

# Biochemische und funktionale Charakterisierung der Cytohesin-1-Interaktionspartner CYTIP und GRASP

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Bettina Kellersch

aus

München

Bonn 2006

---

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006.

1. Referent: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

2. Referent: Prof. Dr. Michael Hoch

eingereicht am: 02.08.2006

Tag der Promotion: 26.09.2006

---

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 von Prof. Dr. Waldemar Kolanus betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind gemäß §6 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 als solche kenntlich gemacht.

Bonn, den

.....  
Bettina Kellersch

---

## Publikationen

**Kellersch, B., Brillert, I. und Kolanus, W.** "Proteasomal degradation of the Cytohesin-interacting protein CYTIP is induced by a PKC-dependent phosphorylation and mediated by the TRIM/RBCC ubiquitin ligase ARD1/TRIM23." (in Vorbereitung).

**Kellersch, Bettina und Kolanus, Waldemar.** "Membrane-proximal signaling events in beta-2 integrin activation." *Results Probl Cell Differ*, 2006, 43, pp. 245-57.

**Theis, M. G., Knorre, A., Kellersch, B., Moelleken, J., Wieland, F., Kolanus, W. und Famulok, M.** "Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(31), pp. 11221-6.

**Boehm, T., Hofer, S., Winklehner, P., Kellersch, B., Geiger, C., Trockenbacher, A., Neyer, S., Fiegl, H., Ebner, S., Ivarsson, L., Schneider, R., Kremmer, E., Heufler, C. und Kolanus, W.** "Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration." *EMBO J*, 2003, 22(5), pp. 1014-24.

**Sirim, P., Zeitlmann, L., Kellersch, B., Falk, C. S., Schendel, D. J. und Kolanus, W.** "Calcium signaling through the beta 2-cytoplasmic domain of LFA-1 requires intracellular elements of the T cell receptor complex." *J Biol Chem*, 2001, 276(46), pp. 42945-56.

---

*Wege entstehen dadurch,  
dass man sie geht*

Franz Kafka

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Grundlagen des Immunsystems.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Aktivierung der T-Lymphozyten.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Integrine .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Die Funktion der Integrine bei der Extravasation.....	11
1.3.2 Die Struktur der Integrine.....	14
1.3.3 Das Integrin LFA-1 .....	15
1.3.3.1 Die Regulation der LFA-1-Aktivität („inside-out-signaling“) .....	16
1.3.3.2 LFA-1-vermittelte Signale („outside-in-signaling“) .....	18
<b>1.4 Cytohesin-1 .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Cytohesin-Interaktionspartner.....	20
<b>Zielsetzung.....</b>	<b>24</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Geräte .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien.....	27
2.1.4 Zellkultur-Puffer, -Medien und -Seren.....	29
2.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme.....	29
2.1.6 Enzyme.....	29
2.1.7 Antikörper .....	29
2.1.7.1 Primäre Antikörper .....	29
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper .....	30
2.1.8 DNA- und Protein-Längenstandard .....	31
2.1.9 Plasmide.....	32
2.1.10 Proteinfusionsanteile .....	33

2.1.11 Oligonukleotide.....	33
2.1.12 SiRNAs.....	34
2.1.13 Bakterienstämme.....	36
2.1.14 Säugetier-Zell-Linien .....	36
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme .....	37
2.2.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	37
2.2.1.2 Dauerkulturen von <i>E. coli</i> .....	37
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	37
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.2.2 Mutagenese-PCR.....	38
2.2.2.3 Reinigung und Fällung von PCR-Produkten .....	39
2.2.2.4 Restriktionsverdau .....	39
2.2.2.5 5'-Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA .....	39
2.2.2.6 Analytische Agarosegelelektrophorese .....	40
2.2.2.7 Präparative Agarosegelelektrophorese .....	40
2.2.2.8 Ligation .....	40
2.2.2.9 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	41
2.2.2.10 Plasmid-Minipräparation .....	41
2.2.2.11 Plasmid-Maxipräparation .....	42
2.2.2.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	43
2.2.2.13 DNA-Sequenzierung .....	43
2.2.3 Eukaryotische Zellkultur .....	43
2.2.3.1 Kultivierung adhärenter Zellen .....	43
2.2.3.2 Transfektion adhärenter Zellen .....	43
2.2.3.3 Kultivierung von Suspensionszellen.....	43
2.2.3.4 Transfektion von Suspensionszellen.....	44
2.2.3.5 Dauerkulturen eukaryotischer Zellen.....	44
2.2.3.6 Präparation humaner Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) .....	44
2.2.3.7 Transfektion humaner PBL mit siRNA.....	46
2.2.3.8 Zell-Stimulationen .....	46
2.2.4 Funktionale Analysen .....	47
2.2.4.1 Adhäsionstest auf ICAM-1 .....	47
2.2.4.2. Transwell-Migrationstest .....	48

---

2.2.4.3 IL-2-Promotor-Aktivierungsanalyse .....	49
2.2.5 Zellbiologische Methoden .....	50
2.2.5.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	50
2.2.5.2 Durchflusszytometrie.....	51
2.2.6 Proteinbiochemische Methoden .....	52
2.2.6.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten.....	52
2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	53
2.2.6.3 Immunpräzipitation.....	54
2.2.6.4 <i>In-vitro</i> -Dephosphorylierung immunpräzipitierter Proteine .....	54
2.2.6.5 <i>In-vitro</i> -Phosphorylierung immunpräzipitierter Proteine mit PKC $\delta$ .....	55
2.2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	56
2.2.6.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	57
2.2.6.8 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western-Blot) .....	58
2.2.6.9 Immundetektion von Western-Blots .....	59
2.2.6.10 „Stripping“ von Western-Blots .....	60
2.2.7 Elektronische Datenverarbeitung.....	60
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 GRASP, ein neuer Cytohesin-1-Interaktionspartner.....</b>	<b>61</b>
3.1.1 GRASP ist ein CYTIP-homologes Protein .....	61
3.1.2 GRASP interagiert mit Cytohesin-1 .....	63
3.1.3 Die subzelluläre Lokalisation von GRASP in T-Zellen .....	65
3.1.4 GRASP und Cytohesin-1 kolokalisieren an der Plasmamembran .....	66
3.1.5 GRASP wird nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation ITAM-phosphoryliert.....	68
3.1.6 Cytohesin-1 verstärkt die GRASP-Phosphorylierung .....	72
3.1.6 GRASP inhibiert die IL-2-Promotor-Aktivierung.....	73
<b>3.2 Die Regulation des Cytohesin-1-Interaktionspartners CYTIP durch Phosphorylierung und Degradation.....</b>	<b>76</b>
3.2.1 Expressionsanalyse von CYTIP .....	76
3.2.2 Cytohesin-1 und CYTIP kopräzipitieren aus humanen PBL .....	77
3.2.3 Endogenes CYTIP wird nach PMA-Stimulation degradiert.....	78
3.2.4 CYTIP wird nach PMA-Stimulation phosphoryliert.....	80
3.2.5 CYTIP wird nach PMA-Stimulation ubiquitiniert.....	84

3.2.6 Die CYTIP-Phosphorylierung ist PKC-abhängig.....	85
3.2.7 Die Degradation von CYTIP ist PKC $\delta$ - oder PKC $\theta$ -abhängig .....	87
3.2.8 CYTIP wird <i>in vitro</i> durch PKC $\delta$ phosphoryliert .....	90
3.2.9 Identifizierung der CYTIP-Phosphorylierungsstellen .....	91
3.2.10 Die Mutante CYTIP-Clu-2 wird nicht degradiert.....	96
3.2.11 CYTIP und Cytohesin-1 werden nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation phosphoryliert.....	97
3.2.12 Die CYTIP-Degradation ist durch TCR-Stimulation induzierbar.....	98
3.2.13 CYTIP wird durch die Überexpression von Cytohesin-1 stabilisiert.....	99
3.2.14 Durch Cytohesin-1-„knock-down“ wird die CYTIP-Expression reduziert und die Cytohesin-3-Expression verstärkt.....	100
3.2.15 Die E3 Ubiquitin-Ligase ARD1 könnte an der Degradation von CYTIP beteiligt sein.....	101
3.2.16 CYTIP verstärkt die IL-2-Promotor-Aktivierung.....	104
<b>3.3 Die Regulation des Integrins LFA-1 durch Cytohesin-1 und dessen Guaninnukleotid-Austauschfaktor-Aktivität.....</b>	<b>105</b>
3.3.1 Cytohesin-1-„knock-down“ inhibiert die LFA-1-vermittelte Adhäsion .....	105
3.3.2 Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität reduziert die LFA-1-Adhäsion .....	106
3.3.3 Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität hemmt die Migration.....	107
3.3.4 Cytohesin-1-„knock-down“ inhibiert die 327C-Induktion .....	109
3.3.5 Die 327C-Induktion ist unabhängig von der GEF-Aktivität.....	110
3.3.6 ARD1-„knock-down“ inhibiert die LFA-1-vermittelte Adhäsion.....	111
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>113</b>
<b>4.1 Charakterisierung des ITAM-Proteins GRASP .....</b>	<b>114</b>
4.1.1 GRASP interagiert mit Cytohesin-1 .....	114
4.1.2 GRASP lokalisiert in T-Zellen an der Plasmamembran .....	116
4.1.3 GRASP inhibiert die transkriptionelle Induktion des IL-2-Promotors.....	119
<b>4.2 Die CYTIP-Regulation durch Phosphorylierung und Degradation. 122</b>	<b>122</b>
4.2.1 CYTIP wird PKC-vermittelt phosphoryliert.....	122
4.2.2 CYTIP wird durch Cytohesin-1 stabilisiert.....	126
4.2.3 Mögliche Funktion von ARD1 bei der CYTIP-Degradation .....	128

4.2.4 CYTIP verstärkt die transkriptionelle Induktion des IL-2-Promotors .....	130
<b>4.3 Die funktionale Rolle von Cytohesin-1 bei der LFA-1-Regulation..</b>	<b>132</b>
4.3.1 Die LFA-1-Aktivierung ist abhängig von Cytohesin-1 .....	132
4.3.2 Die GEF-Funktion ist für die LFA-1-Aktivierung nicht erforderlich .....	135
4.3.3 Mögliche Funktion von ARD1 als Cytohesin-1-Effektor .....	138
<b>5 AUSBLICK.....</b>	<b>140</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>143</b>
<b>8 ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>162</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>165</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>166</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten schützt den Organismus durch vielfältige Mechanismen effektiv vor den Angriffen durch pathogene Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Es ermöglicht die Erkennung und gezielte Eliminierung der Pathogene sowie veränderter körpereigener Zellen. Die Abwehrmechanismen des Immunsystems werden durch die Leukozyten (weisse Blutzellen) gewährleistet, die fortlaufend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden. Das Immunsystem verfügt über eine angeborene oder unspezifische sowie eine adaptive oder erworbene Immunität. Die angeborene Immunität verleiht einen schnellen ersten Schutz gegen pathogene Mikroorganismen und wird hauptsächlich durch natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und das Komplementsystem vermittelt. Die Erkennung der Pathogene basiert dabei größtenteils auf evolutionär konservierten Strukturen. Nicht alle Krankheitserreger können jedoch durch das angeborene Immunsystem erkannt und erfolgreich abgewehrt werden. Infektionen, die nicht durch die angeborene Immunität beseitigt werden können, lösen eine adaptive Immunreaktion aus. Die adaptive Immunantwort richtet sich spezifisch gegen das auslösende Pathogen und ermöglicht durch die Differenzierung langlebiger Gedächtniszellen eine schnelle und gezielte Abwehr einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger, so dass in vielen Fällen eine lebenslange Immunität gegen ein Pathogen erworben wird.

Die adaptive Immunität wird durch die Lymphozyten vermittelt, wobei zwischen B- und T-Lymphozyten unterschieden wird. B- und T-Vorläuferzellen entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle. Während B-Zellen im Knochenmark ausreifen, wandern T-Zellen zu ihrer Reifung in den Thymus. Reife naive B- und T-Zellen werden in den Blutkreislauf entlassen und zirkulieren fortan kontinuierlich durch das Blut und die peripheren lymphatischen Organe.

B- und T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Antigen-Rezeptoren, die aus variablen und konstanten Regionen bestehen. Die variablen Regionen der Antigen-Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten werden während der Reifung der Zellen durch somatische Rekombination aus verschiedenen Gen-Segmenten zufällig zusammengesetzt, wodurch eine enorme Diversität der Rezeptoren erzeugt wird. Jede reife B- oder T-Zelle exprimiert jedoch nur Antigen-Rezeptoren einer einzigen

Spezifität, da die Rekombination des zweiten Allels supprimiert wird. Das Repertoire der möglichen Antigen-Rezeptoren beträgt bei B-Zellen etwa  $10^{14}$ , bei T-Zellen etwa  $10^{18}$ . Lymphozyten, deren Antigen-Rezeptoren gegen ubiquitäre körpereigene Strukturen gerichtet sind, werden in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung durch klonale Deletion eliminiert. Trifft ein naiver Lymphozyt in einem peripheren lymphatischen Organ auf ein passendes Antigen, löst dies seine Aktivierung und Proliferation und damit eine adaptive Immunantwort aus.

Der Antigen-Rezeptor der B-Lymphozyten (B-Zell-Rezeptor, BCR) besteht aus einem transmembranen Antikörper-Molekül sowie zwei nicht-kovalent assoziierten Signalkomplexen aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Ig $\alpha$  und Ig $\beta$ ). Aktivierte B-Zellen proliferieren und differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Antikörper vermitteln den humoralen Teil der adaptiven Immunität. Die Bindung von Antikörpern an Toxine oder Oberflächen-Antigene extrazellulärer Pathogene kann deren Wechselwirkung mit Körperzellen hemmen (Neutralisierung). Weiterhin erleichtert die Bindung an Oberflächen-Antigene extrazellulärer Pathogene (Opsonisierung) deren Aufnahme durch phagozytierende Zellen und aktiviert das Komplement-System.

Die meisten pathogenen Viren, Bakterien und Parasiten vermehren sich jedoch innerhalb von Zellen, wo sie für Antikörper nicht zugänglich sind. Intrazelluläre Infektionen werden durch die Zell-vermittelte adaptive Immunabwehr bekämpft. Für den Zell-vermittelten Teil der adaptiven Immunität sind die T-Lymphozyten verantwortlich.

Der Antigen-Rezeptor der T-Zellen ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit oder seltener einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Untereinheit. Wie der BCR besitzt auch der T-Zell-Rezeptor (TCR) selbst keine Signalfunktion. Die Signalübermittlung in die Zelle wird durch TCR-assoziierte akzessorische Ketten übernommen, worauf im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden soll. Im Gegensatz zum Antigen-Rezeptor der B-Zellen, der lösliche Antigene binden kann, erkennt der TCR Antigene nur in Form kurzer Peptide, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) gebunden sind. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHC-Moleküle der Klasse I (MHC-I) werden von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und präsentieren Peptide proteasomal degradierter, zytosolischer Proteine, die zelleigenen oder pathogenen Ursprungs sein können. Diese Peptide werden über den sogenannten TAP-Komplex

(*transporters associated with antigen processing*) in das Endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert, wo die MHC-Moleküle mit passenden Peptiden beladen werden. MHC-Klasse-II (MHC-II) -Moleküle werden, mit Ausnahme der Makrophagen-verwandten Mikroglia-Zellen im Gehirn, nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems exprimiert. Zu den APC zählen dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Auf MHC-II-Molekülen werden Peptide von Proteinen präsentiert, die in intrazellulären phagolysosomalen Vesikeln abgebaut wurden. Neben zelleigenen können dies Proteine pathogenen Ursprungs sein, die durch APC phagozytotisch oder endozytotisch aufgenommen wurden.

MHC-Moleküle werden durch den TCR sowie die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 gebunden, wobei CD8 an MHC-I, CD4 an MHC-II bindet. Unreife CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (doppelt positive) T-Zellen unterlaufen im Thymus eine positive Selektion, wenn ihr TCR an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle bindet, wonach die Expression von CD4 bzw. CD8 supprimiert wird.

Die Bindung des TCR einer naiven T-Zelle an einen passenden Peptid:MHC-Komplex einer APC löst die Proliferation der T-Zelle und die Differenzierung der Tochterzellen zu bewaffneten T-Effektorzellen aus. CD8-positive T-Zellen differenzieren in der Regel zu zytotoxischen T-Zellen, deren Hauptfunktion darin besteht, virusinfizierte Körperzellen zu töten. Die zytotoxische Aktivität der Killerzellen wird durch die Freisetzung von Effektormolekülen vermittelt, die zum einen Poren in der Membran der Zielzelle erzeugen und zum anderen die Apoptose der Zielzelle auslösen.

CD4-positive T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zunächst zu T<sub>H</sub>0-Zellen, welche die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und IL-4 sowie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sezernieren. T<sub>H</sub>0-Zellen können weiter zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren. Die Entscheidung, ob eine aktivierte T<sub>H</sub>0-Zelle zu einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Effektor-Zelle differenziert, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zytokine spielen dabei eine wichtige Rolle. Das Zytokin IL-12 begünstigt die T<sub>H</sub>1-Differenzierung, während IL-4 die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen fördert [Agnello *et al.*, 2003]. Die inflammatorischen T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und TNF- $\beta$  (Lymphotoxin, LT) und veranlassen so Makrophagen dazu, intrazelluläre Bakterien abzutöten. T<sub>H</sub>2-Zellen sind darauf spezialisiert, B-Zellen zu aktivieren. Sie sezernieren die B-Zellen stimulierenden Zytokine IL-4 und IL-5. Die molekularen

Mechanismen, die die Aktivierung naiver T-Lymphozyten vermitteln, werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### **1.2 Die Aktivierung der T-Lymphozyten**

Naive T-Lymphozyten befinden sich während ihrer Zirkulation durch den Blutkreislauf und die peripheren lymphatischen Organe in einem mitotisch inaktiven Zustand. Die Bindung des TCR an einen passenden Peptid:MHC-Komplex auf der Oberfläche einer APC löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die unter dem Begriff T-Zell-Aktivierung zusammengefasst werden. In deren Folge wird eine Polarisierung der Zelle, eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts sowie die transkriptionelle Induktion T-Zell-spezifischer Gene eingeleitet. Die Induktion des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2 sowie der hochaffinen  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors resultiert in der Proliferation und damit der klonalen Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen.

Für die Signalweiterleitung vom TCR ins Zellinnere kommt den Proteinen des TCR-assoziierten CD3-Komplexes, CD3 $\gamma$ , - $\delta$  und - $\epsilon$ , sowie den homodimeren  $\zeta$ -Ketten eine essentielle Bedeutung zu. Die zytoplasmatischen Domänen der CD3-Untereinheiten und der  $\zeta$ -Ketten enthalten ein konserviertes Sequenzmotiv, das als ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) bezeichnet wird. Das ITAM ist ein Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv der Konsensussequenz [D/E X X Y X X L/I X<sub>6-8</sub> Y X X L/I] [Reth, 1989]. Jede Untereinheit des CD3-Komplexes enthält ein ITAM, jede  $\zeta$ -Kette (CD247) enthält drei dieser Motive.

Die beiden Tyrosinreste der ITAMs in den zytoplasmatischen Domänen der CD3- und  $\zeta$ -Ketten sind Substrate der Tyrosinkinase Lck und Fyn. Die Aktivierung dieser Kinasen der Src-Familie ist ein frühes Ereignis in der Signalkaskade des TCR. Die Aktivität der Kinasen wird durch Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert, wobei Src-Kinasen sich gegenseitig phosphorylieren und dadurch aktivieren können. Die Dephosphorylierung an inhibitorischen Stellen durch die membranständige Phosphatase CD45 erleichtert die Aktivierung und steigert die katalytische Aktivität der Kinasen [Zhang *et al.*, 2005].

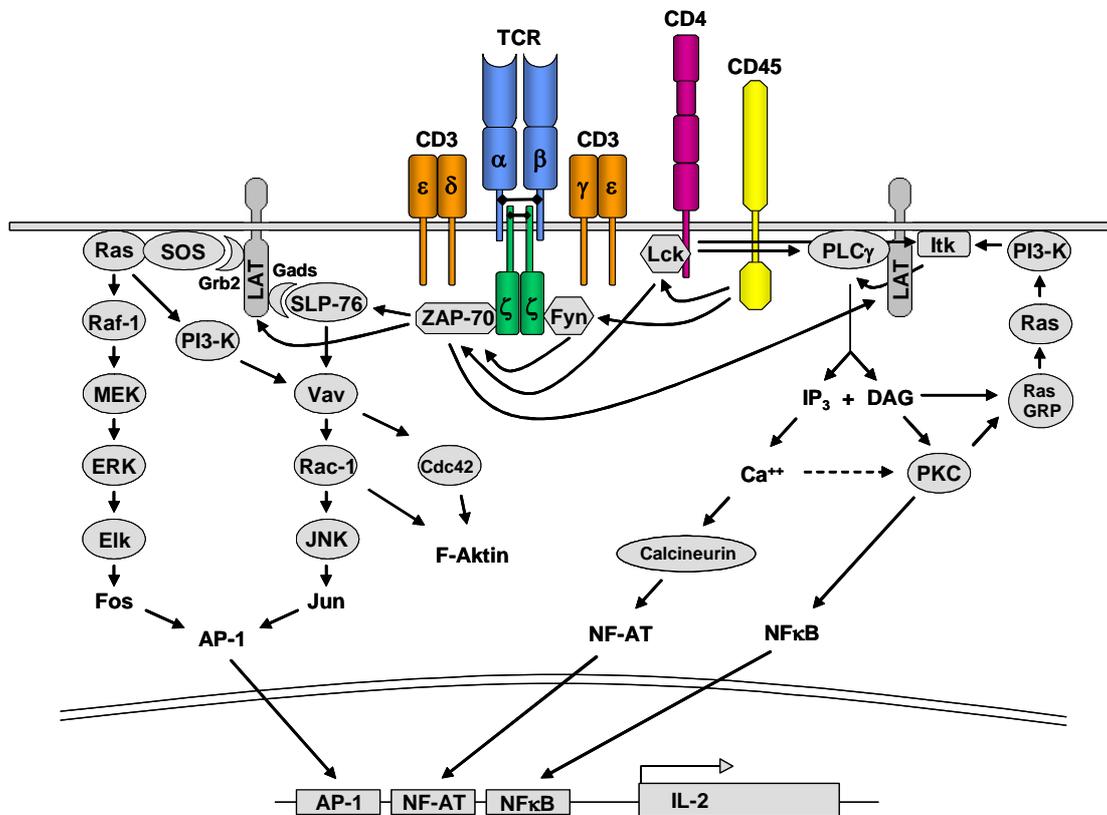
Die phosphorylierten ITAMs der TCR-assoziierten Ketten bilden Bindungsstellen für die Tandem-SH2- (*Src homology 2*) Domänen der Tyrosin-Kinasen ZAP-70 und Syk. Diese Kinasen können ihrerseits durch die Src-Kinasen Lck und Fyn an regulatorischen Stellen phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Die Kinasen

ZAP-70 und Syk sind durch die Phosphorylierung von Adapter-Proteinen für die Weiterleitung und Amplifikation der TCR-induzierten Signale wichtig [Samelson, 2002]. Zu den Substraten der Kinase ZAP-70 gehören die Adapter-Proteine SLP-76 und LAT [Zhang *et al.*, 1998; Finco *et al.*, 1998]. Diese bilden zusammen eine molekulare Plattform für die Assemblierung von Multi-Protein-Komplexen und ermöglichen dadurch die Kopplung intrazellulärer Signalkaskaden an TCR-proximale Ereignisse.

Die Rekrutierung der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren SOS und Vav resultiert in der Aktivierung der kleinen G-Proteine Ras bzw. Rac-1 und Cdc42. Ras vermittelt zum einen die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) [Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996]. Diese Kinase phosphoryliert das Phospholipid Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>; PIP<sub>2</sub>) am 3'-OH des Inositolrings. Dadurch entsteht das Signalmolekül Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>; PIP<sub>3</sub>), an welches Vav und die Tec-Kinase Itk mittels einer Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne binden und so an die Plasmamembran rekrutiert werden. Zum anderen löst Ras über Raf-1 und MEK eine MAP-Kinase- (*mitogen activated protein kinase*) Kaskade aus, in deren Folge schließlich der Transkriptionsfaktor Fos aktiviert wird. Die Vav-vermittelte Aktivierung des G-Proteins Rac-1 resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Jun durch die JNK (Jun N-terminale Kinase). Jun und Fos bilden zusammen den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1. Die lokale Aktivierung der Rho-GTPasen Rac-1 und Cdc42 durch Vav ist darüber hinaus wichtig für die Regulation und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, wodurch eine Polarisierung der Zelle erreicht wird.

Durch die Bindung der Phospholipase C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>) an phosphoryliertes LAT wird ihre Aktivierung durch Lck und Itk ermöglicht. Die PLC<sub>γ</sub> hydrolysiert das Phospholipid PIP<sub>2</sub>, wodurch die beiden Signalmoleküle Inositol (1,4,5)-trisphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>; IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) entstehen. IP<sub>3</sub> erhöht durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel und induziert über die Phosphatase Calcineurin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT. DAG aktiviert Mitglieder der Proteinkinase C (PKC) Familie sowie die Ras aktivierenden Austauschfaktoren der RasGRP (*Ras guanyl releasing factor*) Familie. Die PKC<sub>θ</sub> ist das wichtigste Isoenzym der PKC-Familie bei der T-Zell-Aktivierung. Sie ist an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und NF-AT beteiligt [Sun *et al.*, 2000; Pfeifhofer *et al.*, 2003].

Die wichtigsten Signalkaskaden, die durch die Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes induziert werden, sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.1 Die TCR/CD3-induzierte Signaltransduktion in T-Zellen**

Die durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) und den assoziierten CD3-Komplex induzierten Signalkaskaden, die zur transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promotors führen, sind am Beispiel einer CD4-positiven T-Zelle dargestellt. Die Aggregation des TCR mit dem Korezeptor CD4 und der membranständigen Phosphatase CD45 löst die Aktivierung der Kinasen Lck und Fyn aus, die daraufhin die ITAMs in den zytosolmatischen Domänen der CD3- und  $\zeta$ -Ketten phosphorylieren, wodurch ZAP-70 rekrutiert und aktiviert wird. ZAP-70 phosphoryliert die Adapter-Proteine LAT und SLP-76. Die Rekrutierung der Austauschfaktoren SOS und Vav führt zur Aktivierung von Ras und Rac-1 und schließlich des Transkriptionsfaktors AP-1. Durch die Lck- und Itk-vermittelte Aktivierung der PLC $\gamma$  werden die Signalmoleküle IP $_3$  und DAG gebildet. IP $_3$  bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Spiegels, wodurch der Transkriptionsfaktor NF-AT aktiviert wird. DAG vermittelt die Aktivierung von RasGRPs und PKCs, woraus die Aktivierung der PI3-Kinase und des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B resultiert. AP-1, NF-AT und NF $\kappa$ B induzieren die Transkription des IL-2-Gens.

