

Regulation von CD45-alternativem Spleißen durch U2AF26 und Gfi1: Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Geographie
der Universität Duisburg-Essen
vorgelegt von

Florian Heyd

aus Berlin

Dezember 2005

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot
3. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 06. April 2006

Meiner geliebten Theresa

Inhalt

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 RNA-Spleißen: Mechanismus und Regulation	2
2.2 Der Spleißfaktor U2AF26	5
2.3 Signalkaskaden während der T-Zell-Aktivierung	6
2.4 CD45: Funktion, Struktur und Regulation	10
2.5 Der Transkriptionsfaktor Gfi1	16
2.6 Zielsetzung der Arbeit	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Identifizierung neuer Gfi1-Interaktionspartner durch Hefe-Interaktionsklonierung	19
3.2 Gfi1 interagiert mit U2AF26	20
3.3 Gfi1 und U2AF26 liegen colokalisiert im Zellkern vor	22
3.4 Bestimmung der Interaktionsdomänen in Gfi1 und U2AF26	24
3.5 U2AF26 bewirkt den Ausschluss von Exon B aus der CD45-mRNA	26
3.6 Der siRNA-vermittelte U2AF26 „knock-down“ bewirkt die Bildung der CD45RB-Isoform	29
3.7 U2AF26 bindet an die ESS-Sequenz von CD45-Exon 4	30
3.8 Erstellung U2AF26-transgener Mäuse	32
3.9 U2AF26-transgene Mäuse zeigen verstärkte CD45R0-Expression	34
3.10 U2AF26-transgene Tiere zeigen einen schweren Defekt in der T-Zell-Aktivierung	36
3.11 Gfi1 inhibiert die Exon-Exklusion durch U2AF26, aber U2AF26 reguliert die Aktivität von Gfi1 nicht	38
3.12 Gfi1 Δ 140-257 hat keinen Effekt auf die U2AF26-Aktivität, wirkt aber als transkriptioneller Repressor	40
3.13 Gfi1-defiziente Mäuse exprimieren vermehrt CD45R0	42
3.14 Gfi1-defiziente Mäuse zeigen CD45-Spleißdefekte in zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen	43
3.15 Gfi1 ^{-/-} -T-Zellen zeigen einen Proliferationsdefekt und Fehler in der TCR-Signalkaskade nach α -CD3-Stimulation	45
3.16 Die Expression von Gfi1 und U2AF26 wird während der T-Zell-Aktivierung mit unterschiedlicher Kinetik reguliert	46

4 Diskussion	48
4.1 CD45-alternatives Spleißen und Regulation durch U2AF26 und Gfi1	48
4.2 Die Gfi1-U2AF26-Interaktion und die Interaktionsdomänen	49
4.3 U2AF26 und U2AF35 in CD45-Exon-Exklusion und ESS-Bindung	52
4.4 Gfi1 als Antagonist von U2AF26 im CD45-alternativen Spleißen	55
4.5 <i>In vivo</i> -Modelle zur Analyse vom CD45-alternativen Spleißen: Gfi1-defiziente und U2AF26-transgene Mäuse	56
4.6 Unterschiedliche Aktivitäten verschiedener CD45-Isoformen	59
4.7 Weiterführende Arbeiten	61
5 Material und Methoden	62
5.1 Zellkultur	62
5.2 Manipulation von DNA, Herstellung von Plasmiden	62
5.3 Minigen-Versuche und RT-PCR	64
5.4 Quantifizierung von PCR-Produkten, Southernblot	65
5.5 siRNA-Transfektion	66
5.6 Herstellung transgener Mäuse	67
5.7 RNA-Interaktions-Experimente	67
5.8 Hefe-Interaktionsklonierung (Yeast Two-Hybrid-Screen)	69
5.9 Transiente Transfektion für Immunfluoreszenz oder Reporter-genversuche	70
5.10 Westernblot und Immunopräzipitation	70
5.11 Herstellung und Reinigung von Proteinen	72
5.12 T-Zell-Aktivierung und ZAP-70-Phosphorylierung	73
5.13 Durchflusszytometrie (FACS)	75
6 Literatur	76
7 Anhang	89
7.1 Häufig verwendete Abkürzungen	89
7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen	91
7.3 Danksagung	92
7.4 Lebenslauf	93
7.5 Ehrenwörtliche Erklärung	94

1 Zusammenfassung

Die Transmembrantyrösosphatase CD45 spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion durch den T-Zell-Rezeptor (TCR). Die CD45-Aktivität wird während der T-Zell-Aktivierung durch die Exklusion der alternativ gespleißten Exons 4, 5 und 6 gesteuert. Eine Fehlregulation dieses „activation induced alternative splicing“ genannten Prozesses trägt möglicherweise zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen bei. Die genauen Mechanismen, die zur Exklusion der alternativ gespleißten Exons führen, liegen bislang ebenso wie die Identität der beteiligten Spleißfaktoren weitgehend im Dunkeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Spleißfaktor U2AF26 die Exklusion alternativ gespleißter CD45-Exons *in vitro* und *in vivo* bewirkt. RNA-Interaktions-Studien lassen eine Bindung von U2AF26 an regulatorische Sequenzen dieser Exons vermuten, was eine Erklärung für den beobachteten Effekt darstellen könnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die U2AF26-Expression während der T-Zell-Aktivierung stark ansteigt, was auf eine Funktion von U2AF26 in aktivierten T-Zellen *in vivo* hindeutet.

Reguliert wird die Aktivität von U2AF26 durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Gfi1. Durch eine direkte Interaktion der beiden Proteine war Gfi1 in der Lage, den U2AF26-vermittelten Ausschluss der alternativ gespleißten CD45-Exons teilweise aufzuheben. Da Gfi1 in Abwesenheit von U2AF26 keinen Einfluss auf das CD45-alternative Spleißen hatte, scheint Gfi1 spezifisch alternative Spleißprozesse zu regulieren, an denen U2AF26 beteiligt ist.

Eine antagonistische Rolle von Gfi1 und U2AF26 im CD45-alternativen Spleißen konnte auch in zwei unabhängigen Mausmutanten demonstriert werden: Gfi1-defiziente und U2AF26-transgene Mäuse zeigen den gleichen Defekt im CD45-alternativen Spleißen, und zwar einen Verlust aller größeren sowie eine erhöhte Expression der kleinsten Isoform (CD45R0). In beiden Mausmutanten wurde ein schwerer Defekt in der TCR-Signalkaskade festgestellt, vermutlich ausgelöst durch eine verminderte CD45-Aktivität. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass die in Gfi1-defizienten und U2AF26-transgenen Mäusen überexprimierte CD45R0-Isoform eine geringere Aktivität als die größeren CD45-Isoformen aufweist.

Durch die hier vorgestellten Experimente konnte eine neue Funktion von Gfi1 und U2AF26 in der Regulation des CD45-alternativen Spleißens etabliert werden und es wurde gezeigt, dass eine Manipulation des Gfi1:U2AF26-Verhältnisses *in vivo* zu einem Defekt in der CD45-Isoform-Expression und damit in der T-Zell-Aktivierung führt.

2 Einleitung

2.1 RNA-Spleißen: Mechanismus und Regulation

Die Sequenzierung der Genome verschiedener Spezies hat es ermöglicht, die Gesamtzahl der Gene der jeweiligen Organismen abzuschätzen. Demnach besitzt *D. melanogaster* 14000, *C. elegans* 19000, und der Mensch um 30000 Gene (Rubin et al., 2000; Venter et al., 2001). Die erstaunlich kleine Differenz zwischen Wurm und Mensch und die kleinere Zahl von Genen in Fliegen im Vergleich zu Würmern legt nahe, dass die Anzahl der Gene alleine nicht die Komplexität eines Organismus erklären kann (Maniatis und Tasic, 2002). Eine mögliche Erklärung liegt im alternativen Spleißen von prä-mRNA, also der Variation des Primärtranskripts, so dass aus einem Gen verschiedene reife mRNAs gebildet werden können.

In eukaryotischen Organismen enthalten die Primärtranskripte der meisten Gene nichtkodierende Bereiche (Introns), die vor der Translation entfernt werden müssen, um zu funktionellen Proteinen zu führen. Das Entfernen (Spleißen) der Introns, deren Länge und Anzahl pro Gen sehr variabel ist, wird durch einen Multi-Protein-RNA-Komplex, das Spleißosom, katalysiert. Die Komplexität des Proteoms kann durch diesen Mechanismus immens gesteigert werden, was dazu führt, dass die tatsächliche Zahl der Proteine die der proteinkodierenden Gene bei weitem übersteigt.

Beispielsweise kann die prä-mRNA des Drosophila-Gens *dscam* auf bis zu 38016 verschiedene Arten gespleißt werden, so dass aus einem einzigen Gen mehr Proteine entstehen können, als das gesamte Genom Gene enthält (Übersicht in Black, 2000; Graveley, 2002). Die

komplexen Regulationsmechanismen, die einen

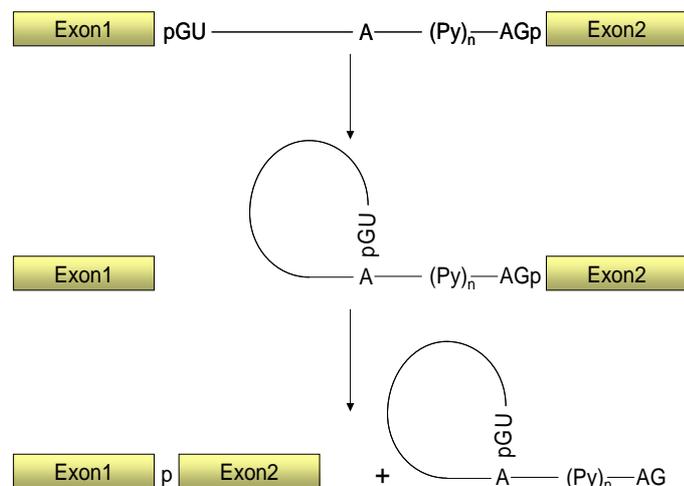


Abbildung 1: Strukturmerkmale eukaryotischer prä-mRNA und schematische Darstellung des Spleiß-Mechanismus.

korrekten Ablauf des alternativen Spleißens ermöglichen, sind Gegenstand aktueller Forschung, unter anderem im Hinblick auf eine Fehlregulation des zelltypspezifischen alternativen Spleißens in verschiedenen Tumoren (Venables, 2004).

Verschiedene cis-wirkende Elemente innerhalb der prä-mRNA sind für den Spleißvorgang essentiell (Abb. 1): Die 5'-Spleiß-Stelle (ss) ist durch ein GU-Dinukleotid gekennzeichnet, die 3'-ss durch ein AG-Dinukleotid (eine zweite Gruppe von Spleiß-Stellen, 5'-AU und 3'-AC kommt im Vergleich nur selten vor, Nilsen, 1996). Zur Konsensussequenz gehören außerdem ein Polypyrimidintrakt (15-25 Pyrimidin-Basen) vor der 3'-ss sowie ein Adenosin als sogenannter Verzweigungspunkt. Die Spleißreaktion verläuft in zwei Schritten: Zunächst bildet sich eine Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe der 5'-ss und der 2'-OH-Gruppe des Verzweigungspunktes, dann erfolgt die Ligation der beiden Exons und die Freisetzung des Introns in „Lasso-Form“ (Abb. 1). Die Katalyse erfolgt durch das Spleißosom, einem Komplex aus 5 „small nuclear ribonucleoproteins“ (snRNP) und einer Vielzahl weiterer Proteine, die räumlich und zeitlich geordnet an die prä-mRNA binden müssen, um ein korrektes Spleißen zu gewährleisten. Die Reaktion erfordert eine Reihe von teilweise ATP-abhängigen Umgruppierungen des Spleißosoms und durchläuft mehrere definierte Stadien vor der eigentlichen Reaktion (Übersicht in Black, 2003). Im ersten Schritt, der Bildung des E-Komplexes (*early*), binden die beiden Komponenten des heterodimeren „U2 auxiliary factor“ (U2AF), U2AF35 und U2AF65, an das 3'-AG bzw. den Polypyrimidintrakt. Zusätzlich wird der Verzweigungspunkt durch das SF1-Protein (*splice factor 1*) gebunden, und U1 snRNP bindet an das 5'-GU. Im nächsten Schritt, der Bildung des A-Komplexes, wird SF1 von der RNA gelöst, und das U2AF-Heterodimer rekrutiert U2 snRNP zu dem Verzweigungspunkt, so dass die Enden des Introns durch gebundene snRNPs definiert werden (Ruskin et al., 1988), wobei die Interaktion zwischen den snRNPs und der prä-mRNA durch direkte Basenpaarung der jeweiligen snRNAs und der prä-mRNA vermittelt wird. Die dann folgende Bildung des B-Komplexes ist durch die Bindung von drei weiteren snRNPs und das Ablösen der beiden U2AF-Untereinheiten von der prä-mRNA gekennzeichnet. Durch Umarrangieren der gebundenen snRNPs bildet sich schließlich der katalytisch aktive C-Komplex. Bei

den meisten alternativen Spleißvorgängen wird schon die Bildung des E-Komplexes reguliert, es wird also vor der ersten katalysierten Reaktion festgelegt, ob ein Exon in der reifen mRNA enthalten sein wird oder nicht (Übersicht in Black, 2003). Eine Regulation erst nach dem ersten katalytischen Schritt wurde aber ebenfalls beschrieben (Lallena et al., 2002).

Abhängig von der Übereinstimmung des Polypyrimidintrakts und der 3'-ss mit der Konsensussequenz lassen sich verschiedene Klassen von Exons definieren. Wenn ein konservierter Polypyrimidintrakt vorhanden ist, kann U2AF65 an diesen binden und U2 snRNP rekrutieren, ohne dass U2AF35 benötigt wird (AG-unabhängige Exons).

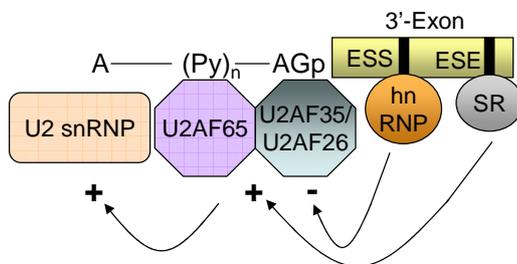


Abbildung 2: Regulation der Bildung des A-Komplexes durch das U2AF-Heterodimer sowie ESS- und ESE-Sequenzen. Abkürzungen siehe Text.

Wenn der Polypyrimidintrakt nicht stark genug ausgeprägt ist, kann U2AF35 das 3'-AG binden und durch eine Wechselwirkung mit U2AF65 die Bindung von U2 snRNP ermöglichen (AG-abhängige Exons) (Wu et al., 1999). Einige Exons benötigen zusätzlich zu den intronischen Elementen exonische Sequenzen

(*exonic splicing enhancer*, ESE), um in die reife mRNA integriert zu werden. ESEs werden von SR-Proteinen gebunden (eine Familie RNA-bindender Proteine, die sich durch das Vorhandensein einer serin- und argininreichen Domäne im C-terminalen Bereich auszeichnet), und SR-Proteine können dann die Bindung von U2AF35 an die 3'-ss stabilisieren (Enhancer-abhängiges Spleißen) (Graveley et al., 2001). Die entgegengesetzte Wirkung haben „*exonic splicing silencers*“ (ESS). Diese Elemente können von heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP) gebunden werden, welche dann den Aufbau des Spleißosoms behindern und einen Ausschluss des Exons aus der mRNA bewirken (Caputi et al., 1999) (Abb. 2).

Das Vorhandensein von ESS- und ESE-Elementen in alternativ gespleißten Exons ermöglicht eine genaue Kontrolle über die zelltypspezifische sowie entwicklungs- und aktivierungsabhängige Expression verschiedener Spleißformen eines Proteins (Übersicht in Lynch, 2004). Beispielsweise sind ESS-Sequenzen in den alternativ gespleißten Exons der prä-mRNA der Proteintyrosinphosphatase CD45

verantwortlich für die Expression verschiedener CD45-Isoformen während der T-Zell-Aktivierung (Rothrock et al., 2003).

2.2 Der Spleißfaktor U2AF26

U2AF26 (Abb. 3) wurde kürzlich als ein Homolog von U2AF35 beschrieben. Die murinen Proteine zeigen innerhalb der ersten 187 Aminosäuren eine Sequenzhomologie von 87 %, während die C-terminalen Bereiche einen deutlichen

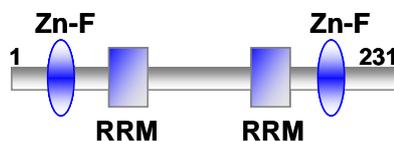


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von murinem U2AF26. Zn-F: Zinkfingerdomäne, RRM: RNA recognition motif

Unterschied aufweisen (Shepard et al., 2002).

Interessanterweise befindet sich am C-terminalen Ende von U2AF35 eine RS-reiche Domäne, die in U2AF26 teilweise fehlt. Die Länge der RS-reichen Domäne konnte in direkten Zusammenhang mit der Aktivität einiger Spleißfaktoren gebracht werden

(Graveley et al., 1998), was einen funktionellen Unterschied zwischen U2AF26 und U2AF35 vermuten lässt. Da jedoch U2AF26 ebenso wie U2AF35 ein Heterodimer mit U2AF65 bilden kann und U2AF26 eine vergleichbare Aktivität wie U2AF35 in konstitutivem und Enhancer-abhängigem Spleißen aufweist, scheint die RS-reiche Domäne für diese Funktionen nicht essentiell zu sein (Guth et al., 2001; Shepard et al., 2002).

U2AF26 und U2AF35 werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Die im Verhältnis höchste Expression von U2AF26 wurde im Gehirn nachgewiesen, die geringste in der Leber und der Milz (Shepard et al., 2002). Die differentielle Expression der beiden Proteine lässt Spekulationen über unterschiedliche Funktionen zu; deutliche Unterschiede konnten bisher aber nicht gezeigt werden.

2.3 Signalkaskaden während der T-Zell-Aktivierung

T-Zellen sind ein Teil der erworbenen, antigenspezifischen Immunantwort. Sie tragen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCRs), deren Vielfalt durch somatische Rekombination entsteht und die spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. Erkennt eine T-Zelle das entsprechende Antigen in Kombination mit einem MHC-Molekül, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die spezifisch zur Proliferation und Differenzierung der antigenspezifischen T-Zelle führt. Die Aktivierung des TCR kann außerdem zur Neuausrichtung des sekretorischen Apparats in Richtung des aktivierenden Stimulus und zur Ausübung der Effektorfunktionen, wie z.B. der Zytokinfreisetzung, führen. Da der TCR keine intrinsische Enzymaktivität aufweist, führt die Signalkaskade zunächst über Tyrosinphosphorylierungen und die Bindung von Adapterproteinen und mündet dann in der differentiellen Expression einer Vielzahl von Genen, die je nach Zelltyp bestimmte Programme aktivieren (Übersicht in Mustelin und Tasken, 2003).

Der TCR besteht aus einer α - und einer β -Kette (bzw. einer γ - und einer δ -Kette), die die Antigenbindungsstelle bilden und durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Dazu kommen assoziierte TCR ζ -Ketten und der CD3-Komplex, bestehend aus mehreren γ -, δ - und ϵ -Ketten, deren Funktion die Signaltransduktion ist. Jede CD3-Untereinheit enthält ein „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) von der Struktur YXX(L/V) X_{6-9} YXX(L/V), die ζ -Kette enthält drei solcher Motive. Für die Aktivierung im physiologischen Umfeld wird außerdem ein Corezeptor, entweder CD4 oder CD8, benötigt. Die Aggregation des TCR und der Corezeptoren durch die Bindung an den entsprechenden Antigen-MHC-Komplex führt zu einer lokalen Konzentration von TCR ζ -Ketten und dem CD3-Komplex sowie Kinasen der Src-Homologie-Familie (Lck und Fyn), die über einen N-terminalen Lipidanker mit der Membran verbunden und mit den zytoplasmatischen Domänen der Corezeptoren assoziiert sind (Abb. 4). Eine Trans-Autophosphorylierung benachbarter Lck-Proteine führt zu deren Aktivierung und ermöglicht die Lck-vermittelte Phosphorylierung der ITAMs. Diese bilden dann Bindestellen für Proteine mit SH2-Domänen, die wiederum phosphoryliert werden können (zur detaillierten Regulation der Lck-Aktivität: siehe Abb. 6; Übersicht in Qian und Weiss, 1997; van Leeuwen

und Samelson, 1999). Eine wichtige Rolle spielt hier die Kinase ZAP-70 aus der Syk-Familie, die über zwei SH2-Domänen an phosphorylierte ITAMs binden kann und dann durch Lck phosphoryliert und damit aktiviert wird (Chan et al., 1995). Die Aktivität von ZAP-70 wird durch verschiedene Tyrosinphosphorylierungen kontrolliert, die entweder stimulierend (Y315, Y319, Y493) oder inhibierend (Y292) wirken. Die essentielle Rolle von ZAP-70 in der TCR-Signaltransduktion wurde

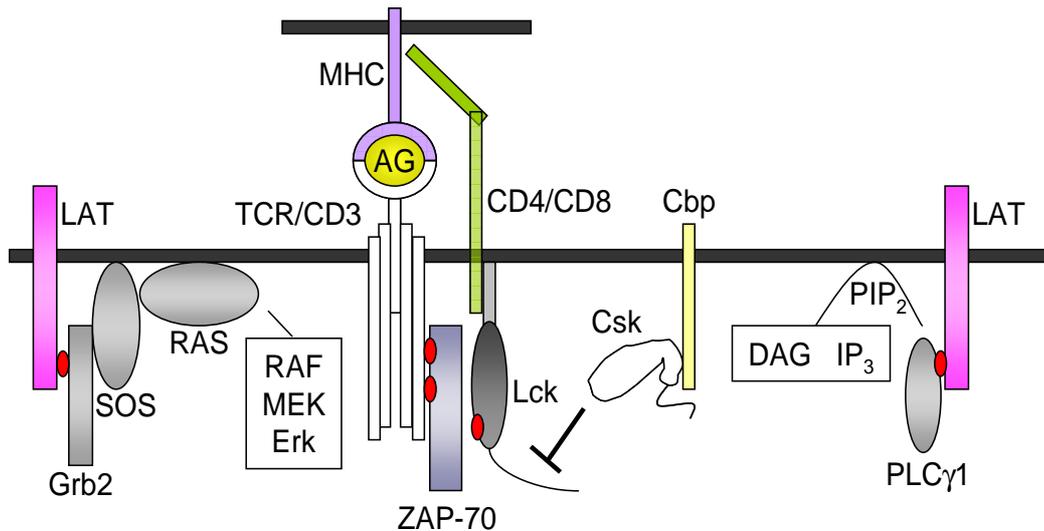


Abbildung 4: Signaltransduktion durch den TCR. Dargestellt sind einige der frühen Schritte nach der Aktivierung der TCR-Signalkaskade. Die Aggregation des TCR/CD3-Komplexes und der Corezeptoren CD4/CD8 durch MHC-gebundenes Antigen führt zur Tyrosinphosphorylierung (rote Kugeln) von ITAMs durch Lck. Phosphorylierte ITAMs dienen als Bindestelle für Adapterproteine mit SH2-Domäne wie ZAP-70, die dann durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden können und ihrerseits weitere Zielproteine wie LAT aktivieren. Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führt u.a. zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-AT. Details und Abkürzungen siehe Text. Modifiziert nach Mustelin und Tasken, 2003.

durch das Vorkommen von Mutationen im ZAP-70-Gen von SCID-Patienten (*severe combined immunodeficiency*) (Chan et al., 1994) sowie durch die Erstellung ZAP-70-defizienter Mäuse bestätigt (Negishi et al., 1995). ZAP-70 kann weitere Proteine binden und phosphorylieren, u.a. das Transmembranprotein LAT (*linker for activation of T-cells*) und das zyttoplasmatische SLP-76 (*SH2-domain-containing leucocyte protein of 76 kD*) (Zhang et al., 1998). LAT rekrutiert u.a. PhospholipaseC- γ 1 (PLC γ 1) zur Membran, wo das durch Phosphorylierung aktivierte Enzym Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) spaltet. Diese Botenstoffe stimulieren Signalkaskaden, die in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT (*nuclear factor of activated T-*

cells) und NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) münden. Ebenfalls über LAT und das Adapterprotein Grb2 wird die Aktivität des Guaninnukleotid-Austauschfaktors SOS erhöht, was die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 über die Signalkaskade Ras, Raf, Erk bewirkt (Zhang et al., 1998). Ein anderer Signalweg ist die Bindung des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Vav durch aktiviertes SLP-76, was durch Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie unter anderem zur Umordnung des Zytoskeletts führt (Bubeck-Wardenburg et al., 1998). Eine schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung ist in Abbildung 4 gezeigt.

Neben den bereits erwähnten Kinasen der Src- und der Syk-Familie spielen Kinasen der Csk- und der Tec-Familie eine Rolle in der Signaltransduktion durch den TCR. Die Kinase Itk (*inducible T-cell kinase*) der Tec-Familie ist an der Regulation der PLC γ 1-Aktivierung beteiligt (Perez-Villar und Kanner, 1999). Itk beinhaltet eine PIP₃-bindende Pleckstrin-Homologie-Domäne, über die eine Assoziation mit der Membran, dem Ort der PLC γ 1-Aktivierung, erfolgt. Die Bildung von PIP₃ während der T-Zell-Aktivierung wird ebenfalls reguliert; es entsteht durch Phosphorylierung von PIP₂ durch PI-3-Kinasen, die über LAT zur Membran rekrutiert werden (August et al., 1997).

Im Gegensatz zu den Src-, Syc- und Tec-Kinasen, die alle eine aktivierende Funktion ausüben, wirken die Kinasen der Csk-Familie inhibitorisch auf die T-Zell-Aktivierung, indem sie Kinasen der Src-Familie inaktivieren. Lck kann an zwei regulatorischen Tyrosinresten phosphoryliert werden: Die Phosphorylierung von Tyrosin-394 bewirkt eine Aktivierung der Kinaseaktivität durch eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum (Hardwick und Sefton, 1995), während die Phosphorylierung von Tyrosin-505 die Bildung einer inaktiven Konformation hervorruft (Liu et al., 1993). Diese inhibitorische Phosphorylierung wird durch Csk katalysiert (Nada et al., 1991). Csk ist im Gegensatz zu Kinasen der Src-Familie nicht über einen Lipidanker an die Membran gebunden, sondern wird über das Transmembranprotein Cbp (*Csk-binding protein*) zur Plasmamembran rekrutiert (Brdicka et al., 2000). Der Cbp-Csk-Komplex ist ebenso wie Lck in definierten Membrandomänen (GEM für *glycosphingolipid-enriched microdomains*) konzentriert, wo Csk eine Inhibierung von Lck bewirkt. Erst nach der Aktivierung

des TCR wird Csk aus diesen Membrandomänen ausgeschlossen und ermöglicht so eine transiente Aktivierung von Lck (Brdicka et al., 2000).

Die durch CD45 katalysierte Dephosphorylierung von Lck wird ausführlich im Kapitel „CD45: Funktion, Struktur und Regulation“ behandelt.

Neben der Csk-Kinase gibt es zwei weitere Klassen von Proteinen, die (gemeinsam) eine inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung haben: inhibierende Rezeptoren und Proteintyrosinphosphatasen. Ein Beispiel für einen inhibierenden Rezeptor ist das CTLA-4-Protein (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), das auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und mit CD28 um die Bindung von B7-Rezeptoren konkurriert. Während die CD28-B7-Bindung ein costimulatorisches Signal bewirkt, induziert die Bindung von B7 an CTLA-4 die Aktivierung von Proteintyrosinphosphatasen, die zu einer Inhibierung der T-Zell-Antwort beitragen (Marengere et al., 1996). Die wichtige Rolle dieses Mechanismus konnte durch eine Korrelation von Mutationen im CTLA-4-Lokus und dem erhöhten Auftreten von Autoimmunerkrankungen bestätigt werden (Ueda et al., 2003). Analog zu den ITAMs des CD3-Komplexes haben inhibierende Rezeptoren ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) mit der Sequenz (I/V)XYXXL. Diese können durch Lck phosphoryliert werden und dienen dann zur Rekrutierung von Phosphatasen mit SH2-Domäne (z.B. SHP1/2), die die aktivierten Komponenten der TCR-Signalkaskade, z.B. ZAP-70, dephosphorylieren (Brockdorff et al., 1999).

Eine Reihe weiterer Phosphatasen ist an der Signaltransduktion durch den TCR beteiligt. Da das Forschungsinteresse lange Zeit hauptsächlich Kinasen galt und Phosphatasen währenddessen vernachlässigt wurden, ist die Regulation der T-Zell-Aktivierung durch Phosphatasen aber weniger gut verstanden. Im folgenden Abschnitt wird die für die T-Zell-Aktivierung essentielle Phosphatase CD45 beschrieben.

