Tripletts. ** $p < 0,006$; *** $p < 0,001$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Während DMSO eine geringe Apoptose bei allen Zelltypen auslöste, induzierte Bortezomib nur in iDCs und mDCs (Abb. 22B und Abb. 22C), nicht aber in undifferenzierten Monozyten (Abb. 22A), eine im Vergleich zum Kontrollansatz gesteigerte Apoptose. Es konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptose und ein signifikanter Unterschied zu DMSO festgestellt werden. mDCs reagierten am suszeptibelsten auf Proteasom-Inhibition und zeigten den größten Anteil AnnexinV⁺/CD11c⁺ Zellen.

1.5 Einfluss der Proteasom-Inhibition auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose

Eine der wichtigsten Aufgaben, die iDCs im Immunsystem erfüllen, ist die Überwachung ihrer Umgebung hinsichtlich der Präsenz von pathogenen Organismen. Während der Migration im peripheren Gewebe nehmen sie über spezifische Endozytose- und Makropinozytose-Rezeptoren kontinuierlich Antigene auf, welche sie dann nach Differenzierung zu mDCs T-Zellen präsentieren. Da die Proteasom-Inhibition auch unter anderem eine verminderte Expression des Endozytose-Rezeptors MMR bei DCs verursacht, wurde nun analysiert, inwiefern daraus auch eine eingeschränkte Endozytose resultiert. Zur Analyse der Endozytose wurde 40 kDa großes FITC-markiertes Dextran verwendet, welches durch Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den MMR in die Zelle aufgenommen wird. Der Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer yellow* (LY) wird über in der Zellmembran lokalisierte Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, aufgenommen. LY wurde zur Analyse der Makropinozytose verwendet und ist wie FITC-Dextran nach Aufnahme in die Zelle durchflusszytometrisch nachweisbar. Für den Versuch wurden iDCs für 24 h mit 1 nM, 5 nM und 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert und anschließend deren endo- und makropinozytische Aktivität bestimmt.

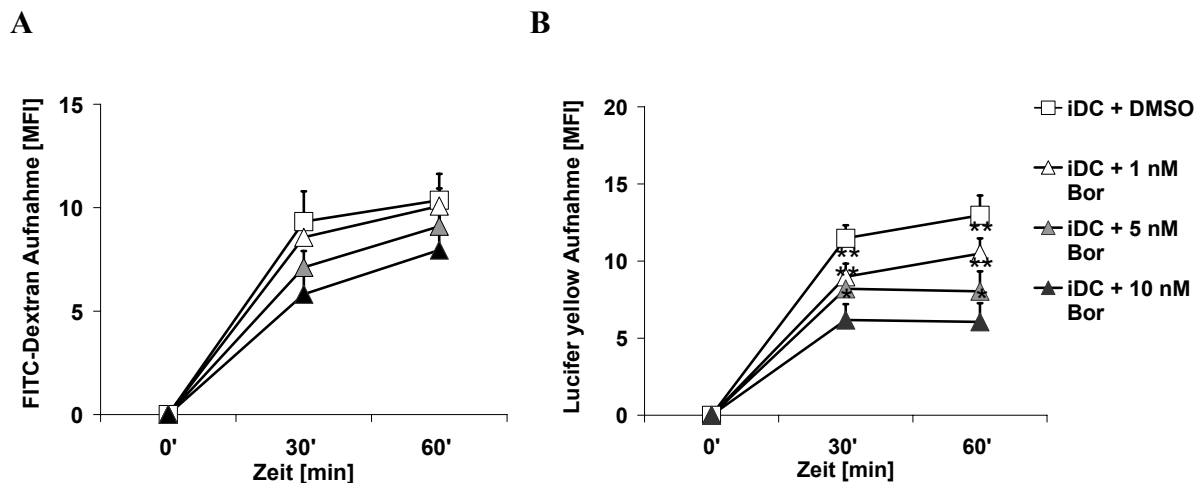


Abb. 23: Inhibition der Rezeptor-vermittelten Endozytose und Makropinozytose von iDCs durch Bortezomib (Bor). iDCs wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen Bortezomib inkubiert. Anschließend wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von FITC-Dextran (A) und LY (B) zu den angegebenen Zeitpunkten, wie in Material und Methoden beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analyse der Rezeptor-vermittelten Endozytose und Makropinozytose wurde durch Messung der MFI unter Verwendung einer CD11c⁺ *regate*-Prozedur, wie in Abb. 15 beschrieben, durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten, die als Triplet durchgeföhrt wurden. * $p < 0,033$; ** $p < 0,01$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Eine Inkubation mit Bortezomib zeigte eine deutliche und konzentrationsabhängige Abnahme der Rezeptor-vermittelten FITC-Dextran-Aufnahme in die Zelle (Abb. 23A).

Dieses Ergebnis korreliert somit mit der bereits zuvor gemessenen stark verminderten MMR-Expression nach Proteasom-Inhibition. Auch die Inkorporation von LY wurde supprimiert (Abb. 23B).

1.6 IL-12 Produktion in mDCs bei Proteasom-Inhibition

Das Th1-induzierende, heterodimere, bioaktive IL-12p70 besteht aus den zwei unterschiedlich großen Untereinheiten p40 und p35 (Wolf *et al.*, 1991). Während p35 von mDCs konstitutiv exprimiert wird, unterliegt die Expression von p40 der Induktion durch Signalwege, die z.B. nach LPS und CpG-Stimulation aktiviert werden (Schoenhaut *et al.*, 1992). Die Untereinheit p40 antagonisiert als Homodimer die Wirkung des IL-12p70 Heterodimers, bildet aber auch mit anderen Zytokin-Untereinheiten neue heterodimere Zytokine, wie beispielsweise IL-23 (Mattner *et al.*, 1993; Heinzel *et al.*, 1997; Oppmann *et al.*, 2000).

Reife DCs gelten als Hauptproduzenten sowohl des bioaktiven IL-12p70 als auch des antagonistisch wirkenden IL-12(p40)₂ (Macatonia *et al.*, 1995). Zur Beurteilung des Effekts auf T-Zellen ist eine Ermittlung des IL-12p70-/IL-12p40-Produktion-Quotienten notwendig (Luft *et al.*, 1995).

Zur Untersuchung des Einflusses der Proteasom-Inhibition auf die IL-12 Sekretion wurden iDCs während der Differenzierung zu mDCs mit Bortezomib inkubiert. Die Sekretion von IL-12p70 und IL-12p40 wurde ermittelt und der IL-12p70/p40 Quotient berechnet.

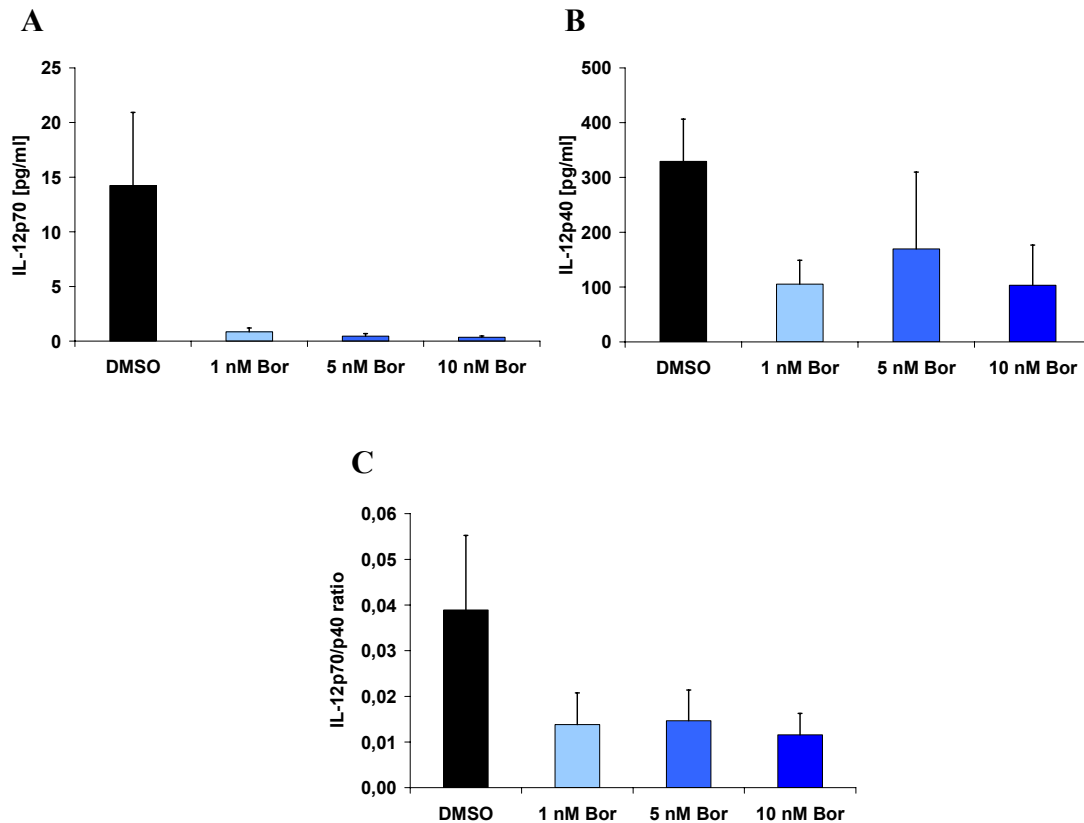


Abb. 24: Inhibition der IL-12-Produktion von DCs durch Bortezomib (Bor). (A) Die Produktion von agonistischem (bioaktivem) IL-12p70, (B) und von IL-12p40 wurde quantitativ bestimmt und das Verhältnis IL-12p70/p40 (C) berechnet. Dazu wurden DCs für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen Bortezomib während der Differenzierung von iDCs zu mDCs inkubiert und die Menge an IL-12p70 und IL-12p40 im Zellkulturüberstand durch ELISA ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten, die als Triplet durchgeföhrt wurden.

Bereits niedrige Konzentrationen von Bortezomib hatten einen ausgeprägten Einfluss auf die IL-12p70- und IL-12p40-Produktion während der Differenzierung von iDCs zu mDCs (Abb. 24A und 24B). Die supprimierende Wirkung erhöhte sich mit steigender Bortezomib-Konzentration nur geringfügig. Daraus resultierte für alle eingesetzten Bortezomib-Konzentrationen ein stark reduziertes IL-12p70/p40 Verhältnis (Abb. 24C). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass das Proteasom in Signalwege involviert ist, welche die Expression und Sekretion von IL-12 regulieren.

1.7 Untersuchung der T-Zell-Aktivierungseigenschaften von mDCs nach Proteasom-Inhibition durch Bortezomib

Die physiologische Funktion von mDCs besteht unter anderem in der Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort. Dabei werden fremde, von den DCs aufgenommene und prozessierte Antigene MHC I- und II-Molekülen an naiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen präsentiert. Die T-Zellen erkennen mit dem TZR das fremde Antigen und werden über Zell-Zell-Kontakt von den mDCs aktiviert. Abhängig

von den von DCs sezernierten Zytokinen differenzieren die T-Zellen im Falle von $CD4^+$ -Zellen entweder in Th1- oder Th2-Zellen, Th17-Effektorzelle oder Tregs. Naive $CD8^+$ -Zellen spezialisieren sich zu zytotoxischen T-Zellen. Diese primäre Immunreaktion kann auch in einem *in vitro*-Modell simuliert werden, indem vorher Antigen-gepulste DCs und T-Zellen vom selben Blutspender kokultiviert werden. Antigen-spezifische T-Zellen erkennen das von mDCs auf MHC-Molekülen präsentierte Fremd-Antigen und reagieren durch Aktivierung, die eine klonale Expansion der T-Zelle zur Folge hat.

Bei der allogenen Stimulation stammen die beiden Zelltypen in der Kokultur von unterschiedlichen Spendern. Die naiven T-Zellen reagieren hier nicht auf ein präsentierte Antigen, sondern auf vorhandene humane Leukozytenantigen (HLA)-Divergenzen.

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib vielseitige Auswirkungen auf die für Aktivierung von T-Zellen essentiellen Faktoren hat. Deshalb sollte nun untersucht werden, inwiefern dadurch die Kapazität zur Stimulation von T-Zellen beeinträchtigt ist.

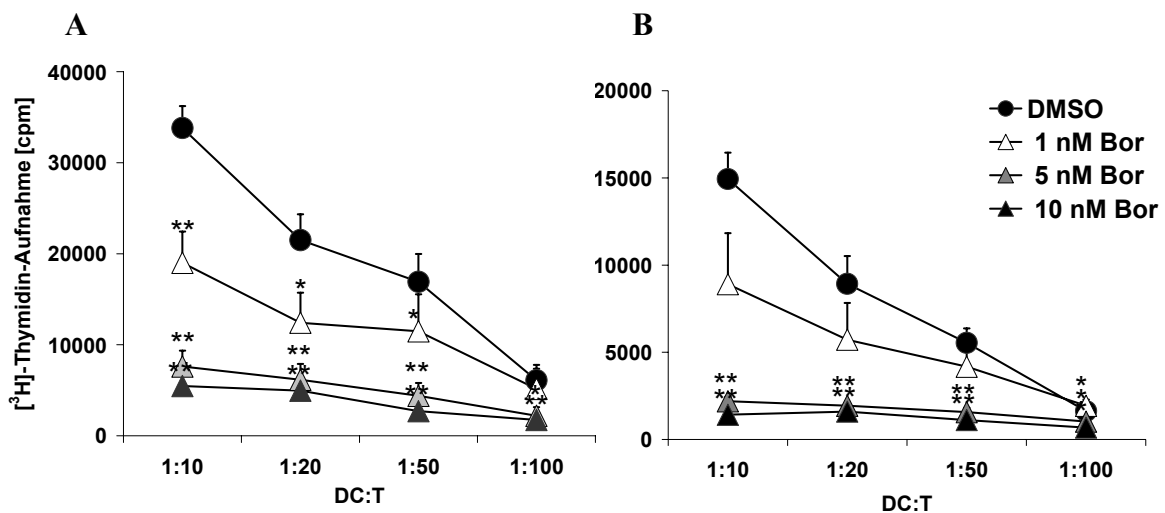


Abb. 25: Inhibition der mDC-vermittelten allogenen T-Zell-Stimulation durch Bortezomib (Bor). Stimulation von (A) allogenen $CD4^+$ T-Zellen und (B) allogenen $CD8^+$ T-Zellen durch mDCs nach 24 h Inkubation der mDCs mit den angegebenen Konzentrationen Bortezomib. Nur vitale Zellen wurden ausgezählt und für die T-Zell-Stimulation verwendet. Die Stimulationen wurden mit den DC:T-Zell Verhältnissen von 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von sieben ($CD4^+$ T-Zellen) bzw. fünf ($CD8^+$ T-Zellen) unabhängigen Experimenten, die in sechsfachen Ansätzen durchgeführt wurden. * $p < 0,048$; ** $p < 0,009$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Bei der allogenen Stimulation von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zeigte sich, dass bereits eine 24 h Inkubation mit der niedrigsten Bortezomib-Konzentration ausreichte, um die stimulatorische Kapazität der mDCs in statistisch relevantem Maße zu beeinträchtigen.

Eine Steigerung der Bortezomib-Konzentration resultierte in einer annähernd kompletten Inhibition der DC-vermittelten T-Zell-Aktivierung (Abb. 25A und 12B).

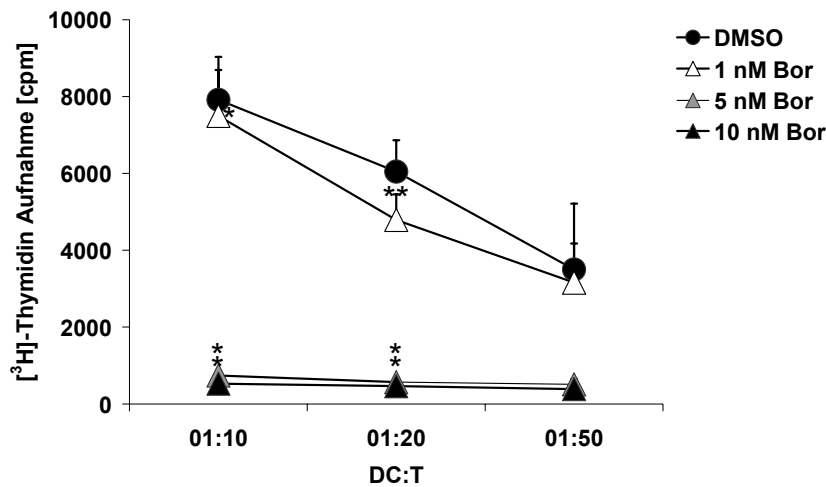


Abb. 26: Inhibition der mDC-vermittelten autologen CD4⁺ T-Zell-Stimulation durch Bortezomib (Bor). Stimulation von autologen CD4⁺ T-Zellen durch mDCs nach 24 h Inkubation der mDCs mit den angegebenen Konzentrationen Bortezomib. DCs wurden während der Differenzierung zu iDCs mit OVA gepulst, wie in Material und Methoden beschrieben. Nur vitale Zellen wurden ausgezählt und für die T-Zell-Stimulation verwendet. Die Stimulationen wurden mit den DC:T-Zell Verhältnissen von 1:10, 1:20 und 1:50 durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten, die in sechsfachen Ansätzen durchgeführt wurden. * $p < 0,039$; ** $p < 0,01$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Im Gegensatz zur allogenen Stimulation verursachte die Proteasom-Inhibition mit 1 nM Bortezomib nur eine geringfügig verminderte Fähigkeit zur Stimulation von autologen CD4⁺ T-Zellen. Allerdings konnte auch hier eine deutliche Suppression der stimulatorischen Kapazität durch Inkubation mit 5 nM und 10 nM Bortezomib beobachtet werden (Abb. 26).

Insgesamt demonstrierten die durchgeführten Versuche die zentrale Rolle des Proteasoms in der Regulation von essentiellen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von DCs. Die Inhibition der proteasomalen Aktivität durch verschiedene Proteasom-Inhibitoren induziert Apoptose bei differenzierten DCs, supprimiert die Expression von relevanten Oberflächenmolekülen in allen Differenzierungsstadien, verhindert die nukleäre Translokation von RelA und RelB, vermindert die Rezeptor-vermittelte Endozytose und Makropinozytose von iDCs und verursacht eine deutliche Verringerung der Kapazität zur Induktion einer primären T-Zell-vermittelten Immunantwort.

2 Suppression essentieller Immunfunktionen von CD4⁺ T-Zellen durch Proteasom-Inhibition

Um ein vollständigeres Bild der Effekte von Proteasom-Inhibition auf zwei der wichtigsten Zelltypen des Immunsystems zu erhalten, wurden Untersuchungen in naiven und aktivierten CD4⁺ T-Zellen durchgeführt.

2.1 Reinheit der CD4⁺ T-Zellen

Die Untersuchungen von CD4⁺ T-Zellen mittels Western Blot-Analyse setzt eine möglichst reine Zellpopulation voraus. Die für die Versuche eingesetzten CD4⁺ T-Zellen wurden jedoch auf physiologische Art durch Kokultur mit mDCs aktiviert, und eine potentielle Verfälschung der Ergebnisse war möglich. Um eine korrekte Beurteilung der Western Blot-Analysen zu gewährleisten, musste somit überprüft werden, wie hoch der Anteil an DCs zum Zeitpunkt der Versuchsansätze war. DCs exprimieren, wie bereits in Kapitel 1.2.1.2 gezeigt, das charakteristische C-Typ-Lektin DC-SIGN. Zur Ermittlung des Verhältnisses an DC-SIGN⁺/CD4⁺-Zellen wurde die Expression der beiden Oberflächenproteine nach 5 Tagen Kokultur durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass weniger als 0,5% der Zellen DC-SIGN⁺ waren, wogegen mehr als 93% der T-Zellen den Rezeptor CD4 exprimierten. Für die korrekte Auswertung der Western Blot-Ergebnisse stellten DCs mit weniger als 1% der Zellen somit eine vernachlässigbare Zellpopulation dar (Abb. 27).

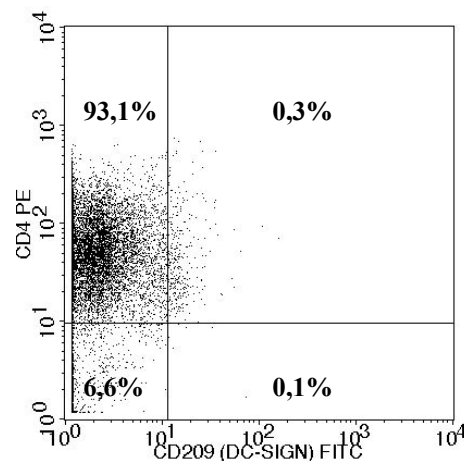


Abb. 27: Reinheit der aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Darstellung der Reinheit der CD4⁺ T-Zell-Population anhand des Verhältnisses DC-SIGN⁺/CD4⁺-Zellen. Die Expression der Oberflächenrezeptoren CD4 und DC-SIGN wurde nach 5 Tagen Kokultur von CD4⁺ T-Zellen mit mDCs durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die mAks anti-CD4 (SK3) und anti-DC-SIGN (DCN46) mAks verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von zehn unabhängigen Experimenten.

2.2 Bestimmung des inhibitorischen Profils der Proteasom-Inhibitoren in aktivierten T-Zellen

Zur Bestimmung der inhibitorischen Profile der eingesetzten Proteasom-Inhibitoren Bortezomib, LC und EPM in aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurde die gleiche Methode wie bereits für mDCs verwendet (Kapitel 1.1).

Es ist bislang nicht bekannt, ob und in welchem Maße Immunproteasom-Untereinheiten in den auf physiologische Weise mit mDCs aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden (Macagno *et al.*, 1999; Kloetzel *et al.*, 2004). Deshalb wurde die Expression der katalytisch-aktiven konstitutiven und Immunproteasom β -Untereinheiten durch Western Blot-Analyse ermittelt.

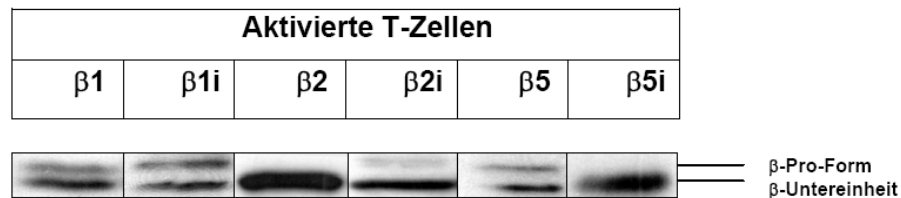


Abb. 28: Expression von konstitutiven und Immunproteasom-Untereinheiten in aktivierten CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden durch 5-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert und anschliessend lysiert. Die Ganzzelllysate wurden mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe von anti- $\beta 1$ (MCP421), anti- $\beta 1i$ (LMP2-13), anti- $\beta 2$, anti- $\beta 2i$ (MECL-1), anti- $\beta 5$ und anti- $\beta 5i$ (LMP7-1) Antikörpern entwickelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von zehn unabhängigen Experimenten.

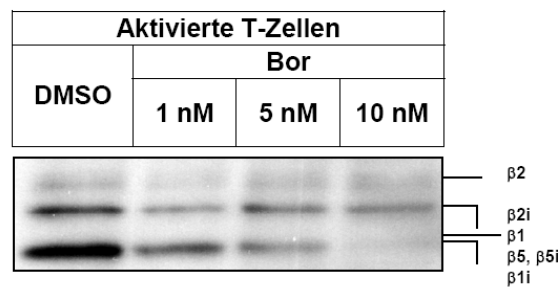
Es stellte sich heraus, dass sowohl die konstitutiven katalytisch-aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ als auch die Immunproteasom-Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ von den aktivierten T-Zellen exprimiert werden (Abb. 28). Aufgrund dessen erfasste die Analyse des Wirkungsspektrums der Proteasom-Inhibitoren die inhibitorischen Effekte auf die konstitutiven und Immunproteasom-Untereinheiten.

Bei mit DMSO behandelten aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnten, analog zu den DCs in Kapitel 1.1, drei Signale detektiert werden, die anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts den katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten zugeordnet werden konnten. Die zwei oberen Signale mit dem Molekulargewicht von 30 bzw. 28 kDa stellten die Untereinheiten $\beta 2$ bzw. $\beta 2i$ dar. Das untere Signal entsprach den konstitutiven Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$, sowie deren immunproteasomalen Homologen $\beta 1i$ und $\beta 5i$.

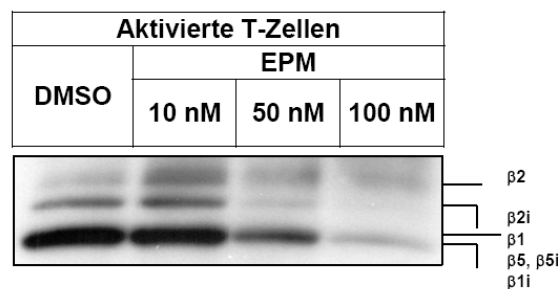
Durch Inkubation mit steigenden Konzentrationen Bortezomib konnte eine spezifische Verringerung des unteren Signals festgestellt werden (Abb. 29A). Dieses Ergebnis ist konsistent mit Ergebnissen in anderen Zelltypen und demonstriert die selektive und

spezifische Wirkung von Bortezomib auf die katalytische Aktivität der Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 5$ bzw. $\beta 1i$ und $\beta 5i$ in T-Zellen (Berkers *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2007). Die $\beta 2$ -Aktivität wurde dagegen von steigenden Bortezomib-Konzentrationen nur geringfügig inhibiert. EPM inhibierte dagegen ab einer Konzentration von 50 nM alle katalytisch-aktiven proteasomalen Untereinheiten, bevorzugt jedoch die $\beta 2$ und $\beta 2i$ Untereinheit (Abb. 29B). LC zeigte bereits bei der niedrigsten verwendeten Konzentration eine gleichmäßig starke Inhibition aller katalytisch-aktiven proteasomalen Untereinheiten (Abb. 29C).

A



B



C

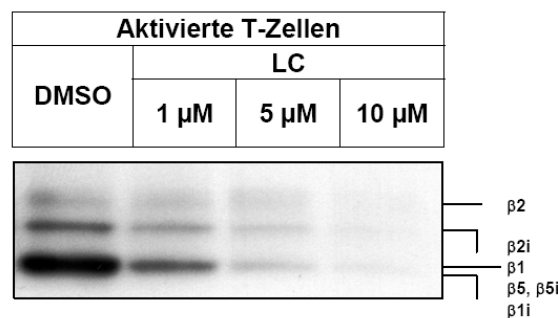


Abb. 29: Bestimmung des inhibitorischen Profils von Bortezomib (Bor) (A), EPM (B) und LC (C) in aktivierten $CD4^+$ T-Zellen durch Affinitätsmarkierung. Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach Zelllyse wurden die proteolytisch-aktiven konstitutiven und Immunproteasom-Untereinheiten mit der spezifischen Affinitätssonde bioALVS markiert. Die katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten wurden dann mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und in einem anschließenden Western Blot mit Streptavidin-HRP sichtbar gemacht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten.

2.3 Akkumulation mono- und polyubiquitinerter Proteine bei Proteasom-Inhibition

Eine Funktion des 26S Proteasoms ist die Degradation von nicht nur defekten, falsch-synthetisierten oder mutierten Proteinen, sondern auch von Proteinen, die wesentliche zelluläre Prozesse wie z.B. Differenzierung, Proliferation und Apoptose der Zelle steuern (Hershko und Ciechanover, 1998; Naujokat und Hoffmann, 2002; DeRenzo und Seydoux, 2004; Bowerman und Kurz, 2006; Naujokat und Saric, 2007). Damit das Proteasom die zu degradierenden Proteine erkennt, werden diese durch Mono- und Polyubiquitin-Ketten markiert. Eine funktionelle Konsequenz der Inhibition der Protein-Degradation ist die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine (Princiotta *et al.*, 2001). Um den Anteil ubiquitinerter Proteine nach 24 h Proteasom-Inhibition zu ermitteln, wurden mono- und polyubiquitinierte Proteine in aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Western Blot mit einem spezifischen Antikörper (Klon FK2) detektiert (Fujimoro M *et al.*, 1994). Dazu wurden die Proteasom-Inhibitoren in Konzentrationen verwendet, die nachweislich einen deutlichen Effekt auf die katalytische Aktivität der Proteasom-Untereinheiten hatten (s.Abb. 29). Anschließend konnte die Zunahme der ubiquitinierten Proteine der Proteasom-Inhibitor-Ansätze gegenüber der Kontrolle kalkuliert werden.

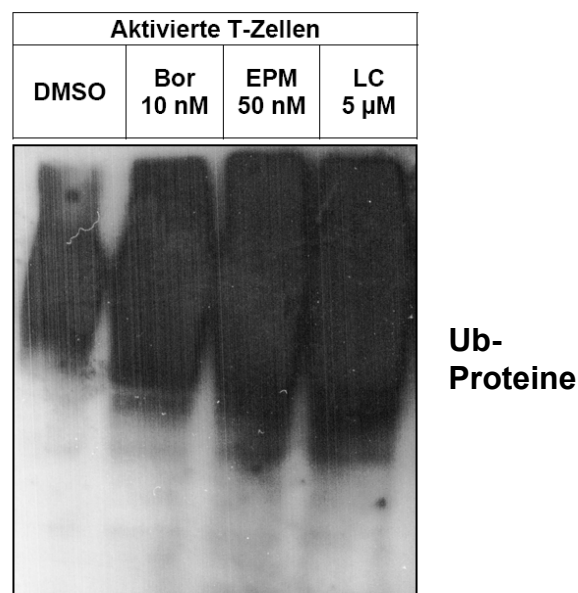


Abb. 30: Inhibition der Degradation ubiquitinerter Proteinen durch Proteasom-Inhibitoren. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurden Ganzzelllysate generiert, diese mit 7,5% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mit einem Ak, der gegen mono- und polyubiquitinierte Konjugate gerichtet ist (Klon FK2), analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten.

Ansatz	Mittelwert der Bandenintensität	Mittelwert der Bandenintensität in [%]	Kehrwert des Mittelwerts in [%]
DMSO	159.694	100	100
10 nM Bor	115.613	72,4	138,1
50 nM EPM	85.819	53,7	186,1
5 µM LC	80.708	50,5	197,9

Tabelle 2: Analyse der Bandenintensitäten aus Abb. 30 mit der ImageJ software

Die Inkubation von CD4⁺ T-Zellen mit den drei Proteasom-Inhibitoren bewirkte eine deutliche Zunahme von mono- und polyubiquitinierten Proteinen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 30). Die Länge der Signale vermittelte einen ersten Hinweis auf die Stärke der Inhibition. Darüber hinaus wurde die Signalintensität mittels [ImageJ](http://rsb.info.nih.gov/ij/) software (Version 1.37, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) analysiert. Dadurch konnte für Bortezomib eine 38%ige, für EPM eine 85%ige und für LC eine 98%ige Steigerung an mono- und polyubiquitinierten Proteinen im Vergleich zum Kontrollansatz festgestellt werden.

2.4 Proteasom-Inhibition supprimiert die Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Nach Aktivierung von T-Zellen durch DCs findet die klonale Expansion des Antigen-spezifischen T-Zell Klons statt. Anhand der Bestimmung der Proliferationsrate kann die Intensität einer Immunantwort festgestellt werden. Um zu untersuchen, inwiefern die Inhibition des Proteasoms einen Einfluss auf die Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen hatte, wurde der Einbau von [³H]-Thymidin gemessen. Die radioaktiv markierte Nukleinsäure wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA der proliferierenden CD4⁺ T-Zellen eingebaut und kann als Maß für die Proliferation mit Hilfe eines β-Counters bestimmt werden.

Die Proteasom-Inhibitoren wurden bei der Untersuchung der Rolle des Proteasoms auf die Proliferation der aktivierten CD4⁺ T-Zellen am vierten Tag der Kokultur für weitere 24 h hinzugefügt. Es zeigte sich bereits bei der jeweils niedrigsten verwendeten Konzentration der Proteasom-Inhibitoren eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate ($p < 0,002$) um fast die Hälfte der ursprünglichen Proliferation des Kontrollansatzes. Die Steigerung der Konzentration der Proteasom-Inhibitoren bewirkte eine annähernd komplette Suppression der Proliferation (Abb. 31).

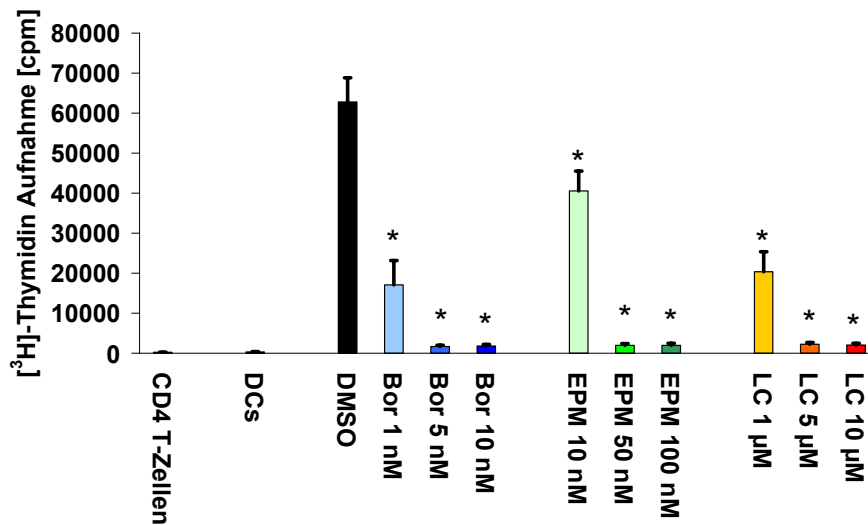


Abb. 31: Inhibition der Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Proteasom-Inhibition. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und der Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin bestimmt wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von sechs unabhängigen Experimenten, die in sechsfachen Ansätzen durchgeführt wurden. * p < 0,002 (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

2.5 Proteasom-Inhibition induziert Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Proteasoms Apoptose in aktivierten T-Zellen induziert (Wang X *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2006). Die zuvor bestimmte supprimierte Proliferation könnte somit auch ein Indiz für eine erhöhte Apoptose sein.

Um zu untersuchen, ob die verminderte Proliferation bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach Proteasom-Inhibition auf einer Induktion von Apoptose beruhte, wurden sowohl mikroskopische als auch durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

Eine lichtmikroskopische Untersuchung nach Wright-Färbung sollte zeigen, ob die für 24 h mit Proteasom-Inhibitoren inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen die für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen aufwiesen.

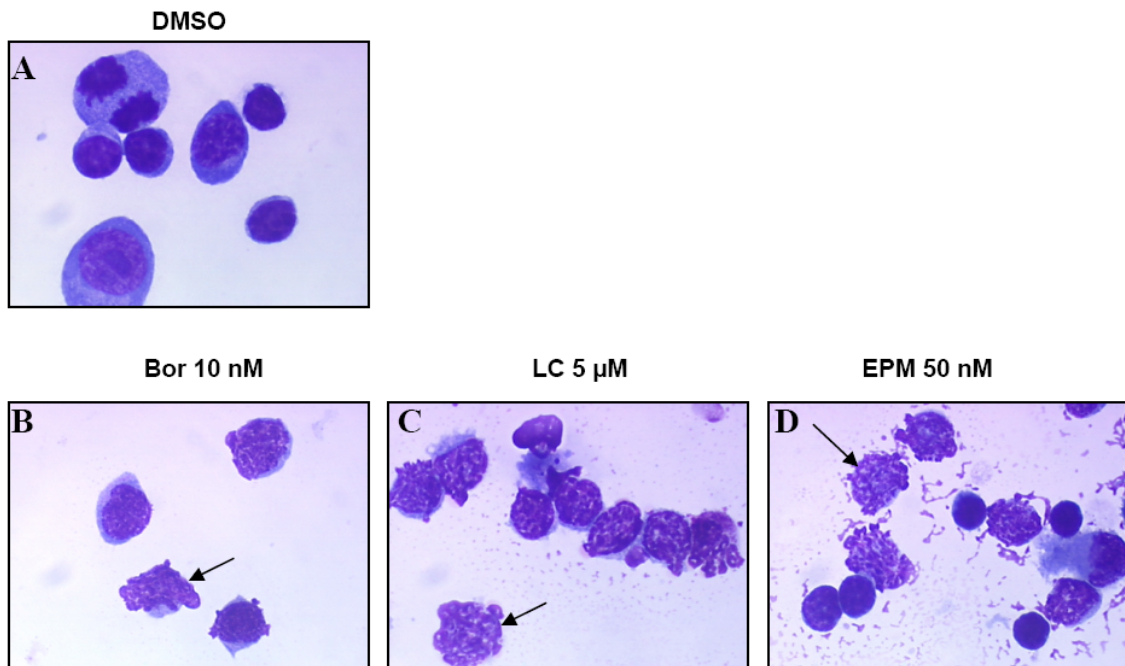


Abb. 32 Morphologische Veränderungen nach Proteasom-Inhibition. Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Objektträger ausgestrichen, mit Eosin-Methylenblau nach Wright angefärbt und lichtmikroskopisch (Vergrößerung 160x) analysiert. Pfeile weisen beispielhaft auf Zellen mit charakteristischen Kennzeichen der Apoptose hin. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von Zellen eines Blutspenders aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten.