Die Signale, die durch die Interaktion des TCR und des Korezeptors CD4 bzw. CD8 mit dem Peptid:MHC-Komplex ausgelöst werden, sind für die Aktivierung einer naiven T-Zelle jedoch nicht hinreichend. T-Zellen die nur über den TCR Signale empfangen, werden vielmehr apoptotisch oder verfallen in einen nicht-reaktiven Zustand, der als Anergie bezeichnet wird. Für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle sind zusätzliche Signale durch akzessorische Moleküle wie LFA-1 (CD11a/CD18), LFA-2 (CD2) sowie CD28 erforderlich.

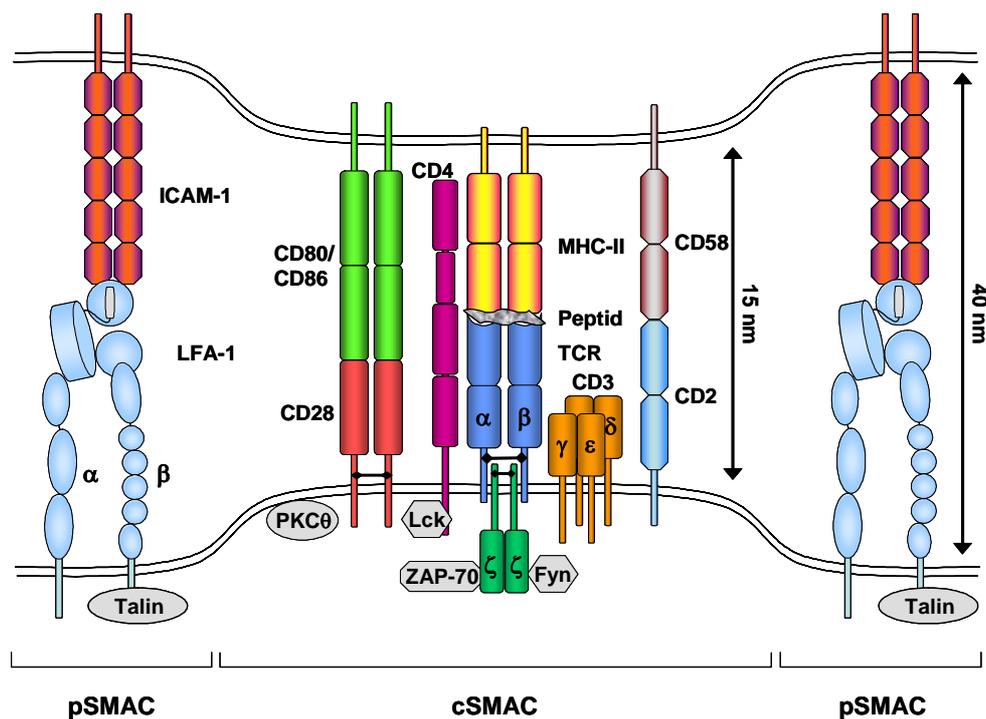
Der Rezeptor CD28 übermittelt ein wichtiges kostimulatorisches Signal. Er bindet an die Proteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die ausschließlich durch professionelle APC exprimiert werden. Die Interaktion löst in Verbindung mit der Stimulation des TCR die verstärkte Aktivierung der PI3-Kinase, die Stabilisierung der IL-2-mRNA sowie die Expression der IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette und anti-apoptotischer Gene, wie Bcl-x<sub>L</sub> aus [Umlauf *et al.*, 1995; Boise *et al.*, 1995; Kane *et al.*, 2001; Appleman *et al.*, 2002]. Die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors bildet zusammen mit der konstitutiv exprimierten  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette einen hochaffinen Rezeptor [Wang und Smith, 1987]. Die Bindung des Liganden IL-2 an diesen trimere Rezeptor induziert den Eintritt der T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus und die Proliferation.

Man kennt inzwischen mehrere CD28-verwandte Rezeptoren, die nur durch aktivierte T-Zellen exprimiert werden. Zu diesen zählen CTLA-4, ICOS, PD-1 und BTLA. CTLA-4 bindet B7-1 und B7-2 mit einer mehrfach höheren Affinität als CD28. ICOS und PD-1 binden an die B7-verwandten Moleküle ICOSL (B7-H2) bzw. PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC), während der BTLA-Ligand derzeit noch nicht bekannt ist [Greenwald *et al.*, 2005]. Die ICOS:ICOSL-Interaktion induziert ähnliche kostimulatorische Signale wie CD28:B7-1/B7-2 und verstärkt die TCR/CD3-induzierte Proliferation. Durch ICOS wird allerdings die IL-2-Produktion nicht erhöht, sondern vielmehr eine vermehrte Sekretion der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$  bewirkt [Hutloff *et al.*, 1999; Coyle *et al.*, 2000]. Durch die Induktion der IL-4-Produktion ist ICOS an der T<sub>H</sub>2-Differenzierung beteiligt [Nurieva *et al.*, 2003]. Im Gegensatz zu CD28 und ICOS vermitteln CTLA-4, PD-1 und BTLA negative Signale, durch die die Aktivierung der Zelle inhibiert wird [Watanabe *et al.*, 2003; Parry *et al.*, 2005]. Diese inhibierenden Signale scheinen einerseits für die Differenzierung langlebiger Gedächtniszellen, andererseits für die Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell-Toleranz von entscheidender Bedeutung zu sein [Greenwald *et al.*, 2005].

Das effiziente Zusammenwirken der Membranrezeptoren und intrazellulärer Signalmoleküle während der T-Zell-Aktivierung erfordert eine koordinierte räumliche Anordnung der beteiligten Proteine. Der initiale Kontakt zwischen einer naiven T-Zelle und einer APC ist Antigen-unabhängig und wird hauptsächlich durch Adhäsionsmoleküle ausgebildet. Erfolgt keine spezifische Antigen-Erkennung, wird der Kontakt schnell wieder gelöst und die naive T-Zelle kann so weitere APC kontaktieren. Die spezifische Bindung des TCR an den Peptid-MHC-Komplex der APC löst eine charakteristische Umverteilung von Membranrezeptoren und intrazellulären Signalmolekülen aus [Bromley *et al.*, 2001]. Die so gebildete Kontakt-Region wird analog zur Kontaktstelle neuronaler Zellen als immunologische Synapse bezeichnet (Abb 1.2).

Der TCR und die akzessorischen Rezeptoren CD2, CD4/CD8 und CD28 werden innerhalb weniger Minuten in einer zentralen Region der Synapse, dem sogenannten cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) angereichert [Monks *et al.*, 1998; Grakoui *et al.*, 1999]. Lck, Fyn und die PKC $\theta$  sind weitere Komponenten, welche in diese zentrale Region rekrutiert werden [Bi *et al.*, 2001]. Das Integrin LFA-1 und das assoziierte Aktin-bindende Protein Talin formen einen äusseren Ring um diese zentrale Region, der als pSMAC (*peripheral SMAC*) bezeichnet wird.

Die molekularen Prozesse durch die die Segregation der beteiligten Proteine in die unterschiedlichen Kompartimente der Synapse organisiert werden, sind Gegenstand intensiver Forschung. Die CD28-vermittelte Kostimulation, die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Vav sowie spezialisierte, Sphingolipid- und Cholesterol-angereicherte Membran-Mikrodomänen, sogenannte Lipid-„Rafts“, sind entscheidend an der Formation der Synapse beteiligt [Viola *et al.*, 1999; Villalba *et al.*, 2000; Dustin und Cooper, 2000; Huang *et al.*, 2002; Marwali *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005]. Man kennt inzwischen verschiedene Formen der immunologischen Synapse, es ist jedoch noch nicht geklärt, inwiefern diese verschiedenen Typen auf unterschiedliche Weise zur T-Zell-Aktivierung beitragen und welche Formen *in vivo* ausgebildet werden [Friedl *et al.*, 2005]. Die spezifische Organisation der Membranrezeptoren und intrazellulärer Signalmoleküle in die distinkten Kompartimente der Synapse lassen jedoch eine Funktion bei der Modulation der T-Zell-Aktivierung vermuten. Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der immunologischen Synapse.



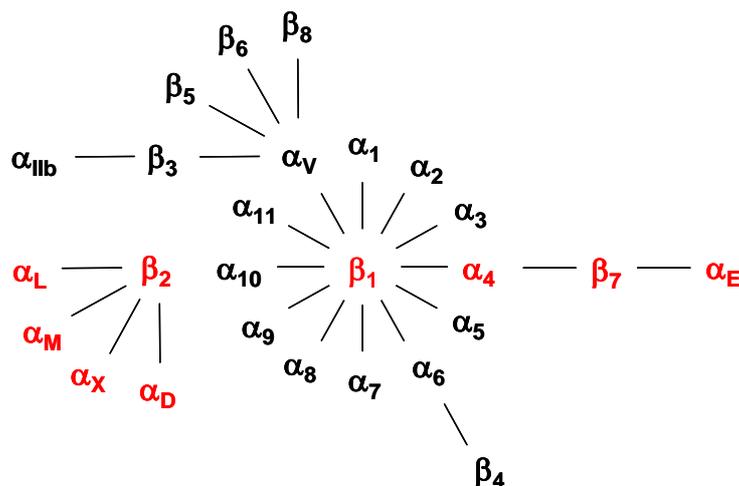
**Abb. 1.2 Schematische Darstellung der immunologischen Synapse**

Die immunologische Synapse stellt eine räumlich koordinierte Organisation membranständiger Rezeptoren sowie intrazellulärer Signalmoleküle dar, die sich bei einem Antigen-spezifischen Kontakt zwischen einer T-Zelle und einer APC ausbildet. Der TCR/CD3/CD4-Komplex, der kostimulatorische Rezeptor CD28 und das Adhäsionsmolekül CD2 (LFA-2) sowie die intrazellulären Signalproteine Lck, Fyn, ZAP-70 und die PKC $\theta$  werden bei der Bildung der Synapse in das Zentrum der Kontakt-Region transportiert. Dieser zentrale Bereich der Synapse wird als cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) bezeichnet. ICAM-1, LFA-1 und das Aktin-bindende Protein Talin sind in einem Ring um das cSMAC angereichert, der als pSMAC (*peripheral SMAC*) bezeichnet wird. Der Membranabstand innerhalb des cSMAC beträgt ca. 15 nm, im pSMAC ca. 40 nm.

Das Integrin LFA-1 bildet bei der Formation der immunologischen Synapse einen peripheren Ring um das cSMAC aus. Im folgenden Abschnitt soll näher auf die Familie der Integrine und insbesondere das Integrin LFA-1 und dessen essentielle Funktionen bei der Adhäsion und Migration der Immunzellen eingegangen werden.

### 1.3 Integrine

Integrine sind eine Familie heterodimerer Adhäsionsmoleküle, die aus einer  $\alpha$ - und einer nicht kovalent assoziierten  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Vertreter dieser Familie werden gewebespezifisch von fast allen Zellen des Körpers exprimiert. Integrine vermitteln die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und des Plasmas sowie an zelluläre Rezeptoren. Aufgrund dieser Funktionen sind sie für die Entwicklung und Homöostase vielzelliger Organismen essentiell [Hynes, 1992]. Integrine binden ihre Liganden nicht konstitutiv, sondern werden dazu durch intrazelluläre Signale aktiviert (*inside-out signaling*). Überdies besitzen Integrine auch die Fähigkeit intrazelluläre Signalkaskaden zu induzieren (*outside-in signaling*). Derzeit sind 18 verschiedene Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die zusammen mindestens 24 Heterodimere bilden können [Plow *et al.*, 2000]. Diese sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3 Die Familie der Integrine**

Derzeit sind 18 verschiedene Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die zusammen mindestens 24 Heterodimere bilden können. Bekannte Heterodimere sind durch Verbindungen angezeigt. Die wichtigsten Leukozyten-Integrine sind rot dargestellt.  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine wurden bislang nur auf Leukozyten gefunden.

Leukozyten exprimieren nur  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\beta_7$ -Integrine, wobei  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine bislang ausschließlich auf Leukozyten nachgewiesen wurden. Die  $\beta_2$ -Integrine stellen hier die am stärksten vertretene Gruppe dar. Man kennt vier  $\beta_2$ -Integrine: LFA-1 (CD11a/CD18,  $\alpha_L/\beta_2$ ), Mac-1 oder CR3 (CD11b/CD18,  $\alpha_M\beta_2$ ), CR4 (CD11c/CD18,

$\alpha_X\beta_2$ ) und  $\alpha_D\beta_2$  (CD11d/CD18). Die Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine für die Immunabwehr macht sich bei einem Ausfall der  $\beta_2$ -Expression bemerkbar. Dieser hat den Verlust aller  $\beta_2$ -Integrine zur Folge und verursacht das Krankheitssyndrom der Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (LAD). Patienten mit dieser Krankheit sterben meist in jungen Jahren an wiederkehrenden Infektionen, da ihre Leukozyten nicht aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe auswandern und an einen Infektionsherd gelangen können [Springer, 1990; Hogg und Bates, 2000].

### 1.3.1 Die Funktion der Integrine bei der Extravasation

Die Zell-Zell-Interaktionen der Immunzellen sind meist dynamisch und transient. Da Integrine ihre Liganden nicht konstitutiv binden, sondern durch intrazelluläre Signale reversibel aktiviert werden, sind sie in der Lage solche transienten Adhäsionsprozesse zu vermitteln [van Kooyk und Figdor, 2000]. Um den koordinierten Ablauf dieser dynamischen Vorgänge zu gewährleisten, müssen die adhäsiven Eigenschaften der Integrine zeitlich und räumlich genau reguliert werden.

Die Fähigkeit der Leukozyten, den Blutstrom zu verlassen, ist entscheidend für die Immunabwehr. Auf diese Weise wird die Rekrutierung phagozytierender Zellen an einen Entzündungsherd ermöglicht. Naive Lymphozyten müssen aus dem Blutkreislauf in periphere lymphatische Organe einwandern, um dort präsentierte Antigene aufzuspüren, während bewaffnete T-Effektorzellen um ihre Funktion in peripheren Geweben erfüllen zu können an einen Infektionsherd gelangen müssen.

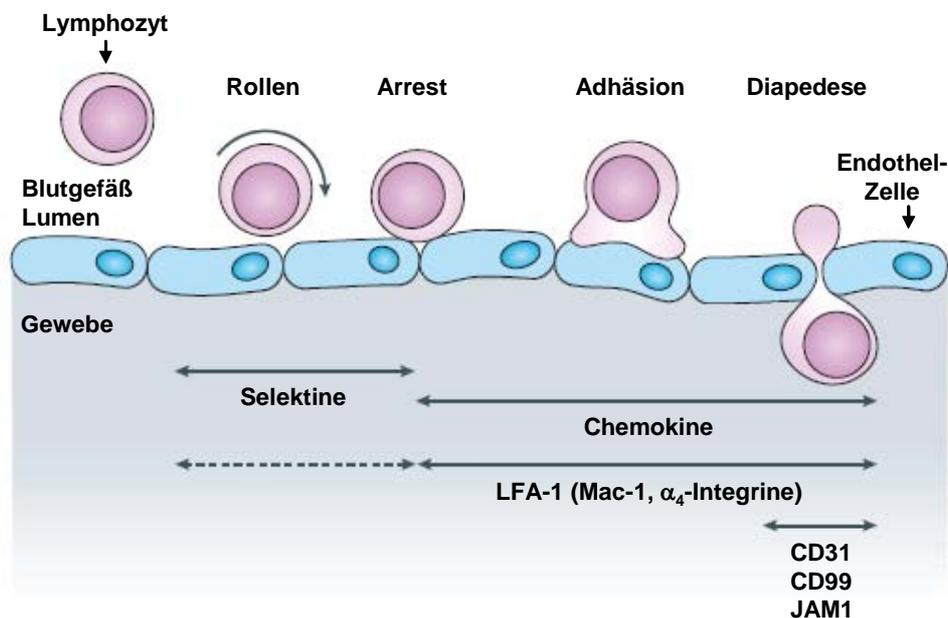
Der Prozess des Austritts aus dem Blutstrom wird als Extravasation bezeichnet und kann in vier Schritte unterteilt werden. Zunächst beginnen die Leukozyten auf dem Gefäß-Endothel zu rollen. Diese rollende Bewegung wird hauptsächlich durch Selektine vermittelt. Leukozyten exprimieren L-Selektin, das an den Kohlehydratanteil sulfatiertes Sialyl-Lewis<sup>x</sup> der Mucin-ähnlichen vaskulären Adressine CD34, GlyCAM und MadCAM bindet. CD34 und GlyCAM werden auf den hohen Endothelzellen der postkapillaren Venolen (*high endothelial venules*, HEV) der Lymphknoten exprimiert und vermitteln das „homing“ der Lymphozyten in diese peripheren lymphatischen Organe. MadCAM (*mucosa-associated cell adhesion molecule*) wird auf dem Schleimhaut-Endothel exprimiert und dirigiert den Eintritt in die lymphatischen Schleimhautgewebe, z. B. im Darm. Bei einer Entzündung im Gewebe sezernieren Makrophagen IL-1 und TNF- $\alpha$ , wodurch auf vaskulärem

Endothel die Expression von P-Selektin und E-Selektin induziert wird, die an Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Gruppen der Leukozyten binden. Die Wechselwirkungen der Selektine bewirken eine Verlangsamung der Leukozyten relativ zum Blutstrom. Die Adhäsion der Zellen an das Endothel ist jedoch so schwach, dass sie durch die Scherkräfte des Blutstromes immer wieder gelöst wird, worauf das charakteristische Rollen der Zellen zurückzuführen ist. Durch die schwache Adhäsion wird jedoch das Arretieren der Zellen ermöglicht, das den zweiten Schritt der Extravasation darstellt.

Das Arretieren der Leukozyten auf dem Endothel wird durch Integrine vermittelt. Die Integrine werden durch Chemokine, die an die Proteoglycan-Schicht auf dem Endothel gebunden sind, durch einen unvollständig verstandenen Mechanismus im Subsekunden-Bereich aktiviert [Constantin *et al.*, 2000; Shamri *et al.*, 2005]. Die Aktivierung der Integrine wird in den Venolen der Lymphknoten durch das Chemokin CCL21 (SLC, *secondary lymphoid tissue chemokine*) induziert, an Entzündungsherden durch CXCL8 (IL-8), das durch aktivierte Makrophagen sezerniert wird. Für den Arrest der Lymphozyten ist hauptsächlich LFA-1 verantwortlich, bei den Neutrophilen und Monozyten zusätzlich Mac-1. Beide Integrine binden den Liganden ICAM-1, dessen Expression auf vaskulärem Endothel durch Makrophagen-sezerniertes TNF- $\alpha$  induziert wird. Die Endothelzellen der Lymphknoten-Venolen exprimieren ICAM-1 dagegen konstitutiv. Bewaffnete T-Effektorzellen exprimieren neben LFA-1 das Integrin VLA<sub>4</sub> (*very late antigen-4*,  $\alpha_4\beta_1$ ). Dessen Interaktion mit dem ebenfalls durch TNF- $\alpha$  induzierten Liganden VCAM-1 auf aktiviertem Endothel ist neben der LFA-1:ICAM-1-Interaktion wichtig für die Extravasation aktivierter T-Zellen in infiziertes Gewebe. Das Integrin LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ), das von einer Untergruppe naiver T-Zellen exprimiert wird, interagiert mit dem bereits erwähnten, auf Schleimhaut-Endothel exprimierten MadCAM.  $\alpha_4$ -Integrine sind überdies auch am Rollen der Zellen auf dem Endothel beteiligt [Alon *et al.*, 1995; Berlin *et al.*, 1995].

Durch die Bindung von LFA-1 an die Liganden ICAM-1 und -2, kommt es zu einer festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Es folgt die Migration zu einer Kontaktstelle zweier Endothelzellen und schließlich das Hindurchwandern des Leukozyten zwischen den Endothelzellen. Dieser Vorgang wird als Diapedese bezeichnet. An der Diapedese sind weiterhin das von endothelialen Zellen und Leukozyten exprimierte Adhäsionsmolekül PECAM (CD31), der LFA-1-Ligand JAM-1 (*junctional adhesion molecule-1*) sowie CD99 beteiligt [Muller *et al.*, 1993; Ostermann

*et al.*, 2002; Schenkel *et al.*, 2002]. Die Basalmembran wird bei der Diapedese durch sezernierte Matrix-Metalloproteinasen überwunden. Die gerichtete Migration bei der Diapedese, sowie die anschließende Migration im Gewebe zu einem Entzündungsherd bzw. in die T-Zell-Regionen in peripheren lymphatischen Organen wird durch Chemokin-Gradienten gesteuert. Die Wanderung in peripherem Gewebe wird vermutlich größtenteils durch  $\beta_1$ -Integrine vermittelt [Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid, 1999]. Abbildung 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der Extravasation am Beispiel eines Lymphozyten.



**Abb. 1.4 Die Extravasation der Leukozyten**

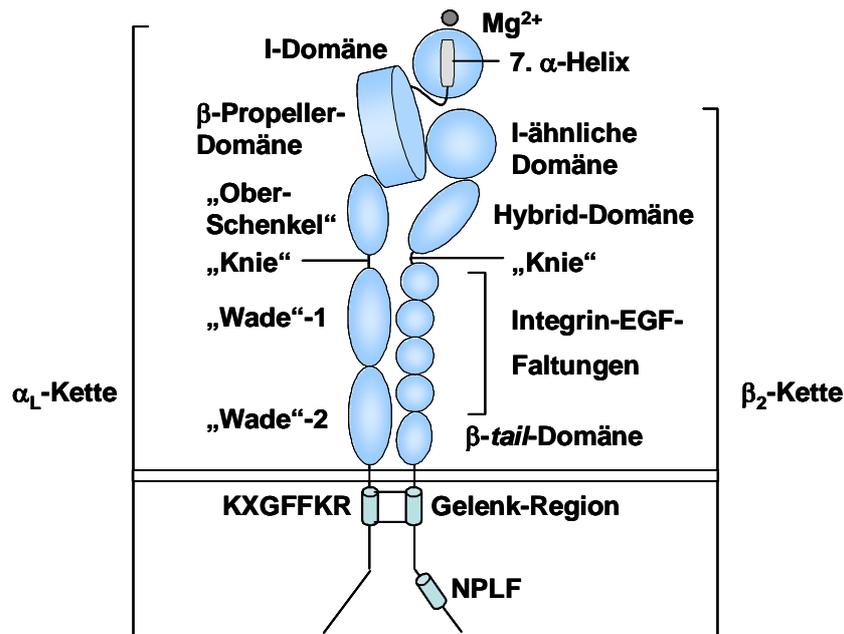
Das Auswandern der Leukozyten aus einem Blutgefäß wird als Extravasation bezeichnet und ist hier am Beispiel eines Lymphozyten dargestellt. Bei der Extravasation können vier Schritte unterschieden werden. 1) Durch Selektin-vermittelte Wechselwirkungen kommt es zu einer Verlangsamung der Zellen im Blutstrom, wobei die Zellen auf dem Endothel entlang rollen. 2) Durch Proteoglycan-gebundene Chemokine erfolgt die Aktivierung der Leukozyten-Integrine. Dies bewirkt einen sofortigen Arrest der Zellen. LFA-1 spielt dabei die wichtigste Rolle. Bei Monozyten und Neutrophilen ist außerdem Mac-1 an diesem Prozess beteiligt, bei bewaffneten T-Effektorzellen VLA-4. 3) Mittels der aktivierten Integrine adhärirt der Leukozyt fest am Endothel. 4) Der Leukozyt wandert zwischen den Endothelzellen hindurch in das umgebende Gewebe (Diapedese). Abbildung verändert nach Kinashi [2005].

### 1.3.2 Die Struktur der Integrine

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Integrine bestehen aus einem großen N-terminalen extrazellulären Teil von bis zu mehr als eintausend Aminosäuren, einer kurzen transmembranen Domäne und mit Ausnahme der  $\beta_4$ -Untereinheit, einer kurzen zytoplasmatischen Domäne von weniger als einhundert Aminosäuren.

Alle Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen am N-Terminus eine  $\beta$ -Propeller-Domäne [Springer, 1997]. Der Propeller ist aus sieben Blättern aufgebaut. Bei einigen  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ ) ist zwischen dem zweiten und dritten Blatt des Propellers eine zusätzliche Domäne von ca. 200 Aminosäuren inseriert, die als I-Domäne (*insertion domain*) bezeichnet wird. Die I-Domäne enthält eine konservierte  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -Bindungsstelle, das sogenannte MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*) [Lee *et al.*, 1995]. In der zytoplasmatischen Domäne aller  $\alpha$ -Ketten findet sich ein konserviertes KXGFFKR-Sequenzmotiv, das in der membrannahen sogenannten Gelenk-Region lokalisiert ist.

Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten im extrazellulären Teil eine I-ähnliche Domäne, die ebenfalls ein MIDAS-Motiv beinhaltet, eine Hybrid-Domäne sowie vier EGF- (*epidermal growth factor*) ähnliche Wiederholungen. Das MIDAS-Motiv der I-ähnlichen Domäne und/oder ggf. der I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt die Ligandenbindung [Plow *et al.*, 2000]. In der membrannahen zytoplasmatischen Region der  $\beta$ -Ketten findet sich ein konserviertes KLLIXIHDRR-Sequenzmotiv, das mit dem KXGFFKR-Motiv der  $\alpha$ -Untereinheiten interagiert und die sogenannte Gelenk-Region bildet. Weiterhin ist in der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Ketten ein NPXY/F-Motiv konserviert, das eine Bindungsstelle für das Aktin-bindende Protein Talin bildet. Die Struktur der Integrine ist in Abbildung 1.5 schematisch am Beispiel des Integrins LFA-1 dargestellt.