2.4 CD45: Funktion, Struktur und Regulation

Die Transmembrantyrrosinphosphatase CD45 (auch LCA für *leucocyte common antigen*) wird auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist eines der häufigsten Zelloberflächenproteine. In T- und B-Zellen kann CD45 bis zu 10 % der Zelloberfläche bedecken. Homologe von CD45 wurden in diversen Säugern sowie in Hühnern, Haien und Kugelfischen identifiziert. CD45 ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer N-terminalen extrazellulären Domäne, deren Größe durch alternatives Spleißen variiert werden kann, einer Transmembrandomäne, sowie einem C-terminalen, zytoplasmatischen Teil, der zwei Phosphatasedomänen enthält, von denen aber nur eine katalytisch aktiv ist (Abb. 5). Je nach Isoform beträgt die molekulare Masse von CD45 zwischen 180 kD und 240 kD. Die N-terminale, extrazelluläre Domäne trägt N- und O-gebundene Zuckerketten, die je nach Zelltyp variieren und möglicherweise eine regulatorische Funktion haben. Obwohl CD45 in

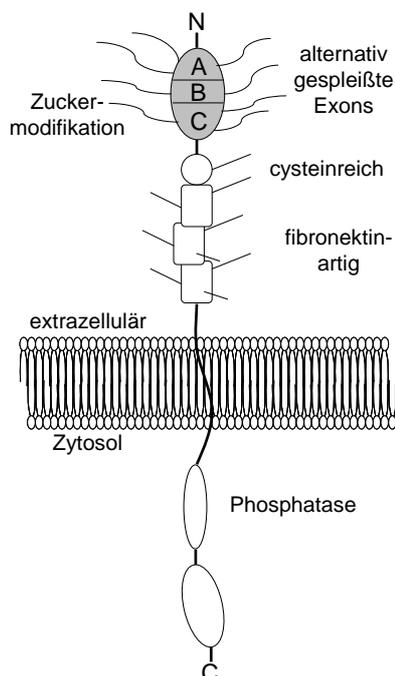


Abbildung 5: Struktur von CD45.

der extrazellulären Domäne Homologien zu Rezeptortyrosinkinasen aufweist, konnte bisher kein CD45-Ligand identifiziert werden (Übersicht in Penninger et al., 2001; Hermiston et al., 2003).

Die Tyrosinphosphatase-Aktivität der intrazellulären Domäne kann durch die Bildung von CD45-Dimeren reguliert werden. Im CD45-Dimer werden die Phosphatase-Domänen von „inhibitorischen Schleifen“ des jeweils anderen Monomers gebunden und dadurch inaktiviert. Die physiologische Relevanz der Bildung inaktivierter CD45-Dimere konnte durch die Einführung einer Punktmutation (E613R), die zur Zerstörung der inhibitorischen

Schleife führt, gezeigt werden. Mäuse, die das mutierte Protein anstelle des Wildtyp-Proteins exprimieren, bilden verschiedene Autoimmunerkrankungen aus und sind nur eingeschränkt lebensfähig (Majeti et al., 2000).

T-Zellen von CD45-defizienten Mäusen können durch α -CD3-Antikörper nicht zur Proliferation angeregt werden, weil die Signalkaskade durch den TCR massiv gestört ist. Auf molekularer Ebene konnte demonstriert werden, dass CD45 eine essentielle Rolle bei der Regulation von Kinasen der Src-Familie, z.B. Lck, spielt (Stone et al., 1997). In T-Zellen zeigt CD45 in den meisten Studien eine positive Regulation der

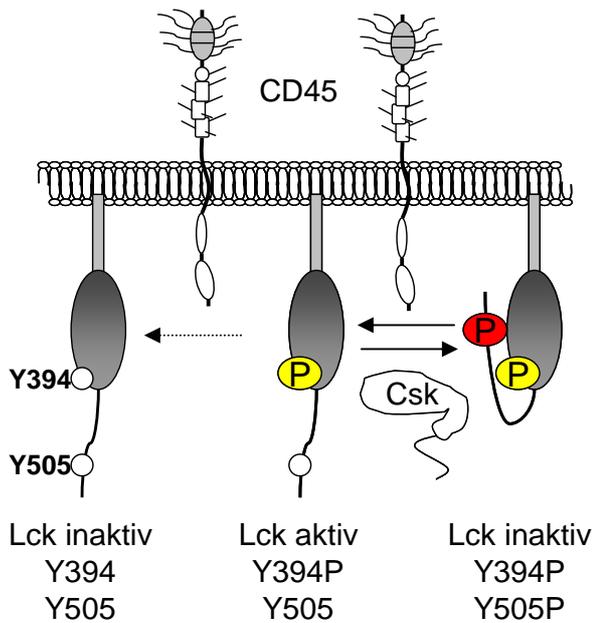


Abbildung 6: Regulation von Lck durch CD45 und Csk in T-Zellen. Weiße Kreise stehen für nicht phosphorylierte Tyrosinreste, aktivierende Phosphatgruppen (P) sind gelb, inhibierende rot. In T-Zellen wird Lck durch CD45 vernehmlich aktiviert (durchgezogener Pfeil), während die inhibitorische Funktion schwächer ist (gestrichelter Pfeil).

Lck-Aktivität durch die Dephosphorylierung des inhibierenden Tyrosin-505. CD45 hebt also die Csk-vermittelte Inhibierung von Lck auf (Abb. 6). Dies spiegelt sich in einer Hyperphosphorylierung der inhibierenden Tyrosinreste von Lck in CD45-defizienten Zelllinien und Thymozyten wider (Cahir McFarland et al., 1993; Stone et al., 1997). In Übereinstimmung mit diesem

Befund kann die Expression der nicht phosphorylierbaren Lck-Y505F-Punktmutante in CD45-defizienten Mäusen dem (durch den Verlust von CD45 hervorgerufenen) Defekt in der Thymozytenentwicklung entgegenwirken (Seavitt et al., 1999). Diese Daten sprechen dafür, dass Lck-Tyrosin-505 ein physiologisch relevantes Substrat von CD45 ist. Allerdings wurde in Thymozyten von CD45-defizienten Mäusen auch eine Hyperphosphorylierung von Lck-Tyrosin-394 festgestellt (Baker et al., 2000), was darauf hindeutet, dass CD45 auch an der Regulation der Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosins beteiligt ist. Diese Vermutung wurde in Studien bestätigt, die eine Verminderung der Lck-Aktivität durch CD45 zeigen (D'Oro und Ashwell, 1999). Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass CD45 beide regulatorischen Tyrosinreste in Kinasen der Src-Familie dephosphorylieren kann und der Effekt von CD45 auf die Aktivität dieser

Kinasen kontext- und zelltypabhängig ist. Die unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitäten in T-Zellen sind in Abbildung 6 angedeutet.

Im Gegensatz zu T-Zellen, in denen CD45 vornehmlich eine Aktivierung bewirkt, konnte gezeigt werden, dass CD45 in B-Zellen beide regulatorischen Tyrosinreste in der Src-Kinase Lyn dephosphoryliert und so eher hemmend auf die Kinaseaktivität wirkt. Eine Aktivierung von Lyn wird möglich, wenn CD45 nach der Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BCR) kurzzeitig aus den GEMs, die den aktivierten BCR enthalten, ausgeschlossen wird (Shrivastava et al., 2004). Auch für die T-Zell-Aktivierung spielt die Lokalisation von CD45 in distinkten Membrandomänen eine regulatorische Rolle (Irles et al., 2003).

Die zelltypspezifische Aktivität wird auch in CD45-defizienten Mäusen deutlich, in denen B- und T-Zellen unterschiedlich stark betroffen sind. T-Zellen zeigen einen ausgeprägten Funktionsverlust: Die β -Selektion während der Thymozytenentwicklung CD45-defizienter Mäuse ist aufgrund gestörter Signalgebung durch den Prä-TCR behindert. Hinzu kommen Defekte in der Positiv- und Negativselektion, so dass die Zahl reifer Thymozyten auf etwa 20 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sinkt. Die wenigen überlebenden CD45-negativen peripheren T-Zellen sind nicht in der Lage, auf Antigenstimulation zu reagieren, da die TCR-Signalkaskade nicht funktionsfähig ist (Byth et al., 1996; Mee et al., 1999; Ogilvy et al., 2003). Der B-Zell-Phänotyp in CD45-defizienten Mäusen ist weniger stark ausgeprägt. Die B-Zell-Entwicklung scheint erst im letzten Schritt, der Bildung von $\text{IgM}^{\text{lo}}\text{IgD}^{\text{hi}}$ -Zellen, teilweise betroffen zu sein. CD45-defiziente B-Zellen zeigen eine normale Reaktion auf Stimulation mit α -CD40, lassen sich aber mit α -IgM oder α -IgD weniger gut aktivieren (Byth et al., 1996). Zudem zeigen CD45-defiziente Mäuse eine normale B-Zell-Antwort, wenn durch Transplantation CD45-positive T-Helferzellen zur Verfügung gestellt werden (Kong et al., 1995). Diese Ergebnisse spiegeln die entscheidende aktivierende Rolle von CD45 in T-Zellen und die weniger gut definierte Funktion von CD45 in B-Zellen wider.

Auch im humanen System konnte die essentielle Bedeutung von CD45 in der Entwicklung des Immunsystems bestätigt werden. Mutationen im humanen CD45-Lokus, die einen Funktionsverlust des Proteins bewirken, führen zu dem SCID-Phänotyp (Kung et al., 2000).

Neben der Regulation von Kinasen der Src-Familie konnten JAKs (Januskinasen) als weitere CD45-Substrate identifiziert werden. Durch die Dephosphorylierung von JAKs wird deren Aktivität gesenkt und so die Signaltransduktion durch den JAK-STAT (*signal transducers and activators of transcription*) Signalweg negativ reguliert. Eine solche Regulation findet z.B. in Makrophagen statt, wo sich der Verlust von CD45 durch eine stärkere Reaktion auf Zytokinstimulation im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen auswirkt (Irie-Sasaki et al., 2001).

Die CD45-prä-mRNA wird je nach Zelltyp sowie Entwicklungs- und Aktivierungszustand alternativ gespleißt. Dies betrifft besonders die Exons 4, 5 und 6 (bzw. A, B, C), in manchen Zellpopulationen auch Exon 7 (Tsujikawa et al., 2000). In murinen T-Zellen werden alle möglichen Kombinationen von CD45-Isoformen nach einem streng regulierten Muster exprimiert: Beispielsweise ist die

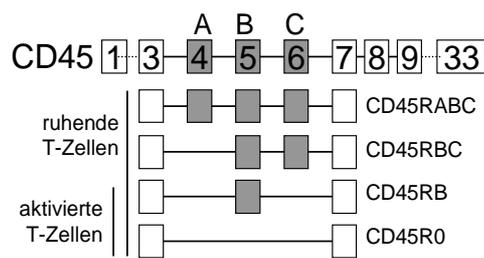


Abbildung 7: Alternative CD45-Isoformen in T-Zellen. Der CD45-Lokus besteht aus 33 Exons (oben), zwei Nomenklaturen für die alternativ gespleißten Exons (grau) sind angegeben. Die Hauptisoformen in ruhenden und aktivierten T-Zellen sind dargestellt.

Hauptisoform in peripheren, naiven T-Zellen CD45RB (mit der Exonfolge -3-5-7-), während in aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen CD45R0 (Exonfolge -3-7-) die vorherrschende Form ist (Birkeland et al., 1989) (Abb. 7).

Die genaue Regulation der CD45-Isoform-Expression zeigt sich auch während der T-Zell-Aktivierung: In den ersten Stunden wird eine transiente Erhöhung der Expression der

CD45RB-Form beobachtet (Deans et al., 1992), worauf die Exklusion der alternativ gespleißten Exons etwa 24 Stunden nach Antigenstimulation folgt (Lynch und Weiss, 2000). Dieser „activation induced alternative splicing“ genannte Prozess könnte Teil eines Regulationsmechanismus sein, der die T-Zell-Antwort begrenzt. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass CD45R0 eine geringere Aktivität als CD45RB besitzt, so dass die CD45-Aktivität während der T-Zell-Aktivierung abnimmt, was zu einer Limitierung der Aktivierung führen würde (Xu und Weiss, 2002).

Innerhalb der alternativ gespleißten Exons konnten ESS-Sequenzen identifiziert werden, die essentiell für den Ausschluss der jeweiligen Exons während der T-Zell-Aktivierung sind (Lynch und Weiss, 2001). Deletion oder Mutation dieser ESS-Sequenzen führt zu einem aberranten Spleißmuster, in dem CD45-Isoformen dominieren, die die alternativ gespleißten Exons einschließen (Rothrock et al., 2003). Kürzlich konnte hnRNP-L als ein Faktor identifiziert werden, der an die ESS-Sequenz der alternativ gespleißten CD45-Exons bindet und einen Ausschluss dieser Exons aus der reifen mRNA bewirkt (Rothrock et al., 2005; Tong et al., 2005). Da sich weder die Aktivität noch die Menge von hnRNP-L während der T-Zell-Aktivierung verändert (Rothrock et al., 2005), ist es wahrscheinlich, dass das „activation induced alternative splicing“ während der T-Zell-Aktivierung von weiteren Faktoren beeinflusst wird. Potentielle Kandidaten müssten drei Kriterien erfüllen: Sie müssten ESS-Sequenzen binden oder zumindest in einem ESS-bindenden Komplex enthalten sein, sie müssten einen Ausschluss der entsprechenden Exons aus der mRNA bewirken, und ihre Aktivität müsste während der T-Zell-Aktivierung zunehmen. Zellkulturexperimente mit überexprimierten Proteinen lassen vermuten, dass SR-Proteine an der Regulation des CD45-Spleißens während der T-Zell-Aktivierung beteiligt sind (ten Dam et al., 2000), eine Bestätigung *in vivo* steht allerdings noch aus.

Die alternativ gespleißten Exons liegen alle in der extrazellulären, stark glykosilierten Domäne. Da die Zuckerketten durch ihre Form und Ladung wesentlich zur Ausbildung der Proteinstruktur beitragen, weisen die verschiedenen CD45-Isoformen deutliche strukturelle Unterschiede auf. Die Auswirkung dieser strukturellen Unterschiede auf die Fähigkeit von CD45, T-Zellen zu aktivieren, war der Untersuchungsgegenstand einer Vielzahl von Arbeiten. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die größere CD45RABC-Isoform T-Zellen stärker aktiviert als die kleinere CD45R0-Isoform, während andere Studien zu dem entgegengesetzten Ergebnis kommen (Leitenberg et al., 1999; Dornan et al., 2002; Xu und Weiss, 2002; Irls et al., 2003). Drei dieser Studien gehen davon aus, dass die kleinere CD45R0-Isoform besser in der Lage ist, stabile Komplexe mit Interaktionspartnern zu bilden, als die größere CD45RABC-Isoform, was je nach Interaktionspartner aber zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. In einem Modell kann die kleinere R0-Isoform

besser mit dem TCR-Komplex interagieren und wirkt deshalb stärker aktivierend (Leitenberg et al., 1999; Dornan et al., 2002), während ein anderes Modell davon ausgeht, dass CD45R0 eine größere Neigung zur Ausbildung inaktiver Dimere besitzt und deshalb weniger zur T-Zell-Aktivierung beiträgt (Xu und Weiss, 2002). In einem anderen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die größere CD45RABC-Isoform präferentiell in GEMs lokalisiert ist, während dies für CD45R0 nicht der Fall ist. Die Lokalisation in GEMs korreliert in dieser Studie mit der Fähigkeit zur TCR-Aktivierung (Irles et al., 2003). Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser vier Arbeiten verdeutlichen die Vielschichtigkeit der CD45-Regulation: Dimerbildung, Interaktion mit anderen Bindepartnern und die Lokalisation in distinkten Membrandomänen sind Faktoren, die die Aktivität der verschiedenen Isoformen mitbestimmen. Es wird außerdem deutlich, dass Ergebnisse aus artifiziellen Systemen – alle drei Studien basieren auf Versuchen in CD45-defizienten Zelllinien, die verschiedene CD45-Konstrukte überexprimieren – nur bedingt auf die *in vivo*-Situation übertragen werden können.

Die unterschiedliche Fähigkeit von verschiedenen CD45-Isoformen, die TCR-Signalkaskade zu aktivieren, wurde auch *in vivo* untersucht. CD45-defiziente Mäuse wurden mit einzelnen CD45-Isoformen rekonstituiert, und der T-Zell-Phänotyp dieser Mäuse wurde analysiert. Alle untersuchten Isoformen waren in diesem Modell in der Lage, den Verlust von endogenem CD45 auszugleichen, wobei ein Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen nicht festgestellt werden konnte (Kozieradzki et al., 1997; Ogilvy et al., 2003). Im Gegensatz dazu stehen Versuche mit Wildtyp-Mäusen, die zusätzlich zu endogenem CD45 verschiedene CD45-Isoformen überexprimieren. In diesem System aktiviert CD45RABC die TCR-Signalkaskade effizienter als CD45R0 (Chui et al., 1994).

Im Unterschied zur T-Zell-Entwicklung scheint die B-Zell-Entwicklung von dem Vorhandensein mehrerer CD45-Isoformen abhängig zu sein, da weder CD45R0 noch CD45RB alleine in der Lage waren, den Defekt in der Bildung reifer $IgM^{lo}IgD^{hi}$ -B-Zellen aus $IgM^{hi}IgD^{hi}$ -Vorläuferzellen in CD45-defizienten Mäusen auszugleichen (Ogilvy et al., 2003).

2.5 Der Transkriptionsfaktor Gfi1

Das Zinkfingerprotein „growth factor independence-1“ (Gfi1) wurde 1993 erstmals beschrieben. Mit Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MoMLV) infizierte Interleukin-2 (IL2) abhängige Lymphom-Zellen wurden auf IL2-unabhängiges Wachstum selektioniert und der Integrationsort des Virus im Wirtszellgenom der selektierten Klone ermittelt. Die Virusintegration führte zur vermehrten Expression eines benachbarten Gens, dessen cDNA isoliert werden konnte. Eine stabile Expression dieser cDNA in IL2-abhängigen Zellen führte zu IL2-unabhängigem Wachstum und zur Namensgebung des neuen Proteins – growth factor independence (Gilks et al., 1993). Weitere MoMLV-Infektionsexperimente mit transgenen Mäusen bestätigten,

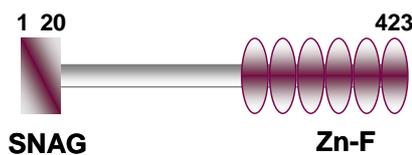


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gfi1-Domänenstruktur mit Aminosäurepositionen für das murine Protein. SNAG: Snail/Gfi1, Zn-F: Zinkfingerdomäne

dass Gfi1 ein Proto-Onkogen ist, da die transkriptionelle Aktivierung von Gfi1 durch provirale Integration im Gfi1-Lokus mit beschleunigter Tumorentstehung im T-Zellkompartiment korrelierte (Zörnig et al., 1996; Schmidt et al., 1996; Schmidt et al., 1998a). Sequenzvergleiche von Gfi1 und einem weiteren Homologen, Gfi1B, mit

bekannten anderen Proteinen zeigten, dass Gfi1 und Gfi1B Mitglieder einer Proteinfamilie sind. Weitere Mitglieder sind die Proteine Snail und Slug, über deren Funktion in Säugerzellen noch wenig bekannt ist. Allen Familienmitgliedern gemeinsam ist eine C-terminale Domäne, die fünf, oder im Falle von Gfi1 und Gfi1B sechs, Zinkfinger vom C₂H₂-Typ enthält (Abb. 8). Während die Sequenzen im mittleren Teil der Proteine stärker variieren, zeigen die N-terminalen 20 Aminosäuren aller Gfi-Familienmitglieder eine starke Konservierung. Dieser Sequenzabschnitt, der SNAG-Domäne (Snail/Gfi1) genannt wird, ist wahrscheinlich für die Eigenschaft der Gfi-Proteine als transkriptionelle Regulatoren verantwortlich. Bisherige Befunde deuten daraufhin, dass die Funktion von Gfi1 hauptsächlich die Repression der Transkription von Zielgenen ist (Zweidler-McKay et al., 1996; Grimes et al., 1996a; Yücel et al., 2004; Möröy, 2005). Die Repression erfolgt möglicherweise über die Änderung der Chromatinstruktur, da neuere Studien eine

Interaktion von Gfi1 mit histonmodifizierenden Enzymen gezeigt haben (McGhee et al., 2003; Duan et al., 2005).

Die physiologische Funktion von Gfi1 blieb lange im Unklaren, aber die starke Expression im Thymus und in aktivierten T-Zellen deutete auf eine Rolle in der T-Zell-Entwicklung und -Aktivierung hin (Grimes et al., 1996b; Schmidt et al., 1998b; Karsunky et al., 2002a). Durch die Deletion von Gfi1 mittels homologer Rekombination in Mäusen konnten mehrere Funktionen von Gfi1 im Immunsystem nachgewiesen werden: Zum einen ist in Gfi1-defizienten Mäusen die Differenzierung myeloider Vorläuferzellen zu Granulozyten (nicht aber zu Makrophagen) gestört, zum anderen ist die T-Zell-Entwicklung in frühen Stadien im Thymus teilweise blockiert und die Bildung von CD8⁺-T-Zellen scheint bevorzugt stattzufinden (Karsunky et al., 2002b; Hock et al., 2003; Yücel et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gfi1 eine Rolle in der Regulation der Funktion von hämatopoetischen Stammzellen spielt (Hock et al., 2004; Zeng et al., 2004). Im Gegensatz zu den (eingeschränkt) vitalen Gfi1^{-/-}-Mäusen sterben Gfi1B^{-/-}-Mausembryonen aufgrund fehlender Entwicklung von Erythrozyten pränatal (E15) (Saleque et al., 2002).

Durch die Entdeckung dominant-negativ wirkender Gfi1-Mutationen in Neutropenie-Patienten konnte kürzlich die Beteiligung von Gfi1 an der Bildung funktioneller neutrophiler Granulozyten im humanen System bestätigt werden (Person et al., 2003).

Eine weitere Konsequenz der Gfi1-Defizienz in Mäusen ist der Verlust des Hörvermögens und des Gleichgewichtssinns, hervorgerufen durch Apoptose oder eine gestörte Entwicklung der Innenohrhaarzellen (Wallis et al., 2002; Hertzano et al., 2003). In der gleichen Studie wurde die Expression von Gfi1 in verschiedenen sensorischen Geweben in Maus-Embryonen nachgewiesen, was für zusätzliche, bisher nicht genau identifizierte Funktionen von Gfi1 während der Embryonalentwicklung spricht; beispielsweise konnte der Verlust von Gfi1 mit einer Störung der Neuronenentwicklung in Verbindung gebracht werden (Tsuda et al., 2005).

Trotz der vor allem durch die Gfi1-Defektmutanten verdeutlichten Relevanz der Expression von Gfi1 und Gfi1B für das hämatopoetische System liegen die

molekularen Mechanismen für die beschriebenen Gfi1-Verlust-Phänotypen beim Menschen wie bei der Maus weitgehend im Dunkeln. Erste Analysen haben gezeigt, dass Gfi1 durch die Interaktion mit PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT-3*) die Signaltransduktion durch den STAT3-Signalweg erhöht (Rödel et al., 2000). In einem anderen Ansatz wurde die Regulation potentieller Gfi1-Zielgene durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und RT-PCR-basierte Erstellung von Expressionsprofilen untersucht (Duan und Horwitz, 2003). Obwohl diese Arbeit die Gfi1-abhängige Repression einiger Gene zeigt, ist die Regulation der Gfi1-Aktivität und die Stellung von Gfi1 im hämatopoetischen System nur unzureichend verstanden.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Der gut beschriebenen Auswirkung des Verlusts von Gfi1 im humanen und murinen System steht die kaum verstandene Funktionsweise von Gfi1 gegenüber. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Frage nach einem molekularen Mechanismus, der zur Erklärung des Gfi1-Verlust-Phänotyps beitragen sollte. Da Gfi1 selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, ist es wahrscheinlich, dass Gfi1 seine Funktion nur über die Bindung von Partnerproteinen ausüben kann. Die Charakterisierung solcher Gfi1-Bindepartner sollte deshalb Rückschlüsse auf Funktionen und die zugrunde liegenden Mechanismen zulassen. Aus diesem Grund stand am Anfang der Arbeit ein Hefe-Interaktions-Experiment (*Yeast Two-Hybrid-Screen*) zur Identifizierung neuer Gfi1-interagierender Proteine. Potentielle Interaktionspartner sollten dann durch biochemische Methoden, z.B. Coimmunopräzipitationsversuche und Colokalisationsstudien bestätigt und eine funktionelle Relevanz der Interaktion in geeigneten *in vitro*- und *in vivo*-Systemen untersucht werden. Dazu sollten sowohl die schon vorhandenen Gfi1-defizienten Mäuse eingesetzt, als auch neue Mausmutanten generiert und analysiert werden. Die Analyse dieser *in vivo*-Systeme sollte einen tieferen Einblick in die Rolle von Gfi1 im hämatopoetischen System ermöglichen und einen Beitrag zum Verständnis Gfi1-regulierter Prozesse in der Hämatopoese leisten.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Gfi1-Interaktionspartner durch Hefe-Interaktionsklonierung

Um neue, mit Gfi1 interagierende Proteine zu identifizieren, wurde eine Hefe-Interaktionsklonierung durchgeführt. Als Köderprotein wurde entweder wt-Gfi1 oder eine verkürzte Variante, in der die Zinkfingerdomäne deletiert wurde (Gfi1 Δ Zn-F, Abb. 12C), eingesetzt. Entsprechende DNA-Fragmente wurden an das C-terminale Ende der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 angefügt und eine Expression der Fusionsproteine mittels Immunoblot nachgewiesen (nicht gezeigt). Mit diesen Konstrukten wurde eine T-Zell-Lymphom-cDNA-Bibliothek durchsucht, in der die cDNAs als Fusionsproteine mit der Transaktivierungsdomäne von Gal4 exprimiert werden. Diese cDNA-Bibliothek wurde ausgewählt, da sie aus einem Zelltyp mit endogener Gfi1-Expression stammt (nicht gezeigt) und die Chance, physiologisch relevante Interaktionspartner zu identifizieren, dadurch steigen sollte. Insgesamt wurden drei Interaktionsexperimente durchgeführt, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Erwartungsgemäß nahm die Zahl positiver Klone mit jedem Selektionsschritt ab, nach der stringentesten Selektion blieben insgesamt 44 Kandidaten von einer Gesamtzahl von fast 4×10^6 unabhängigen Klonen übrig.

Tabelle 1: Zusammenfassung von drei „Two-Hybrid“-Experimenten. Unter stringenter Selektionsbedingungen nahm die Zahl positiver Klone ab.

Köder	Klone auf -leu-trp-his	Klone auf -leu-trp-his-ade	β -Gal-positive Klone	Klone nach Retransform.	gesamt Klone
Gfi1 Δ Zn-F(1)	594	154	48	17	$1,2 \times 10^6$
Gfi1 Δ Zn-F(2)	326	84	28	15	$1,2 \times 10^6$
Gfi1	224	87	22	12	$1,4 \times 10^6$

In allen drei Interaktionsexperimenten fand sich unter den positiven Klonen zweimal ein Fragment des Spleißfaktors U2AF26 (nicht gezeigt). Nur ein weiteres Protein konnte ebenfalls in allen drei Versuchen als Gfi1-interagierendes Protein isoliert werden. Dabei handelte es sich um die Serin-Threonin-Kinase Trb3. Biochemisch konnte eine Interaktion zwischen Trb3 und Gfi1 bestätigt werden (nicht gezeigt), aber die Funktion dieser Interaktion ist noch ungeklärt. Ein anderer Gfi1-Interaktionspartner, der in diesen „Two-Hybrid“-Versuchen gefunden wurde, ist die p150-Untereinheit des „Chromatin assembly factor“ (CAF). In weiterführenden Experimenten konnte eine Rolle dieser Interaktion in der Gfi1-vermittelten transkriptionellen Repression etabliert werden (nicht gezeigt), die aber nicht Teil dieser Arbeit ist. In der vorliegenden Arbeit wird die Charakterisierung des Spleißfaktors U2AF26, die Interaktion zwischen Gfi1 und U2AF26 und die Bedeutung der beiden Faktoren in der T-Zell-Aktivierung beschrieben.

3.2 Gfi1 interagiert mit U2AF26

In den beschriebenen „Two-Hybrid“-Experimenten wurde ein C-terminales Fragment des Spleißfaktors U2AF26 als Gfi1-interagierendes Protein gefunden. Um diese Interaktion zu verifizieren, wurde die vollständige cDNA von U2AF26 isoliert und in Cos7-Zellen mit der Gfi1-cDNA coexprimiert. In Coimmunopräzipitationsversuchen konnte eine Interaktion zwischen Gfi1 und U2AF26 bestätigt werden. Abbildung 9A zeigt eine Immunopräzipitation (IP) von U2AF26-Flag durch α -Flag-Antikörper und eine Coimmunopräzipitation (CoIP) von Gfi1 nur in Anwesenheit von U2AF26-Flag. Unter den gleichen Bedingungen wurde keine CoIP von U2AF26-Flag mit dem unbeteiligten Transkriptionsfaktor p53 beobachtet (nicht gezeigt), was auf eine spezifische Gfi1-U2AF26-Interaktion hindeutet.

In weiterführenden Experimenten wurde die Expression von U2AF26 in humanen Jurkat-Zellen untersucht. Humanes U2AF26 wurde bisher nicht charakterisiert, aber das Vorhandensein eines U2AF26-Gens auf dem humanen Chromosom 19, dessen Exons eine 90%ige Homologie zum murinen U2AF26 zeigen (Shepard et al., 2002), die Existenz von EST-Klonen sowie eigene RT-PCR-Versuche (nicht gezeigt) weisen auf das Vorkommen von U2AF26 in humanen Zellen hin. Mit einem

U2AF26-spezifischen Antikörper wurde in Kernextrakten, nicht aber in der zytosolischen Fraktion von Jurkat-Zellen, ein Protein in der Größe von murinem U2AF26 detektiert (Abb. 9B, Lysat). Da Größe, nukleäre Lokalisation und Bindung durch einen spezifischen Antikörper mit dem murinen U2AF26 übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Protein um humanes U2AF26 handelt.