Bei Zellen, die mit Bortezomib (Abb. 32B), LC (Abb. 32C) und EPM (Abb. 32D) inkubiert worden waren, konnten deutliche morphologische Veränderungen beobachtet werden. Es zeigten sich Membranausstülpungen, erste Anzeichen von *apoptotic bodies* und Nukleusfragmentierungen (Abb. 32, Pfeile). Dagegen wiesen die Zellen des Kontrollansatzes runde und intakte Zellmembranen und Nuklei auf (Abb. 32A).

Um den genauen Anteil an apoptotischen Zellen zu bestimmen, wurde der Anteil AnnexinV⁺/PI⁺-Zellen nach 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Bortezomib, LC und EPM durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wurden auch ruhende $CD4^+$ T-Zellen in den Versuchsansatz einbezogen. Anschließend wurde die spezifische Apoptose berechnet, um nur den durch Proteasom-Inhibition verursachten Effekt zu zeigen.

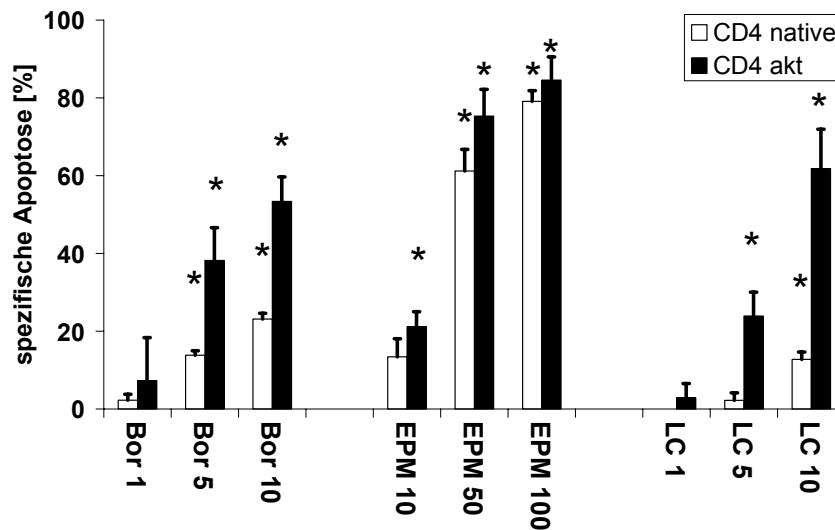


Abb. 33: Induktion von Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Proteasom-Inhibition. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogeenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die aktivierten (akt) und naive CD4⁺ T-Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde der Anteil Annexin V⁺/PI⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und die sA ermittelt, wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplet. * $p < 0,001$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Wie Abb. 33 verdeutlicht, wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der sA bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Inkubation mit Bortezomib, LC und EPM festgestellt. Im Gegensatz zu EPM, dass bei allen Konzentrationen eine signifikante Steigerung der sA verursachte, induzierten Bortezomib und LC erst ab Konzentrationen von 5 nM bzw. 5 μ M eine im Vergleich zur Kontrolle statistisch relevante Apoptose. Auch zeigten die mit EPM-inkubierten aktivierten T-Zellen mit 90% sA die stärkste Apoptoserate von allen verwendeten Proteasom-Inhibitoren. Interessanterweise war bei ruhenden, mit EPM inkubierten CD4⁺ T-Zellen mit etwa 80% sA eine ähnlich hohe Suszeptibilität zu beobachten wie bei EPM-inkubierten, aktivierten T-Zellen. Ein vergleichbares Ergebnis war bei Inkubation der ruhenden CD4⁺ T-Zellen mit Bortezomib bzw. LC nicht festzustellen. Hier zeigte sich bei ruhenden CD4⁺ T-Zellen eine mit maximal 23% (Bortezomib) bzw. 13% (LC) sA im Vergleich zu den aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Bortezomib: 53%, LC: 62%) nur schwache Apoptose-Induktion. Die zuvor bestimmte, deutlich verminderte Proliferation der aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnte nur teilweise einer Apoptose-Induktion zugeschrieben werden. Daher musste die Proteasom-Inhibition zusätzliche zytostatische Effekte induzieren.

2.6 Induktion von G-1-Arrest durch Proteasom-Inhibition bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Das UPS ist durch die temporale Kontrolle der Degradation von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent-kinase*, CDK) und ihren Inhibitoren (z.B. p21^{WAF1/CIP1}, p27^{Kip1}) maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Infolgedessen kann die Inhibition des Proteasoms bei proliferierenden Zellen je nach Zelltyp und Zellstatus auch in Zellzyklus-Arrest oder Apoptose resultieren (Drexler HCA, 1997; Koepp *et al.*, 1999; Yew PR, 2001; Reed SI, 2003). Der Zellzyklus-Arrest wird unter anderem auch durch die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressor Proteins p53 reguliert. p53 induziert die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CKI) p21^{WAF1/CIP1}. Darüber hinaus wird p21^{WAF1/CIP1} genauso wie p27^{Kip1}, ein weiterer CKI, durch Degradation durch das Proteasom reguliert (Li X *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Eine Akkumulation der negativen Zellzyklusregulatoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} resultiert in einem Arrest in der G1- oder G2/M-Phase des Zellzyklus (El-Deiry *et al.*, 1994; Kudo *et al.*, 2000; Chen und Lin, 2004). Ferner verhindert p21^{WAF1/CIP1} durch Interaktion mit dem hochkonservierten p53-regulierten *protein proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) die DNA-Synthese und somit den Eintritt in die S-Phase (Shivakumar *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995; Gartel und Tyner, 2002). PCNA ist ein Prozessivitäts-Faktor der DNA-Polymerase- δ und $-\epsilon$, der für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus essentiell ist.

Auch die Cycline A und D sind wesentliche Faktoren für die Progression des Zellzyklus. Während Cyclin A den Beginn der Mitose in der S-Phase initiiert, ist Cyclin D für die Progression des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase zuständig (Bastians *et al.*, 1999; Diehl *et al.*, 1997).

Da die beobachtete Abnahme in der Proliferation bei den aktivierten Proteasom-inhibierten CD4⁺ T-Zellen neben der Apoptose-Induktion auch durch einen Arrest im Zellzyklus erklärt werden könnte, wurde eine Zellzyklus-Analyse dieser Zellen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991) durchgeführt (s. Material und Methoden 2.4.3).

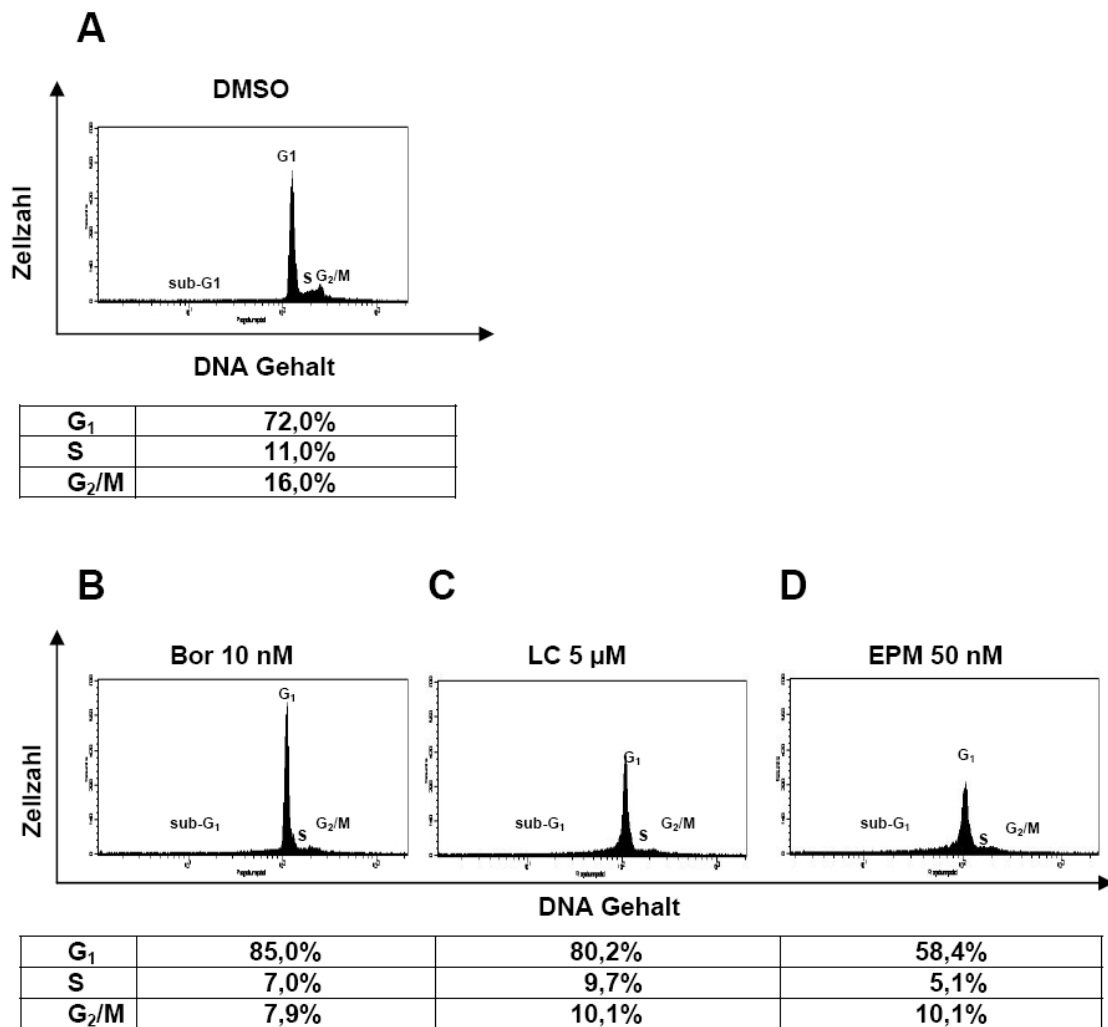


Abb. 34: Analyse des Zellzyklus nach Nicoletti. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), EPM, LC und DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Danach wurde der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch analysiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von sechs unabhängigen Experimenten.

Im einem repräsentativen Experiment (Abb. 34) zeigte der Kontrollansatz (A) einen hohen Anteil an Zellen in der G₁-Phase (72%), während sich deutlich weniger Zellen in G₂/M- und S-Phase befanden (16% und 11%). Die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib (B) und LC (C) bewirkte eine Zunahme der Zellen in sub-G₁ und G₁-Phase, während sich der Anteil von Zellen in S- und G₂/M-Phase reduzierte. Dagegen induzierte die Inhibition des Proteasoms mit EPM (D) eine Abnahme der Zellen in G₁-, S- und G₂/M-Phase und nur die sub-G₁-Phase verzeichnete eine auffällige Zunahme. Nach mehrfacher Wiederholung des Experiments wurde die Art des Zellzyklus-Arrestes ermittelt. Dafür wurde jeweils das Verhältnis der G₁-, S- und G₂/M-Phase-Zellen mit allen sich im Zellzyklus befindenden Zellen berechnet, Zellen in sub-G₁-Phase wurden ignoriert. Es

konnte bei Bortezomib- und LC-inkubierten aktivierten T-Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz eine signifikante Zunahme der Zellen in G₁-Phase festgestellt werden (Abb. 35). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Proteasom-Inhibition mit LC und Bortezomib einen Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase induzierte. Dagegen bewirkte die Inkubation der aktivierten T-Zellen mit EPM weder einen G₁- noch einen G₂/M-Arrest. Aufgrund der im Vergleich zu Bor und LC untypischen Effekte von EPM bei Apoptose- und Zellzyklus-Analyse, wurden die folgenden Versuche nur mit LC und Bortezomib durchgeführt.

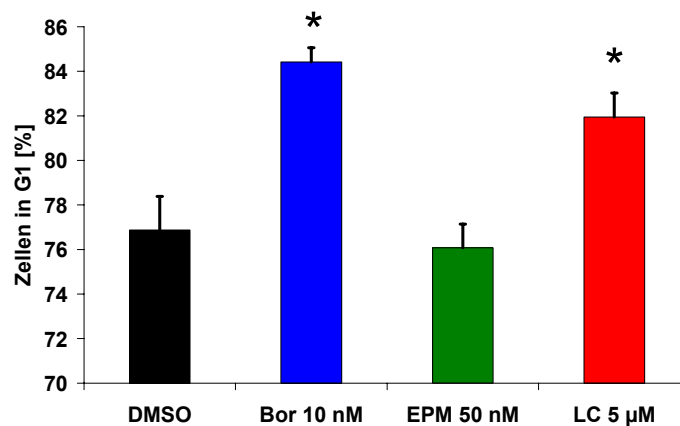


Abb. 35: Induktion von Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus. Das Diagramm zeigt den durch Zellzyklus-Analyse ermittelten prozentualen Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus nach 24 h Inkubation mit DMSO, 10 nM Bortezomib (Bor), 50 nM EPM und 5 µM LC. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von sechs unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplett. * p < 0,001 (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Die starke Abnahme der Proliferation bei mit Bortezomib und LC inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen beruhte folglich teilweise auf der Induktion von Apoptose, sowie auf einem Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus.

Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms bei schnell proliferierenden Tumorzellen, die nicht p53-defizient oder p53-mutiert sind, eine Akkumulation von verschiedenen Zellzyklusregulatoren und p53 verursacht, was einen Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase oder auch Apoptose induziert (El-Deiry *et al.*, 1994; Chen F *et al.*, 2000). Daher sollten die Proteine, welche einen G₁-Arrest in aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach Bortezomib-Inkubation induzierten, identifiziert werden. Dazu wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Bortezomib inkubiert und die Präsenz von bekannten Protein-Substraten des Proteasoms, deren Akkumulation durch Proteasom-Inhibition mit der Induktion von G₁-Zellzyklus-Arrest assoziiert ist, im

Western Blot analysiert (Rao *et al.*, 1999; Yew PR, 2001; Naujokat und Hoffmann, 2002; Chen und Lin, 2004).

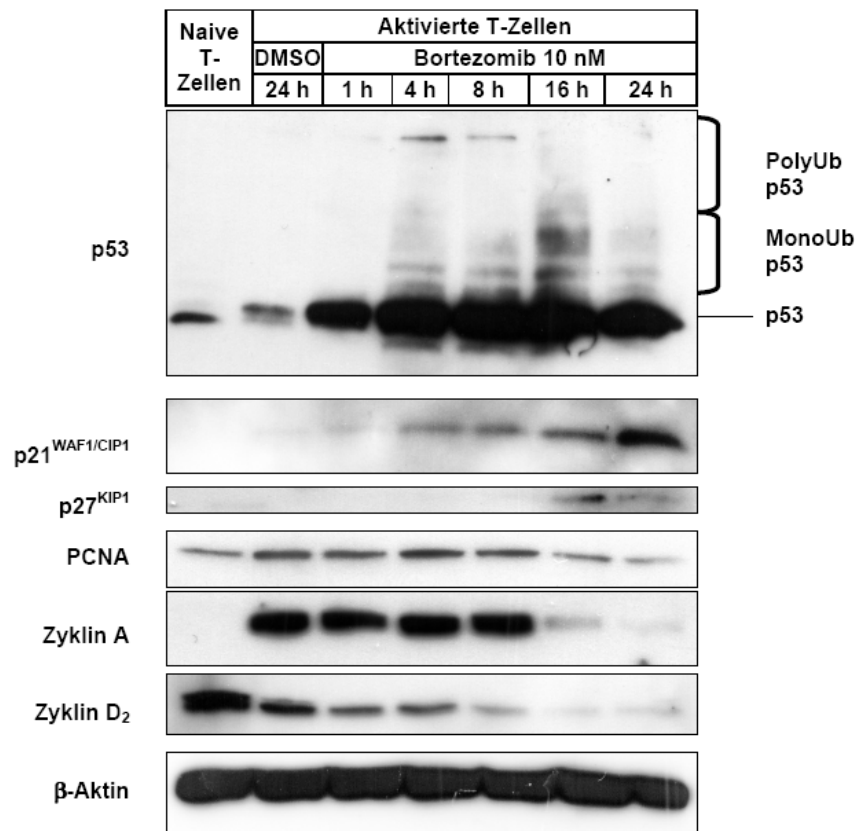


Abb. 36: Western Blot-Analyse von Zellzyklusregulatoren. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert. Frisch isolierte naive CD4⁺ T-Zellen wurden dem Versuchsansatz als Negativ-Kontrolle hinzugefügt. Aus allen Zellen wurden Ganzzelllysate generiert. Diese wurden mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe von anti-p53 (DO-1), anti-p21 (C-19), anti-p27 (F-8), anti-PCNA (FL-261), anti-Cyclin A (H-432) und anti-Cyclin D2 (C-17) entwickelt. Als Ladekontrolle wurde anti-β-Aktin (AC-15) verwendet. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Das Tumor-Suppressor-Protein p53 wurde bereits in aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert und demonstrierte bereits ab 1 h Proteasom-Inhibition eine sukzessive Zunahme der Signalintensität. Zusätzlich zu der p53-Akkumulation konnte man auch eine Zunahme von Signalen mit höherem Molekulargewicht als p53 beobachten, die mono- und polyubiquitiniertem p53 (MonoUb, PolyUb) entsprachen (Marchenko *et al.*, 2007a). Ein Signal für den CKI p21^{WAF1/CIP1} konnte erst nach 4 h Bortezomib-Inkubation beobachtet werden. Bei längerer Bortezomib-Inkubation konnte, wie für p53, eine kontinuierliche Zunahme der Signalintensität festgestellt werden. Erst nach 16 h Proteasom-Inhibition konnte der CKI p27^{Kip1} nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den negativen Zellzyklus-

Regulatoren demonstrierten die positiven Zellzyklus-Regulatoren PCNA, Cyclin A und Cyclin D2 eine kontinuierliche Abnahme der Signalintensität. Die Cyclin D2-Expressionsabnahme korrelierte negativ mit der Zunahme an p53, während eine Abnahme der Signalintensität von Cyclin A und PCNA erst nach 16 h beobachtet werden konnte (Abb. 36). Insgesamt konnte durch die Analyse von wichtigen Zellzyklus-Regulatoren und p53 gezeigt werden, dass der Bortezomib-vermittelte Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase offenbar auf einer Akkumulation von negativen Zellzyklus-Regulatoren beruht.

2.7 Supprimierte Expression von funktionellen T-Zell Oberflächenmolekülen durch Proteasom-Inhibition

Um weitere Konsequenzen der Proteasom-Inhibition zu ermitteln, wurde die Expression von essentiellen T-Zell-Oberflächenmolekülen analysiert.

Die Interaktion von CD80 oder CD86 auf DCs mit CD28 auf T-Zellen ist essentiell zur Aktivierung, zum Überleben und zur anhaltenden Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen (Lucas *et al.*, 1995; Boise *et al.*, 1995; Noel *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2002). Während CD28 bereits auf naiven CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, kommt CD134 (OX40), ein Mitglied der TNF-R-Familie, vor allem auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Weinberg *et al.*, 1998) vor und bewirkt nach Stimulation durch OX40L eine verstärkte und verlängerte Zytokin-Produktion und Proliferation. CD27, CD95 und TNF-RII sind weitere Mitglieder der TNF-R-Familie, die auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden (Borst *et al.*, 1989; Ware *et al.*, 1991; Leithauser *et al.*, 1993). CD27 ist beteiligt an der Expansion von T-Zellen nach Aktivierung durch CD28 (Arens *et al.*, 2001; Hendriks *et al.*, 2003). TNF-RII bindet die Zytokine TNF- α und LT α und leitet pro- und anti-apoptische sowie Proliferations-fördernde Signale ins Zellinnere weiter (Kim und Teh, 2001; Bodmer *et al.*, 2002). CD95 (Fas/APO-1) gehört als einziges der untersuchten Oberflächenmoleküle zur Todesrezeptoren-Untergruppe der TNF-R-Familie (Bhardwaj und Aggarwal, 2003). Die Bindung seines Liganden CD95L (CD178/APO1-L/FasL), der vor allem auf aktivierten T-, B- und NK-Zellen exprimiert wird (Yu *et al.*, 1999), induziert die Bildung des Death-inducing signaling complexes (DISC), welcher pro- aber auch anti-apoptische, zellaktivierende Signale vermittelt (Kischkel *et al.*, 1995).

Die Aktivierung von T-Zellen führt zur raschen autokrinen und parakrinen Produktion von IL-2 und zur Expression der IL-2 Rezeptor- α -Untereinheit (CD25). CD25 bildet gemeinsam mit der IL-2 Rezeptor- β - und - γ -Untereinheit den hoch affinen IL-2-Rezeptor. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor initiiert Proliferation und Differenzierung und

ist somit essentiell für T-Zellen (Nelson *et al.*, 1994; Hughes and Pober, 1996). Aufgrund dessen gilt CD25 auch als charakteristischer T-Zell-Aktivierungsmarker.

Die Expression von CD25, CD28, CD27, TNF-RII, OX40 und CD95 wurde nach 24 h Inkubation mit Bortezomib und LC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analyse von ausschließlich vitalen Zellen wurde durch Einsatz eines T-Zell-spezifischen *gate*, das anhand der Lage der T-Zellen im FSC/SSC gesetzt wird, gewährleistet.

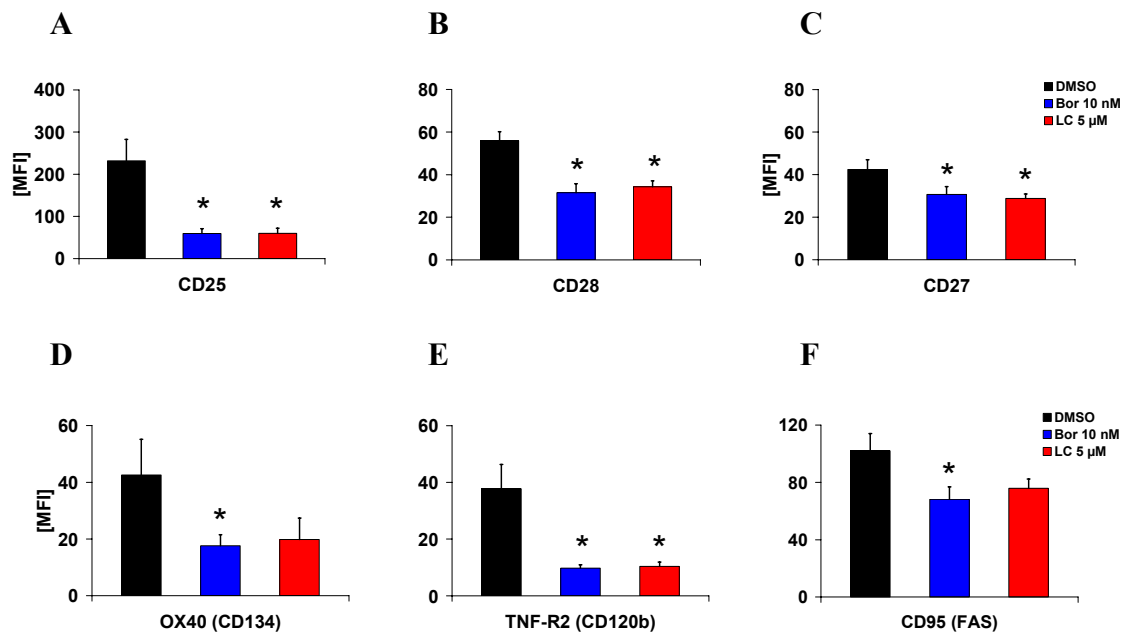


Abb. 37: Suppression von Aktivierungs-assoziierten T-Zell-Oberflächenrezeptoren durch Proteasom-Inhibition. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Bortezomib (Bor), LC oder DMSO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nachfolgend wurde die Expression der Zell-Oberflächenproteine CD25 (A), CD28 (B), CD27 (C), CD120b (D), CD134 (E) und CD95 (F) durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) ± SEM von fünf unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Triplett. * p < 0,048 (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib und LC hatte einen deutlichen Einfluss auf die Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren von aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Besonders stark war der supprimierende Effekt auf die IL-2 Rezeptor- α -Kette (CD25) (Abb. 37A) und TNF-RII (Abb. 37E). Aber auch bei CD28 (Abb. 37B) und CD27 (Abb. 37C) konnte eine statistisch relevante und im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringere Expression demonstriert werden. Bei der Expression von OX40 (Abb. 37D) und CD95 (Abb. 37F) wiesen nur mit Bortezomib inhibierte Zellen eine signifikant verringerte Expression auf, während die Abnahme der Expression durch LC etwas schwächer ausgeprägt war. Die erhaltenen Ergebnisse gaben einen weiteren Hinweis auf die Ursache der durch Proteasom-Inhibition verminderten Proliferation.

2.8 Analyse von Bortezomib-inkubierten aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen

2.8.1 Proliferation

In den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Proteasom-inhibierte aktivierte CD4⁺ T-Zellen eine stark verminderte Proliferation aufwiesen. Diese resultierte aus Apoptose-Induktion, Zellzyklusarrest und supprimierter Expression von essentiellen T-Zell-Oberflächenproteinen. Eine Restimulation der T-Zellen sollte nun überprüfen, inwiefern die nach Proteasom-Inhibition überlebenden Zellen noch zu einer Immunantwort fähig waren. Die Restimulationstechnik ist eine etablierte Methode, die eine *in vivo* stattfindende repetitive T-Zell-Stimulation mit einem gleichen oder wechselnden Antigen simuliert und der quantitativen Beurteilung einer T-Zellfunktion oder -dysfunktion dient (Jonuleit *et al.*, 2000; Di Nicola *et al.*, 2002). Um einen ersten Überblick über die Effekte der Proteasom-Inhibition auf die T-Zellen zu bekommen, wurde zuerst die Proliferation analysiert. Dazu wurden aktivierte CD4⁺ T-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Bortezomib inkubiert und die vitalen Zellen danach in einem neuen Kulturansatz für 24 h mit:

1. mDCs vom gleichen allogenen DC-Spender restimuliert (Ansatz 1).
2. mDCs von einem anderen allogenen DC-Spender restimuliert (Ansatz 2).
3. dem Mitogen PWM restimuliert (Ansatz 3).

Folgend wurde die Proliferationsrate, wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, bestimmt.

Bei allen 3 Restimulations-Ansätzen konnte eine signifikante Abnahme der Proliferation festgestellt werden (Abb. 38). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Inhibition des Proteasoms während der primären Kokultur einen supprimierenden Effekt auf

1. den bereits aktivierten CD4⁺ T-Zell-Klon in Ansatz 1 und 3 hatte. (Restimulation mit dem gleichen allogenen DC-Spender und Restimulation mit PWM).
2. die ruhenden T-Zellen in Ansatz 2 und 3 hatte.
(Restimulation mit anderem allogenen DC-Spender und Restimulation mit PWM).

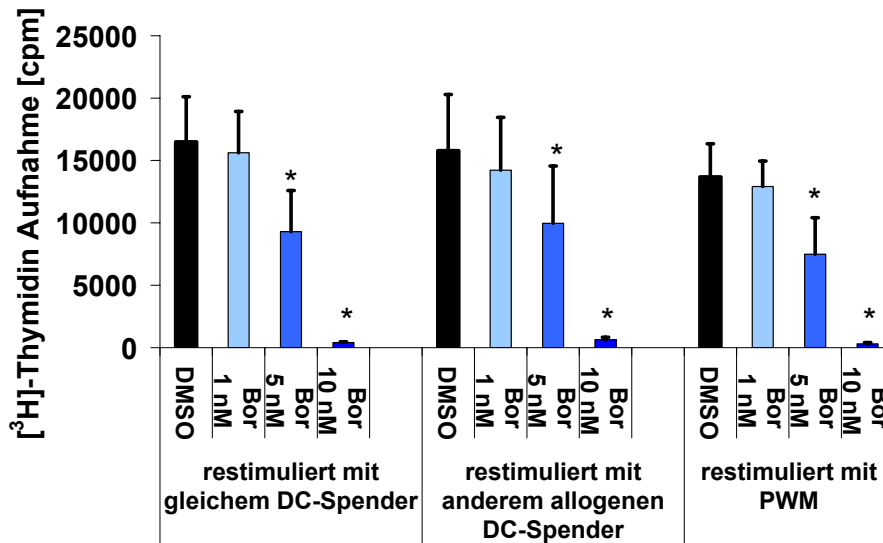


Abb. 38: Inhibition der Proliferation von aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen durch Proteasom-Inhibition. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Die Zellen wurden für 24 h mit DMSO oder den angegebenen Konzentrationen Bortezomib (Bor) inkubiert und anschließend mit den gleichen allogenen mDCs wie in der initialen Aktivierung, mit mDCs von einem anderen allogenen DC-Spender wie in der initialen Aktivierung oder mit PWM für weitere 24 h restimuliert. Danach wurde der Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin bestimmt, wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von sechs unabhängigen Experimenten, die in sechsfachen Ansätzen durchgeführt wurden. * p < 0,03 (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

2.8.2 Zytokin-Produktion

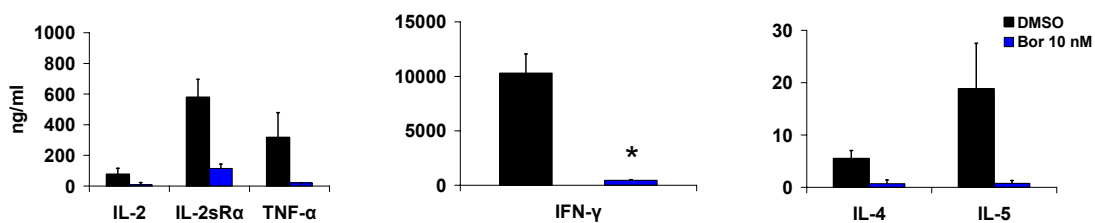
CD4⁺ T-Zellen differenzieren nach Antigen-vermittelter Aktivierung in unterschiedliche Helferzelltypen. Anhand des von ihnen produzierten Zytokin-Profiles ordnet man sie in Th1- oder Th2-Zellen ein (Mosmann *et al.*, 1989). Dabei sind IL-12, IFN- γ , IL-2 und TNF- α sezernierende Th1-Zellen für die Regulation der zellulären Immunantworten zuständig, wogegen Th2-Zellen durch Ausschüttung von IL-4 und IL-5 humorale Immunantworten fördern. Insbesondere das Zytokin IL-2 aktiviert durch Bindung an seinen hochaffinen Rezeptor Signalwege, die zur Proliferation führen. Deshalb sollte überprüft werden, ob eine durch Bortezomib verursachte Abnahme der Zytokin-Produktion zu der verringerten Proliferation beitrug. Dazu wurde vorgegangen, wie zuvor in Kapitel 2.8.1 beschrieben. Allerdings wurden die aktivierten T-Zellen vor Restimulation statt mit drei unterschiedlichen Konzentrationen nur mit 10 nM Bortezomib inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der Zytokine im Kulturüberstand durch ELISA ermittelt.

Auch Zellkulturüberstände von aktivierten, nicht-restimulierten CD4⁺ T-Zellen wurden analysiert. Diese Messungen ergaben jedoch bei hohen Bortezomib-Konzentrationen oftmals eine erhöhte Zytokin-Konzentration im Vergleich zum Kontrollansatz. Die

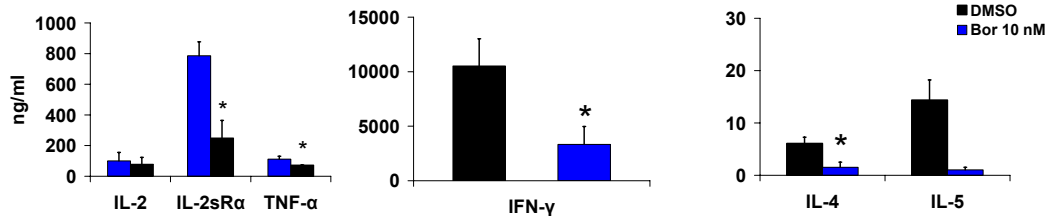
Ursache lag vermutlich in der Apoptose-Induktion durch Bortezomib (2.5), die zur unspezifischen Ausschüttung von Zytokinen durch Lyse der T-Zellen führt. Auch in anderen Studien wurde dieser Effekt bereits beobachtet (Blanco *et al.*, 2006).

Die durch mDCs aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen produzierten sowohl Zytokine, die dem Th1-Zelltyp (IL-2, TNF- α und IFN- γ), als auch dem Th2-Zelltyp (IL-4 und IL-5) zuzuordnen sind (Mosmann *et al.*, 1989). Darüber hinaus wurde noch die Menge der löslichen IL-2 Rezeptor- α -Untereinheit (IL-2sR α) bestimmt.

(A) Restimuliert mit gleichen allogeenen mDCs (Ansatz 1)



(B) Restimuliert mit anderen allogeenen mDCs (Ansatz 2)



(C) Restimuliert mit PWM (Ansatz 3)

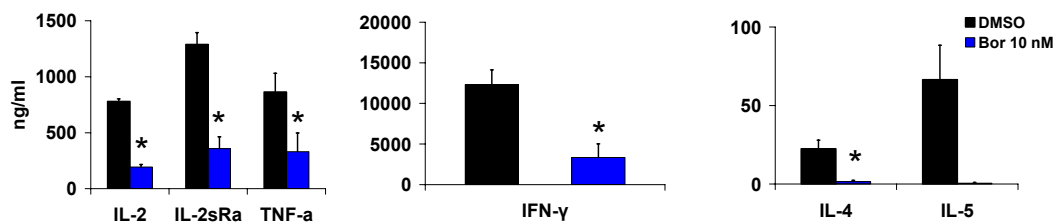


Abb. 39: Hemmung der Produktion von spezifischen T-Zell-Zytokinen durch Proteasom-Inhibition bei aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogeenen mDCs aktiviert. Nachfolgend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO inkubiert und anschließend mit den gleichen allogeenen mDCs wie in der initialen Aktivierung (A), mit mDCs von einem anderen allogeenen DC-Spender wie in der initialen Aktivierung (B) oder mit PWM (C) für weitere 24 h restimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-2, IL-2sRa, TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-5 im Zellkulturüberstand mit Hilfe von ELISA, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von fünf unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplett. * $p < 0,05$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Die mit DMSO-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen des Kontrollansatzes demonstrierten nach Restimulation die charakteristische Zytokin-Produktion von Th1-Zellen: Während eine hohe Sekretion von IL-2, TNF- α und IFN- γ beobachtet werden konnte, war die Sekretion von Zytokinen des Th2-Zelltyps, wie IL-4 und IL-5, eher schwach ausgeprägt (Abb. 39). Das lag vermutlich an den zur T-Zell-Aktivierung verwendeten, mit LPS und IFN- γ ausgereiften mDCs (Macatonia *et al.*, 1995).

In allen drei Restimulations-Ansätzen konnte eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Zytokin-Produktion durch Bortezomib im Vergleich zum Kontrollansatz ermittelt werden. Infolgedessen konnte nicht nur eine supprimierte Produktion von Zytokinen des Th1-, sondern auch des Th2-Typs beobachtet werden. Durch die geringere Abnahme der Zytokin-Produktion von CD4⁺ T-Zellen aus Ansatz 2 (Abb. 39B) im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus Ansatz 1 (Abb. 39A) konnte geschlossen werden, dass der Effekt von Bortezomib auf aktivierte T-Zellen größer war als auf ruhende.

2.8.3 Oberflächenproteine

Die Stärke der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation korreliert mit der Zytokin-Produktion und der Expression des jeweiligen Zytokin-Rezeptors. Die zuvor nachgewiesene eingeschränkte Produktion von Zytokinen, insbesondere von IL-2, lieferte damit eine Erklärung für die deutliche Abnahme der Proliferation bei Bortezomib-inkubierten restimulierten CD4⁺ T-Zellen. Um jedoch den zugrunde liegenden Mechanismus vollständig zu analysieren, war eine Bestimmung der IL-2-Rezeptor-Expression bei den restimulierten T-Zellen notwendig. Ferner wurde auch die Expression von weiteren, für die T-Zell Kostimulation essentiellen Oberflächenmolekülen ermittelt. Dazu wurde vorgegangen, wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben. Jedoch wurden die Zellen nach Restimulation mit PBS gewaschen und anschließend, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, die Expression von CD25, CD28, OX40 und CD95 durchflusszytometrisch analysiert.