**Abb. 1.5 Die Struktur der Integrine am Beispiel von LFA-1**

Die  $\alpha$ -Ketten der Integrine enthalten im extrazellulären Teil eine  $\beta$ -Propeller-Domäne. Einige  $\alpha$ -Untereinheiten wie  $\alpha_L$  beinhalten eine, zwischen dem zweiten und dritten Blatt des Propellers inserierte Domäne (I-Domäne), die ein sogenanntes MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*) enthält. Das MIDAS-Motiv der  $\alpha_L$ -Untereinheit stellt die  $Mg^{2+}$ -abhängige Bindungsstelle für die LFA-1-Liganden der ICAM-Familie dar. Die siebte  $\alpha$ -Helix der I-Domäne scheint eine wichtige Funktion bei der Regulation der LFA-1-Affinität zu besitzen. Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten im extrazellulären Teil eine I-ähnliche Domäne, die ebenfalls ein MIDAS-Motiv beinhaltet, eine Hybrid-Domäne, vier EGF- (*epidermal growth factor*) Faltungen und die sogenannte  $\beta$ -tail-Domäne. Eine flexible Region in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten wird als „Knie“ bezeichnet. In der zytosolischen membranannähigen Region enthalten die beiden Untereinheiten konservierte, miteinander interagierende Sequenzen, die die sogenannte „Gelenk“-Region bilden. Die  $\beta$ -Ketten enthalten ein konserviertes NPXY/F-Motiv (hier NPLF), das die Bindungsstelle für das Aktin-bindende Protein Talin bildet. Abbildung verändert nach Kinashi [2005].

### 1.3.3 Das Integrin LFA-1

LFA-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Extravasation und Migration der Leukozyten, der Aktivierung naiver T-Zellen sowie der Interaktion aktivierter T-Zellen mit ihren Zielzellen. Die Liganden des Integrins sind ICAM-1 bis -5 und JAM-1 [Pflow *et al.*, 2000; Ostermann *et al.*, 2002]. Die Ligandenbindung erfolgt durch das MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*) in der I-Domäne der  $\alpha_L$ -Untereinheit in Abhängigkeit von einem MIDAS-gebundenen  $Mg^{2+}$ -Ion [McDowall *et al.*, 1998].

Die adhäsiven Eigenschaften des Integrins LFA-1 unterliegen der dynamischen Regulation, wobei die Aktivität des Integrins sowohl durch die Modulation der Affinität als auch der Avidität reguliert wird [Kinashi, 2005]. Die Affinität beschreibt die Stärke,

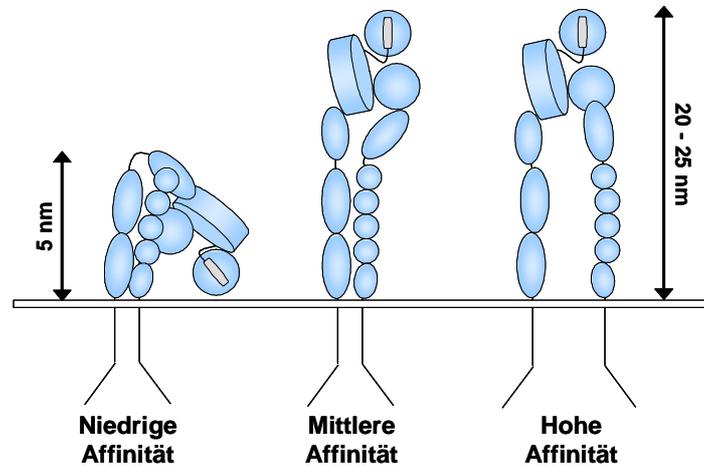
mit der ein einzelnes Integrin-Molekül an seinen monomeren Liganden bindet, während die Avidität die gesamte Bindungsstärke zwischen multimeren Integrinmolekülen und ihren Liganden angibt. Die Avidität wird durch die Aggregation der Integrine auf der Zelloberfläche erhöht. Man vermutet, dass die transiente Entkopplung vom Aktin-Zytoskelett für die Aggregation der Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle spielt [Stewart *et al.*, 1998].

### 1.3.3.1 Die Regulation der LFA-1-Aktivität („inside-out-signaling“)

Eine Änderung der Affinität geht mit Konformationsänderungen in den extrazellulären Domänen der  $\alpha_L$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit einher. Strukturanalysen haben ergeben, dass das inaktive Integrin eine geknickte Konformation einnimmt, die durch Ligandenbindung oder intrazelluläre Signale in eine gestreckte Konformation überführt wird [Takagi *et al.*, 2002]. Der monoklonale Antikörper mAb24 detektiert ein induzierbares Epitop innerhalb der  $\beta_2$ -I-ähnlichen Domäne, das vermutlich diese gestreckte Konformation der  $\beta_2$ -Integrine anzeigt. Allerdings ist dieses Neo-Epitop nicht unbedingt mit hoher Affinität des Integrins assoziiert [Salas *et al.*, 2004]. Der monoklonale Antikörper 327C detektiert dagegen vermutlich spezifisch die hochaffine Konformation der  $\beta_2$ -I-ähnlichen Domäne [Beals *et al.*, 2001; Lum *et al.*, 2002].

Die Induktion der hochaffinen Konformation geht mit allosterischen Umlagerungen in dem sogenannten IDAS-Motiv (*I-domain allosteric site*) der I-Domäne der  $\alpha_L$ -Untereinheit sowie in der I-ähnlichen Domäne der  $\beta_2$ -Untereinheit einher [Peter und O'Toole, 1995; Huth *et al.*, 2000; Lupher *et al.*, 2001]. Mit Hilfe der FRET- (*fluorescence resonance energy transfer*) Technologie konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären Domänen der  $\alpha_L$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit im inaktiven Stadium nah beieinander liegen, während die Aktivierung des Integrins durch intrazelluläre Signale oder Ligandenbindung in einer räumlichen Trennung der Ketten resultiert [Kim *et al.*, 2003]. Das gegenwärtige Modell der LFA-1-Aktivierung postuliert, dass das „Aufklappen“ des Integrins eine Konformation mittlerer Affinität erzeugt. Durch die Separation der zytoplasmatischen Domänen werden nach diesem Modell Konformationsänderungen induziert, die durch die I-ähnliche Domäne an die I-Domäne übermittelt werden und dort eine Verschiebung der siebten  $\alpha$ -Helix induzieren, durch die die Affinität des Integrins erhöht wird [Shimaoka *et al.*, 2003]. Es wird jedoch vermutet, dass verschiedene Übergangsstadien zwischen diesen

Konformationen auftreten [Takagi *et al.*, 2002]. Dieses Modell ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.6 Modell der Affinitätsregulation des Integrins LFA-1**

Im inaktiven Stadium liegt das Integrin in einer Konformation niedriger Affinität vor. Dabei sind beide Untereinheiten am sogenannten „Knie“ geknickt, wodurch die ligandenbindende I-Domäne in die Nähe der Membran rückt. Durch das „Aufklappen“ des Integrins entsteht eine Konformation mittlerer Affinität. Ligandenbindung oder intrazelluläre Signale induzieren Konformationsänderungen, die strukturell voneinander abhängig sind. Die Separation der membranproximalen Gelenkregion ruft eine Konformationsänderung in der I-ähnlichen Domäne der  $\beta_2$ -Kette hervor. Die I-ähnliche Domäne interagiert mit der Verbindung der siebten  $\alpha$ -Helix der I-Domäne und dem  $\beta$ -Propeller, wodurch die Information an die ligandenbindende I-Domäne übermittelt wird und eine Konformation hoher Affinität entsteht. Abbildung verändert nach Kinashi [2005].

Das hochaffine Stadium kann durch divalente Kationen, aktivierende Antikörper wie zum Beispiel KIM185 oder MEM48 sowie durch intrazelluläre Signale induziert werden [Lu *et al.*, 2001]. Calcium-Ionophore und Phorbolster wie PMA bewirken ebenfalls die Aktivierung von LFA-1. LFA-1-aktivierende intrazelluläre Signale werden zum Beispiel durch die Quervernetzung des TCR oder der Rezeptoren CD2, CD28, CTLA-4 oder CD31 ausgelöst [Dustin und Springer, 1989; van Kooyk *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1992]. Die Aktivierung von LFA-1 wird auch durch Zytokine und Chemokine erreicht [Kolanus und Seed, 1997; Constantin *et al.*, 2000].

Durch die Ligandenbindung an die Oberflächenrezeptoren werden intrazelluläre Signalkaskaden induziert, in deren Folge LFA-1 durch gemeinsame oder unterschiedliche Mechanismen aktiviert wird. Man kennt inzwischen mehrere intrazelluläre Signalmoleküle, die an der Regulation von LFA-1 beteiligt sind.

Das Protein Talin bindet an das NPXY/F-Motiv der Integrin  $\beta$ -Untereinheiten und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Integrins LFA-1 [Tadokoro *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Shamri *et al.*, 2005]. Ein weiterer wichtiger Regulator der LFA-1-Aktivierung sowie dessen Lokalisierung ist das zur Ras-Superfamilie gehörende G-Protein Rap1 sowie dessen Effektor RapL [Kinashi und Katagiri, 2005]. Auch die beiden Proteine ADAP und SKAP55 sind in die Regulation von LFA-1 involviert [Griffiths *et al.*, 2001; Peterson, 2003].

Das zytoplasmatische Protein Cytohesin-1 wurde in einem Two-Hybrid-Screen nach Interaktionspartnern der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta_2$ -Kette identifiziert und ist ebenfalls ein positiver Regulator von LFA-1 [Kolanus *et al.*, 1996]. Auf diesen LFA-1-Regulator soll im Abschnitt 1.4 näher eingegangen werden.

### **1.3.3.2 LFA-1-vermittelte Signale („outside-in-signaling“)**

Integrine besitzen neben ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle auch die Fähigkeit intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren (*outside-in-signaling*). Es wurde gezeigt, dass die Quervernetzung von LFA-1 Tyrosin-Phosphorylierungen auslöst. Die Quervernetzung des Integrins bewirkt unter anderem die Aktivierung von Src-Kinasen, der PI3-Kinase sowie der PLC $\gamma$  [Kanner *et al.*, 1993; Axelsson *et al.*, 2000]. LFA-1-vermittelte Signale scheinen für die Aktivierung naiver T-Zellen essentiell zu sein. Dies könnte jedoch auch größtenteils auf seiner Adhäsionsfunktion beruhen [Abraham *et al.*, 1999]. T-Zellen, die nur über LFA-1 kostimulatorische Signale erhalten, fallen verstärkt in den Zustand der Anergie [Ragazzo *et al.*, 2001]. Dennoch scheinen LFA-1-vermittelte Signale ähnlich zur kostimulatorischen Funktion des CD28, die Signalschwelle des TCR zu senken [Perez *et al.*, 2003]. DNAM-1 (CD226) assoziiert nach TCR-Stimulation mit LFA-1 und rekrutiert die Tyrosin-Kinase Fyn. DNAM-1 ist essentiell für LFA-1-induzierte kostimulatorische Signale [Shibuya *et al.*, 1999; 2003]. Die Signalfunktion von LFA-1 könnte somit teilweise auch indirekt durch Wechselwirkungen mit anderen Membranrezeptoren vermittelt werden.

## 1.4 Cytohesin-1

Cytohesin-1 gehört zu einer Familie von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren für GTPasen der ARF- (*ADP-ribosylation factor*) Familie. Derzeit sind vier humane Vertreter der Cytohesin-Familie bekannt: Cytohesin-1, Cytohesin-2/ARNO, Cytohesin-3/GRP1 und Cytohesin-4. Die Mitglieder dieser Familie weisen eine gemeinsame Struktur aus vier Domänen und mit Ausnahme von Cytohesin-4 eine stark konservierte Sequenz auf. Die Cytohesin-Proteine bestehen aus einer kurzen N-terminalen coiled-coil-Domäne von ca. 50 Aminosäuren, einer zentralen Sec7-Domäne von etwa 200 Aminosäuren, einer Pleckstrin-Homologie-Domäne von ca. 120 Aminosäuren und einer daran anschließenden kurzen polybasischen Region von ca. 15 Aminosäuren. Die coiled-coil-Domäne ist eine häufig vorkommende Protein-Protein-Interaktionsdomäne und Interaktionspartner der coiled-coil-Domäne der Cytohesin-Proteine wurden identifiziert. Auf diese soll im folgenden Abschnitt noch genauer eingegangen werden. Die Sec7-Domäne vermittelt den Guaninnukleotid-Austausch an GTPasen der ARF-Familie [Meacci *et al.*, 1997]. Die Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne bindet an das Phospholipid PIP<sub>3</sub>. Durch die Bindung an PIP<sub>3</sub> erfolgt die Translokation der Cytohesine an die Plasmamembran [Nagel *et al.*, 1998a]. Die polybasische Domäne von Cytohesin-1 kooperiert mit der PH-Domäne und ist für die Membranlokalisierung erforderlich [Nagel *et al.*, 1998b]. In der polybasischen Region wurden überdies Phosphorylierungsstellen identifiziert, wobei Cytohesin-1 zwei, Cytohesin-2 eine, Cytohesin-3 keine und Cytohesin-4 möglicherweise mehrere Phosphorylierungsstellen enthält. Abbildung 1.7 zeigt schematisch die Domänenstruktur der Cytohesine.



### Abb. 1.7 Domänenstruktur der Cytohesine

Die vier bekannten Mitglieder der Cytohesin-Familie (Cytohesin-1 bis -4) bestehen aus einer kurzen N-terminalen coiled-coil-Domäne (cc) von ca. 50 Aminosäuren, einer zentralen, ca. 200 Aminosäuren langen Sec7-Domäne, einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) von ca. 120 Aminosäuren sowie einer kurzen ca. 15 Aminosäuren langen polybasischen Region (pb).

Cytohesin-1 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert [Kolanus *et al.*, 1996]. Die Sec7-Domäne vermittelt neben der GEF-Funktion die Bindung an die zytoplasmatische Domäne der Integrin  $\beta_2$ -Kette CD18. Die membranproximalen Aminosäuren WKA 723-725 der CD18-Kette stellen dabei das Bindemotiv für Cytohesin-1 dar [Geiger *et al.*, 2000].

Die Überexpression von Cytohesin-1 oder der isolierten Sec7-Domäne in der humanen T-Zell-Line Jurkat resultiert in einer verstärkten Adhäsion der Zellen an ICAM-1 [Kolanus *et al.*, 1996]. Die Steigerung der LFA-1-vermittelten Adhäsion an ICAM-1 durch Cytohesin-1 ist abhängig von dessen GEF-Aktivität. Die Überexpression der GEF-defekten Mutante Cytohesin-1 E157K inhibiert die LFA-vermittelte Adhäsion dominant [Geiger *et al.*, 2000]. Ebenso inhibiert die Überexpression des C-terminalen Teils, der die PH-Domäne und die polybasische Region enthält, die Adhäsion dominant [Kolanus *et al.*, 1996].

Cytohesin-1 wird durch die Stimulation mit dem Phorbolester PMA innerhalb der polybasischen Region an den Serinen 393 und 394 phosphoryliert [Kathrin Obrusnik, unveröffentlicht]. Es wurde gezeigt, dass phosphoryliertes Cytohesin-1 mit dem kortikalen Aktin-Zytoskelett assoziiert. Die Bindung an PIP<sub>3</sub> wird durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst, die GEF-Aktivität gegenüber ARF1 wird dagegen durch die Phosphorylierung gesteigert [Dierks *et al.*, 2001]. Da die GEF-Funktion für die LFA-1-vermittelte Adhäsion relevant ist, könnte die Phosphorylierung von Cytohesin-1 eine Rolle bei der LFA-1-Regulation spielen. Vor kurzem wurde eine Funktion von Cytohesin-1 in einem LFA-1 *outside-in*-Signalweg gezeigt. Die Bindung von ICAM-2 an LFA-1 resultiert in der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2, wobei phosphoryliertes Cytohesin-1 an der Signalübermittlung beteiligt sein soll [Perez *et al.*, 2003].

### 1.4.1 Cytohesin-Interaktionspartner

Cytohesin-1 katalysiert *in vitro* den Guaninnukleotid-Austausch an den ARF-GTPasen ARF1 und ARF6 sowie dem ARF-Domänen-Protein ARD1 [Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998; Knorr *et al.*, 2000; Vitale *et al.*, 2000]. ARF-GTPasen regulieren Vesikel-Formation und -Transport durch die Rekrutierung und Assemblierung von Hüllproteinen an knospende Vesikel, die Regulation des Phospholipid-Metabolismus durch die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) und

der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP5K) sowie durch die Modulation der Aktin-Struktur an Membranen über die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac-1. Dadurch sind ARF-GTPasen an solch fundamentalen Prozessen wie Sekretion, Endozytose, Phagozytose, Adhäsion und Migration beteiligt [D'Souza-Schorey und Chavrier, 2006].

ARD1 (*ARF domain protein 1*) ist ein 64 kD Protein, mit einer C-terminalen, 18 kD ARF-GTPase-Domäne. Der N-terminale 46 kDa Teil von ARD1 bildet ein „Tripartite“-Motiv (TRIM), bestehend aus einer RING-Domäne, zwei B-Boxen und einer coiled-coil-Domäne. Das Protein wird somit zur TRIM- oder RBCC- (*R*ING, *B*-Box, *c*oiled-*c*oil) Familie gezählt und auch als TRIM23 bezeichnet. Die TRIM/RBCC-Familie bildet eine neue Klasse von E3 Ubiquitin-Ligasen [Meroni und Diez-Roux, 2005]. Die RING-Domäne komplexiert zwei, die B-Boxen jeweils ein Zink-Atom. Die zweite B-Box und die coiled-coil-Domäne sind häufig an der Substrat-Bindung beteiligt, während die E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität durch die RING-Domäne vermittelt wird. In *in-vitro*-Ubiquitinierungs-Analysen wurde gezeigt, dass ARD1, wie die meisten Mitglieder der TRIM/RBCC-Familie, eine RING-abhängige E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt [Vichi *et al.*, 2005]. Die Mitglieder der Familie unterscheiden sich durch einen variablen C-Terminus. ARD1 ist das einzig bekannte Mitglied dieser Familie das eine ARF-GTPase-Domäne besitzt. Abbildung 1.8 zeigt ein Schema der Domänenstruktur von ARD1.



**Abb. 1.8 Domänenstruktur des TRIM/RBCC-Proteins ARD1**

ARD1/TRIM23 besteht aus einer RING-Domäne (R), einer Typ 1 und Typ 2 B-Box (B1, B2) sowie einer coiled-coil-Domäne (cc). Diese Domänen charakterisieren die TRIM/RBCC-Familie. Am C-Terminus besitzt ARD1 eine ADP-Ribosylierungsfaktor- (ARF-) Domäne.

Im Gegensatz zu anderen ARF-GTPasen enthält ARD1 keine Myristoylierungsstelle und zeigt eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität. Diese ist auf eine interne GTPase-aktivierende (GAP) Funktion zurückzuführen, die spezifisch für die ARF-Domäne von ARD1 ist. Die GAP-Aktivität ist in der Region der B-Boxen und der coiled-coil-

Domäne lokalisiert [Vitale *et al.*, 1997a; Vitale *et al.*, 1998a]. Die 15 Aminosäuren unmittelbar vor der ARF-Domäne agieren als GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) [Vitale *et al.*, 1997b]. Überexprimiertes und endogenes ARD1 assoziieren mit dem Golgi-Apparat und Lysosomen. In COS-7 Zellen überexprimiertes eGFP-ARD1 zeigt zunächst eine Assoziation mit dem Golgi-Kompartiment und nachfolgend lysosomale Lokalisation. Für die Golgi-Lokalisation sind dabei Sequenzen in der ARF-Domäne ausschlaggebend, für die lysosomale Lokalisation Sequenzen in der GAP-Domäne [Vitale *et al.*, 1998b; Vitale *et al.*, 2000a].

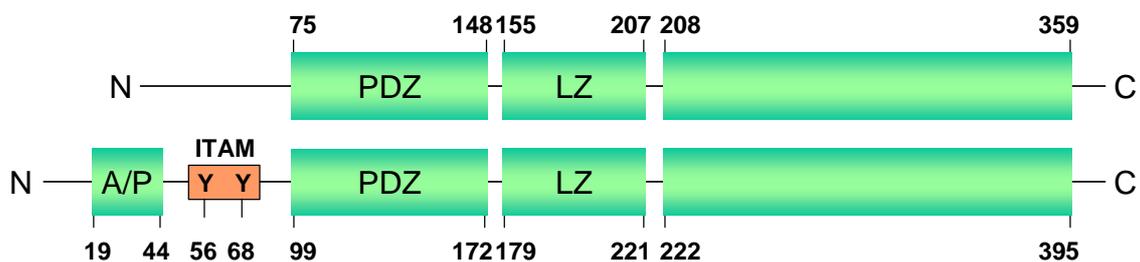
ARD1 wird embryonal schwach ubiquitär exprimiert. In der adulten Maus liegt die stärkste Expression in Herz, Gehirn und Testis und eine schwächere Expression in anderen Geweben vor [Reymond *et al.*, 2001].

Cytohesin-1 katalysiert *in vitro* den GDP/GTP-Austausch an ARD1, wohingegen Cytohesin-2 keine GEF-Aktivität an ARD1 zeigt und auch nicht an ARD1 bindet [Vitale *et al.*, 2000b]. Demnach könnte ARD1 eine Funktion als Cytohesin-1-Effektor besitzen.

Das Cytohesin-interagierende Protein CYTIP (*Cytohesin-interacting protein*, auch als Cybr: *Cytohesin binder and regulator* oder Casp: *Cytohesin-associated scaffolding protein* bekannt) wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert [Tang *et al.*, 2002; Boehm *et al.*, 2003]. Die CYTIP-Expression wird in humanen PBL durch die Zytokine IL-2 und IL-12 sowie in dendritischen Zellen während der Reifung induziert. Das Protein setzt sich aus einer 73 Aminosäuren langen N-terminalen PDZ- (PSD-95, Discs large, ZO-1) Domäne, einer Leucin-Zipper-Domäne von 53 Aminosäuren und einer 152 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne unbekannter Funktion zusammen. Die PDZ-Domäne ist eine strukturell konservierte Protein-Interaktionsdomäne. PDZ-Domänen vermitteln häufig die Bindung an ein C-terminales PDZ-Bindemotiv, das aus drei Aminosäuren gebildet wird. Der Leucin-Zipper ist eine besondere Form einer coiled-coil-Domäne. CYTIP interagiert mittels seiner Leucin-Zipper-Domäne mit der coiled-coil-Domäne von Cytohesin-1, -2 und -3 [Mansour *et al.*, 2002]. Eine Interaktion mit Cytohesin-4 wurde bislang nicht gezeigt. CYTIP ist ein negativer Regulator der LFA-1-vermittelten Adhäsion. Die Überexpression von CYTIP in Jurkat Zellen resultiert in einer Inhibition der LFA-1-vermittelten Adhäsion an ICAM-1, wobei diese Funktion von der PDZ- und der Leucin-Zipper-Domäne abhängt. Der siRNA-vermittelte „knock-down“ der CYTIP-

Expression führt zu einer verstärkten Adhäsion reifer dendritischer Zellen an Fibronectin sowie an immobilisierte T-Zellen [Hofer *et al.*, 2005].

CYTIP besitzt ein homologes Protein, das als GRASP (*GRP1-associated scaffolding protein*) bekannt ist. GRASP wird hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert und interagiert mit Cytohesin-2 und -3 [Nevrivy *et al.*, 2000]. CYTIP und GRASP besitzen eine gemeinsame Domänenstruktur, wobei GRASP mit 395 Aminosäuren Länge um 36 Aminosäuren länger ist als CYTIP. GRASP enthält im N-terminalen Bereich einen zusätzlichen Alanin- und Prolin-reichen Sequenzabschnitt von 26 Aminosäuren. Überdies beinhaltet GRASP im N-terminalen Bereich ein typisches ITAM-Motiv, das bislang fast ausschließlich in Proteinen hämatopoetischer Zellen gefunden wurde. Das ITAM-Motiv lässt eine Funktion des Proteins in hämatopoetischen Zellen vermuten. Abbildung 1.9 zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der homologen Proteine CYTIP und GRASP.



**Abb. 1.9 Domänenstruktur der homologen Proteine CYTIP und GRASP**

CYTIP und GRASP besitzen eine PDZ-Domäne, eine Leucin-Zipper-Domäne (LZ) sowie eine große C-terminale Domäne unbekannter Funktion. GRASP beinhaltet im N-terminalen Bereich einen zusätzlichen Alanin- und Prolin-reichen Sequenzabschnitt (A/P) sowie ein typisches ITAM-Motiv, das in CYTIP nicht konserviert ist.

### **Zielsetzung**

Das Integrin LFA-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration der Leukozyten. Seine adhäsiven Eigenschaften unterliegen der dynamischen Regulation durch intrazelluläre Faktoren. Cytohesin-1 ist ein Interaktionspartner und positiver Regulator von LFA-1. Die Mechanismen, durch die Cytohesin-1 die LFA-1-vermittelte Adhäsion beeinflusst, sind jedoch unvollständig aufgeklärt.

Die beiden homologen Proteine CYTIP und GRASP interagieren mittels einer Leucin-Zipper-Domäne mit Mitgliedern der Cytohesin-Familie. Die in beiden Proteinen vorliegende PDZ-Domäne lässt eine Funktion der Homologen als Gerüst-Proteine vermuten. Die Untersuchung der Funktion dieser beiden Cytohesin-Interaktionspartner ist ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

GRASP beinhaltet ein in nur wenigen Proteinen gefundenes Phosphorylierungsmotiv, das als ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) bezeichnet wird. Dieses Motiv ist in dem homologen Protein CYTIP nicht konserviert. ITAMs sind essentielle Signalmoleküle in der Lymphozytenaktivierung. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob GRASP eine Funktion in T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalwegen besitzt.

CYTIP wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und seine Expression wird in Lymphozyten durch Zytokine verstärkt. Die Überexpression von CYTIP resultiert in einer Inhibition der LFA-1-vermittelten Adhäsion. Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde eine Signal-induzierte Modifikation des Proteins beobachtet, deren Beschaffenheit, Induktion und Funktion in dieser Arbeit näher analysiert werden sollte.