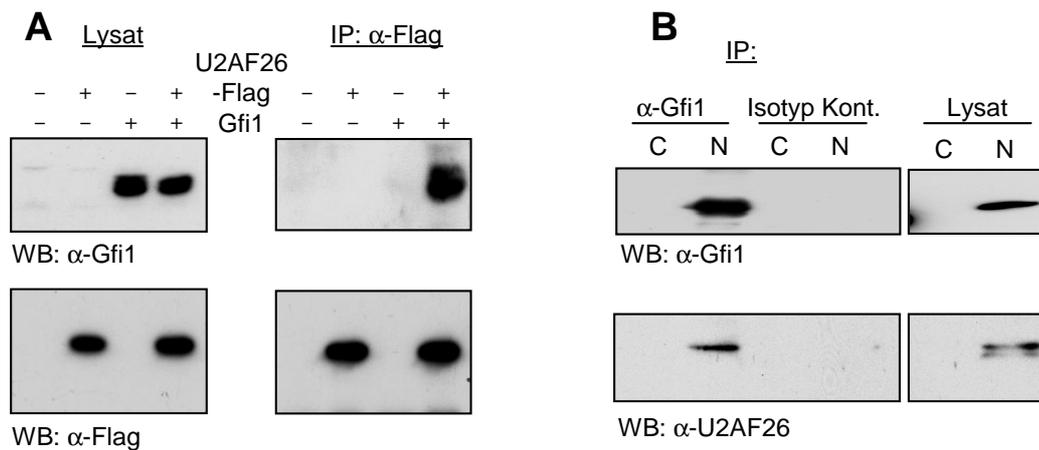


Abbildung 9: Gfi1 und U2AF26 interagieren in eukaryotischen Zellen. A: Gfi1 und U2AF26-Flag wurden in Cos7-Zellen überexprimiert (links) und nach α -Flag-Immunopräzipitation und Westernblot mit α -Gfi1- (oben) oder α -Flag-Antikörpern (unten) analysiert. B: Westernblot-Analyse von α -Gfi1- oder Kontroll-Immunopräzipitaten aus Zytoplasma- (C) und Kernextrakten (N) von Jurkat-Zellen mit α -Gfi1- (oben) oder α -U2AF26-Antikörpern (unten).

In CoIP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass endogen exprimiertes Gfi1 und U2AF26 aus Kernextrakten von Jurkat-Zellen interagieren. Wie für einen Transkriptions- bzw. einen Spleißfaktor erwartet, waren beide Proteine scheinbar ausschließlich im Kern lokalisiert (Abb. 9B, Lysat) und wurden von einem α -Gfi1-Antikörper, nicht aber von einem Kontrollantikörper präzipitiert bzw. copräzipitiert (Abb. 9B, IP). Für den Nachweis von endogenem U2AF26 wurde ein Peptidantikörper gegen einen C-terminalen Bereich des Maus-Proteins generiert, der nur eine schwache Homologie zu dem nahe verwandten U2AF35 aufweist. Das gereinigte Antiserum ist spezifisch für U2AF26 und detektiert U2AF35 nicht (nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass Gfi1 unspezifisch mit Komponenten der Spleißmaschinerie interagiert, wurden Experimente mit Gst-Fusionsproteinen und Extrakten von HeLa-

Zellen vorgenommen. In diesen Versuchen interagierte Gfi1 nur mit U2AF26, nicht aber mit U2AF35, U2AF65 oder hnRNP-A (Abb. 10). Die bekannte Interaktion zwischen U2AF26 und U2AF65 wurde als Positivkontrolle verwendet, so dass Probleme bei der Versuchsdurchführung als Grund für eine fehlende Interaktion zwischen Gfi1 und U2AF65 ausgeschlossen werden können.

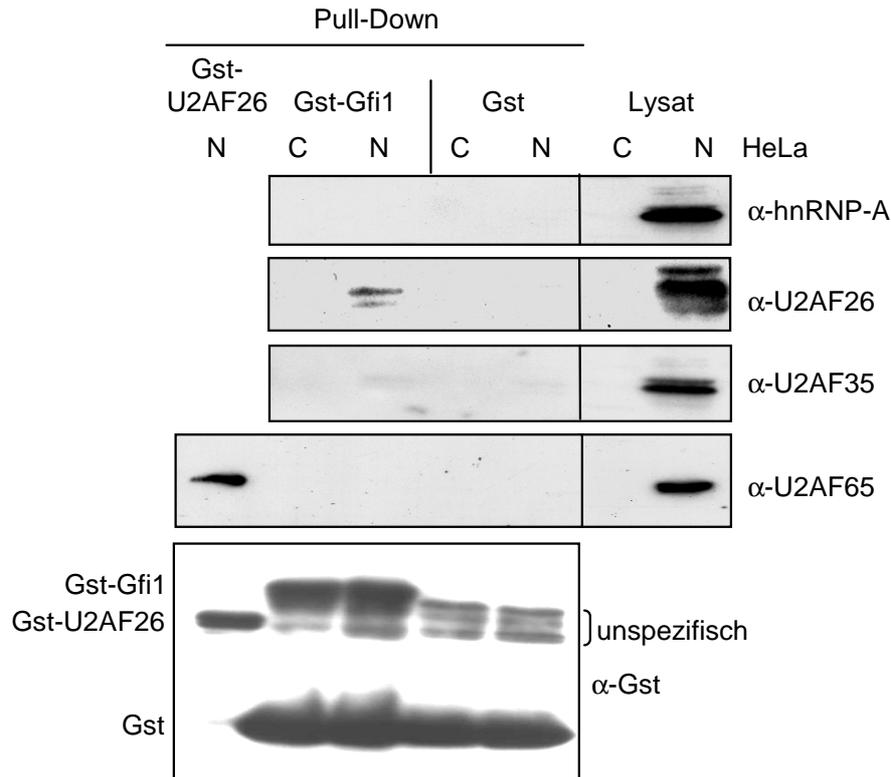


Abbildung 10: Gfi1 interagiert spezifisch mit U2AF26. Die angegebenen Gst-Fusionsproteine wurden in Bakterien hergestellt, gereinigt und immobilisiert und dann mit Zytoplasma- (C) oder Kernextrakt (N) von HeLa-Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Westernblot mit den rechts genannten Antikörpern analysiert. Die Gst-, Gst-U2AF26- und Gst-Gfi1-Banden sind links markiert.

3.3 Gfi1 und U2AF26 liegen colokalisiert im Zellkern vor

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz eines Gfi1-U2AF26-Komplexes *in vivo* lieferten Colokalisationsstudien in 3T3-Fibroblasten. In mit Expressionsvektoren für Gfi1 und U2AF26-Flag transfizierten Zellen konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz eine eindeutige Colokalisation der beiden Proteine festgestellt werden (Abb. 11A, B). In Übereinstimmung mit dem Vorkommen beider Proteine in

Kernextrakten von Jurkat-Zellen (Abb. 9B) waren überexprimiertes Gfi1 und U2AF26 im Kern lokalisiert, wo sie in der Mehrzahl der untersuchten Zellen in punktförmigen Strukturen vorlagen (Abb. 11A). In einigen Zellen schien die Lokalisation zu distinkten Domänen aber aufgehoben zu sein, und eine weniger spezifische Kernlokalisation wurde beobachtet (Abb. 11B).

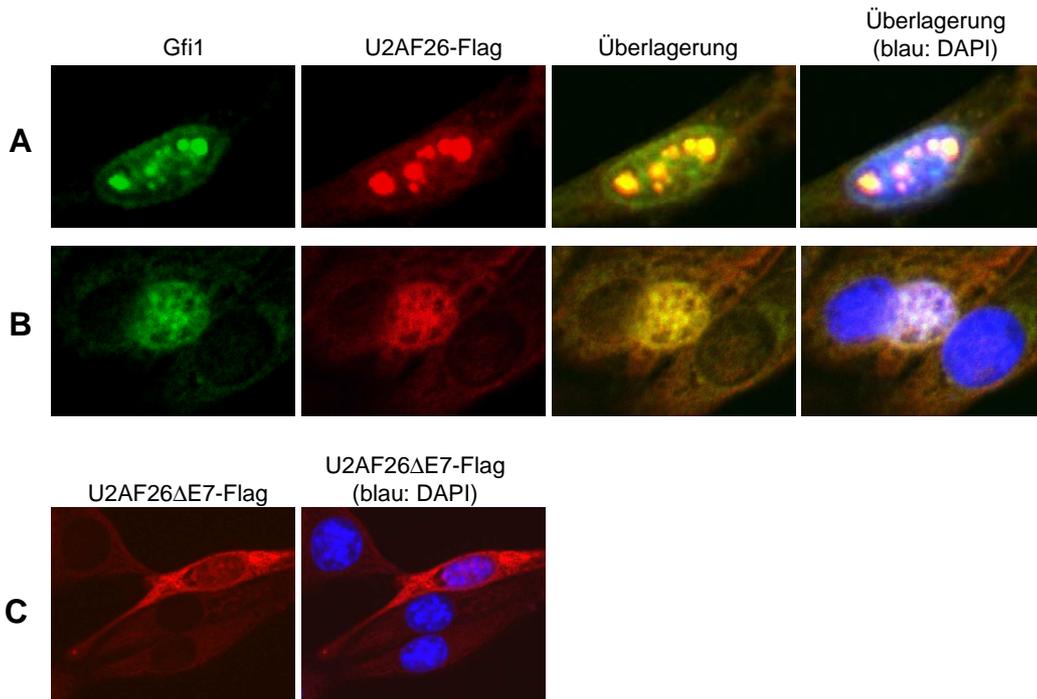


Abbildung 11 A, B: Gfi1 und U2AF26 colokalisieren in eukaryotischen Zellen. 3T3-Fibroblasten wurden mit U2AF26-Flag und Gfi1-Expressionsplasmiden transfiziert, 24 h später fixiert, mit α -Gfi1- und α -Flag-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern behandelt und dann mittels Laserscan-Mikroskopie analysiert. C: Die natürlich vorkommende U2AF26 Δ E7-Variante ist im Zytoplasma lokalisiert. 3T3-Fibroblasten wurden mit einem U2AF26 Δ E7-Flag-Expressionsplasmid transfiziert und analysiert wie in (A).

Die Lokalisation einer natürlich vorkommenden U2AF26-Variante, die durch alternatives Spleißen kein Exon 7 besitzt (U2AF26 Δ E7) und der dadurch die Aminosäuren 162-194 fehlen, wurde ebenfalls untersucht. Überraschenderweise war U2AF26 Δ E7 fast gänzlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 11C) und büßte dementsprechend seine Funktion als Spleißfaktor ein (siehe Abb. 14D).

3.4 Bestimmung der Interaktionsdomänen in Gfi1 und U2AF26

Um ein genaueres Bild von der Interaktion zwischen Gfi1 und U2AF26 zu bekommen, wurden verschiedene Deletionsmutanten der beiden Proteine hergestellt und auf die Interaktion mit dem jeweils anderen Protein getestet. Um die Domäne innerhalb von Gfi1 zu bestimmen, die für die Interaktion mit U2AF26 notwendig ist,

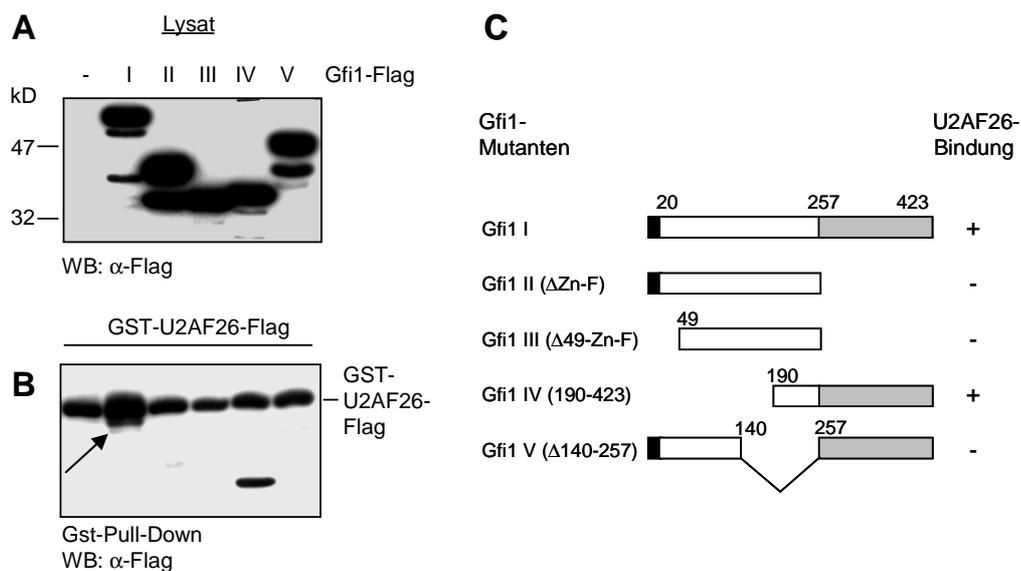


Abbildung 12: Kartierung der U2AF26-Interaktionsdomäne in Gfi1. Gfi1-Deletionsmutanten wurden als Flag-Proteine in Cos7-Zellen exprimiert (A) und mit immobilisiertem Gst-U2AF26-Flag gemischt. Gebundene Proteine wurden durch einen α -Flag-Immunoblot analysiert (B). Die Gst-U2AF26-Flag-Bande ist markiert, sie wird durch Wildtyp-Gfi1 überlagert (Pfeil). Die verwendeten Deletionsmutanten und ihre Bindung an U2AF26 sind in (C) schematisch gezeigt, die SNAG-Domäne ist schwarz, die Zinkfingerdomäne grau dargestellt.

wurden die in Abbildung 12 gezeigten Gfi1-Deletionsmutanten als Flag-Proteine exprimiert (Abb. 12A), mit immobilisiertem Gst-U2AF26-Fusionsprotein gemischt und die gebundenen Proteine analysiert. Nur das Wildtyp-Gfi1-Protein und die Deletionsmutante Gfi1(190-423) waren in der Lage, U2AF26 zu binden (Abb. 12B). Gfi1 Δ Zn-F verlor unter den hier verwendeten Bedingungen die Fähigkeit, stabil mit U2AF26 zu interagieren, obwohl in den „Two-Hybrid“-Versuchen eine Bindung festgestellt worden war (nicht gezeigt). Diese Diskrepanz lässt sich durch die sehr stringenten Waschbedingungen erklären, die angewendet wurden, um unspezifische Interaktionen auszuschließen, die gleichzeitig aber eine Detektion schwächerer Interaktionen verhinderten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine stabile

Interaktion mit U2AF26 Teile der Zinkfingerdomäne (vergleiche Gfi1-Mutanten II und IV in Abb. 12) sowie Sequenzen aus dem Mittelteil zwischen den Aminosäuren 190-257 (vergleiche Gfi1-Mutanten IV und V in Abb. 12) notwendig sind. Wie die Interaktion von Gfi1 Δ Zn-F mit U2AF26 in den „Two-Hybrid“-Versuchen zeigt, ist eine (schwächere) Bindung auch ohne die Zinkfingerdomäne möglich.

Eine ähnliche Versuchsanordnung wurde verwendet, um die Domäne in U2AF26 zu kartieren, die für eine Interaktion mit Gfi1 notwendig ist. U2AF26-Deletionsmutanten wurden als Flag-Proteine in Cos7-Zellen exprimiert, mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Gfi1 gemischt und mit einem α -Flag-Antikörper immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch Autoradiographie (Abb. 13A) oder α -Flag-Immunoblot (Abb. 13B) analysiert. Obwohl die drei

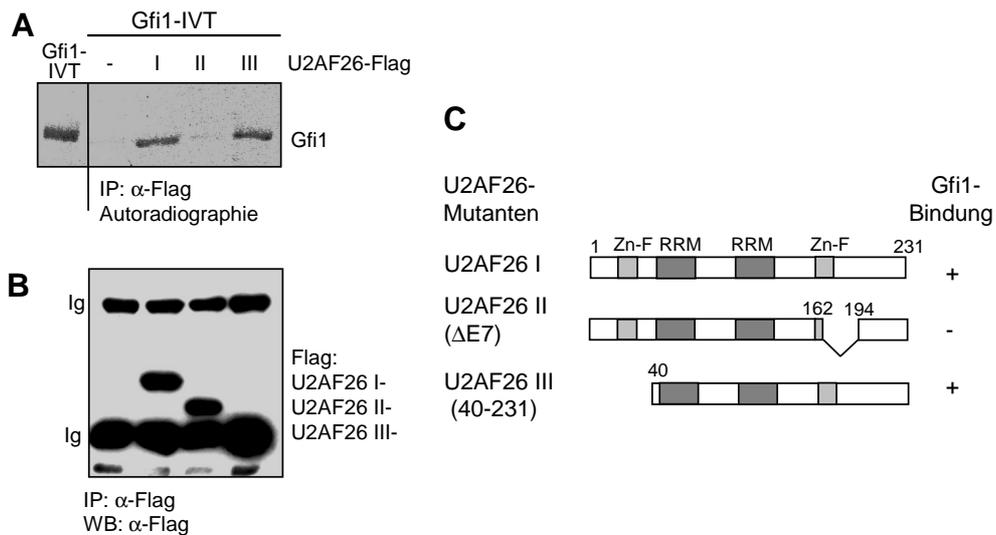


Abbildung 13: U2AF26-Exon 7 ist essentiell für die Interaktion mit Gfi1. U2AF26-Deletionsmutanten wurden als Flag-Proteine in Cos7-Zellen überexprimiert und die Lysate mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Gfi1 (Gfi1-IVT) gemischt. Nach einer α -Flag-IP wurden die Präzipitate auf das Vorhandensein von Gfi1 (A) und U2AF26-Flag-Proteinen (B) untersucht. Die Mutante U2AF26 III wird durch die IgG-Bande überlagert. Die verwendeten U2AF26-Flag-Konstrukte und die Gfi1-Bindung sind in (C) dargestellt. RRM: RNA recognition motif; Zn-F: Zinkfingerdomäne

verwendeten U2AF26-Flag-Proteine in vergleichbaren Mengen im Präzipitat vorhanden waren, war dies für copräzipitiertes Gfi1 nicht der Fall. Vielmehr wurde eine Bindung von Gfi1 durch die Deletion von U2AF26-Exon 7 fast vollständig verhindert. Diese Versuche zeigen, dass ein den zweiten Zinkfinger von U2AF26

beinhaltender Bereich neben der nukleären Lokalisation auch für die Gfi1-Bindung entscheidend ist.

3.5 U2AF26 bewirkt den Ausschluss von Exon B aus der CD45-mRNA

Um die Interaktion zwischen Gfi1 und U2AF26 weiter analysieren zu können, musste zunächst die Funktion von U2AF26 näher charakterisiert werden. Zu Beginn der Arbeit war nur bekannt, dass U2AF26 an die 3'-ss binden und U2AF35 dort ersetzen kann; eine Regulation alternativer Spleißvorgänge durch U2AF26 wurde aber diskutiert (Shepard et al., 2002). Die bekannte Rolle von Gfi1 in der T-Zell-Aktivierung (Karsunky et al., 2002a) und die entscheidende Funktion von CD45 in diesem Prozess lenkten die Aufmerksamkeit auf die alternativ gespleißte CD45-mRNA. In ersten Analysen wurde eine Änderung des CD45-Spleißmusters in Thymozyten Gfi1-defizienter Mäuse festgestellt (nicht gezeigt). In weiteren Versuchen wurde ein von Dr. Gerdy ten Dam (Universität Nijmegen, Niederlande) zur Verfügung gestelltes CD45-Minigen eingesetzt. In diesem Konstrukt ist die humane CD45-Exons 2-7 beinhaltende genomische Region in einen Expressionsvektor kloniert, so dass eine prä-mRNA transkribiert werden kann, in der die alternativ gespleißten Exons enthalten sind (Abb. 7 und 14A) (ten Dam et al., 1999).

Um den Effekt von U2AF26 auf das alternative Spleißen von CD45 zu untersuchen, wurde das CD45-Minigen mit zunehmender Menge U2AF26-Flag in RK13-Zellen (Epithelzellen aus Kaninchen) transfiziert. In Abbildung 14B ist gezeigt, dass mit steigender Menge U2AF26 die CD45RB-mRNA verschwand und im Verhältnis die Expression der CD45R0-Isoform zunahm (Abb. 14B, oberes Bild, Spuren 1-5), ein Ergebnis, das auch in murinen 3T3-Fibroblasten erhalten wurde (nicht gezeigt). Die Phosphoimager-Quantifizierung belegte eine U2AF26-dosisabhängige Veränderung des CD45RB:CD45R0-Verhältnisses zu Gunsten der R0-Isoform (Abb. 14C1, Spuren 1-5). Da U2AF26 nur als Faktor beschrieben worden war, der an der 3'-ss positiv auf die Rekrutierung des Spleißosoms wirkt und so die Aufnahme alternativ

gespleißter Exons in die mRNA unterstützt, war dieses Ergebnis ein erster Hinweis auf eine neue Funktion von U2AF26.

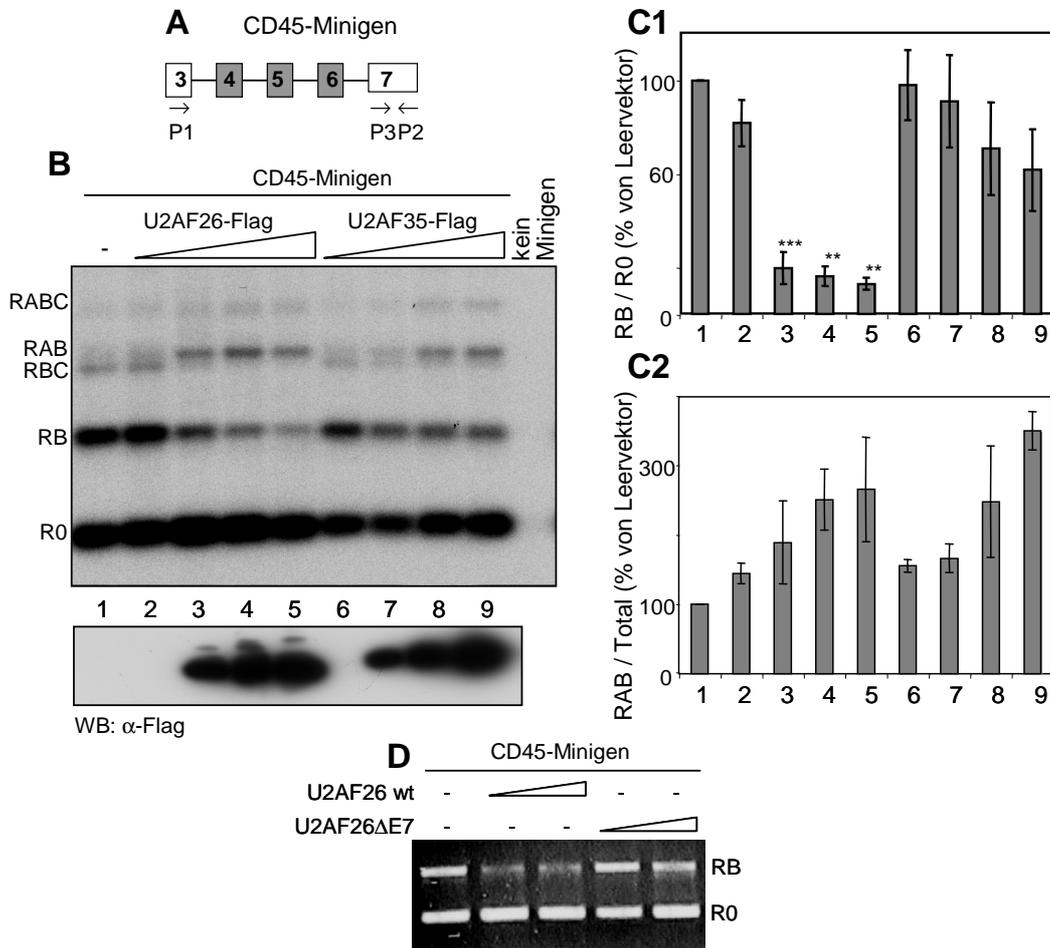


Abbildung 14: U2AF26 bewirkt den Ausschluss von CD45-Exon B aus der reifen mRNA. A: Schematische Darstellung des CD45-Minigen und der verwendeten Primer. PCRs wurden mit den Primern P1 und P2 durchgeführt, das mit den Primern P2 und P3 generierte PCR-Fragment diente zur Sondenherstellung. B: Die angegebenen Plasmide wurden in RK13-Zellen transfiziert, 24 h später wurde RNA präpariert und durch RT-PCR und Southernblot analysiert (oben). Die Identität der CD45-Isoformen (links) wurde durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt. Parallel transfizierte Zellen wurden zur Expressionskontrolle mittels Westernblot verwendet (unten). C: Phosphoimager-Quantifizierung von 6 (1) und 3 (2) unabhängigen Versuchen wie in (B). In (1) ist das CD45RB/R0-Verhältnis gezeigt, in (2) die RAB-Isoform im Verhältnis zu allen Isoformen. In beiden Fällen wurde der Wert aus Spur 1 (Leervektorkontrolle) als 100 % definiert. $p < 0,01$; **, $p < 0,001$; *** D: Minigen-Versuch wie in (B). Die Detektion der CD45-Isoformen erfolgte mittels Ethidium-Bromid-Färbung.

U2AF26 bewirkte neben der Exklusion von Exon B auch die Bildung der CD45RAB- und den Verlust der CD45RBC-Isoform (Abb. 14B). Diese Beobachtung zeigte, dass der Ausschluss von Exon B eine spezifische Regulation darstellt und nicht durch die generell bevorzugte Bildung kleinerer Isoformen hervorgerufen

wurde. Als weitere Kontrolle wurde der Effekt von U2AF35 auf die CD45-Isoform-Expression untersucht. In Abbildung 14B ist erkennbar, dass U2AF35 ebenfalls zu einer Exklusion von Exon B führte, aber in signifikant abgeschwächter Form (Spuren 6-9), was auch durch die Quantifizierung in Abbildung 14C1 verdeutlicht wird. Da durch die Expression von U2AF35 ebenfalls die Bildung der CD45RAB-Isoform induziert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass der weniger starke Effekt auf die Exklusion von Exon B auf einen allgemeinen Funktionsverlust von U2AF35 zurückzuführen ist. Zudem zeigte die Quantifizierung der CD45RAB-Isoform, dass die Bildung dieser Form durch die Expression von U2AF26 und U2AF35 mit ähnlicher Effizienz stattfand (vergleiche Spuren 2-5 und 6-9 in Abbildung 14C2), was auf ähnliche Aktivitäten der beiden Proteine in diesen Versuchen hindeutete. Dies wurde auch durch vergleichbare U2AF26- und U2AF35-Proteinmengen (vergleiche Spuren 3 und 7, 4 und 8, 5 und 9 in Abb. 14B unten) deutlich.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde der Effekt der U2AF26 Δ E7-Mutante auf das CD45-alternative Spleißen untersucht. Während wt-U2AF26 zu einer Reduktion der CD45RB-Isoform führte, hatte U2AF26 Δ E7 nur einen sehr schwachen Effekt (Abb. 14D), was möglicherweise auf die zytoplasmatische Lokalisation dieser Deletionsmutante zurückzuführen ist (Abb. 11C). Dieser Befund macht einen unspezifischen Effekt durch die Expression von U2AF26 auf das alternative Spleißen von CD45-Exon B unwahrscheinlich.

Aus den Experimenten in Abbildung 14 ergibt sich eine zentrale These:

U2AF26 bewirkt den Ausschluss von CD45-Exon B aus der reifen mRNA und verschiebt das Verhältnis zwischen den RB- und R0-Isoformen zugunsten der R0-Isoform. Dieses Spleißmuster gleicht dem „activation induced alternative splicing“ während der T-Zell-Aktivierung, was die Vermutung zulässt, dass U2AF26 eine regulatorische Rolle in T-Zellen spielt. Da U2AF35 die Exklusion von Exon B wesentlich schwächer bewirkte, als dies für U2AF26 der Fall war, scheint es sich hierbei um eine nichtredundante Funktion von U2AF26 zu handeln.