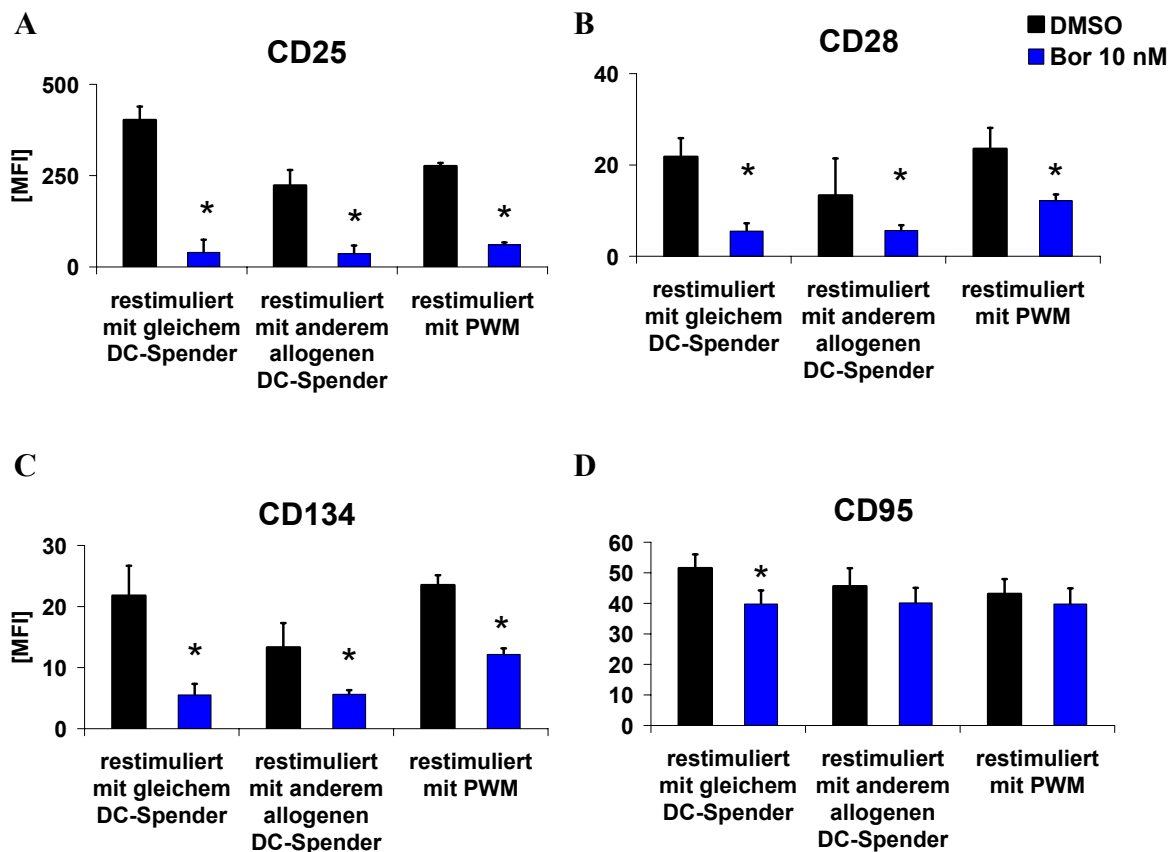


Abb. 40: Suppression der Expression von Oberflächenrezeptoren bei aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allophenen mDCs aktiviert. Nachfolgend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO inkubiert und anschließend mit den gleichen allophenen mDCs wie in der initialen Aktivierung, mDCs von einem anderen allophenen DC-Spender wie in der initialen Aktivierung oder PWM für weitere 24 h restimuliert. Anschließend wurde die Expression der Zelloberflächenproteine CD25 (A), CD28 (B), CD134 (C) und CD95 (D) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) ± SEM von vier unabhängigen Experimenten durchgeführt als Triplet. * $p < 0,035$ (gepaarter Student t-Test) gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Es zeigte sich, dass alle mit Bortezomib-inkubierten Restimulations-Ansätze eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eingeschränkte Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren aufwiesen. Dabei konnte eine besonders deutliche, statistisch-relevante Suppression der Expression der IL-2 Rezeptor- α -Kette (CD25) (Abb. 40A) und der kostimulierenden Moleküle CD28 (Abb. 40B) und CD134 (Abb. 40C) beobachtet werden. Die Analyse der CD95 Expression (Abb. 40D) demonstrierte nur einen geringfügigen Unterschied zwischen dem Kontroll- und dem Bortezomib-Ansatz und erwies sich nur für die Restimulation mit mDCs des gleichen allophenen Spenders als signifikant unterschiedlich. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib, analog zur Untersuchung der Proliferation und der Zytokin-Produktion, einen hemmenden Effekt auf sowohl ruhende, als auch bereits aktivierte T-Zellen hatte.

Zusammengefasst demonstrierte die Analyse von restimulierten T-Zellen, dass Bortezomib auch einen supprimierenden Effekt auf die nach Proteasom-Inhibition überlebenden Zellen hatte. Im Einzelnen konnte eine stark verminderte Proliferation bei Bortezomib-inkubierten aktivierten und restimulierten T-Zellen nachgewiesen werden. Diese konnte zumindest teilweise durch die suppressierte Expression von für die IL-2 Bindung und Kostimulation wichtigen Oberflächenproteinen erklärt werden. Eine weitere Begründung hierfür konnte durch den Nachweis der verminderten Produktion von für die Aktivierung und Proliferation essentiellen Zytokinen gegeben werden.

2.9 Proteasom-Inhibition verhindert die Aktivierung von NF- κ B und die Translokation von NFATc2 in den Nukleus

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren ist für die korrekte Funktion von T-Zellen wesentlich (Rao *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1998). Während die Aktivität von NFAT sowohl für immunogene und tolerogene T-Zell Immunantworten verantwortlich ist, regulieren die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie, die sowohl über TZR- als auch durch Kostimulation aktiviert werden, nur immunogene T-Zell-Funktionen (Sundstedt *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1998; Kane *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen, inwiefern eine Suppression der nukleären Translokation von NFAT durch Inhibition des Proteasoms erfolgte, wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte von Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen im Western Blot auf die Anwesenheit von NFATc2, eines der Hauptmitglieder der NFAT-Familie in reifen T-Zellen, analysiert (Macian F, 2005).

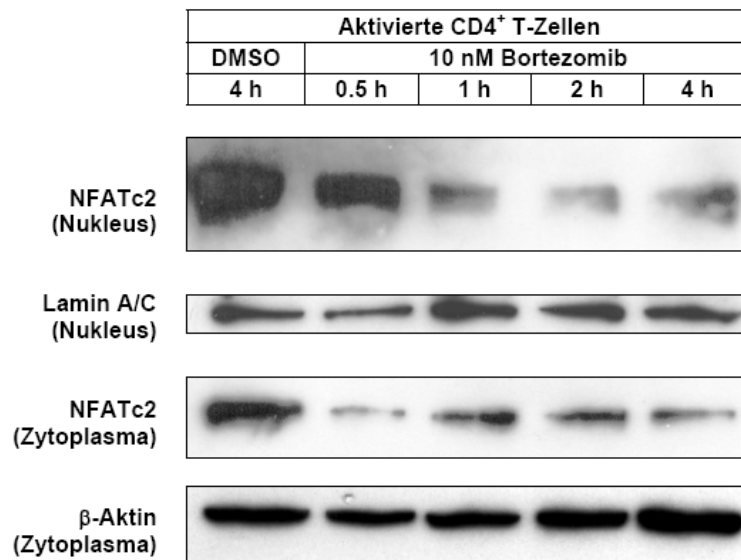


Abb. 41: Suppression der nukleären Translokation und zytoplasmatischen Abundanz von NFATc2 durch Bortezomib. CD4⁺ T-Zellen wurden durch 5-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert und für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert. Anschließend wurden nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen generiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Quantität von NFATc2 in den einzelnen Fraktionen im Western Blot mit anti-NFATc2 (4G6-G5) ermittelt. Als Ladekontrolle wurde anti-β-Aktin (AC-15) für die zytoplasmatische und anti-Lamin A/C für die nukleäre Fraktion verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Es konnte eine sukzessive Abnahme der nukleären Translokation und der zytoplasmatischen Abundanz von NFATc2 beobachtet werden (Abb. 41). Dadurch konnte demonstriert werden, dass die proteasomale Aktivität für die Aktivierung und nukleäre Lokalisation von NFATc2 bei aktivierten T-Zellen erforderlich war.

Um zu untersuchen, ob die Proteasom-Inhibition die Degradation von IκB-α verhindert und somit einen direkten Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptions-Faktors NF-κB hat, wurden aktivierte CD4⁺ T-Zellen behandelt, wie bei der Analyse von Zellzyklusregulatoren (Kapitel 2.6) beschrieben und die Expression von IκB-α im Western Blot analysiert.



Abb. 42: Inhibition der IκBα-Degradation durch Bortezomib. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert. Frisch isolierte naive CD4⁺ T-Zellen wurden dem Versuchsansatz als Negativ-Kontrolle hinzugefügt. Aus allen Zellen wurden Ganzzelllysate generiert, diese mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe von anti-IκBα (H-4) entwickelt. Anti-β-Aktin (AC-15) diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten.

Aktiviert CD4⁺ T-Zellen exprimieren nur geringfügig mehr IκBα als unstimulierte CD4⁺ T-Zellen. Die Inkubation mit Bortezomib bewirkte eine Akkumulation von IκB-α, die auf die Inhibition der proteasomalen Degradation zurückzuführen ist (Abb. 42). Damit verursachte die Proteasom-Inhibition eine Blockierung des NF-κB-Signalwegs in aktivierten T-Zellen, wodurch vermutlich die verminderte Proliferation und Zytokin-Produktion und die Blockierung von NF-κB-abhängigen anti-apoptotischen Mechanismen ausgelöst wurden. Zusammenfassend konnte hiermit ein proteasomaler Einfluss auf für T-Zell-Funktionen essentielle Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

3 Mechanismen der Apoptose-Induktion in aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Bortezomib

In den vorangegangenen Experimenten konnten die Auswirkungen der Proteasom-Inhibition auf funktionelle und phänotypische Eigenschaften von aktivierten CD4⁺ T-Zellen dargestellt werden. Anschließend sollte nun der Mechanismus der Apoptose-Induktion bei Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen aufgeklärt werden, da bisherige Publikationen diesen Aspekt nur unzureichend analysiert hatten (Blanco *et al.*, 2006).

3.1 Untersuchung des Spaltungszustands von Caspasen

Ein Hinweis auf die Aktivität von Caspasen, den Exekutoren der Apoptose, liefert ihr Grad der Prozessierung. Deshalb sollte in einem ersten Schritt der Prozessierungsgrad von Caspase-8, -9, -3 und -7 analysiert werden, um den durch Bortezomib-induzierten

Apoptoseweg bei aktivierten $CD4^+$ T-Zellen näher untersuchen zu können. Dazu wurden aktivierte $CD4^+$ T-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit 10 nM Bortezomib inkubiert und die Expression der Initiator-Caspasen-8 und -9 sowie der Effektor-Caspasen-3 und -7 im Western Blot analysiert. Dabei dienten Ganzzelllysate aus naiven, unbehandelten $CD4^+$ T-Zellen als Negativ-Kontrolle.

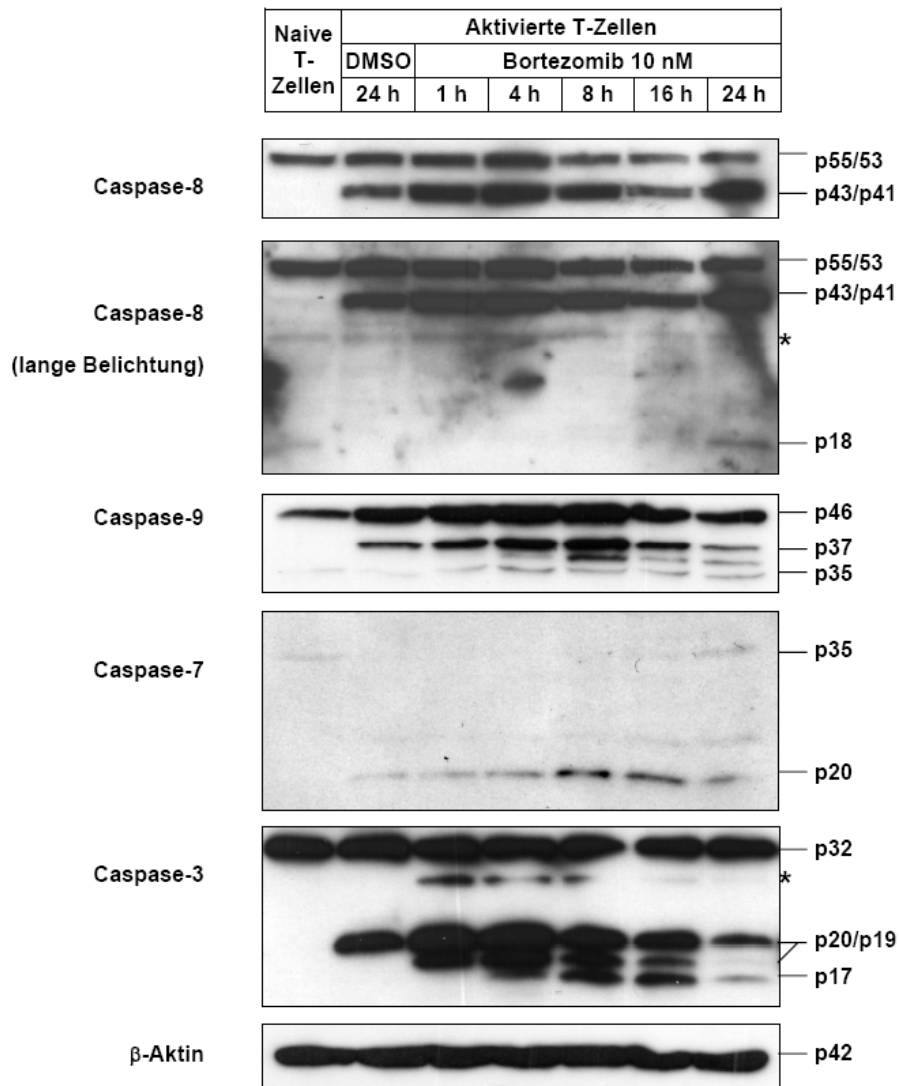


Abb. 43: Induktion der Caspase-Prozessierung durch Bortezomib. Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert. Frisch isolierte naive $CD4^+$ T-Zellen wurden dem Versuchsansatz als Negativ-Kontrolle hinzugefügt. Aus allen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, diese mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Hierzu wurden anti-Caspase-8 (1C12), anti-Caspase-9, anti-Caspase-7p20 (B-5) und anti-Caspase-3 verwendet. Als Ladekontrolle diente anti- β -Aktin (AC-15). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von fünf unabhängigen Experimenten. Die Asteriske stellen unspezifische kreuzreaktive Proteine dar.

Die Aktivität von Caspase-8 kann man anhand der Spaltung der unprozessierten Procaspase-8 (55 kDa) in Caspase-8p43/p41- und Caspase-8p12-Untereinheiten abschätzen. Die auf physiologische Weise aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimierten sowohl Procaspase-8 als auch die durch Abspaltung der Prodomäne entstandene Caspase-8p43/p41. Die durch die zweite Spaltung entstandene p18-Form, die zur Bildung eines pro-apoptotisch-aktiven Caspase-8 Heterotetramers notwendig ist (Scaffidi *et al.*, 1997; Krueger *et al.*, 2001), wurde erst durch lange Exposition des Filmes bei 24 h Inkubation mit Bortezomib sichtbar. Bei nicht-aktivierten T-Zellen konnte nur Procaspase-8 detektiert werden.

Aktiviert CD4⁺ T-Zellen exprimierten hauptsächlich Procaspase-9 (MW 46 kDa). Des Weiteren konnte die durch Caspase-3 generierte Caspase-9p37 detektiert werden (Slee *et al.*, 1999; Denault *et al.*, 2007). Die Proteasom-Inhibition bewirkte eine rasche Signalzunahme von p37. Das durch Autoprozessierung entstandene p35 Fragment (Srinivasula *et al.*, 1998; Denault *et al.*, 2007) zeigte dagegen nur eine leichte Verstärkung des Signals, während das Signal der Procaspase-9 (p46) sich nicht veränderte. Bei nicht-aktivierten CD4⁺-T-Zellen konnte nur Procaspase-9 nachgewiesen werden.

In aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnten sowohl Procaspase-7 (MW 35 kDa) als auch proteolytisch-aktive Caspase-7p20 detektiert werden. Nicht aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimierten ausschließlich die unprozessierte Procaspase-7. Die Hemmung des Proteasoms verursachte eine geringfügige Zunahme des Caspase-7p20-Signals.

In aktiven, proliferierenden CD4⁺ T-Zellen konnte sowohl die unprozessierte Procaspase-3 (MW 32 kDa) als auch die prozessierte proteolytisch leicht aktive Caspase-3p20 detektiert werden. Bereits kurz nach Zugabe von Bortezomib konnte eine Zunahme der Signalintensität der bereits proteolytisch-aktiven Caspase-3p19 beobachtet werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer wurde Caspase-3p19 in die proteolytisch voll aktive, reife Caspase-3p17 weiter prozessiert. Dagegen konnte eine leichte Abnahme der Signalintensität von Procaspase-3 und Caspase-3p20 beobachtet werden. Nicht-aktivierte T-Zellen exprimierten unprozessierte, proteolytisch inaktive Procaspase-3.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Caspasen in aktivierten CD4⁺ T-Zellen bereits in ihrer prozessierten Form vorliegen. Dagegen zeigten nicht-aktivierte CD4⁺ T-Zellen nur die Expression der jeweiligen Procaspase-Form. Die Proteasom-Inhibition bewirkte eine rasche Autoprozessierung von proteolytisch schwach aktiver Caspase-3p20 in die aktiven p19- und p17-Untereinheiten. Dagegen konnte bei proteolytisch-aktiver Caspase-7p20 nur eine schwache Signalzunahme beobachtet werden. Die Zunahme des

Caspase-9p37-Signals innerhalb 1 h nach Proteasom-Inhibition wurde vermutlich durch eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität generiert. Dagegen verstärkte sich das durch Autoprozessierung entstehende Caspase-9p35-Signal erst nach 4 h Proteasom-Inhibition.

3.2 Untersuchung des Spaltungszustands von Caspase-Substrat-Proteinen

Die proteolytische Aktivität von Caspasen lässt sich, wie bereits erwähnt, nur begrenzt anhand ihrer prozessierten Form ablesen. So können Mitglieder der IAP-Familie, wie z.B. cIAP-1, cIAP-2 und XIAP mit prozessierten Caspasen-3, -7 und -9 wechselwirken und deren Aktivität vollständig hemmen (Riedl *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2001b; Shi *et al.*, 2002). Um die vorhandene Caspase-Aktivität besser beurteilen zu können, wurde der Spaltungszustand der charakteristischen Caspase-3-, -7- und -8-Substratproteine PARP, c-FLIP, ICAD, HPK1 und Bid im Western Blot analysiert (Abb. 44).

Das DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase-1 (PARP) wird während der Apoptose sowohl von Caspase-3 als auch Caspase-7 gespalten (Tewari *et al.*, 1995; Germain *et al.*, 1999). Bei nicht-aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnte ungespaltenes PARP (116 kDa) detektiert werden, wogegen bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen die Anwesenheit von gespaltenem (85 kDa) PARP zu beobachten war. Die Zugabe von Bortezomib bewirkte in aktivierten T-Zellen bereits nach 1 h die Abnahme von intakter PARP und eine Zunahme des 85 kDa Spaltproduktes.

Die Inaktivierung des nukleären ICAD/DFF45 durch Caspase-3-vermittelte proteolytische Spaltung verursacht die Freisetzung der aktiven Endonuklease CAD/DFF40, welche genomische DNA fragmentiert (Liu *et al.*, 1997). In aktivierten CD4⁺ T-Zellen wurde die ICAD-L- gegenüber der ICAD-S-Isoform auf höherem Niveau exprimiert. Die Inkubation der Zellen mit Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression beider Spleiß-Varianten. Dennoch war eine Zunahme eines Spaltprodukts mit 28 kDa MW festzustellen. Dieses entspricht dem nach Caspase-3 Spaltung am Asp¹¹⁷ entstehenden C-terminalen ICAD-L Fragment. Es konnte eine Verstärkung der Signalintensität dieses Spaltprodukts bereits nach 1 h Proteasom-Inhibition detektiert werden.

Die Hämatopoietische Progenitor Kinase1 (HPK1) moduliert die Sensitivität von aktivierten T-Zellen gegenüber Aktivierungs-induziertem Zelltod (AICD) durch Regulation von NF-κB-Signalwegen (Arnold *et al.*, 2001). HPK1 wird nach Aktivierung von T-Zellen über den TZR durch schwach-aktive Caspase-3 in die N-terminale Kinase-Domäne (HPK1-N) und die C-terminale regulatorische-Domäne (HPK1-C) gespalten.

Der HPK1-Western-Blot wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der die N-terminale-Kinase-Domäne erkennt, so dass sowohl die ungespaltene HPK1 (MW 97 kDa) als auch HPK1-N detektiert wurden. Nicht aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimierten deutlich weniger ungespaltene HPK1 als aktivierte CD4⁺ T-Zellen. Bei aktivierten T-Zellen konnte darüber hinaus die prozessierte HPK1-N detektiert werden. Das deutete auf eine gering vorhandene Caspase-3-Aktivität bereits in aktivierten, nicht-apoptotischen CD4⁺ T-Zellen hin. Die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib bewirkte sowohl eine Abnahme des HPK1-Signals als auch eine kontinuierliche Zunahme der HPK1-N Signalintensität.

Proteolytische Caspase-8 Aktivität wird durch verschiedene Spleiß-Varianten des Caspase-8-Homologs c-FLIP moduliert. Diese weist als Heterodimer mit c-FLIP nur eine moderate proteolytische Aktivität auf und spaltet c-FLIP_L zu p43-FLIP oder p22-FLIP. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimierten c-FLIP_L, c-FLIP_S und p43-FLIP, wogegen bei unstimulierten CD4⁺ T-Zellen nur c-FLIP_L beobachtet werden konnte. Die Inkubation mit Bortezomib induzierte eine Zunahme aller c-FLIP-Spleiß- und Spalt-Varianten. Zusätzlich konnte mit c-FLIP_R und p22-FLIP nach 16 h Proteasom-Inhibition eine weitere c-FLIP-Spleiß-Form detektiert werden (Djerbi *et al.*, 2001; Golks *et al.*, 2005).

Das *BH3-only* Protein Bid befindet sich im inaktiven Zustand im Zytoplasma. Die aktive *truncated* (t)Bid Form wird durch Caspase-8-vermittelte proteolytische Spaltung generiert. Diese transloziert zu den Mitochondrien und agiert dort durch Interaktion mit *Bax-like*-Proteinen als Apoptose-Aktivator und Verstärker der Rezeptor-vermittelten Apoptose (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999).

Bid wurde sowohl in naiven als auch in aktivierten CD4⁺ T-Zellen nur in der ungespaltenen Form exprimiert. Durch Inhibition des Proteasoms konnte eine Anreicherung von Bid beobachtet werden.

Insgesamt zeigte sich in aktivierten, nicht-apoptotischen CD4⁺ T-Zellen eine selektive Spaltung von Caspase-3-, -7- und -8-Substraten. Durch Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib verstärkte sich die Caspase-3- und -7-Aktivität, sichtbar an der Zunahme der PARP-, ICAD- und HPK1-Spaltprodukte. Die Akkumulation der c-FLIP-Spleiß- und Spalt-Produkte und von Bid war dagegen wohl eher auf die Inhibition der proteasomalen Degradation zurückzuführen (Kim *et al.*, 2002; Perez und White, 2003; Breitschopf *et al.*, 2000).

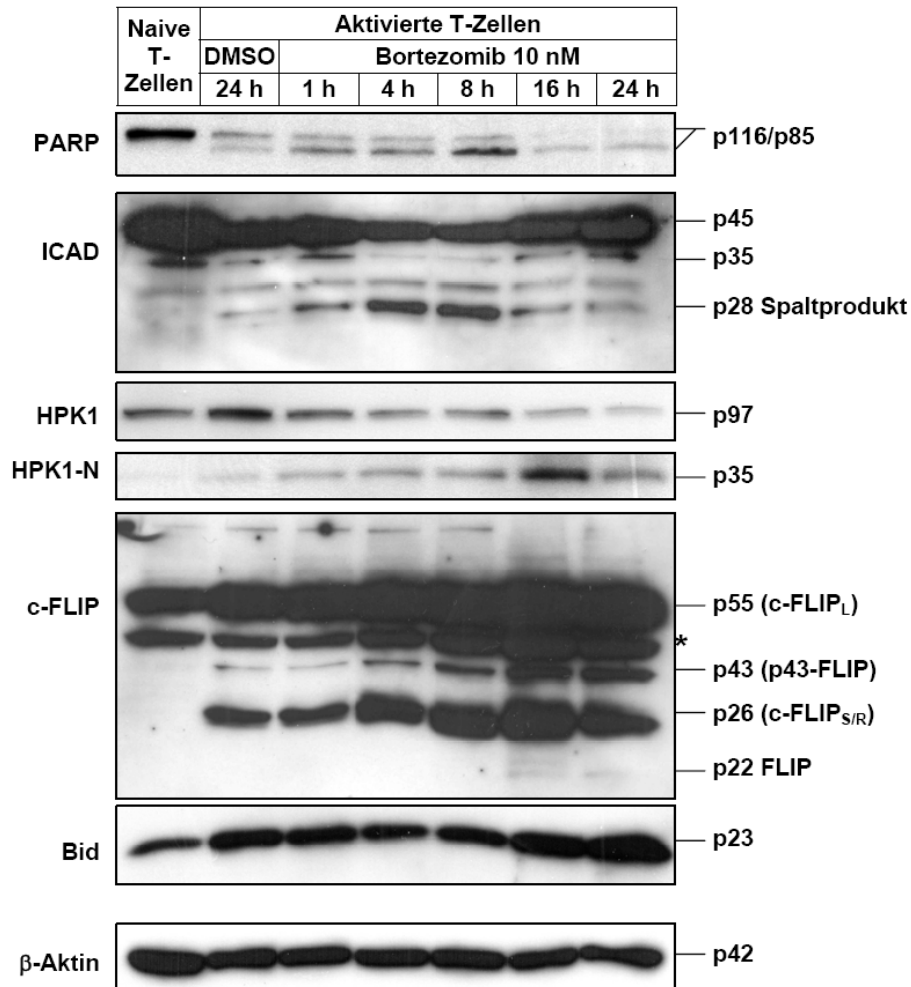


Abb. 44: Bortezomib verstärkt Spaltung von spezifischen Caspase-Substraten Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert. Frisch isolierte naive CD4⁺ T-Zellen wurden dem Versuchsansatz als Negativ-Kontrolle hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Zellen lysiert, die Proteinlysate mit 12% SDS-PA-Gelen aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe von anti-PARP (H-250), anti-ICAD (FL-331), anti-HPK1, anti-c-FLIP_{S/L} (G 11) und anti-Bid (FL-195) entwickelt. Anti-β-Aktin (AC-15) diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind jeweils drei repräsentative Western Blots aus einer Serie von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Der Asterisk stellt unspezifische kreuzreaktive Proteine dar.

3.3 Identifizierung aktiver Caspasen durch *in situ* trapping mittels bVAD-fmk

In den vorausgegangen Versuchen konnte demonstriert werden, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen prozessierte Caspase-3, -7, -8 und -9 haben. Durch Analyse von Caspase-Substratproteinen konnte vor allem eine Steigerung der Caspase-3- und -7-Aktivität nach Proteasom-Inhibition nachgewiesen werden. Die Abschätzung der Caspase-Aktivität anhand des Prozessierungsgrads und von charakteristischen Caspase-Proteinsubstraten bietet allerdings nur einen eingeschränkten Hinweis auf ihre proteolytische Aktivität. So ist beispielsweise unprozessierte Procaspase-8 nach Heterodimerisierung mit c-FLIP_L proteolytisch-aktiv (Muzio *et al.*, 1998; Micheau *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003). Auch Procaspase-9 gilt nach Dimerisierung im Apoptosome als proteolytisch-aktiv (Riedl *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004).

Zur Detektion und Analyse proteolytisch-aktiver Caspasen wurden Caspase-Aktivitäts-Blots entwickelt. Hierzu wurden proteolytisch-aktive Caspase-Untereinheiten mit dem biotinylierten Peptid-basierten Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk (bVAD) markiert und anschließend präzipitiert. Im anschließenden Western Blot erfolgte die Identifizierung der präzipitierten proteolytisch-aktiven Caspasen durch Verwendung spezifischer Antikörper, da eine einfache Markierung zur Unterscheidung der zahlreichen Caspase-Untereinheiten gleichen Molekulargewichts nicht ausreicht.

Für den Versuchsansatz wurde eine insgesamt kürzere Inkubationsspanne mit mehr Zeitpunkten gewählt, da es von besonderem Interesse war, welche der Caspasen zuerst eine erhöhte Aktivität aufzeigte und somit für die Aktivierung der anderen Caspasen verantwortlich war. Auch war noch unklar, welcher Apoptoseweg durch Bortezomib-Inkubation bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen induziert wurde. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich vor der Zugabe von 10 nM Bortezomib mit 100 µM des nicht-biotinylierten ZVAD-fmk inkubiert.

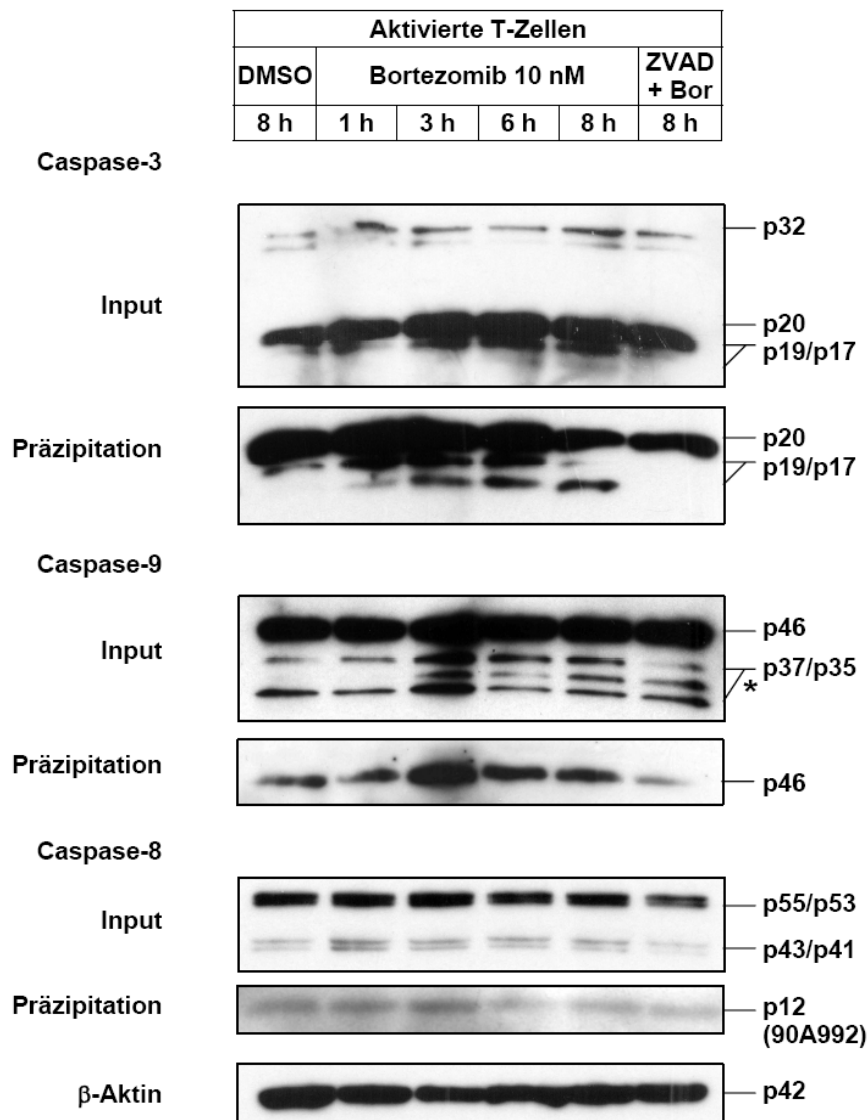


Abb. 45: Steigerung der proteolytischen Caspase-Aktivität durch Bortezomib. Je 2×10^7 aktivierte $CD4^+$ T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Bortezomib oder DMSO inkubiert, bzw. mit 100 μ M ZVAD-fmk (ZVAD) vorinkubiert und anschließend mit 10 nM Bortezomib versetzt. Nachfolgend wurde 20 μ M bVAD für 1 h hinzugefügt, die Zellen danach lysiert und mit Streptavidin-HRP *beads* über Nacht präzipitiert. Die Präzipitate wurden dann in 12% SDS-PA Gelen aufgetrennt und im Western Blot entwickelt. Hierzu wurden anti-Caspase-8 (90A992), anti-Caspase-9 und anti-Caspase-3 verwendet. Als Ladekontrolle diente anti- β -Aktin (AC-15). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten. Der Asterisk stellt unspezifische kreuzreaktive Proteine dar.

Die Western Blots aus dem Input bestätigten das Ergebnis der Caspasen-Analyse mit Ganzzelllysaten (Kapitel 3.2). Caspase-3, -8 und -9 konnten bereits bei aktivierten, nicht Proteasom-inhibierten $CD4^+$ T-Zellen in prozessierter Form detektiert werden (Abb. 45). Im Einzelnen exprimierten aktivierte $CD4^+$ T-Zellen Caspase-3p20, während für Procaspase-3 und dem Caspase-3p19-Fragment nur schwache Signale festgestellt werden konnten. Bortezomib induzierte innerhalb von 1 h die Autoprozessierung von Caspase-

3p20 in die p19- und p17-Fragmente der reifen Caspase-3. Caspase-9 wurde im Input der aktivierten CD4⁺ T-Zellen überwiegend als Procaspase vorgefunden. Außerdem konnte noch das durch Caspase-3-Aktivität generierte Caspase-9p37-Fragment und durch Autoprozessierung entstandene Caspase-9p35-Fragment identifiziert werden. Die Inkubation mit Bortezomib bewirkte eine deutliche Signalverstärkung von Caspase-9p37, wogegen Caspase-9p35 kaum Signalveränderungen zeigte.

Caspase-8 konnte im Input hauptsächlich als Procaspase detektiert werden. Zusätzlich zeigten sich die prozessierten Caspase-8p43/p41-Isoformen. Die Inkubation mit Bortezomib bewirkte kaum sichtbare Signalveränderungen.

In den bVAD-Aktivitäts-Blots von aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnte nur prozessierte Caspase-3p20 identifiziert werden. Die Zugabe von Bortezomib resultierte im raschen Fortsetzen der Prozessierung in Caspase-3p19 und p17 bereits nach 1 h Proteasom-Inhibition und somit in der Verstärkung der proteolytischen Caspase-3 Aktivität.

Caspase-9 konnte in den Aktivitäts-Blots in der unprozessierten Procaspase-Form mit dem Molekulargewicht 46 kDa nachgewiesen werden. Dieses Signal war bereits in den aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu beobachten. Die Apoptose-Induktion durch Bortezomib bewirkte eine Verstärkung des Signals nach 3 h Proteasom-Inhibition, gleichbedeutend mit der Erhöhung der Caspase-9-Aktivität. Die proteolytische Caspase-9-Aktivität erhöhte sich somit erst nach der Zunahme der Caspase-3-Aktivität. In den Aktivitäts-Blots konnten prozessierte Caspase-9p37 und p35 nicht nachgewiesen werden.

Caspase-8 zeigte in den Aktivitäts-Blots, trotz Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern, nur äußerst schwache Signale, die während der Analysezeit kaum Veränderungen aufzeigten. Die erhaltenen Signale entsprachen einem Molekulargewicht der kleinen Caspase-8p12-Untereinheit.

Die Präinkubation mit 100 µM des Pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk hemmte die Prozessierung von Caspase-3 und -9 im Input und in den Aktivitäts-Blots. Darüber hinaus konnte in den Aktivitäts-Blots durch die Anwesenheit von ZVAD-fmk eine Signalabnahme von Caspase-3 und -9 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden. Diese Signalabschwächung ist gleichbedeutend mit der Inhibition der proteolytischen Caspase-Aktivität durch ZVAD-fmk.

Die Aktivitäts-Blots zeigten, dass Caspase-3, -8 und -9 in aktivierten CD4⁺ T-Zellen proteolytisch-aktiv sind. Darüber hinaus konnte eine rasche Zunahme der Caspase-3- und Caspase-9-Aktivität durch Bortezomib nachgewiesen werden.

3.4 Der Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk verringert Bortezomib-vermittelte Apoptose, Proliferationsabnahme und CD25-Expressionsabnahme

In den vorherigen Versuchen konnte demonstriert werden, dass aktivierte, nicht-apoptotische CD4⁺-T Zellen prozessierte und proteolytisch-aktive Caspasen-3, -7, -8 und -9 besitzen. Durch Inhibition des Proteasoms konnte eine Zunahme der Prozessierung und der Aktivität von Caspase-3, -7 und -9 innerhalb kurzer Zeit beobachtet werden. Mit Hilfe des synthetischen Peptid-basierten Pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk (Dolle *et al.*, 1994) sollte nun überprüft werden, ob die Bortezomib-vermittelte Apoptose-Induktion (Kapitel 2.5), Inhibition der Proliferation (Kapitel 2.4) und Suppression der CD25-Expression (Kapitel 2.7) bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen Caspase-abhängig war. Dazu wurden aktivierte CD4⁺ T-Zellen mit 100 µM ZVAD-fmk für 1 h vorinkubiert und anschließend 10 nM Bortezomib für weitere 24 h hinzugefügt. Danach wurde der Anteil Annexin V⁺/PI⁺ Zellen bestimmt und die spezifische Apoptose ermittelt.