Um die Funktion von Cytohesin-1 bei der Regulation von LFA-1 eingehender zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein siRNA-vermittelter „knock-down“ der Cytohesin-1 Expression in primären humanen Lymphozyten etabliert werden. Die Guaninnukleotid-Austauschfaktor- (GEF-) Aktivität von Cytohesin-1 an GTPasen der ARF Familie scheint für die LFA-1 Regulation relevant zu sein. Mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors, sollte der Einfluss des Cytohesin GEF-Funktion auf die Aktivierung von LFA-1 sowie auf die LFA-1-vermittelte Adhäsion ermittelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegeldokumentation	Gel Max, INTAS (Göttingen)
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Polymehr (Paderborn)
Autoklav	Model 135T, H+P (Oberschleißheim)
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Drehrad	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Durchflusszytometer	Epics XL, Beckman Coulter (München)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektroporationsapparatur	- GenePulser Xcell, Biorad (München) - Nucleofector, Amaxa (Köln)
Elektrowaage	College, Mettler Toledo (Gießen)
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte (Wiesbach)
Feinwaage	AG 285, Mettler Toledo (Gießen)
Fluoreszenz- und Absorptionsmessgerät	Synergy HT, MWG (Ebersberg)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	FV-1000, Olympus (Hamburg)
Lichtmikroskop	DMIL, Leica (Wetzlar)
Luminometer	Micro Lumat Plus LB 96V, Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Magnetrührer	ARE, VELP scientifica (Usmate, Italien)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Maschine	Mycycler, Biorad (München)
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Pipetten	P2, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson (Middleton, WI, USA)
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Photometer	Biophotometer, Eppendorf (Hamburg)
Schüttelgerät	VKS-75 control, Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Spannungsgerät	Elite300Plus, Schütt Labortechnik (Göttingen)
Stabsonificator	UW/HD 2070, Bandelin Elektronik (Berlin)
Sterilbank für Zellkulturarbeiten	Euroflow, Thermolife (Woerden, Niederlande)

Ultrafiltrations-Zelle	Stirred Ultrafiltration Cell, Millipore (Schwalbach)
Vortex	Zx <sup>3</sup> , VELP scientifica (Usmate, Italien)
Vacuum-Zentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	Typ 1004, GFL (Burgwedel)
Wippe	Rocky, Fröbel Labortechnik GmbH (Lindau)
Zellkulturinkubator	Model 381, ThermoForma (Karlsruhe)
Zentrifugen	- Multifuge 4KR, Heraeus instrument GmbH (München) - Biofuge pico, Heraeus instrument GmbH (München) - Biofuge fresco, Heraeus instrument GmbH (München) - Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München) - Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (München)
Zentrifugen-Rotoren	
Avanti J-20XP	- JLA-8.1000 - JA-14 - JS-5.3
Optima LE-80K Ultrazentrifuge	- NVT 100

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, Ø 15 mm	Roth (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Biozym (Wien, Österreich)
FACS-Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
Fett-Stift	Super PAP Pen, Daido Sangyo (Tokyo, Japan)
Filterpapier	Whatman Nr. 4, Schleicher & Schuell (Dassel)
Luminometerplatten, 96-Loch	Lumitrac 200, Greiner (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten, 96-Loch	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran	PROTRAN, Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger, 76 x 26 mm	Roth (Karlsruhe)
PCR-Reaktionsgefäße	200 µl Thin Wall Tubes, Biorad (München)
Poly-L-Lysin Objektträger	Sigma (Taufkirchen)
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2,0 ml	Starlab (Helsinki, Finnland)
Röntgenfilm	Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Spritzen und Kanülen	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter 0,2 µm/0,45 µm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Transwell Boyden-Kammer (Ø 5 µm)	Costar, Corning Inc. (New York, NY, USA)

Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
UV-Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Verbandmull	Hartmann (Heidenheim)
Zellkulturplastik	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

### 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 30%	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose (LMP-Agarose)	NuSieve™, Biozym (Wien, Österreich)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
ATP	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Bisbenzimid H33342	
Fluorochrom-Trihydrochlorid	Calbiochem (Bad Soden)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
n-Butanol	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Cäsiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Chloroquin	Sigma (Taufkirchen)
CXCL12, human (rekombinant)	R&D Systems (Wiesbaden)
Cytochalasin D	Sigma (Taufkirchen)
DABCO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diacylglycerol (DAG)	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
DNA-Auftragspuffer 6x Loading Dye	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
dNTP-Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Darmstadt)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycol-bis [ $\beta$ -aminoethylether]	
-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll (human)	Pan Biotech GmbH (Aidenbach)
Gelmount	Biotrend (Köln)
Gentamicinsulfat	Gibco (Eggenstein)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
2-Glycerolphosphat	Sigma (Taufkirchen)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Roche (Mannheim)
Gö6850	Calbiochem (Bad Soden)
Gö6976	Calbiochem (Bad Soden)
HEPES	Roth (Karlsruhe)

Igepal CA 630	Sigma (Taufkirchen)
Ionomycin	Sigma (Taufkirchen)
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Lactacystin	Sigma (Taufkirchen)
LB-Agar	Gibco (Eggenstein)
LB-Medium	Gibco (Eggenstein)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumacetat	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Manganchlorid	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
MG132	Sigma (Taufkirchen)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma (Taufkirchen)
Nocodazol	Sigma (Taufkirchen)
Novartis-299136	Prof. G. Baier (Innsbruck, Österreich)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBu)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Taufkirchen)
Phosphatidylserin (PS)	Sigma (Taufkirchen)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Protein A Sepharose™ 6MB	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Protein G Sepharose™, 4 fast flow	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Rottlerin	Sigma (Taufkirchen)
Salzsäure (37%)	Roth (Karlsruhe)
Secin H3	Prof. Dr. M. Famulok (Bonn)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin	Roche (Mannheim)
Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Eggenstein)
Tween-20	Roth (Karlsruhe)

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

### 2.1.4 Zellkultur-Puffer, -Medien und -Seren

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Eggenstein)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Eggenstein)
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Gibco (Eggenstein)
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco (Eggenstein)
RPMI 1640	Gibco (Eggenstein)
VLE-RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin)

### 2.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

BCA™ Reagenzlösungen	Pierce, Perbio Science (Bonn)
HRP-Detektionssystem	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Human T Cell Nucleofector™ Kit	Amaxa (Köln)
Lipofectamin 2000™	Invitrogen (Karlsruhe)
Luziferase-Substrat	Promega (Mannheim)

### 2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche (Mannheim)
Proteinkinase C delta (PKCδ)	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot); New England Biolabs (Schwalbach); Roche (Mannheim)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Vent™ DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)

### 2.1.7 Antikörper

#### 2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Ratte-anti-CYTIP (2F9) Hybridoma-Überstand	1:20 (WB) 1:2,5 (IP)	E. Kremmer (GSF, München)
Ratte-anti-Cyh-1 (7H2) Hybridoma-Überstand	1:20 (WB) 1:2,5 (IP)	E. Kremmer (GSF, München)
Ratte-anti-Cyh-3 (8B4) Hybridoma-Überstand	1:20 (WB)	E. Kremmer (GSF, München)
Maus-anti-CD3ε (OKT3) gereinigt/Hybridoma-Überstand	2 µg/ml (Stim.)/ 1:20 (Stim.)	LGC Promochem, ATCC (Wesel)

Maus-anti-CD11a (MHM24)	10 µg/ml (IF)	Dako (Hamburg)
Maus-anti-CD18 (MHM23)	10 µg/ml (IF)	Dako (Hamburg)
Maus-anti-CD18 (MEM48)	5 µg/ml (Stim.)	V. Horejsi (Prag, Tschechien)
Maus-anti-CD18 (KIM185)	700 ng/1 x 10 <sup>6</sup> Zellen (Stim.)	M. Robinson (Celltech, Berkshire, UK)
Maus-anti-CD18 (327C)	10 µg/ml (IF)	R. Alon (Rehovot, Israel)
Maus-anti-CD28 (CD28.2)	2 µg/ml (Stim.)	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)
Maus-anti-CD45RA	2 µg/ml (Stim.)	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)
Maus-anti-eGFP (B2)	1:1500 (WB)	Santa Cruz (Heidelberg)
Maus-anti-Flag (M5)	1:1000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
Maus-anti-Phospho-Tyrosin (4G10)	1:10.000 (WB)	Upstate Biotechnology Inc., Biomol (Hamburg)
Kaninchen-anti-CD4	2 µg/ml (Stim.)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Kaninchen-anti-Aktin	1:500 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
Kaninchen-anti-Flag	4 µg/ml (IP)	Sigma (Taufkirchen)
Kaninchen-anti-Ubiquitin	1:1000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)

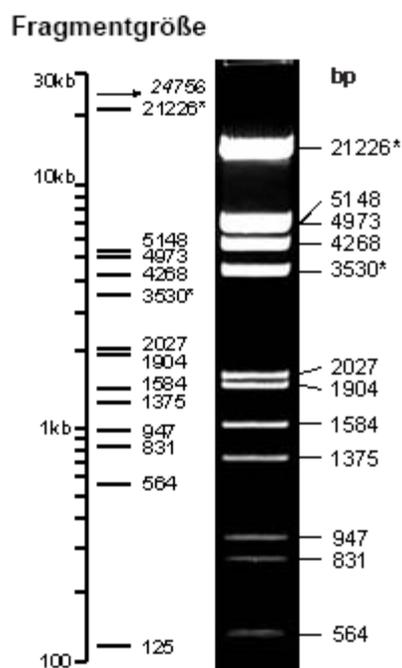
### 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Human-IgG	1:2000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Esel-anti-Ratte-IgG	1:5000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Esel-anti-Ziege-IgG	1:5000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
HRP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000 (WB)	Rockland (Gilbertsville, PA, USA)

HRP-Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000 (WB)	Dianova (Hamburg)
Alexa Fluor® 488-Ziege-anti-Maus-IgG <sub>1</sub>	1:200 (IF)	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
FITC-Ziege-anti-human-IgG	1:200 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC-Schaf-anti-Maus-IgG	1:200 (IF)	Dianova (Hamburg)
TRITC-Ziege-anti-human-IgG	1:200 (IF)	Dianova (Hamburg)

## 2.1.8 DNA- und Protein-Längenstandard

### DNA-Längenstandard



$\lambda$  -DNA/*EcoRI* + *HindIII* Marker 3

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

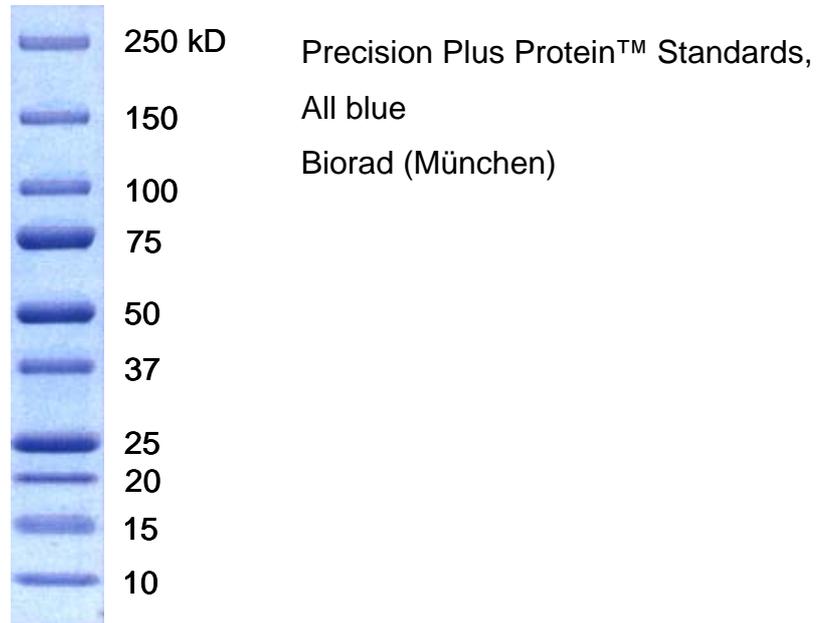
100  $\mu$ l  $\lambda$ -DNA/*EcoRI* + *HindIII* (500 ng/ $\mu$ l)

166,7  $\mu$ l 6x DNA-Auftragspuffer

ad 1 ml H<sub>2</sub>O bidest.

1%iges Agarosegel von 8 cm Länge  
0,5  $\mu$ g/Spur aufgetragen  
1X TAE, 17V/cm

## Protein-Längenstandard



### 2.1.9 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Referenz	GenBank Accession #
pEGFP-N1	Kanamycin	BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA, USA)	U55762
pRK5	Ampicillin	diese Arbeitsgruppe, nicht publiziert.	-
pIL-2 GL2 (IL-2-Luc)	Ampicillin	[Zeitlmann <i>et al.</i> , 1998]	-

### 2.1.10 Proteinfusionsanteile

Bezeichnung	Aufbau	Verwendung	Referenz
Ig	CH2- und CH3-Domänen der humanen IgG <sub>1</sub> -cDNA	Präzipitation an Protein A-Separose und Detektion (WB und IF)	[Kolanus <i>et al.</i> , 1996]
eGFP	modifizierte cDNA des GFP aus <i>Aequoria victoria</i>	Detektion (IF und WB)	[Chalfie <i>et al.</i> , 1994]
FLAG	MDYKDDDDK	Immunpräzipitation und Detektion (WB)	[Hopp <i>et al.</i> , 1988]

### 2.1.11 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Ig-for-Seq	5' - ACA CGC AGA AGA GCC TC - 3'	Sequenzierung
Ig-rev-Seq	5' - GAA GAG GAA GAC TGA CGG - 3'	Sequenzierung
N1-rev-Seq	5' - ATG TGG TAT GGC TGA TTA TGA TC - 3'	Sequenzierung
pRK5-rev-Seq	5' - GTA ACC ATT ATA AGC TGC - 3'	Sequenzierung
CYTIP-for-Mlu	5' - GCC GCG ACG CGT GCC ACC ATG TCT TTA CAA AGG CTC CTG - 3'	PCR
CYTIP204-for-Mlu	5' - GCG GGC ACG CGT GCC ACC ATG CAT GGT GAT GCA GCT AAT TGC CCC - 3'	PCR
CYTIP-rev-Not	5' - GCC GCT GCG GCC GCT CAA AAG CGA CTT TCT TCC TC - 3'	PCR
CYTIP-w/o-stop-rev-Not	5' - GCG CGC GCG GCC GCC AAA GCG ACT TTC TTC CTC TTC - 3'	PCR
CYTIP-SCluA-for	5' - GCC GCC GAG GCC GCC TGT AAG GCC TGG CTG AGC TCC ATG ACG - 3'	Mutagenese
CYTIP-SCluA-rev	5' - GGC CTT ACA GGC GGC CTC GGC GGC TAA TCG ATT CCG GTC CAC - 3'	Mutagenese

CYTIP-SS241/ 242AA-for	5' - TCG ATT AGC CGC CGA GAG CAG CTG TAA GAG C - 3'	Mutagenese
CYTIP-SS241/ 242AA-rev	5' - CTG CTC TCG GCG GCT AAT CGA TTC CGG TCC AC - 3'	Mutagenese
Grasp-for-Mlu	5' - GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG ACC CTC CGC CGA CTC AGG AAG CTG - 3'	PCR
Grasp-rev-Not	5' - GCG CGC GCG GCC GCC TAC AGC TGG CTC TCC TCC TCC TCC AGG - 3'	PCR
Grasp-w/o- stop-rev-Not	5' - GCG CGC GCG GCC GCC CAG CTG GCT CTC CTC CTC CTC CAG GGA G - 3'	PCR
GraspY55F-for- Sac	5' - GAG GAG CTC TTC GCA GCA CTG GAG GAC TAT CAC - 3'	Mutagenese
GraspY55F- rev-Sac	5' - CAG TGC TGC GAA GAG CTC CTC CCC GGG GGC TCC - 3'	Mutagenese
GraspY67F-for	5' - GCC GAG CTG TTC CGC GCG CTC GCC GTG TCC GGG - 3'	Mutagenese
GraspY67F-rev	5' - GAG CGC GCG GAA CAG CTC GGC AGG GTG ATA GTC - 3'	Mutagenese

Die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide erfolgte bei der Arbeitsgruppe Dr. Georg Arnold (Genzentrum, München) oder bei der Firma MWG (Ebersberg).

### 2.1.12 siRNAs

siRNAs sind kurze doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Duplex von 19 Nukleotiden und zwei Nukleotiden Überhang an den 5'-Enden, wobei die Überhänge aus Desoxynukleotiden bestehen. In eukaryotischen Zellen bewirken siRNAs die spezifische Degradation einer mRNA, die zu einem Strang der siRNA komplementär ist. Dieser evolutionär konservierte Mechanismus wird als RNA-Interferenz bezeichnet und wird durch den sogenannten RISC-Enzymkomplex katalysiert. Die folgenden siRNAs wurden für den spezifischen „knock-down“ der Expression der bezeichneten Zielgene verwendet. Die Sequenz des „sense“- und „antisense“-Stranges der siRNA lässt sich nach folgendem Schema aus der Zielsequenz der cDNA ableiten, wobei [N] für eine Nukleotid, [dN] für ein Desoxynukleotid und [N']

bzw. [dN'] für das zu N bzw. dN komplementäre Ribonukleotid bzw. Desoxynukleotid steht:

„sense“ Strang: 5' - N<sub>19</sub> dN dN - 3'  
 cDNA-Sequenz: 5' - dN dN dN<sub>19</sub> dN dN - 3'  
 „antisense“ Strang 3' - dN'dN' N'<sub>19</sub> - 5'

Zielgen	Bezeichnung	Zielsequenz der cDNA
Luciferase	Luciferase ‡	5' - AA CTT ACG CTG AGT ACT TCG A TT - 3'
Renilla GFP	Renilla ‡	5' - AA AAA CAT GCA GAA AAT GCT G TT - 3'
Cytohesin-1	754 ‡	5' - AA TGA CCT CAC TCA CAC TTT C TT - 3'
CYTIP	474 ‡	5' - AA CGA TAG AGA CTC TTA ATG G AA - 3'
ARD1	TRIM23-1 †	5' - CA AGT GTA TAG CCG TAG TCT A TT - 3'
	TRIM23-2 †	5' - CA GGT GTA GTT TGT GTG CAT A TT - 3'

Die Synthese der mit „‡“ gekennzeichneten siRNAs erfolgte durch die Firma Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Mit „†“ gekennzeichnete siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert. Doppelsträngig gelieferte siRNAs der Firma Qiagen wurden mit 1x siRNA-Puffer des Herstellers zu einer Konzentration von 20 µM gelöst. Einzelsträngige siRNAs der Firma Dharmacon wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O bidest. zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Daraus wurde mit 5 x siRNA-Puffer ein Ansatz mit je 20 µM beider Einzelstränge hergestellt. Die 20 µM Ansätze wurden 1 min bei 90°C erhitzt und zur Hybridisierung der komplementären Stränge 30 min bei 37°C inkubiert.

5 x siRNA-Puffer	
Kaliumacetat	500 mM
HEPES, pH 7,4	150 mM
Magnesiumacetat	10 mM

### 2.1.13 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	endA1, hsdR17( $r_k^- m_k^-$ ), supE44, thi1, recA1, gyrA, (Nal <sup>r</sup> ), relA1	[Hanahan, 1983]
MC1061	araD139, $\Delta$ (ara-leu)7696, galE15, galK16, $\Delta$ (lac) <sub>X74</sub> , rpsL(Str <sup>r</sup> ), hsdR2( $m_k^- m_k^-$ ), mcrA, mcrB	[Casadaban und Cohen, 1980]

### 2.1.14 Säugetier-Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Referenz
COS-7	fibroblastenähnliche Affennierenzellen ( <i>African green monkey</i> ) mit integriertem, replikationsdefektem SV40-Genom	[Gluzman, 1981]
EREB 2.5	humane lymphoblastoide B-Zell-Linie	[Kempkes <i>et al.</i> , 1995]
LCL-721	humane lymphoblastoide B-Zell-Linie	[Reitnauer <i>et al.</i> , 1985]
Jurkat E6.1	humane T-Zell-Linie eines Patienten mit akuter Leukämie	[Weiss <i>et al.</i> , 1984]
T-Ag Jurkat	SV-40 T-Antigen exprimierendes Jurkat-Derivat	[Clipstone und Crabtree, 1992]

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten *E. coli* Stämme**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium bzw auf LB-Agar. Die verwendeten Medien wurden bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlen mit dem entsprechenden Antibiotikum in Form einer sterilfiltrierten Lösung versetzt. Zur Selektion Ampicillin- bzw. Kanamycin-resistenter Klone werden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin zugefügt. Die Anzucht der Bakterien auf LB-Agar erfolgte über Nacht in 10 cm Petrischalen bei 37°C. Flüssigkulturen wurden in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 37°C mit 160 Upm geschüttelt.

#### **2.2.1.2 Dauerkulturen von *E. coli***

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien-Stämmen und Klonen mit rekombinanten Plasmiden wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wird das Pellet einer 5 ml-Flüssigkultur in 500 µl LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum resuspendiert, mit 500 µl Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Um die eingefrorenen Bakterien wieder in Kultur zu nehmen, werden sie mit einem sterilen Zahnstocher auf LB-Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen.

### **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei, an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxynukleotiden. Sie wird häufig zur Isolierung spezifischer Sequenzen aus Genbanken sowie zur ortsgerichteten Mutagenese angewendet. Bei der Reaktion folgen wiederholt Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritte aufeinander: Zunächst wird die Matrizen-DNA bei einer Temperatur von 94°C reversibel denaturiert. Darauf folgt die Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide (Primer) bei einer Annealing-Temperatur, die abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer zwischen 50 und 65°C liegt. Anschließend erfolgt bei 72°C die Elongation der Primer an ihrem 3'-OH Ende komplementär zur Matrizen-DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes:

PCR-Ansatz	
Matrizen-DNA	200 ng
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	5 µl
10 x Thermopolymerase-Puffer	5 µl
<i>forward</i> -Primer (100 µM)	1 µl
<i>reverse</i> -Primer (100 µM)	1 µl
DMSO (optional)	2,5 µl
Vent™ DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,75 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

PCR-Programm	
94°C	5 min
94°C	30 sec
50-65°C	30 sec
72°C	1 min
72°C	10 min
4°C	∞

} 20–25 Zyklen

Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wird 1/10 des Ansatzes einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen (siehe 2.2.2.6).

### 2.2.2.2 Mutagenese-PCR

Um in eine gegebene DNA-Sequenz spezifische Punktmutationen einzuführen, wird die Methode der Mutagenese-PCR angewendet. Hierzu werden zunächst in getrennten Ansätzen zwei überlappende PCR-Produkte hergestellt, die die gewünschte Mutation im überlappenden Bereich enthalten. Der überlappende Bereich sollte dabei eine Länge von etwa 18-21 Nukleotiden haben. Um die beiden mutierten Fragmente zu vereinigen, wird eine weitere PCR-Reaktion durchgeführt, die jeweils 1 µl der beiden ersten Ansätze als Template sowie die beiden endständigen Primer enthält. Die beiden mutierten Fragmente können im Überlappungsbereich hybridisieren, so dass sie jeweils am 3'-Ende bis zum Ende

des jeweils anderen Fragments komplettiert werden können. Die komplettierten Stränge werden nun mittels der endständigen Primer amplifiziert. So entsteht ein punktmutiertes PCR-Produkt der gesamten Länge. Um nach der Klonierung des Produktes die Mutation-enhaltenden Klone leichter identifizieren zu können, kann zusätzlich zur Mutation eine „stumme“ Schnittstelle eingefügt werden.

### 2.2.2.3 Reinigung und Fällung von PCR-Produkten

Zur Abtrennung der DNA-Polymerase von einem PCR-Produkt wird der Ansatz einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Dazu wird der Ansatz mit H<sub>2</sub>O bidest. auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt, mit 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) gut durchmischt und 5 min bei 11.400 x g zentrifugiert. Anschließend wird die obere, wässrige Phase entnommen und die enthaltene DNA durch Zugabe von 40 µl 4M Lithiumchlorid, 1 ml eiskaltem 96% Ethanol gefällt. Durch Zugabe von 1 µl 10 mg/ml Glykogen-Lösung entsteht ein stabileres, sichtbares Pellet. Die DNA wird durch Zentrifugation für 12 min bei 11.400 x g und 4°C pelletiert, zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H<sub>2</sub>O bidest gelöst.

### 2.2.2.4 Restriktionsverdau

Für die Analyse und Klonierung von DNA werden Restriktionsverdaus vorgenommen. Die enzymatische Spaltung der DNA erfolgt bei der für die jeweiligen Restriktionsenzyme optimalen Temperatur, wobei ein Verdau von Plasmid-DNA für mindestens 2 h, der Verdau eines PCR-Produktes über Nacht inkubiert wird.

Verdau PCR-Produkt		Verdau von Plasmid-DNA	
gereinigtes PCR-Produkt	40 µl	Plasmid-DNA	3-5 µg
10 x Restriktionspuffer	5 µl	10 x Restriktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzyme	je 1 µl	Restriktionsenzyme	je 1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

### 2.2.2.5 5'-Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um bei Klonierungen die Häufigkeit von Vektor-Religationen ohne Insert zu verringern, werden die 5'-Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors vor einer

Ligation enzymatisch entfernt. Hierzu wird dem Restriktionsansatz 1  $\mu\text{l}$  Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert.

### 2.2.2.6 Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle von PCR-Reaktionen sowie von Restriktionsverdau wird DNA in 1-2% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA im Agarosegel wird diesem sowie dem Laufpuffer Ethidiumbromid zugesetzt, das in die Doppelhelix interkaliert. Der Ethidiumbromid-DNA-Komplex kann durch UV-Licht von 250–310 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch den Vergleich mit einem auf das Gel geladenen DNA-Längenstandard kann die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Die zu analysierenden DNA-Proben werden vor dem Laden auf das Agarosegel mit 6x Auftragspuffer versetzt. Als Laufpuffer wird ein Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verwendet. Die Elektrophorese erfolgt je nach Größe des Gels bei 70–90V.

1 x TAE-Puffer		1% Agarosegel	
Tris/HCl pH 8,0	40 mM	Agarose in 1 x TAE-Puffer	1% (w/v)
Essigsäure	40 mM		
EDTA	1 mM		
Ethidiumbromid	200 $\mu\text{g/l}$		

### 2.2.2.7 Präparative Agarosegelelektrophorese

Für präparative Agarosegelelektrophoresen werden 1,2% niedrigschmelzende NuSieve-Agarosegele verwendet. Hierauf werden 15  $\mu\text{l}$  eines Restriktionsverdau geladen und die enthaltene DNA bei einer Spannung von 75 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente werden anschließend unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Erhitzen für 5 min bei 65°C können die Gelblöckchen geschmolzen und so direkt für eine Ligation eingesetzt werden.

### 2.2.2.8 Ligation

Bei der Ligation werden lineare DNA-Fragmente durch Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen kovalent verbunden. Diese Reaktion wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Der Ligations-Ansatz wird für mindestens 4 h oder über Nacht inkubiert. Komplementäre

überhängende Enden werden bei Raumtemperatur ligiert, die Ligation glatter Enden erfolgt bei 16°C. Zur Kontrolle von Vektor-Religationen dient ein Parallelansatz ohne Insert-DNA.