3.6 Der siRNA-vermittelte U2AF26 „knock-down“ bewirkt die Bildung der CD45RB-Isoform

Wenn die Überexpression von U2AF26 eine Exklusion von CD45-Exon B bewirkt, sollte die Deletion von endogenem U2AF26 eine Zunahme der CD45RB-Isoform zur Folge haben. Diese Hypothese wurde getestet, indem die Expression von endogenem U2AF26 in 3T3-Fibroblasten mittels siRNA reduziert und der Effekt auf

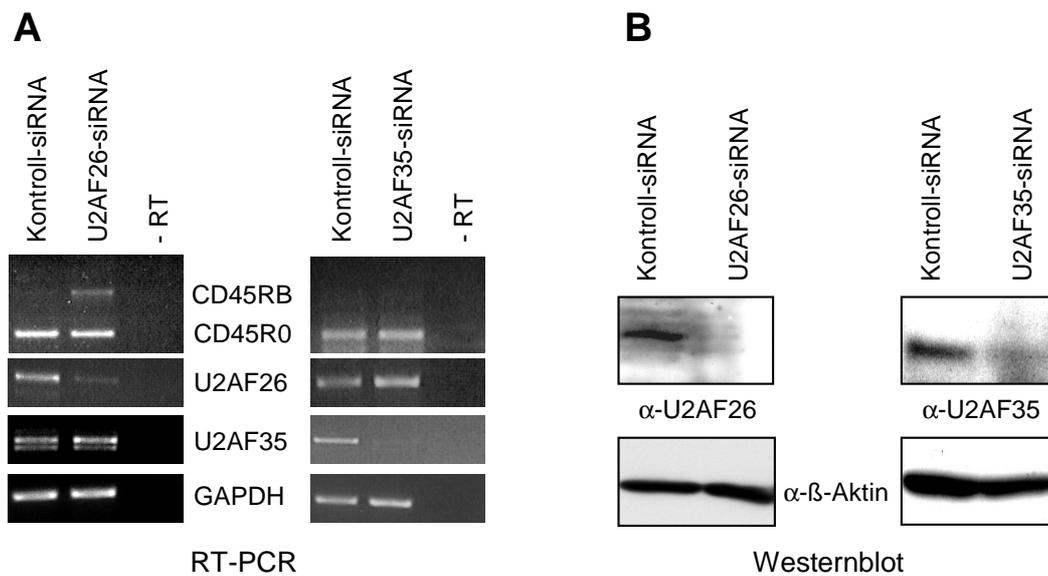


Abbildung 15: Der siRNA-vermittelte „knock-down“ von U2AF26 führt zur Aufnahme von Exon B in die CD45-mRNA. 3T3-Fibroblasten wurden mit den angegebenen siRNAs und dem CD45-Minigen transfiziert (siehe „Material und Methoden“). Der Effekt der siRNAs wurde durch RT-PCR (A) und Westernblot (B) spezifisch für die jeweils angegebenen mRNAs und Proteine untersucht.

transfiziertes CD45-Minigen untersucht wurde. In Versuchen mit Zellen, die endogene CD45-Expression aufweisen, wurde ein siRNA-vermittelter „knock-down“ von U2AF26 aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz nicht erreicht (nicht gezeigt, siehe auch Rothrock et al., 2005). 3T3-Fibroblasten wurden für diesen Versuch ausgewählt, weil sie nach Transfektion mit dem CD45-Minigen hauptsächlich die R0-Isoform exprimieren (ten Dam et al., 1999), so dass eine Zunahme der RB-Isoform leicht detektierbar sein sollte, und sie sich außerdem gut mit siRNA transfizieren lassen. Abbildung 15 zeigt, dass U2AF26-spezifische siRNA zu einer deutlichen Reduktion der U2AF26-mRNA führte (Abb. 15A, links) und einen Verlust des U2AF26-Proteins bewirkte (Abb. 15B, links). Die Spezifität der siRNA wurde durch das Fehlen eines Effekts auf die U2AF35-mRNA belegt. In

einem cotransfizierten CD45-Minigen bewirkte der U2AF26 „knock-down“ eine Verringerung der CD45R0-Isoform und eine Zunahme der CD45RB-Isoform (Abb. 15A, links). Der Verlust von U2AF26 führte demnach zu einer Aufnahme von Exon B in die CD45-mRNA, was im Einklang mit den in Abbildung 14 gezeigten Überexpressionsstudien steht.

In einem Kontrollexperiment wurde auch der Effekt von siRNA-vermitteltem „knock-down“ von U2AF35 untersucht. Abbildung 15 zeigt, dass diese siRNA spezifisch die Menge an U2AF35-mRNA (Abb. 15A, rechts) und Protein (Abb. 15B, rechts) reduzierte, dies aber keinen Einfluss auf die Bildung der CD45RB-Isoform hatte. Dieses Ergebnis spricht wiederum für einen im Vergleich zu U2AF26 schwächeren Effekt von U2AF35 in der Regulation von CD45-Exon B.

3.7 U2AF26 bindet an die ESS-Sequenz von CD45-Exon 4

In den alternativ gespleißten CD45-Exons sind definierte ESS-Sequenzen vorhanden, die für die Exklusion der jeweiligen Exons essentiell sind (Rothrock et al., 2003). Diese Sequenzen sind hoch konserviert, sowohl zwischen den verschiedenen Exons als auch zwischen Mensch und Maus. Um einen Mechanismus postulieren zu können, wie U2AF26 den Ausschluss der alternativ gespleißten CD45-Exons bewirkt, war es deshalb von Interesse, eine mögliche Bindung von U2AF26 an diese ESS-Sequenzen zu untersuchen. Als Modell-RNA wurde hier die ESS-Sequenz von murinem CD45-Exon 4 benutzt, auch im Hinblick auf eine medizinisch relevante Rolle der Regulation von Exon 4 im humanen System (Jacobsen et al., 2000).

In einer ersten Reihe von Experimenten wurden Kernextrakte von U2AF26-Flag-transfizierten oder untransfizierten Cos7-Zellen mit radioaktiv markierter ESS-RNA (Abb. 16A) inkubiert und das Reaktionsgemisch nach UV-Bestrahlung durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 16B zeigt deutlich die Anreicherung eines markierten Komplexes in den U2AF26-Flag-transfizierten Zellen, der mit einer Größe von etwa 62 kD aber deutlich größer ist als U2AF26 allein. Es ist daher wahrscheinlich, dass andere Komponenten zusätzlich zu U2AF26 Bestandteil dieses Komplexes sind und unter den angewandten Bedingungen mit der ESS-RNA vernetzt wurden. Um einen indirekten Effekt, wie die Aktivierung eines RNA-

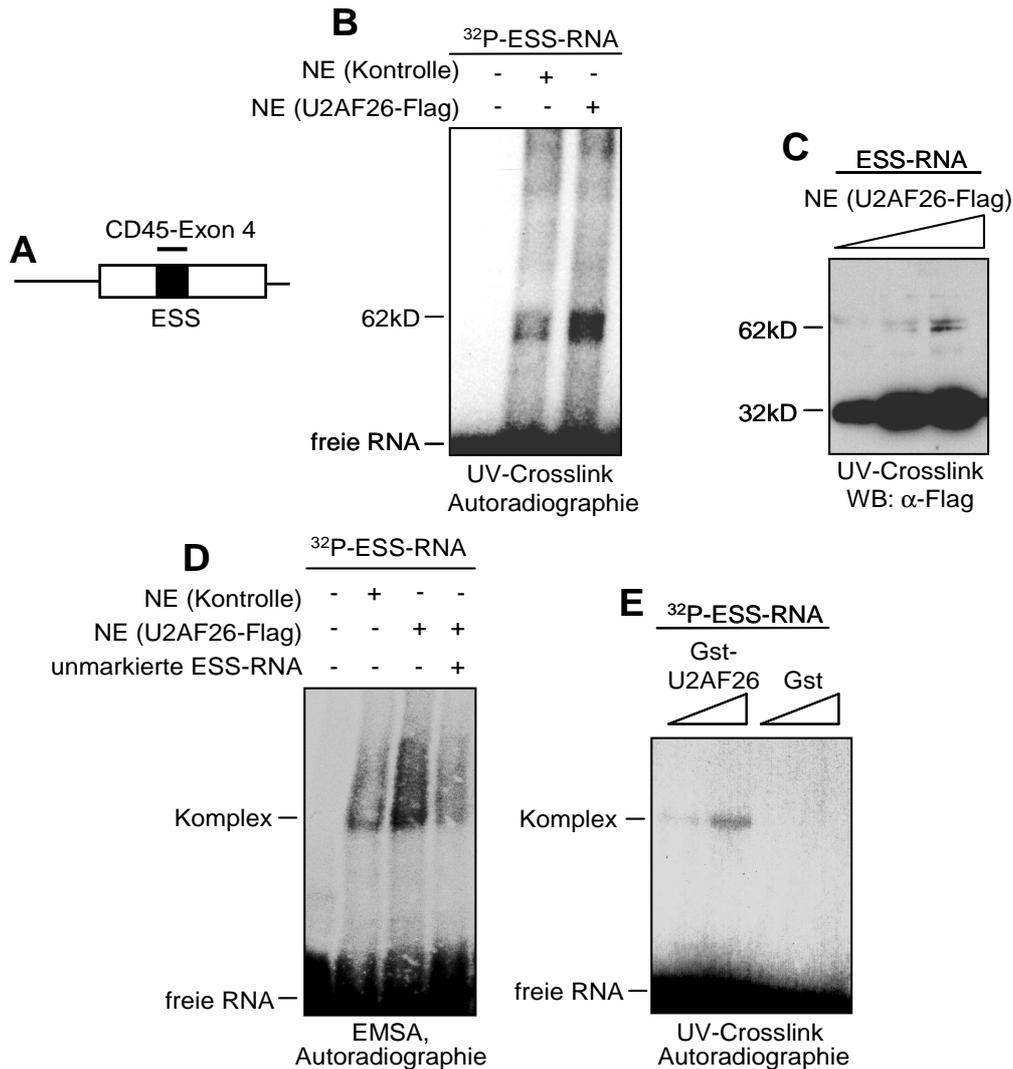


Abbildung 16: U2AF26 bindet an die ESS-Sequenz von CD45-Exon 4. A: Schematische Darstellung von CD45-Exon 4 und der ESS-Sequenz. Die markierte Sequenz wurde in den folgenden Versuchen als ESS-RNA eingesetzt. Die RNA wurde durch in vitro-Transkription in Gegenwart von α -³²P-UTP erzeugt und durch PAGE gereinigt. B: ³²P-markierte ESS-RNA wurde mit Kernextrakt (NE) von untransfizierten oder U2AF26-Flag-transfizierten Cos7-Zellen inkubiert und nach UV-Bestrahlung durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. C: Crosslink-Versuch wie in (B) (mit unmarkierter ESS-RNA), die Detektion des Komplexes erfolgte durch einen α -Flag-Westernblot. D: Kernextrakte und ESS-RNA wurden gemischt wie in (B) und durch Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA) und Autoradiographie analysiert. E: Die radioaktiv markierte ESS-RNA wurde mit gereinigtem Gst- oder Gst-U2AF26-Protein inkubiert und der Komplex detektiert wie in (B).

bindenden Proteins durch U2AF26, auszuschließen, wurde das Experiment wiederholt, wobei statt der Autoradiographie ein α -Flag-Westernblot (Abb. 16C) durchgeführt wurde. In diesem Versuch konnte ebenfalls eine 62-kD-Bande detektiert werden, was dafür spricht, dass U2AF26-Flag tatsächlich Bestandteil dieses ESS-bindenden Komplexes ist.

Um weitere Hinweise auf eine Bindung von U2AF26 an die ESS-Sequenz zu erhalten, wurden Elektromobilitäts-Shift-Assays (EMSAs) durchgeführt. In diesen Versuchen wurden die Reaktionsgemische nicht mit UV-Strahlung behandelt, sondern nach der Inkubation der RNA mit Kernextrakten direkt durch ein natives Gel aufgetrennt. Die Expression von U2AF26 korrelierte in EMSAs mit der Bildung eines Komplexes an der ESS-Sequenz, dessen Bildung durch einen Überschuss an nichtmarkierter ESS-RNA verhindert wurde (Abb. 16D). Dieses Ergebnis kann als weiterer guter Hinweis gesehen werden, dass U2AF26 die Bildung eines ESS-bindenden Komplexes induziert. Da in diesen Experimenten eine indirekte Wechselwirkung von U2AF26 mit der RNA, z.B. die Bindung von U2AF26 an ein RNA-bindendes Protein, nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden weitere RNA-Bindestudien mit gereinigtem Gst-U2AF26-Fusionsprotein durchgeführt. Um eine Spezifität der RNA-Bindung für U2AF26 zu zeigen, wurde die Bindung von Gst-U2AF26 und Gst an die ESS-Sequenz verglichen. Abbildung 16E zeigt eine Komplexbildung zwischen Gst-U2AF26 und der ESS-RNA, während eine Bindung der RNA durch Gst nicht beobachtet wurde. Dieses Experiment zeigt eine direkte Interaktion zwischen (überexprimiertem) U2AF26 und der ESS-Sequenz von CD45-Exon 4.

3.8 Erstellung U2AF26-transgener Mäuse

In den bereits vorgestellten Analysen zur Charakterisierung von U2AF26 konnte eine Regulation von CD45-alternativem Spleißen gezeigt werden, die dem Spleißmuster während der T-Zell-Aktivierung gleicht und möglicherweise durch direkte Bindung von U2AF26 an die ESS-Sequenzen der alternativ gespleißten Exons von CD45 vermittelt wird. Um diesen Mechanismus *in vivo* zu testen, wurde ein Mausmodell erstellt, in dem U2AF26 in T-Zellen überexprimiert wird. Dazu wurde die U2AF26-cDNA mit einer N-terminalen Kozak-Sequenz und einer C-terminalen Flag-Sequenz unter die Kontrolle des T-Zell-spezifischen Lck-Promotors gestellt und zur Stabilisierung der RNA mit der Intron-Exon-Struktur des „human Growth Hormone“ (hGH) verbunden. Das verwendete Konstrukt ist in Abbildung 17A schematisch gezeigt.

Ein α -Flag-Westernblot zeigte, dass die Expression des U2AF26-Flag-Transgens im Thymus deutlich stärker ist als in der Milz, was einen weitaus größeren Prozentsatz an Zellen mit Lck-Promotoraktivität im Thymus widerspiegelt (Abb. 17B links; eine unspezifische Bande ist durch ein Sternchen markiert). Mit einem U2AF26-spezifischen Antikörper wurde die Transgen-Expression ebenfalls nachgewiesen, allerdings lag die Expression in der Milz transgener Tiere und in Wildtyp-Tieren unter den hier verwendeten Bedingungen unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 17B, rechtes Bild).

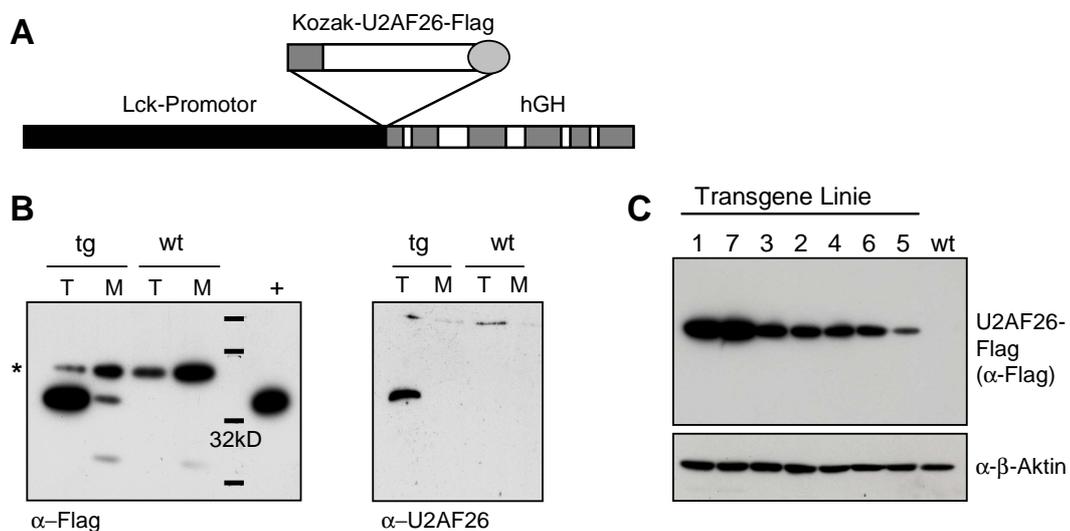


Abbildung 17: U2AF26-Flag-Expression in transgenen Mäusen. A: Schematische Darstellung des Konstrukts, das zur Generierung U2AF26-Flag-transgener Mäuse verwendet wurde. Die Erstellung der transgenen Mäuse wurde von Dr. Ralph Waldschütz und Wojciech Wegrzyn vorgenommen. hGH: human Growth Hormone B: Westernblot-Analyse von Thymus- (T) und Milz- (M) Extrakten von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) mit α -Flag- (links) und α -U2AF26-Antikörpern (rechts). Eine Positivkontrolle (+, U2AF26-Flag in Cos7-Zellen überexprimiert) und ein Größenstandard (schwarze Querbalken) sowie die Position des 32-kD-Markers sind gezeigt. Eine unspezifische Bande ist durch ein Sternchen markiert. Unter den hier verwendeten Bedingungen lag die U2AF26-Expression im Wildtyp und in der Milz transgener Tiere unterhalb der Nachweisgrenze (rechtes Bild). C: Die Stärke der Transgen-Expression in Thymusextrakten der transgenen Linien wurde durch Westernblot verglichen (oben). Als Ladekontrolle ist ein α - β -Aktin-Westernblot gezeigt (unten).

Insgesamt wurden sieben U2AF26-Flag-transgene Linien erhalten, die sich im Expressionsniveau deutlich unterschieden. Abbildung 17C zeigt einen Westernblot mit Thymusextrakten aller transgener Linien in der ungefähren Ordnung ihrer Expressionsstärke. Die Linien 1 und 7 zeigten die höchste Expression, gefolgt von den Linien 3, 2, 4, 6 mit mittlerer Expression und Linie 5, die die geringste Expression aufwies.

3.9 U2AF26-transgene Mäuse zeigen verstärkte CD45R0-Expression

Um eine *in vivo*-Funktion von U2AF26 in der Regulation von CD45-alternativem Spleißen zu zeigen, wurde RNA aus Thymus oder CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen aus der Milz von transgenen bzw. wt-Tieren mittels RT-PCR auf die CD45-Isoform-Expression untersucht. Da sich das CD45-Expressionsprofil von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterscheidet (McNeill et al., 2004), wurde zwischen diesen beiden Zellpopulationen differenziert, obwohl in den transgenen Tieren kein Defekt in der Liniendeterminierung festgestellt wurde (nicht gezeigt). Abbildung 18A zeigt, dass in peripheren T-Zellen U2AF26-Flag-transgener Tiere eine erhöhte Expression der CD45R0-Isoform vorlag, während die Expression der größeren RB-, RBC- und RABC-Isoformen abnahm. In CD4⁺-Zellen bewirkte U2AF26 außerdem eine Zunahme der CD45 Δ E4-E7-Isoform (entspricht der R0-Isoform, der zusätzlich Exon 7 fehlt, Tsujikawa et al., 2000). Da in beiden untersuchten Zellpopulationen sowohl die Expression der größeren Isoformen zurückging, als auch die Expression der CD45R0-Isoform zunahm, bewirkt die Expression des U2AF26-Flag-Transgens offensichtlich eine Exklusion der alternativ gespleißten CD45-Exons *in vivo* (Abb. 18A).

Thymozyten exprimieren hauptsächlich die CD45R0-Isoform, so dass eine mögliche Abnahme von CD45RB in den transgenen Tieren durch die RT-PCR nicht zu detektieren war (Abb. 18A). Allerdings wurde eine Zunahme der CD45 Δ E4-E7-Isoform in den U2AF26-Flag-transgenen Tieren beobachtet.

Eine Änderung in der mRNA-Expression verschiedener CD45-Isoformen sollte die Änderung der Proteinisoformen nach sich ziehen. Dies wurde sowohl in Thymozyten als auch in peripheren T-Zellen aus Wildtyp- und transgenen Tieren mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Abbildung 18B zeigt die Analyse von Thymozyten U2AF26-transgener Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Mit einem Antikörper, der spezifisch die CD45RB-Isoform bindet, war eine Abnahme der CD45RB-Expression in den transgenen Tieren deutlich messbar. Der Rückgang der RB-Expression war U2AF26-dosisabhängig: am stärksten in den transgenen Linien 1

und 7, weniger stark in den Linien 2, 3, 4, 6, und nicht detektierbar in der Linie 5 (Abb. 18B und nicht gezeigt), was der unterschiedlichen Stärke der Transgen-Expression entspricht (Abb. 17C).

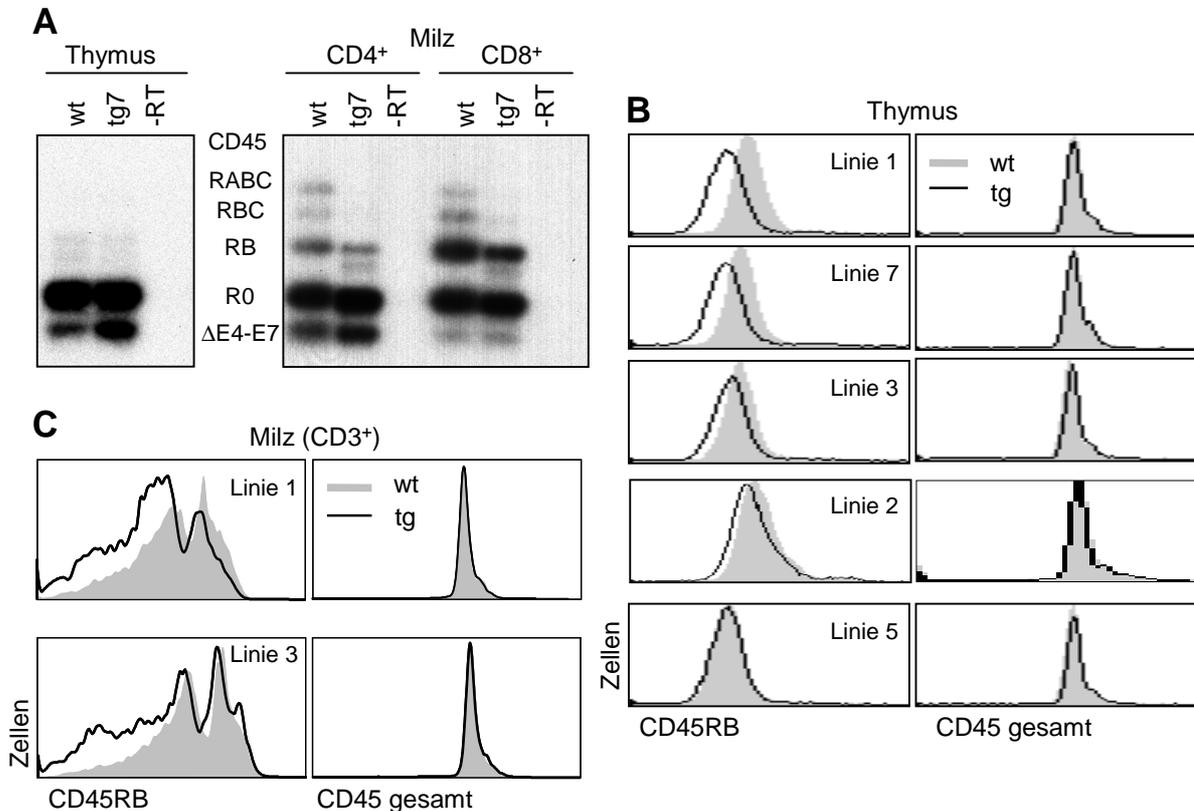


Abbildung 18: Die Expression des U2AF26-Flag-Transgens bewirkt eine Exklusion alternativ gespleißter CD45-Exons in vivo. A: RT-PCR-Analysen von Thymus (links) und peripheren T-Zellen (rechts) aus wt- und tg-Tieren (Linie 7). RNA aus den angegebenen Zellpopulationen wurde präpariert und die Produkte einer CD45-spezifischen RT-PCR durch Southernblot mit einer internen Sonde detektiert. Die beobachteten CD45-Isoformen wurden durch Klonierung und Sequenzierung verifiziert. B: FACS-Analyse von Thymozyten aus wt-Tieren (grau ausgefüllt) und verschiedenen tg-Linien (schwarz). Die Zellen wurden entweder mit einem CD45RB-spezifischen Antikörper (links) oder mit einem Antikörper, der alle CD45-Isoformen erkennt (rechts), markiert. C: FACS-Analyse von peripheren T-Zellen aus der Milz von wt- und tg-Tieren. CD3-positive Milzzellen wurden ausgewählt und analysiert wie in (B).

In einem ähnlichen Experiment konnte eine U2AF26-dosisabhängige Reduktion der CD45RB-Isoform in peripheren T-Zellen gezeigt werden (Abb. 18C). Der Effekt in CD3⁺-Milzzellen war in Linie 1 deutlich stärker ausgeprägt als in Linie 3.

Für Thymozyten als auch periphere T-Zellen wurde eine Kontrollfärbung durchgeführt, in der ein Antikörper verwendet wurde, der CD45 unabhängig von den alternativ gespleißten Exons bindet. Mit diesem Antikörper wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen transgenen Linien und Wildtyp-Tieren festgestellt (Abb.

18B, C). Daraus ergibt sich, dass die CD45-Gesamtmenge durch die Transgen-Expression nicht verändert wird, sondern ausschließlich eine Änderung der CD45-Isoform-Expression erfolgt.

In den FACS-Analysen konnte nur die Abnahme der RB-Isoform verfolgt werden, nicht aber die Zunahme von CD45R0, weil bislang kein Antikörper gegen diese murine Isoform beschrieben wurde. Da in RT-PCR-Experimenten eine Abnahme der RB-Isoform mit einer Zunahme der R0-Isoform einherging, kann dies auch für die Änderung der Proteinexpression angenommen werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die Expression von U2AF26 *in vivo* zu einer Reduktion der größeren CD45RB-, RBC- und RABC-Isoformen und zu einer Zunahme der R0-Isoform führt. Diese Befunde sind konsistent mit den Ergebnissen der CD45-Minigen-Versuche, die die gleiche Regulation gezeigt haben und somit auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind.

3.10 U2AF26-transgene Tiere zeigen einen schweren Defekt in der T-Zell-Aktivierung

In der Einleitung wurden verschiedene Versuche und Modelle beschrieben, die sich der Frage widmen, ob die unterschiedlichen CD45-Isoformen unterschiedliche katalytische Aktivitäten aufweisen. Da dies bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden konnte, war es von großem Interesse, mit der hier etablierten U2AF26-transgenen Mausmutante zu einer Klärung beizutragen. Das Modell eignet sich besonders gut, da es eine geänderte CD45-Isoform-Expression aufweist, ohne dass der CD45-Lokus selbst modifiziert worden ist.

In Proliferationsversuchen mit gereinigten T-Zellen konnte ein schwerer Defekt in U2AF26-transgenen Tieren in der TCR-abhängigen Aktivierung gezeigt werden (Abb. 19A, α -CD3+PMA). Dieser Defekt ist U2AF26-dosisabhängig, da er in Linie 1 und 7 stärker ausgeprägt war als in der schwächer exprimierenden Linie 2 (Abb. 19A und nicht gezeigt). Mit einem Stimulus, der die Signalkaskade durch den TCR umgeht und direkt Effektormoleküle unabhängig vom TCR aktiviert, war der Defekt in den transgenen Tieren deutlich schwächer ausgeprägt und die Dosisabhängigkeit

ging verloren (Abb. 19A, Ionomycin+PMA). Diese Daten sprechen für eine Störung der TCR-Signalkaskade durch die transgene Expression von U2AF26 und lassen außerdem vermuten, dass zusätzlich ein TCR-unabhängiger, weniger schwerer Proliferationsdefekt ausgelöst wird.

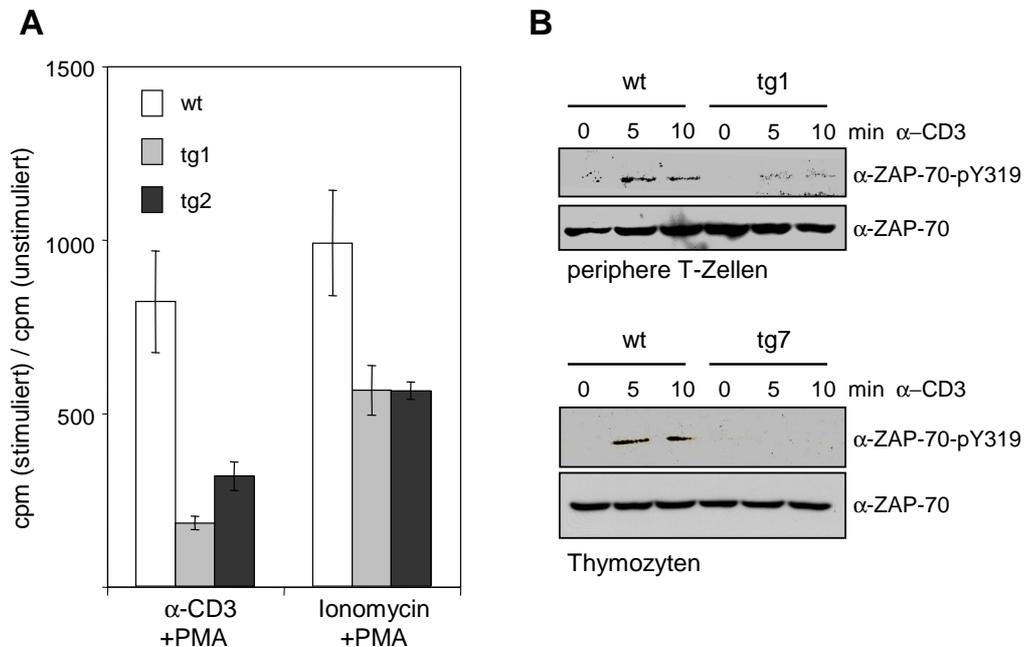


Abbildung 19: U2AF26-transgene Tiere zeigen einen schweren Defekt in der TCR-abhängigen T-Zell-Aktivierung. A: Gesamt-T-Zellen von wt- (weiß), tg1- (hellgrau) oder tg2-Tieren (dunkelgrau) wurden durch MACS (magnetic cell sorting) gereinigt und für 30 h mit den angegebenen Stimuli behandelt. Für die letzten 8 h wurde 1 μ Ci [3 H]-Thymidin zugegeben und der Einbau in die DNA mit einem β -Szintillationszähler bestimmt. Die Werte wurden in Dreifachmessungen bestimmt und sind repräsentativ für mehrere unabhängige Versuche. Die Werte sind auf die basale Proliferation unstimulierter Zellen bezogen. Für den Wildtyp wurden zwei Mäuse, Geschwister der beiden transgenen Tiere, kombiniert. B: Negativ-selektionierte T-Zellen aus der Milz (oben) oder Gesamt-Thymozyten (unten) wurden für 5 oder 10 min mit α -CD3-Antikörper stimuliert und dann mittels Westernblot erst auf die Phosphorylierung von ZAP-70-Y319 und dann als Ladekontrolle auf Gesamt-ZAP-70-Protein getestet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Versuche.