Die Vorinkubation mit ZVAD-fmk bewirkte eine signifikante Verringerung der Bortezomib-induzierten Apoptose. Es konnte eine Abnahme der sA von 40% auf 11% beobachtet werden.

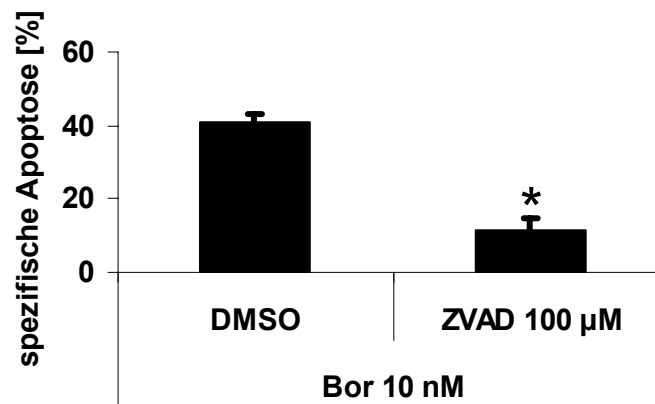


Abb. 46: Inhibition der Bortezomib-induzierten Apoptose durch ZVAD-fmk. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 100 µM ZVAD-fmk oder DMSO vorinkubiert und nachfolgend mit 10 nM Bortezomib (Bor) für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde die spezifische Apoptose ermittelt, wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von sechs unabhängigen, im Triplet durchgeführten Experimenten. * p < 0,002 (gepaarter Student t-Test) gegenüber Bortezomib-Ansatz.

Wie bereits in Kapitel 2.4 gezeigt werden konnte, bewirkte die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib eine Abnahme der Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 46). Diese war einerseits auf die Induktion von Apoptose und andererseits auf einen Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus zurückzuführen. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die Inhibition der Caspase-Aktivität die Bortezomib-induzierte

Hemmung der Proliferation beeinflusste. Dazu wurde vorgegangen, wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben. Da Caspasen bei aktivierten T-Zellen jedoch auch zur Proliferation notwendig sind (Alam *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 2005), musste zusätzlich der Effekt von ZVAD-fmk auf die Proliferationsrate von aktivierten CD4⁺ T-Zellen analysiert werden. Deshalb wurde parallel zur ZVAD-fmk/10 nM Bortezomib-Versuchsreihe auch ein Ansatz ausschließlich mit ZVAD-fmk vorgesehen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Proliferation zur jeweiligen Kontrolle ermittelt.

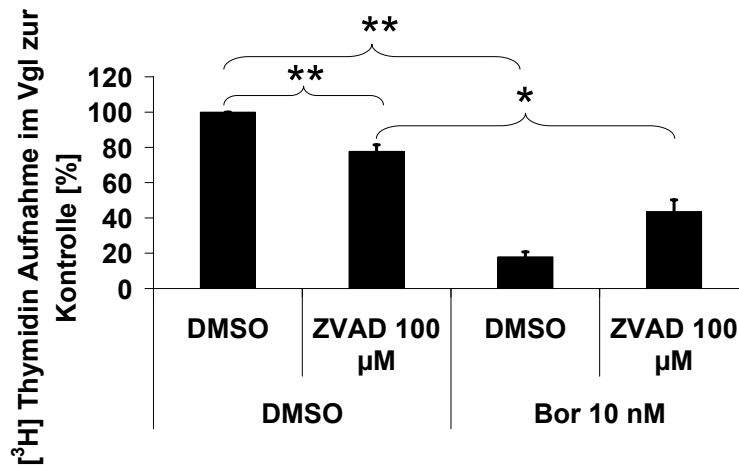


Abb. 47: Inhibition der Bortezomib induzierten Abnahme der Proliferation durch ZVAD-fmk (ZVAD). Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 100 µM ZVAD-fmk oder DMSO vorinkubiert und nachfolgend mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO für weitere 24 h inkubiert. Nachfolgend wurde der Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin bestimmt und der prozentuale Anteil gegenüber der jeweiligen Kontrolle ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von sechs unabhängigen Experimenten, die in sechsfachen Ansätzen durchgeführt wurden. * p < 0,003; ** p < 0,001 (gepaarter Student t-Test) gegenüber der jeweiligen-Kontrolle.

Die Inhibition der Caspasen bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch ZVAD-fmk bewirkte eine signifikante Verminderung der Proliferation auf 77% der Ausgangsproliferation. Die Inkubation mit Bortezomib verringerte die Proliferation in statistisch relevantem Maße auf 17% des Kontrollansatzes. In Anwesenheit von ZVAD-fmk konnte die Bortezomib-vermittelte Suppression der Proliferation signifikant auf 50% des ZVAD-Kontrollansatzes reduziert werden (Abb. 47). So konnte demonstriert werden, dass eine proteolytische Caspase-Aktivität für einen Teil der Bortezomib-induzierten Proliferations-Inhibition verantwortlich war.

Die Analyse des Einflusses von Caspasen bei der Bortezomib-induzierten Inhibition der CD25-Expression wurde wie in Kapitel 2.7 durchgeführt. Da eine proteolytische Caspase-Aktivität bei aktivierten T-Zellen auch zur Expression von CD25 notwendig ist (Falk *et al.*, 2005), wurde analysiert, ob die Inkubation mit ZVAD-fmk die Expression von CD25

beeinflusst. Deshalb wurde parallel zur ZVAD-fmk/10 nM Bortezomib-Versuchsreihe ein Ansatz mit ZVAD-fmk vorgesehen. Tatsächlich bewirkte die 24 h Inkubation mit ZVAD-fmk eine Abnahme der CD25-Expression von 301 MFI auf 185 MFI. Dies entsprach einer Ausgangsexpression von 61,3%. Dagegen verursachte die Proteasom-Inhibition durch 10 nM Bortezomib eine Verringerung der CD25-Expression auf 127 MFI. Dieser Wert entsprach 42% der ursprünglichen Expression. In Anwesenheit von ZVAD-fmk bewirkte Bortezomib eine Abnahme der CD25 Expression auf 107 MFI. Die CD25 Expression entsprach damit nur 35,3% der Ausgangsexpression. Vergleich man jedoch den ZVAD-fmk/Bortezomib-Ansatz mit dem eigentlichen Kontrollansatz ZVAD-fmk, betrug die CD25 Expression noch 57,6%. Daraus folgt, dass die CD25-Expression bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen abhängig von der Caspase-Aktivität ist. Darüber hinaus konnte die durch Bortezomib verursachte Abnahme der CD25-Expression durch Hemmung der Caspase-Aktivität antagonisiert werden (Abb. 48).

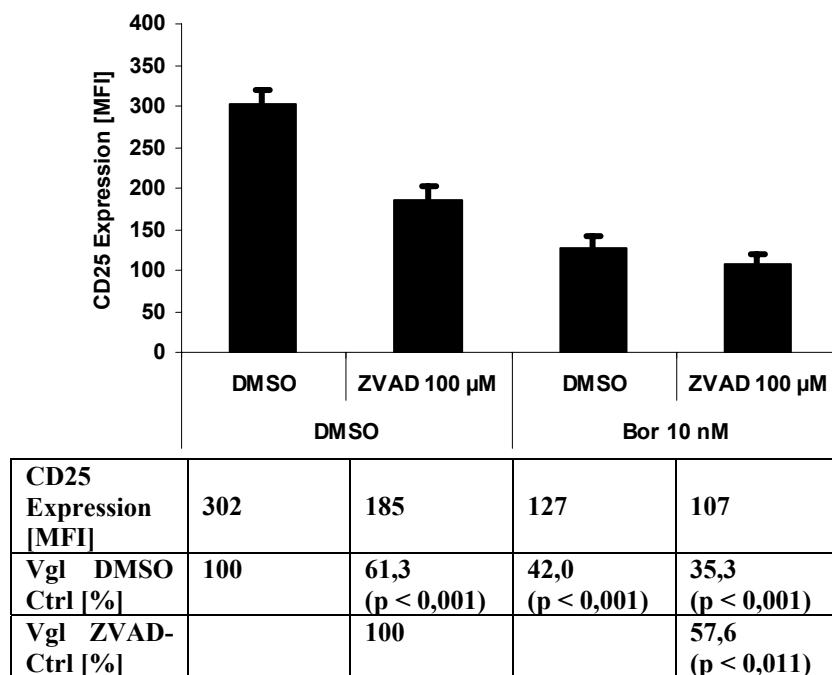


Abb. 48: Antagonisierung der Bortezomib-induzierten Abnahme der CD25 Expression durch ZVAD-fmk (ZVAD). Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 100 µM ZVAD-fmk oder DMSO vorinkubiert und nachfolgend mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO für weitere 24 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Expression des Zelloberflächenproteins CD25 durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) ± SEM von sechs unabhängigen, im Triplet durchgeführten Experimenten.

3.5 Expressions-Analyse natürlicher Caspase-Inhibitoren

In den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Caspasen in aktivierten CD4⁺ T-Zellen eine moderate proteolytische Aktivität haben. Diese ist für essentielle Funktionen, wie z.B. T-Zell-Proliferation und Expression von IL-2R α (CD25), notwendig, wie auch vorausgegangene Studien bereits nachweisen konnten (Alam *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 2005). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Aktivität von Caspasen in den aktivierten T-Zellen, insbesondere die Caspase-3-Aktivität, einer zentralen Regulation unterliegt. Dadurch wird das Überschreiten eines gewissen apoptotischen Schwellenwerts verhindert. Die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib bei aktivierten T-Zellen verursachte eine Zerstörung dieses regulativen Mechanismus und eine Aktivierung der pro-apoptotischen proteolytischen Caspase-Aktivität.

Die Proteine der IAP-Familie sind Antagonisten der Caspase-Funktion und stellen damit potentielle Kandidaten für die Regulation der Caspase-Aktivität dar. IAPs antagonisieren vor allem die Initiator-Caspase-9 und die Effektor-Caspasen-3 und -7 (Deveraux und Reed, 1999). Darüber hinaus haben einige IAPs, z.B. cIAP-1, cIAP-2 und XIAP, wie E3-Ubiquitin-Ligasen, RING-Finger Domänen. Dadurch können sie Caspasen als ihre Interaktionspartner zum Zweck des proteasomalen Abbaus ubiquitinieren (Li *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001a).

Eine Western-Blot-Analyse der wichtigsten Mitglieder der IAP-Familie sollte zeigen, ob Bortezomib einen hemmenden Einfluss auf deren Expression hat. Dazu wurden aktivierte CD4⁺ T-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Bortezomib inkubiert, Ganzzelllysate hergestellt und eine Western Blot-Analyse von cIAP-1, cIAP-2 und XIAP durchgeführt.

der cIAP-1-, cIAP-2- und XIAP-Expression konnte eine Ursache für die durch Bortezomib verursachte Verstärkung der Caspase-Aktivität nachgewiesen werden.

3.6 Untersuchung der Translokation intramitochondrialer pro-apoptotischer Proteine

Die Abnahme der Expression von cIAP-1 und cIAP-2 erklärte die auf den Aktivitäts-Blots beobachtete Zunahme der proteolytischen Caspase-3 und -9 Aktivität. Mit *Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with a low pI* (Smac/DIABLO) und *high temperature requirement protein A2/Omi stress-regulated endoprotease* (HtrA2) existieren zwei intramitochondriale Proteine, die nach zytoplasmatischer Translokation eine indirekte Caspase-Aktivierung durch Inaktivierung der IAPs verursachen. Smac/DIABLO und HtrA2 antagonisieren die IAP-vermittelte Caspase-Hemmung (Chai *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002). Die Abnahme der cIAP-1 und cIAP-2-Signale könnte auch auf der Spaltung durch die proteolytische Aktivität der mitochondrialen Serin-Protease HtrA2/Omi basieren (Srinivasula *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003).

Darüber hinaus demonstrierten die Aktivitäts-Blots auch eine Zunahme der Caspase-9-Aktivität. Zur Aktivierung von Caspase-9 ist die zytoplasmatische Translokation von intramitochondrialem Cytochrom *c* notwendig.

Das Flavoprotein AIF ist ein weiteres pro-apoptotisches, intramitochondriales Protein, das jedoch im Gegensatz zu Smac/DIABLO und Cytochrom *c* Caspase-unabhängige Apoptose induziert (Susin *et al.*, 1999; Joza *et al.*, 2001).

Die Untersuchung von zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktionen von Bortezomib-inkubierten, aktivierten CD4⁺ T-Zellen sollte zeigen, ob eine zytoplasmatische Translokation von intramitochondrialen pro-apoptotischen Proteinen stattgefunden hatte. Dazu wurden aktivierte CD4⁺ T-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit 10 nM Bortezomib inkubiert und danach zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen angefertigt. Anschließend wurde die Abundanz der intramitochondrialen Proteine Smac/DIABLO, HtrA2, Cytochrom *c* und AIF in den verschiedenen Fraktionen mit Hilfe von Western Blots analysiert.

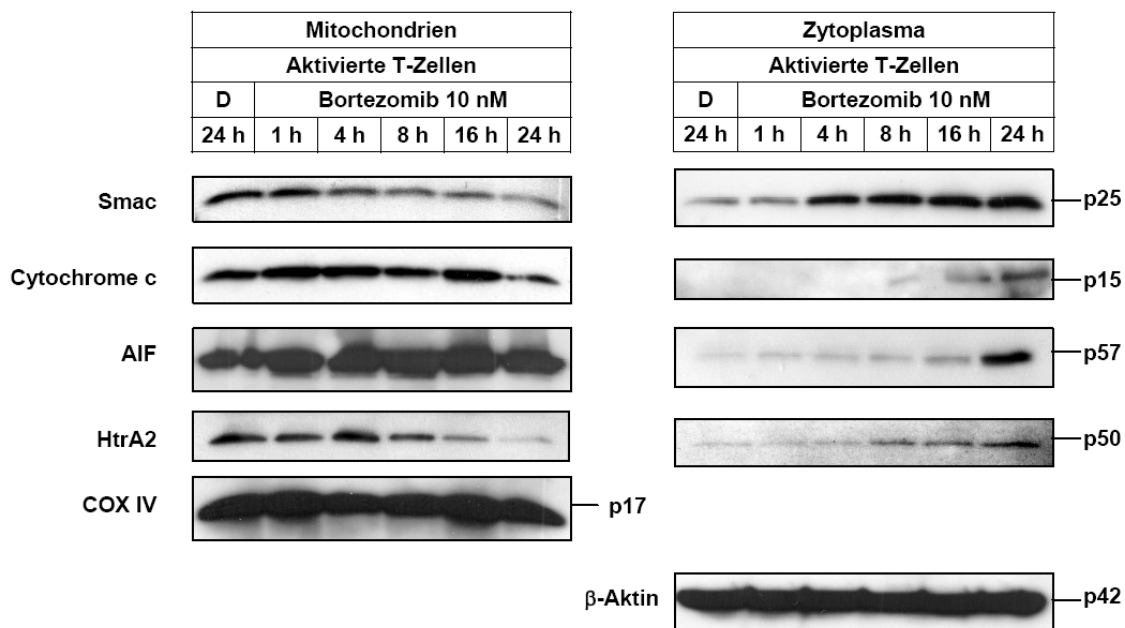


Abb. 50: Freisetzung von intramitochondrialen pro-apoptischen Proteinen durch Bortezomib (Bor). CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert und für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO (D) inkubiert. Anschließend wurden mitochondriale und zytoplasmatische Fraktionen generiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Quantität von Smac/DIABLO (Smac), Cytochrom *c*, AIF und HtrA2 in den einzelnen Fraktionen im Western Blot analysiert. Dazu wurden anti-Smac (FL-239), anti-Cytochrom *c* (7H8), anti-AIF (E-1) und anti-HtrA2 (1B3) verwendet. Als Ladekontrolle wurden anti-β-Aktin (AC-15) für die zytoplasmatische und anti-COX IV für die mitochondriale Fraktion verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Bortezomib bewirkte nach 4 h Inkubation eine Freisetzung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Im Gegensatz dazu konnte zytoplasmatisches Cytochrom *c* erst nach 16 h Proteasom-Inhibition beobachtet werden. AIF zeigte eine ähnliche Dynamik wie Cytochrom *c* und translozierte erst nach 16 h ins Zytoplasma.

Eine zytoplasmatische Translokation der Serin-Protease HtrA2 in das Zytoplasma konnte nach 8 h nachgewiesen werden und lag zeitlich damit zwischen der Freisetzung von Smac/DIABLO und Cytochrom *c* bzw. AIF (Abb. 50).

Durch die Freisetzung von Smac/DIABLO und HtrA2 aus den Mitochondrien ins Zytoplasma konnte die rasche Inaktivierung der Caspase-inhibierenden Wirkung von XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 erklärt werden. Dadurch kommt es zur Zunahme der Caspase-3- und -7-Aktivität, welche man bei der Untersuchung der Caspase-Substrat-Proteine und anhand der Aktivitäts-Blots feststellen konnte. Die in Kapitel 1.1 gezeigte Abnahme von cIAP-1 und cIAP-2 ließ sich somit durch HtrA2-vermittelte proteolytische Spaltung erklären. Da die Cytochrom *c*- im Vergleich zur Smac/DIABLO-Freisetzung aus den

Mitochondrien verzögert stattfand, konnte damit auch eine Ursache für die im Vergleich zur Caspase-3 verspätete Aktivitätszunahme von Caspase-9 gefunden werden.

3.7 Untersuchung von MOMP-induzierenden Bax-like-Proteinen bei Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Der Efflux von apoptogenen Proteinen wie Cytochrom *c*, Smac/DIABLO und HtrA2 ist nur nach Zerstörung der mitochondrialen Membranintegrität und anschließender *Mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP) möglich. Zur Induktion dieses Effektes ist die Aktivierung von Bax oder Bak, beides Mitglieder der pro-apoptotischen *Bax-like*-Proteine, notwendig (Antonsson *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, inwiefern Bortezomib eine Aktivierung und mitochondriale Translokation von Bax und Bak verursacht hatte, wurde die Präsenz der beiden pro-apoptotischen Proteine in den gleichen zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktionen wie in Kapitel 3.6 mittels Western Blot analysiert.

Bax und Bak konnten im Zytoplasma und in Mitochondrien von aktivierten CD4⁺ T-Zellen sowohl in ihrer monomeren als auch dimeren, aktivierten Form detektiert werden. Nach Zugabe von 10 nM Bortezomib war in beiden Fraktionen eine rapide Zunahme der Signalintensität von Bax-Monomeren und -Dimeren festzustellen, die sich mit Dauer der Proteasom-Inhibition geringfügig verstärkte.

Auch für Bak konnte eine Aktivierung durch Dimerisierung und anschließend eine Translokation an die Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 51).

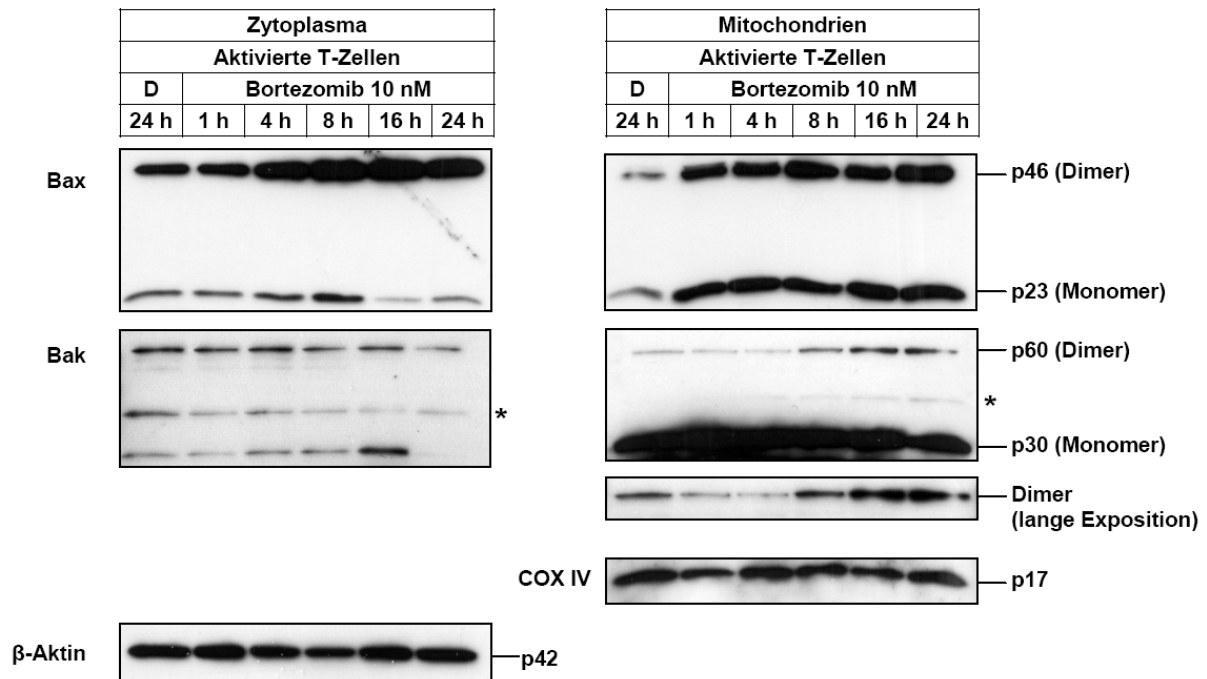


Abb. 51: Aktivierung und mitochondriale Translokation von Bax und Bak durch Bortezomib (Bor). CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert und für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO (D) inkubiert. Anschließend wurden mitochondriale und zytoplasmatische Fraktionen hergestellt, mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Quantität von Bax und Bak in den einzelnen Fraktionen im Western Blot ermittelt. Dazu wurden anti-Bak (G-23) und anti-Bax (N-20) verwendet. Als Ladekontrolle wurden anti- β -Aktin (AC-15) für die zytoplasmatische und anti-COX IV für die mitochondriale Fraktion verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten. Der Asterisk stellt unspezifische kreuzreaktive Proteine dar.

3.8 Untersuchung der Beteiligung von ROS-Produktion bei der Bortezomib-induzierten Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Die durch mitochondriale Bax-/Bak-Translokation induzierte MOMP und daraus resultierende Freisetzung von pro-apoptotischen intramitochondrialen Proteinen wie Smac/DIABLO, HtrA2, Cytochrom *c* und AIF geht oftmals mit der gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) einher (Kroemer G *et al.*, 2007). Erhöhte zytoplasmatische ROS-Konzentrationen können direkt die Oxidierung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren verursachen und dadurch MOMP, in einem positiven Feedback weiter verstärken (Marchetti P *et al.*, 1997). Zahlreiche Studien belegen darüber hinaus, dass die ROS-Produktion einer der multiplen Mechanismen der Apoptose-Induktion durch Bortezomib darstellt (Ling *et al.*, 2003; Fribley *et al.*, 2004; Perez-Galan *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob die Produktion von ROS zur Bortezomib-induzierten Apoptose von aktivierten CD4⁺ T-Zellen beiträgt,

wurden die Zellen mit Rotenon (Rot) und N-Acetylcystein (NAC) für 2 h präinkubiert und anschließend 10 nM Bortezomib für weitere 24 h hinzugefügt. Danach wurde der Anteil Annexin V⁺/PI⁺ Zellen bestimmt und die spezifische Apoptose ermittelt.

Rot blockiert die Ubiquinone-Bindungsstelle der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) in der mitochondrialen Atmungskette, und ist somit ein Inhibitor der im Intermembranraum befindlichen Atmungskette (Lambert AJ und Brand MD, 2004). Komplex I gilt dabei als Hauptproduzent von mitochondrialem ROS (de Vries S, 1986; Turrens *et al.*, 1980; Orrenius *et al.*, 2007).

NAC stimuliert als Vorstufe von reduziertem Glutathion, einem intrazellulären Antioxidans, die zelluläre Glutathion-Produktion, wirkt aber auch direkt als ROS-Fänger (Meister und Anderson, 1983; Villagrasa *et al.*, 1997; Sadowska *et al.*, 2006)

Die Vorinkubation mit Rot und NAC reduzierte die Bortezomib-induzierte Apoptose signifikant (Abb. 52). Dabei zeigte sich, dass Rot mit 23,7% sA die Apoptose nicht ganz so deutlich hemmte wie NAC, welches die Bortezomib-induzierte Apoptose von 40,7% auf 18,4% sA verringern konnte. Wie bereits in 3.4 bewirkte die Vorinkubation mit dem Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk einen im Vergleich zu Rot und NAC noch stärkeren anti-apoptotischen Effekt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Bortezomib-induzierte Apoptose durch die Produktion von mitochondrialen ROS verstärkt wird. Ausserdem konnte Komplex I der Atmungskette als einer der ROS-Produzenten identifiziert werden.

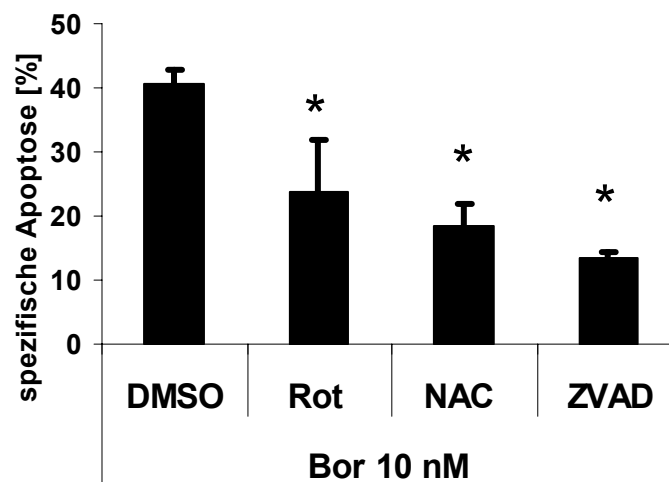


Abb. 52: Inhibition der Bortezomib-induzierten Apoptose durch ZVAD-fmk. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h mit 500 nM Rotenon (Rot), 1 mM N-Acetylcystein (NAC), 100 µM ZVAD-fmk (ZVAD) oder DMSO vorinkubiert und nachfolgend mit 10 nM Bortezomib (Bor) für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde die spezifische Apoptose ermittelt, wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von vier unabhängigen, im Triplet durchgeführten Experimenten. * p < 0,048 (gepaarter Student t-Test) gegenüber Bortezomib-Ansatz.

3.9 Untersuchung von pro-apoptotischen *BH3-only*- und anti-apoptotischen *Bcl-2-like*-Proteinen bei Bortezomib-inkubierten, aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Die Konformationsänderung von Bax und Bak wird durch die pro-apoptotische Aktivität der *BH3-only* Proteine induziert. Diese werden durch spezifische zelluläre Stressfaktoren aktiviert und translozieren anschließend an die äußere mitochondriale Membran, um auf noch nicht geklärte Weise die anti-apoptotischen *Bcl-2-like*-Proteine zu neutralisieren und die *Bax-like*-Proteine zu aktivieren (Huang und Strasser, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Karst und Li, 2007).

Aufgrund der nachgewiesenen Translokation von Bax- und Bak-Dimeren an die äußere mitochondriale Membran sollte nun untersucht werden, welche *BH3-only* Proteine für die Aktivierung und Freisetzung von Bax und Bak verantwortlich sind. Dafür wurde die Präsenz der *BH3-only* Proteine Bid, PUMA, Bim und Noxa in zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktionen ermittelt.

Bortezomib verursachte eine Zunahme von zytoplasmatischem Bid bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen, wogegen in der mitochondrialen Fraktion kein Bid detektiert werden konnte (Abb. 53). Somit konnte das Ergebnis aus der Analyse von Ganzzelllysaten (s. 1.1) bestätigt werden.

PUMA konnte dagegen nur in mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen werden. Die Inhibition des Proteasoms bewirkte eine sukzessive Akkumulation des *BH3-only* Proteins. Auch Bim konnte, wie bereits beschrieben, mit seinen drei bekannten Spleiß-Varianten Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S nur in der mitochondrialen Fraktion detektiert werden (Zhu *et al.*, 2004). Bim_{EL} zeigte, wie bereits beschrieben, die stärkste Expression der Isoformen (O'Reilly *et al.*, 2000). Die Zugabe von Bortezomib bewirkte eine deutliche Anreicherung von Bim, insbesondere der beiden kleinen Isoformen Bim_L und Bim_S.

Noxa wird, wie PUMA, nach genotoxischem Stress durch p53 induziert (Oda *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2001). Nach 8 h Proteasom-Inhibition konnte das *BH3-only* Protein sowohl in zytoplasmatischen als auch in mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen werden und zeigte in der Folge eine rasche Akkumulation.

Die Aktivierung von *Bax-like* Proteinen durch *BH3-only* Proteine wird durch antagonistische Interaktion mit den anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteinen, wie z.B. Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 verhindert. Dabei können sich nur bestimmte Heterodimere bilden (Chen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Letai *et al.*, 2002). Da eine gesteigerte Expression von Noxa, PUMA und allen drei Bim-Isoformen an der mitochondrialen Membran

beobachtet werden konnte, sollte nun gleichermassen eine Analyse der wichtigsten Mitglieder der anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteine Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 erfolgen. Bcl-XL konnte sowohl im Zytoplasma als auch an den Mitochondrien nachgewiesen werden. Bortezomib verursachte innerhalb von 1 h eine Anreicherung von mitochondrialem Bcl-XL. Anschließend konnte keine Veränderung der Signalintensität mehr festgestellt werden. Im Gegensatz dazu reicherte sich zytoplasmatisches Bcl-XL kontinuierlich an.

Mcl-1 und Bcl-2 konnten nur in der mitochondrialen Fraktion lokalisiert werden. Während eine stetige Akkumulation von mitochondrialem Mcl-1 beobachtet wurde, war die Abundanz von Bcl-2 nach Bortezomib-Inkubation unverändert.

Dem Tumorsuppressor Protein p53 wird in aktuellen Publikationen durch Antagonisierung der anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteine eine apoptogene Funktion direkt an der mitochondrialen Membran zugeschrieben (Marchenko *et al.*, 2000). In nicht fraktionierten Lysaten von aktivierten, mit Bortezomib inkubierten CD4⁺ T-Zellen konnte bereits eine deutliche Akkumulation von p53 und ubiquitiniertem p53 festgestellt werden (Kapitel 2.6). Deshalb war es von Interesse, ob nun auch mitochondriales p53 detektiert werden konnte. Tatsächlich verursachte Bortezomib eine sukzessive p53-Akkumulation in mitochondrialen und zytoplasmatischen Fraktionen. Während sich jedoch in der mitochondrialen Fraktion neben p53 selbst nach langer Filmexposition keine zusätzlichen Signale zeigten, konnten in der zytoplasmatischen Fraktion mit Dauer der Inkubation Signale mit einem höheren Molekulargewicht als p53 beobachtet werden, die analog zu den Western Blots mit Ganzelllysaten (Kapitel 2.6) auf ubiquitiniertes p53 schließen ließen.

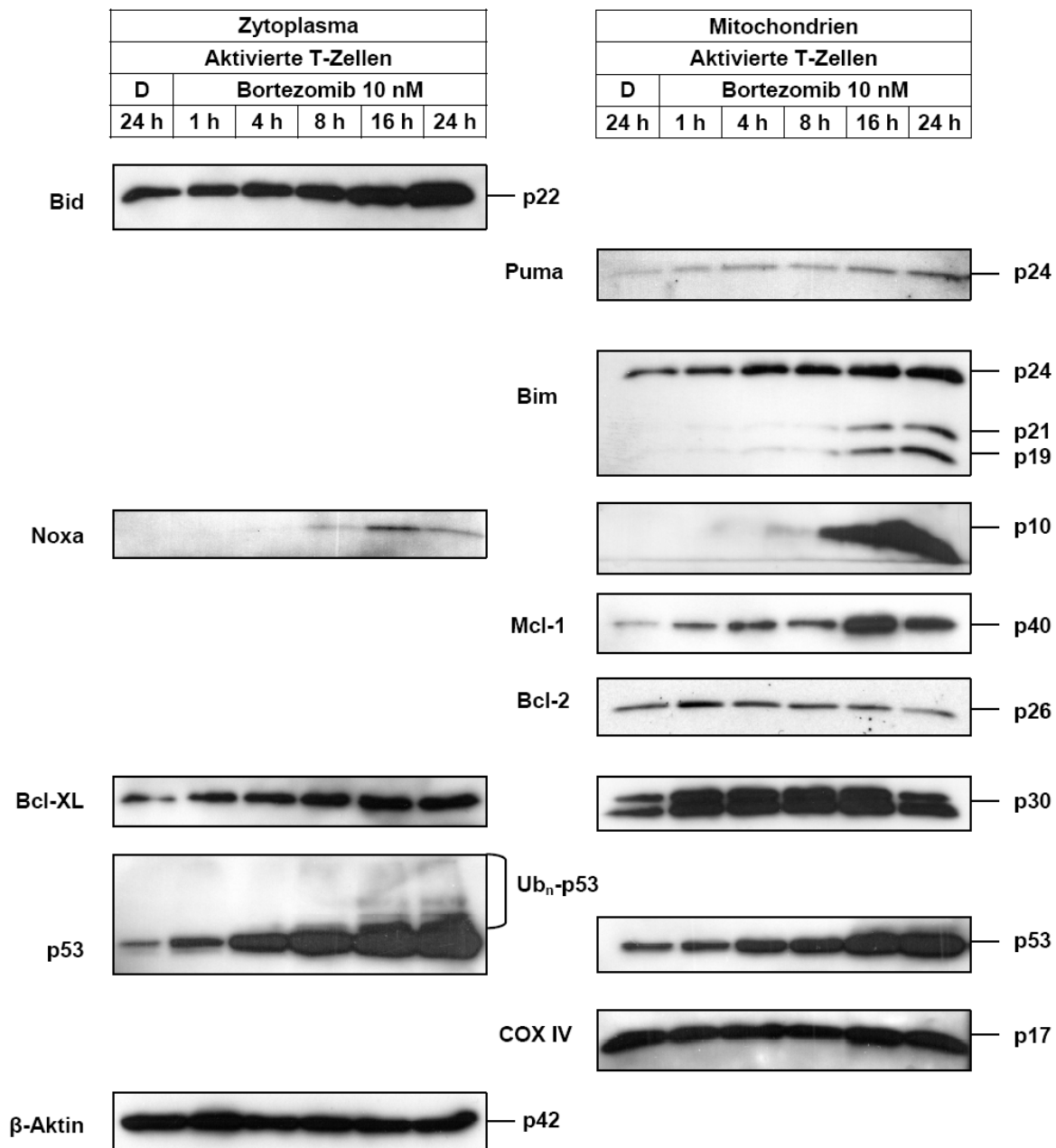


Abb. 53: Analyse von pro- und anti-apoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie in zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktionen mit Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden durch 4-tägige Kokultur mit allogenen mDCs aktiviert und für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Bortezomib (Bor) oder DMSO (D) inkubiert. Anschließend wurden mitochondriale und zytoplasmatische Fraktionen generiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Abundanz von Bid, PUMA, Bim, Noxa, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL und p53 in den einzelnen Fraktionen im Western Blot ermittelt. Dazu wurden anti-Bid (FL-195), anti-PUMA α/β (FL-193), anti-Bim (H-191), anti-Noxa (114C307), anti-Mcl-1 (22), anti-Bcl-2 (N-19), anti-Bcl-x_{S/L} (S-18) und anti-p53 (DO-1) verwendet. Als Ladekontrolle wurden anti-β-Aktin (AC-15) für die zytoplasmatische und anti-COX IV für die mitochondriale Fraktion verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Somit belegte die Analyse von mitochondrialen und zytoplasmatischen Fraktionen von mit Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen eine Akkumulation von pro-

apoptotischen *BH3-only*-Proteinen (PUMA, Noxa, Bim) und p53 an der äußeren mitochondrialen Membran. Da keine ausreichende Neutralisation der pro-apoptotischen Proteine durch die anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteine Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 stattfindet, resultiert daraus die Aktivierung der *Bax-like*-Proteine. Bax und Bak oligomerisieren und integrieren in die äußere mitochondriale Membran, wodurch MOMP verursacht und pro-apoptotische intramitochondriale Proteine, wie Smac/DIABLO, HtrA2, Cytochrom *c* und AIF ins Zytoplasma translozieren.

Diskussion

Das UPS mit dem darin integrierten 26S Proteasom reguliert durch Proteolyse fast aller zellulären Proteine solch unterschiedliche und essentielle Prozesse wie Zellentwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation, Zellzyklus, Apoptose, Gentranskription, Signaltransduktion, Seneszenz, Entzündungs- und Stress-Antwort (Hershko und Ciechanover, 1998; Naujokat und Hoffmann, 2002; DeRenzo und Seydoux, 2004; Bowerman und Kurz, 2006; Naujokat und Saric, 2007). Die Verwendung von selektiven synthetischen und biologischen Inhibitoren der proteolytischen Aktivitäten des 26S Proteasoms, der zentralen proteolytischen Komponente des UPS, haben dazu beigetragen, die essentiellen Funktionen zu erkennen und für medizinische Zwecke zu nutzen (Groll und Huber, 2004; Gaczynska und Osmulski, 2005). Insbesondere die Entdeckung, dass die Inhibition des Proteasoms hauptsächlich in neoplastischen und schnell proliferierenden Zellen Apoptose induziert, hat den Weg für Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib in die Krebstherapie geebnet (Shinohara *et al.*, 1996; Drexler HCA, 1997; Lopes *et al.*, 1997; Drexler *et al.*, 2000; Naujokat *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2000; Adams und Kauffman 2004; Voorhees und Orlowski, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der potenten biologischen und synthetischen Proteasom-Inhibitoren EPM, LC und Bortezomib auf essentielle funktionelle und phänotypische Eigenschaften von humanen DCs und von aktivierten CD4⁺ T-Zellen untersucht. Des Weiteren wurde der Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen charakterisiert.