Ligationsansatz		Religationskontrolle	
Vektor	1 µl	Vektor	1 µl
Insert	3 µl	Insert	-
10 x T4-Ligasepuffer	5 µl	10 x T4-Ligasepuffer	5 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl	T4-DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

### 2.2.2.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Bei -80°C eingefrorene, chemisch kompetente *E. coli* des Stamms MC1061 oder DH5α werden auf Eis aufgetaut. 80 µl der Zellsuspension werden mit 7 µl eines Ligationsansatzes oder zur Retransformation eines Plasmids mit 100 ng der Plasmid-DNA vermischt. Das Gemisch wird für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem 5-minütigen Hitzeschock bei 37°C wird der Transformationsansatz nochmals für 2 min auf Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden anschließend 2 min bei 11.400 x g pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Aufgrund des im Agar enthaltenen Antibiotikums können sich nur die Bakterien vermehren, die das Plasmid mit dem jeweiligen Resistenzgen aufgenommen haben.

### 2.2.2.10 Plasmid-Minipräparation

Zur raschen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* werden Mini-Präparationen durchgeführt. Dazu werden 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem *E. coli* Klon beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Das Bakterienpellet aus 3 ml der Übernacht-Kultur wird in 200 µl Lösung I resuspendiert. Die Zellsuspension wird zur alkalischen Lyse der Bakterien mit 400 µl Lösung II versetzt und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 300 µl Lösung III und vorsichtigem Mischen wird der Ansatz 10 min bei 11.400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) gut durchmischt und für 5 min bei 11.400 x g bei RT

zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die gelöste Plasmid-DNA enthält wird abgenommen, zur Fällung der DNA mit 750 µl 2-Propanol versetzt und 10 min bei 4°C mit 11.400 x g zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 80 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Zur Analyse der gewonnenen DNA werden 10 µl für einen Kontrollverdau eingesetzt.

Lösung I (pH 8,0)		Lösung II (pH 13,0)		Lösung III (pH 5,0)	
Tris/HCl, pH 8,0	25 mM	NaOH	0,2 M	Kaliumacetat	5 M
Glucose	50 mM	SDS	1% (w/v)	Essigsäure	2 M
EDTA	10 mM				

### 2.2.2.11 Plasmid-Maxipräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA im Milligramm-Maßstab erfolgt durch Maxi-Präparation. Dazu wird 1 l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 1 ml einer Übernacht-Kultur beimpft und 24 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 x g pelletiert, in 40 ml Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 80 ml Lösung II lysiert. Nach Zugabe von 40 ml Lösung III wird der Ansatz wiederum für 20 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 100 ml 2-Propanol versetzt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 4000 x g wird die gefällte Plasmid-DNA pelletiert. Das Pellet wird mit 25 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 ml Lösung I aufgenommen. Darin werden nun 5,5 g Cäsiumchlorid gelöst, anschließend werden 100 µl 10% (v/v) Igepal und 500 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation mit 4000 x g bei RT wird der Überstand in ein Quick-seal™ Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird zugeschweisst, zusammen mit einem passenden Gegengewicht in den NVT100 Ultrazentrifugen-Rotor eingesetzt und bei 25°C 3,5 h mit 80.000 Upm oder über Nacht mit 55.000 Upm zentrifugiert. Bei der Zentrifugation entsteht ein Cäsiumchlorid-Gradient in dem die DNA entsprechend ihrer Dichte eine Bande bildet, die durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar ist. Mit Hilfe einer Kanüle wird die DNA-Bande entnommen. Durch mehrmaliges Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol wird interkaliertes Ethidiumbromid entfernt. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von einem Volumenäquivalent 1 M Ammonium-Acetat und 2,5 Volumenäquivalenten Ethanol

gefällt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 4000 x g pelletiert. Das Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst.

#### **2.2.2.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentrationsbestimmung gelöster DNA erfolgt durch Messung der Absorption bei 260 nm, da DNA bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Die Extinktion  $E_{260}$  einer 50 µg/ml DNA-Lösung ist 1,0. Die Reinheit einer DNA-Lösung kann anhand des  $E_{260}/E_{280}$  Koeffizienten bestimmt werden, wobei reine DNA-Lösungen ein  $E_{260}/E_{280}$  Verhältnis von 1,8 aufweisen.  $E_{260}/E_{280}$  Koeffizienten kleiner 1,8 werden durch Verunreinigungen mit Protein hervorgerufen, wogegen ein Verhältnis größer 1,8 Verunreinigungen mit RNA anzeigt.

#### **2.2.2.13 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden durch die Firma Agowa (Berlin) mit einem ABI 3730 xl Sequencer und der Big dye-Chemie durchgeführt.

### **2.2.3 Eukaryotische Zellkultur**

#### **2.2.3.1 Kultivierung adhärenter Zellen**

Adhärenente Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 µg/ml Gentamicinsulfat in Zellkultur-Schalen im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Vereinzelnung werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg/ml Trypsin, 10 mM EDTA) bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Plastik ablösen. Die abgelösten Zellen werden einmal mit frischem Medium gewaschen und zur weiteren Kultivierung 1:3 bis 1:10 verdünnt, in neue Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden höchstens 10 mal passagiert.

#### **2.2.3.2 Transfektion adhärenter Zellen**

Für Transfektionen adhärenter Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Lipofectamin 2000™ Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.3.3 Kultivierung von Suspensionszellen**

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 µg/ml Gentamicinsulfat in Zellkultur-Flaschen im Inkubator bei 37°C, 5%

CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einem Titer von maximal 1 x 10<sup>6</sup>/ml kultiviert und jeden zweiten bis dritten Tag auf eine Dichte von 2 x 10<sup>5</sup>/ml mit frischem Kulturmedium verdünnt. Jede Charge wurde höchstens 40 mal passagiert.

### **2.2.3.4 Transfektion von Suspensionszellen**

Die Transfektion von Suspensionszellen mit Plasmid-DNA oder siRNA erfolgte durch Elektroporation. Zur Transfektion von Jurkat E6 Zellen werden 1 - 1,5 x 10<sup>7</sup> Zellen in 400 µl RPMI 1640/50% FCS mit 25 µg Plasmid-DNA gemischt. Zur Transfektion von Jurkat E6 Zellen mit siRNA werden 1 - 1,5 x 10<sup>7</sup> Zellen in 400 µl RPMI 1640 ohne Serum aufgenommen und mit 2,5 - 10 µg siRNA gemischt. Die Zellen werden in 4 mm Elektroporationsküvetten gegeben und bei 240 Volt und 1500 µF elektroporiert. Anschließend werden die Zellen in 10 ml Kulturmedium überführt und bis zur Verwendung bei 37°C inkubiert.

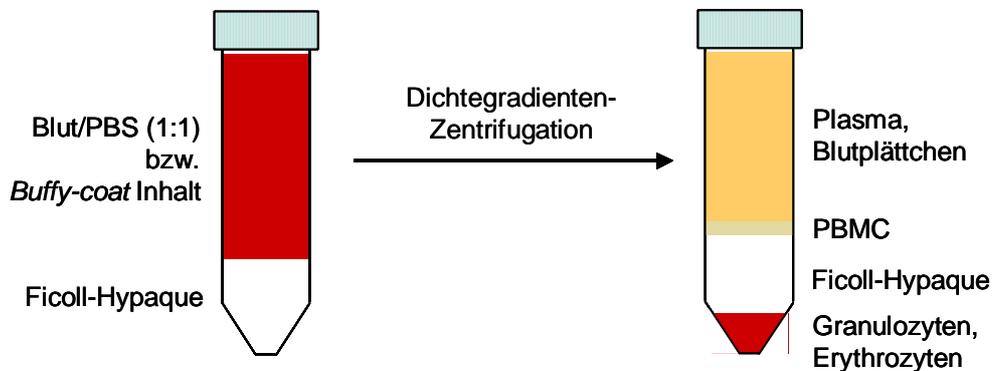
### **2.2.3.5 Dauerkulturen eukaryotischer Zellen**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. 2,5 x 10<sup>7</sup> Zellen einer Suspensionskultur werden dazu 5 min bei 1000 x g pelletiert und anschließend in 1 ml RPMI-Medium ohne Zusätze resuspendiert. Konfluente adhärente Zellen einer 15 cm Kulturschale werden trypsiniert, mit DMEM gewaschen und in 1 ml DMEM resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt, mit 1 ml 70% hitzeinaktiviertem FCS/30% DMSO gemischt und bei -80°C eingefroren. Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen wird die Zellsuspension im Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, einmal mit 50 ml vorgewärmtem Medium ohne Zusätze gewaschen, in 25 ml Kulturmedium resuspendiert und in einem entsprechenden Zellkultur-Gefäß ausgesät.

### **2.2.3.6 Präparation humaner Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)**

Die Isolation der Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) erfolgte aus Vollblut oder Leukozyten angereicherten „buffy-coats“ gesunder Spender. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation auf Ficoll-Hypaque werden zunächst mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Anschließend werden enthaltene Monozyten (ca. 40% der mononukleären Zellen) durch Adhäsion an Plastik depletiert. Das folgende Protokoll wurde mit leichten Modifikationen aus den *Current protocols in Immunology* übernommen.

Für die Dichtegradienten-Zentrifugation werden 10 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/l) in 50 ml-Zentrifugengefäße vorgelegt. Das Ficoll wird nun langsam mit 40 ml *buffy-coat*-Inhalt bzw. einer 1:1 Blut/PBS Mischung überschichtet. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation mit 900 x g bei 18 – 20°C ohne Bremse, um eine Verwirbelung des Gradienten zu verhindern. Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich bei der Zentrifugation am Boden des Röhrchens, da sie eine höhere Dichte als das Ficoll besitzen. Mononukleäre Zellen und Blutplättchen wandern nicht in die Ficoll-Phase ein, da sie geringerer Dichte sind. Die mononukleären Zellen bilden bei der Zentrifugation eine sichtbare weisse Schicht auf der Ficoll-Phase aus (siehe Abbildung).



Die PBMC-Schicht wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Zentrifugengefäß überführt. Um enthaltene Blutplättchen und Erythrozyten abzutrennen, werden die Zellen 3 - 4 mal in einem Volumen von 50 ml mit PBS/1% (w/v) BSA gewaschen. Die Zentrifugation der einzelnen Waschschriffe erfolgt bei RT für 7 min mit 300 x g beim ersten, 200 x g beim zweiten und 150 x g beim dritten und vierten Waschschriff. Danach sollte der Überstand klar und das Zellpellet weiss erscheinen. Die so erhaltenen PBMC werden in VLE-RPMI 1640/10% (v/v) FCS/10 µg/ml Gentamicinsulfat resuspendiert, gezählt und im gleichen Medium auf eine Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Je 50 ml der Zellsuspension werden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Während einer Inkubation für 1 h bei 37°C adhären die enthaltenen Monozyten auf dem Plastik. Anschließend werden nicht-adhärenente Zellen (PBL) abgenommen, in eine neue Zellkulturflasche überführt und bis zur Verwendung, maximal 3 Tage, bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3.7 Transfektion humaner PBL mit siRNA

Für die Transfektion humaner PBL mit siRNA wurde das Human T Cell Nucleofector™ Kit der Firma Amaxa (Köln) verwendet. Hierzu werden  $2 \times 10^7$  PBL einmal mit PBS gewaschen, in 100 µl der Transfektionslösung resuspendiert, mit 10 µg siRNA versetzt und in eine 2 mm-Küvette überführt. Die Transfektion erfolgt im Amaxa Nucleofector™ mit dem Programm U14. Anschließend werden die Zellen in 5 ml Kulturmedium überführt und für 72 bis 96 h inkubiert.

### 2.2.3.8 Zell-Stimulationen

Für funktionale oder biochemische Analysen erfolgten Stimulationen bei 37°C in HBSS oder Kulturmedium. Adhärenente Zellen werden dazu einmal mit PBS gewaschen und anschließend direkt in der Kulturschale stimuliert. Zur Stimulation von Suspensionszellen wird die benötigte Zellzahl 5 min bei 900 x g pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen zu einem Titer von  $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ /ml in HBSS oder Kulturmedium resuspendiert. Bei der Verwendung von Inhibitoren oder Toxinen werden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit bis zur Stimulation mit dem Inhibitor bzw. Toxin vorinkubiert. Ein Ansatz mit dem jeweiligen Lösungsmittel dient als Kontrolle. Folgende Inhibitoren, Toxine und Stimuli wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

Inhibitor/Toxin	Funktion	Endkonzentration
Chloroquin	inhibiert lysosomale Degradation	25 - 100 µM
Cytochalasin D	zerstört das Aktin-Zytoskelett	10 µM
Gö6850	inhibiert c- und nPKCs	0,5 µM
Gö6976	inhibiert cPKCs	0,5 µM
Lactacystin	inhibiert proteasomale Degradation	10 µM
MG132	inhibiert proteasomale und lysosomale Degradation	50 µM
Nocodazol	zerstört Mikrotubuli	10 µM
Novartis-299136	inhibiert PKC	0,5 µM
Rottlerin	inhibiert PKC δ und PKCθ	20 µM
Secin H3	inhibiert Cytohesin-GEF-Aktivität	1 - 10 µM

Stimulus	Funktion	Endkonzentration
Ionomycin	erzeugt Calcium-Kanäle	0,5 µg/ml
PMA	aktiviert c- und nPKCs	50 ng/ml
PDBu	aktiviert c- und nPKCs	10 ng/ml
Pervanadat	aktiviert Tyrosinkinase	1 mM
CXCL12	Chemokin	0,2 - 1 µg/ml

Antikörper-vermittelte Stimulationen erfolgten analog mit den unter 2.1.7.1 angegebenen Konzentrationen. Für funktionale Analysen werden die Zellen direkt nach der Stimulation verwendet, für biochemische Analysen werden die Zellen nach der Stimulation einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und gegebenenfalls als Pellet bis zur Lyse bei -20°C eingefroren.

## 2.2.4 Funktionale Analysen

### 2.2.4.1 Adhäsionstest auf ICAM-1

Zur Analyse LFA-1-vermittelter Adhäsion werden Zelladhäsionstests auf immobilisiertem ICAM-1 in 96-Loch-Schalen durchgeführt.

#### **Beschichtung mit ICAM-1**

Die Beschichtung mit ICAM-1 erfolgt durch Adsorption eines anti-human-IgG Antikörpers an das Plastik der 96-Loch-Schale und anschließende Bindung eines ICAM-1-Fc Fusionsproteins durch den Antikörper. Durch diese Anordnung wird die korrekte Orientierung des Fusionsproteins erreicht. Für die Beschichtung wird zunächst der Ziege-anti-human-IgG Antikörper mit 50 mM Tris/HCl, pH 9,5 auf eine Konzentration von 1,8 µg/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 50 µl pro Vertiefung in eine 96-Loch-Schale pipettiert. Nach 90-minütiger Inkubation bei RT werden die Vertiefungen zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf dem Plastik werden die Vertiefungen mit 100 µl PBS/1% (w/v) BSA befüllt und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden 100 µl eines ICAM-1-Fc-haltigen Kulturüberstands in die Vertiefungen gegeben und die Schale für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Der Kulturüberstand stammt von CV-1 Zellen, die nach Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus das ICAM-1-Fc Fusionsprotein überexprimieren und sezernieren.

### ***Adhäsion der Zellen auf ICAM-1***

Die zu analysierenden Zellen werden zunächst in Kulturmedium mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 mit einer Endkonzentration von 12 µg/ml für 30 min bei 37°C markiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und in HBSS resuspendiert. Jurkat E6 wurden dabei auf eine Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml resuspendiert, PBL wurden mit einem Titer von  $1 \times 10^7$ /ml eingesetzt. Die Zellen werden nun aufgeteilt und entweder nicht stimuliert oder für 10 min bei 37°C mit verschiedenen LFA-1-aktivierenden Agenzien stimuliert. Die ICAM-1 beschichteten Vertiefungen werden zweimal mit HBSS gewaschen und mit 100 µl der Zellsuspensionen befüllt, wobei pro Ansatz drei Vergleichswerte analysiert werden. Die Zellen werden nun zur Adhäsion für 30 min (Jurkat E6) bzw. für 45 min (PBL) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden nicht adhärierende Zellen durch vorsichtiges Waschen der Vertiefungen mit 37°C warmem HBSS entfernt. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgt durch Messung der Fluoreszenz-Emission bei 485 nm mit einer Anregung bei 360 nm. Als 100%-Referenz dient der Messwert der eingesetzten Zellen.

### **2.2.4.2. Transwell-Migrationstest**

Im Transwell-Migrationstest wird die Fähigkeit von Zellen untersucht, durch eine poröse Membran in Richtung eines Chemokin-Gradienten zu wandern. Der Migrationstest wird in modifizierten Transwell-Boyden-Kammern durchgeführt. Die Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine poröse Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 5 µm getrennt sind. Die zu analysierenden Zellen werden in VLE-RPMI 1640/1% FCS zu einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml aufgenommen. 300 µl der Zellsuspension werden in das obere Kompartiment einer Kammer überführt. Das untere Kompartiment ist mit 700 µl des gleichen Mediums befüllt. Während einer Stunde Inkubation bei 37°C setzen sich die Zellen auf der Membran ab. Anschließend wird der Einsatz in 700 µl VLE-RPMI 1640/1% FCS mit 200 ng/ml CXCL12 umgesetzt. Als Kontrolle dient je ein Ansatz mit Medium ohne Chemokin. Die Kammern werden nun für 3 h bei 37°C inkubiert, währenddessen die Zellen durch die poröse Membran transmigrieren. Nach dieser Inkubationszeit werden die Einsätze aus den Kammern entfernt und die transmigrierten Zellen in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Migrationsrate wird prozentual zur eingesetzten Zellzahl ausgewertet.

### 2.2.4.3 IL-2-Promotor-Aktivierungsanalyse

Die Produktion des autokrinen Wachstumsfaktors IL-2 oder die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors kann als Maß der T-Zell-Aktivierung betrachtet werden, da die IL-2-Produktion bei der T-Zell-Aktivierung graduell induziert wird. Die Quantifizierung der transkriptionellen Aktivierung eines Promotors wird durch den Einsatz eines Reportergens, unter der Kontrolle des zu analysierenden Promotors, vereinfacht. Durch die Expression eines Enzyms als Reporter, wie zum Beispiel der Luziferase des Glühwürmchens, wird überdies die Sensitivität der Quantifizierung durch die Amplifikation des Signals erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Luziferase-Reporter-Konstrukt IL-2-Luc zur Quantifizierung der IL-2-Promotor-Aktivierung verwendet. Das Konstrukt IL-2-Luc ist ein Derivat des pGL2-Vektors (Promega), in welchen der humane IL-2-Promotor (Basenpaare -577 bis +53 relativ zum Transkriptionsstart) über die Mlu I- und Hind III-Schnittstellen inseriert wurde. Zur Quantifizierung der IL-2-Promotor-Aktivierung wurden  $9 \times 10^6$  T-Ag Jurkat Zellen mit 5 µg pEGFP-N1, 15 µg IL-2-Luc und falls nicht anders angegeben 20 µg eines Expressionsvektors für das zu analysierende Protein bzw. die entsprechende Kontrolle transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde 17 Stunden nach der Transfektion anhand der eGFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (2.2.5.2). Zur Stimulation der IL-2-Promotor-Aktivierung wurden  $6,75 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 750 µl in 24-Loch Zellkultur-Schalen für 6 Stunden mit OKT3 und anti-CD28 (je 2 µg/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 200 µl 1 x Reporter-Lysispuffer (Promega) resuspendiert, bei -80°C eingefroren, auf Eis aufgetaut und für 10 Minuten mit  $11.400 \times g$  bei 4°C zentrifugiert. 6 µl des Lysats wurden zur Bestimmung des Proteingehalts einem BCA-Test (2.2.6.2) unterzogen. Für die Messung der Luziferase-Aktivität wurden 100 µl des Lysats eingesetzt. Die Licht-Emission wurde im Luminometer 10 Sekunden nach Injektion von 100 µl Luziferase-Substrat (Promega) für 10 Sekunden gemessen. Die relativen Licht-Einheiten (RLU) wurden auf die Transfektionseffizienz und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben normalisiert und relativ zur stimulierten Kontrolle (100%) ausgewertet.

## 2.2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.2.5.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur mikroskopischen Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen werden Immunfluoreszenz-Markierungen fixierter Zellen durchgeführt. Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und zu einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml mit PBS resuspendiert. Auf einem poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wird mit einem Fettstift ein Ring mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm Durchmesser gezogen. 200  $\mu$ l der Zellsuspension werden als Tropfen auf den durch den Fettstift umrandeten Bereich aufgebracht. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C haften die Zellen auf der poly-L-Lysin Beschichtung an. Anschließend werden nicht adhärierte Zellen durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Die adhärierten Zellen werden mit 200  $\mu$ l PBS/2% Paraformaldehyd (PFA) bedeckt und für 30 min bei RT fixiert. Um überschüssiges PFA abreagieren zu lassen, werden die Zellen für 10 min bei RT mit PBS/2% Glycin (w/v) inkubiert, und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Immunfluoreszenz-Markierung erfolgt durch 2-stündige Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung eines primären Antikörpers in 100  $\mu$ l PBS/0,2% Triton X-100 (v/v)/1% BSA (w/v) bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit einer 1:200 Verdünnung eines sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers in PBS/0,2% Triton X-100 (v/v)/1% BSA (w/v) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS und einmal kurz mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen, mit 20  $\mu$ l Gelmount/50 mg/ml Dabco versetzt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Zum Aushärten des Mounting-Mediums werden die Präparate über Nacht bei 4°C gelagert. Um überexprimierte eGFP-Fusionsproteine nachzuweisen, werden die Zellen direkt nach Fixierung und Waschen mit Mounting-Medium „eingedeckelt“. Für den Nachweis überexprimierter Proteine mit Fc-Fusionsanteil wurden Markierungen mit einem sekundären, Fluorochrom-gekoppelten anti-human-IgG Antikörper angefertigt. Die Analyse der Präparate erfolgte im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (FV-1000, Olympus).

### 2.2.5.2 Durchflusszytometrie

Die Technik der Durchflusszytometrie ermöglicht die Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen oder intrazellulären Proteinen auf Einzelzellebene, wobei gleichzeitig zwischen verschiedenen Zellpopulationen unterschieden werden kann. Bei diesem Verfahren werden Zellen einzeln mit einem Laser bestrahlt und das abgelenkte Licht bzw. die emittierte Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen analysiert. Die Messungen erlauben dadurch Aussagen über Größe und Granularität der analysierten Zellen, über den Anteil fluoreszierender Zellen in einer Population und anhand der Fluoreszenz-Intensität über die Expressionsstärke des analysierten Proteins.

Zur Expressionskontrolle von eGFP oder eGFP-Fusionsproteinen werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, zu einem Titer von maximal  $1 \times 10^6$ /ml in PBS resuspendiert und eingemessen. Für die Markierung eines Oberflächen-Antigens müssen die Zellen ebenfalls nicht fixiert werden. Um jedoch zu vermeiden, dass gebundene Antikörper endozytiert werden, werden alle Schritte auf Eis und mit eiskalten Lösungen durchgeführt.  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  Zellen werden mit PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l PBS mit in der Regel 10  $\mu$ g/ml des primärem Antikörpers resuspendiert und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen in 100  $\mu$ l einer geeigneten Verdünnung des entsprechenden sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers in PBS resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, einer Dichte von maximal  $1 \times 10^6$ /ml in PBS aufgenommen und eingemessen.

Der monoklonale Antikörper 327c erkennt spezifisch eine induzierbare Konformation der CD18 I-ähnlichen Domäne, die mit hoher Affinität für lösliches ICAM-1 korreliert [Bealset al., 2001] Die Markierung des induzierbaren Aktivierungsepitops durch den 327C-Antikörper weicht von vorstehendem Standard-Protokoll ab. Die Induktion des 327-Epitops ist abhängig von divalenten Kationen. Daher wurden alle Markierungs- und Wasch-Schritte in HBSS / 10 mM HEPES, pH 7,4 / 2% BSA (w/v) durchgeführt. Die Markierung des Neoepitops mit 327C (10  $\mu$ g/ml final) erfolgt für 10 Minuten bei 37°C.

## 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.6.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

#### ***Denaturierende Lyse***

Um eine schnelle Lyse zu erreichen, werden Zellen denaturierend mit SDS lysiert. Dazu werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Adhärenente Zellen werden im Zellkulturgefäß unter PBS mit einem Schaber abgelöst, pelletiert und in PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1/9 Volumen 10% (w/v) SDS werden die Proben 5 min bei 99°C gekocht. Durch denaturierte, chromosomale DNA wird die Lösung stark viskös. Um die Viskosität zu verringern, wird die DNA durch Sonifizieren geschert. Dazu werden die Proben auf Eis mittels eines Stabsonifikators mit 5 kurzen Pulsen beschallt. Anschließend werden die Lysate mit 1/4 Volumen 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 11.400 x g zentrifugiert.

5 x SDS-Probenpuffer (reduzierend)	
Glycerin	50% (v/v)
Tris/HCl, pH 6,8	250 mM
DTT	500 mM
SDS	10% (w/v)
Bromphenolblau	0,5% (w/v)

#### ***Nicht-denaturierende Lyse***

Zur Lyse von Suspensionszellen unter nicht-denaturierenden Bedingungen werden  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen für 5 min bei 900 x g pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in 100 - 500 µl eiskaltem Igepal-Lysispuffer mit Protease- und ggf. Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert. Die Lyse adhärenenter Zellen erfolgt direkt im Zellkulturgefäß auf Eis. Dazu werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Igepal-Lysispuffer versetzt, mit einem Zellschaber vom Plastik abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Für die Lyse in 6-Loch-Schalen werden 500 µl Lysispuffer pro Vertiefung eingesetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis und mehrfachem Auf- und Abpipettieren des Ansatzes, werden unlösliche Zellbestandteile bei 11.400 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand, der das Gesamtzell-Lysat enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Da Igepal ein mildes, nicht-ionisches

Detergenz ist, bleiben bei diesem Zellaufschluss Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine weitgehend erhalten, wodurch das erhaltene Lysat für Koimmunpräzipitations-Analysen verwendet werden kann. Für Immunpräzipitationen (siehe 2.2.6.3) erfolgt die Lyse in einem Volumen von 500 µl. Sollen Gesamt-Lysate mittels SDS- oder nativer PAGE und Western Blot analysiert werden, wird zum Proteinabgleich verschiedener Proben eine Proteinbestimmung (siehe 2.2.6.2) durchgeführt. Für die SDS-PAGE (siehe 2.2.6.4) wird das Lysat mit 1/4 Volumen 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C gekocht. Zur Analyse mittels nativer PAGE (siehe 2.2.6.5) werden die Proben mit 1/2 Volumen 3 x nativem Probenpuffer versetzt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Igepal-Lysispuffer	
HEPES, pH 7,5	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	150 mM
DTT (optional)	1 mM
Igepal	1% (v/v)

Protease-Inhibitoren	
Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml
PMSF	1:1000 aus gesättigter Stammlösung in 2-Propanol

Phosphatase-Inhibitoren	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
Glycerolphosphat	1 mM
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	1:100

### 2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung erfolgte mittels des BCA-Tests. Dazu werden 6 µl der zu bestimmenden Proteinlösung in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Probe darf für die Proteinbestimmung kein DTT oder SDS enthalten, da diese Substanzen das Ergebnis stark verfälschen würden. Als Standards für die Erstellung einer Eichgeraden werden 6 µl BSA-Lösungen der Konzentrationen 2,0/1,5/1,0/0,5/0,25/0,05 mg/ml verwendet. Die Proben und

Standards werden mit 200  $\mu\text{l}$  frisch angesetztem BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Bei der Nachweisreaktion werden in alkalischer Lösung  $\text{Cu}^{++}$ -Ionen durch Cystein-, Cystin-, Tyrosin und Tryptophanreste sowie durch Peptidbindungen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches mit BCA (Bicinchoninic acid) einen violetten Farbkomplex bildet. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 562 nm im Multiwell-Platten Absorptionsmessgerät Synergy HT (MWG). Mit der Software KC4 wird anhand der Messwerte der BSA-Standardlösungen eine Eichgerade erstellt und die Protein-Konzentration der Proben berechnet.