Um den Proliferationsdefekt in U2AF26-transgenen Tieren direkt mit einem molekularen Defekt in der TCR-Signalkaskade zu korrelieren, wurde die TCR-proximale Signalgebung näher untersucht. Da CD45 die Lck-katalysierte Phosphorylierung von ZAP-70-Y319 aktiviert, wurde diese Phosphorylierung als Maß für die CD45-Aktivität verwendet. In gereinigten peripheren wt-T-Zellen aus der Milz konnte eine Phosphorylierung von ZAP-70-Y319 nach 5 und 10 Minuten α -CD3-Stimulation festgestellt werden. Diese Phosphorylierung war in T-Zellen von U2AF26-transgenen Tieren (Linie 1) deutlich gehemmt (Abb. 19B oben). Ein

ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich von Thymozyten von Wildtyp- und U2AF26-transgenen Tieren (Linie 7). Im Wildtyp wurde hier ebenfalls eine Phosphorylierung von ZAP-70-Y319 nach α -CD3-Behandlung festgestellt, während dies in den transgenen Zellen nicht der Fall war (Abb. 19B, unteres Bild). Da der Defekt in zwei unabhängigen U2AF26-transgenen Linien nachgewiesen wurde, kann ein linienspezifischer Effekt ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse korrelieren den Proliferationsdefekt der transgenen T-Zellen mit einem Defekt in der proximalen TCR-Signalgebung, die durch ein gestörtes CD45-Spleißmuster hervorgerufen werden könnte. Die offenbar reduzierte CD45-Aktivität in den U2AF26-transgenen Tieren lässt den Schluss zu, dass die von den transgenen Tieren vermehrt exprimierte CD45R0-Isoform weniger gut zur T-Zell-Aktivierung beitragen kann als die größeren Isoformen.

3.11 Gfi1 inhibiert die Exon-Exklusion durch U2AF26, aber U2AF26 reguliert die Aktivität von Gfi1 nicht

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war ein „Two-Hybrid“-Versuch mit dem Transkriptionsfaktor Gfi1 als Köderprotein, in dem eine Interaktion mit U2AF26 festgestellt wurde. Es war deshalb naheliegend, den Einfluss von Gfi1 auf das alternative CD45-Spleißen in Gegenwart und Abwesenheit von U2AF26 zu testen. Zu diesem Zweck wurde das CD45-Minigen zusammen mit steigenden Mengen Gfi1 mit oder ohne U2AF26 in RK13-Zellen transfiziert und das CD45-Spleißmuster analysiert. Wie in Abbildung 20 gezeigt ist, konnte die U2AF26-vermittelte Exon-B-Exklusion durch das Hinzutitrieren von Gfi1 teilweise rückgängig gemacht werden (Abb. 20A, oberes Bild, vergleiche Spuren 1-6). Dieser Effekt wurde nicht beobachtet, wenn Gfi1 in Abwesenheit von U2AF26 in RK13-Zellen exprimiert wurde (Abb. 20A, Spuren 7-10); in diesem Fall blieb das CD45RB:R0-Verhältnis nahezu konstant. Die Phosphoimager-Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 20B gezeigt und bestätigt dieses Verhalten. Diese Versuche lassen die Vermutung zu, dass Gfi1 spezifisch alternative Spleißprozesse reguliert, an denen U2AF26 beteiligt ist, aber in Abwesenheit von U2AF26 keinen Einfluss auf das alternative Spleißen hat.

Die Vermutung, dass Gfi1 alternative Spleißvorgänge nur über eine Interaktion mit U2AF26 reguliert, konnte durch ein Experiment erhärtet werden, in dem Gfi1 zusammen mit dem CD45-Minigen in 3T3-Fibroblasten transfiziert wurde. Überraschenderweise konnte in dieser Zelllinie eine Gfi1-abhängige Expression der CD45RB-Isoform beobachtet werden, was in RK13-Zellen nicht der Fall war (Abb. 20C). Eine mögliche Erklärung bietet die Beobachtung, dass 3T3-Fibroblasten eine starke endogene U2AF26-Expression aufwiesen, während das Protein in RK13-Zellen kaum detektierbar war (Abb. 20D). Die Fähigkeit von Gfi1 zur Regulation des CD45-alternativen Spleißens korreliert demnach auch hier mit der (endogenen) Expression von U2AF26. Die unterschiedlichen U2AF26-Expressionsniveaus in 3T3- und RK13-Zellen stimmen auch mit der Expression der CD45R0-Isoform in Minigen-transfizierten Zellen überein. In 3T3-Zellen mit einer starken endogenen U2AF26-Expression war die CD45R0-Isoform vorherrschend, während in RK13-Zellen mit geringer U2AF26-Expression CD45R0 und CD45RB in etwa gleichem Verhältnis vorlagen (Abb. 20A, C). Diese Daten ergänzen die Minigen-Versuche mit überexprimierten Proteinen, in denen gezeigt wurde, dass die Expression von U2AF26 zur Bildung der CD45R0-Isoform führt.

Da diese Experimente eine Regulation der U2AF26-Aktivität durch Gfi1 zeigten, war es von Interesse zu untersuchen, ob U2AF26 ebenfalls in der Lage ist, die Funktion von Gfi1 als transkriptionellem Repressor zu regulieren. In einem Reporter-genversuch konnte gezeigt werden, dass die Gfi1-vermittelte Repression eines Zielgens durch Hinzutitrieren von U2AF26 nicht verändert wird (Abb. 20E). Die Gfi1-U2AF26-Bindung scheint sich demnach bevorzugt oder sogar ausschließlich auf die Aktivität von U2AF26 auszuwirken.

3.12 Gfi1 Δ 140-257 hat keinen Effekt auf die U2AF26-Aktivität, wirkt aber als transkriptioneller Repressor

Um zu zeigen, dass Gfi1 die Aktivität von U2AF26 durch direkte Interaktion der beiden Proteine reguliert, wurde der Effekt der Gfi1 Δ 140-257-Deletionsmutante auf die U2AF26-vermittelte Exon-Exklusion untersucht. Diese Mutante war nicht mehr

in der Lage, U2AF26 zu binden (Abb. 12) und sollte deshalb keinen Effekt auf die U2AF26-Aktivität haben, wenn eine direkte Proteininteraktion dafür notwendig wäre. Abbildung 21 zeigt, dass genau dies der Fall ist. Während wt-Gfi1 eine Umkehr des durch U2AF26-Expression hervorgerufenen Verlusts der CD45RB-Isoform bewirkte (Abb. 21A Spuren 6-9, oberes Bild), hatte die Expression von Gfi1 Δ 140-257 keinen Effekt auf das CD45-Spleißmuster (Abb. 21A Spuren 3-5, oberes Bild). Die Expression von Gfi1 und Gfi1 Δ 140-257 wurde per Westernblot nachgewiesen, um ungleiche Proteinmengen als Grund für den fehlenden Effekt auszuschließen (Abb. 21A, unteres Bild). (Im hier gezeigten Westernblot scheint die U2AF26-Menge in den Spuren mit der Gfi1 Δ 140-257-Mutante größer zu sein als in den Spuren mit Gfi1. Es handelt sich jedoch um die Überlagerung von U2AF26 mit einem Abbauprodukt der Gfi1 Δ 140-257-Mutante.)

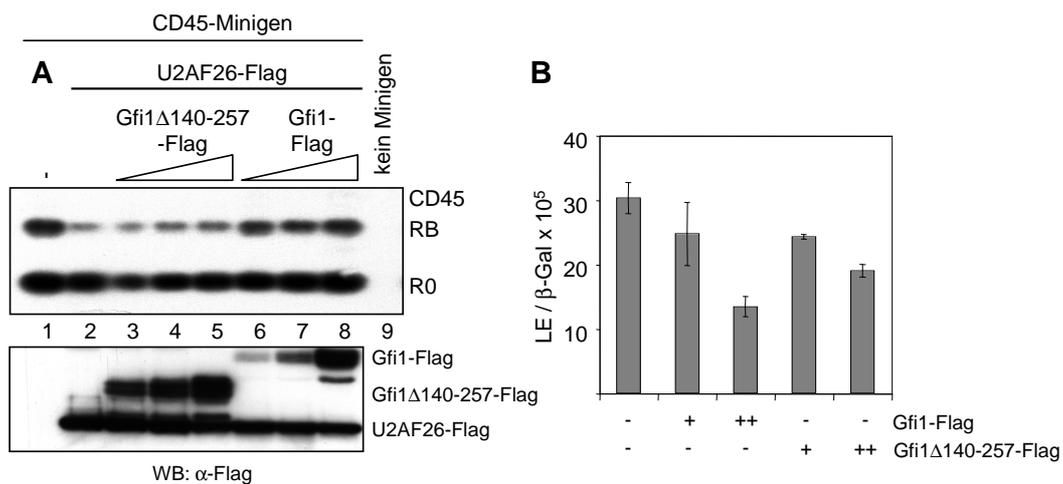


Abbildung 21: Gfi1 Δ 140-257 beeinflusst das CD45-alternative Spleißen nicht, wirkt aber noch als transkriptioneller Repressor. A: RK13-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden und dem CD45-Minigen transfiziert und CD45-Isoformen wurden untersucht wie in Abbildung 14 beschrieben (oben). Eine Expressionskontrolle wurde mittels Westernblot durchgeführt (unten). B: Reporterexperimente wurden durchgeführt wie in Abbildung 20 beschrieben.

In einem Reporterexperiment konnte gezeigt werden, dass die Gfi1 Δ 140-257-Mutante (in leicht reduziertem Ausmaß) in der Lage war, als transkriptioneller Repressor zu wirken (Abb. 21B). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der Effekt von Gfi1 auf das U2AF26-vermittelte alternative Spleißen nicht durch transkriptionelle Regulation hervorgerufen wird. Vielmehr sind die für die Effekte

auf das alternative Spleißen und die Transkription verantwortlichen Domänen innerhalb des Gfi1-Proteins voneinander separierbar.

3.13 Gfi1-defiziente Mäuse exprimieren vermehrt CD45R0

In den bisher beschriebenen Ergebnissen zeichnet sich ein Modell ab, in dem U2AF26 einen Ausschluss alternativ gespleißter Exons aus der CD45-mRNA bewirkt und Gfi1, wahrscheinlich durch direkte Bindung an U2AF26, diesem Effekt entgegenwirken kann. In diesem Modell sollte sich der Verlust von Gfi1 in der gleichen Weise bemerkbar machen wie die Überexpression von U2AF26, da sich die

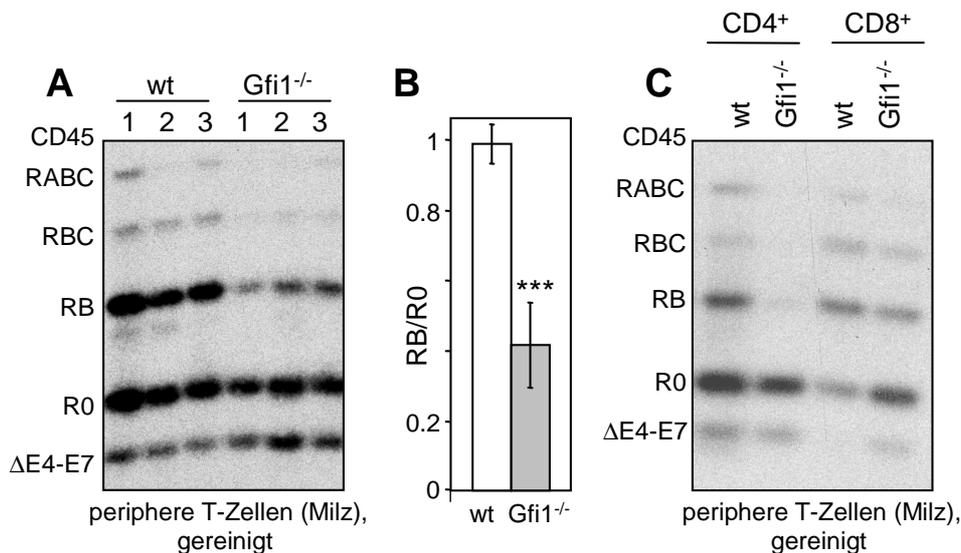


Abbildung 22: Gfi1-defiziente Mäuse zeigen verstärkte CD45R0-Expression. A: T-Zellen aus der Milz von drei Gfi1-defizienten und drei wt-Mäusen wurden durch MACS gereinigt und die CD45-Isoform-Expression wie in Abbildung 18 beschrieben durch RT-PCR und Southernblot analysiert. B: Phosphoimager-Quantifizierung des in (A) gezeigten Southernblots. Dargestellt ist das Verhältnis CD45RB/CD45R0. C: CD4- und CD8-positive T-Zell-Subpopulationen von wt- und Gfi1-defizienten Mäusen wurden durch MACS aufgereinigt und wie in (A) auf die CD45-Isoform-Expression analysiert.

Abwesenheit eines negativ wirkenden Regulators (Gfi1) positiv auf die Aktivität des Zielproteins (U2AF26) auswirken sollte. Dieses Modell wurde durch die Analyse des CD45-Spleißmusters Gfi1-defizienter Mäuse überprüft. In Abbildung 22 sind RT-PCR-Analysen von gereinigten T-Zellen aus der Milz von drei Mauspaaren (Gfi1^{-/-} und wt) gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass Gfi1-defiziente Tiere im Verhältnis mehr CD45R0 exprimierten und dass die Expression größerer CD45-Isoformen

deutlich reduziert war (Abb. 22A). Die Quantifizierung durch Phosphoimager-Analyse bestätigte dieses Verhalten (Abb. 22B). Weil sich das CD45-Expressionsmuster in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterscheidet, wäre eine Veränderung des CD45-Spleißmusters theoretisch auch durch eine Verschiebung des Verhältnisses von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen möglich. Da bekannt ist, dass die Liniendeterminierung in Gfi1-defizienten Tieren zu Gunsten der CD8⁺-Linie verschoben ist (Yücel et al., 2003), wurden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Populationen aufgereinigt und separat untersucht. In Abbildung 22 ist gezeigt, dass auch in diesen Subpopulationen ein Defekt im CD45-Spleißen in den Gfi1-defizienten Tieren vorhanden war, der dem in Gesamt-T-Zellen beobachteten Defekt gleicht (Abb. 22C). Der Defekt scheint in CD4⁺-T-Zellen stärker ausgeprägt zu sein, da in dieser Population unter den hier verwendeten Bedingungen fast ausschließlich die CD45R0-Isoform nachgewiesen wurde, während in CD8⁺-Zellen aus Gfi1-defizienten Tieren noch Spuren von größeren CD45-Isoformen sichtbar waren.

3.14 Gfi1-defiziente Mäuse zeigen CD45-Spleißdefekte in zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen

Neben dem bereits erwähnten Phänotyp in der CD4-CD8-Liniendeterminierung haben Gfi1-defiziente Tiere weitere Defekte in der T-Zell-Entwicklung; z.B. bilden Gfi1-defiziente Mäuse mehr Gedächtnis-T-Zellen als wt-Tiere (Pargmann und Möröy, Manuskript in Vorbereitung). Da Gedächtnis-T-Zellen mehr CD45R0 exprimieren als naive T-Zellen, wäre eine Verschiebung des CD45RB:R0-Verhältnisses hin zur R0-Form auch durch eine stärkere Bildung von Gedächtnis-T-Zellen zu erklären. Um diese Möglichkeit als Ursache für den Defekt im CD45-Spleißen in Gfi1-defizienten Tieren auszuschließen, wurden periphere T-Zellen nach der Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L getrennt analysiert. Die Expression dieser Oberflächenmarker definiert drei unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen: naive T-Zellen (CD44^{lo}CD62L^{hi}), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD44^{hi}CD62L^{hi}) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD44^{hi}CD62L^{lo}). Diese drei Zellpopulationen wurden durch FACS-Analyse voneinander getrennt und auf ihre CD45RB-Expression untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die

erwähnten Oberflächenmarker und CD4 bzw. CD8 und einem CD45RB-spezifischen Antikörper markiert. Abbildung 23 zeigt drei Populationen, in denen die CD45RB-Expression in Gfi1-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert war, während eine Änderung der Gesamt-CD45-Expression nicht beobachtet wurde (nicht gezeigt): CD4-positive zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie CD8-positive Effektor-Gedächtnis-T-Zellen. In den drei anderen Populationen war nur eine marginale Änderung der CD45RB-Expression zu erkennen, was durch eine

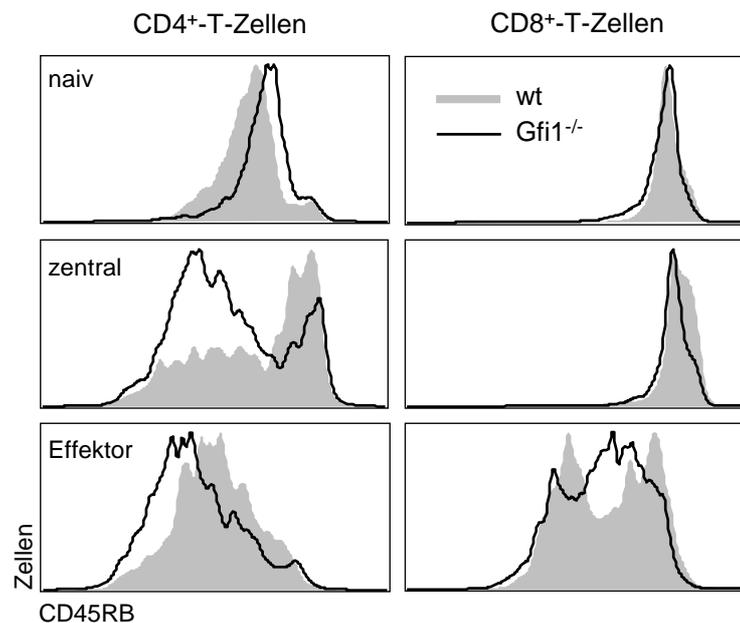


Abbildung 23: Gfi1-defiziente Mäuse zeigen verminderte CD45RB-Expression in zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen. Milzzellen aus wt- oder Gfi1-defizienten Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 und CD44, CD62L und CD45RB markiert. Die Zellen wurden nach der Expression von CD44 und CD62L in naive, zentrale Gedächtnis- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen unterteilt und die CD45RB-Expression in den einzelnen Populationen wurde zwischen wt- (grau ausgefüllt) und Gfi1-defizienten Zellen (schwarze Linie) verglichen.

schwächere Gfi1-Expression im Wildtyp (Yücel et al., 2004) und damit verbunden einer schwächeren Auswirkung der Gfi1-Defizienz erklärbar ist. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Veränderung in der CD45-Isoform-Expression in Gfi1-defizienten Tieren tatsächlich durch einen Spleißdefekt hervorgerufen wird und nicht durch eine unterschiedlich starke Ausbildung verschiedener T-Zell-Subpopulationen.

3.15 Gfi1^{-/-}-T-Zellen zeigen einen Proliferationsdefekt und Fehler in der TCR-Signalkaskade nach α -CD3-Stimulation

In den folgenden Experimenten wurde die Auswirkung des CD45-Spleißdefekts in Gfi1-defizienten Mäusen untersucht. Dazu wurden die gleichen Versuchsanordnungen verwendet wie für die U2AF26-transgenen Tiere beschrieben. Abbildung 24 macht deutlich, dass T-Zellen von Gfi1-defizienten Mäusen nur sehr eingeschränkt in der Lage sind, auf einen TCR-abhängigen Stimulus mit Proliferation zu reagieren. Vielmehr war die Reaktion auf Stimulation mit α -CD3+PMA stark beeinträchtigt, während der TCR-unabhängige Stimulus Ionomycin+PMA eine normale Reaktion hervorrief (Abb. 24A). Da es sich also nicht um einen generellen Proliferationsdefekt handelt, ist es wahrscheinlich, dass ein Defekt in der TCR-Signalkaskade für die fehlende Reaktion auf α -CD3+PMA-Stimulation verantwortlich ist. Wie für U2AF26-transgene Tiere gezeigt, konnte ein

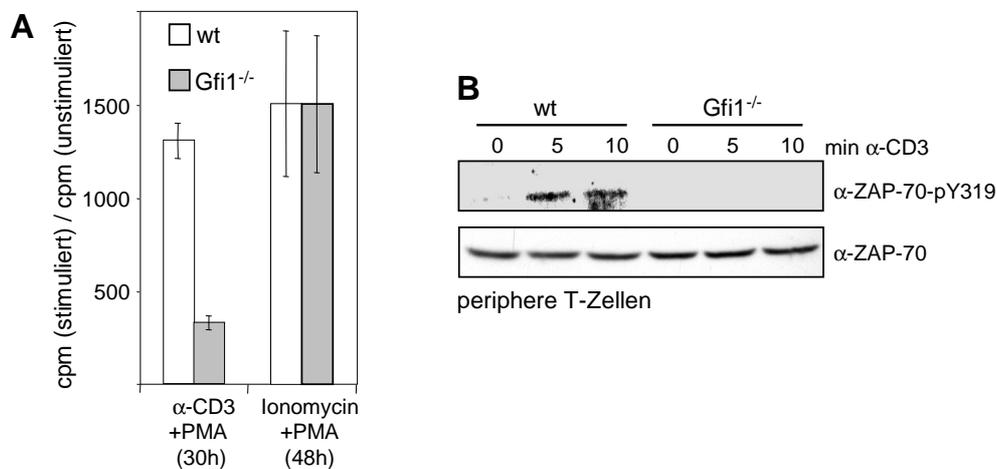


Abbildung 24: Gfi1-defiziente T-Zellen zeigen einen Defekt in der CD3-abhängigen Aktivierung. Proliferations-Versuche (A) und ZAP-70-Aktivierungsversuche (B) wurden durchgeführt wie in Abbildung 19 beschrieben. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Versuche.

Fehler in der TCR-Signalkaskade auch in T-Zellen Gfi1-defizienter Mäuse nachgewiesen werden. Abbildung 24B zeigt einen Vergleich des Phosphorylierungsgrades von ZAP-70-Y319 als Reaktion auf α -CD3-Stimulation in wt- und Gfi1-defizienten T-Zellen. Es wird deutlich, dass dieser frühe Schritt in der T-Zell-Aktivierung nur in Wildtyp-Zellen effizient ablief, in Gfi1-defizienten T-Zellen jedoch massiv gestört war.

3.16 Die Expression von Gfi1 und U2AF26 wird während der T-Zell-Aktivierung mit unterschiedlicher Kinetik reguliert

Um die Rolle von endogenem Gfi1 und U2AF26 in den alternativen Spleißprozessen während der T-Zell-Aktivierung weiter zu klären, wurde die Regulation der Expression der beiden Proteine analysiert. Dazu wurden stimulierte, gereinigte T-Zellen von Wildtyp-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Westernblot auf die Proteinexpression von Gfi1 und U2AF26 getestet. Abbildung 25A zeigt eine schnelle, transiente Erhöhung der Gfi1-Expression nach 6 h, die ihren Höhepunkt nach 24 h erreichte und dann wieder abnahm. Der Westernblot zeigt auch, dass während der Aktivierung die Bildung einer kleineren Form von Gfi1 (k) induziert wurde, während die größere, ursprünglich vorhandene Form (l) nach 48 h fast vollständig verschwand. Die Induktion von U2AF26 folgte einer langsameren Kinetik: Nach 6 h war noch keine Änderung im Vergleich zum unstimulierten Zustand bemerkbar; die Expression stieg erst nach 24 h stark an und blieb auch 48 h nach der Stimulation auf diesem erhöhten Niveau (Abb. 25A). Das Verhältnis von U2AF26 und Gfi1 während der T-Zell-Aktivierung korrelierte genau mit den beobachteten Änderungen in der CD45-Isoform-Expression, wobei eine stärkere U2AF26-Expression die Bildung der CD45R0-Form begünstigte. Nach 6 h verschob sich das Gfi1:U2AF26-Verhältnis zu Gunsten von Gfi1, was mit einer transienten Erhöhung der Expression der CD45RB-Isoform korrelierte (Abb. 25B und Deans et al., 1992). Nach längerer Stimulation ging die CD45-Expression zunehmend zur R0-Isoform über, was mit einer gesteigerten Expression von U2AF26 nach 24 h und einer nachlassenden Expression von Gfi1 nach 48 h einherging (Abb. 25A, B).

In einem weiteren *in vivo*-Modell konnte ein größeres U2AF26:Gfi1-Verhältnis ebenfalls mit einer stärkeren Expression der CD45R0-Isoform korreliert werden. Im Vergleich zwischen aufgereinigten naiven ($CD44^{lo}CD62L^{hi}$) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ($CD44^{hi}CD62L^{lo}$) waren beide Proteine, Gfi1 und U2AF26, in den Effektor-Gedächtnis-T-Zellen stärker exprimiert. Allerdings schien die Expression von U2AF26 deutlich erhöht, während sich für Gfi1 nur eine leichte Steigerung der Expression detektieren ließ, so dass in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen

ein größeres U2AF26:Gfi1-Verhältnis vorlag als in naiven T-Zellen (Abb. 25C). Damit einhergehend wurde eine verstärkte Expression der CD45R0-Isoform in den Gedächtnis-T-Zellen detektiert (Abb. 25D).

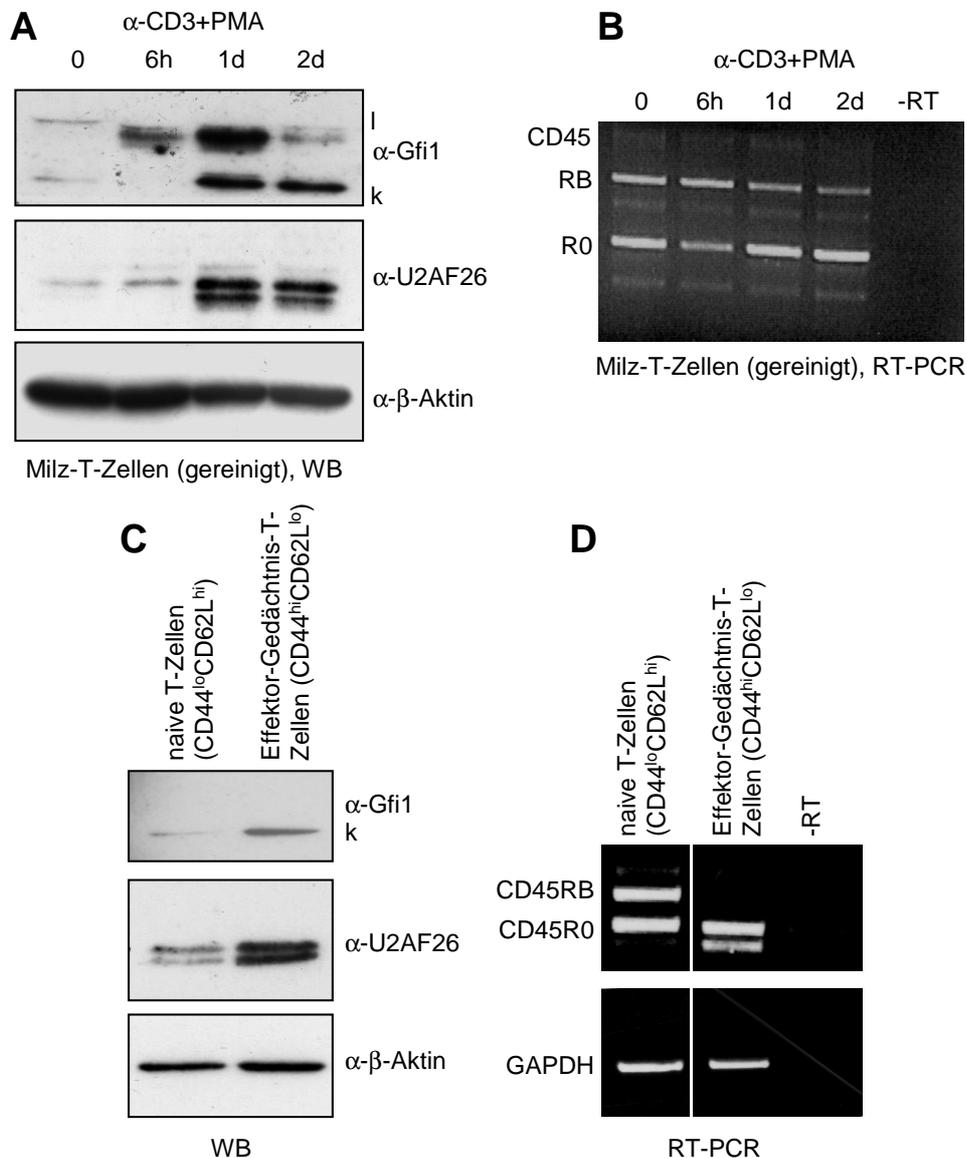


Abbildung 25: Die Expression von Gfi1 und U2AF26 während der T-Zell-Aktivierung korreliert mit der Änderung der CD45-Isoform-Expression. A: Milz-T-Zellen wurden durch MACS gereinigt und für die angegebene Zeit mit α -CD3+PMA stimuliert. Die Zellen wurden dann durch Westernblot auf die Expression von U2AF26, Gfi1 und β -Aktin getestet. Es sind zwei Gfi1-Isoformen sichtbar, die durch l (lang) und k (kurz) markiert sind. B: T-Zellen wurden gereinigt und stimuliert wie in (A) und dann durch RT-PCR auf die CD45-Expression untersucht. C: Naive oder Effektor-Gedächtnis-T-Zellen wurden sortiert und wie in (A) durch Westernblot analysiert. D: Zellpopulationen wie in (C) wurden durch RT-PCR wie in (B) untersucht.