1 Beurteilung der Methoden

DCs können generell aus Vorläuferzellen des Blutes, des Knochenmarks oder des Nabelschnurblutes generiert oder direkt aus Blut und peripherem Gewebe isoliert werden. Da DCs im peripheren Blut jedoch nur etwa 1% der PBMCs ausmachen, ist die direkte Isolation problematisch und führt nur zu einer geringen Zellausbeute. Deshalb wird die *in vitro* Generierung von DCs aus Vorläuferzellen für die meisten klinischen und experimentellen Fragestellungen bevorzugt (Maraskovsky *et al.*, 1996; Shurin *et al.*, 1997; Pulendran *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit verwendeten DCs wurden in Anlehnung eines von Faries *et al.* entwickelten Protokolls aus CD14⁺ Monozyten generiert (Faries *et al.*, 2001). Abweichend vom klassischen, 5-tägigen Protokoll benötigen die Monozyten durch

Kultivierung im serumfreien Medium nur zwei Tage, bis sie das unreife DC-Stadium erreicht haben (Romani *et al.*, 1994). Die folgende Differenzierung zu phänotypisch und funktionell reifen DCs wird durch die eintägige Inkubation der iDCs in einem Cocktail von Maturationsinduktoren wie TNF- α , IFN- γ und CD40L oder LPS und IFN- γ gewährleistet (Sallusto *et al.*, 1994; Caux *et al.*, 1994; Zhou und Tedder, 1996; Cella *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1997). Die serumfreie Variante wird durch *in vivo* Beobachtungen von Randolph *et al.* (1998) gestützt, welcher eine spontane Differenzierung von DCs aus, ins periphere Gewebe einwandernden Monozyten beschrieb. Dabei geht der Differenzierungsstimulus durch den vom Blutserum abweichenden Protein- und Elektrolyt-Gehalt der interstitiellen Flüssigkeit aus. Daraus lässt sich schließen, dass wohl bestimmte, bisher noch unbekannte Komponenten des Serums die Differenzierung von DC-Vorläuferzellen inhibieren (Faries *et al.*, 2001; Koski *et al.*, 2001; Randolph *et al.*, 2005). Eine aktuelle Studie stützt die Beobachtungen von Randolph *et al.*, dass Monozyten unter physiologischen Bedingungen in DCs differenzieren (Léon *et al.*, 2004).

Die immunphänotypischen und funktionellen Untersuchungen demonstrieren, dass die in dieser Arbeit verwendeten DCs vergleichbare Eigenschaften mit jenen anderer Publikationen hatten. Beide Differenzierungsstadien zeigten den charakteristischen Immunphänotyp:

iDC: CD83⁻, CD14^{low}, CD11c⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺, MHC-II⁺

mDC: CD83⁺, CD14⁻, CD40⁺⁺, CD11c⁺, CD80⁺⁺, CD86⁺⁺, MHC-II⁺⁺.

Darüber hinaus konnte bei iDCs eine hohe endozytotische Kapazität nachgewiesen werden, die im Zuge der Ausreifung zu mDCs stark vermindert wurde (Daten nicht gezeigt). Dagegen produzierten die mDCs das zur Induktion von Th1-Immunantworten notwendige biologisch-aktive IL-12p70 und waren in der Lage, allogene und autologe CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Die durch die Ausreifungsstimuli LPS und IFN- γ aktivierten mDCs wiesen bei späteren Untersuchungen eine noch höhere stimulatorische Kapazität auf. Daher wurden sie auch zur physiologischen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen bei der Untersuchung des Einflusses von Proteasom-Inhibitoren auf CD4⁺ T-Zellen verwendet. Aufgrund der im Vergleich zur klassischen Methode kürzeren Kultivierungsdauer, bei vergleichbar resultierenden DC-Eigenschaften, bot das modifizierte DC-Generierungsprotokoll einen praktischen Vorteil und war zur Untersuchung von humanen DCs geeignet.

Durch Messung der proteolytischen Proteasom-Aktivität mit fluorogenen Peptidsubstraten erhält man drei unterschiedliche Spaltungsneigungen, die chymotryptische-, tryptische- und caspase-ähnliche Aktivität genannt werden. Diese können den katalytisch-aktiven Untereinheiten β_5 , β_2 und β_1 zugeordnet werden (Orlowski *et al.*, 1993; Kisselev *et al.*, 1999; Groll *et al.*, 1999). Nach Stimulation mit IFN- γ wird die Produktion von Immunoproteasomen induziert, in welchen die konstitutiven proteolytisch-aktiven Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 durch die Immunoproteasom-Untereinheiten β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} ersetzt werden, die nun vorzugsweise eine andere Substratspezifität aufweisen (Fruh *et al.*, 1994).

Zur Bestimmung des inhibitorischen Profils der einzelnen Proteasom-Inhibitoren wurde die Methode der Affinitätsmarkierung mit einer Aktivitäts-basierten Sonde nach Kessler *et al.* (2001) verwendet. Diese hat gegenüber der gewöhnlich verwendeten Methode mit fluorogenen Peptidsubstraten den Vorteil, eine Differenzierung zwischen proteolytischer Aktivität der konstitutiven und der Immunoproteasom-Untereinheiten zu ermöglichen. Dagegen kann bei der Bestimmung mit fluorogenen Peptidsubstraten nur ungenau zwischen chymotryptischer, tryptischer und caspase-ähnlicher Peptidase-Aktivität unterschieden werden. Damit konnte zum ersten Mal die Aktivität der katalytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten in humanen mDCs und humanen aktivierten CD4⁺ T-Zellen demonstriert und die inhibitorische Wirkung von Bortezomib, LC und EPM auf diese gezeigt werden (Berges *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die inhibitorische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren auf die katalytisch-aktiven konstitutiven als auch Immunoproteasom-Untereinheiten aufgezeigt werden, denn mDCs exprimieren die Immunoproteasom-Untereinheiten konstitutiv (Kloetzel PM, 2004; Macagno *et al.*, 1999). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} in aktivierten CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen. Insgesamt konnte eine Bestätigung der Ergebnisse von Studien erhalten werden, die bereits die Methode der Affinitätsmarkierung in primären Monozyten, akuten und chronischen Leukämiezellen und diversen transformierten Zelllinien angewendet hatten. Demnach inhibierte Bortezomib in klinisch relevanten Dosen (Papandreou *et al.*, 2004) die konstitutiven Untereinheiten β_5 und β_1 sowie deren homologe Immunoproteasom-Untereinheiten β_{5i} und β_{1i} , wogegen EPM und LC eine annähernd gleichmäßige Hemmung auf alle katalytisch-aktiven Untereinheiten ausübten (DCs: Abb. 14, CD4⁺ T-Zellen: Abb. 29) (Berkers *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007). Damit inhibierten alle verwendeten Proteasom-Inhibitoren auch die chymotryptische Aktivität. Diese gilt als

physiologisch wichtigste der drei existierenden katalytischen Proteasom-Aktivitäten (Kisselev *et al.*, 2006). Im Fall von Bortezomib konnte in dieser Arbeit eine zusätzliche inhibitorische Wirkung auf die β 1- und β 1i- Untereinheit und damit auf die caspase-ähnliche Aktivität demonstriert werden. Damit konnten Studien widerlegt werden, die das Wirkungsspektrum von Bortezomib mittels Bestimmung des Umsatzes fluorogener Peptidsubstrate einzig auf die chymotryptische Peptidase-Aktivität restringiert hatten (Adams J *et al.*, 1998; Adams J *et al.*, 1999).

2 Dendritische Zellen

2.1 Effekte auf die Expression von DC-Oberflächenmolekülen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bortezomib, LC und EPM trotz des unterschiedlichen Wirkungsspektrums auf die proteolytisch-aktiven Proteasom-Untereinheiten einen vergleichbaren supprimierenden Effekt auf die Expression der für die Funktion der einzelnen DC-Differenzierungs-Stadien essentiellen Oberflächenproteine haben (Abb. 16-Abb. 19).

Im Einzelnen bewirkte die Inhibition des Proteasoms während der Differenzierung von Monozyten zu iDCs, während der Differenzierung von iDCs zu mDCs und bei ausgereiften mDCs eine verringerte Expression des MHC-II-Moleküls HLA-DR, der kostimulierenden Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 und des C-Typ-Lektins CD206 (MMR). Darüber hinaus konnte eine verminderte Expression des kostimulierenden Moleküls CD80 und des C-Typ-Lektins CD209 (DC-SIGN) durch Inkubation mit Bortezomib, LC und EPM während der Differenzierung von iDCs zu mDCs und in ausgereiften DCs beobachtet werden. Während der Differenzierung von iDCs zu mDCs konnte zusätzlich eine abgeschwächte Expression des für mDCs charakteristischen Oberflächenmoleküls CD83 beobachtet werden (Zhou und Tedder, 1996; Lechman *et al.*, 2002). Durch weiterführende Untersuchung der intrazellulären Expression von HLA-DR und CD206 in allen DC-Differenzierungsstadien wurde der suppressive Effekt der Proteasom-Inhibition auf die Expression der Oberflächenmoleküle verdeutlicht (Abb. 20). Da die Inkubation mit Bortezomib den gleichen Effekt auf die DC-Phänotypen hatte wie die Inhibition mit LC und EPM, konnte dadurch abermals die prominente Stellung der chymotryptischen, zumindest gegenüber der tryptischen Aktivität betont werden. Diese These wird durch eine Studie bestätigt, die durch Verwendung des unspezifischen Peptid-Aldehyd-Proteasom-Inhibitors PSI ähnliche Effekte auf die Expression von CD86 und HLA-DR demonstrierte (Yoshimura *et al.*, 2001).

2.2 Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die nukleäre Translokation von RelA und RelB

Die post-translationale zytosolische Induktion und nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren RelA (p65) und RelB, Mitglieder der NF- κ B-Familie, ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von DCs und für die Differenzierung zu mDCs mit hoher T-Zell-stimulatorischer Kapazität (Neumann *et al.*, 2000; Ardeschna *et al.*, 2000; Ouaz *et al.*, 2002; Li und Verma, 2002; Platzer *et al.*, 2004). Während RelA das Überleben der DCs steuert, ist RelB essentiell für die Differenzierung zu funktionellen, T-Zell-aktivierenden mDCs. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein siRNA vermittelter RelB-knockout potentiell tolerogene DCs generiert (Li *et al.*, 2007). Davor konnten Studien mit knockout Mäusen belegen, dass die Differenzierung von DCs mit der Expression von RelB assoziiert ist (Burkly *et al.*, 1995).

RelA kann mit NF- κ B1(p50) Heterodimere bilden, die durch die inhibitorisch wirkenden I κ B-Proteine (I κ B- α , I κ B- β und I κ B- γ) im Zytoplasma gehalten werden. Dagegen ist RelB mit der NF- κ B2(p52)-Vorstufe p100 im Zytoplasma komplexiert. RelA und RelB werden durch unterschiedliche Signalwege aktiviert, die das Proteasom zur Ubiquitin-vermittelten Degradation der I κ Bs bzw. Prozessierung von p100 zu p52 benötigen. Durch den proteasomalen Abbau wird die nukleäre Translokation von RelA/p50 und RelB/p52 ermöglicht (Solan *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms zwar nicht die zytoplasmatische Induktion von RelA und RelB, aber die durch LPS und IFN- γ ausgelöste nukleäre Translokation verhindert (Abb. 21). Der zugrunde liegende Mechanismus ist ein bereits bekannter Effekt, der durch eine verminderte Degradation von I κ B-Proteinen bzw. Prozessierung von p100 durch Inhibition des Proteasoms verursacht wird. Zusätzliche oder indirekte Effekte, die durch die Bortezomib-vermittelte Inhibition des Proteasoms ausgelöst werden, welche zur Supprimierung der nukleären Translokation von RelA und RelB führen, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da RelB mit mDCs assoziiert ist und RelA und RelB auch als Transkriptions-Aktivatoren von CD40, CD80, CD86, MHC-II-Moleküle und CD83 gelten, konnte somit eine Ursache für die reduzierte Expression dieser Oberflächenproteine und die damit einhergehende beeinträchtigte Differenzierung zu mDCs gefunden werden (Clark *et al.*, 1999; Ardeschna *et al.*, 2000). Des Weiteren konnten Ergebnisse einer Studie, die ähnliche Effekte von Bortezomib auf die phänotypischen Eigenschaften von DCs und die Aktivierung von RelB während der Differenzierung zu mDCs beschreibt, komplettiert werden (Nencioni *et al.*, 2006a).

2.3 Induktion von Apoptose in DCs

Ein Effekt der Inhibition des Proteasoms bei proliferierenden und neoplastischen, nicht jedoch bei ruhenden und ausdifferenzierten Zellen, ist die Induktion von Apoptose (Chen *C et al.*, 2000; Naujokat und Hoffmann, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Bortezomib, LC und EPM bei nicht-proliferierenden iDCs und mDCs sowie ausdifferenzierten mDCs, aber nicht bei differenzierten Monozyten, Apoptose induzieren (Abb. 22). Ein Teil der Apoptose wird vermutlich durch die Proteasom-Inhibition-vermittelte Hemmung der NF- κ B-Aktivierung ausgelöst, da das Überleben von differenzierenden DCs von einer NF- κ B-vermittelten Expression anti-apoptotischer Proteine abhängig ist (Ouaaz *et al.*, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse ergänzen eine kürzlich veröffentlichte Studie, die bei iDCs nach Inkubation mit Bortezomib eine Induktion von Apoptose zeigte (Nencioni *et al.*, 2006b).

2.4 Suppression funktioneller Eigenschaften von DCs

Rezeptor-vermittelte Endozytose und Makropinozytose repräsentieren basale Eigenschaften von iDCs, mit deren Hilfe sie das periphere Gewebe ständig auf die Präsenz von fremden Antigenen überwachen. Nur dadurch wird die MHC-vermittelte Antigenpräsentation und Initiierung T-Zell-spezifischer Immunantworten gewährleistet (Sallusto *et al.*, 1995; de Baey und Lanzavecchia, 2000). In dieser Arbeit konnte anhand der verminderten Aufnahme von FITC-Dextran und LY gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms diese bedeutenden funktionellen Eigenschaften inhibiert. Dieses wurde durch die verminderte Aufnahme von FITC-Dextran und LY veranschaulicht (Abb. 32). Eine mögliche Ursache liegt in der supprimierten Expression der für die Rezeptor-vermittelte Endozytose und Makropinozytose notwendigen Rezeptoren. Dieser Proteasom-Inhibition-induzierte Effekt konnte im Fall der Endozytose-Rezeptoren MMR und DC-SIGN gezeigt werden. Dadurch konnten Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Studie komplettiert werden, die einen ähnlichen Effekt von Bortezomib auf die Aufnahme von FITC-Dextran durch iDCs beschrieb (Nencioni *et al.*, 2006a). Eine Suppression von Makropinozytose in DCs konnte jedoch bislang nur bei Verwendung immunsuppressiver Substanzen wie mTOR-, Calcineurin-, Proteinkinase C- und HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren wie Antithymozytenglobulin demonstriert werden (Hackstein *et al.*, 2002; Woltman *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2005; Ghittoni *et al.*, 2006; Naujokat *et al.*, 2007). Dieses lässt vermuten, dass die Suppression von Makropinozytose in DCs ein Effekt ist, der generell von immunsuppressiven Substanzen induziert wird.

Die von mDCs produzierten Zytokine verweisen auf die immunstimulatorische Kapazität und stellen, neben dem präsentierten Antigen und den kostimulierenden Oberflächenmolekülen, das dritte Signal bei der Interaktion mit T-Zellen dar. Dieses entscheidet über die Art der Immunantwort. Dabei löst die Sekretion von bioaktiven IL-12p70 Heterodimeren bei CD4⁺ T-Zellen eine Differenzierung in Th1-Zellen aus (Banchereau und Steinman; 1998; Rissoan *et al.*, 1999; Reis e Sousa C, 2006). In dieser Arbeit konnte eine Bortezomib-vermittelte Suppression der Produktion von IL-12p70 Heterodimeren und antagonistisch wirkenden IL-12p40 Homodimeren nachgewiesen werden. Dadurch verminderte sich das IL-12p70/p40 Verhältnis, welches das funktionelle Potenzial der IL-12-Synthese widerspiegelt (Abb. 24) (Luft *et al.*, 2002). Eine mögliche Ursache hierfür liegt in dem durch Proteasom-Inhibition inaktivierten NF-κB-Signalweg, der für die Regulation der IL-12-Produktion in DCs verantwortlich ist (Trinchieri G, 2003; Gautier *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse ergänzen eine Studie, die einen vergleichbaren Effekt auf die IL-12-Sekretion bei mit Bortezomib inkubierten DCs zeigt, ohne jedoch zwischen der Produktion von IL-12p70 und IL-12p40 zu unterscheiden (Nencioni *et al.*, 2006a).

Durch Analyse der immunstimulatorischen Eigenschaften konnten die zuvor durch die Proteasom-Inhibition verursachten inhibitorischen Effekte in humanen DCs beurteilt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit Bortezomib behandelte mDCs eine deutlich verringerte Kapazität zur Initiation einer klonalen Expansion von allogenen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und autologen CD4⁺ T-Zellen haben (Abb. 25, Abb. 26). Dieser Defekt wird wahrscheinlich hauptsächlich durch die verminderte Expression der kostimulierenden Moleküle CD80, CD86, CD40 und des für die Antigen-Präsentation benötigten MHC-II-Moleküls HLA-DR induziert. Ferner trägt auch die bei Inhibition des Proteasoms reduzierte Produktion des bioaktiven IL-12p70 und das daraus resultierende, verminderte IL-12p70/p40-Verhältnis zur eingeschränkten Aktivierung der T-Zellen bei. Damit konnten Ergebnisse von zwei unabhängigen Studien vervollständigt werden, die ähnliche Effekte für PSI- und Bortezomib-behandelte humane DCs beschrieben. In diesen Studien wurden jedoch weder allogene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen noch autologe CD4⁺ T-Zellen zur Stimulation verwendet (Nencioni *et al.*, 2006a; Yoshimura *et al.*, 2001).

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit eine bedeutende Rolle des Proteasoms bei der Regulation von essentiellen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften humaner DCs. Diese multiplen Effekte werden vermutlich durch die Hemmung der nukleären Translokation von RelA und RelB nach Proteasom-Inhibition induziert. Durch die

Verwendung von Bortezomib, eines Proteasom-Inhibitors, der vor allem die proteolytisch-aktiven Untereinheiten $\beta 5$ und $\beta 1$ sowie deren immunoproteasomalen Homologe hemmt, konnte die dominante Rolle der chymotryptischen Aktivität, im Vergleich zur tryptischen Aktivität des Proteasoms, hervorgehoben werden.

3 CD4⁺ T-Zellen

Der positive Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf dysregulierte T-Zell-vermittelte Immunantworten, die zur Pathogenese von Polyarthrit, Psoriasis, Abstoßung allogener Transplantate und GVHD beitragen, konnte in diversen Studien mit Nagern demonstriert werden (Palombella *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2001; Zollner *et al.*, 2002; Sun K *et al.*, 2004). Bisher konnte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus jedoch nicht aufgedeckt werden. Um eine Erklärung für diese Phänomene zu finden, wurden die Proteasom-Inhibition-vermittelten Effekte und Mechanismen in humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht. Diese gelten, neben den DCs, als wichtigste Schlüsselzellen zur Initiierung, Steuerung, Kontrolle, Modulation und Aufrechterhaltung einer spezifischen, Antigen-abhängigen Immunantwort (Frasca *et al.*, 1998; Mills und Cambier, 2003; Castellino und Germain, 2006).

In dieser Arbeit wurden humane CD4⁺ T-Zellen verwendet, die durch Kokultur mit allogenen humanen mDCs *in vitro* aktiviert wurden. Dieses *in vitro* Modell ist mit physiologischen Verhältnissen vergleichbar, die bei Initiierung einer Immunantwort in sekundären lymphatischen Organen vorliegen. Die auf diese Weise aktivierten T-Zellen zeigten nach 5-tägiger Kokultur mit mDCs eine hohe Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR. Zusätzlich war die Proliferationsrate weitaus höher als bei durch Mitogen- oder Anti-CD3-Stimulation aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten auch prozessierte Caspasen und Caspaseaktivität nachgewiesen werden, was ein Zeichen für aktivierte, proliferierende T-Zellen ist, wie auch *in vivo* Beobachtungen belegen (Abb. 45). Bei unstimulierten T-Zell-Linien, wie Jurkat oder MOLT-4, die oftmals als T-Zell-Modellsystem dienen, ist dieser Indikator für eine intakte T-Zell-Aktivierung jedoch nicht nachzuweisen (Wilhelm *et al.*, 1998; Miossec *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 1999). Aufgrund dessen stellen die in dieser Arbeit verwendeten Zellen ein ideales Modellsystem zur Analyse der durch Proteasom-Inhibition induzierten Effekte in aktivierten T-Zellen dar.

3.1 Effekte auf Proliferation und Induktion von Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms eine deutliche Verminderung der Proliferation von aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen induziert (Abb. 31).

Da das Ausmaß der Proteasom-Inhibition auf die Proliferation sehr hoch war, sollten weitere Untersuchungen die Ursachen dieses Effekts aufklären. Die Analyse von Apoptose demonstrierte, dass ein Teil der nachgewiesenen verminderten Proliferation durch Apoptose-Induktion verursacht wurde. Dementsprechend konnte die Inhibition der Apoptose-exekutierenden Caspasen durch den Pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk die ursprüngliche Proliferation bei mit Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen zum Teil regenerieren (Abb. 48). Ferner konnte gezeigt werden, dass aktivierte im Vergleich zu ruhenden CD4⁺ T-Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Proteasom-Inhibition haben. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Ergebnissen aus Studien in aktivierten T-Zellen. Diese beschränkten sich jedoch auf die Analyse von CD3⁺ T-Zellen oder PBMCs, die entweder in einem artifiziellen System der MLR, durch anti-CD3 und anti-CD28 oder durch PHA aktiviert worden waren (Wang X *et al.*, 1998; Naujokat *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2006). Dagegen weicht die geringe Apoptose-Induktion in ruhenden CD4⁺ T-Zellen in dieser Arbeit von den Ergebnissen von Blanco *et al.* (2006) ab. Hierbei sind die Ursachen in der Verwendung von unterschiedlichen Zelltypen und Analysemethoden zu vermuten. Dagegen konnte auch Wang X *et al.* (1998) eine leichte Apoptosesuszeptibilität durch LC-vermittelte Proteasom-Inhibition in ruhenden T-Zellen beobachten. Für die in dieser Arbeit beobachtete annähernd gleich hohe Apoptose-Induktion bei mit EPM inkubierten ruhenden und aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnte allerdings keine Erklärung gefunden werden. Diese liegt eventuell in dem durch Bildung eines Morpholinorings einzigartigen Inhibitionsmechanismus des Proteasom-Inhibitors (Kisselev *et al.*, 2006).

3.2 Effekt auf den Zellzyklus

Die Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibition in proliferierenden Zellen wird zum Teil über die Akkumulation des Proteasom-Substrats p53 vermittelt (Maki *et al.*, 1996). Je nach Zelltyp und Zellstatus resultiert die Inhibition des Proteasoms in Säugetierzellen neben p53-vermittelter Apoptose auch in einem p53-abhängigen G₁-Zellzyklus-Arrest (Sherwood *et al.*, 1993; Dietrich *et al.*, 1996; Machiels *et al.*, 1997; Drexler HCA, 1997; Lopes *et al.*, 1997; Orłowski RZ, 1999; Chen F *et al.*, 2000; Drexler *et al.*, 2000). Dieser Effekt konnte auch bei Bortezomib- und LC-Proteasom-Inhibition überlebenden,

aktivierten CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Dagegen war bei den mit EPM-behandelten aktivierten CD4⁺ T-Zellen kein Arrest in einer Zellzyklus-Phase zu demonstrieren (Abb. 34, Abb. 35). Diese unerwarteten Ergebnisse lassen sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Induktion, vorzugsweise von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus, erklären. Vermutlich arretieren EPM-inkubierte aktivierte CD4⁺ T-Zellen kurzzeitig auch in der G₁-Phase des Zellzyklus. Jedoch löst EPM als einziger der verwendeten Proteasom-Inhibitoren in dieser Zellzyklusphase wahrscheinlich verstärkt Apoptose aus. Ein derartiges Phänomen konnte bereits in HL60 Leukämiezellen beobachtet werden (Drexler HCA, 1997).

Eine nähere Untersuchung des Apoptose- und Zellzyklus-Arrest-Mechanismus bei mit Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen demonstrierte eine starke Akkumulation von p53, einhergehend mit der Akkumulation der CKIs p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} (Abb. 36). Diese beiden negativen Zellzyklus-Regulatoren werden durch die transkriptionelle Aktivität von p53 induziert (El-Deiry *et al.*, 1994; Waldmann *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird die Akkumulation von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} auch durch die Inhibition des Proteasoms verursacht. Die beiden CKIs werden im fortschreitenden Zellzyklus in der G₁- und der frühen S-Phase des Zellzyklus durch das Proteasom degradiert (Luo *et al.*, 1995; Pagano *et al.*, 1995; Sutterlüty *et al.*, 1999; Yew PR, 2001; Naujokat und Hoffmann, 2002; Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Eine Akkumulation von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} führt demzufolge zur Inhibition der Proliferation und zum Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase (Kudo *et al.*, 2000; Chen und Lin, 2004).

Die Untersuchung von weiteren Zellzyklus-Regulatoren in den mit Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen zeigte eine deutliche Abnahme der Expression von Cyclin A und Cyclin D2 (Abb. 36). Beide werden für den Eintritt von der G₁- in die S-Phase und die Progression durch die S-Phase des Zellzyklus benötigt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verminderung der Expression der beiden Cycline in aktivierten T-Zellen mit Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus assoziiert ist (Kirkham *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2005). Da die Regulation dieser Cycline der proteasomalen Degradation unterliegt, wäre eine Akkumulation der beiden Cycline durch Bortezomib zu erwarten gewesen (Yew PR, 2001; Naujokat und Hoffmann, 2002). Jedoch konnte in verschiedenen Studien eine Arretierung von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus (Stack und Newport, 1997; Finkielstein *et al.*, 2002) oder eine Verstärkung des apoptotischen Stimulus (Mazumder *et al.*, 2002) durch Caspase-3-vermittelte Cyclin A-, D- und E-Spaltung beobachtet werden. Da auch in dieser Arbeit in den mit Bortezomib-inkubierten

CD4⁺ T-Zellen eine Verstärkung von proteolytisch-aktiver Caspase-3 nachgewiesen werden konnte, läßt sich das ungewöhnliche Ergebnis durch eine Caspase-3-vermittelte Spaltung/Degradation von Cyclin A und D2 erklären. Des Weiteren könnte die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte, durch Proteasom-Inhibition verursachte Hemmung der nukleären NFATc2-Translokation zur verminderten Expression der Cycline in aktivierten CD4⁺ T-Zellen beitragen (Caetano *et al.*, 2002).

Bei der Untersuchung des Effekts von Bortezomib auf Zellzyklus-Regulatoren konnte auch eine Abnahme der PCNA-Expression festgestellt werden (Abb. 36). PCNA ist ein Prozessivitäts-Faktor der DNA-Polymerase- δ und $-\epsilon$, der für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus essentiell ist (Kurki *et al.*, 1987; Jaskulski *et al.*, 1988). Die Konkurrenz zwischen p21^{WAF1/CIP1} und diversen DNA-Replikationsfaktoren, wie beispielsweise Cyclin A und D um die Interaktion mit PCNA, reguliert auf zellulärer Ebene die Progression des Zellzyklus in der S-Phase (Xiong *et al.*, 1992; 1993; Loo *et al.*, 1997). Da eine starke Induktion und Stabilisierung von p53 eine verminderte Expression von PCNA auf mRNA- und Proteinebene verursacht (Yamaguchi *et al.*, 1994; Shivakumar *et al.*, 1995), ist die beobachtete Abnahme von PCNA bei Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen eine direkte Konsequenz der zuvor gezeigten, durch Proteasom-Inhibition verursachten Stabilisierung und Akkumulation von p53. Außerdem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine p53-vermittelte p21^{WAF1/CIP1}-Anreicherung zur verminderten Expression von PCNA und zum Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus führt (Waga *et al.*, 1994; Gehen *et al.*, 2007). Somit wird der G₁-Zellzyklus-Arrest in aktivierten, mit Bortezomib-inkubierten CD4⁺ T-Zellen durch eine komplexe Wechselwirkung von p53, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{Kip1}, Cyclin A, Cyclin D2 und PCNA verursacht.

3.3 Effekte auf die Expression von Oberflächenrezeptoren und Zytokin-Produktion

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Expression von mit Aktivierung-assoziierten T-Zell Oberflächenmolekülen, wie CD25 (IL-2R α), den TNF-R-Mitgliedern CD28, CD134 (OX40), CD120b (TNFR-II) und CD95 (Fas/APO1) bei Proteasom-Inhibition überlebenden CD4⁺ T-Zellen deutlich supprimiert ist (Abb. 37). Die anschließende Untersuchung von Bortezomib überlebenden aktivierten CD4⁺ T-Zellen anhand unterschiedlicher Restimulationsansätze deckte weitere Defekte in den für die *Inducer*-Funktion der T-Zellen essentiellen Eigenschaften auf. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bortezomib-Inkubation überlebende und restimulierte CD4⁺ T-Zellen

eine verminderte Proliferation und Expression von mit T-Zell-Aktivierung assoziierten Zelloberflächenmolekülen, wie CD25 (IL-2R α), den TNF-R-Mitgliedern CD28, CD134 (OX40), CD120b (TNFR-II) und CD95 (Fas/APO1) aufwiesen (Abb. 38, Abb. 40). Ferner demonstrierten die Proteasom-inhibierten restimulierten CD4⁺ T-Zellen eine supprimierte Produktion der für die Zellfunktion essentiellen Zytokine IL-2, IL-2sR α , IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α (Abb. 39) (Mosmann *et al.*, 1989). Die verschiedenen Restimulations-Ansätze konnten unter anderem auch demonstrieren, dass nicht nur aktivierte, die Proteasom-Inhibition überlebende CD4⁺ T-Zellen (Ansatz 1 und 3), sondern auch nach primärer Stimulation ruhende T-Zellen (Ansatz 2 und 3) in ihren funktionellen Eigenschaften supprimiert waren. Diese Ergebnisse überraschten, denn bislang galt das Paradigma, dass nur aktivierte, proliferierende Zellen eine Suszeptibilität gegenüber Inhibition des Proteasoms aufweisen (Drexler HCA, 1997; Naujokat und Hoffmann, 2002; Adams J., 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus muss in zukünftigen Studien noch aufgeklärt werden. Auch widersprechen die Resultate einer anderen Studie, die nur eine unerhebliche Suppression der Aktivierung bei restimulierten und in der initialen Stimulation ruhenden CD3⁺ T-Zellen beobachten konnte. Diese Zellen wurden jedoch anstatt mit allogenen DCs wie in der vorliegenden Arbeit, mit allogenen T-Lymphozyten restimuliert (Blanco *et al.*, 2006).

Die durch verminderte Produktion von IL-2 und Expression von IL-2R eingeschränkte Aktivierung des IL-2/IL-2R-Signalwegs trägt wohl beträchtlich zur verminderten Proliferation bei Proteasom-inhibierten aktivierten und restimulierten CD4⁺ T-Zellen bei, da dieser Signalweg die Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, wie p27^{Kip1}, Cyclin D2, PCNA und E2F, kontrolliert (Shipman-Appasamy *et al.*, 1990; Modiano *et al.*, 1994; Nourse *et al.*, 1994; Appleman *et al.*, 2000). Auch die verminderte Produktion von IFN- γ und IL-4 basiert wahrscheinlich auf einem inhibierten IL-2/IL-2R-Signalweg (Seder *et al.*, 1994; Malek *et al.*, 2001).

3.4 Effekte auf NFAT und I κ B- α

Die Expression von Genen, die für die Aktivierung, Zytokin-Produktion, Proliferation und das Überleben von T-Zellen essentiell sind, wie beispielsweise Cycline, CD25, CD40L, CD95L, CTLA-4, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α , Bcl-2, Bcl-XL, IAPs und c-FLIP, werden hauptsächlich von der transkriptionellen Aktivität der NFAT- und NF- κ B-Proteinfamilie gesteuert (Boise *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1998; Strehlik *et al.*, 1998; Caetano *et al.*, 2002; Karin und Lin, 2002; Serfling *et al.*, 2004). Die bei ruhenden Zellen im Zytoplasma vorliegenden NFAT-

Transkriptionsfaktoren werden durch die Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin induziert die nukleäre Translokation von NFAT durch Dephosphorylierung von NFAT. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation von NFATc2, eines der Hauptmitglieder der NFAT-Familie (Macian *et al.*, 2005), bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Bortezomib-vermittelte Proteasom-Inhibition innerhalb kurzer Zeit inhibiert wird (Abb. 41). Daraus kann geschlossen werden, dass die proteasomale Aktivität zur Initiierung von Signalen notwendig ist, die zur Calcineurin-Aktivierung und anschließender nukleären Translokation von NFAT führen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie weist auf eine derartige Regulation der Calcineurin-Aktivität durch proteasomale Degradation eines spezifischen Calcineurin-Inhibitors hin (Kishi *et al.*, 2007). Der zugrundeliegende Mechanismus für die verringerte nukleäre NFAT-Translokation durch Proteasom-Inhibition muss allerdings in zukünftigen Studien noch aufgeklärt werden.

Weitläufig bekannt und akzeptiert ist eine derartige Proteasom-abhängige Regulation für den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Während die transkriptionelle Aktivität von NFAT hauptsächlich über den TZR gesteuert wird, findet dessen Aktivierung sowohl über den TZR als auch über kostimulierende Moleküle der TNF-R-Familie, wie beispielsweise CD28, OX40, TNF-RI und TNF-RII, statt (Kane *et al.*, 2002). Dabei ist c-Rel für T-Zellen, ähnlich wie RelB für DCs, für intakte Effektorzellfunktionen, wie z.B. IL-2-Produktion und Proliferation essentiell. Dies zeigten auch Studien mit c-Rel-defizienten Mäusen (Kontgen *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2003). NF- κ B-Dimere, wie c-Rel/p50 und RelA/p50, werden durch inhibitorische Proteine der I κ B-Familie im Zytoplasma gehalten. Bei Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs werden diese proteasomal abgebaut, so dass c-Rel/p50 und RelA/p50 in den Nukleus translozieren und an ihre Zielgene binden können. In der vorliegenden Arbeit konnte in Proteasom-inhibierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen anhand der Akkumulation von I κ B- α die Hemmung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs nachgewiesen werden (Abb. 42). Dadurch konnte eine Studie ergänzt werden, die ein vergleichbares Ergebnis, d.h. eine Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch Proteasom-Inhibition in PHA-aktivierten CD3⁺ T-Zellen, zeigte (Blanco *et al.*, 2006).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass kostimulierende Signale essentiell für die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in T-Zellen sind (Hsu *et al.*, 1996; Ashkenazi und Dixit, 1998; Zhou *et al.*, 2002; Croft M, 2003). Somit wird eine zusätzliche Abschwächung des NF- κ B-Signals in Proteasom-inhibierten, aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch verringerte Expression von kostimulierenden Zelloberflächenproteinen, wie CD28,

TNF-RII, OX40 und CD27 und der supprimierten Produktion des TNF-RI- und TNF-RII-Liganden TNF- α verursacht.

3.5 Anti-apoptotische Funktionen proteolytisch-aktiver Caspasen in aktivierten CD4⁺ T Zellen

Caspasen haben neben ihrer Rolle in der Apoptose-Exekution und der Reifung von Zytokinen eine wichtige Funktion in der Proliferation und Differenzierung von bestimmten Zelltypen, insbesondere von T-Zellen (Elkon KB, 1999; Los *et al.*, 2001; Budd RC, 2002; Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002; Boissonnas *et al.*, 2002). Diese Daten wurden durch *in vivo* Studien an Menschen und Mäusen bestätigt, die demonstrieren konnten, dass eine Caspase-8 Defizienz zur Immunodefizienz durch Mangel an funktionellen T-Zellen (Mensch), B-Lymphozyten und NK-Zellen (Maus) führt (Chung *et al.*, 2002; Salmena *et al.*, 2003). In *in vitro*-Versuchen mit humanen homozygoten Caspase-8-defizienten B-Zellen zeigte sich, dass diese nicht nur in ihrer Proliferation, sondern auch in der NF- κ B-Aktivierung eingeschränkt sind (Su *et al.*, 2005). Wie weitere Studien zeigten, sind insbesondere T-Zellen auf eine geringfügig aktive Caspase-8 zur Proliferation und Aktivierung von NF- κ B über Todesrezeptoren wie Fas/APO-1, TRAIL/APO-2 und TNF-RI angewiesen (Varfolomeev *et al.*, 2005; Dohrman *et al.*, 2005; Jun *et al.*, 2005). Derweil sind weitere Studien publiziert worden, die die wichtigen Funktionen von Caspasen in anti-apoptotischen Prozessen, wie Differenzierung, NF- κ B-Aktivierung und Überleben in unterschiedlichen Zelltypen, wie B-Zellen, Keratinozyten, Erythroblasten, Osteoblasten und Spermatozoen bestätigen konnten (Los *et al.*, 2001; Thome und Tschopp, 2001; Budd RC, 2002).