### **2.2.6.3 Immunpräzipitation**

Um ein spezifisches Protein aus Gesamtzell-Lysaten zu isolieren, wird die Methode der Immunpräzipitation angewendet. Hierfür wird dem Lysat zunächst ein, für das zu analysierende Protein oder einen Fusionsanteil, spezifischer Antikörper zugefügt. Der Antikörper-Antigen-Komplex wird anschließend mittels, an Sepharose-Kügelchen gekoppeltes Protein A oder G immobilisiert. Für die Präzipitation mit Antikörpern aus Ratte, Maus oder Ziege wird Protein G-Sepharose verwendet. Kaninchen-Antikörper werden mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Überexprimierte Proteine mit einem Fc-Fusionsanteil, der aus der CH2- und CH3-Domäne von humanem  $\text{IgG}_1$  besteht, können direkt an Protein A-Sepharose präzipitiert werden.

Zu 500  $\mu\text{l}$  Zellysat werden 300  $\mu\text{l}$  Hybridoma-Überstand oder 8  $\mu\text{g}$  eines gereinigten Antikörpers gegeben. Der Ansatz wird für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. 40  $\mu\text{l}$  einer etwa 50%-igen Aufschlammung, mit PBS äquilibrierter Protein A- bzw. Protein G-Sepharose-Kügelchen werden zugefügt und der Ansatz wird für eine weitere Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss werden die Sepharose-Kügelchen 2 min mit 900 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, 3 x mit 1 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen, mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C gekocht.

### **2.2.6.4 *In-vitro*-Dephosphorylierung immunpräzipitierter Proteine**

Zur *in-vitro*-Dephosphorylierung immunpräzipitierter Proteine werden die Protein A- bzw. Protein G-Sepharose-Kügelchen nach der Immunpräzipitation zweimal mit 1 ml eiskaltem Igepal-Lysispuffer gewaschen und zweimal mit 1 ml eiskaltem Alkalische Phosphatase- (AP-) Puffer äquilibriert. Anschließend werden die Sepharose Kügelchen mit 20  $\mu\text{l}$  AP-Puffer versetzt und 1  $\mu\text{l}$  Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) bzw. als Kontrolle 1  $\mu\text{l}$  50% Glycerin zugefügt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation

bei 37°C unter Schütteln. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 x SDS-Probenpuffer und 5-minütiges Aufkochen bei 99°C abgestoppt.

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

### 2.2.6.5 *In-vitro*-Phosphorylierung immunpräzipitierter Proteine mit PKC $\delta$

Um immunpräzipitierte Proteine *in vitro* mit PKC $\delta$  zu phosphorylieren, werden die Protein A- bzw. Protein G-Sepharose-Kügelchen nach der Immunpräzipitation zweimal mit 1 ml Igepal-Lysispuffer gewaschen. Zum Äquilibrieren wird die Sepharose zweimal mit 1 ml PKC-Puffer gewaschen und anschließend in 60  $\mu$ l Reaktions-Mix suspendiert und auf 30°C vorgewärmt. Für die Phosphorylierung werden 2  $\mu$ l PKC-Verdünnung (20 ng/ $\mu$ l) bzw. 2  $\mu$ l Verdünnungspuffer als Kontrolle zugegeben. Der Ansatz wird 30 min unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 x SDS-Probenpuffer und 5-minütiges Aufkochen bei 99°C abgestoppt.

PKC-Puffer		Reaktions-Mix		Endkonzentration
HEPES,		500 mM HEPES,		
pH 7,4	20 mM	pH 7,4	2,4 $\mu$ l	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	100 mM MgCl <sub>2</sub>	6 $\mu$ l	10mM
EGTA	100 $\mu$ M	1 mM EGTA	6 $\mu$ l	100 $\mu$ M
		10 mM ATP	0,6 $\mu$ l	100 $\mu$ M
		Lipid-Mix	6 $\mu$ l	200 $\mu$ g/ml PS
		(siehe unten)		20 $\mu$ g/ml DAG
		H <sub>2</sub> O bidest.	ad 60 $\mu$ l	0,03% (v/v) Triton X-100

PKC-Verdünnungspuffer	
HEPES, pH 7,4	10 mM
DTT	5 mM
Triton X-100	0,01% (v/v)

### ***Präparation des Lipid-Mix***

Die Phospholipide 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-L-Serin (Phosphatidylserin, PS) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycerol (Diacylglycerol, DAG) sind als Lösung in Chloroform: Methanol (1:1) erhältlich. Pro 60 µl Reaktions-Mix (siehe oben) werden 12 µg PS und 1,2 µg DAG eingesetzt. Die benötigten Mengen an PS- und DAG-Lösung werden vereinigt und durch Zentrifugation in einer Vacuum-Zentrifuge wird das Methanol/Chloroform Lösungsmittel-Gemisch abgezogen. Die so getrockneten Lipide werden durch kräftiges Mischen in 6 µl Resuspensions-Puffer pro 12 µg PS/1,2 µg DAG resuspendiert. Bevor der Lipid-Mix zum Reaktions-Mix gegeben wird, wird die Suspension 5 min. auf 40°C erwärmt, um die Lipide in Lösung zu bringen.

Lipid-Resuspensionspuffer	
HEPES, pH 7,4	10 mM
Triton X-100	0,3% (v/v)

### **2.2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden hierfür in SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht. Die Bindung des stark anionischen Detergenz SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine sowie die Maskierung ihrer Eigenladung, wobei die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS/Protein-Komplexe in einem Polyacrylamidgel allein abhängig von ihrem Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach Lämmli mit 10%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel verwendet. Durch das niedrigprozentige Sammelgel mit leicht saurem pH wird eine Fokussierung der Proteine vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel erreicht, wodurch schärfere Banden entstehen. Die nachstehenden Angaben für Trenn- und Sammelgel

beziehen sich auf den Ansatz für zwei Gele. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 110 Volt.

Trenngel (10%)	
H <sub>2</sub> O	4,0 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1)	3,3 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl
10% (w/v) APS	100 µl
TEMED	4 µl

Sammelgel (5%)	
H <sub>2</sub> O	4,1 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1)	1,0 ml
1 M Tris/HCl, pH 6,8	750 µl
10% (w/v) SDS	60 µl
10% (w/v) APS	60 µl
TEMED	6 µl

Laufpuffer	
Glycin	192 mM
Tris-Base	25 mM
SDS	0,1% (w/v)

### 2.2.6.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung unter nicht-denaturierenden Bedingungen werden 7,5%-ige Polyacrylamidgele mit 5%-igem Sammelgel benutzt. Die Laufgeschwindigkeit von Proteinen in der SDS-freien PAGE ist abhängig von ihrer Größe und Eigenladung. Daher weisen phosphorylierte Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen häufig eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als ihre unphosphorylierte Form auf [Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994]. Die nachstehenden Angaben für Trenn- und Sammelgel beziehen sich auf den Ansatz für zwei Gele. Für die Elektrophorese werden kerndepletierte Gesamtzell-Lysate mit 3 x nativem Probenpuffer versetzt und direkt auf das Gel geladen. Der Lauf erfolgt mit konstanter Spannung bei 90 Volt.

natives Trenngel (7,5%)	
H <sub>2</sub> O	2,4 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1)	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	5 ml
10% (w/v) APS	100 µl
TEMED	6 µl

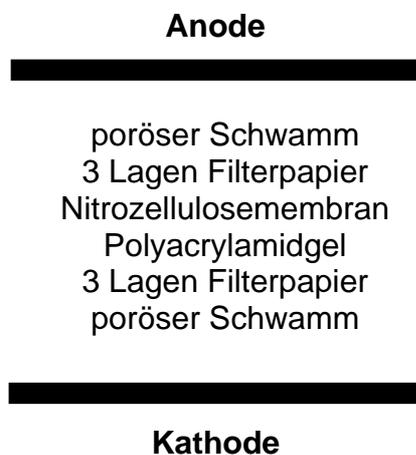
3 x nativer Probenpuffer	
Tris/HCl, pH 7,0	60 mM
Glycerin	9% (v/v)
Bromphenolblau	0,03% (w/v)

natives Sammelgel (5%)	
H <sub>2</sub> O	4,0 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1)	1,0 ml
1 M Tris/HCl, pH 6,8	900 µl
10% (w/v) APS	60 µl
TEMED	6 µl

Laufpuffer	
Glycin	200 mM
Tris-Base	25 mM

### 2.2.6.8 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran (Western-Blot)

Um den immunologischen Nachweis von Proteinen in SDS- oder nativen Polyacrylamidgelen zu ermöglichen, werden die Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulosemembran transferiert. Für den Transfer wurde das Nassblot-Verfahren angewendet. Dazu werden zwei poröse Schwämme, 6 Filterpapiere, das Polyacrylamid-Gel und die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt und nach folgendem Schema luftblasenfrei aufeinandergelegt, zwischen die Elektroden der Blot-Kammer platziert und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank gegeben:



Der Transfer erfolgt über 2 h bei 4°C mit einer konstanten Spannung von 80 Volt.

Transferpuffer	
Glycin	192 mM
Tris-Base	25 mM
Methanol	20% (v/v)
SDS	0,002% (w/v)

### 2.2.6.9 Immundetektion von Western-Blots

Um bei der Immundetektion unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, müssen zunächst freie Bindungsstellen der Membran abgesättigt werden. Hierfür wird die Membran für 1 h oder über Nacht in 10 ml TBST mit 2 - 5% (w/v) Milchpulver geschwenkt. Zum spezifischen Nachweis eines Proteins auf der Membran wird diese nach der Blockade mit einem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein bzw. gegen einen Proteinfusionsanteil inkubiert. Der primäre Antikörper wird mit 10 ml TBST auf die vom Hersteller empfohlene Konzentration verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt für 2 h unter leichtem Schwenken bei RT. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen mit TBST, wird die Membran für 1 h in 10 ml einer 1:5000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wird die Membran 3 mal für 15 min mit TBST gewaschen, einmal kurz mit TBS gespült und für ca. 1 min in 2 ml einer 1:1-Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2 inkubiert. Durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol entsteht Chemolumineszenz, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann.

TBS	
Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	140 mM

TBST	
Tween-20 in TBS	0,05% (v/v)

### 2.2.6.10 „Stripping“ von Western-Blots

Um einen Western-Blot für eine zweite Detektion verwenden zu können, werden die für die erste Detektion verwendeten Antikörper durch „Stripping“ der Membran entfernt. Dazu werden 50 ml „Stripping“-Puffer auf 55°C erhitzt und die Membran darin für 30 min geschwenkt. Anschließend wird die Membran mehrfach mit TBST gewaschen und schließlich für 1 h oder über Nacht in TBST mit 2 - 5% (w/v) Milchpulver blockiert.

„Stripping“-Puffer	
SDS	2% (w/v)
Tris/HCl, pH 6,7	62,5 mM
2-Mercaptoethanol	100 mM

### 2.2.7 Elektronische Datenverarbeitung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Word 2003 (Microsoft) erstellt. Quellenverweise wurden mit Bibliographix5 eingefügt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop 7.0 (Adobe). Schemata wurden mit PowerPoint 2003 (Microsoft) angefertigt. Für Tabellenkalkulationen und die Erstellung von Diagrammen wurde Excel 2003 (Microsoft) verwendet. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit WinMDI 2.8. Sequenzierungen wurden mit Chromas 2 ausgewertet. Sequenzvergleiche wurden mit VektorNTI erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 GRASP, ein neuer Cytohesin-1-Interaktionspartner

#### 3.1.1 GRASP ist ein CYTIP-homologes Protein

Das PDZ-Domänen-Protein GRASP (*GRP1-associated scaffold protein*) wurde ursprünglich als ein differentiell exprimiertes Gen in murinen embryonalen P19 Karzinomzellen identifiziert [Nevrivy *et al.*, 2000]. Die GRASP-codierende mRNA wird in diesen Zellen durch Behandlung mit dem Differenzierungsfaktor Retinolsäure stark hochreguliert. In einem Two-Hybrid-Screen mit GRASP als Köder wurde GRP1 (*general receptor for phosphoinositides 1*), das Cytohesin-3 Homolog der Maus, als Interaktionspartner identifiziert. Weiterhin konnte in dieser Studie durch GST-pull-down Experimente eine Interaktion mit Cytohesin-2/ARNO nachgewiesen werden. Sequenzvergleiche in der Datenbank zeigen, dass GRASP ein Homolog des mit Cytohesinen interagierenden Proteins CYTIP ist. Wie CYTIP enthält auch GRASP eine PDZ-Domäne sowie eine daran angrenzende Leucin-Zipper-Region. Darüber hinaus besitzt GRASP ein carboxyterminales Klasse I PDZ-Bindemotiv (Abb. 3.1). Über die gesamte Sequenz betrachtet, weisen die beiden Proteine eine relativ geringe Ähnlichkeit von 34% identischen Aminosäuren auf. Unter Einbeziehung konservativer Substitutionen ergibt sich eine Homologie von 47%. Die stärkste Konservierung der beiden Proteine liegt in der PDZ-Domäne mit 46% Identität und 64% Homologie, in der Leucin-Zipper-Region mit 63% Identität und 78% Homologie, sowie in den carboxyterminalen 30 Aminosäuren mit 60% Identität und 77% Homologie vor. Im aminoterminalen Bereich divergieren die beiden Proteine stark. GRASP beinhaltet hier einen zusätzlichen Alanin- und Prolin-reichen Sequenzabschnitt von 26 Aminosäuren. Darüber hinaus enthält GRASP in der aminoterminalen Region drei SH3- (*src homology 3*) Bindemotive der Konsensussequenz [PXXP], an welche Tyrosinkinasen der Src-Familie binden können, sowie ein typisches ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*), das in CYTIP nicht konserviert ist (Abb. 3.1). ITAMs besitzen die Konsensussequenz [D/E XX Y XX L/I X<sub>6-8</sub> Y XX L/I], wobei die beiden Tyrosinreste durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert werden können. Diese Motive dienen als Signalmodule in Signaltransduktionskaskaden, wie zum Beispiel der Lymphozyten-Aktivierung oder F<sub>c</sub>-Rezeptor-Signalwegen [Isakov, 1997]. Im phosphorylierten Zustand bilden sie

Andockstellen für nachgeschaltete Effektoren. Bei der Lymphozyten-Aktivierung binden die Tyrosinkinase ZAP-70 bzw. Syk an phosphorylierte ITAMs im T- bzw. B-Zell-Rezeptor-Komplex. Da ITAMs wichtige Signalmoleküle in der Lymphozyten-Aktivierung darstellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob GRASP möglicherweise eine Funktion in T-Zell-Rezeptor-Signalwegen hat.

CYTIP	1	MSLQRLQHS	SNGNLADF--	-----	-----	-----	-----	CAGPAY
GRASP	1	MTLRRLRKLQ	QKEEAAATPD	PAARTPDSEV	A	PAAPVPTPG	PPAAAAATPGP	
CYTIP	25	SSYSTLTGSL	TMNDNRRIQM	LADTVATLPR	GRKQLALTRS	SSLSDFSWSQ		
GRASP	51	PADELYAALE	DYHPAELYRA	LAVSGGTLPR	-RK-GSGFRW	KNLSQSPEQQ		
CYTIP	75	RKLVTVLEKQD	NETFGFEIQS	YRPQNQNACS	SEMFTLICKI	QEDSPAHCAG		
GRASP	99	RKVLTLLEKED	NQTFGFEIQT	YGLHHREEQR	VEMVTFVCRV	HESSPAQLAG		
CYTIP	125	LQAGDVLANT	NGVSTEGFTY	KQVVDLIRSS	GNLLTIETLN	GTMILKRTEL		
GRASP	149	LTPGDTIASV	NGLNVEGIRH	REIVDIIKAS	GNVLRLETLY	GTSI-RKAEL		
CYTIP	175	EAKLQVLKQT	LKQKWVEYRS	LQLQEHRLH	GDAANCPSL-	ENMDLDELST		
GRASP	198	EARLQYLKQT	LYEKWGEYRS	LMVQEQRLVH	GLVVKDPSIY	DTLESVRSCL		
CYTIP	224	FGPLPGGPA	LVDRNRLSSE	SSCKSWLSSM	TMDSEDG-YQ	TCVSEDSSRG		
GRASP	248	YGAGLLPG-S	LPFGPLLAVP	GRPRGGARRA	RGDADDAVYH	TCFFGDSEPP		
CYTIP	273	AF-----SR	QTS---TDDE	CFIPKEGDDF	-LRRSSSRRN	RSISNTSSGS		
GRASP	297	ALPPPPPPAR	AFGPGPAETP	AVGPGGPRA	ALSRSASVRC	AGPGGGGGG		
CYTIP	313	M-SPLW-EGN	LSSMFGTLPR	KSRKGSVRKQ	LLKFIPGLHR	AVEEEESRF		
GRASP	347	APGALWTEAR	EQALCGPGLR	GTKYRSFRRR	LLKFIPGLNR	SLEEEESQI		

**Abb. 3.1 Sequenzvergleich zwischen humanem CYTIP und GRASP**

In beiden Proteinen identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, konservative Substitutionen grün. Der schwarze Balken markiert die PDZ-Domäne, der blaue die Leucin-Zipper-Region. Die schwarz umrandeten Aminosäuren sind SH3-Bindemotive der Konsensussequenz [PXXP]. Die rote Umrandung hebt ein ITAM-Motiv der Konsensussequenz [D/E XX Y XX L/I X<sub>6-8</sub> Y XX L/I] hervor, wobei die phosphorylierbaren Tyrosine rot dargestellt sind. Die violette Umrandung markiert ein PDZ-Bindemotiv.

Für Überexpressionsversuche wurde in dieser Arbeit die cDNA des murinen GRASP verwendet. Diese cDNA wurde von Prof. Mark Leid (Laboratory of Molecular Pharmacology, College of Pharmacy; Oregon State University) zur Verfügung gestellt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem GRASP zeigt, dass die beiden Proteine weitgehend konserviert sind (Abb. 3.2). Insbesondere die Interaktionsdomänen, die PDZ-Domäne, die Leucin-Zipper-Region sowie das PDZ-Bindemotiv sind in den Homologen, bis auf einen Austausch in der PDZ-Domäne, identisch. Auch das ITAM ist in murinem GRASP konserviert. Murines

GRASP enthält in der aminoterminalen Region vor dem ITAM jedoch nur zwei SH3-Bindemotive, während das humane Protein hier drei dieser Motive beinhaltet.

human	1	MTLRRLRKLQ	QKEEAAATPD	PAARTPDSEV	APAAPVPTPG	PPAAAAATPGP
murin	1	MTLRRLRKLQ	QKEEATAAPD	PAGRAPDSEA	ARAAPLPS-G	PPAAAAATPGA
human	51	PADELYAALE	DYHPAELYRA	LAVSGGTLPR	RKGSQFRWKN	LSQSPEQQRK
murin	50	PGEELYAALE	DYHPAELYRA	LAVSGGTLPR	RKGSQFRWKN	FTQSPEQQRK
human	101	VLTLEKEDNQ	TFGFEIQTYG	LHHREEQRVE	MVTFVCRVHE	SSPAQLAGLT
murin	100	VLTLEKGDNQ	TFGFEIQTYG	LHHREEQRVE	MVTFVCRVHE	SSPAQLAGLT
human	151	PGDTIASVNG	LNVEGIRHRE	IVDIIKASGN	VLRLLETLYGT	SIRKAELEAR
murin	150	PGDTIASVNG	LNVEGIRHRE	IVDIIKASGN	VLRLLETLYGT	SIRKAELEAR
human	201	LQYLKQTLYE	KWGEYRSLMV	QEQRVHGLV	VKDPSIYDTL	ESVRSCLYGA
murin	200	LQYLKQTLYE	KWGEYRSLMV	QEQRVHGLV	VKDPSIYDTL	ESVRSCLYGA
human	251	GLLPGSLPFG	PLLAVPGRPR	GGARRARGDA	DDAVYHTCFF	GDSEPPALPP
murin	250	GLLPGSLPFG	PLLAAPGSAR	GGARRAKGDT	DDAVYHTCFF	GGAEPQALPP
human	301	PPPPARAFGP	GPAETPAVGP	GPGPRAALSR	SASVRCAGPG	GGGGGAPGA
murin	300	PPPPARALGP	SSAETPASVL	FPAPRSTLSR	SASVRCAGP-	-GGGGGAPGA
human	351	LWTEAREQAL	CGPGLRKTKY	RSFRRRLKLF	IPGLNRSLEE	EESQL
murin	348	LWTEAREQAL	CGAGLRKTKY	RSFRRRLKLF	IPGLNRSLEE	EESQL

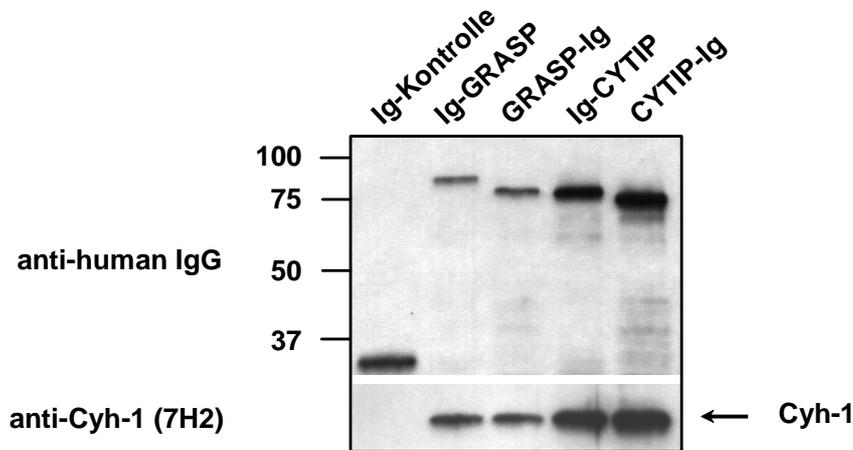
**Abb. 3.2 Sequenzvergleich zwischen humanem und murinem GRASP**

Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, konservative Substitutionen grün. Der schwarze Balken markiert die PDZ-Domäne, der blaue die Leucin-Zipper-Region. Die schwarz umrandeten Aminosäuren sind SH3-Bindemotive. Die rote Umrandung hebt das ITAM hervor, die violette das PDZ-Bindemotiv.

### 3.1.2 GRASP interagiert mit Cytohesin-1

Wie eingangs erwähnt, wurde gezeigt, dass GRASP mit Cytohesin-2 und Cytohesin-3 interagiert. Das homologe Protein CYTIP bindet an Cytohesin-1, -2 und -3 [Boehm *et al.*, 2003], während eine Interaktion mit Cytohesin-4 derzeit noch nicht untersucht wurde. Die starke Ähnlichkeit zwischen CYTIP und GRASP innerhalb der Leucin-Zipper-Region, welche die Bindung an die coiled-coil-Domäne der Cytohesine vermittelt, legt die Vermutung nahe, dass GRASP auch mit Cytohesin-1 interagieren kann. Um dies zu überprüfen, wurden Kopräzipitationsanalysen mit überexprimiertem GRASP durchgeführt. Hierzu wurde GRASP amino- oder carboxyterminal Ig-fusioniert in Jurkat E6 Zellen überexprimiert, an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot analysiert. Die Detektion mit dem Cytohesin-1-spezifischen,

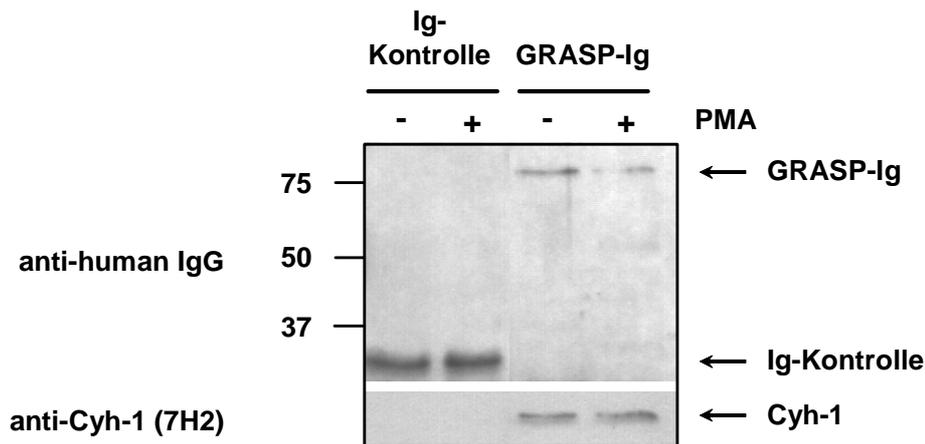
monoklonalen Antikörper 7H2 zeigt, dass endogenes Cytohesin-1 mit amino- und carboxyterminal Ig-fusioniertem GRASP kopräzipitiert (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3 Endogenes Cytohesin-1 kopräzipitiert mit GRASP**

GRASP wurde als amino- oder carboxyterminales Ig-Fusionsprotein (Ig-GRASP, GRASP-Ig) in Jurkat E6 Zellen überexprimiert und an Protein A-Sepharose präzipitiert. Zur Expressions- und Präzipitationskontrolle wurde der Ig-Fusionsanteil mit anti-human IgG nachgewiesen (oberer Blot). Detektion mit dem Cytohesin-1-spezifischen, monoklonalen Antikörper 7H2 zeigt kopräzipitiertes, endogenes Cytohesin-1 (Cyh-1, unterer Blot). Als Negativkontrolle diente der Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle). Amino- oder carboxyterminal Ig-fusioniertes CYTIP (Ig-CYTIP, CYTIP-Ig) wurden als Positivkontrollen verwendet.