4 Diskussion

4.1 CD45-alternatives Spleißen und Regulation durch U2AF26 und Gfi1

Die hier beschriebenen Daten lassen sich in dem in Abbildung 26 gezeigten Schema zusammenfassen. In diesem Modell führt die Expression von U2AF26 zur Bildung der CD45R0-Isoform, die eine geringere Aktivität in der T-Zell-Aktivierung aufweist als die größeren CD45-Isoformen. Der Ausschluss der alternativ gespleißten CD45-Exons A, B und C wird möglicherweise durch direkte Bindung von U2AF26 an die ESS-Sequenzen in den jeweiligen Exons vermittelt. Die Expression von Gfi1 führt zu einer Komplexbildung zwischen U2AF26 und Gfi1 und damit zu einer Inaktivierung von U2AF26. Gfi1 kehrt so die U2AF26-vermittelte Bildung der CD45R0-Isoform um und führt zur Expression der größeren, stärker aktiven CD45-Isoformen. Das Fehlen von Gfi1 hat in diesem Modell die gleiche Auswirkung wie eine vermehrte U2AF26-Expression, nämlich eine verstärkte Bildung der weniger aktiven CD45R0-Isoform, ein Effekt, der in den jeweiligen Mausmutanten beobachtet wurde.

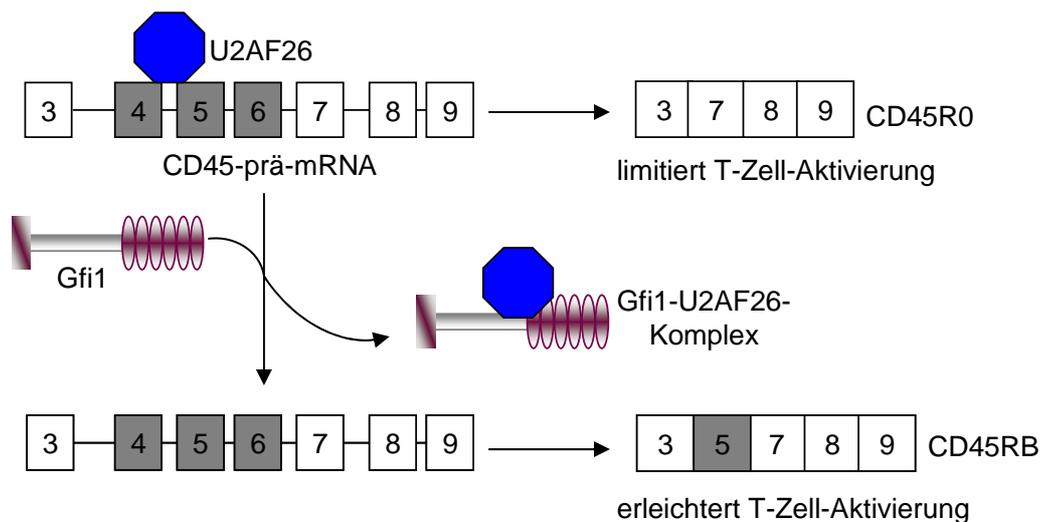


Abbildung 26: Modell zur Funktion von Gfi1 und U2AF26 im CD45-alternativen Spleißen und die Auswirkung auf die T-Zell-Aktivierung.

Im humanen System wurden in verschiedenen Studien Defekte in der Tyrosinphosphatase CD45 mit Erkrankungen assoziiert. Ein komplettes Fehlen von CD45 bewirkt einen SCID-Phänotyp (Kung et al., 2000), während eine veränderte Aktivität von CD45 mit weniger ausgeprägten Defekten korreliert. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine stille Mutation in der ESS-Sequenz von Exon 4 (C77G) die Bindung eines regulatorischen Proteins an die ESS-Sequenz stört, was zu einer verminderten Exklusion dieses Exons aus der mRNA führt (Lynch und Weiss, 2001) und möglicherweise zur Ausbildung von Multipler Sklerose beiträgt (Jacobsen et al., 2000). Diese Korrelation wurde in anderen Studien jedoch nicht bestätigt und ist deshalb umstritten (z.B. Barcellos et al., 2001). Eine gestörte CD45-Expression wurde auch mit der Ausbildung weiterer Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. So wurde z.B. vorgeschlagen, dass eine Änderung der CD45-Isoform-Expression die Bildung von Typ-I-Diabetes begünstigt (Sempe et al., 1993). Diese Beispiele verdeutlichen die entscheidende Rolle der exakten Regulation der CD45-Aktivität und erklären das große Interesse an den alternativ gespleißten CD45-Isoformen.

4.2 Die Gfi1-U2AF26-Interaktion und die Interaktionsdomänen

Die Interaktion von Gfi1 und U2AF26 konnte in einer Reihe verschiedener Versuche mit überexprimierten und endogenen Proteinen bestätigt werden, so dass die Existenz eines Gfi1-U2AF26-Komplexes *in vivo* wahrscheinlich ist. Bei ungefähr gleichem Expressionsniveau von Gfi1 und U2AF26-Flag in Cos7-Zellen lassen sich etwa gleiche Mengen an Gfi1 und U2AF26 mit einem α -Flag-Antikörper (co)präzipitieren, was auf eine 1:1-Stöchiometrie im Gfi1-U2AF26-Komplex hindeutet. In verschiedenen Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass der unbeteiligte Transkriptionsfaktor p53 nicht mit U2AF26 und Gfi1 nicht mit U2AF35, U2AF65 oder hnRNP-A interagiert. Da eine unspezifische Interaktion von einerseits U2AF26 mit Transkriptionsfaktoren und andererseits Gfi1 mit Komponenten der Spleißmaschinerie somit ausgeschlossen werden kann, scheint die Gfi1-U2AF26-Interaktion sehr spezifisch zu sein. Besonders das Fehlen einer Komplexbildung

zwischen Gfi1 und U2AF35 war überraschend, da die für die Gfi1-Interaktion verantwortliche Domäne zwischen U2AF26 und U2AF35 stark konserviert ist. Wahrscheinlich wird durch einige Abweichungen in der Sequenz die Interaktion soweit geschwächt, dass sie unter den hier verwendeten stringenten Versuchsbedingungen nicht detektiert werden konnte. Als Positivkontrolle in diesen Versuchen wurde die Interaktion von Gst-U2AF26 mit U2AF65 aus Kernextrakten von HeLa-Zellen verwendet (Shepard et al., 2002). Dass Gfi1 nicht mit U2AF65 interagiert, was zu erwarten wäre, wenn U2AF26 simultan mit Gfi1 und U2AF65 interagieren könnte, kann als Hinweis auf eine sich gegenseitig ausschließende Interaktion von U2AF26 mit Gfi1 einerseits und U2AF26 mit U2AF65 andererseits gewertet werden. Dieser Befund unterstützt das hier vorgeschlagene Modell, in dem die Aktivität von U2AF26 durch Gfi1 reguliert wird. Wenn eine Interaktion mit Gfi1 die Wechselwirkung mit Komponenten der Spleißmaschinerie ausschließt, könnte U2AF26 im Komplex mit Gfi1 nicht mehr an der Regulation alternativer Spleißvorgänge beteiligt sein. Dieser Effekt könnte *in vivo* auch durch unterschiedliche Lokalisationen des Gfi1-U2AF26-Komplexes und der prä-mRNA erreicht werden (siehe unten).

Die Interaktionsdomäne innerhalb von Gfi1, die für eine stabile Wechselwirkung mit U2AF26 verantwortlich ist, schließt Bereiche des Mittelteils und der Zinkfingerdomäne ein. Da eine Gfi1-Mutante mit deletiertem Zinkfinger in einem „Two-Hybrid“-Versuch noch in der Lage war, mit U2AF26 zu interagieren, die gleiche Mutante aber in einem *in vitro*-Interaktionsexperiment keine U2AF26-Bindung zeigt, scheinen mehrere Sequenzelemente unabhängig voneinander an der Interaktion beteiligt zu sein. Eine partielle Deletion dieser Sequenzen führt zu einer Schwächung, nicht aber zu einem kompletten Verlust der Bindung, die je nach Versuchsbedingungen noch detektiert werden kann.

In U2AF26 konnten Bereiche um den von Exon 7 kodierten zweiten Zinkfinger als essentiell für die Interaktion mit Gfi1 ermittelt werden. Die natürlich vorkommende Spleißvariante U2AF26 Δ E7 weicht in mehrfacher Hinsicht vom Verhalten des vollständigen Proteins ab: U2AF26 Δ E7 interagiert nicht mit Gfi1 und es ist im Gegensatz zu U2AF26 im Zytoplasma lokalisiert. Die Möglichkeit, dass U2AF26

nur durch die Interaktion mit Gfi1 in den Kern gelangt, ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall das gesamte kernständige U2AF26 mit Gfi1 komplexiert und dadurch inaktiviert sein müsste. Zusätzlich zeigt U2AF26 Δ E7 einen Verlust der Aktivität auf das CD45-alternative Spleißen. Ob dieser Defekt durch die zytoplasmatische Lokalisation hervorgerufen wird, oder ob U2AF26 Δ E7 tatsächlich nicht mehr in der Lage ist, alternatives Spleißen zu regulieren, konnte nicht abschließend geklärt werden.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Spleißfaktoren eine dynamische Lokalisation zwischen Kern und Zytoplasma aufweisen und dass zytoplasmatisch lokalisierte Spleißfaktoren verschiedene regulatorische Aufgaben während der Translation wahrnehmen. Dazu zählen unter anderem der mRNA-Export aus dem Kern und die Regulation der mRNA-Stabilität (Lemaire et al., 2002; Huang et al., 2003). Daraus ergeben sich Spekulationen über die Funktion der U2AF26 Δ E7-Mutante: Die Exklusion von Exon 7 könnte sowohl die Rolle von U2AF26 als Spleißfaktor im Kern regulieren, als auch andere, im Zytoplasma angesiedelte Funktionen von U2AF26 aktivieren; Studien zur Identifizierung solcher Funktionen sind bisher aber noch nicht durchgeführt worden.

Die Colokalisation von U2AF26 und Gfi1 in punktförmigen Strukturen im Zellkern liefert einen weiteren Hinweis auf die physiologische Relevanz der Interaktion. Eine Lokalisation in distinkten Kerndomänen ist für beide Proteine unabhängig voneinander beschrieben worden (Rödel et al., 2000; Shepard et al., 2002). Ob Gfi1 und U2AF26 *in vivo* in der gleichen Kerndomäne lokalisiert sind, ist jedoch nicht geklärt. Möglich wäre auch, dass durch eine verstärkte Gfi1-Expression die Lokalisation von U2AF26 aus dem ursprünglichen Kernkompartiment in die Gfi1-ständige Domäne wechselt. Diese veränderte Lokalisation wäre ein einfaches Modell zur Erklärung der Regulation von U2AF26 durch Gfi1. In diesem Fall würde die Regulation auf einer räumlichen Trennung von U2AF26 und prä-mRNA-Substraten beruhen. Im Gegensatz dazu ist die Regulation der Gfi1-Aktivität durch eine U2AF26-vermittelte Änderung der Gfi1-Lokalisation unwahrscheinlich, da die Repression eines Gfi1-sensitiven Reportergens durch die Coexpression von U2AF26 nicht beeinflusst wurde.

4.3 U2AF26 und U2AF35 in CD45-Exon-Exklusion und ESS-Bindung

Bisher ist für U2AF26 nur beschrieben, dass es U2AF35 an der 3'-Spleiß-Stelle ersetzen kann und dort durch die Rekrutierung des Spleißosoms positiv auf den Spleißvorgang wirkt; U2AF26 sollte deshalb eine erhöhte Inklusion alternativ gespleißter Exons bewirken (Shepard et al., 2002). In einem CD45-Minigen-Versuch wurde jedoch festgestellt, dass U2AF26 in erster Linie eine Exklusion von CD45-Exon B verursacht. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen U2AF26-spezifischen Effekt handelt, da U2AF35 zwar eine ähnliche Tendenz aufweist, allerdings in einer um Größenordnungen abgeschwächten Effizienz. Ein weiterer, deutlich schwächerer Effekt in dem Minigen-Versuch war die Abnahme der CD45RBC-Isoform und parallel dazu die Zunahme der CD45RAB-Isoform. Dieser Wechsel von CD45RBC zu RAB wurde sowohl von U2AF26 als auch von U2AF35 bewirkt und unterliegt deshalb vermutlich einem anderen Mechanismus als die fast ausschließlich von U2AF26 hervorgerufene Exklusion von Exon B. Aus diesem Versuch ergeben sich zwei wichtige Schlussfolgerungen: Erstens bewirkt U2AF26 eine Exklusion alternativ gespleißter CD45-Exons, speziell Exon B, und könnte somit *in vivo* am „activation induced alternative splicing“ mitwirken. Da dieser Effekt spezifisch durch U2AF26 hervorgerufen wurde, haben zweitens U2AF26 und U2AF35 nichtredundante Funktionen.

Um die neue Funktion von U2AF26 erklären zu können, wurde nach einem Mechanismus gesucht, der es U2AF26 erlaubt, die Aufnahme alternativ gespleißter Exons entweder zu fördern oder zu inhibieren. Eine vergleichbare Situation ist für den neuronenspezifischen Spleißfaktor Nova-1 beschrieben worden, der je nach Position der Bindestelle an der prä-mRNA zur Inklusion oder zur Exklusion alternativ gespleißter Exons führt (Dredge et al., 2005). In Anlehnung an dieses Modell kann ein Mechanismus postuliert werden, in dem die Bindung von U2AF26 an die 3'-Spleiß-Stelle zur Rekrutierung des Spleißosoms und damit zu einer verstärkten Aufnahme des Exons in die reife mRNA führt (Shepard et al., 2002), während eine Bindung von U2AF26 an die ESS-Sequenzen der alternativ gespleißten CD45-Exons den Ausschluss dieser Exons bewirkt. Dieser inhibierende Effekt nach

der ESS-Bindung ließe sich durch eine räumlich falsche Anordnung der Komponenten des Spleißosoms erklären, was einen produktiven Zusammenbau des Spleißosoms verhindern würde. Möglich wäre auch, dass die ESS-Sequenz von mehreren Proteinen gebunden wird, eines davon U2AF26, die gemeinsam einen Ausschluss des entsprechenden Exons aus der reifen mRNA bewirken (siehe Kapitel 4.5). RNA-Interaktions-Studien mit Kernextrakten von U2AF26-überexprimierenden Zellen ebenso wie mit gereinigtem Gst-U2AF26-Fusionsprotein legen eine ESS-Bindung durch U2AF26 nahe; eine Bestätigung dieser Interaktion mit endogenem U2AF26 steht allerdings noch aus. Da eine Bindung von U2AF26 bisher nur an das AG-Dinukleotid der 3'-Spleiß-Stelle beschrieben wurde, wäre eine ESS-Bindung durch U2AF26 ein bemerkenswerter Befund. Eine mögliche Erklärung bietet die Beobachtung, dass weder U2AF26 noch U2AF35 eine genau festgelegte RNA-Sequenz binden, sondern vielmehr beide eine breite Spezifität aufweisen. So wird sichergestellt, dass verschiedene 3'-Spleiß-Stellen, die abgesehen vom AG-Dinukleotid kaum konserviert sind, durch U2AF26 und/oder U2AF35 gebunden und effizient gespleißt werden können. Da einige der von U2AF26 präferentiell gebunden Sequenzen der ESS-Sequenz ähneln (Shepard, 2004), trägt die nicht genau festgelegte Bindungsspezifität von U2AF26 möglicherweise dazu bei, dass das Protein neben der 3'-Spleiß-Stelle auch die ESS-Sequenz in den alternativ gespleißten CD45-Exons binden kann. Dies könnte eine plausible Erklärung für die gegensätzlichen Effekte von U2AF26 liefern: Je nach Sequenz könnte U2AF26 entweder an die 3'-ss binden und dort die Aufnahme des Exons in die reife mRNA fördern, oder an die ESS-Sequenz, was eine Exklusion des Exons begünstigen würde.

Da außerdem gezeigt werden konnte, dass bestimmte Sequenzen in Nachbarschaft zum AG eine präferentielle Bindung von U2AF26 oder U2AF35 auslösen (Shepard et al., 2002; Shepard, 2004), kann dieses Modell auch herangezogen werden, um die unterschiedlichen Aktivitäten von U2AF26 und U2AF35 zu erklären. U2AF35 ist ebenfalls in der Lage, einen Ausschluss von CD45-Exon B aus der reifen mRNA zu bewirken, allerdings in einer sehr stark abgeschwächten Form. Der Grund könnte eine verringerte Affinität von U2AF35 zur ESS-Sequenz sein. U2AF35 würde in diesem Modell mit großer Affinität an die 3'-Spleiß-Stelle binden, dort die Aufnahme des Exons in die mRNA bewirken und erst bei sehr hohen

Konzentrationen auch die ESS-Bindestelle besetzen, wo es zu einer teilweisen Exon-Exklusion führen würde. Experimentelle Evidenzen für eine unterschiedliche Affinität von U2AF26 und U2AF35 zu der ESS-Sequenz liegen bislang allerdings nicht vor.

Es ist außerdem unklar, ob die hohe U2AF35-Konzentration, die nötig wäre, um zu einem Ausschluss alternativ gespleißter Exons zu führen, *in vivo* erreicht wird. Deshalb handelt es sich bei dem beobachteten Effekt möglicherweise um eine physiologisch nicht relevante Funktion von U2AF35, die erst durch eine massive Überexpression auftritt. Diese Vermutung wird auch durch die beschriebenen siRNA-Versuche gestützt: Der „knock-down“ von U2AF26 bewirkte eine Zunahme der CD45RB-Isoform, während der U2AF35 „knock-down“ keinen Effekt auf das CD45-Spleißmuster hatte. Da U2AF26 und U2AF35 in verschiedenen Geweben differentiell exprimiert werden (Shepard et al., 2002), kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass unter bestimmten Voraussetzungen, wie etwa der Abwesenheit von U2AF26, auch U2AF35 eine Rolle in der Exklusion alternativ gespleißter CD45-Exons spielt.

Für AG-abhängige Exons wäre zu erwarten, dass der „knock-down“ von U2AF35 eine verminderte Exon-Aufnahme in die reife mRNA bewirkt. Unter den gegebenen Bedingungen hatte der Verlust von U2AF35 jedoch keinen detektierbaren Effekt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Aufnahme AG-abhängiger Exons in die mRNA von U2AF35 oder U2AF26 katalysiert werden kann, so dass das Fehlen eines der beiden Proteine durch das jeweils andere kompensiert wird. Alternativ wäre es auch möglich, dass die Exons 3 und 7 (die in der vom CD45-Minigen exprimierten CD45R0-Isoform enthalten sind) AG-unabhängige Exons sind und deshalb für ihre Aufnahme in die mRNA kein U2AF35 benötigen. Da diese Experimente mit dem CD45-Minigen durchgeführt wurden, das nur die Exons 3-7 enthält, könnte sich die Situation *in vivo*, mit einer 33 Exons beinhaltenden CD45-prä-mRNA, wieder anders darstellen.

4.4 Gfi1 als Antagonist von U2AF26 im CD45-alternativen Spleißen

Die Interaktion von Gfi1 mit U2AF26 ließ die Vermutung zu, dass Gfi1 ebenfalls eine Rolle in der Regulation des CD45-alternativen Spleißens spielt. In einem CD45-Minigen-Versuch in RK13-Zellen konnte zunächst jedoch kein signifikanter Effekt von Gfi1 auf das CD45-Spleißmuster nachgewiesen werden. Wenn Gfi1 jedoch mit U2AF26 coexprimiert wurde, war Gfi1 in der Lage, den U2AF26-vermittelten Verlust der CD45RB-Isoform teilweise aufzuheben. Der Vergleich der Proteinmengen von Gfi1 und U2AF26 in diesem Versuch liefert eine mögliche Erklärung, warum der Effekt von U2AF26 durch Gfi1 nur teilweise aufgehoben wurde. Es ist eine deutlich größere Menge an U2AF26 vorhanden, so dass (bei einer angenommenen 1:1-Stöchiometrie im Gfi1-U2AF26-Komplex) U2AF26 nicht vollständig durch Gfi1 komplexiert würde. Da eine Gfi1-Mutante, die nicht mehr mit U2AF26 interagiert, auch in Gegenwart von U2AF26 keinen Einfluss auf das CD45-alternative Spleißen hatte, kann davon ausgegangen werden, dass eine direkte Interaktion von Gfi1 mit U2AF26 für diese Gfi1-Funktion essentiell ist.

Im Gegensatz zu dem Ergebnis aus RK13-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Gfi1 in mit dem CD45-Minigen transfizierten 3T3-Fibroblasten eine Zunahme der CD45RB-Isoform bewirkt. Dieser Befund korreliert mit der Expression von endogenem U2AF26, da in 3T3-Zellen eine sehr viel stärkere U2AF26-Expression als in RK13-Zellen nachgewiesen wurde. (Anzumerken ist hier, dass der verwendete Antikörper gegen das murine Protein hergestellt wurde, RK13-Zellen aber aus Kaninchen stammen, was eine theoretische Erklärung für die fehlende Detektion von U2AF26 in RK13-Zellen ist. Dieser Punkt wird aufgrund der hohen Homologie von U2AF-Proteinen auch zwischen verschiedenen Spezies im Weiteren aber als irrelevant angesehen.) Dieser Befund stützt die Theorie, dass Gfi1 alternative Spleißvorgänge nur über eine Interaktion mit U2AF26 reguliert. In Abwesenheit oder bei niedrigen Konzentrationen von U2AF26, wie in RK13-Zellen der Fall, sollte Gfi1 dann keine Auswirkung auf das CD45-Spleißmuster haben, während in einem Umfeld mit U2AF26-Expression, wie 3T3-Zellen oder transfizierten RK13-Zellen,

eine Beeinflussung des alternativen Spleißens stattfinden sollte; all diese Erwartungen konnten experimentell bestätigt werden.

In verschiedenen Arbeiten konnte eine koordinierte Regulation von Transkription und Spleißen gezeigt werden. Beispielsweise hat die Struktur des Promoters einen Einfluss auf das alternative Spleißen (Cramer et al., 1997) und das Spleißosom kann durch direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Davies et al., 1998). Die hier beschriebene Interaktion von Gfi1 mit U2AF26 und die dadurch hervorgerufene Regulation von CD45-alternativem Spleißen durch den Transkriptionsfaktor Gfi1 stellt eine neue Verbindung zwischen Transkriptions- und Spleißmaschinerie dar und verdeutlicht die enge Verbindung dieser beiden Prozesse.

4.5 *In vivo*-Modelle zur Analyse vom CD45-alternativen Spleißen: Gfi1-defiziente und U2AF26-transgene Mäuse

Eine antagonistische Rolle von U2AF26 und Gfi1 im CD45-alternativen Spleißen wird auch durch den Befund gestützt, dass T-Zellen von Gfi1-defizienten und U2AF26-transgenen Mäusen den gleichen Phänotyp, nämlich eine verstärkte Expression der CD45R0-Isoform, aufweisen. In U2AF26-transgenen Mäusen konnte ein Verlust der CD45RBC- und RABC-Isoformen sowie eine verringerte Menge an CD45RB und eine erhöhte Expression der CD45R0-Form sowohl in Thymozyten als auch in peripheren T-Zellen aus der Milz nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Minigen-Versuchen und verdeutlicht, dass U2AF26 eine Exklusion der alternativ gespleißten CD45-Exons auch *in vivo* bewirken kann. Allerdings scheint der Effekt auf die CD45RB-Isoform weniger stark ausgeprägt, als die Minigen-Versuche vermuten ließen. Der Grund könnte zum einen darin liegen, dass in Wildtyp-Zellen bereits endogenes U2AF26 vorhanden ist und zusätzliches U2AF26 keine starke ergänzende Wirkung entfaltet. Da U2AF26 in naiven T-Zellen kaum detektierbar ist und die Proteinmenge während der T-Zell-Aktivierung massiv zunimmt, was mit einer verstärkten CD45R0-Expression einhergeht, ist dieser Erklärungsansatz alleine nicht ausreichend. Zusätzlich wäre es denkbar, dass U2AF26 *in vivo* die Bildung der CD45R0-Isoform reguliert, aber mit anderen Faktoren zusammenwirkt, um die Exklusion der alternativ gespleißten Exons zu

erreichen. Für die Möglichkeit, dass ein weiterer Faktor in diesen Prozess involviert ist, spricht der in RNA-Interaktions-Studien mit der ESS-Sequenz nachgewiesene U2AF26-haltige Komplex, der aufgrund der Größe von 62 kD noch weitere Komponenten enthalten muss. In diesem Modell wären mindestens zwei Faktoren essentiell für das regulierte CD45-Spleißen, einer davon U2AF26, und die Überexpression von einem der beiden Faktoren würde keinen kompletten Ausschluss der alternativ gespleißten Exons bewirken. Alternativ ließe sich die Größe des in den RNA-Crosslink-Experimenten beobachteten Komplexes auch durch ein U2AF26-Dimer erklären. Die Existenz von U2AF35-Homodimeren konnte bestätigt werden (Chusainow et al., 2005), was ein Hinweis auf das Vorhandensein von U2AF26 in dimerer Form sein könnte. Experimentelle Hinweise auf eine U2AF26-Dimerbildung liegen bisher allerdings nicht vor.

In zwei aktuellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hnRNP-L an die ESS-Sequenzen aller drei alternativ gespleißter CD45-Exons bindet und deren Exklusion aus der reifen mRNA bewirkt (Rothrock et al., 2005; Tong et al., 2005). Da die U2AF26-Expression während der T-Zell-Aktivierung stark ansteigt, was für hnRNP-L nicht beobachtet wurde (Rothrock et al., 2005), ist ein Zusammenwirken der beiden Proteine in der CD45-Exon-Exklusion ein attraktives Modell und Gegenstand aktueller Arbeiten. Es ist ebenfalls denkbar, dass U2AF26 und hnRNP-L überlappende Funktionen haben, aber differentiell exprimiert werden, so dass es vom Zelltyp und dem Aktivierungszustand abhängig ist, welches der beiden Proteine vorhanden ist, um das alternative Spleißen zu regulieren. Die Bindung von U2AF26 oder hnRNP-L an die ESS-Sequenzen könnte auch durch die genauen Sequenzen und eventuell unterschiedliche Bindungsspezifitäten reguliert werden.

Da in Gfi1-defizienten Tieren eine verstärkte Bildung von Gedächtnis-T-Zellen erfolgt (Pargmann und Möröy, Manuskript in Vorbereitung), musste ausgeschlossen werden, dass dies der Grund für das geänderte CD45-Spleißmuster ist. Durch FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Gfi1 in Zellpopulationen, die im Wildtyp eine hohe Gfi1-Expression aufweisen (Yücel et al., 2004), zu einem teilweisen Verlust der CD45RB-Expression führt, während naive T-Zellen, die im Wildtyp kaum Gfi1 exprimieren, nicht betroffen waren. In RT-PCR-Analysen spiegelt sich der auf der Proteinebene gezeigte stärkere Verlust der CD45RB-Isoform

in CD4⁺-T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺-T-Zellen wider. Außerdem konnte durch die RT-PCR-Versuche gezeigt werden, dass sich in Gfi1-defizienten T-Zellen das CD45RB:R0-Verhältnis zugunsten der CD45R0-Isoform verschiebt und der in der Durchflusszytometrie detektierte Verlust der CD45RB-Isoform nicht mit dem Auftreten einer größeren CD45-Isoform einhergeht. Diese Experimente zeigen eine Beeinträchtigung des CD45-alternativen Spleißens in genau definierten, stark eingegrenzten T-Zell-Subpopulationen und lassen deshalb auf einen Spleißdefekt anstatt auf einen Defekt in der Liniendeterminierung in Gfi1-defizienten Mäusen schließen. Sollte Letzteres der Fall sein, wäre eine Änderung in der CD45RB-Expression in den einzelnen Populationen nicht zu erwarten, sondern lediglich eine vermehrte Bildung von Gedächtnis-T-Zellen mit verringerter CD45RB-Expression. Dieses Phänomen trägt möglicherweise zum beobachteten CD45-Spleißmuster in Gesamt-T-Zellen bei, allerdings nicht als alleinige Ursache.

Um die Hinweise auf eine regulatorische Rolle von Gfi1 und U2AF26 während der T-Zell-Aktivierung weiter zu verstärken, wurden die Expressionsmuster beider Proteine während der T-Zell-Aktivierung untersucht. Für das Gfi1-Protein konnte eine Induktion nach der T-Zell-Aktivierung gezeigt werden, die mit der beschriebenen Regulation der Gfi1-mRNA übereinstimmt (Yücel et al., 2004). Zudem konnte eine starke Erhöhung der U2AF26-Expression in aktivierten T-Zellen festgestellt werden. Die Expressionsprofile von Gfi1 und U2AF26 sprechen für eine regulatorische Funktion der beiden Proteine im CD45-alternativen Spleißens während der T-Zell-Aktivierung und stimmen gut mit den Ergebnissen aus den Minigen-Versuchen überein, in denen U2AF26 eine verstärkte CD45R0 und Gfi1 eine verstärkte CD45RB-Expression bewirkt haben.

24 h nach der T-Zell-Aktivierung wurde die Induktion einer kleineren Gfi1-Isoform beobachtet, die 48 h nach Stimulation und in Effektor-T-Zellen die vorherrschende Form darstellt. Die Identität dieser Isoform ist ungeklärt; allerdings ist eine N-terminale Modifikation, wie z.B. die Verwendung eines internen ATGs, unwahrscheinlich, da der zur Detektion verwendete Antikörper gegen die Aminosäuren 14-27 gerichtet ist (Schmidt et al, 1998b). U2AF26 liegt ebenfalls in zwei Formen vor, was auch hier für eine Proteinmodifikation spricht und einen Hinweis auf eine komplexe Regulation der U2AF26-Funktion darstellen könnte.