Aus diesem Grund wurden zusätzlich zur Analyse des Bortezomib-vermittelten Apoptose-Mechanismus in aktivierten CD4⁺ T-Zellen die vorhandene Caspase-Aktivität und deren Regulation ermittelt. Diese Ergebnisse erlauben eine Differenzierung zwischen pro- und anti-apoptotischer Caspase-Aktivität.

In den mit allogenen mDCs aktivierten CD4⁺ T-Zellen konnten prozessierte Caspase-3p20, -7p20, -8p43/41 und -9p37/p35 detektiert werden (Abb. 43). Eine Aktivitätsanalyse mittels bVAD-Präzipitation und anschließendem Western Blot demonstrierte, dass bereits in nicht Proteasom-inhibierten, durch mDCs aktivierten CD4⁺ T-Zellen Caspase-3, -8 und -9 proteolytisch-aktiv sind (Abb. 45). Zusätzlich konnte durch Verwendung von ZVAD-fmk gezeigt werden, dass eine Caspase-Aktivität essentiell für die Proliferation und die Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 ist (Abb. 47, Abb. 48). Diese Ergebnisse sind konsistent mit Daten von anderen Studien, welche mittels Caspase-

Inhibitoren demonstrieren, dass eine moderate Caspase-Aktivität zur Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und IL-2-Produktion von humanen und murinen T-Zellen benötigt wird (Miossec *et al.*, 1997; Wilhelm *et al.*, 1998; Alam *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 2004; Misra *et al.*, 2005; Sehra *et al.*, 2005). Ferner wurde in einigen Studien parallel zum Auftreten von Caspase-3p20 eine moderate Caspase-3-Aktivität in aktivierten, vitalen T-Zellen beschrieben (Miossec *et al.*, 1997; Posmantur *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 1999; Misra *et al.*, 2005). In diesen Studien konnte noch nicht geklärt werden, welche Signalwege die Prozessierung von Caspase-3 zu Caspase-3p20 induzieren. Man nimmt jedoch an, dass es nach Aktivierung der T-Zellen über den TZR zur Trimerisierung von Todesrezeptoren, wie beispielsweise CD95 oder TNF-RI kommt, wodurch die intrazelluläre Bildung des DISC induziert wird (Kischkel *et al.*, 1995). Nachfolgend wird Caspase-8, durch Rekrutierung an den DISC, aktiviert. Schließlich prozessiert aktive Caspase-8 die durch TZR-Stimulation verstärkt exprimierte Caspase-3 in die leicht aktive Caspase-3-p20. In der vorliegenden Arbeit wurde Caspase-8 wahrscheinlich über DISC-Bildung am CD95- oder TNF-RI-Rezeptor aktiviert. Anschließend aktivierte sie Caspase-3 durch Spaltung der Pro-Caspase-3 in die leicht aktive Caspase-3p20 (Boissonas *et al.*, 2002; Lakhani und Flavell, 2003; Sabbagh *et al.*, 2004).

Im Zuge der schwachen proteolytischen Caspase-Aktivität kommt es zur selektiven Spaltung von Caspase-Substraten, wie PARP, ICAD und HPK1 durch Caspase-3 (und/oder -7) und c-FLIP durch Caspase-8 (Abb. 44). Konsistent mit anderen Studien wurde jedoch nur ein geringer Anteil des jeweiligen Caspase-Substrats in prozessierter Form vorgefunden (Wilhelm *et al.*, 1998; Posmantur *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 1999; Misra *et al.*, 2005).

Die proteolytische Aktivität von Caspasen wird durch die inhibitorische Wirkung von Proteinen der IAP-Familie und c-FLIP kontrolliert (Irmeler *et al.*, 1997; Deveraux und Reed, 1999; Salvesen und Duckett, 2000). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Präsenz der Caspase-3p20-Untereinheit in aktivierten T-Zellen ein Indiz für die Inhibition von Caspase-3 durch XIAP ist (Sun *et al.*, 2002; Aouad *et al.*, 2004). In den aktivierten CD4⁺ T-Zellen der vorliegenden Arbeit konnte eine Induktion bzw. eine deutliche Steigerung der Expression von cIAP-1, cIAP-2 und c-FLIP_S und eine unmerkliche Verstärkung der XIAP-Expression durch die T-Zell-Aktivierung ermittelt werden (Abb. 44, Abb. 49). Diese wird wohl durch die simultane Aktivierung des NF-κB-Signalwegs über den TZR und die kostimulierenden Moleküle, wie beispielsweise CD28 und TNF-RII, verursacht (Strehlik *et al.*, 1998). Interessanterweise sind einige der IAP-

Mitglieder, darunter auch cIAP-1, cIAP-2 und XIAP, RING-Finger-Motiv enthaltende E3 Ubiquitin-Ligasen. Dadurch sind sie in der Lage, sich selbst und ihre Bindungspartner zu ubiquitinieren, was die proteasomale Degradation zur Folge hat (Huang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2002; Vaux und Silke, 2003). Die proteolytische Aktivität der in aktivierten CD4⁺ T-Zellen detektierten Caspasen wird somit nicht nur durch inhibitorische Bindung von XIAP, sondern wahrscheinlich auch über Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation reguliert. Um trotz proteasomaler Degradation einen adäquaten gleichmäßigen Caspase-3-Spiegel aufrecht zu erhalten, ist die Caspase-3-Expression in T-Zellen nach Aktivierung über den TZR erhöht (Sabbagh *et al.*, 2004).

Die Aktivität von Caspase-8 wird durch c-FLIP moduliert. Multiple Spleiß-Varianten von c-FLIP wurden beschrieben, von denen jedoch bisher nur c-FLIP_S, c-FLIP_L und c-FLIP_R auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (Irmeler *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999; Golks *et al.*, 2005). Nach Bildung des DISC können alle drei über die, auch bei Caspase-8 vorkommenden, DED-Domänen kompetitiv an das DISC-Adapterprotein binden. Dadurch wird die Dimerisierung von Caspase-8 und damit die Caspase-8-Aktivierung verhindert (Kirchhoff *et al.*, 2000). Die aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimieren c-FLIP_L, c-FLIP_S und p43-FLIP. Da bei ruhenden T-Zellen nur c-FLIP_L detektiert werden konnte, wird die Expression von c-FLIP_S erst durch T-Zell-Aktivierung induziert, wie eine andere Studie bereits belegen konnte (Golks *et al.*, 2005). Dagegen handelt es sich bei p43-FLIP, dem eine prominente Rolle in der NF-κB-Aktivierung zugeschrieben wird, um ein c-FLIP_L-Spaltprodukt, welches nach Heterodimerisierung mit Pro-Caspase-8 am DISC durch die proteolytische Aktivität von Pro-Caspase-8 entsteht (Scaffidi *et al.*, 1999; Kataoka und Tschopp, 2004; Golks *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit antagonisiert das exprimierte c-FLIP_{L/S} vermutlich eine pro-apoptotische, proteolytische Aktivität von Caspase-8. Die schwache Caspase-8-Aktivität, ersichtlich an der Präsenz von p43-FLIP und der Caspase-8p12-Untereinheit im Aktivitäts-Blot, wurde wahrscheinlich zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs und somit für anti-apoptotische Prozesse wie Proliferation und Überleben der Zelle genutzt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer anderen Studie, die bei nicht-apoptotischen, aktivierten murinen CD4⁺ T-Zellen eine schwache Caspase-8-Aktivität durch Detektion von p43-FLIP aufzeigen konnte (Misra *et al.*, 2005). Bid wird bei bestimmten Zelltypen, die man als Typ II-Zellen bezeichnet, nach Stimulation des Rezeptor-, insbesondere des Todesrezeptor-vermittelten Apoptosewegs durch Caspase-8-Aktivität in tBid gespalten

und aktiviert anschließend den mitochondrialen Apoptoseweg (Gross *et al.*, 1999). Diese *Amplification loop* (Verstärkungsschleife) des Todesrezeptor-vermittelten Apoptosewegs wird benötigt, um Apoptose trotz unzureichender DISC-Bildung und einhergehender schwacher Caspase-8-Aktivität, zu induzieren. Dagegen gehören T-Zellen zu den Typ I-Zellen und bilden nach Todesrezeptor-Stimulation ausreichend DISC, um eine Caspase-8-vermittelte Prozessierung von nachgeschalteten Caspasen, wie Caspase-3, zu bewirken (Scaffidi *et al.*, 1998; Lavriks *et al.*, 2005). Diese Theorie konnte mit der Detektion von ungespaltenem Bid in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 44, Abb. 53).

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Caspase-3, -7, -8 und -9 in mit allogenen mDCs aktivierten CD4⁺ T-Zellen bereits in ihrer prozessierten Form existierten. Die Caspasen demonstrierten auch moderate, nicht-apoptotische proteolytische Aktivität, die anhand der selektiven Spaltung von Caspase-Proteinsubstraten, wie PARP, HPK1, ICAD und c-FLIP, und Aktivitäts-Blots durch bVAD-Präzipitation beobachtet wurde. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Caspase-Aktivität zur Proliferation und Expression des IL-2R α -Rezeptors bei aktivierten CD4⁺ benötigt wurde. Die Aktivität der Caspasen wurde durch die verstärkte Expression der Caspase-Antagonisten cIAP-1, cIAP-2, XIAP und c-FLIP unterhalb eines nicht-apoptotischen Schwellenwertes gehalten.

3.6 Apoptose-Mechanismus nach Proteasom-Inhibition bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen

In verschiedenen Studien mit immortalisierten Tumorzelllinien konnten multiple molekulare Mechanismen für die Proteasom-Inhibition-induzierte Apoptose dargestellt werden (Adams J, 2004; Chauhan *et al.*, 2005; Fenell *et al.*, 2007). Es konnte demonstriert werden, dass die Inhibition des Proteasoms meist die Induktion von intrinsischen Apoptosewegen verursacht (Yu J *et al.*, 2003; Dewson *et al.*, 2003; Chauhan *et al.*, 2003; Fribley *et al.*, 2004; Nawrocki *et al.*, 2004; Nencioni *et al.*, 2005; Perez-Galan *et al.*, 2006). Dabei kommt es zur Störung des empfindlichen Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine an der äußeren mitochondrialen Membran und anschließend zur Zerstörung der mitochondrialen Membranintegrität. Durch das daraus resultierende MOMP werden intramitochondriale pro-apoptotische Proteine, wie z.B. Cytochrom *c*, freigesetzt, die die Initiator-Caspase-9 aktivieren. Anschließend werden die im Signalweg nachgeschalteten Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert und die Zelle geht in Apoptose. Seltener und nur bei bestimmten Zelltypen aktiviert Proteasom-Inhibition durch Bortezomib auch den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg (Nikrad *et al.*, 2005). Oftmals

ist eine stringente Trennung der induzierten Apoptose-Mechanismen jedoch nicht möglich, da die verschiedenen Signalwege auf molekularer Ebene eng miteinander verknüpft sind. Ferner ist zu beachten, dass der Apoptose-Mechanismus vom jeweiligen Proteasom-Inhibitor, vom Zelltyp und – vom Differenzierungsstadium abhängt. Deshalb ist eine exakte Analyse des jeweiligen Apoptose-Mechanismus vor dem Hintergrund einer sicheren therapeutischen Anwendung von Proteasom-Inhibitoren relevant.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal der Apoptose-Mechanismus für in physiologischer Weise aktivierte, humane CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden. Es konnte demonstriert werden, dass die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib den intrinsischen Apoptoseweg aktiviert.

3.6.1 Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs

Der mitochondriale Apoptoseweg wird durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht von pro-apoptotischen (Bax, Bak, Bim, Bid, PUMA, Noxa usw.) und anti-apoptotischen (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL usw.) Proteinen der Bcl-2-Familie an der äußeren mitochondrialen Membran reguliert (Cory und Adams; 2002).

Die Proteasom-Inhibition bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Bortezomib bewirkte eine Akkumulation von pro-apoptotischen *Bax-like* (Bax und Bak) und *BH3-only* (Noxa, PUMA, Bim) Proteinen sowie p53 an der äußeren mitochondrialen Membran (Abb. 51, Abb. 53). Dagegen konnte keine ausreichende neutralisierende Anreicherung von *Bax-like*- und *BH3-only*-antagonisierenden *Bcl-2-like* Proteinen (Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1) nachgewiesen werden. Im Einzelnen konnte eine mitochondriale Anreicherung der durch p53 auf transkriptioneller Ebene induzierten pro-apoptotischen *BH3-only* Proteine Noxa und PUMA demonstriert werden (Oda *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2001; Concannon *et al.*, 2007). Dagegen ist die Akkumulation von allen Bim-Spleiß-Varianten (Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S) an den Mitochondrien, von welchen Bim_S als apoptogenste Isoform gilt (O'Connor *et al.*, 1998), vermutlich auf die Inhibition der proteasomalen Degradation zurückzuführen (Ley *et al.* 2003; Tan *et al.*, 2005). Von den untersuchten anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteinen zeigte nur Mcl-1, dessen Abundanz ebenfalls der proteasomalen Regulation unterliegt, eine annähernd gleichwertige mitochondriale Akkumulation (Derouet *et al.*, 2004; Nencioni *et al.*, 2005). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass allein Mcl-1 neutralisierende Heterodimere mit Noxa bilden kann und dadurch dessen Aktivierung von *Bax-like*-Proteinen unterbindet (Chen *et al.*, 2005; Adams und Cooper, 2007). Im Gegensatz zu Mcl-1 zeigten die anderen, in der vorliegenden Arbeit analysierten *Bcl-2-like* Proteine nur eine moderate (Bcl-XL) bzw. keine Anreicherung (Bcl-2) an der äußeren

mitochondrialen Membran. Dieser Effekt beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Bortezomib-vermittelten Blockade des NF- κ B-Signalwegs, der die Transkription von Bcl-2 und Bcl-XL reguliert (Chen und Greene, 2004). In der vorliegenden Arbeit tragen Bim und PUMA vermutlich zum großen Teil zur Störung des Gleichgewichts von pro- und anti-apoptischen Proteinen an der äußeren mitochondrialen Membran bei. Eine vorherige Aktivierung von Bim ist hierfür nicht notwendig, da das *BH3-only* Protein in T-Zellen konstitutiv mit Bcl-2 oder Bcl-XL assoziiert ist (Zhu *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse unterstreichen damit die essentielle Funktion der beiden *BH3-only* Proteine bei der Apoptose-Induktion in aktivierten T-Zellen (Bouillet *et al.*, 1999; Hildeman *et al.*, 2002; Erlacher *et al.*, 2006)

3.6.2 Rolle von p53 bei der mitochondrialen Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen

p53 hat durch Induktion der Transkription pro-apoptischer Proteine, wie Noxa, PUMA und Bax und als Repressor der Bcl-2- und Bcl-XL-Transkription, einhergehend mit seiner Funktion als Tumorsuppressor, einen indirekten Einfluss auf die *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP) (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita und Reed, 1995; Bartke *et al.*, 2001; Vousden und Lu, 2002)

In neueren Studien konnte jedoch auch ein direkter pro-apoptischer Effekt von p53 an der äußeren mitochondrialen Membran gezeigt werden. Demnach transloziert monoubiquitiniertes p53 an die äußere mitochondriale Membran und interagiert dort mit den anti-apoptischen Proteinen Bcl-XL und Bcl-2 (Mihara *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004). Dadurch können mit Bcl-XL und Bcl-2 interagierende *BH3-only* und *Bax-like* Proteine dissoziieren und ihre pro-apoptische Wirkung entfalten (Marchenko *et al.*, 2000; 2007a; 2007b).

In dieser Arbeit konnte eine Bortezomib-vermittelte Anreicherung von mono- und polyubiquitiniertem zytoplasmatischem p53 in aktivierten CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 53). Dagegen akkumulierte nur deubiquitiniertes p53 an der äußeren mitochondrialen Membran. Dadurch konnten Studien bestätigt werden, die nach Apoptose-Induktion eine Translokation von monoubiquitiniertem zytoplasmatischem p53 an die äußere mitochondriale Membran beobachtet hatten (Marchenko *et al.*, 2007a). Monoubiquitiniertes p53 wird anschließend von einer spezifischen Deubiquitinase an der äußeren mitochondrialen Membran deubiquitiniert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nur nicht-ubiquitiniertes mitochondriales p53 nachgewiesen werden, welches die apoptogene, Bcl-2- und Bcl-XL-antagonisierende Form darstellt (Marchenko *et al.*, 2007).

Anschließend konnte in dieser Arbeit die Aktivierung von Bax und Bak anhand ihrer Homodimerisierung und mitochondrialen Translokation nachgewiesen werden (Abb. 51). Trotz zahlreicher Studien konnte bisher nicht aufgeklärt werden, ob die Bax-/Bak-Aktivierung nur durch *BH3-only* Protein-vermittelte Antagonisierung der anti-apoptotischen *Bcl-2-like*-Proteine oder durch direkte Interaktion mit pro-apoptotischen *BH3-only*-Proteinen induziert wird. Diese Fragestellung ist weiterhin Mittelpunkt kontroverser Diskussionen und konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht gelöst werden (Letai *et al.*, 2002; Youle R, 2007; Willis *et al.*, 2007). Eine Studie konnte jedoch demonstrieren, dass eine Neutralisierung der anti-apoptotischen *Bcl-2-like*- durch die *BH3-only* Proteine nicht ausreicht, um bei Abwesenheit von funktionellen Bax-like-Proteinen Apoptose zu induzieren (Zong *et al.*, 2001). Deshalb kann nur vermutet werden, dass die Aktivierung der *Bax-like*-Proteine, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, durch einen koordinierten p53-induzierten Mechanismus verursacht wurde, der die synergistische Kooperation der pro-apoptotischen *BH3-only* Proteine Bim, PUMA und Noxa und des Tumorsuppressors p53 umfasst. Eine zusätzliche Potenzierung des pro-apoptotischen Effekts wurde vermutlich durch eine Inhibition der Proteasom-vermittelten Bax-Degradation verursacht (Chang *et al.*, 1998; Li und Dou, 2000; Liu *et al.*, 2008).

3.6.3 Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine durch Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Durch die Induktion von MOMP durch *Bax-like*-Proteine werden pro-apoptotische Proteine, wie Cytochrom *c*, Smac/DIABLO, HtrA2 und AIF, aus dem intramitochondrialen Raum ins Zytoplasma freigesetzt (Saelens *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die zytoplasmatische Translokation von Smac/DIABLO und HtrA2 vor jener von Cytochrom *c* und AIF detektiert (Abb. 50). Das Ergebnis bestätigt Studien, welche eine unterschiedliche Kinetik der Freisetzung von intramitochondrialen Proteinen aus den Mitochondrien postulieren (Adrain *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2003a; Henderson *et al.*, 2005 Uren *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass die intramitochondrialen Proteine durch verschiedene Mechanismen aus den Mitochondrien freigesetzt werden und dass die proteolytische Aktivität von Caspasen eine wichtige Rolle dabei spielt (Marzo *et al.*, 1998). So konnte demonstriert werden, dass der Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk in Zellen, in welchen Bax-/Bak-vermittelte Apoptose induziert wurde, zwar die Funktion der Elektronentransportkette aufrecht erhält oder die Freisetzung von pro-apoptotischen intramitochondrialen Proteinen, wie z.B. Smac/DIABLO und HtrA2 verhindert, jedoch nicht die Cytochrom *c* Freisetzung inhibiert

(Adrain *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2003a). Deshalb vermutet man, dass eine Caspase-vermittelte Proteolyse von definierten zytosolischen oder mitochondrialen Komponenten entscheidend zur unterschiedlichen Kinetik der zytoplasmatischen Translokation von Smac/DIABLO und HtrA2 beiträgt (Ricci *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2004; Breckenridge und Xue, 2004; Belizário *et al.*, 2007).

Eine mögliche Erklärung für die verzögerte Cytochrom *c*- und AIF-Freisetzung stellt deren Bindung an der inneren mitochondrialen Membran dar, wogegen Smac/DIABLO und HtrA2 größtenteils frei im mitochondrialen Membranzwischenraum gelöst sind (Uren *et al.*, 2005; Otera *et al.*, 2005). Cytochrome *c* interagiert dabei über elektrostatische Interaktionen mit Cardiolipin, einem azidischen Phospholipid, an der inneren mitochondrialen Membran (Vik *et al.*, 1983; Tuominen *et al.*, 2002). Diese Bindung wird gewöhnlich während der Apoptose durch Cytochrom *c*-katalysierte Peroxidation von Cardiolipin zerstört, so dass Cytochrom *c* in das Zytoplasma translozieren kann (Garcia Fernandez *et al.*, 2002; Iverson und Orrenius, 2004). Cytochrom *c* benötigt zur Peroxidation aber die mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Kagan *et al.*, 2005). Deshalb wird vermutet, dass bei nicht ausreichender ROS-Produktion zwar MOMP ausgelöst wird und im Membranzwischenraum gelöste Proteine, wie Smac/DIABLO und HtrA2, ins Zytoplasma translozieren können, die Dissoziation und zytoplasmatische Freisetzung von Cytochrom *c* aber verzögert stattfindet.

Auch scheint die Translokation von Cytochrom *c* eng mit der mitochondrialen Teilung während der Bax-/Bak-vermittelten Apoptose assoziiert zu sein. Die mitochondriale Teilung wird unter anderem durch die zytosolische GTPase *Dynamin-related protein 1* (Drp1) reguliert (Youle und Karbowski, 2005). Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Inhibition der mitochondrialen Teilung durch eine verringerte Drp1-Expression während Bax-/Bak-vermittelter Apoptose-Induktion, zur selektiven Smac/DIABLO-/HtrA2-Freisetzung führt. Daraus wurde geschlossen, dass die verringerte Expression von Drp1 eine Stabilisierung der Cardiolipin-Cytochrom *c*-Interaktion bewirkt, so dass Cytochrom *c* eine längere Peroxidationsphase zur Dissoziation von Cardiolipin benötigt (Parone *et al.*, 2006; Ghavami *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass durch einen ROS-Fänger und einen Inhibitor von ROS-Produzenten in der mitochondrialen Atmungskette, die Bortezomib induzierte Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen deutlich verringert wird (Abb. 52). Ferner belegen zahlreiche weitere Studien eine Produktion von ROS als einer

der multiplen Mechanismen der Apoptose-Induktion durch Bortezomib (Ling *et al.*, 2003; Fribley *et al.*, 2004; Perez-Galan *et al.*, 2006). Deshalb kann eine verzögerte Freisetzung von Cytochrom *c* durch ungenügende ROS-Generierung ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist eine Abnahme der Drp1-Expression bei Bortezomib-inhibierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen eher unwahrscheinlich, da Drp1 der Regulation durch das UPS unterliegt (Yonashiro *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu Cytochrom *c* ist AIF mit seinem N-terminalen Ende in der inneren mitochondrialen Membran fest integriert. In Folge eines MOMP-induzierenden apoptotischen Reizes wird AIF offenbar durch eine noch unbekannt zyttoplasmatische Protease an der N-terminalen Verankerung gespalten, so dass eine zyttoplasmatische Translokation des abgespaltenen AIF ermöglicht wird (Otera *et al.*, 2005). Verschiedene Studien konnten sowohl einen Caspase-abhängigen (Arnoult *et al.*, 2003a; 2003b) als auch einen Caspase-unabhängigen (Dumont *et al.*, 2000; Cregan *et al.*, 2002; Yu C *et al.*, 2003; Uren *et al.*, 2005) Mechanismus der zyttoplasmatischen Translokation von AIF demonstrieren. Die Regulation der AIF-Translokation scheint dabei abhängig vom Apoptose-induzierenden Stimulus und dem Zelltyp zu sein (Cregan *et al.*, 2004). Es konnte jedoch demonstriert werden, dass Bortezomib in humanen Leukämiezellen eine Caspase-unabhängige Freisetzung von AIF mit Hilfe von ROS-Produktion induziert (Yu *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit verursachte Bortezomib eine Aktivierung der *Bax-like* Proteine. Darüber hinaus zeigten aktivierte CD4⁺ T-Zellen eine moderate proteolytische Caspase-Aktivität. Diese Beobachtungen bestärken die Vermutung, dass die rasche und selektive zyttoplasmatische Translokation der frei im intramitochondrialen Raum gelösten Smac/DIABLO und HtrA2 durch spezifische mitochondriale Membran-Kanäle erfolgte. Diese wurden vermutlich durch die Zerstörung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie und der vorhandenen Caspase-, vor allem der Caspase-3-Aktivität, geöffnet. Im Gegensatz dazu fand die Dissoziation der mit der inneren mitochondrialen Membran assoziierten bzw. in die innere mitochondriale Membran integrierten Proteine Cytochrom *c* und AIF vermutlich erst im späteren Verlauf der Apoptose statt.

In zukünftigen Studien sollte geklärt werden, ob die unterschiedliche Kinetik der zyttoplasmatischen Translokation der intramitochondrialen Proteine nach Bortezomib-vermittelter Apoptose-Induktion in aktivierten CD4⁺ T-Zellen abhängig von Caspase-Aktivität und ROS-Produktion ist.

Der prominente Unterschied zwischen der zytoplasmatischen Abundanz von Smac/DIABLO und Cytochrom *c* bzw. AIF wurde durch die Proteasom-Inhibition wahrscheinlich noch potenziert. Denn Smac/DIABLO gehört neben Caspase-3, -7 und -9 auch zu den Zielproteinen der intrinsischen E3-Aktivität der IAPs und wird über das UPS reguliert (Yang und Du, 2004). Die Proteasom-Inhibition verursachte somit vermutlich eine Akkumulation von zytoplasmatischem Smac/DIABLO.

3.6.4 Antagonisierung von IAPs durch zytoplasmatisches Smac/DIABLO nach Proteasom-Inhibition

Die beiden mitochondrialen Proteine Smac/DIABLO und HtrA2 induzieren Apoptose, indem sie die Caspase-antagonisierende Wirkung der IAPs auf vielfältige Weise unterbinden. Diverse Studien konnten zeigen, dass freigesetztes Smac/DIABLO und HtrA2 *in vitro* über eine kurze N-terminale AS-Sequenz mit den IAPs interagieren, den IAP-Caspase-Komplex voneinander trennen und dadurch den inhibitorischen Effekt auf die Caspasen aufheben kann (Chai *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit verursachte Bortezomib eine kontinuierliche Abnahme von cIAP-1 und cIAP-2 bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 49). Diese ist vermutlich auf die proteolytische Aktivität der zytoplasmatischen Serin-Protease HtrA2 zurückzuführen. HtrA2 demonstrierte eine ähnlich rasche zytoplasmatische Translokation wie Smac/DIABLO (Abb. 50). Ferner spaltet HtrA2 durch ihre intrinsische proteolytische Aktivität die Caspase-inhibierenden IAPs (Srinivasula *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Verhagen *et al.*, 2003). Allerdings lässt sich auch eine Smac/DIABLO-vermittelte proteasomale Degradation von cIAP-1 und cIAP-2 trotz Proteasom-Inhibition nicht ganz ausschließen (Yang und Du, 2004), da Bortezomib das Proteasom reversibel hemmt. Außerdem weisen verschiedene Studien und die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die katalytischen Untereinheiten β_2 und β_2i von der inhibitorischen Wirkung durch Bortezomib nicht beeinflusst werden und damit eine residuale Proteasom-Aktivität trotz Proteasom-Inhibition vorhanden ist (Berkers *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2007). Auch die Inhibition der NF- κ B-abhängigen Transkription der IAPs trägt offenbar zur verminderten cIAP-1- und cIAP-2-Expression bei (Liston *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1997; Wang C *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu cIAP-1 und cIAP-2 blieb die Expression von XIAP konstant und es konnte eine Anreicherung von ubiquitiniertem XIAP beobachtet werden, die vermutlich auf Hemmung der proteasomalen Degradation zurückzuführen ist (Abb. 49). Obwohl kein

direkter Nachweis erbracht wurde, kann vermutet werden, dass Smac/DIABLO auch die intrinsische E3-Aktivität der E3s reprimierte. Diese ist für die Funktion der IAPs essentiell (Creagh *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse sind analog zu Studien, die eine Degradation von cIAP-1 und cIAP-2 durch Verwendung von synthetischen Smac/DIABLO-Imitaten demonstrieren. Auch dort konnte die Abnahme von cIAP-1 (Vince *et al.*, 2007) bzw. cIAP-1 und -2 (Varfolomeev *et al.*, 2007) trotz Proteasom-Inhibition nicht komplett inhibiert werden.

3.6.5 Aktivierung von Caspasen durch freigesetzte pro-apoptotische intramitochondriale Proteine

Die in dieser Arbeit festgestellte Abnahme von cIAP-1 und cIAP-2 sowie die Antagonisierung von cIAP-1, cIAP-2 und XIAP durch Smac/DIABLO- und HtrA2-Freisetzung bewirkte eine indirekte Aktivierung der Caspasen. Zusätzlich verhinderte die Smac/DIABLO-vermittelte Repression der E3-Ligase-Aktivität von cIAP-1, cIAP-2 und XIAP die proteasomale Degradation der Caspasen.

Dadurch kam es zur raschen Autoprozessierung von proteolytisch leicht aktiver Caspase-3p20 in die reife Caspase-3p17. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Caspase-9- erst nach der Zunahme der Caspase-3-Aktivität beobachtet werden (Abb. 43, Abb. 45). Die Umkehrung der Caspase-Kaskade-Abfolge lässt sich jedoch durch die verzögerte Cytochrom *c*-Freisetzung aus den Mitochondrien begründen (Abb. 50). Deren Anwesenheit ist neben Apaf-1 und dATP zur Bildung des Caspase-9-aktivierenden Apoptosoms notwendig (Zou *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999). Es kann vermutet werden, dass die zytoplasmatische Cytochrom *c*-Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze im Western Blot lag, so dass die Detektion von Cytochrom *c* erst nach Zunahme der Caspase-9-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint Caspase-9 in Bortezomib-inkubierten aktivierten CD4⁺ T-Zellen die Funktion eines „Apoptose-Beschleunigers“ zu haben, der der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 nachgeschaltet ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die einen ähnlichen alternativen Cytochrom *c*- und Caspase-9-unabhängigen, jedoch Bcl-2-Familie-abhängigen Apoptoseweg insbesondere in Lymphozyten nachweisen konnten (Marsden *et al.*, 2002; Ekert *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2005). Dieser inverse Caspase-Aktivierungsweg ist für die Induktion von Apoptose durch Proteasom-Inhibitoren bereits in einer anderen Studie beschrieben worden. Darin konnte demonstriert werden, dass Proteasom-Inhibitoren, im Gegensatz zu vielen anderen zytotoxischen Wirkstoffen, Apoptose in Caspase-9-defizienten Tumorzellen induzieren.

Dabei wurde Smac/DIABLO als der essentielle Effektor-Caspase-aktivierende Faktor identifiziert (Henderson *et al.*, 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte rasche Prozessierung von Procaspase-9 in Caspase-9p37 durch proteolytisch-aktive Caspase-3 stellt einen positiven *feedback*-Mechanismus dar, der die Caspase-Kaskade verstärkt. Durch die Caspase-9-Spaltung wird ein *IAP-Binding-Motiv* (IBM) zerstört, welches der Caspase-Inhibitor XIAP zur Interaktion mit und zur Inhibition von Caspase-9 benötigt (Slee *et al.*, 1999; Denault *et al.*, 2007).

Es ist allerdings zu vermuten, dass die Bortezomib-induzierte Apoptose bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen nicht vollständig von Caspasen exekutiert wird. Die Inhibition der Caspasen durch ZVAD-fmk bewirkte zwar eine signifikante Verringerung der Apoptose, jedoch konnte diese nicht vollständig blockiert werden. Ein potentieller Kandidat für die Induktion von Caspase-unabhängiger Apoptose ist das intramitochondriale Flavoprotein AIF. Dieses transloziert nach MOMP über das Zytoplasma in den Nukleus, wo es durch noch unbekannte Mechanismen Chromatin kondensiert und DNA-fragmentiert (Susin *et al.*, 1999; Joza *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass mitochondriales AIF nach Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib mit einer ähnlichen Kinetik wie Cytochrom *c* ins Zytoplasma transloziert (Abb. 50). Eine Studie in humanen Leukämiezellen konnte demonstrieren, dass die zytoplasmatische Translokation von AIF bei Bortezomib-induzierter Apoptose Caspase-unabhängig ist und auf die Produktion von ROS angewiesen ist (Yu *et al.*, 2004). Deshalb kann man annehmen, dass AIF zur beobachteten Caspase-unabhängigen Apoptose beiträgt.

3.6.6 Spaltung von Caspase-Substraten

Während der Induktion von Apoptose konnte eine rasche und selektive Spaltung von charakteristischen Caspase-3- und -7-Proteinsubstraten, wie z.B. PARP und ICAD, detektiert werden. Dagegen zeigte sich keine Spaltung von Bid, welches in Typ II-Zellen durch proteolytische Caspase-8-Aktivität prozessiert wird (Abb. 44).

In der vorliegenden Arbeit konnte unter anderem auch eine sukzessive Expressions-Abnahme von HPK1 durch verstärkte Spaltung in die N-terminale Kinase-Domäne nachgewiesen werden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass HPK1 die Sensitivität von aktivierten T-Zellen gegenüber AICD durch Aktivierung bzw. Inhibition von NF- κ B-Signalwegen moduliert (Arnold *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005). Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Überschreitung einer definierten Caspase-3-Aktivitäts-Schwelle die HPK1-Spaltung in die C-terminale regulatorische HPK1-Domäne

fördert. Dieses HPK1-C-Fragment supprimiert anti-apoptotische, NF- κ B-abhängige Signalwege, während es den mitochondrialen Apoptoseweg, durch Antagonisierung von anti-apoptotischen *Bcl-2-like* Proteinen, aktiviert (Brenner *et al.*, 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Proteasom-Inhibition in aktivierten CD4⁺ T-Zellen eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität bewirkt, welche das initial anti-apoptotische NF- κ B-aktivierende Signal der HPK1 durch Spaltung in ein pro-apoptotisches NF- κ B-supprimierendes Signal modifiziert.

3.7 Modell der Bortezomib-vermittelten Apoptose

Im nachfolgenden, zum Teil hypothetischen Modell sind die multiplen und komplexen, durch Bortezomib-induzierten Apoptosewege in aktivierten CD4⁺ T-Zellen zusammengefasst. Die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib induziert eine Akkumulation von pro-apoptotischen *BH3-only* Proteinen und p53 an der äußeren mitochondrialen Membran. Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs durch die Proteasom-Inhibition verhindert simultan eine Neutralisierung der pro-apoptischen Proteine durch anti-apoptotische *Bcl-2-like* Proteine. Dadurch werden *Bax-like* Proteine aktiviert, die in die äußere mitochondriale Membran integrieren und/oder mit mitochondrialen Membrankanälen (PTP) interagieren. Die synergistische Wirkung der *Bax-like* Proteine, der durch Bortezomib-induzierten ROS und der in aktivierten CD4⁺ T-Zellen bereits proteolytisch leicht aktiven Caspasen auf die äußere mitochondriale Membran löst MOMP aus. Es kommt zur selektiven zytoplasmatischen Translokation von im mitochondrialen Membranzwischenraum gelösten Smac/DIABLO und HtrA2 durch mitochondriale Poren. Diese antagonisieren die Caspase-Inhibition durch die IAPs. Gleichzeitig inhibiert Bortezomib die IAP-vermittelte proteasomale Degradation der Caspasen, so dass eine rasche Autoprozessierung und damit einhergehende Aktivitätssteigerung von Caspase-3p20 in die reife Caspase-3p17 induziert wird. Folgend wird die Aktivierung von Caspase-9, durch Caspase-3-vermittelter Zerstörung eines IBM und dem verzögert ins Zytoplasma freigesetztem Cytochrom *c*, induziert. Caspase-9 fungiert bei der Bortezomib-induzierten Apoptose in aktivierten CD4⁺ T-Zellen nur als Apoptose-Verstärker. Reife Caspase-3p17 prozessiert nicht nur Caspase-9, sondern spaltet selektiv auch charakteristische Proteinsubstrate, wie HPK1, PARP und ICAD, die wiederum durch Inhibition des NF- κ B-Signalwegs bzw. Degradation der DNA zur Amplifikation des Apoptosesignals beitragen.