Der Phorbolster PMA ist ein Strukturanalogon des Diacylglycerol (DAG) und aktiviert Isoformen der Proteinkinase C- (PKC-) Familie. Die Stimulation von Jurkat Zellen mit PMA führt zu einer Phosphorylierung von Cytohesin-1 innerhalb seiner carboxyterminalen, polybasischen Region [Dierks *et al.*, 2001]. Phosphoryliertes Cytohesin-1 assoziiert über einen bislang unbekanntem Mechanismus mit dem Aktin-Zytoskelett. Um zu prüfen, ob die Phosphorylierung von Cytohesin-1 die Interaktion mit GRASP beeinflusst, wurde die Kopräzipitation von endogenem Cytohesin-1 mit GRASP-Ig in unstimulierten und PMA-stimulierten Zellen analysiert. Wie Abbildung 3.4 zeigt, wird die Interaktion durch Stimulation der Zellen mit PMA nicht beeinflusst.

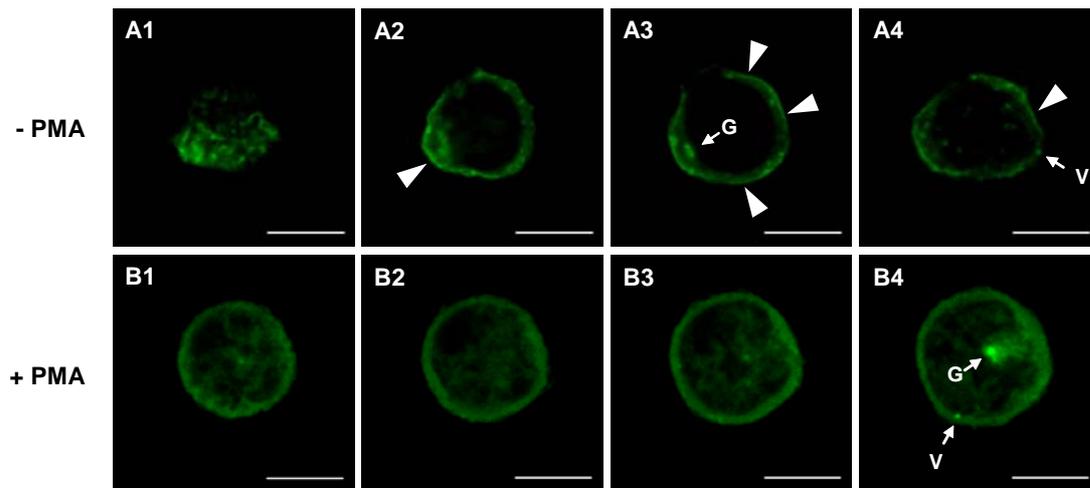


**Abb. 3.4 Die Interaktion zwischen GRASP und Cytohesin-1 wird durch PMA-Stimulation nicht beeinflusst**

Jurkat E6 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für den Ig-Fusionsanteil als Negativ-Kontrolle (Ig-Kontrolle) und GRASP-Ig transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen nicht stimuliert (-) oder für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA stimuliert (+). Die überexprimierten Fusionsproteine wurden an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit anti-human IgG nachgewiesen (oberer Blot). Die Detektion mit dem monoklonalen Antikörper 7H2 zeigt, dass endogenes Cytohesin-1 (Cyh-1) aus unstimulierten und PMA-stimulierten Zellen gleichermaßen mit GRASP-Ig kopräzipitiert.

### 3.1.3 Die subzelluläre Lokalisation von GRASP in T-Zellen

Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation von GRASP in T-Zellen analysiert. Hierzu wurde eGFP-GRASP in Jurkat E6 Zellen überexprimiert. Die transfizierten Zellen wurden unstimuliert oder PMA-stimuliert auf poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern adhärirt und fixiert. Wie Abbildung 3.5 zeigt, lokalisiert eGFP-GRASP in einem dem Golgi-Apparat ähnelnden Kompartiment sowie in mehreren kleinen, vesikelartigen Strukturen. Darüber hinaus ist eGFP-GRASP im Cytoplasma sowie schwach auch im Zellkern detektierbar. In unstimulierten Zellen lokalisiert eGFP-GRASP partiell an der Plasmamembran, wohingegen eine wesentlich schwächere Plasmamembran-Assoziation in PMA-stimulierten Zellen zu beobachten ist (Abb. 3.5). Ein ähnliches Verhalten wurde für überexprimiertes Ig-CYTIP beschrieben. Durch Adhäsion transfizierter Zellen an Integrin-Liganden wird eine verstärkte Plasmamembran-Lokalisation von CYTIP induziert. PMA-Stimulation revertiert die Integrin-vermittelte Assoziation mit der Plasmamembran [Boehm *et al.*, 2003].

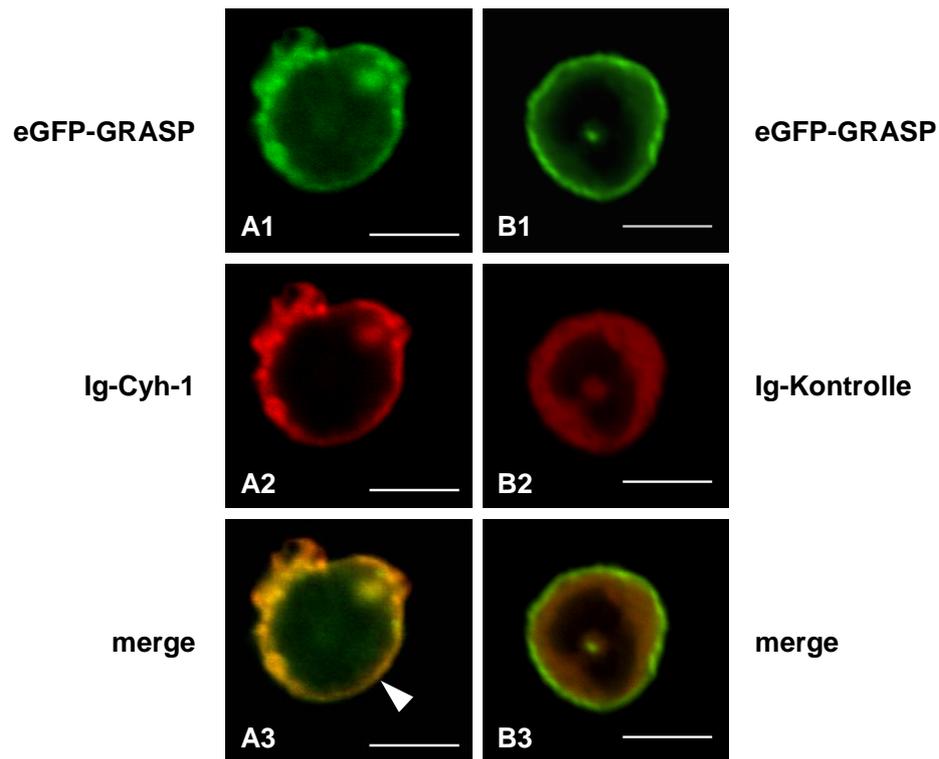


**Abb. 3.5 EGFP-GRASP in unstimulierten und PMA-stimulierten Jurkat E6**

Die Abbildung zeigt je vier konfokale Schnitte einer eGFP-GRASP überexprimierenden, unstimulierten (- PMA, A1-A4) bzw. PMA-stimulierten (+ PMA, B1-B4), auf poly-L-Lysin adhärenen Zelle. EGFP-GRASP lokalisiert in einem Kompartiment, das vermutlich dem Golgi-Apparat (G) entspricht sowie in vesikelartigen Strukturen (V). In unstimulierten Zellen ist eine Lokalisation an der Plasmamembran zu beobachten (Pfeile in A2, A3 und A4), wohingegen nach PMA-Stimulation eine deutlich schwächere Plasmamembran-Lokalisation vorliegt. Der Maßbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4 GRASP und Cytohesin-1 kolokalisieren an der Plasmamembran

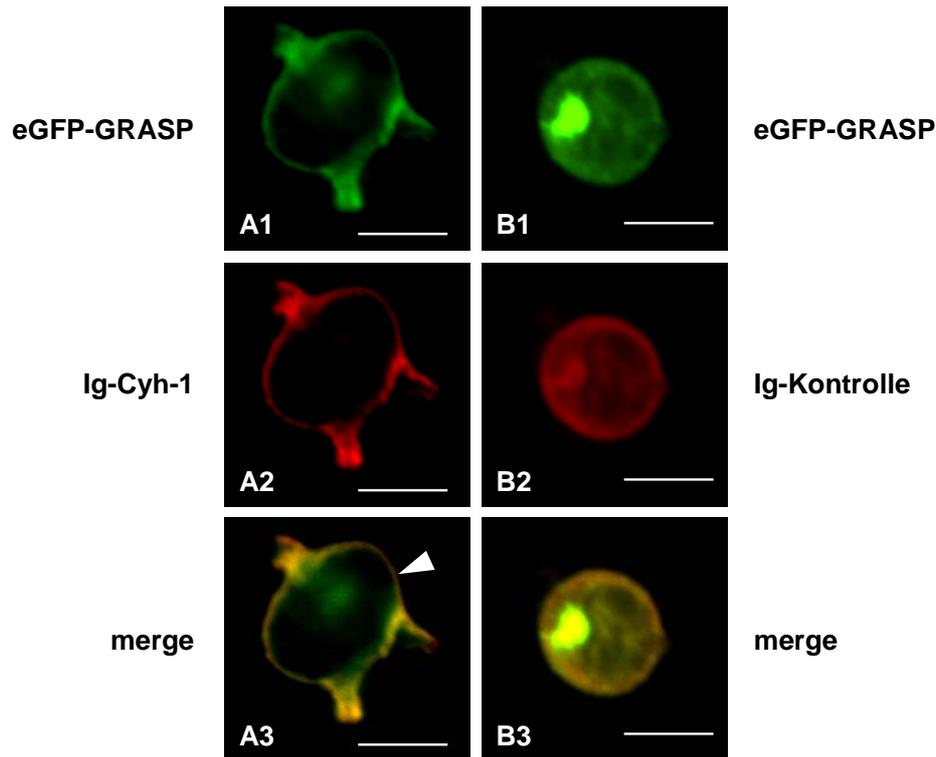
Um zu prüfen, ob GRASP und Cytohesin-1 intrazellulär kolokalisieren, wurden eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen koexprimiert. Die transfizierten Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern adhären und fixiert. Mit TRITC-anti-human IgG erfolgte die Markierung des Ig-Fusionsanteils. Abbildung 3.6 zeigt die basale Ebene einer kotransfizierten Zelle. Gegenüber der Ig-Kontrolle weisen Ig-Cytohesin-1 koexprimierende Zellen eine verstärkte Polarisierung auf (Abb. 3.6, A1-A3). Die Morphologie der Zellen ist durch zahlreiche Membranprotrusionen gekennzeichnet. Überexprimiertes Cytohesin-1 ist in Jurkat Zellen vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert sowie teilweise im Golgi-Apparat. Die Übereinanderlagerung des grünen und roten Kanals macht eine partielle Kolokalisation von eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 an der Plasmamembran sowie in Membranfortsätzen deutlich (Abb. 3.6, A3). Dieses Resultat bestätigt die zuvor durch Kopräzipitation gezeigte Interaktion der beiden Proteine.



**Abb. 3.6 GRASP und Cytohesin-1 kolokalisieren an der Plasmamembran**

Jurkat E6 wurden transient mit eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 (Ig-Cyh-1, A) bzw. dem Ig-Fusionsanteil als Kontrolle (Ig-Kontrolle, B) transfiziert. Cytohesin-1 koexprimierende Zellen zeigen eine verstärkte Polarisierung gegenüber der Ig-Kontrolle. Die Überlagerung des grünen und roten Kanals (merge) macht eine Kolokalisation der beiden überexprimierten Proteine an der Plasmamembran sowie in Membranfortsätzen sichtbar (Pfeil in A3). Der Maßbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Nachdem festgestellt wurde, dass eGFP-GRASP nach PMA-Stimulation in geringerem Ausmaß an der Plasmamembran lokalisiert, die Interaktion mit Cytohesin-1 durch die Stimulation jedoch nicht beeinflusst wird, wurde folgend die Lokalisation von eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 in PMA-stimulierten Zellen analysiert (Abb. 3.7). Auch nach PMA-Stimulation zeigen Ig-Cytohesin-1 koexprimierende Zellen eine, im Vergleich zur Ig-Kontrolle, stärker polarisierte Morphologie. Eine partielle Kolokalisation von eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 an der Plasmamembran ist auch in PMA-stimulierten Zellen zu beobachten, wohingegen in der Ig-Kontrolle keine Plasmamembran-Lokalisation von eGFP-GRASP vorliegt.

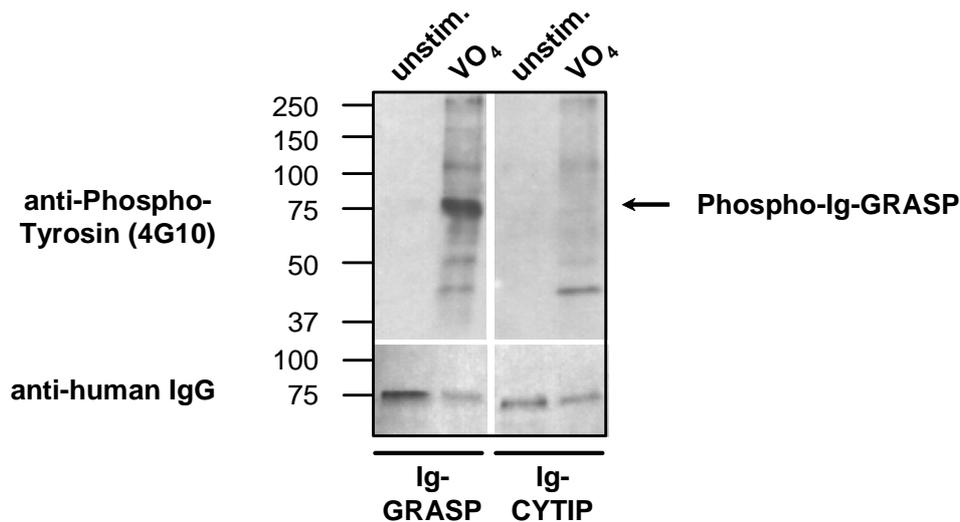


**Abb. 3.7 GRASP und Cytohesin-1 kolokalisieren in PMA-stimulierten Zellen an der Plasmamembran**

EGFP-GRASP wurde mit Ig-Cytohesin-1 (Ig-Cyh-1, A) bzw. dem Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle, B) in Jurkat E6 überexprimiert. Die transfizierten Zellen wurden für 30 Minuten mit PMA stimuliert und auf poly-L-Lysin adhärirt. Ig-Cytohesin-1 koexprimierende Zellen zeigen eine stärkere Polarisierung im Vergleich zur Ig-Kontrolle. In der Übereinanderlagerung des grünen und roten Kanals (merge) wird eine partielle Kolokalisation von eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 an der Plasmamembran deutlich (Pfeil in A3), während in der Ig-Kontrolle keine Plasmamembran-Lokalisation von eGFP-GRASP vorliegt. Der Maßbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.5 GRASP wird nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation ITAM-phosphoryliert

Tamalin, das GRASP-Homolog der Ratte, wird in COS-7 Zellen durch Überexpression von Src oder Fyn spezifisch an den beiden Tyrosinen des ITAM phosphoryliert [Hirose *et al.*, 2004]. Um die Phosphorylierung des Proteins in T-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst kontrolliert, ob Grasp in Jurkat Zellen nach Pervanadat-Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Tyrosin-Phosphorylierungen können im Western Blot mit dem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 nachgewiesen werden. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Analyse.



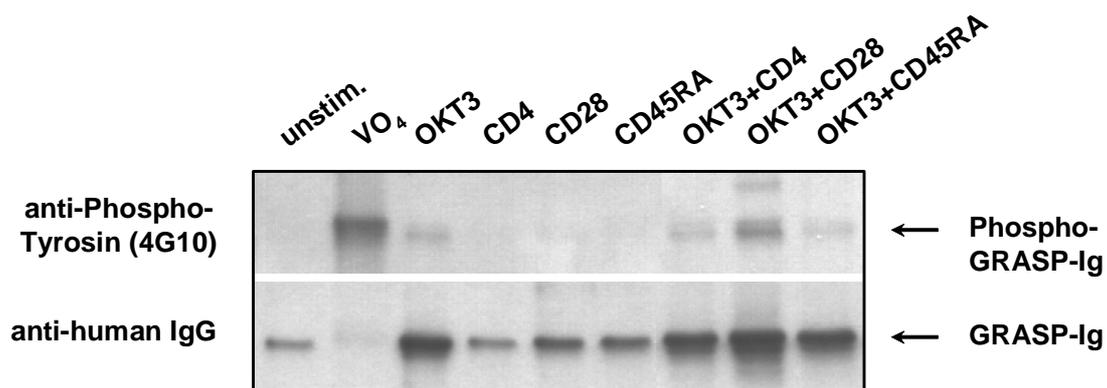
**Abb. 3.8 GRASP wird nach Pervanadat-Stimulation Tyrosin-phosphoryliert**

Jurkat E6 wurden transient mit Ig-GRASP oder Ig-CYTIP transfiziert und nicht stimuliert (unstim.) oder für 10 Minuten mit 1 mM Pervanadat ( $\text{VO}_4$ ) stimuliert. Die überexprimierten Ig-Fusionsproteine wurden an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot analysiert. Die Detektion mit dem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 liefert in der Spur der Ig-GRASP exprimierenden, Pervanadat-stimulierten Zellen ein starkes Signal bei ca. 75 kD (oberer Blot). Die Laufhöhe dieser Bande entspricht damit der des Ig-GRASP. Bei Ig-CYTIP ist dagegen nur ein sehr schwaches phospho-Tyrosin Signal auf der entsprechenden Höhe detektierbar. Zur Expressionskontrolle wurden die Fusionsproteine mit anti-human IgG nachgewiesen (unterer Blot).

In der Immunpräzipitation des Ig-GRASP aus Pervanadat-stimulierten Zellen wurde mit dem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 eine Bande nachgewiesen, deren Laufhöhe bei ca. 75 kD der von Ig-GRASP entspricht. Die Detektion mit 4G10 der Ig-CYTIP-Immunpräzipitation liefert dagegen ein sehr schwaches Signal, was zeigt, dass weder der Ig-Fusionsanteil noch CYTIP nach Pervanadat-Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert werden. Um ausschließen zu können, dass es sich bei der mit 4G10 detektierten Bande in der Ig-GRASP-Immunpräzipitation um ein Tyrosin-phosphoryliertes, kopräzipitiertes Protein der gleichen Größe handelt, wurde der Versuch mit überexprimiertem GRASP-Ig wiederholt. Carboxyterminal Ig-fusioniertes GRASP migriert in der SDS-PAGE etwas tiefer als Ig-GRASP (vergleiche Abb. 3.3). Dadurch konnte bestätigt werden, dass das Phospho-Tyrosin-Signal von überexprimiertem GRASP und nicht von einem endogenen, kopräzipitierten Protein stammt (nicht gezeigt).

Bei der T-Zell-Aktivierung werden durch Aggregation des T-Zell-Rezeptors (TCR) die Src-Kinasen Lck und Fyn aktiviert, die daraufhin ITAMs in den zytoplasmatischen Domänen des CD3-Komplexes sowie der assoziierten  $\zeta$ -Ketten phosphorylieren. Die

Aktivität dieser Kinasen wird durch Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Src-Kinasen können sich gegenseitig phosphorylieren und dadurch aktivieren. Dephosphorylierung an inhibitorischen Stellen durch die membranständige Phosphatase CD45 erleichtert die Aktivierung und steigert die Kinaseaktivität. Nachdem die Src-Kinase Fyn das GRASP-ITAM phosphorylieren kann, wurde untersucht, ob T-Zell-Rezeptor-Stimulation eine Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins auslöst (Abb. 3.9).



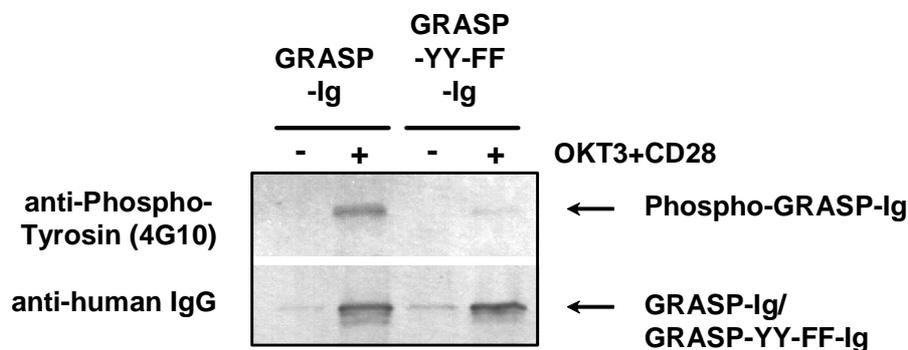
**Abb. 3.9 T-Zell-Rezeptor-Stimulation induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von GRASP, welche durch CD28-Kostimulation verstärkt wird**

GRASP-Ig überexprimierende Jurkat Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (unstim.) oder für 10 Minuten mit 1 mM Pervanadat ( $VO_4$ ) bzw. für 30 Minuten mit dem anti-CD3 $\epsilon$  Antikörper OKT3 oder Antikörpern gegen CD4, CD28 oder CD45RA (jeweils 2  $\mu$ g/ml) oder mit OKT3 in Kombination mit anti-CD4, anti-CD28 oder anti-CD45RA behandelt. Das überexprimierte Fusionsprotein wurde an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit 4G10 analysiert (oberer Blot). T-Zell-Rezeptor-Stimulation (OKT3) induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von GRASP-Ig. Kostimulation mit anti-CD28 verstärkt die Phosphorylierung. Zur Expressions- und Präzipitationskontrolle wurde das Fusionsprotein mit anti-human IgG nachgewiesen (unterer Blot). Die durch OKT3 induzierte Phosphorylierung führt gleichzeitig zu einer erhöhten Expression des Fusionsproteins, was auf einer Stabilisierung beruhen könnte.

Zur Untersuchung der Phosphorylierung wurden GRASP-Ig überexprimierende Jurkat Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenrezeptoren stimuliert. Die Quervernetzung des TCR kann *in vitro* durch den monoklonalen anti-CD3 $\epsilon$  Antikörper OKT3 bewirkt werden. Die Stimulation von Jurkat E6 mit OKT3 oder anti-CD45RA verursacht eine starke Aggregation der Zellen, so dass der Effekt der Behandlung lichtmikroskopisch kontrolliert werden kann. Wie Abbildung 3.9 zeigt, wird durch die Stimulation mit OKT3 die Tyrosin-Phosphorylierung von GRASP

induziert. Nach Quervernetzung der Rezeptoren CD4, CD28 oder CD45RA konnte keine Phosphorylierung des Fusionsproteins nachgewiesen werden. Zusätzliche Stimulation mit anti-CD4 oder anti-CD45RA zeigte keinen Effekt auf das durch OKT3 ausgelöste Signal, wohingegen durch CD28-Kostimulation eine Verstärkung der Phosphorylierung eintritt. Auffallend ist, dass die Phosphorylierung, außer im Fall der Stimulation mit Pervanadat, mit einer erhöhten Expression des Fusionsproteins einhergeht. Dieses Resultat führt zu der Annahme, dass die Phosphorylierung des Proteins oder die Bildung eines Komplexes mit aktivierten Kinasen eine Stabilisierung des Proteins bewirken.

Um zu bestimmen, ob GRASP nach OKT3/CD28-Stimulation an den Tyrosinen des ITAM phosphoryliert wird, wurde eine Mutante hergestellt, in der beide Tyrosine des Motivs (Y55 und Y67) gegen Phenylalanine ausgetauscht sind (GRASP-YY-FF-Ig). Diese Mutante zeigt nach OKT3/CD28-Stimulation eine deutlich schwächere Phosphorylierung als das Wildtyp Protein (Abb. 3.10). Somit findet die OKT3/CD28-induzierte Phosphorylierung hauptsächlich an den Tyrosinen des ITAM statt.



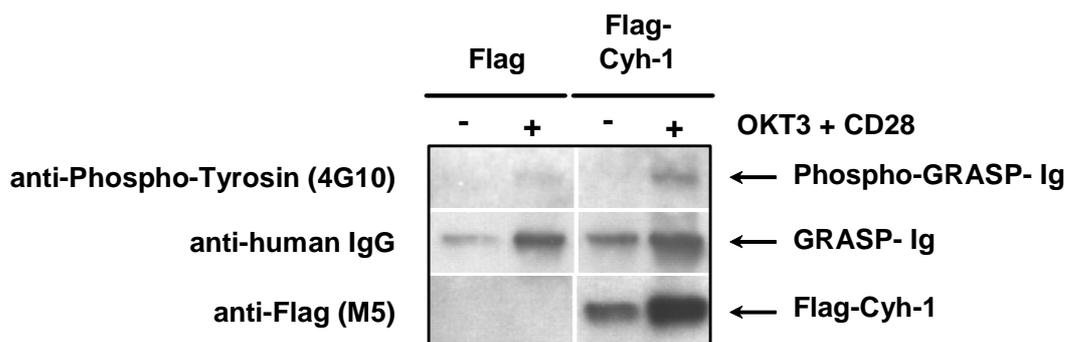
**Abb. 3.10 GRASP wird nach OKT3/CD28-Stimulation an den Tyrosinen des ITAM phosphoryliert**

Jurkat E6 Zellen wurden transient mit GRASP-Ig oder der ITAM-Mutante GRASP-YY-FF-Ig transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (-) oder für 30 Minuten mit OKT3 und anti-CD28 (je 2 µg/ml) stimuliert (+). Die überexprimierten Fusionsproteine wurden an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit 4G10 analysiert (oberer Blot). Überexprimiertes GRASP-Ig wird nach OKT3/CD28-Stimulation Tyrosin-phosphoryliert. Die Phosphorylierung ist in der ITAM-Mutante GRASP-YY-FF-Ig stark reduziert. Zur Expressions- und Präzipitations-Kontrolle wurden die Fusionsproteine mit anti-human IgG detektiert (unterer Blot). Die OKT3/CD28-Stimulation bewirkt eine verstärkte Expression beider Fusionsproteine.