Auch wenn Art und Funktion der Modifikationen von U2AF26 und Gfi1 nicht oder nur unzureichend verstanden sind, sprechen die vorhandenen Daten für ein (vereinfachendes) Modell, in dem Gfi1 die U2AF26-Aktivität reguliert. Theoretisch ließen sich aber auch andere Modelle konstruieren: Beispielsweise sind die Ergebnisse teilweise konsistent mit einem Modell, in dem U2AF26 die Gfi1-Aktivität regulieren und so zu einer vermehrten Expression eines weiteren Spleißfaktors führen würde, der eine Exklusion alternativ gespleißter CD45-Exons bewirken könnte. In einem Reportergergenversuch konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Gfi1, einen Gfi1-sensitiven Promotor zu reprimieren, durch die Coexpression von U2AF26 nicht beeinflusst wird. Dieser Befund validiert das vorgeschlagene Modell, in dem Gfi1 die Aktivität von U2AF26 reguliert, und spricht gegen einen indirekten Mechanismus über die Regulation der Gfi1-vermittelten transkriptionellen Repression durch U2AF26.

4.6 Unterschiedliche Aktivitäten verschiedener CD45-Isoformen

In den vorgestellten Experimenten wurde die Grundlage geschaffen, um einen Mechanismus zu postulieren, der die Involvierung von Gfi1 und U2AF26 im alternativen Spleißen und damit der T-Zell-Aktivierung beschreibt. Aus den Ergebnissen lassen sich aber auch Rückschlüsse über die kontrovers diskutierte Aktivität verschiedener CD45-Isoformen ziehen. Durch die starke Glykosilierung der alternativ gespleißten Bereiche des CD45-Proteins haben die verschiedenen CD45-Isoformen einen erheblich veränderten Raumbedarf. Wie in der Einleitung beschrieben, verweisen viele Modelle daher auf sterische Gründe, um eine unterschiedliche Aktivität der verschiedenen Isoformen zu erklären, kommen jedoch zu konträren Ergebnissen (Leitenberg et al., 1999; Xu und Weiss, 2002; Irls et al., 2003). Uneinheitliche Ergebnisse wurden auch in verschiedenen *in vivo*-Systemen erzielt, in denen versucht wurde, die Aktivität der einzelnen Isoformen zu bestimmen (Chui et al., 1994; Kozieradzki et al., 1997; Ogilvy et al., 2003). In all diesen Studien wurde der CD45-Lokus selbst manipuliert, beispielsweise wurden in CD45-defizienten Zelllinien oder Mäusen die cDNAs für die jeweiligen CD45-Isoformen

exprimiert. Unterschiedlich hohe Expressionsniveaus der einzelnen Isoformen und die nicht vorhandene Möglichkeit zur Bildung von CD45-Heterodimeren sind mögliche Fehlerquellen, die zu den unterschiedlichen Ergebnissen dieser Studien beigetragen haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unabhängige Mausmutanten vorgestellt, in denen der endogene CD45-Lokus intakt ist, deren CD45-Expressionsniveau nicht verändert ist, die aber einen Defekt in der CD45-Isoform-Expression aufweisen. In beiden Mausmutanten korreliert eine verstärkte Expression der kleineren CD45R0-Isoform mit einem erheblichen Defekt in der T-Zell-Aktivierung. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die CD45R0-Isoform eine geringere Aktivität aufweist als die größeren Isoformen und stützt somit das Modell, demzufolge die verstärkte Expression der CD45R0-Isoform nach der T-Zell-Aktivierung einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt, um die Aktivierung zu limitieren.

Aus den hier vorgestellten Experimenten ergibt sich kein endgültiger Beweis für die These, dass der Proliferationsdefekt in Gfi1-defizienten und U2AF26-transgenen Tieren durch einen Defekt im CD45-alternativen Spleißen hervorgerufen wird. Allerdings sprechen einige Befunde deutlich für diese Theorie: Sowohl in Gfi1-defizienten als auch in U2AF26-transgenen T-Zellen war die fehlende Proliferation nach Stimulation mit α -CD3+PMA nicht auf einen generellen Proliferationsdefekt zurückzuführen, da eine TCR-unabhängige Stimulation (Ionomycin+PMA) zu einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Proliferation führte. Zusätzlich konnte in beiden Mausmutanten ein Defekt in der TCR-proximalen Signalkaskade nachgewiesen werden. Da CD45 nach Antigenstimulation Lck durch Dephosphorylierung aktiviert und Lck wiederum ZAP-70 phosphoryliert, kann der Phosphorylierungszustand von ZAP-70 als direktes Maß für die CD45-Aktivität verwendet werden. In beiden Mausmutanten wurde in diesen Experimenten eine verminderte ZAP-70-Y319-Phosphorylierung beobachtet, was auf eine reduzierte CD45-Aktivität hindeutet. Weil keine weiteren Hinweise auf andere Ursachen vorliegen, die zu einem Defekt in der TCR-Signalkaskade in den beiden Mausmodellen führen könnten, ist es wahrscheinlich, dass die vermehrte Expression der weniger aktiven CD45R0-Isoform in T-Zellen von Gfi1-defizienten und U2AF26-transgenen Mäusen zu dem beobachteten Phänotyp führt.

Konsistent mit den bestehenden Daten wäre ein Modell, in dem die anhaltende U2AF26-Expression nach der T-Zell-Aktivierung zu einer vermehrten Bildung der weniger aktiven CD45R0-Isoform führt und so zu einer Limitierung der T-Zell-Aktivierung beiträgt, während die frühe, transiente Expression von Gfi1 die T-Zell-Aktivierung verstärkt.

4.7 Weiterführende Arbeiten

Zur Überprüfung und Bestätigung des vorgeschlagenen Modells, sowie zur weiteren Analyse der Funktion von U2AF26, ist die Konstruktion U2AF26-defizienter Mäuse von offensichtlicher Relevanz. Erste Versuche mit diesem Ziel sind bereits unternommen worden und Gegenstand aktueller Bemühungen.

Der Mechanismus der U2AF26-vermittelten Exon-Exklusion könnte in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden. Beispielsweise ist die ESS-Bindung von U2AF26 bislang nur mit überexprimierten Proteinen gezeigt und eine Bestätigung dieser Bindung *in vivo* steht noch aus. Weiterhin offen ist die Frage nach potentiellen Interaktionspartnern von U2AF26, die gemeinsam eine Exon-Exklusion bewirken könnten. Hier soll z.B. ein mögliches Zusammenspiel von U2AF26 und hnRNP-L untersucht werden.

Unbeantwortet ist auch die Frage, ob die Regulation alternativer Spleißvorgänge durch U2AF26 und Gfi1 spezifisch für CD45 ist, oder ob andere prä-mRNAs auf eine ähnliche Weise reguliert werden. Die Erstellung von Expressionsanalysen von Gfi1-defizienten und U2AF26-transgenen Tieren durch DNA-Chip-Experimente hat bereits weitere potentielle Kandidaten ergeben, die momentan analysiert werden.

Ein Anknüpfungspunkt für weitere Arbeiten ist auch die Lokalisation der U2AF26 Δ E7-Mutante im Zytoplasma. Diese Mutante könnte Funktionen unabhängig vom alternativen Spleißen erfüllen, deren Analyse Einblicke in die Rolle von U2AF26 in anderen zellulären Prozessen gewähren sollte.

5 Material und Methoden

Im Folgenden werden Arbeitsprotokolle beschrieben, nach denen die gezeigten Versuche durchgeführt wurden. Es wird dabei auf die ausführliche Darstellung von Standardmethoden verzichtet, auch werden nicht alle Rezepte für Standardlösungen angegeben. Diese sind in Protokoll- und Rezeptsammlungen, z.B. Sambrook und Russell, 2001, oder in Datenblättern der Hersteller enthalten.

5.1 Zellkultur

Da alle Zellkulturarbeiten unter Standardbedingungen durchgeführt wurden, wird auf eine genaue Beschreibung verzichtet. Die folgenden adhärenenten Zelllinien wurden in D-MEM (Sigma) + 10 % FBS (Biochrom) + 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) kultiviert: Cos7 (Affeniere), NIH-3T3 (Maus-Fibroblasten), HeLa (humanes Zervixkarzinom) und RK13 (Kaninchen-Nieren-Epithel). Jurkat-Zellen (humanes T-Zell-Lymphom) wurden in Suspension in RPMI-1640 + 10 % FBS (Biochrom) + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin (Invitrogen) kultiviert.

5.2 Manipulation von DNA, Herstellung von Plasmiden

Alle Arbeiten zur Manipulation von DNA und Herstellung von Plasmiden wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001).

Um Expressionsplasmide zu erzeugen, wurde das gewünschte DNA-Fragment durch PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) amplifiziert, wobei die Oligonukleotide (Primer) mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen versehen waren, so dass die amplifizierten Fragmente geschnitten und in den gewünschten Vektor ligiert werden konnten. Als Expressionsvektor wurde ein von pEGFP-N3 (Invitrogen) abstammender Vektor benutzt, der anstatt des EGFP-Proteins ein Flag-Epitop (DNA-Sequenz: taggatccatggactacaaagacgatgacgataaatagtagagc, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen) C-terminal an das exprimierte Protein anfügt (CMV-Flag-N3)

(hergestellt von Bernd Rödel). Dafür wurden PCR-Primer verwendet, die das amplifizierte Fragment 5' mit einer XhoI- und 3' mit einer BamHI-Schnittstelle ausstatten. In den meisten Fällen wurde das PCR-Produkt zunächst in den TopoTA-Vektor (Invitrogen) und anschließend in CMV-Flag-N3 ligiert. Folgende Primer wurden verwendet:

U2AF26for: cgctcgagatggctgaatatttagcttcg	U2AF26rev: cgggatccgaagcgaccatgccggtgtct
U2AF26Δ40for: cgctcgagatgactttcagccagaccatagtc	U2AF35for: cgctcgagatggcgggaataacttggcctcc
U2AF35rev: cgggatccaaatcgccagatctctccc	Gfi1rev: cgggatcctttgagtccatgctgagtct
Gfi1for: ccctcgagatgccgcgctcattcctggt	Gfi1Δ49for: ccctcgagatggagccccgagagcgttt
Gfi1ΔZn-Frev: cgggatcctttgtaggagccgccgcca	Gfi1_140rev: caccaggtgccgcaggtcaga
Gfi1Δ190for: ccctcgagatgcagccagggagctgcggggt	Gfi257for+140: gacctgcggcacctggtgtgcatcaaatgcagcaag

Ein Gfi1-Expressionskonstrukt ohne Flag-Tag wurde durch die folgenden Primer generiert: Gfi1start: aacatagccgcgctcattcctg und Gfi1end: aactgcagttatcatttgagtccatgctg, das Produkt wurde in den TopoTA-Vektor und das EcoRI-Fragment in pcDNA3 ligiert.

PCRs wurden in 50 µl mit den folgenden Komponenten durchgeführt: je 20 pmol spezifische Primer (MWG Biotech), 0,2 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP, Matrizen-DNA (100-500 ng Plasmid oder genomische DNA), Taq-Polymerase und entsprechenden Puffer. Für einige PCRs (z.B. zur Amplifikation der GC-reichen Gfi1-cDNA) wurde der Reaktionsansatz außerdem mit 10 % DMSO versetzt. Je nach Bedarf wurde eine gewöhnliche Taq-Polymerase oder ein Enzym mit Korrekturlesefunktion (Phusion DNA Polymerase, Finnzymes) verwendet. Standard-PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Reaktionsprofil durchgeführt: 94°C, 1:30 min – (94°C, 30s – 59°C, 30s – 72°C, 30s)₃₀ – 72°C, 2min – 4°C. Für größere

DNA-Fragmente wurde die Elongationszeit verlängert (1 min pro 1 kb), die Zyklenzahl und Anlagerungstemperatur wurde je nach Bedarf variiert.

Die korrekte Sequenz aller verwendeten DNAs wurde durch Sequenzierung verifiziert. Sequenzierungen wurden vom Zentralen Sequenzierservice der Medizinischen Fakultät am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

5.3 Minigen-Versuche und RT-PCR

Für die Arbeiten mit RNA wurde nur mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet. Bidestilliertes Wasser wurde dazu mit 0,1 % DEPC versetzt, mehrere Stunden bei RT gerührt und dann autoklaviert.

5×10^4 3T3-Fibroblasten oder RK13-Zellen pro Ansatz wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und 24 h später mit Rotifect (Roth) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. 100 ng CD45-Minigen pro Transfektion und entsprechende Expressionsplasmide (10 – 1000 ng) wurden eingesetzt. Um in allen Ansätzen eine vergleichbare Transfektionseffizienz zu erhalten, wurde die Gesamt-DNA-Menge in jedem Ansatz durch Auffüllen mit Leervektor (CMV-Flag-N3) konstant gehalten. 24 h nach der Transfektion wurde RNA mittels peqGOLD RNAPure (Peqlab) nach den Herstellerangaben präpariert. Die RNA wurde in 25-30 μ l (bei großer Menge an Ausgangsmaterial bis 100 μ l) DEPC-Wasser aufgenommen. Nach einem DNaseI-Verdau (8 μ l RNA, 1 μ l Puffer, 1 μ l DNaseI, 30 min, 37°C) (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) wurde die RNA mit 1 μ l DNase-Stop-Lösung, 1 μ l Zufallshexamer-Primern (300 ng) und 1 μ l dNTP-Mix (jeweils 10 mM) versetzt, für 5 min auf 70°C erhitzt, auf Eis gekühlt und dann mit 1 μ l RNaseOut, 2 μ l DTT, 4 μ l Reaktionspuffer und 1 μ l SuperScriptII-Reverser-Transkriptase gemischt (alle Materialien Invitrogen). Es folgten 10 min Inkubation bei 25°C, 40 min 42°C, 15 min 70°C und nach Zugabe von 1 U RNaseH (Takara) 30 min 37°C. Die cDNA wurde mittels PCR, Agarose-Gelelektrophorese und ggf. Southernblot analysiert. Um die Identität der PCR-Produkte zu bestätigen, wurden diese kloniert (TopoTA Cloning Kit, Invitrogen) und die Plasmide mit M13-Primern sequenziert.

Für PCR-Analysen von Maus-T-Zellen wurden Einzelsuspensionen aus Milz präpariert, Erythrozyten lysiert (Red Blood Cell Lysis Buffer, Sigma) und die gewünschten T-Zell-Populationen durch die entsprechenden Kits (Pan-T-Zell, CD4⁺, CD8⁺) und einen autoMACS aufgereinigt (Miltenyi). Die Reinheit der resultierenden T-Zellen wurde durch FACS-Analyse verifiziert. RNA wurde hergestellt und per PCR untersucht wie beschrieben. Die Identität aller CD45-Isoformen wurde durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt.

Folgende Oligonukleotide wurden für die Analyse von CD45-Isoformen verwendet:

CD45mausfor: aaacacctacaccagtgat	CD45mausrev: ttagctggagcacatgagtc
CD45mausforsonde: ctaccacaacgaagcaa	CD45humanfor: atgcagtttcttagggacacg
CD45humanrev: ccagaagggctcagagtgg	CD45humanforsonde: atgcctacctaatactctct

5.4 Quantifizierung von PCR-Produkten, Southernblot

2 X SSC: 0,3 M NaCl, 0,03 M NaCitrat, pH 7,0

Prähybridisierungslösung: 2 X SSC + 1 % SDS + 0,5 % Milchpulver + 10 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

Hybridisierungslösung: 2 X SSC + 1 % SDS + 0,5 % Milchpulver + 10 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA + 10 % Dextransulfat

Um PCR-Produkte zu quantifizieren, wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Agarosegel (2 %) 20 min in 0,25 M HCl, dann 20 min in 0,4 M NaOH geschwenkt und anschließend für mindestens 16 h in 0,4 M NaOH auf eine Nylonmembran (Blotting-Nylon 66 Membranes, type B, positive, Fluka) transferiert (Alkali-Schwerkraftblot). Die Membran wurde dann mit 2 X SSC kurz gewaschen und UV-vernetzt (Autocrosslink, UV Stratalinker 2400, Stratagene). Nach der Prähybridisierung für 2 h bei 68°C folgte die Hybridisierung mit der ³²P-markierten Sonde bei 68°C üN. Die Blots wurden dann in 2 X SSC + 0,5 % SDS gewaschen und mittels Phosphoimager (FujiFilm Bas-1500) quantifiziert. Die Daten wurden mit der Aida Image Analyzer (3.43) Software ausgewertet; die

Signifikanz wurde durch einen „Student’s T-Test“ bestimmt. Folgende Signifikanzniveaus wurden verwendet: $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***

Die Sonde wurde mit dem Megaprime DNA Labelling System (Amersham) in Gegenwart eines internen PCR-Fragments als Matrize und $50 \mu\text{Ci } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ (Amersham) hergestellt und mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) nach den Angaben der Hersteller gereinigt. Herstellung der Sonden und Durchführung der Southernblots wurde zu großen Teilen von Inge Spratte übernommen.

5.5 siRNA-Transfektion

5×10^4 3T3-Fibroblasten pro Ansatz wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 10 h später mit $2 \mu\text{l}$ Lipofectamin2000 (Invitrogen) nach den Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden üN mit dem Transfektionsansatz inkubiert, der 20 pmol siRNA beinhaltet. Folgende siRNAs wurden verwendet: U2AF26: ucagccagaccuaguccugcucaa (Invitrogen), U2AF35: gcaacuucaugcauuugaa (Qiagen), und eine unspezifische Kontroll-siRNA (Qiagen). Die Zellen wurden dann 36 h in normalem Medium gehalten und anschließend üN mit 100 ng CD45-Minigen transfiziert (Lipofectamin2000). 24 h später wurde RNA präpariert und durch RT-PCR analysiert. Folgende Primer wurden verwendet (CD45human: Kapitel 5.3):

U2AF26for: atggctgaatatttagcttcg	U2AF26rev: tccgaagcgaccatgccggtgtct
U2AF35for: atggcgaataacttggcctcc	U2AF35rev: aaatcgtccagatctctccc
GAPDHfor: tgtcttcaccaccatggaga	GAPDHrev: cggccatcacgccacagctt

Parallel transfizierte Zellen wurden zur Analyse der Proteinexpression eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in kochendem SDS-Probenpuffer lysiert und dann durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

5.6 Herstellung transgener Mäuse

Das Konstrukt zur Erstellung U2AF26-Flag-transgener Mäuse wurde durch PCR mit den Primern U2AF26startKozakBglIII: gaagatctgccaccatggctgaatatttagcttcg und FLAGrevBglIII: ctagatctctattatcgtcatcgtcttt mit pCMV-U2AF26-FLAG-N3 als Matrizen-DNA generiert. Das PCR-Produkt wurde in den TopoTA-Vektor kloniert und das BglIII-Fragment wurde in einen BamHI-geschnittenen Vektor ligiert, der den proximalen Lck-Promotor enthält (Schmidt et al., 1998). Die richtige Orientierung wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung sichergestellt. Die weiteren Schritte zur Erstellung der transgenen Mäuse wurden von Dr. Ralph Waldschütz und Wojciech Wegrzyn am Institut für Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen nach Standardmethoden durchgeführt (Hogan et al., 1994). Die Integration der injizierten DNA wurde durch Southernblot mit Schwanzspitzen-DNA nachgewiesen (Hogan et al., 1994), wobei die Vollängen-U2AF26-cDNA als Matrize zur Sondengenerierung eingesetzt wurde. Um die transgenen Linien zu züchten, wurden die Gründer mit Inzucht-C57BL/6-Tieren gekreuzt.

5.7 RNA-Interaktions-Experimente

Zytoplasma-Puffer:	10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl + Proteaseinhibitoren 1:1000
Kernextrakt-Puffer:	20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,42 M NaCl, 0,2 mM EDTA, 25 % Glycerin + Proteaseinhibitoren 1:1000
RNA-Bindepuffer	20 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin

2 komplementäre Primer (AGCTTCTGAATCCACACCCCAAGCATCTCTGAAC und TCGAGTTCAGAGATGCTTGGGGGTGTGGATTCAGA, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen), die der ESS-Sequenz von murinem CD45-Exon 4 entsprechen, wurden zum Doppelstrang zusammengelagert und in HindIII/XhoI-

geschnittenes pcDNA3-Plasmid ligiert. Es folgte eine *in vitro*-Transkription mit XhoI-linearisiertem Plasmid und T7 RNA-Polymerase (NEB) in Gegenwart von 50 μCi α - ^{32}P -UTP; anschließend wurden die Produkte durch PAGE gereinigt. Dazu wurde der gesamte Reaktionsansatz durch ein 6%iges Gel aufgetrennt, die Position der ESS-RNA wurde durch Autoradiographie bestimmt, das entsprechende Gelstück wurde ausgeschnitten und die RNA durch 4-6 h Inkubation bei 4°C in 100-200 μl DEPC-Wasser auf einem Rollinkubator eluiert.

Die Bindungsreaktion wurde für 15 min bei RT in 10 μl RNA-Bindepuffer mit radioaktiv markierter ESS-RNA, 0,5 μl RNaseOut, 100 ng BSA und 0,5 μg Kernextrakten von Cos7-Zellen oder U2AF26-Flag-überexprimierenden Cos7-Zellen durchgeführt. Alternativ wurden aufgereinigte Gst-Proteine eingesetzt. Für EMSAs wurden die Proben dann durch ein 4%iges Acrylamid-Gel in 25 mM TrisBase, 0,2 M Glycin und 5 % Glycerin aufgetrennt und per Autoradiographie analysiert. Für Crosslink-Experimente wurden die Proben in 96-Loch-Rundbodenplatten transferiert, für 10 min auf Eis mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, mit RNaseT1 verdaut und dann durch 10%ige SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. In einigen Crosslink-Experimenten wurde der Komplex anstelle von Autoradiographie durch einen α -Flag-Immunoblot detektiert.

Kernextrakte wurden wie folgt hergestellt: Cos7-Zellen wurden durch Abschaben von einer 10-cm-Platte in kaltem PBS aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (Tischzentrifuge, 2000 rpm, 4°C, 5 min) und dann in 250 μl Zytoplasma-Puffer 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 250 μl Zytoplasma-Puffer + 0,2 % NP-40 zugegeben, vorsichtig gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Kerne wurden pelletiert (6500 rpm, 4°C, 3 min) und in 40 μl Kernextrakt-Puffer aufgenommen. Es folgten 3 Frier-Tau-Zyklen (-80°C, 37°C), wobei nach dem Auftauen jeweils 1 min gevortext wurde. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C, 20 min) wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (und bei unterschiedlichen Konzentrationen in Lysaten von transfizierten und Kontroll-Zellen durch Zugabe von Kernextrakt-Puffer angeglichen) und der aliquotierte Kernextrakt bei -80°C gelagert.

5.8 Hefe-Interaktionsklonierung (Yeast Two-Hybrid-Screen)

- YPAD (Vollmedium), 1l: 10 g Hefe-Extrakt, 20 g Pepton, 20 g α -D-Glukose, 10 ml Adeninlösung (5 mg/ml), für Platten zusätzlich 24 g Bacto-Agar
- SD (Mangelmedium), 1l: 20 g α -D-Glukose, 1,7 g Yeast nitrogen base, 5 g Ammoniumsulfat, + CSM-Ade-His-Leu-Trp (Qbiogene), nach Bedarf 10 ml/l von 5 mg/ml der fehlenden Zusätze, für Platten zusätzlich 30 g Bacto-Agar

Die Köderkonstrukte Gfi1 oder Gfi1 Δ Zn-F wurden C-terminal in den Leserahmen der Gal4-DNA-Bindedomäne im pGBKT7-Vektor (Clontech) kloniert. Dazu wurden in einer PCR durch entsprechende Primer (for: aacatagccgcgctcattcctg, rev: aactgcagttatcatttgagtcctgctg, Δ Zn-Frev: aactgcagttattgtaggagccgccg) eine 5'-NdeI- und eine 3'-PstI-Schnittstelle in die cDNAs von Gfi1 oder Gfi1 Δ Zn-F angefügt und die entsprechenden NdeI/PstI-Fragmente in den ebenso geschnittenen Vektor ligiert. Diese Konstrukte wurden benutzt, um eine cDNA-Bibliothek aus murinen Lymphom-Zellen (Matchmaker Gal4 cDNA library, Clontech) zu durchsuchen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Arbeiten nach den Angaben des Herstellers (Clontech) durchgeführt. Der Hefestamm AH109 wurde mit Köder- und Bibliotheksplasmiden nach der Li-Acetat-Methode transfiziert, auf 15-cm-Platten mittlerer Stringenz (SD-His-Leu-Trp) ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Wachsende Kolonien wurden auf Platten hoher Stringenz (SD-Ade-His-Leu-Trp) transferiert und erneut auf Wachstum getestet. Alle Platten enthielten 5 mM 3-Aminotriazol. Angewachsene Klone wurden auf β -Galaktosidase-Aktivität getestet und die Bibliotheksplasmide positiver Kolonien wurden isoliert. Die Interaktion wurde durch eine Retransformation der isolierten Bibliotheksplasmide mit den Köderplasmiden überprüft und die Bibliotheksplasmide von positiven Klonen wurden sequenziert.

5.9 Transiente Transfektion für Immunfluoreszenz oder Reporter-genversuche

IF-Puffer:	10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05 % Tween-20
PBS:	137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3

Für Immunfluoreszenz-Studien wurden 5×10^4 3T3-Fibroblasten pro Ansatz in 12-Loch-Platten auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später mit Rotifect transfiziert. Die Zellen wurden 24 h später mit kaltem PBS gewaschen, für 5 min in Methanol fixiert, mit PBS und mit IF-Puffer gewaschen und für 30 min bei RT mit 1 % BSA in IF-Puffer geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (α -Flag oder α -Gfi1 [Santa Cruz], jeweils 1:200) erfolgte in IF-Puffer mit 1 % BSA für 1 h bei RT, die Proben wurden dann mehrfach mit IF-Puffer gewaschen und anschließend für 30 min mit entsprechend markierten Zweitantikörpern (1:200, Dianova) und DAPI (1 μ g/ml) in IF-Puffer + 1 % BSA im Dunkeln inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit IF-Puffer wurden die Proben mit dem ProLong Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt und durch Laser-Scanmikroskopie (Zeiss) analysiert.

Reporter-genversuche wurden durchgeführt wie beschrieben (Yücel et al., 2004), mit der Änderung, dass zusätzlich ein β -Galaktosidase-kodierendes Plasmid cotransfiziert und zur Normalisierung verwendet wurde.

5.10 Westernblot und Immunopräzipitation

Lysis-Puffer:	10 mM TrisHCL pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40 + Proteaseinhibitoren 1:1000
Flag-Lysis-Puffer:	25 mM TrisHCL pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 % Triton-X-100 + Proteaseinhibitoren 1:1000
Proteaseinhibitoren:	100 mg/ml PMSF, 1 mg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Bestain in 80 % Methanol + 20 % DMSO

	1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml E64, 1 M Na ₃ VO ₄ , 1 M Na ₂ MnO ₄ in Wasser
5 X Bradford-Reagenz:	100 mg Serva Blue G, 50 ml Ethanol, 100 ml Phosphorsäure ad 200 ml mit Wasser
10 X SDS-Laufpuffer:	1,25 M Tris-Base, 2 M Glycin, 1 % SDS
SDS-Probenpuffer:	50 mM TrisHCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,025 % Bromphenolblau
Transferpuffer:	5,82 g Tris-Base, 2,93 g Glycin, 3,75 ml 10 % SDS, 200 ml Methanol ad 1 l Wasser
Waschpuffer:	PBS + 0,05 % Tween-20
Blocklösung:	PBS + 0,05 % Tween-20 + 1 % BSA

Cos7-Zellen wurden mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert (Elektroporator: Bio-Rad), 24 h später in kaltem PBS gewaschen, in Lysis-Puffer oder Flag-Lysis-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert, wobei gelegentlich gevortext wurde. Möglicherweise noch intakte Zellen wurden dann durch 10 min Beschallung in einem eisgekühlten Ultraschallbad (Branson 2210) lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (Tischzentrifuge: 5 min, 14000 rpm, 4°C) und die Überstände weiterverarbeitet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Bradford-Test. Für IPs wurden 200 µg Protein in 0,7 ml Flag-Lysis-Puffer + 3 % BSA und Proteaseinhibitoren aufgenommen. Die Präzipitation erfolgte üN bei 4°C auf einem Rollinkubator mit 500 ng α-Gfi1-Antikörper (N20, Santa Cruz) und prääquilibrierter Protein G–Sepharose (Amersham) oder M2-Affinitäts-Gel (Sigma). Die immobilisierten Proteine wurden anschließend dreimal mit Flag-Lysis-Puffer gewaschen, dann in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch eine SDS-PAGE separiert. Die Proteine wurden schließlich nach dem Semidry-Verfahren in Transferpuffer auf Hybond-C-Membranen (Amersham) übertragen und mit Blocklösung für 1 h bei RT geschwenkt. Die Membranen wurden dann üN bei 4°C mit dem ersten Antikörper in Blocklösung inkubiert, 3 mal 5 min mit Waschpuffer bei RT gewaschen und 1 h bei RT mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (Dianova) in PBS + 0,05 % Tween-20 + 2 % Milchpulver inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer (1 mal 15 min, 2 mal 5 min) wurden die

Blots mit dem SuperSignal ECL-System (Pierce) entwickelt. Die folgenden Erstantikörper wurden benutzt: α -Gfi1, α -ZAP-70, α -ZAP-70pY319, α -p53 (Pharmingen), α -FLAG (Stratagene), α - β -Aktin, α -U2AF35, α -U2AF65, α -hnRNP-A, α -Gfi1 (N20), α -Gst (Santa Cruz), α -Gfi1 aus Kaninchen (nichtkommerziell; Schmidt et al, 1998b).