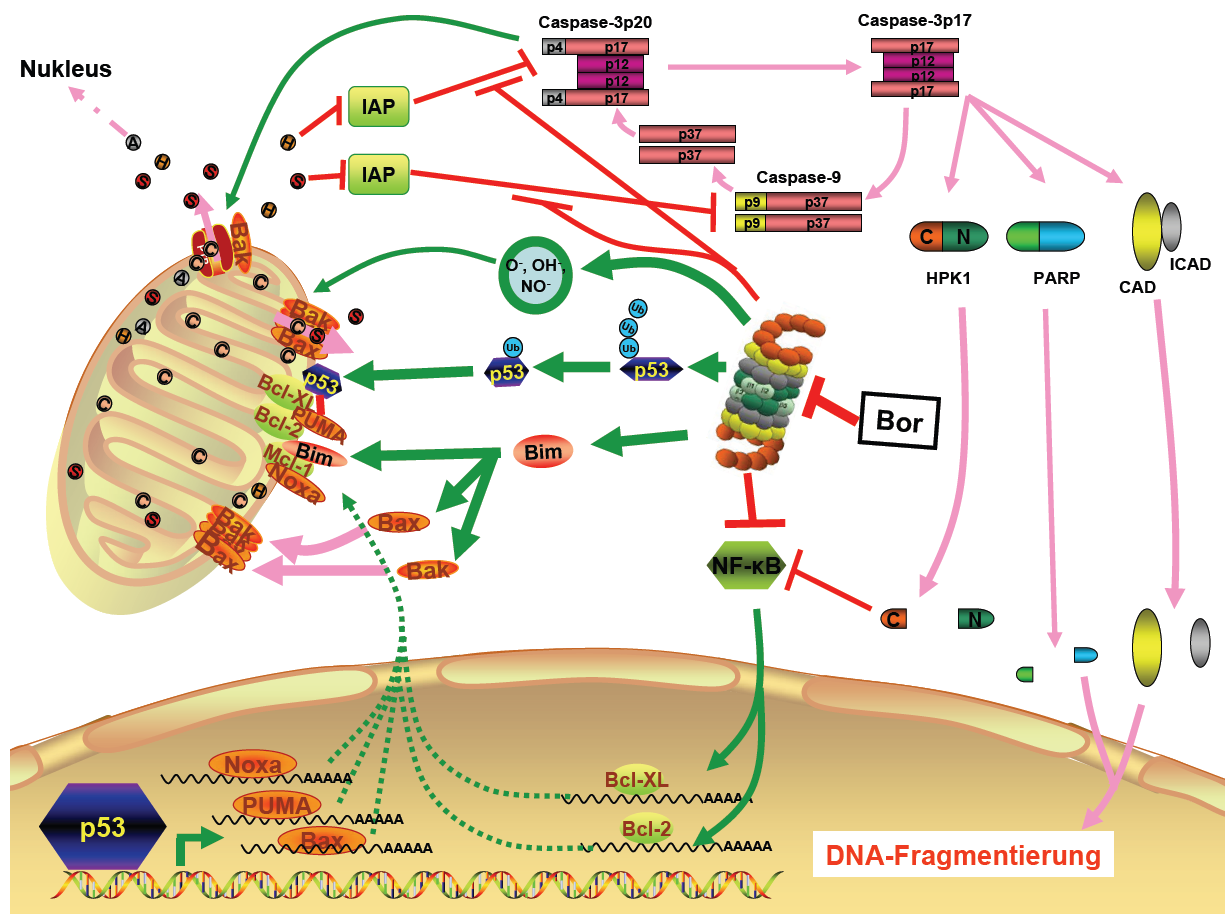


Abb 54 Modell des potentiellen Apoptose-Mechanismus bei aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch Bortezomib (Bor). Bor inhibiert das Proteasom und induziert dadurch multiple und komplexe proapoptotische Signalwege (p53, Bim, ROS), wogegen anti-apoptotische Signalwege (NFκB, Bcl-2, IAP) direkt oder indirekt supprimiert werden. Weitere Erläuterungen s. Text (Diskussion 3.7).

4 Klinische Relevanz

Bisher wurden die Effekte von Proteasom-Inhibitoren fast ausschliesslich in neoplastisch transformierten Zellen untersucht und beschrieben. Diese sind aufgrund eines raschen Wachstums besonders suszeptibel gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Proteasom-Inhibition (Drexler HCA, 1997; Naujokat und Hoffmann, 2002; Adams J., 2002). Aufgrund des einzigartigen Wirkmechanismus wurde Bortezomib als erster Wirkstoff

seiner Klasse zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen. Inzwischen wird Bortezomib auch bei der Behandlung von weiteren Krebserkrankungen, wie z.B. Mantelzelllymphome, follikulären Lymphomen, T-Zell-Lymphomen und Kolon-, Bronchial-, Pankreas-, Mamma- und Prostatakarzinomen, eingesetzt (Voorhees und Orłowski, 2006). Da die Inhibition des Proteasoms in Tumorzellen weitaus stärkere Effekte (z.B. Zellzyklus-Arrest und Apoptose) induziert als in nicht transformierten Zellen, zeigt der therapeutische Einsatz von Bortezomib geringe allgemeine Nebenwirkungen in Patienten (San Miguel *et al.*, 2006; 2008).

Das Wirkungsprinzip von Bortezomib schließt eine therapeutische Verwendung auch als Immunsuppressivum nicht aus. In Folge einer funktionellen Analogie zwischen neoplastischen Zellen und aktivierten Immunzellen, wie T-Zellen und DCs, können auch dysregulierte Immunantworten durch Proteasom-Inhibitoren supprimiert werden. Denn sowohl neoplastische als auch aktivierte T-Zellen weisen im Vergleich zu regulären, nicht-transformierten Zellen bzw. ruhenden T-Zellen eine akzelerierte Zellzyklus-Progression, eine gesteigerte Mitose-Rate und eine klonogene Proliferation auf. Ferner zeigen DCs und aktivierte T-Zellen analog zu neoplastischen Zellen eine erhöhte Protein- und Zytokin-Expression, eine verstärkte Aktivität von NF- κ B und einen gesteigerten Stoffwechsel. Aktuelle *in vitro*-Studien bestätigen diese Hypothese. Darin konnte eine selektive Depletion von alloreaktiven T-Zellen bei gleichzeitiger Abnahme von Th1-Zytokinen durch Bortezomib demonstriert werden (Blanco *et al.*, 2006; Berges *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bortezomib bei physiologisch-aktivierten CD4⁺ T-Zellen einen Zellzyklus-Arrest und Apoptose induziert und essentielle Funktionen, wie Proliferation und Zytokin-Produktion, supprimiert. Darüber hinaus konnte hier demonstriert werden, dass durch die Suppression essentieller DC-Funktionen die Aktivierung von T-Zell-vermittelten Immunantworten bereits in ihrer Initiations-Phase gehemmt wird. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind somit im Einklang mit anderen Studien, die einen ähnlichen Effekt von Bortezomib in DCs beschreiben konnten (Nencioni *et al.*, 2006a und b).

Die immunsuppressive Wirkung von Proteasom-Inhibitoren konnte auch im Mausmodell beobachtet werden. So wird eine akute GVHD unter Erhaltung des *graft-versus-tumor*-Effekts nach Knochenmarkstransplantation durch systemische Applikation von Bortezomib verhindert (Sun K *et al.*, 2004). Dagegen konnten zahlreiche Studien demonstrieren, dass die Verwendung von Standard-Immunsuppressivas wie Cyclosporine A, das Risiko, an Lymphomen zu erkranken, erhöht (Opelz und Henderson, 1993; Stewart

et al., 1995; Opelz und Döhler, 2004). Damit zeigt die Proteasom-Inhibition in tierexperimentellen Studien deutliche Vorteile gegenüber der immunsuppressiven Standardtherapie nach Transplantationen. Auch die Verwendung von Bortezomib bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen wird durch Studien mit Polyarthritits- und Psoriasis-Mausmodellen gestützt (Palombella *et al.*, 1998; Zollner *et al.*, 2002).

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit immunmodulatorische Effekte durch Proteasom-Inhibition bei funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von zwei der wichtigsten Zellen des Immunsystems demonstrieren. Im Einklang mit anderen Studien wird deshalb eine Evaluation der Anwendung von Bortezomib als zukünftiges Immunsuppressivum zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, GVHD und zur Suppression von Abstossungsreaktionen nach Organtransplantation im Menschen empfohlen (Mattingly *et al.*, 2007).

Anhang

Literatur

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16: 3797-3804.

Adams GM, Crotchett B, Slaughter CA, DeMartino GN, Gogol EP (1998). Formation of proteasome-PA700 complexes directly correlates with activation of peptidase activity. *Biochemistry* 37: 12927-12932.

Adams J, Behnke M, Chen S, Cruikshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 333-338.

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59: 2615-2622.

Adams J (2002). Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 7: 9-16.

Adams J (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4: 349-360.

Adams J and Kauffman M (2004). Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* 22: 304-311.

Adams KW and Cooper GM (2007). Rapid turnover of Mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *J Biol Chem* 282: 6192-6200.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 20: 6627-6636.

Akira S (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15: 5-11.

Al-Alwan MM, Liwski RS, Haeryfar SM, Baldrige WH, Hoskin DW, Rowden G, West KA (2003). Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent. *J. Immunol* 171: 4479-4483.

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190: 1879-1890.

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89

Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2: 1010-1017.

Alegre ML, Florquin S, Goldman M (2007). Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. *Curr Opin Immunol* 19: 563-568.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.

Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Peter ME (2002). Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14: 721-726.

Alnemri E, Livingston SDJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171-175.

- Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117: 515-526.
- An J; Sun Y; Fisher M, Rettig MB (2004). Antitumor effects of bortezomib (PS-341) on primary effusion lymphomas, *Leukemia* 10: 1699-1704.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276: 11615–11623.
- Aouad SM, Cohen LY, Shraif-Askari E, Haddad EK, Alam A Sekaly RP (2004). Caspase-3 is a component of Fas death-inducing signalling complex in lipid rafts and its activity is required for complete caspase-8 activation during Fas-mediated cell death. *J Immunol* 172: 2316-2323.
- Appleman, LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA (2000). CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 164: 144-151.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24: 47-53.
- Ardehna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96: 1039–1046.
- Arens R, Tesselaar K, Baars PA, van Schijndel GM, Hendriks J, Pals ST, Krimpenfort P, Borst J, van Oers MH, van Lier RA (2001). Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion. *Immunity* 15: 801–812.
- Arnold R, Liou J, Drexler HCA, Weiss A, Kiefer F (2001). Caspase-mediated cleavage of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) converts an activator of NF κ B into an inhibitor of NF κ B. *J Biol Chem* 276: 14675–14684.
- Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H (1999). Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162: 3757-3760
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22: 4385-4399.
- Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, anasetti C (2000). Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95: 2484-2490.
- Ashkenazi A and Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–1308.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Banchereau J and Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–52.
- Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J* 23: 3175-3185.
- Bartke T, Siegmund D, Peters N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich P, Wajant H (2001). p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 20: 571-580.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303-313.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, and Seemüller E (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367-380.

- Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A (2007). A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res* 40: 1011-1024.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001). Impairment of the UPS by protein aggregation. *Science* 292: 1552-1555.
- Berges C, Haberstock H, Fuchs D, Miltz M, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V, Naujokat C (2008). Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4(+) T cells. *Immunology* 124: 234-246.
- Berkers CR, Verdoes M, Lichtman E, Fiebiger E, Kessler BM, Anderson KC, Ploegh HL, Ovaas H, Galardy PJ (2005). Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nature meth* 2: 357-362.
- Bernardi R, Liebermann DA, Hoffmann B (2000). Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation. *Oncogene* 19: 2447-2454.
- Bhardwaj A and Aggarwal BB (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23: 317-332.
- Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, El-Deiry WS (1996). Proteasome-dependent regulation of p21^{WAF1/CIP1} expression. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 564-569.
- Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca LI, Carvajal-Vergara C, Mateos J, Vidriales B, Lopez-Holgado N, Maiso P, Alberca M, Villaron E, Schenkein D, Pandiella A, San Miguel J (2006). Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 107: 3575-3583.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27: 19-26.
- Bogyo M, Shin S, McMaster JS, Ploegh HL (1998). Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site directed affinity probes. *Chem Biol* 5: 307-320.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87-98.
- Boissonnas A, Bonduelle O, Lucas B, Debre P, Autran B, Combadiere B (2002). Differential requirement of caspases during naive T cell proliferation. *Eur J Immunol* 32: 3007-3015.
- Boatright KM., Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11: 529-541.
- Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179: 901-909.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.
- Bonifaz LC, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199: 815-824.
- Borissenko L and Groll M (2007). Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response. *Biol Chem* 388: 947-955.
- Borst J, Sluysers C, de Vries E, Klein H, Melief CJ, van Lier RA (1989). Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation. *Eur J Immunol* 19: 357-364.

- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998). Mitochondrial cytochrome *c* release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 17: 37-49.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286: 1735-1738.
- Bouloc A, Walker P, Grivel JC, Vogel JC, Katz SI (1999). Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA: a role for migratory dendritic cells. *Eur J Immunol* 29: 446-454.
- Bowerman B and Kurz T (2006). Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis. *Development* 133: 773-784.
- Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PC, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378: 416-419.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1: 221-226.
- Breckenridge DG and Xue D (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by Bcl-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 647-652.
- Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S (2000). Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem* 275: 21648-21652.
- Brenner D, Golks A, Kiefer F, Krammer PH, Arnold R (2005). Activation or suppression of NF κ B by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death. *EMBO J* 24: 4279-4290.
- Brenner D, Golks A, Kiefer F, Becker M, Muller W, Frey CR, Novak R, Melamed D, Kiefer F, Krammer PH, Arnold R (2007). Caspase-cleaved HPK1 induces CD95-L independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood* 110: 968-977
- Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 346: 155-161.
- Budd RC (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 109: 437-441.
- Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Maroni LA, Olson D, Tizard R, Gate R, Lo D (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373: 531-536.
- Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, Viola JP (2002). NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* 16: 1940-1942.
- Cao W, Lee SH, Lu J (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* 385: 85-93.
- Cascio P, Call M, Petre BM, Walz T, Goldberg AL (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J* 21: 2636-2645.
- Castellino F, Germain RN (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 24: 519-540.
- Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, and Slingerland JM (1997). Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein: Prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3: 227-230.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138: 1379-1394

- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. *J Exp Med* 180: 1263-1272.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J (1996). CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic-cell pathways in response to GM-CSF and TNF- α . *J Exp Med* 184: 695-706.
- Cavo M (2006). Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 20: 1341-1352.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, and Alber G (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184: 747-752.
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997a). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-787.
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997b). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9: 10-16.
- Cenciarelli C, Hou D, Hsu K-C, Rellahan BL, Wiest DL, Smith HT, Fried VA, Weissman AM (1992). Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science* 257: 795-797.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862.
- Cham CM, Gajewski TF (2005) Metabolic mechanisms of tumor resistance to T cell effector function. *Immunol Res* 31: 107-118.
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95- mediated apoptosis. *EMBO J* 21: 3704-3714.
- Chang YC, Lee YS, Tejima T, Tanaka K, Omura S, Heintz NH, Mitsui Y, Magae J (1998). mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Growth Differ* 9: 79-84.
- Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC (2001). Apaf-1/cytochrome *c*-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 276: 24453-24456.
- Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 278: 17593-17596.
- Chauhan D, Li G, Auclair D, Hideshima T, Podar K, Mitsiades N, Mitsiades C, Chen LB, Munshi N, Saxena S, Anderson KC (2004). 2-Methoxyestadiol and bortezomib/proteasome-inhibitor overcome dexamethasone-resistance in multiple myeloma cells by modulating heat shock protein-27. *Apoptosis* 9: 149-155.
- Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC (2005). Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 465-476.
- Chen F, Chang D, Goh M, Klivanov SA, Ljungman M (2000). Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Differ* 11: 239-246.
- Chen C, Lin H, Karanes C, Pettit GR, Chen BD (2000). Human THP-1 monocytic leukemic cells induced to undergo monocytic differentiation by bryostatins are refractory to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 60: 4377-4385.

- Chen LF and Greene WC (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 392-401.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS (2005): Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17: 393-403.
- Chen WJ and Lin JK (2004). Induction of G1 arrest and apoptosis in human Jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27Kip1, p21WAF1/Cip1, and Bax proteins. *J Biol Chem* 279: 13496-13505.
- Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM (2007). Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell* 26: 843-852.
- Chen ZJ, Hagler J, Palombella V, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets IκBα to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9: 1586-1597.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001). Bcl-2, Bcl-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8: 705-711.
- Chim CS, Ooi GC, Loong F, Au AW, Lie AK (2005). Side effects and good effects from new chemotherapeutic agents. Case 3. Bortezomib in primary refractory plasmacytoma. *J Clin Oncol* 23: 2426-2428.
- Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, Pizzolo G, Magidson J, Montagnoli A, Pagano M, Maes B, De Wolf-Peeters C, and Inghirami G (2000). Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 95: 619-626.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014.
- Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997). Suppression of tumor necrosis factor induced cell death by inhibitor of apoptosis cIAP2 is under NF-κB control. *PNAS* 94: 10057-10062.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP; Straus SE, Lenardo MJ (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419: 395-399.
- Chung CH and Baek SH (1999). Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 633-640.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 81: 1100-1105.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S; Hershko A (1980) Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7525-7528.
- Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *PNAS* 78: 761-765.
- Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A (1982). 'Covalent affinity' purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 257: 2537-2542.
- Ciechanover, A, Di Giuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM (1991). Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. *PNAS* 88: 139-143.
- Ciechanover A, Orian A, and Schwartz AL (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *BioEssays* 22: 442-451.

- Ciechanover A and Brundin P (2003). The UPS in neurodegenerative diseases. Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40: 427-446.
- Ciechanover A and Schwartz AL (2004). The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695: 3-17.
- Ciechanover A (2006). The ubiquitin proteolytic system: From a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurol* 66: S7-S19.
- Clark GJ, Gunningham S, Troy A, Vuckovic S, Hart DN (1999). Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells. *Immunology* 98: 189-196.
- Clem RJ, Sheu TT, Richter BW, He WW, Thornberry NA, Duckett CS and Hardwick JM (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem* 276: 7602-7608.
- Cohen JJ (1993). Apoptosis. *Immunol Today* 44: 126-129.
- Concannon CG, Koehler BF, Reimertz C, Murphy BM, Bonner C, Thurow N, Ward, Villunger A, Strasser A, Kögel D, Prehn JH (2007). Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: predominant role of the p53/PUMA pathway. *Oncogene* 26: 1681-1692.
- Corey EJ, Li WD (1999). Total synthesis and biological activity of lactacystin, omuralide and analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47: 1-10.
- Cory S and Adams JM (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656.
- Cranmer LD, Trevor KT, Hersh EM (2004). Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol. Immunother* 53: 275-306.
- Creagh EM, Murphy BM, Duriez PJ, Duckett CS, Martin SJ (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 279: 26906-26914.
- Croft M (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3: 609-620.
- Dahlmann B (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 8: S3.
- Das R, Ponnappan S, Ponnappan U (2007). Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic Biol Med* 42: 541-551.
- De Baey A, Lanzavecchia A (2000). The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* 191: 743-748.
- DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Ma CP, Afendis SJ, Swaffield JC, Slaughter CA (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide binding protein family. *J Biol Chem* 269: 20878-20884.
- Denault JB, Eckleman BP, Shin H, Pop C, Salvesen GS (2007). Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis proteases)-mediated inhibition of caspase 9. *Biochem J* 405: 11-19.
- DeRenzo C and Seydoux G (2004). A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends Cell Biol* 14: 420-426.
- Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW (2004). Granulocyte macrophage colonystimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem* 279: 26915-26921.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 388: 300-303.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula M, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17: 2215-2223.

Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252.

de Vries S (1986) The pathway of electron transfer in the dimeric QH₂: cytochrome *c* oxidoreductase. *J Bioenerg Biomembr* 18: 195-224.

Dewson G, Snowden RT, Almond JB, Dyer MJ, Cohen GM (2003). Conformational change and mitochondrial translocation of Bax accompany proteasome inhibitor-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemic cells. *Oncogene* 22: 2643-2654.

Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149: 3166-3173.

Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Krammer PH (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) *Nature* 373: 438-441.

Dick LR; Cruikshank AA; Grenier L; Melandri FD; Nunes SL, Stein RL (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 271: 7273-7276.

Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanović S, Schild H, Rammensee HG (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86: 253-262.

Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11: 957-972.

Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *PNAS* 99: 11796-11801.

Dietrich C, Bartsch T, Schanz F, Oesch F, Wieser RJ (1996). p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts. *PNAS* 93: 10815-10819.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-386.

Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM (1999). Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: A link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189: 1815-1822.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.

Dohrman A, Kataoka T, Cuenin S, Russell JQ, Tschopp J, Budd RC (2005). Cellular FLIP (long form) regulates CD8⁺ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation. *J Immunol* 174: 5270-5278.

Dolle RE, Hoyer D, Prasad CV, Schmidt SJ, Helaszek CT, Miller RE, Ator MA (1994). P1 aspartate-based peptide alpha-((2,6-dichlorobenzoyl)oxy)methyl ketones as potent time-dependent inhibitors of interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Med Chem* 37: 563-564.

Drexler HCA (1997). Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *PNAS* 94: 855-60.

- Drexler HCA, Risau W, Konecny MA (2000). Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 14: 65-77.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267: 22369-22377.
- Dubois B, Vanbervliet B, Fayette J, Massacrier C, Van Kooten C, Briere F, Banchereau J, Caux C (1997). Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 185: 941-951.
- Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J, Caux C (1998). Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* 161: 2223-2231.
- Dumont C, Durrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kroemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A (2000). Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* 96: 1030-1038.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6: 1081-1086.
- Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ, Gerl R, Kumar S and Vaux DL (2004). Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol* 165: 835-842.
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54: 1169-1174.
- Elkon KB (1999). Caspases: multifunctional proteases. *J Exp Med* 190: 1725-1728.
- Elofsson M, Splittgerber U, Myung J, Mohan R, Crews CR (1999). Towards subunit-specific proteasome inhibitors: synthesis and evaluation of peptide alphaP,betaP-epoxyketones. *Chem Biol* 6: 811-822.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.
- Erlacher M, Labi V, Manzl C, Böck G, Tzankov A, Häcker G, Michalak E, Strasser A, Villunger A (2006). Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med* 203: 2939-2951.
- Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 24: 6728-6741.
- Fairchild PJ and Waldmann H (2000). Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 12: 528-535.
- Falk M, Ussat S, Reiling N, Wesch D, Kabelitz D, Adam-Klages S (2004). Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* 173: 5077-5085.
- Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157: 541-548.
- Faries MB, Bedrosian I, Xu S, Koski G, Roros JG, Moise MA, Nguyen HQ, Engels FH, Cohen PA, Czerniecki BJ (2001). Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 98: 2489-2497.
- Fay J (1998). Dendritic cells in the treatment of cancer. *Baylor Univ Med Cent Proc* 11: 217-219.

- Fennell DA, Chacko A, Mutti L (2007). Bcl-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 27: 1189-1197.
- Fenteany G, Standaert RF, Reichard GA, Corey EJ, Schreiber SL (1994). A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3358-3362.
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, and Schreiber SL (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: 726-731.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5: 405-411.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *PNAS* 93: 7464-7469.
- Figueiredo-Pereira ME, Banik N, Wilk S (1994) A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem* 62:1989-1994.
- Finkielstein CV, Chen LG, Maller JL (2002). A role for G1/S cyclin-dependent protein kinases in the apoptotic response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 277: 38476-38485.
- Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37: 43-55.
- Fossum S (1988). Lymph-borne dendritic leucocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become interdigitating cells. *Scand J Immunol* 27: 97-105.
- Frasca L, Piazza C, Piccolella E (1998). CD4+ T cells orchestrate amplification and deletion of CD8+ T cells. *Crit Rev Immunol* 18: 569-594.
- Fribley A, Zeng Q, Wang CY (2004). Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 24: 9695-9704.
- Fruh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y (1994). Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J* 13: 3236-3244.
- Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 199: 1607-1618.
- Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins, *FEBS Lett* 349: 173- 180.
- Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N (2001). Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* 20: 5225-5231.
- Gaczynska M and Osmulski PA (2005). Small-molecule inhibitors of proteasome activity. *Methods Mol Biol* 301: 3-22.
- Garcia Fernandez M, Troiano L, Moretti L, Nasi M, Pinti M, Salvioli S, Dobrucki J, A. Cossarizza A (2002). Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ* 13: 449-455.
- Gartel AL and Tyner AL (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol cancer Ther* 1: 639-649.

- Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EEM, Trineri G, Caux C, Garrone C (2005). A type I interferon autocrine–paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201: 1435-1446.
- Gehen SC, Vitiello PF, Bambara RA, Kang PC, O'Reilly MA (2007). Downregulation of PCNA potentiates p21-mediated growth inhibition in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L716–L724.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585.
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999). Cleavage of automodified Poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274: 28379-28384.
- Gerosa FA, Gobbi PZ, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174: 727-734.
- Ghavami S, Kerkhoff C, Chazin WJ, Kadkhoda K, Xiao W, Zuse A, Hashemi M, Eshraghi M, Schulze-Osthoff K, Klonisch T, Los M (2008). S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. *Biochim Biophys Acta* 1783: 297-311.
- Ghittoni R, Napolitani G, Benati D, Olivieri C, Patrussi L, Laghi Pasini F, Lanzavecchia A, Baldari CT. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. *Eur J Immunol* 36: 2885-2893.
- Gianetto R and de Duve C (1955). Tissue fractionation studies 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. *Biochem. J.* 59: 433-438.
- Gilboa E (2007). DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 117: 1195-1203.
- Glas R, Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Ploegh H (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392: 618-622.
- Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, and Finley D (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94: 615-623.
- Glickman MH and Ciechanover A (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428.
- Golab J, Bauer TM, Daniel V, Naujokat C (2004). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in the diagnosis of human diseases. *Clin Chim Acta* 340: 27-40.
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005). C-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 14507-14513.
- Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN (2006). The c-FLIP NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF- κ B activation. *J Exp Med* 203: 1295–1305.
- Gomez-Bougie P, Bataille R, Amiot M (2005). Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-XL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. *Eur J Immunol* 35: 971-976.
- Goldstein G (1974). Isolation of bovine thymine, a polypeptide hormone of the thymus. *Nature* 247: 11–14.
- Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med.* 187: 97-104.

- Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381: 166-168.
- Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *PNAS* 94: 8970-8975.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997). Structure of 20S Proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* 386: 463-470.
- Groll M, Heinemeyer W, Jager S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *PNAS* 96: 10976-10983.
- Groll M, Bajorek M, Koehler A, Moroder L, Rubin D, Huber R, Glickman MH, Finley D (2000a). A gated channel into the core particle of the proteasome. *Nat Struct Biol* 7: 1062-1067.
- Groll M., Kim K.B., Kairies N., Huber R. and Crews C.M. (2000b). Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of alpha ',beta '-epoxyketone proteasome inhibitors. *J Am Chem Soc* 122: 1237-1238.
- Groll M and Huber R (2004). Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1695: 33-44.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (1999). Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome *c* release, while Bcl-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*: 274: 1156-1163.
- Guermonez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621-67
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *PNAS* 95: 258-263
- Guterman A and Glickman MH (2004). Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function). *Curr Protein Pept Sci* 5: 201-211.
- Haas AL and Siepmann TJ (1997). Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* 11: 1257-1268.
- Hackstein H, Taner T, Logar AJ, Thomson AW (2002). Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood* 100: 1084-1087.
- Hackstein H, Thomson AW (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4: 24-34.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T (2001). Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *PNAS* 98: 11318-11323.
- Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, Yamamoto H, Konishi M, Oki T (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo)* 45: 1746-1752.
- Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, Yeh WC, Ohashi P, Wang X, Mak TW (2005). Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome *c* reveals a differential requirement for cytochrome *c* and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121: 579-591.
- Hart D (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245-3287.
- Hassa, PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO (2001). The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-κB coactivator function. *J Biol Chem* 276: 45588-45597.

- Hayden MS and Ghosh S (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 18: 2195–2224.
- Heath WR and Carbone FR (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1: 126-134.
- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277: 432-438.
- Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272: 25200-25209.
- Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM (1997). In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* 158: 4381-4388.
- Henderson CJ, Aleo E, Fontanini A, Maestro R, Paroni G, Brancolini C (2005). Caspase activation and apoptosis in response to proteasome inhibitors. *Cell Death Differ* 12: 1240-1254.
- Hendriks J, Xiao Y, Borst J (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198: 1369–1380
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, and Scheffner M (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *PNAS* 98: 1218-1224.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose I A (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *PNAS* 77: 1783–1786.
- Hershko A, Ciechanover A, Rose IA (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem* 256: 1525-1528.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system: resolution, affinity purification and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258: 8206–8214.
- Hershko A and Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hicke L and Dunn R (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-172.
- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61: 3071-3076.
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P (2002). Activated T cell death in vivo mediated by pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bim. *Immunity* 16: 759-767.
- Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML (1997). Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90: 1920-1926.
- Hochstrasser M (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* 8: E153-E157.
- Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135-141.

- Horton TM, Gannavarapu A, Blaney SM, D'Argenio DZ, Plon SE, Berg SL (2006). Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia *in vitro*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 58: 13–23.
- Hough R, Pratt G, Rechsteiner, M (1986). Ubiquitin–lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 261: 2400–2408.
- Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta Tcell-receptor transgenic system. *PNAS* 89: 6065–6069.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996). TRADD, TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299–308.
- Hsu YT and Youle RJ (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 273: 10777–10783.
- Hu S and Yang X (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 278: 10055–10060.
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Núñez G (1999). Role of cytochrome *c* and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9-activation and apoptosis. *EMBO J* 18: 3586–3595.
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264: 961–965.
- Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* 275: 26661–26664.
- Huang DCS and Strasser A (2000). BH3-only proteins - essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839–842.
- Hughes CC and Pober JS (1996). Transcriptional regulation of the interleukin-2 gene in normal human peripheral blood T cells. Convergence of costimulatory signals and differences from transformed T cells. *J Biol Chem* 271: 5369–5377.
- Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8: 89–95.
- Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A (1999). The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29: 4092–4101.
- Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S, Kikuchi H (1995). Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1070–1077.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693–1702.
- Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guérin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J Exp Med* 178: 479–488.
- Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* 186: 665–672.
- Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular

- fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 188: 2163-2173.
- Iqbal M, Chatterjee S, Kauer JC, Mallamo JP, Messina PA, Reiboldt A, Siman R (1996). Potent α -ketocarbonyl and boronic ester derived inhibitors of proteasome. *Bioorg Med Chem Lett* 6:287-290.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243.
- Iverson SL and Orrenius S (2004). The cardiolipin-cytochrome *c* interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 423: 37-46.
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273: 9357-9360.
- Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R (1988). Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240: 1544-1546.
- Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and – independent apoptotic pathways.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27: 3135-3142.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213-1222.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.
- Jun JI, Chung CW, Lee HJ, Pyo JO, Lee KN, Kim NS, Kim YS, Yoo HS, Lee TH, Kim E, Jung YK (2005). Role of FLASH in caspase-8-mediated activation of NF-kappaB: dominant-negative function of FLASH mutant in NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 24: 688-696.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863-869
- Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K (2000). Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 477: 1-7.
- Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG (2005). Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 1: 223-232.
- Kane LP, Lin J, Weiss A (2002). It's all Rel-ative: NF- κ B and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol* 23: 413-420.
- Kapsenberg ML (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 12: 984-993.

- Karin M and Ben-Neriah Y (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621–663.
- Karin M and Lin A (2002). NF κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227.
- Karst AM and Li G (2007). BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma *Cell Mol Life Sci* 64: 318-330.
- Kataoka T and Tschopp J (2004). N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF- κ B signalling pathway. *Mol Cell Biol* 24: 2627-2636.
- Kato JY, Matsuoka M, Strom DK, Sherr CJ (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 14: 2713-2721.
- Kaufmann SH and Hengartner MO (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biol* 11/12: 526-534.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Kessler BM, Tortorella D, Altun M, Kisselev AF, Fiebiger E, Hekking BG, Ploegh HL, Overkleeft HS (2001). Extended-peptide based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of catalytic subunits, *Chem Biol* 8: 913-929.
- Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM, Ghilardi N, deSavage F, Cooper AM (2005). IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN- γ responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175: 788–795.
- Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC (2002). An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 22320–22329.
- Kim EY and Teh HS (2001). TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 167: 6812-6820.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJD, Cheng EHY (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by Bcl-2 subfamilies. *Nature cell biol* 8: 1348-1358.
- Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH (2000). TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165: 6293-6300.
- Kirkham PA, Lam EWF, Takamatsu HH, Parkhouse RME (1998). Transcription factor E2F controls the reversible cd T cell growth arrest mediated through WC1. *J Immunol* 161: 1630-1636.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276: 46639-46646.
- Kishi T, Ikeda A, Nagao R, Koyama N (2007). The SCFCdc4 ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of phosphorylated Rcn1, an inhibitor of calcineurin. *PNAS* 104: 17418-17423.
- Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15: 70-73.

- Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 4: 395-402.
- Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL (2006). Importance of different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281: 8582-8590.
- Köhler A, Bajorek M, Groll M, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D (2001). The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie* 83: 325-332.
- Kloetzel PM (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 179-187.
- Koepp DM, Harper WJ, Elledge SJ (1999). How the cyclin became a cyclin: Regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97: 431-434.
- Koguchi Y, Kohno J, Suzuki S, Nishio M, Takahashi K, Ohnuki T, Komatsubara S (1999). TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces* sp. TC 1084 and *Saccharothrix* sp. TC 1094. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 52: 1069-1076.
- Kohno J, Koguchi Y, Nishio M, Nakao K, Kuroda M, Shimizu R, Ohnuki T, Komatsubara S (2000). Structures of TMC-95A-D: novel proteasome inhibitors from *Apiospora montagnei* sacc. TC 1093. *J Org Chem* 65: 990-995.
- Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S. (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 9: 1965-1977.
- Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB (1993). Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol* 229: 14-19.
- Korink V, Backer N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787.
- Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA, Rice NR (2001). CD14⁺ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB. *Crit Rev Immunol* 21: 179-189.
- Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-975.
- Kraus M, Rückrich T, reich M, Gogel J, Beck A, Kammer W, Berkers CR, Burg D, Overkleef H, Ovaas H, Driessen C (2007). Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia* 21: 84-92.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163.
- Kroll M; Arenzana-Seisdedos F; Bachelier F; Thomas D; Friguet B; Conconi M (1999). The carboxy-terminus of I kappaB alpha determines susceptibility to degradation by the catalytic core of the proteasome. *Chem Biol* 6: 689-698.
- Kloetzel PM (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5: 661-669.
- Krüger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276: 20633-20640.
- Krüger E, Kuckelkorn U, Sijts A, Kloetzel PM (2003). The components of the proteasome and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148: 81-104.
- Krummel MF, Allison JP (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 182: 459-465.

- Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, Zhao M, Miyauchi M, Nikai H (2000). p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 916-23.
- Kuehn L, Dahlmann B (1996). Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an alpha,beta-heteromultimer. *FEBS Lett* 394: 183-186.
- Kuhn DJ and Dou QP (2005). The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front Biosci* 10: 1462-1474.
- Kurki P, Lotz M, Ogata K, Tan EMM (1987). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in activated human T lymphocytes. *J Immunol* 138: 4114-4120.
- Laan LA, van Haeringen A, Brouwer OF (1999). Angelman syndrome: a review of clinical and genetic aspects. *Clin Neurol Neurosurg* 101: 161-170.
- Lakhani S and Flavell RA (2003). Caspases and T lymphocytes: a flip of the coin? *Immunol Rev* 193: 22-30.
- Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer J, Layfield R (2000). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *PNAS* 97: 9902-9906.
- Lambert AJ und Brand MD (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)". *J Biol Chem* 279: 39414-39420.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-240.
- Lara PN Jr, Davies AM, Mack PC, Mortenson MM, Bold RJ, Gumerlock PH, Gandara DR (2004). Proteasome inhibition with PS-341 (bortezomib) in lung cancer therapy. *Semin Oncol* 31: 40-46.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2665-2672.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118: 265-267.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-258.
- Leist and Nicotera (1997). The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 1-9.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2: 183-192.
- Leon B, Martinez DH, Parrillas V, Vargas HH, Sanchez-Mateos P, Longo N, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2004). Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood* 103: 2668-2676.
- Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278: 18811-18816.
- Li B and Dou QP (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *PNAS* 97: 3850-3855.

- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99.
- Li M, Zhan X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX, Ge W, Yang J, Vladau C, Suzuki M, Chen D, Zhong R, Garcia B, Jevnikar AM, Min WP (2007). Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J Immunol* 178: 5480-5487.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang XD (1997). Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Li Q and Verma IM (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734.
- Li X, Yang Y, Ashwell JD (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416: 345-347.
- Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW (2007). Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell*. 26: 831-842.
- Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS. (1963). A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Phys* 76:199-213.
- Lin L, DeMartino GN, Greene WC (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92: 819-828.
- Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB (1989). Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244: 339-343.
- Ling YH, Liebes L, Zou Y and Perez-Soler R (2003). Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278: 33714-33723.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349-353.
- Liu FT, Agrawal SG, Gribben JG, Ye H, Du MQ, Newland AC, Jia L (2008). Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. *Blood* 111: 2797-2805.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184.
- Liu YC (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, and Pagano M (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3: 231-234.
- Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268: 533-539.
- Loor G, Zhang SJ, Zhang P, Toomey NL, Lee MY (1997). Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res* 25: 5041-5046.

- Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM (1997). p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 272: 12893-12896.
- Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K (2001). Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 22: 31-34.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lu L and Thomson AW (2002). Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 73: S19-S22.
- Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY (1995). Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an *in vitro* antigen-specific immune response. *J Immunol* 154: 5757-5768
- Ludewig B, Ehl S, Karrer U, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM (1998). Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity *J Virol* 72: 3812-3818.
- Luft T, Luetjens P, Hochrein H, Toy T, Masterman KA, Rizkalla M, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E (2002). IFN- α enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 14: 367-380.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.
- Luo H, Wu Y, Qi S, Wan X, Chen H, Wu J (2001). A proteasome inhibitor prevents mouse heart allograft rejection. *Transplantation* 72: 196-202.
- Luo Y, Hurwitz J, Massague J (1995). Cell cycle inhibition by independent CDK and PCNA domains in p21^{Cip1}. *Nature* 375: 159-161.
- Lynas JF, Harriott P, Healy A, McKervey MA, Walker B (1998). Inhibitors of the chymotrypsin-like activity of proteasome based on di- and tri-peptidyl α -keto aldehydes (glyoxals). *Bioorg Med Chem Lett* 8: 373-378.
- Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN (1992). Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267: 10515-10523.
- Ma A, Qi S, Xu D, Daloz P, Chen H (2005). Baohuside-1 inhibits activated T cell proliferation at G1-S phase transition. *Transpl Immunol* 15: 55-62.
- Macagno A, Gilliet M, Sallusto F, Lanzavecchia A, Nestle FO, Groettrup M (1999). Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur J Immunol* 29: 4037-4042.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wyszocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 154: 5071-5079.
- Machiels BM, Henfling MER, Gerards WLH, Broers JLV, Bloemendal H, Ramaekers FCS, Schutte B (1997). Detailed analysis of cell cycle kinetics upon proteasome inhibition. *Cytometry* 28: 243-252.
- Macian F (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
- Maki CG, Huijbrechtse M, Howley PM (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 56: 2649-2654.
- Mani A, Gelmann EP (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23: 4776-4789.

- Mann C and Hilt W (2000). The ubiquitin-proteasome system in cell cycle control. In: Hilt W and Wolf DH, editors. *Proteasomes: The world of regulatory proteolysis*. Georgetown, Texas: Landes Bioscience: 264-301.
- Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184: 1953-1962.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-16212.
- Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM (2007a). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J* 26: 923-934.
- Marchenko ND and Moll UM (2007b). The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle* 6: 1718-1723.
- Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Kroemer G (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol*. 27: 289-296.
- Marsden VS, Ekert PG, Van Delft M, Vaux DL, Adams JM and Strasser A (2004). Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome *c* release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* 165: 775-780.
- Martinou JC and Green DR (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev Mol Cell Biol*: 63-67.
- Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277: 439-444.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Rémy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187: 1261-1271.
- Masdehors P, Merle-Beral H, Maloum K, Omura S, Magdelenat H, and Delic J (2000). Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* 96: 269-274.
- Masuda E, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N (1998). Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal* 10: 599-611.
- Mattingly LH, Gault RA, Murphy WJ (2007). Use of systemic proteasome inhibition as an immunomodulating agent in disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7: 29-34.
- Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E, Germann T (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* 23: 2202-2208.
- Matzinger P (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305
- Mazumder S, Gong B, Chen Q, Drazba JA, Buchsbaum JC, Almasan A (2002). Proteolytic cleavage of cyclin E leads to inactivation of associated kinase activity and amplification of apoptosis in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 22: 2398-2409.
- Mc Cormack T, Baumeister W, Grenier L, Moomaw C, Plamondon L, Pramanik B, Slaughter C, Soucy F, Stein R, Zühl F, Dick L (1997). Active site-directed inhibitors of *Rhodococcus* 20 S proteasome. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* 272: 26103-26109.
- McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DNJ (1996). Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol* 26: 1204-1210.
- McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG (1994). Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 179: 1331-1336

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway, CA (1998). MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2: 253-258.
- Meister A, Anderson ME (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *PNAS* 96: 10403-10408.
- Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G, Lutz MB (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195: 15-21.
- Mescher MF (1995). Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Rev* 146: 177-210.
- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277: 45162-45171.
- Micheau O and Tschopp J (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell* 114: 181-190.
- Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ, Schumann RR (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of dendritic cell maturation and require TLR2. *J Biol Chem*. 276: 25680-25686.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-590.
- Mills DM and Cambier JC (2003). B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4⁺ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin Immunol* 15: 325-329.
- Misra RS, Jelley-Gibbs DM, Russell JQ, Huston G, Swain SL, Budd RC (2005). Effector CD4⁺ T cells generate intermediate caspase activity and cleavage of caspase-8 substrates. *J Immunol* 174: 3999-4009.
- Miossec C, Duilleul V, Fassy F, Diu-Hercend A (1997). Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272: 13459-13462.
- Modiano JF, Domenico J, Szepesi A, Lucas JJ, Gelfand EW (1994). Differential requirements for interleukin-2 distinguish the expression and activity of the cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk2 in human T cells. *J Biol Chem* 269: 32972-32978.
- Mogk A, Schmidt R, Bukau B (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* 17: 165-172.
- Moingeon P, Chang H-C, Wallner BP, Stebbins C, Frey AZ, Reinherz EL (1989). CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 339: 312-314.
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13: 1181-1189.
- Montagut C, Rovira A, Albanell J (2006). The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol* 8: 313-317.
- Morelli AE and Thomson AW (2000). Role of dendritic cells in the immune response against allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 607-613.
- Morelli AE and Thomson AW (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 610-621.

- Mosmann TR, Coffman RL (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-341.
- Mukhopadhyay D and Riezman H (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 315: 201-205.
- Mullins DW, Sheasley SL, Ream RM, Bullock TN, Fu YX, Engelhard VH (2001). Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determine the pattern of regional tumor control. *J Exp Med* 198: 1023-1034
- Murata S, Kawahara H, Tohma S, Yamamoto K, Kasahara M, Nabeshima Y, Tanaka K, Chiba T (1999). Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem* 274: 38211-38215.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi, C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273: 2926-2930.
- Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54: 3131-3135.
- Miyashita T and Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 80: 293-299
- Nakano K and Vousden KH (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7: 683-694.
- Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K (2000). Proteasome inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol* 65: 221-236.
- Naujokat C and Hoffmann S (2002). Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82: 965-980.
- Naujokat C, Daniel V, Bauer TM, Sadeghi M, Opelz G (2003). Cell cycle- and activation-dependent regulation of cyclosporin A-induced T cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 347-354.
- Naujokat C, Berges C, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V (2007). Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation* 83: 485-497.
- Naujokat C and Sarić T (2007). Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells. *Stem Cells* 10: 2408-2418.
- Navon A and Goldberg AL (2001). Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell* 8: 1339-1349.
- Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K Jr, Boise LH, Chiao PJ, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ (2005). Bortezomib inhibits PKRlike endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65: 11510-11519.
- Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor b and g chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 369: 333-336.

- Nencioni A, Hua F, Dillon CP, Yokoo R, Scheiermann C, Cardone MH, Barbieri E, Rocco I, Garuti A, Wesselborg S, Belka C, Brossart P, Patrone F, Ballestrero A (2005). Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood* 105: 3255-3262.
- Nencioni A, Schwarzenberg K, Brauer KM, Schmidt SM, Ballestrero A, Grünebach F, Brossart P (2006a). Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood* 108: 551-558.
- Nencioni A, Garuti A, Schwarzenberg K, Cirmena G, Dal Bello G, Rocco I, Barbieri E, Brossart P, Patrone F, Ballestrero A (2006b). Proteasome inhibitor-induced apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 36: 681-689.
- Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Maurer A, Brocker E, Serfling E, Kampgen E (2000). Differential expression of Rel/NF- κ B and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95: 277-285.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279.
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17: 1475-1486.
- Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS (2005). The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther* 4: 443-449.
- Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB (1996). CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* 157: 636-642.
- Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27: 280-288.
- Norbury CC (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443-451.
- Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372: 570-573.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17: 384-395.
- O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, MacGregor-Cortelli B, Stubblefield M, Straus D, Portlock C, Hamlin P, Choi E, Dumetrescu O, Esseltine D, Trehu E, Adams J, Schenkein D, Zelenetz AD (2005). Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23: 676-684.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267: 10709-10715.
- Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159: 3838-3848.
- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378: 88-91.

- Omura S, Matsuzaki K, Fujimoto T, Kosuge K, Furuya T, Fujita S, Nakagawa A (1991). Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* 44: 117-118.
- O'Neill HC (2006). Dendritic cell therapy for tolerance induction to stem cell transplants. *Curr Stem Cell Res Ther* 1: 121-125.
- Opelz G and Henderson R (1993). Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 342: 1514-1516.
- Opelz G and Döhler B (2004). Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*. 4: 222-230.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715-725.
- O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman G, Print C, Bath ML, Huang DCS, Strasser A (2000) The Proapoptotic BH3-Only Protein Bim Is Expressed in Hematopoietic, Epithelial, Neuronal, and Germ Cells *Am J Pathol* 157: 449-461.
- Orlowski M (1990). The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29: 10289-10297.
- Orlowski M, Cardozo C, Michaud C (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex: properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32: 1563-1572.
- Orlowski RZ (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Diff* 6: 303-313.
- Orlowski M and Wilk S (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 383: 1-16.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 143-183.
- Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hämmerling GJ (1991). Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353: 662-664.
- Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF- κ B subunits. *Immunity* 16: 257-270.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685.
- Palmer JT, Rasnick D, Klaus JL, Bromme D (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* 38: 3193-3196.
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa-B1 precursor protein and the activation of NF-kappa-B. *Cell* 78: 773-785.
- Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux F, Wolf RE, Huang J, Brand S, Elliott P, Lazarus D, McCormack T, Parent L, Stein R, Adams J, Grisham MB (1998). Role of the proteasome and NF- κ B in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *PNAS* 95: 15671-15176.

- Pamer E and Cresswell P (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16: 323-358.
- Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu SM, Pagliaro L, Kim J, Adams J, Elliott P, Esseltine D, Petrusich A, Dieringer P, Perez C, Logothetis CJ (2004). Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 22: 2108-2121.
- Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donze O, Barja F, Martinou JC (2006). Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 26: 7397-7408.
- Pei XY, Dai Y, Grant S (2003). The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia* 17: 2036-2045.
- Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D (2006). The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 107: 257-264.
- Perez D and White E (2003). E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha by downregulating c-FLIP_s. *J Virol* 77: 2651-2662.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22: 929-979.
- Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* 269: 7709-7718.
- Petroski MD and Deshaies RJ (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 9-20.
- Pickart CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533.
- Pickart CM and Cohen RE (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 177-187.
- Pickart CM and Eddins MJ (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695: 55-72.
- Piva R, Cancelli I, Cavalla P, Bortolotto S, Dominguez J, Draetta GF, and Schiffer D (1999). Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 691-696.
- Platzer B, Jörgl A, Taschner S, Höcher B, Strobl H (2004). RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood* 104: 655-663.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, and Roberts JM (1997). Expression of cell cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone or in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3: 222-225.
- Posmantur R, Wang KKW, Gilbertsen RB. 1998. Caspase-3-like activity is necessary for IL-2 release in activated Jurkat cells. *Exp Cell Res* 244: 302-309.
- Prechtel AT, Steinkasserer A (2007a). CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 299: 59-69.
- Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Steinkasserer A (2007b). CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* 178: 5454-5464.

- Princiotta MF, Schubert U, Chen W, Bennink JR, Myunk J, Crews CM, Yewdell JW (2001). Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival. *PNAS* 98: 513-518.
- Pugh, CW, MacPherson GG, Steer HW (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 157: 1758-1779.
- Pulendran B, Smith JL, Jenkins M, Schoenborn M, Maraskovsky E, Maliszewski CR (1998). Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* 188: 2075-2082.
- Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T (2000). Proteasome inhibitors induce cytochrome *c*-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 20: 259-265.
- Qureshi N, Vogel SN, Van Way C, 3rd, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC (2005). The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunol Res* 31: 243-260.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282: 480-483.
- Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5: 617-628.
- Rao A, Luo C, Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747.
- Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K (1999). Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *PNAS* 96: 7797-7802.
- Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M (1994). Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269: 20727-20732.
- Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V (2000). The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345: 1-15.
- Reed SI (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 855-864.
- Reinstein E and Ciechanover A (2006). Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med* 145: 676-684.
- Reis e Sousa (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483.
- Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 20: 200-203.
- Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, Kindler V, Tschopp J, Ricciardi-Castagnoli P (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 192: 1661-1668.
- Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160: 65-75.
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D., Orlowski R.Z., Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC (2003). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348: 2609-2617.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001a). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800.

- Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS, Bode W (2001b). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *PNAS* 98: 14790-14795.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal MR, Liu YJ (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1183-1186.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771.
- Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 80: 1-70.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196: 137-151.
- Rosenberg AS and Singer A (1992). Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol* 10: 333-358.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16: 6914-6925.
- Rubartelli AA, Poggi MR, Zocchi (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha(v)\beta3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol*. 27: 1893-1900.
- Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, Nelson DL. (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*. *J. Immunol* 135: 3172-3177.
- Sadowska AM, Verbraecken J, Darquennes K, De Backer WA (2006). Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(4):425-34.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 179: 1109-1118.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-2769.
- Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, Berry DM, Tamblyn L, Shehabeldin A, Migon E, Wakeham A, Bouchard D, Yeh WC, McGlade JC, Ohashi PS, Hakem R (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17: 883-895.
- Salvesen GS and Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 401-410.
- San Miguel J, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Glasmacher A, Jagannath S, Lonaial S, Orlowski RZ, Sonneveld P, Ludwig H (2006). A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *Oncologist* 11: 51-61.

- San-Miguel JF, Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh JD, Neuwirth R, Boral AL, Esseltine DL, Anderson KC (2008). Efficacy and safety of bortezomib in patients with renal impairment: results from the APEX phase 3 study. *E pub.*
- Sarkar K, Kruhlak MJ, Erlandsen SL, Shaw S (2005). Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 116: 513-524.
- Savill JS, Fadok V, Henson P Haslett JE (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis *Immunology Today* 14: 131-136.
- Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272: 26953-26958.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17: 1675-1687.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 1541-1548.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.
- Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familetti PC, Gately MK, Gubler U (1992). Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 148: 3433-3440.
- Schoenheimer R (1942). *The Dynamic State of Body Constitutents*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JE (2002). Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* 168: 2599-2602.
- Schuh K, Twardzik T, Kneitz B, Heyer J, Schimpl A, Serfling E (1998). The interleukin 2 receptor G chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 188: 1369-1373.
- Schuler G, Romani N, Steinman RM (1985). A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol* 85: 99s-106s
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15: 138-147.
- Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, and Reis e Sousa C (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells *in vivo* requires a microbial priming signal. *Immunity* 13: 453-462.
- Schwartz AL and Ciechanover A (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* 50: 57-74.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas DS, Groth B (1992). The presence of interleukin 4 during *in vitro* priming determines the lymphokine producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176: 1091-1098.
- Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE (1994). CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon γ production. *J Exp Med* 179: 299-304.
- Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268: 579-582.
- Sehra S, Patel D, Kusam S, Wang ZY, Chang CH, Dent AL (2005). A role for caspases in controlling IL-4 expression in T cells. *J Immunol* 174: 3440-3446.

Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A, Chuvpilo S, Klein-Hessling S, Jha MK, Kondo E, Pagel P, Schulze-Luehrmann J, Palmethofer A (2004). NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1166-1170.

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, and Clurman BE (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 5: 403-410.

Sherwood SW; Kung AL; Roitelman J; Simoni RD; Schimke RT (1993). In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetylleucylleucylnorleucinal. *PNAS* 90: 3353-3357.

Shimizu SA, Konishi T, Kodama, Tsujimoto Y (2000a). BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-2 family members closes VDAC, and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *PNAS* 97: 3100-3105.

Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y (2000b). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19: 4309-4318.

Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, Toné S, Ito H, Kawashima S (1996). Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J* 317: 385-388.

Shipman-Appasamy P, Cohen KS, Prystowsky MB (1990). Interleukin 2-induced expression of proliferating cell nuclear antigen is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 265: 19180-19184.

Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M (1999). Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 274: 13886-13893.

Shivakumar CV, Brown DR, Deb S, Deb SP (1995). Wild-type human p53 transactivates the human Gadd45-mediated negative growth control. *J Cell Biol* 15: 6785-6793.

Shurin MR, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, Hunter O, Brumfield A, Storkus WJ, Maraskovsky E, Lotze MT (1997). FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol* 179: 174-184.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-455.

Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398: 77-80.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281-292.

Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277: 1405-1418.

Spits H (2002). Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2: 760-772.

Sprent J, Kishimoto H (2002). The thymus and negative selection. *Immunol Rev* 185: 126-135.

Springs SL, Diavolitsis VM, Goodhouse J, McLendon GL (2002). The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J Biol Chem*. 277: 45715-45718.

Spry CJF, Pflug AJ, Janossy G.,Humphrey JH (1980). Large mononuclear (veiled) cells with "Ia-like" membrane antigens in human afferent lymph. *Clin Exp Immunol* 39: 750-755.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1: 949-957.

- Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 36152-36157.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee, R.A., Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410: 112-116.
- Srinivasula SM, Tupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2003). Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/Htra2. *J Biol Chem* 34: 31469-31472.
- Stack JH and Newport JW (1997). Developmentally regulated activation of apoptosis early in *Xenopus* gastrulation results in cyclin A degradation during interphase of the cell cycle. *Development* 124: 3185-3195.
- Steinman RM and Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 137: 1142-1162.
- Steinman RM (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- Steinman RM and Nussenzweig MC (2002). Avoiding horror autotoxicus—the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* 99: 351-358.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.
- Stelter P and Ulrich HD (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425: 188-191.
- Stewart T, Tsai SC, Grayson H, Henderson R, Opelz G (1995). Incidence of de-novo breast cancer in women chronically immunosuppressed after organ transplantation. *Lancet* 346: 796-798.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245.
- Strasser A (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 189-200.
- Strehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 188: 211-216.
- Strobl H and Knapp W (1999). TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1: 1283-1290.
- Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, Salmena L, Hakem R, Straus S, Lenardo M (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307: 1465-1468.
- Sugawara K; Hatori M; Nishiyama Y; Tomita K; Kamei K; Konishi M; Oki T (1990). Eponemycin, a new antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity. *J Antibiot* 43: 8-18.
- Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, Mac Farlane M, Cohen GM (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor- of-apoptosis protein. *J Biol Chem* 277: 11345-11351.
- Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy, Liu MJ, Barao I, Riordan W, Sitcheran R, Wysocki C, Serody JS, Blazar BR, Sayers TJ, Murphy WJ (2004). Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *PNAS* 101: 8120-8125.

- Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M (1996). In vivo anergized CD4⁺ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. *PNAS* 93: 979-984.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- Sutterlüty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelbauer C, Senften N, Müller U, and Krek W (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1: 207-214.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R (2001a). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *PNAS* 98: 8662-8667.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC and Takahashi R (2001b). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* 276: 27058-27063.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001c). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-621.
- Tacke PJ, de Vries JM, Torensma R, Figdor CG (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 10: 790-802.
- Takayama T, Kaneko K, Morelli AE, Li W, Tahara H, Thomson AW. (2002). Retroviral delivery of transforming growth factor- β to myeloid dendritic cells: inhibition of T-cell priming ability and influence on allograft survival. *Transplantation* 74: 112-119.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451.
- Tan MC, Mommaas AM, Drijfhout JW, Jordens R, Onderwater JJ, Verwoerd D, Mulder AA, van der Heiden AN, Scheidegger D, Oomen LC, Ottenhoff TH, Tulp A, Neefjes JJ, Koning F (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 27: 2426-2435.
- Tan TT, Degenhardt K, Nelson DA, Beaudoin B, Nieves-Neira W, Bouillet P, Villunger A, Adams JM, White E (2005). Key roles of Bim-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell* 7: 227-238.
- Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon- γ and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275: 14336-14345.
- Tanaka K, Suzuki T, Chiba T, Shimura H, Hattori N, and Mizuno Y (2001). Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* 79: 482-494.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR (1995). Yama/CPP32-beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
- Thome M and Tschopp J (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1: 50-58.
- Thomson AW and Lu L (1999). Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation. *Transplantation* 68: 1-8.
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
- Thornberry NA and Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.

- Tokumoto T (1999). Nature and role of proteasomes in maturation of fish oocytes. *Int Rev Cytol* 186: 261-294.
- Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajero A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 281: 8600-8006.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305.
- Trinchieri G and Scott P (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol. Today* 10: 460-463.
- Trinchieri G (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146.
- Tripodi D, Lyons S, Davies D (1971). Separation of peripheral leukocytes by Ficoll density gradient centrifugation. *Transplantation* 11: 487-488.
- Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299: 1400-1403.
- Tsujimoto Y and Shimizu S (2000).VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7: 1174-1181.
- Tu L, Fang TC, Artis D, Shestova O, Pross SE, Maillard I, Pear WS (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202: 1037-1042.
- Tuominen EK, Wallace CJ, Kinnunen PK (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* 277: 8822-8826.
- Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191: 421-427.
- Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD, Kluck RM (2005). Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome *c* but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem*. 280: 2266-2274.
- Ustrell V, Pratt G, Rechsteiner M (1995). Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *PNAS* 92: 584-588.
- Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J*. 21:3516-3525.
- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12: 71-81.
- van Loo G, van Gorp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9: 20-26.
- Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D; Ashkenazi A (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280: 40599-40608.
- Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJA, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM, Vucic D (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 131: 669-681.

- Vaux DL and Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.
- Vaux DL and Silke J (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 499–504.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenaebroeck P (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med* 187: 1477-1485.
- Verdoes M, Florea BI, Menendez-Benito V, Maynard CJ, Witte MD, van der Linden WA, van der Nieuwendijk AMCH, Hofmann T, Berkers CR, van Leeuwen FW, Groothuis TA, Leeuwenburgh MA, Ovaa H, Neeffjes JJ, Filipov DV, Van der Marel GA, Dantuma NP, Overkleeft HS (2006). A Fluorescent Broad-Spectrum Proteasome Inhibitor for Labeling Proteasomes In Vitro and In Vivo. *Chem Biol* 13: 1217-1226.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.
- Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277: 445-454.
- Verhoef LG, Lindsten K, Masucci MG, Dantuma NP (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* 11: 2689–2700.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723–2735.
- Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298: 611-615.
- Verma R, Oania R, Graumann J, Deshaies RJ (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118: 99-110.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, C Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 184: 39-51.
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P (2000). Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 164: 4507-4512.
- Vik SB, Georgevich GI, Capaldi RA (1981). Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome *c* oxidase. *PNAS* 78: 1456–1460.
- Villagrasa V, Cortijo J, Marti-Cabrera M, Ortiz JL, Berto L, Esteras A, Bruseghini L, Morcillo EJ (1997). Inhibitory effects of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Pharm Pharmacol* 49: 525–529.
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa. *Science* 302: 1036-1038.
- Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. *Cell* 131: 682-693.
- Vodanovic-Jankovic S, Hari P, Jacobs P, Komorowski R, Drobyski WR (2006). NF-kappaB as a target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. *Blood* 107: 827-834.

- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068
- Voorhees PM and Orlowski RZ (2006). The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:189-213.
- Vousden and Lu (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
- Waga S, Hannon G, Beach D, Stillman B (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578.
- Waldmann TA (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol today* 14: 264-270.
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55: 5187-5190.
- Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183: 2541-2550.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683.
- Wang EW, Kessler BM, Borodovsky A, Cravatt CF, Bogoy M, Ploegh HL, Glas R (2000). Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity, *PNAS* 97: 9990-9995.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Millman CL, Korsmeyer SJ (1996). Bid: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10: 2859-2869.
- Wang X, Luo H, Chen H, Duguid W, Wu J (1998). Role of proteasomes in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 160: 788-801.
- Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, Smith CA, Goodwin RG (1991). Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *J Immunol* 147: 4229-4238.
- Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, Schmitt E, Schild H, Radsak MP (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 108: 544-550.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436: 1181-1185.
- Waxman L, Fagan J, Goldberg AL (1987). Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 262: 2451-2457.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes Bak to release cytochrome *c*. *Genes Dev* 14: 2060-2071.
- Weinberg AD, Vella AT, Croft M (1998). OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol* 10: 471-480.
- Wilhelm S, Wagner H, Häcker G (1998). Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 891-900.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7529-7532.
- Wilk S and Figueiredo-Pereira ME (1993). Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Prot:*47: 306-313.

- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM (1965). Syndrome of coloboma with multiple congenital abnormalities in infancy. *Dev Med Child Neurol* 7:681-688.
- Williams ME, Chang TL, Burke SK, Lichtman AH, Abbas AK (1991). Activation of functionally distinct subsets of CD4+ T lymphocytes. *Res Immunol* 142: 23-28.
- Willis SN, Adams JM (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17: 617-625.
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19: 1294-305.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315: 856-859.
- Wolf DH and Hilt W (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695: 19-31.
- Wolf RE and Brelsford WG (1988). Soluble interleukin-2 receptors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31: 729-735.
- Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146: 3074-3081.
- Woltman AM, Schlagwein N, van der Kooij SW, van Kooten C (2004). The novel cyclophilin-binding drug sanglifehrin A specifically affects antigen uptake receptor expression and endocytic capacity of human dendritic cells. *J Immunol* 172: 6482-6489.
- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008-1012.
- Wu W, Misra RS, Russell JQ, Flavell RA, Rincon M, Budd RC (2006). Proteolytic regulation of nuclear factor of activated T (NFAT) c2 cells and NFAT activity by caspase-3. *J Biol Chem* 281: 10682-10690.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xie Y and Varshavsky A (2000). Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *PNAS* 97: 2497-2502.
- Xiong Y., Zhang D, Beach D. (1992). D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71: 505-514.
- Xiong Y., Zhang D, Beach D. (1993). Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 7: 1572-1583.
- Yamaguchi A, Makimoto K, Goi T, Takeuchi K, Maehara M, Ise Y, Nakagawara G (1994). Overexpression of p53 protein and proliferative activity in colorectal adenoma. *Oncology* 51: 224-227.
- Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM (1999). Induction of interferon gamma production in Th1 CD4 T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol* 29: 548-555.
- Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17: 1487-1496.
- Yang QH and Du C (2004). Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem* 279: 15963-16970.

- Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288: 874–877.
- Yao T and Cohen RE (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419: 403–407.
- Yew PR (2001). Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *J Cell Physiol* 187: 1–10.
- Yewdell JW and Bennink JR (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13: 13–18.
- Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sada K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25: 3618–3626.
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747–1756.
- Yoshimura T, Kameyama K, Takagi T, Ikai A, Tokunaga F, Koide T, Tanahashi N, Tamura T, Cejka S, Baumeister W, Tanaka K, Ichihara A (1993). Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111: 200–211.
- Youle RJ and Karbowski M (2005) Mitochondrial fission in apoptosis *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 657–663.
- Youle RJ (2007). Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* 315: 776–777.
- Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Kwon BS (1999). A Newly Identified Member of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TR6) Suppresses LIGHT-mediated Apoptosis. *J Biol Chem* 274: 13733–13736.
- Yu J, Tiwari S, Steiner P, Zhang L (2003). Differential apoptotic response to the proteasome inhibitor Bortezomib [VELCADE, PS-341] in Bax-deficient and p21-deficient colon cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2: 694–699.
- Yu C, Rahmani M, Conrad D, Subler M, Dent P, Grant S (2003). The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 102: 3765–3774.
- Zamoyska R and Lovatt M (2004). Signalling in T-lymphocyte development: integration of signalling pathways is the key. *Curr Opin Immunol* 16: 191–196.
- Zamzami N and Kroemer G (2003). Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization – the (w)hole story? *Curr Biol* 13: R71–R73.
- Zhang J, Bardos T, Li D, Vermes C, Xu J, Mikecz K, Finnegan A, Lipkowitz S, Glant TT (2002). Cutting edge: regulation of T cell activation threshold by CD28 costimulation through targeting Cbl- β for ubiquitination. *J Immunol* 169: 2236–2240.
- Zhang Z and Zhang R (2008). Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J* 27: 852–864
- Zhou LJ and Tedder TF (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154: 3821–3835.
- Zhou X, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park, WR, Abe R, Hamaoka T, Naramura M, Gu H, Fujiwara H (2002). Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol* 168: 3847–3854.

Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ, Fang B (2005). Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 24: 4993-4999.

Zhu Y, Swanson BJ, Wang M, Hildeman DA, Schaefer BC, Liu X, Suzuki H, Mihara K, Kappler J, Marrack P (2004). Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *PNAS* 101: 7681-7686.

Zollner TM, Podda M, Pien C, Elliot PJ, Kaufmann R, Bohncke WH (2002). Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *J Clin Invest* 109: 671-679.

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson C. B. (2001) BH3-only proteins that bind prosurvival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15: 1481-1486.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999). An APAF1 cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556.

Publikationsverzeichnis

Originalveröffentlichungen:

Berges C, Naujokat C, Tinapp S, Wieczorek H, Höh A, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 896-907.

Berges C, Naujokat C, Höh A, Wieczorek H, Fuchs D, Ovens J, Miltz M, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V (2007). Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 120: 120-132.

Naujokat C, Berges C, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V (2007). Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation* 83: 485-497.

Fuchs D, Berges C, Opelz G, Daniel V, Naujokat C (2008). Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J Cell Biochem* 103: 270-283.

Berges C, Haberstock H, Miltz M, Fuchs D, Sadeghi M, Opelz G, Daniel V, Naujokat C (2008). Proteasome inhibition suppresses basic immune functions of human CD4⁺ T cells. *Immunology* 124: 234-246.

Berges C, Haberstock H, Miltz M, Opelz G, Daniel V, Naujokat C (2008). Activation of the intrinsic pathway of apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib in alloreactive human CD4⁺ T cells. *Blood*, Manuskript in Vorbereitung.

Übersichtsartikel:

Naujokat C, Fuchs D, Berges C (2007). Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1389-1397.

Poster:

Berges C, Naujokat C, Dominik Fuchs D, Opelz G, Volker Daniel V (2005). Suppressive effects of the polyclonal antithymocyte immunoglobulin preparation Thymoglobulin® on human dendritic cell subsets. 9th Basic science symposium of the Transplantation Society, La Baule, Frankreich.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AICD	Engl.: <i>Activation induced cell death</i>
AIF	Engl.: <i>Apoptosis-inducing factor</i>
AMC	7-Amino-4-methylkumarin
ANT	Engl.: Adenin-Nukleotid-Transporter
APC	Allophycocyanin
APF1	Engl.: <i>ATP-dependent proteolysis factor-1</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
Bak	Engl.: <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	Engl.: <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	Engl.: <i>B cell lymphoma-2 gene</i>
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	Engl.: <i>BH3-interacting-domain death agonist</i>
Bik	Engl.: <i>Bcl-2 interacting killer</i>
Bim	Engl.: <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
bioALVS	Ada-Lys(biotinyl)-(Ahx) ₃ -(Leu) ₃ -vinyl sulphon
Boc-LLR	t-butoxycarbonyl -Leu-Arg-Arg
Bor	Bortezomib
BSA	Rinderserumalbumin (engl. Bovine serum albumine)
CAD	Caspase-aktivierte Deoxyribonuklease
CARD	Caspase Rekrutierungs Domäne
CCR	CC-Chemokine-Rezeptor
CD40L	CD 40-Ligand
Cdc	Engl.: <i>cell division cycle</i>
c-FLIP	Engl.: <i>cellular FLICE-inhibitory protein</i>
CKI	Engl. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CP	Engl.: <i>core particle</i>
CpG	Cytosin-phosphate Guanine
CTL	Cytotoxische T-Zelle
Da	Dalton

DCs	Engl.: <i>dendritic cells</i>
DD	Engl.: <i>death domain</i>
DED	Engl.: <i>death effector domain</i>
DIABLO	Engl.: <i>direct IAP binding protein with a low pI</i>
DISC	Engl.: <i>death inducing signalling complex</i>
DN	Doppel-Negativ
DNA	Engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>
DP	Doppel-Positiv
DTT	Dithiothreitol
ECL	Engl.: <i>enhanced chemoluminescence</i>
ELISA	Engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMEA	Engl.: <i>European Medicines Agency</i>
EPM	Epoxomicin
Fa	Firma
FADD	Engl.: <i>Fas-associated death domain-containing protein</i>
FDS	Engl.: <i>Federal drug administration</i>
FCS	Engl.: <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC/SSC	Engl.: <i>forward scatter, sideward scatter</i>
GLP	Gemeinsame lymphoide Progenitorzellen
GM-CSF	Engl.: <i>granulocytemacrophage colony stimulating factor</i>
GMP	Gemeinsame myeloide Progenitorzellen
GVHD	Engl.: <i>graft versus host disease</i>
h	Engl.: <i>hour/hours</i> (Stunde/Stunden)
HBSS	Engl.: <i>Hanks balanced salt solution</i>
HECT	Engl.: <i>homologous to E6-associated protein C terminus</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRP	Engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
HtrA2	Engl.: <i>high temperature requirement A2</i>
IAP	Engl.: <i>inhibitor of apoptosis protein</i>
iDC	immature/unreife DC
IDC	Interstitielle DC
IL	Interleukin

IFN- γ	Interferon-gamma
KM	Kulturmedium
L	Ligand
LC	Lactacystin
LCs	Engl.: <i>Langerhans cells</i>
LMP	Engl.: <i>low molecular weight protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
mAk	monoklonale Antikörper
MAPK	Mitogen-assoziierte Protein Kinase
Mcl-1	Engl.: <i>myeloid-cell leukaemia sequence 1</i>
mDC	mature/reife DC
MECL	Engl.: <i>multicatalytic endopeptidase complex like-1</i>
MFI	Engl.: <i>mean fluorescence intensity</i>
MHC-I	Engl.: <i>Major Histocompatibility complex class I molecule</i>
MHC-II	Engl.: <i>Major Histocompatibility complex class II molecule</i>
MM	Multipl. Myelom
MOMP	Engl.: <i>mitochondrial outer membran permeabilization</i>
MM	Multipl. Myelom
MMR	Makrophagen-Mannose Rezeptor
MoDC	Monozytäre DC
Ms	Maus
MTP	Mitochondriales Transmembran Potential
NAC	N-Acetylcystein
NF κ B	Engl.: <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells</i>
NIK	Engl.: <i>NFκB inducing kinase</i>
NK	Natürliche Killerzellen
PA28	Proteasom Aktivator 28 kDa
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase-1
PBMC	Engl.: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PDC	Plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PGE	Prostglandin E

PI	Propidiumiodid
PRR	Engl.: <i>pattern recognition receptor</i>
PTP	Engl.: <i>permeability transition pore</i>
PUMA	Engl.: <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWM	<i>pokeweed</i> -Mitogen
R	Rezeptor
RING	Engl.: <i>really interesting new gene</i>
RIP	Engl.: <i>receptor-interacting-protein</i>
RIPA	Engl. <i>radio immunoprecipitation assay</i>
ROS	Engl.: <i>reactive oxygen species</i>
Rot	Rotenon
RP	Engl.: <i>regulatory particle</i>
Rpn	Engl.: <i>regulatory particle non-ATPase</i>
Rpt	Engl.: <i>regulatory particle triple-A protein</i>
S	Svedberg
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Engl.: <i>standard error of mean</i>
Smac	Engl.: <i>second mitochondria activator of caspases</i>
TGF	Engl.: <i>transforming growth factor</i>
TLR	Engl.: <i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF	Engl.: <i>TNF-α-receptor-associated factor</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
Ub	Ubiquitin
UE	Untereinheit
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VDAC	Engl.: <i>voltage-dependent anion channel</i>
XIAP	Engl.: <i>X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Opelz, der mir durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes ermöglichte, diese Arbeit in der Abteilung für Transplantations-Immunologie durchzuführen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Günther J. Hämmerling für die Begutachtung dieser Arbeit und die freundliche Vertretung vor der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Volker Daniel möchte ich an dieser Stelle für die Begutachtung dieser Arbeit, die Möglichkeit der Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die freundliche Unterstützung danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Cord Naujokat für die äußerst interessante Themenstellung, die sehr guten Arbeitsbedingungen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Durch sein immerwährendes Interesse, seine ständige Gesprächsbereitschaft, seine überaus hilfreichen Ideen und durch die mir gewährten wissenschaftlichen Freiheiten hat er sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen/innen in der Abteilung Transplantations-Immunologie, zu denen Dominik Fuchs, Andreas Heinold, Jörg Ovens, Alexandra Höh, Sarah Tinapp und Christian Kleist zählen, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ohne ihre Hilfsbereitschaft und den Gedankenaustausch mit ihnen wären Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn cand. med. Heinrich Haberstock. Dessen freundschaftliche Zusammenarbeit trug entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Sein Tatendrang und seine Motivation wirkten immer ansteckend.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors „Zelluläre Immunologie“ für die einmalige Arbeitsatmosphäre bedanken. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich besonders bei Marion Miltz, Martina Kutsche-Bauer, Regina Seemuth, Gaby Schmeckenbecher und Simone Karcher für die grosse und freundliche Unterstützung.

Frau Carmen Klebert und Frau Heike Martins möchte ich für die Einbestellung der Blutspender und die Durchführung der Blutabnahmen danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Ohne ihre immerwährende Unterstützung und ihr stets vorhandenes Verständnis wäre vieles nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Bina, die mich durch alle Hochs und Tiefs begleitet hat und die mir immer stützend zur Seite stand.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde

Heidelberg, der 8. Juli 2008

.....

Carsten Berges