Um U2AF26 zu detektieren, wurde ein Antikörper in Kaninchen generiert (Seqlab). Der Antikörper richtet sich gegen ein Epitop im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 192-208), der nur eine geringe Homologie zu U2AF35 aufweist. Das Serum wurde vor der Benutzung mit U2AF26-GST aufgereinigt. Dazu wurden 2 ml Serum mit Gst-U2AF26 üN auf einem Rollinkubator bei 4°C inkubiert, anschließend wurde die Matrix mehrfach mit PBS gewaschen. Der Antikörper wurde dann durch 10 min Inkubation mit (einmal) 0,1 M Glycin pH 3,0 in PBS und (dreimal) 0,1 M Glycin pH 2,0 in PBS eluiert. Die Eluate wurden durch Zugabe von 2 M Tris pH 8,0 neutralisiert, mit 0,02 % NaN_3 , 0,1 % BSA und 20 % Glycerin versetzt, im Westernblot auf ihre Bindung an überexprimiertes U2AF26-Flag getestet und bei -80°C gelagert. Die Aufreinigung des α -U2AF26-Antikörpers wurde teilweise von Katharina Fiolka durchgeführt.

5.11 Herstellung und Reinigung von Proteinen

In vitro translatiertes Gfi1 wurde mit dem TNT Coupled Reticulocyte Lysate (Promega) nach den Herstellerangaben in Gegenwart des Plasmids pGBKT7-Gfi1 (siehe „Hefe-Interaktionsklonierung“) und ^{35}S -Methionin (Amersham) hergestellt. In Pull-Down-Versuchen wurden 2 μl von einem 50 μl *in vitro*-Translationsansatz eingesetzt.

Konstrukte zur Erzeugung von Gst-Fusionsproteinen wurden durch die Klonierung der Gfi1- oder U2AF26-Flag-cDNA in entsprechende Vektoren (Pharmacia) erzeugt. U2AF26-Flag wurde mit den Primern U2AF26for und FLAGrevBglIII (siehe „siRNA-Transfektion“ und „Herstellung transgener Mäuse“) und Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) amplifiziert und das Produkt direkt in den SmaI linearisierten pGex-3X-Vektor ligiert. Die Gfi1-cDNA wurde mit den Primern Gfi1startBamH1: `cgggatccatgccgcgctcattcctgt` und Gfi1endNotI:

atttggcgccgctcatttgagtcctatgctgag amplifiziert, in den TopoTA-Vektor ligiert, mit BamHI und NotI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pGEX-4T-2-Vektor ligiert.

Die Produktion der Proteine im Bakterienstamm pRep4 unter IPTG-Induktion (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid, 1 mM) und die anschließende Reinigung durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Glutathion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde das U2AF26-Flag-GST-Fusionsprotein mit 100 μ g Extrakt von Cos7-Zellen, die verschiedene Gfi1-Flag-Mutanten überexprimierten, in 0,5 ml Flag-Lysis-Puffer + 3 % BSA und Proteaseinhibitoren gemischt. In Interaktionsstudien mit HeLa-Zell-Extrakten wurden 150 μ g Zytoplasma- oder Kernextrakt und die angegebenen Gst-Fusionsproteine eingesetzt. Diese wurden mit den im Abschnitt „RNA-Interaktions-Experimente“ beschriebenen Puffern erzeugt. Die Inkubation der Gst-Proteine mit Zellextrakten wurde $\text{in } \mu\text{N}$ bei 4°C auf einem Rollinkubator durchgeführt. Nach fünf Waschschritten mit Flag-Lysis-Puffer wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

5.12 T-Zell-Aktivierung und ZAP-70-Phosphorylierung

MTC-Medium: RPMI-1640, 15 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % Gentamycin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol (alles Invitrogen)

T-Zellen aus der Milz wurden durch das Pan-T-Zell Kit und einen autoMACS (beides Miltenyi) nach den Herstellerangaben aufgereinigt. Bei dieser Aufreinigung werden alle nicht-T-Zellen durch Antikörper markiert, die dann an magnetische Kügelchen gekoppelt und depletiert werden können, so dass T-Zellen während der Reinigung nicht direkt gebunden werden, was eine Aktivierung bewirken könnte (Negativselektion). Aus 3×10^7 Milzzellen (nach Erythrozyten-Lyse) konnten etwa

5×10^6 T-Zellen präpariert werden. Die Reinheit der erhaltenen T-Zell-Population wurde per FACS-Analyse bestimmt und lag üblicherweise um 90 %.

Für [^3H]-Thymidin-Einbau-Versuche wurden 5×10^4 gereinigte T-Zellen pro Ansatz in 96-Loch-Platten (Nunc) in 100 μl MTC-Medium ausgesät und 30 min später mit 0,05 μg α -CD3-Antikörper (500A2, Pharmingen) und 25 ng/ml PMA (Sigma) oder 250 ng/ml PMA und 1 μM Ionomycin (Sigma) für 30 h stimuliert. Löslicher α -CD3-Antikörper wurde verwendet, da durch diesen Stimulus ein Unterschied in der Signalgebung durch verschiedene CD45-Isoformen gut detektiert werden kann (Patel et al., 1994). Für die letzten 8 h wurde 1 μCi [^3H]-Thymidin (Amersham) zugegeben. Die Zellen wurden geerntet (FilterMate Harvester, Perkin Elmer) und die Menge an eingebautem [^3H]-Thymidin in der DNA wurde mit einem β -Szintillationszähler (Wallac) bestimmt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Für ZAP-70 Phosphorylierungsversuche wurden 1×10^6 gereinigte T-Zellen oder $2,5 \times 10^6$ Gesamt-Thymozyten in 100 μl MTC-Medium in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 0,05 μg α -CD3-Antikörper (500A2, Pharmingen) für 5 oder 10 min stimuliert. Die Zellen wurden dann auf Eis gekühlt, in einer vorgekühlten Tischzentrifuge pelletiert (1 min, 6000 rpm, 4°C), in Lysis-Puffer aufgenommen, durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und zentrifugiert (siehe „Westernblot und Immunopräzipitation“). Die Überstände wurden durch 8%ige SDS-PAGE und Westernblot untersucht. Dabei wurde zunächst die phosphorylierte Form, ZAP-70-Yp319, nachgewiesen, die Membran wurde anschließend gewaschen und mit einem α -ZAP-70-Antikörper inkubiert.

Zur Analyse der Regulation von endogenem Gfi1 und U2AF26 während der T-Zell-Aktivierung wurden $2,5 \times 10^6$ gereinigte T-Zellen aus der Milz in 1 ml MTC-Medium für die angegebenen Zeiten mit 1 μg α -CD3-Antikörper (500A2, Pharmingen) und 250 ng/ml PMA (Sigma) stimuliert. Proteine wurden präpariert wie beschrieben und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer geteilt, der Teil mit den kleineren Proteinen (< 40 kD) wurde zum Nachweis von U2AF26 verwendet, der andere Teil für die Detektion von Gfi1 und β -Aktin. Für die Detektion von Gfi1 wurde ein nicht-kommerzieller Antikörper aus Kaninchen verwendet (Schmidt et al, 1998b).

6 Literatur

August, A., Sadra, A., Dupont, B., und Hanafusa, H. (1997). Src-induced activation of inducible T cell kinase (ITK) requires phosphatidylinositol 3-kinase activity and the Pleckstrin homology domain of inducible T cell kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11227-11232.

Baker, M., Gamble, J., Tooze, R., Higgins, D., Yang, F. T., O'Brien, P. C., Coleman, N., Pingel, S., Turner, M., und Alexander, D. R. (2000). Development of T-leukaemias in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mutant lck mice. *Embo J* *19*, 4644-4654.

Barcellos, L. F., Caillier, S., Dragone, L., Elder, M., Vittinghoff, E., Bucher, P., Lincoln, R. R., Pericak-Vance, M., Haines, J. L., Weiss, A., et al. (2001). PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat Genet* *29*, 23-24.

Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S., und Pure, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6734-6738.

Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* *103*, 367-370.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* *72*, 291-336.

Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., et al. (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* *191*, 1591-1604.

Brockdorff, J., Williams, S., Couture, C., und Mustelin, T. (1999). Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1. *Eur J Immunol* 29, 2539-2550.

Bubeck-Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J. Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., und Chan, A. C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9, 607-616.

Byth, K. F., Conroy, L. A., Howlett, S., Smith, A. J., May, J., Alexander, D. R., und Holmes, N. (1996). CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 183, 1707-1718.

Cahir McFarland, E. D., Hurley, T. R., Pingel, J. T., Sefton, B. M., Shaw, A., und Thomas, M. L. (1993). Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1402-1406.

Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A. R., und Zahler, A. M. (1999). hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *Embo J* 18, 4060-4067.

Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R., und Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *Embo J* 14, 2499-2508.

Chan, A. C., Kadlecsek, T. A., Elder, M. E., Filipovich, A. H., Kuo, W. L., Iwashima, M., Parslow, T. G., und Weiss, A. (1994). ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 264, 1599-1601.

Chui, D., Ong, C. J., Johnson, P., Teh, H. S., und Marth, J. D. (1994). Specific CD45 isoforms differentially regulate T cell receptor signaling. *Embo J* 13, 798-807.

Chusainow, J., Ajuh, P. M., Trinkle-Mulcahy, L., Sleeman, J. E., Ellenberg, J., and Lamond, A. I. (2005). FRET analyses of the U2AF complex localize the U2AF35/U2AF65 interaction in vivo and reveal a novel self-interaction of U2AF35. *RNA* *11*, 1201-1214.

Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11456-11460.

D'Oro, U., and Ashwell, J. D. (1999). Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* *162*, 1879-1883.

Davies, R. C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S. H., Lamond, A. I., and Hastie, N. D. (1998). WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* *12*, 3217-3225.

Deans, J. P., Serra, H. M., Shaw, J., Shen, Y. J., Torres, R. M., and Pilarski, L. M. (1992). Transient accumulation and subsequent rapid loss of messenger RNA encoding high molecular mass CD45 isoforms after T cell activation. *J Immunol* *148*, 1898-1905.

Dornan, S., Sebestyen, Z., Gamble, J., Nagy, P., Bodnar, A., Alldridge, L., Doe, S., Holmes, N., Goff, L. K., Beverley, P., et al. (2002). Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J Biol Chem* *277*, 1912-1918.

Dredge, B. K., Stefani, G., Engelhard, C. C., and Darnell, R. B. (2005). Nova autoregulation reveals dual functions in neuronal splicing. *Embo J* *24*, 1608-1620.

Duan, Z., and Horwitz, M. (2003). Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5932-5937.

Duan, Z., Zarebski, A., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., und Horwitz, M. (2005). Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 25, 10338-10351.

Gilks, C. B., Bear, S. E., Grimes, H. L., und Tschlis, P. N. (1993). Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 13, 1759-1768.

Graveley, B. R. (2002). Sex, AGility, and the regulation of alternative splicing. *Cell* 109, 409-412.

Graveley, B. R., Hertel, K. J., und Maniatis, T. (1998). A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *Embo J* 17, 6747-6756.

Graveley, B. R., Hertel, K. J., und Maniatis, T. (2001). The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA* 7, 806-818.

Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B., und Tschlis, P. N. (1996a). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16, 6263-6272.

Grimes, H. L., Gilks, C. B., Chan, T. O., Porter, S., und Tschlis, P. N. (1996b). The Gfi-1 protooncprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14569-14573.

Guth, S., Tange, T. O., Kellenberger, E., und Valcarcel, J. (2001). Dual function for U2AF(35) in AG-dependent pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 21, 7673-7681.

Hardwick, J. S., und Sefton, B. M. (1995). Activation of the Lck tyrosine protein kinase by hydrogen peroxide requires the phosphorylation of Tyr-394. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4527-4531.

Hermiston, M. L., Xu, Z., und Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21, 107-137.

Hertzano, R., Montcouquiol, M., Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Yücel, R., Frankel, W. N., Rechavi, G., Möröy, T., Friedman, T. B., Kelley, M. W., und Avraham, K. B. (2004). Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum Mol Genet* 13, 2143-2153.

Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Schindler, J. W., Saleque, S., Fujiwara, Y., und Orkin, S. H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002-1007.

Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Traver, D., Bronson, R. T., Cameron, S., und Orkin, S. H. (2003). Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18, 109-120.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., und Steitz, J. A. (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11, 837-843.

Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C. D., Aitken, K., et al. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349-354.

Irles, C., Symons, A., Michel, F., Bakker, T. R., van der Merwe, P. A., und Acuto, O. (2003). CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunol* 4, 189-197.

Jacobsen, M., Schweer, D., Ziegler, A., Gaber, R., Schock, S., Schwinzer, R., Wonigeit, K., Lindert, R. B., Kantarci, O., Schaefer-Klein, J., et al. (2000). A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genet* 26, 495-499.

Karsunky, H., Mende, I., Schmidt, T., und Möröy, T. (2002a). High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene* 21, 1571-1579.

Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K. W., Dührsen, U., und Möröy, T. (2002b). Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 30, 295-300.

Kong, Y. Y., Kishihara, K., Sumichika, H., Nakamura, T., Kaneko, M., und Nomoto, K. (1995). Differential requirements of CD45 for lymphocyte development and function. *Eur J Immunol* 25, 3431-3436.

Kozieradzki, I., Kundig, T., Kishihara, K., Ong, C. J., Chiu, D., Wallace, V. A., Kawai, K., Timms, E., Ionescu, J., Ohashi, P., et al. (1997). T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45. *J Immunol* 158, 3130-3139.

Kung, C., Pingel, J. T., Heikinheimo, M., Klemola, T., Varkila, K., Yoo, L. I., Vuopala, K., Poyhonen, M., Uhari, M., Rogers, M., et al. (2000). Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 6, 343-345.

Lallena, M. J., Chalmers, K. J., Llamazares, S., Lamond, A. I., und Valcarcel, J. (2002). Splicing regulation at the second catalytic step by Sex-lethal involves 3' splice site recognition by SPF45. *Cell* 109, 285-296.

Leitenberg, D., Boutin, Y., Lu, D. D., und Bottomly, K. (1999). Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10, 701-711.

Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J. L., und Lafyatis, R. (2002). Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev* 16, 594-607.

Liu, X., Brodeur, S. R., Gish, G., Songyang, Z., Cantley, L. C., Laudano, A. P., und Pawson, T. (1993). Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* 8, 1119-1126.

Lynch, K. W. (2004). Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 931-940.

Lynch, K. W., und Weiss, A. (2000). A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 20, 70-80.

Lynch, K. W., und Weiss, A. (2001). A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J Biol Chem* 276, 24341-24347.

Majeti, R., Xu, Z., Parslow, T. G., Olson, J. L., Daikh, D. I., Killeen, N., und Weiss, A. (2000). An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103, 1059-1070.

Maniatis, T., und Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418, 236-243.

Marengere, L. E., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrucker, H. W., Feng, G. S., und Mak, T. W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272, 1170-1173.

McGhee, L., Bryan, J., Elliott, L., Grimes, H. L., Kazanjian, A., Davis, J. N., und Meyers, S. (2003). Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem* 89, 1005-1018.

McNeill, L., Cassady, R. L., Sarkardei, S., Cooper, J. C., Morgan, G., und Alexander, D. R. (2004). CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* 92, 125-134.

Mee, P. J., Turner, M., Basson, M. A., Costello, P. S., Zamoyska, R., und Tybulewicz, V. L. (1999). Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice. *Eur J Immunol* 29, 2923-2933.

Möröy, T. (2005). The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *Int J Biochem Cell Biol* 37, 541-546.

Mustelin, T., und Tasken, K. (2003). Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 371, 15-27.

Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A., und Nakagawa, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351, 69-72.

Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A. C., und Loh, D. Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.

Nilsen, T. W. (1996). A parallel spliceosome. *Science* 273, 1813.

Ogilvy, S., Louis-Dit-Sully, C., Cooper, J., Cassady, R. L., Alexander, D. R., und Holmes, N. (2003). Either of the CD45RB and CD45RO isoforms are effective in restoring T cell, but not B cell, development and function in CD45-null mice. *J Immunol* 171, 1792-1800.

Patel, H. R., Renz, H., Terada, N., und Gelfand, E. W. (1994). Differential activation of p21ras in CD45RA+ and CD45RO+ human T lymphocytes. *J Immunol* 152, 2830-2836.

Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., und Oliveira-dos-Santos, A. J. (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2, 389-396.

Perez-Villar, J. J., und Kanner, S. B. (1999). Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. *J Immunol* 163, 6435-6441.

Person, R. E., Li, F. Q., Duan, Z., Benson, K. F., Wechsler, J., Papadaki, H. A., Eliopoulos, G., Kaufman, C., Bertolone, S. J., Nakamoto, B., et al. (2003). Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34, 308-312.

Qian, D., und Weiss, A. (1997). T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 205-212.

Rödel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, T., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsässer, H. P., und Möröy, T. (2000). The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *Embo J* 19, 5845-5855.

Rothrock, C., Cannon, B., Hahn, B., und Lynch, K. W. (2003). A conserved signal-responsive sequence mediates activation-induced alternative splicing of CD45. *Mol Cell* 12, 1317-1324.

Rothrock, C. R., House, A. E., und Lynch, K. W. (2005). HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *Embo J* 24, 2792-2802.

Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., et al. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.

Ruskin, B., Zamore, P. D., und Green, M. R. (1988). A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell* 52, 207-219.

Saleque, S., Cameron, S., und Orkin, S. H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev* 16, 301-306.

Sambrook, J., und Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schmidt, T., Karsunky, H., Gau, E., Zevnik, B., Elsässer, H. P., und Möröy, T. (1998a). Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17, 2661-2667.

Schmidt, T., Karsunky, H., Rödel, B., Zevnik, B., Elsässer, H. P., und Möröy, T. (1998b). Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *Embo J* 17, 5349-5359.

Schmidt, T., Zörnig, M., Beneke, R., und Möröy, T. (1996). MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene. *Nucleic Acids Res* 24, 2528-2534.

Seavitt, J. R., White, L. S., Murphy, K. M., Loh, D. Y., Perlmutter, R. M., und Thomas, M. L. (1999). Expression of the p56(Lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Mol Cell Biol* 19, 4200-4208.

Sempe, P., Ezine, S., Marvel, J., Bedossa, P., Richard, M. F., Bach, J. F., und Boitard, C. (1993). Role of CD4+CD45RA+ T cells in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Int Immunol* 5, 479-489.

Shepard, J.B. (2004). Characterization of U2AF²⁶, a paralog of the splicing factor U2AF³⁵. Dissertation. The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas.

Shepard, J., Reick, M., Olson, S., und Graveley, B. R. (2002). Characterization of U2AF(6), a splicing factor related to U2AF(35). *Mol Cell Biol* 22, 221-230.

Shrivastava, P., Katagiri, T., Ogimoto, M., Mizuno, K., und Yakura, H. (2004). Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells. *Blood* 103, 1425-1432.

Stone, J. D., Conroy, L. A., Byth, K. F., Hederer, R. A., Howlett, S., Takemoto, Y., Holmes, N., und Alexander, D. R. (1997). Aberrant TCR-mediated signaling in CD45-null thymocytes involves dysfunctional regulation of Lck, Fyn, TCR-zeta, and ZAP-70. *J Immunol* 158, 5773-5782.

ten Dam, G. B., Wieringa, B., und Poels, L. G. (1999). Alternative splicing of CD45 pre-mRNA is uniquely obedient to conditions in lymphoid cells. *Biochim Biophys Acta* 1446, 317-333.

ten Dam, G. B., Zilch, C. F., Wallace, D., Wieringa, B., Beverley, P. C., Poels, L. G., und Screaton, G. R. (2000). Regulation of alternative splicing of CD45 by antagonistic effects of SR protein splicing factors. *J Immunol* 164, 5287-5295.

Tong, A., Nguyen, J., und Lynch, K. W. (2005). Differential Expression of CD45 Isoforms Is Controlled by the Combined Activity of Basal and Inducible Splicing-regulatory Elements in Each of the Variable Exons. *J Biol Chem* 280, 38297-38304.

Tsuda, H., Jafar-Nejad, H., Patel, A. J., Sun, Y., Chen, H. K., Rose, M. F., Venken, K. J., Botas, J., Orr, H. T., Bellen, H. J., und Zoghbi, H. Y. (2005). The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell* 122, 633-644.

Tsujikawa, K., Uchino, Y., Ichijo, T., Furukawa, T., und Yamamoto, H. (2000). Detection of CD45 ι mRNA in murine Th1 but not Th2 clones. *Immunobiology* 201, 506-514.

Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K. M., Smith, A. N., Di Genova, G., et al. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* *423*, 506-511.

van Leeuwen, J. E., und Samelson, L. E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* *11*, 242-248.

Venables, J. P. (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* *64*, 7647-7654.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.

Wallis, D., Hamblen, M., Zhou, Y., Venken, K. J., Schumacher, A., Grimes, H. L., Zoghbi, H. Y., Orkin, S. H., und Bellen, H. J. (2003). The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* *130*, 221-232.

Wu, S., Romfo, C. M., Nilsen, T. W., und Green, M. R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* *402*, 832-835.

Xu, Z., und Weiss, A. (2002). Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol* *3*, 764-771.

Yücel, R., Karsunky, H., Klein-Hitpass, L., und Möröy, T. (2003). The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* *197*, 831-844.

Yücel, R., Kosan, C., Heyd, F., und Möröy, T. (2004). Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth

factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 279, 40906-40917.

Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., und Möröy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J* 23, 4116-4125.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., und Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.

Zörnig, M., Schmidt, T., Karsunky, H., Grzeschiczek, A., und Möröy, T. (1996). Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 12, 1789-1801.

Zweidler-Mckay, P. A., Grimes, H. L., Flubacher, M. M., und Tschlis, P. N. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16, 4024-4034.

7 Anhang

7.1 Häufig verwendete Abkürzungen

Abb	Abbildung
BSA	Rinderserum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CE	Zytoplasma-Extrakt
CoIP	Coimmunopräzipitation
cpm	Counts pro Minute
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
ESE	exonic splicing enhancer
ESS	exonic splicing silencer
FACS	fluorescence activated cell sorting
β-Gal	β-Galaktosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEM	glycosphingolipid-enriched microdomain
Gfi1	growth factor independence-1
Gst	Glutathion-S-Transferase
hi	high
hnRNPs	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
ITAM/ITIM	immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibition motif
Itk	inducible T-cell kinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LAT	linker for activation of T-cells
LCA	leucocyte common antigen
LE	Luziferase-Einheiten
lo	low

MACS	magnetic cell sorting
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
NE	Kernextrakt
NF-AT	nuclear factor of activated T-Cells
NF-κB	nuclear factor-κB
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLC	Phospholipase-C
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RRM	RNA recognition motif
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SH2	Src Homologie 2
SCID	severe combined immunodeficiency
siRNA	small interfering RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
STAT	signal transducers and activators of transcription
ss	Spleiß-Stelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	transgen
U2AF	U2 auxiliary factor
üN	über Nacht
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
Zn-F	Zinkfinger

Aminosäuren und DNA/RNA-Bausteine wurden mit den gebräuchlichen Einbuchstabenabkürzungen angegeben, Nukleosidtriphosphate mit den Dreibuchstabenabkürzungen.

7.2 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Rohr, U. P., **Heyd, F.**, Neukirchen, J., Wulf, M. A., Queitsch, I., Kroener-Lux, G., Steidl, U., Fenk, R., Haas, R., und Kronenwett, R. (2005). Quantitative real-time PCR for titration of infectious recombinant AAV-2 particles. *J Virol Methods* 127, 40-45.

Rohr, U. P., Wulf, M. A., Stahn, S., **Heyd, F.**, Steidl, U., Fenk, R., Opalka, B., Pitschke, G., Prisack, H. B., Bojar, H., et al. (2003). Non-small lung cancer cells are prime targets for p53 gene transfer mediated by a recombinant adeno-associated virus type-2 vector. *Cancer Gene Ther* 10, 898-906.

Yücel, R., Kosan, C., **Heyd, F.**, und Möröy, T. (2004). Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 279, 40906-40917.

Heyd, F., ten Dam, G. und Möröy, T. The auxiliary splice factor U2AF26 and the transcription factor Gfi1 directly cooperate in the regulation of CD45 alternative splicing. In Revision (*Nature Immunology*).

Heyd, F., Fiolka, K., und Möröy, T. Gfi1-CAF1 interaction is essential for Gfi1 mediated repression. Manuskript in Vorbereitung.

Poster

Katharina Fiolka, Raif Yücel, Lothar Vassen, **Florian Heyd**, Tarik Möröy. Partial Rescue of the Growth-Factor-Independence1 (Gfi1) Null Phenotype and Negative Regulation of the Gfi1 Expression by Gfi1B. 12th International Congress of Immunology, Montreal; Clinical and Investigative Medicine. (CIN) Vol. 27, 4, August 2004.

Raif Yücel, **Florian Heyd**, Tarik Möröy. Gfi1:GFP Knock-In Mutant Reveals Differential Expression and Auto-Regulation of the Gene Growth Factor Independence 1 (Gfi1) during Lymphocyte Development. 12th International Congress of Immunology, Montreal; Clinical and Investigative Medicine. (CIN) Vol. 27, 4, August 2004.

Florian Heyd und Tarik Möröy. Regulation of CD45 alternative splicing by Growth-Factor-Independence 1 (Gfi1) and U2 auxiliary factor 26 (U2AF26). 3. Forschungstag der medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen. November 2004.

Vorträge

Florian Heyd und Tarik Möröy. U2AF26 and Gfi1 modulate T-Cell activation by regulating CD45 alternative splicing. 5th Meeting on eukaryotic mRNA processing, Cold Spring Harbor. August 2005.

7.3 Danksagung

Mein Dank gilt als erstes meinem Betreuer, Prof. Tarik Möröy, für viele interessante Anregungen, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und für seine offene Art gegenüber neuen Ideen, die er mit der richtigen Mischung aus Distanz und Neugier betrachtet und dann meistens mit Nachdruck unterstützt hat. Die Ausstattung im Labor, sowohl mit neuen Geräten, als auch mit täglichem Verbrauchsmaterial und Reagenzien, war kaum zu überbieten, auch dafür möchte ich mich bedanken.

Meine Laborkollegen Emeka Igwe, Cyrus Khandanpour, Denise Pargmann und Taro Okayama haben dafür gesorgt, dass ich mich selten einsam gefühlt habe. Zweien meiner Kollegen, Katharina Fiolka und Christian Kosan, möchte ich besonders danken, für praktische Hilfe im Labor, aber vor allem für die Schaffung einer Arbeitsatmosphäre, die den Laboralltag erträglich, interessant und oft auch sehr nett gemacht hat. Christian danke ich außerdem für die Einführung in die ES-Zellkultur, das Sortieren von Zellen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Für das Korrekturlesen der Arbeit gilt mein Dank ebenfalls meinem Studienkollegen Martin Sichtung, meinem Vater und meiner Frau.

Ralph Waldschütz und Wojciech Wegrzyn haben transgene Mäuse hergestellt, Inge Spratte hat Mäuse und ES-Zellen genotypisiert und Kuchen gebacken, Angelika Warda hat ungezählte Gele und Minis gemacht. Vielen Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei der *Studienstiftung des Deutschen Volkes*, die für über die Hälfte der Arbeitszeit einen Großteil meines Lebensunterhalts gestellt hat.

Meine Eltern, Dr. Helga Moericke und Klaus-Jürgen Heyd, haben mein Studium finanziert und mich auch sonst immer uneingeschränkt unterstützt. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Wichtiger als alles andere in den letzten Jahren war und ist das private Glück mit meiner Frau Theresa. Für all ihre Zuneigung und Liebe möchte ich mich bedanken und hoffe, ihr Gleiches in ähnlicher Weise zurückzugeben. Unsere traumhafte Hochzeit am 22.07.05 wird dafür sorgen, dass die Zeit der Promotion nicht in Vergessenheit gerät.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Heyd
 Geburtsdatum: 19. März 1977
 Geburtsort: Berlin
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung/Zivildienst

Schullaufbahn: August 1983 - Juli 1989 Hanns-Fechner-Grundschule in Berlin - Wilmersdorf
 August 1989 - Mai 1996 Friedrich-Ebert-Oberschule (Gymnasium) in Berlin - Wilmersdorf
 Schulabschluss: Abitur im Mai 1996
 Zivildienst: Juli 1996 - Oktober 1997 „Anderer Dienst im Ausland“, Obdachlosenarbeit in Toulon / Frankreich

Hochschulbildung

Studium: Oktober 1997 – Juni 2002 Biochemie an der FU Berlin
 Diplomarbeit: Oktober 2001 – Mai 2002 an der University of Cambridge (England) mit dem Thema „Molecular mechanisms of TNF α signalling in adipocytes“
 Abschluss: Diplom im Juni 2002
 Stipendien: Aufnahme in das Förderprogramm der *Studienstiftung des deutschen Volkes* nach dem Vordiplom im März 2000, Promotionsstipendium der *Studienstiftung des deutschen Volkes* seit Januar 2004

Wissenschaftliche Tätigkeit

Juli 2002 - Wissenschaftlicher Angestellter an der Universitätsklinik
 Dezember 2002: Düsseldorf (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Haas), Arbeit zum Einsatz von Gentherapie bei Lungenerkrankungen
 seit Januar 2003: Promotion am Institut für Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Möröy) zu dem Thema „Regulation von CD45-alternativem Spleißen durch U2AF26 und Gfi1: Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung“

Essen, im Dezember 2005

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Regulation von CD45-alternativem Spleißen durch U2AF26 und Gfi1: Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Florian Heyd befürworte.

Essen, den 13.12.05

(Prof. Dr. T. Möröy)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 13.12.05

(Florian Heyd)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 13.12.05

(Florian Heyd)