Wie aus Abbildung 3.10 hervorgeht, wird durch OKT3/CD28-Stimulation auch die ITAM-Mutante stabilisiert. Daraus ist zu folgern, dass die Stabilisierung des Fusionsproteins unabhängig von der Phosphorylierung, möglicherweise durch eine Komplex-Bildung verursacht wird.

### 3.1.6 Cytohesin-1 verstärkt die GRASP-Phosphorylierung

Um zu prüfen, ob die OKT3/CD28-induzierte GRASP-Phosphorylierung durch Cytohesin-1 beeinflusst wird, wurden im folgenden Versuchsansatz Flag-Cytohesin-1 und GRASP-Ig in Jurkat E6 Zellen koexprimiert. Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, führt die Koexpression von Cytohesin-1 zu einer verstärkten Phosphorylierung sowie einer leicht erhöhten Expression gegenüber der Kontrolle.



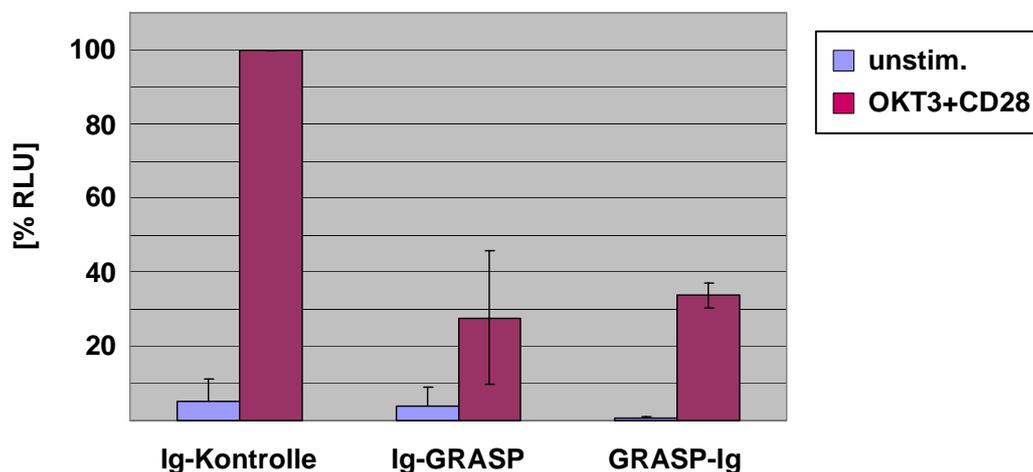
**Abb. 3.11 Die GRASP-Phosphorylierung wird durch Cytohesin-1 verstärkt**

Jurkat E6 Zellen wurden mit GRASP-Ig in Kombination mit dem Flag-Fusionsanteil als Kontrolle (Flag) bzw. Flag-Cytohesin-1 (Flag-Cyh-1) transient transfiziert. Die transfizierten Zellen blieben unstimuliert (-) oder wurden für 30 Minuten mit OKT3 und anti-CD28 (je 2 µg/ml) stimuliert (+). Überexprimiertes GRASP-Ig wurde an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot analysiert. Durch Koexpression von Cytohesin-1 wird die OKT3/CD28-induzierte GRASP-Phosphorylierung verstärkt. Gleichzeitig ist eine erhöhte Expression des Fusionsproteins zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass GRASP-Ig durch die Interaktion mit Cytohesin-1 stabilisiert wird.

### 3.1.6 GRASP inhibiert die IL-2-Promotor-Aktivierung

Die ITAMs der TCR-assoziierten Ketten leisten einen essentiellen Beitrag zur T-Zell-Aktivierung, indem sie die Tyrosin-Kinasen ZAP-70 und Syk rekrutieren und dadurch deren Aktivierung durch Src-Kinasen ermöglichen. Es stellte sich daher die Frage, welchen Einfluss das ITAM-Protein GRASP auf die T-Zell-Aktivierung zeigt. Die Transkription des IL-2-Gens kann als Maß der T-Zell-Aktivierung betrachtet werden, da diese im Zuge der Aktivierung graduell induziert wird. Zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Gens wurden heterologe Reporter-gen-Analysen in T-Ag Jurkat Zellen durchgeführt. Für die Analysen wurde das Konstrukt IL-2-Luc verwendet, das die Luziferase-cDNA als Reporter-gen unter der Kontrolle des vollständigen humanen IL-2-Promotors enthält.

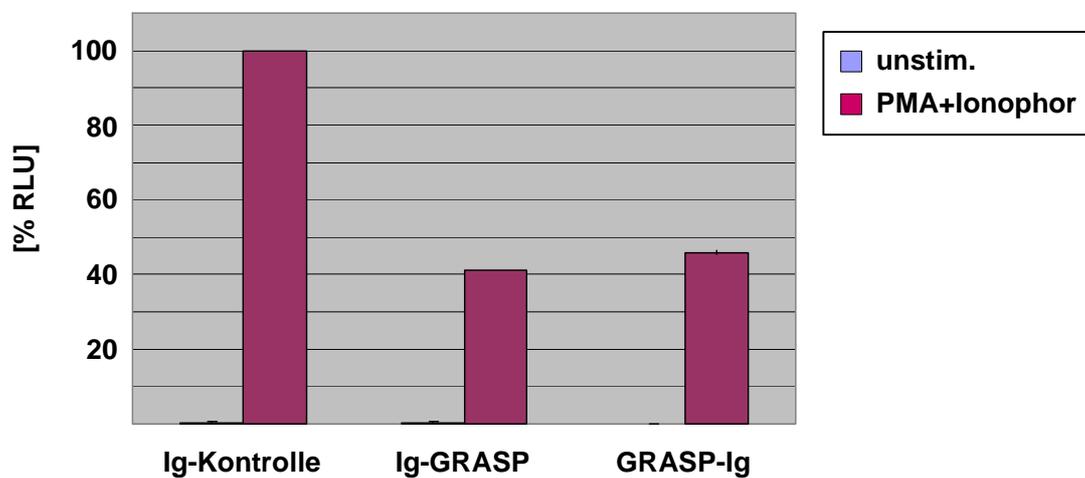
Wie in Abbildung 3.12 gezeigt, wird die Induktion des IL-2-Promotors nach OKT3/CD28-Stimulation durch die Überexpression von GRASP inhibiert. Die Inhibition wird dabei gleichermaßen durch N- oder C-terminal Ig-fusioniertes GRASP bewirkt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das PDZ-Bindemotiv, das durch den C-terminalen Ig-Fusionsanteil maskiert wird, nicht zu der inhibitorischen Wirkung beiträgt.



**Abb. 3.12 Inhibition der TCR/CD28-induzierten Aktivierung des IL-2-Promotors**

T-Ag Jurkat Zellen wurden transient mit IL-2-Luc in Kombination mit dem Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle) oder N- oder C-terminal Ig-fusioniertem GRASP (Ig-GRASP, GRASP-Ig) transfiziert und 17 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (unstim.) oder für 6 Stunden mit OKT3 und anti-CD28 (OKT3+CD28) stimuliert. Die Luciferase-Aktivität wurde luminometrisch quantifiziert, auf Transfektionseffizienz und Proteingehalt normalisiert und prozentual zur Aktivität der stimulierten Ig-Kontrolle (100%) dargestellt [%RLU]. Die Überexpression von Ig-GRASP oder GRASP-Ig bewirkt eine Reduktion der OKT3/CD28-induzierten Aktivierung des IL-2-Promotors auf ca. 30% der Kontrolle.

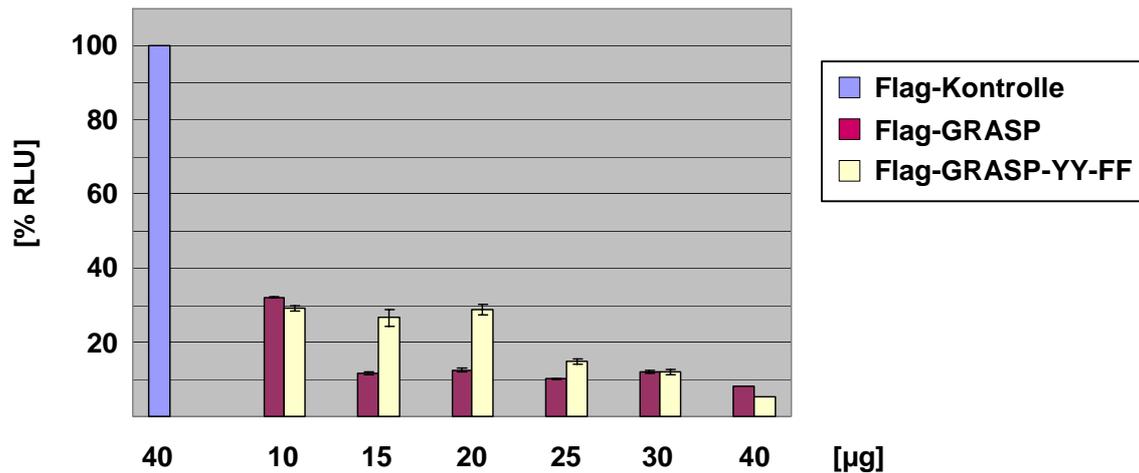
Die gleichzeitige Stimulation mit PMA und Calcium-Ionophor führt zu einer starken Aktivierung des IL-2-Promotors, die unabhängig von proximalen Signalen des TCR ist, da hierdurch direkt ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und eine Aktivierung von PKCs erreicht wird. Um zu prüfen, ob die Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung durch GRASP auf der Ebene der TCR-Signale erfolgt, wurde die IL-2-Induktion nach PMA/Ionophor-Stimulation quantifiziert. Wie aus Abbildung 3.13 hervorgeht, wird die Aktivierung des IL-2-Promotors durch die Überexpression von GRASP auch bei PMA/Ionophor-Stimulation inhibiert. Daraus ist zu schließen, dass der inhibitorische Effekt durch GRASP unabhängig von T-Zell-Rezeptor-proximalen Signalen ist.



**Abb. 3.13 Inhibition der PMA/Ionophor-induzierten IL-2-Promotor-Aktivierung**

T-Ag Jurkat Zellen wurden transient mit IL-2-Luc in Kombination mit dem Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle) oder N- oder C-terminal Ig-fusioniertem GRASP (Ig-GRASP, GRASP-Ig) transfiziert und 17 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (unstim.) oder für 6 Stunden mit PMA und Calcium-Ionophor (PMA+Ionophor) stimuliert. Die Überexpression von Ig-GRASP oder GRASP-Ig bewirkt eine Reduktion der PMA/Ionophor-induzierten Aktivierung des IL-2-Promotors auf ca. 40% der Kontrolle.

Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der inhibitorische Effekt durch GRASP, nicht auf einem ITAM-abhängigen Signalweg beruht, da anzunehmen ist, dass das GRASP-ITAM nach PMA/Ionophor-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Zur Untersuchung, ob die inhibitorische Wirkung des Proteins von der Integrität des ITAM abhängt, wurde von Bianca Paul eine quantitative Analyse der IL-2-Aktivierung mit überexprimiertem Wildtyp-GRASP und der ITAM-Mutante GRASP-YY-FF durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.14 dargestellt.



**Abb. 3.14 Inhibition der IL-2-Induktion durch die ITAM-Mutante GRASP-YY-FF**

T-Ag Jurkat Zellen wurden transient mit IL-2-Luc in Kombination mit 10 bis 40 µg eines Expressionsvektors für den Flag-Fusionsanteil (Flag-Kontrolle), Flag-GRASP oder die ITAM-defekte Mutante Flag-GRASP-YY-FF transfiziert und 17 Stunden nach der Transfektion für 6 Stunden mit OKT3 und PMA stimuliert. Die Luciferase-Aktivität wurde luminometrisch quantifiziert und auf Transfektionseffizienz und Proteingehalt normalisiert. Um den unspezifischen Effekt, der durch die Menge der transfizierten DNA hervorgerufen wird zu normalisieren, wurden die Proben prozentual zur Flag-Kontrolle der jeweils gleichen DNA-Menge ausgewertet. Die ITAM-Mutante Flag-GRASP-YY-FF bewirkt eine ähnlich starke Inhibition der OKT3/PMA-induzierten Aktivierung des IL-2-Promotors, wie das Wildtyp-Protein.

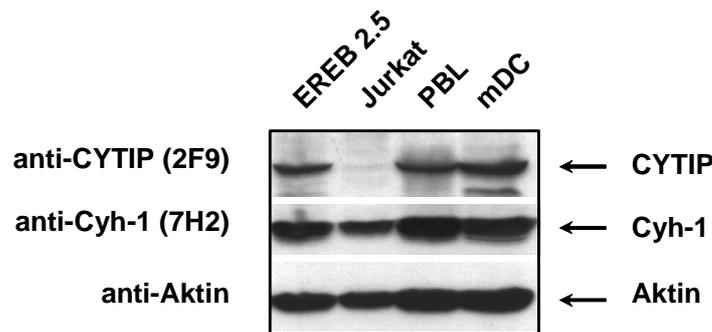
Die Überexpression der ITAM-defekten Mutante GRASP-YY-FF ruft eine vergleichbar starke Reduktion der IL-2-Promotor-Induktion hervor wie das Wildtyp-Protein. Demnach beruht der inhibitorische Effekt, der durch die Überexpression des Wildtyp-Proteins hervorgerufen wird, nicht auf einer Signalfunktion des ITAM. Weiterhin wird die T-Zell-Aktivierung nicht auf der Ebene der proximalen Signale des TCR inhibiert, da GRASP auch die PMA/Ionophor-induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors hemmt.

### **3.2 Die Regulation des Cytohesin-1-Interaktionspartners CYTIP durch Phosphorylierung und Degradation**

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten. Bei naiven CD4-positiven T-Zellen begünstigt das Zytokin IL-4 die T<sub>H</sub>2-Differenzierung, während IL-12 die Differenzierung von T<sub>H</sub>1-Zellen fördert [Agnello *et al.*, 2003]. In einem Screen nach IL-12-induzierten Genen in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde das PDZ-Domänen-Protein CYTIP identifiziert [Rogge *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002]. Northern Blot Analysen zeigten, dass die CYTIP-mRNA stark in Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) und schwächer in Lymphknoten, Thymus, Milz und Lunge vorhanden ist. Die CYTIP-mRNA wird in PBMC durch Behandlung mit IL-2 und IL-12 induziert. In T<sub>H</sub>1-Zellen liegt entsprechend eine stärkere Expression der CYTIP-mRNA vor als in T<sub>H</sub>2-Zellen und die Expression wird in T<sub>H</sub>1-Zellen durch IL-12 weiter gesteigert [Tang *et al.*, 2002]. Auch während der Reifung dendritischer Zellen wird CYTIP hochreguliert [Boehm *et al.*, 2003]. In einem Two-Hybrid-Screen mit CYTIP als Köder wurde Cytohesin-1 als Interaktionspartner identifiziert. Während die Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat Zellen die Adhäsion an ICAM-1 verstärkt, wird die Adhäsion durch Überexpression von CYTIP inhibiert. Die Guanininnukleotid-Austauschfaktor- (GEF-) Aktivität von Cytohesin-1 an ARF1 wird *in vitro* durch CYTIP gesteigert [Tang *et al.*, 2002]. Diese Daten lassen eine regulatorische Rolle von CYTIP in Cytohesin-1-vermittelten Prozessen vermuten. In diesem Teil der Arbeit wurde die Funktion des Cytohesin-1-Interaktionspartners CYTIP untersucht.

#### **3.2.1 Expressionsanalyse von CYTIP**

Mittels des CYTIP-spezifischen monoklonalen Antikörpers 2F9 wurde die endogene Expression des Proteins in verschiedenen humanen hämatopoetischen Zell-Linien und primären Zellen untersucht (Abb. 3.15). CYTIP wird in der CD4-positiven T-Zell-Linie Jurkat E6 in sehr geringem Maß exprimiert. In PBL, reifen dendritischen Zellen (mDC) und der lymphoblastoiden B-Zell-Linie EREB 2.5 liegt dagegen eine starke CYTIP-Expression vor.



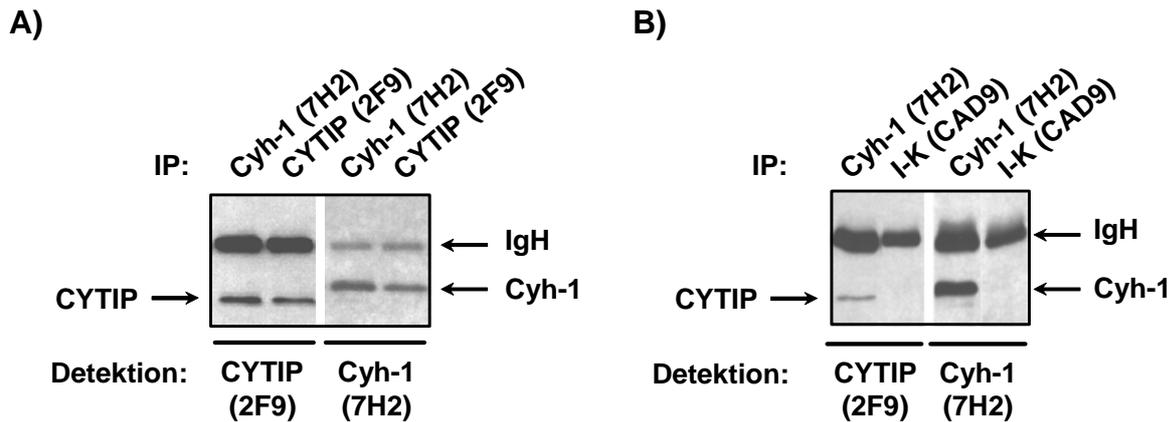
### Abb. 3.15 Endogene CYTIP-Expression

Die endogene Expression von CYTIP wurde mittels des monoklonalen Antikörpers 2F9 in humanen hämatopoetischen Zell-Linien und primären Zellen analysiert (oberer Blot). In der T-Zell-Linie Jurkat E6 ist CYTIP nur sehr schwach detektierbar. Eine starke Expression des Proteins wurde in der lymphoblastoiden B-Zell-Linie EREB 2.5 sowie in PBL und reifen dendritischen Zellen (mDC) nachgewiesen. Cytohesin-1 (Cyh-1) wird in allen untersuchten Zellen stark exprimiert (mittlerer Blot). Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

### 3.2.2 Cytohesin-1 und CYTIP kopräzipitieren aus humanen PBL

Die Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP wurde durch Two-Hybrid-Analysen in Hefe sowie Kopräzipitation und Kolo-kalisation der beiden überexprimierten Proteine in Jurkat E6 Zellen gezeigt [Boehm *et al.*, 2003]. Um die Interaktion der Proteine in primären Zellen zu bestätigen, wurde die Kopräzipitierbarkeit der beiden endogenen Proteine mittels der Cytohesin-1- bzw. CYTIP-spezifischen, monoklonalen Antikörper 7H2 bzw. 2F9 in PBL überprüft. Wie Abbildung 3.16 A zeigt, kopräzipitiert CYTIP mit Cytohesin-1 und umgekehrt Cytohesin-1 mit CYTIP aus humanen PBL.

Die Signalintensität des direkt präzipitierten CYTIP bzw. Cytohesin-1 unterscheidet sich kaum von der des kopräzipitierten CYTIP bzw. Cytohesin-1, was anzeigt, dass die beiden Proteine in PBL offenbar quantitativ als Komplex vorliegen. In PBMC liefert mit Cytohesin-1 kopräzipitiertes CYTIP dagegen ein wesentlich schwächeres Signal als in PBL. Dies ist darauf zurückzuführen, dass CYTIP in Monozyten, die ca. 40% der PBMC ausmachen, nur sehr schwach exprimiert wird (nicht gezeigt).

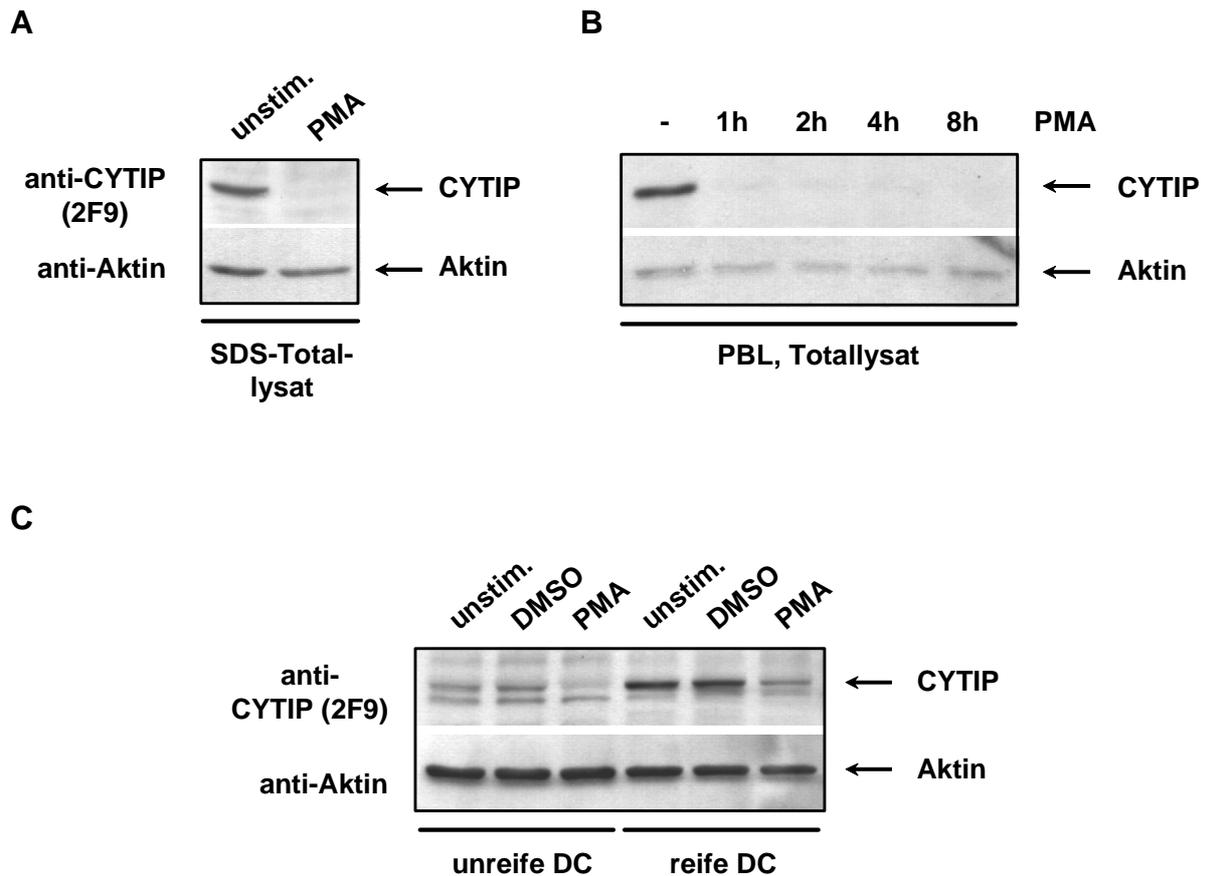


### Abb. 3.16 CYTIP und Cytohesin-1 kopräzipitieren aus PBL und PBMC

A) Endogenes Cytohesin-1 (Cyh-1) bzw. CYTIP wurde mit dem monoklonalen Antikörper 7H2 bzw. 2F9 aus humanen PBL immunpräzipitiert. Die Detektion mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 bzw. dem Cytohesin-1-spezifischen Antikörper 7H2 zeigt mit Cytohesin-1 kopräzipitiertes CYTIP bzw. mit CYTIP kopräzipitiertes Cytohesin-1. B) Weder CYTIP noch Cytohesin-1 wurden mit der 7H2/2F9-Isotyp-Kontrolle (I-K) CAD9 aus humanen PBMC präzipitiert. IgH: schwere Kette der Immunglobuline.

### 3.2.3 Endogenes CYTIP wird nach PMA-Stimulation degradiert

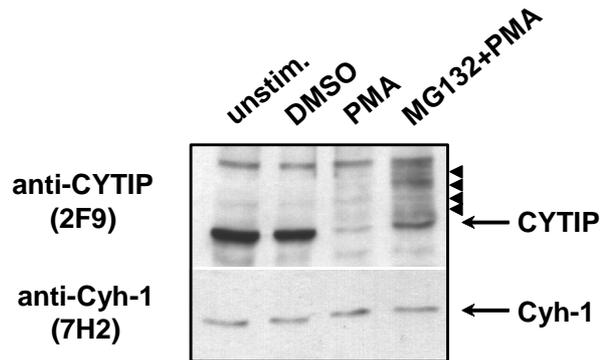
Western Blot Analysen zeigten, dass die Stimulation humaner PBL mit dem Phorbol ester PMA in einem schnellen und annähernd vollständigen Verlust von CYTIP im Totallysat der Zellen resultiert. Die Reduktion tritt dabei bereits nach wenigen Minuten der Stimulation ein. Bei 30-minütiger Stimulation ist das Protein meist nicht mehr im Totallysat detektierbar. Eine transkriptionelle Regulation sollte bei einer Stimulationszeit von 30 Minuten für die Reduktion nicht ausschlaggebend sein. Vielmehr lässt dieses Ergebnis eine induzierte Degradation des Proteins vermuten. Die Reduktion von CYTIP nach PMA-Stimulation humaner PBL wurde auch in SDS-Totallysaten festgestellt, so dass ausgeschlossen werden kann, dass CYTIP durch die Stimulation in ein Igepal-unlösliches Kompartiment transloziert (Abb. 3.17 A). Die CYTIP-mRNA wird in humanen  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen, die für sechs Stunden mit PMA und Ionophor stimuliert wurden, hochreguliert [Tang *et al.*, 2002]. Auf Proteinebene ist CYTIP auch nach acht-stündiger PMA-Stimulation humaner PBL nicht wieder detektierbar (Abb. 3.17 B). Gleiches gilt für die gleichzeitige Stimulation mit PMA und Ionophor (nicht gezeigt). Der Verlust von CYTIP nach PMA-Stimulation wurde auch in unreifen und reifen dendritischen Zellen beobachtet (Abb. 3.17 C).



### Abb. 3.17 CYTIP wird nach PMA-Stimulation degradiert

A) SDS-Totallysate unstimulierter bzw. für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA stimulierter PBL wurden im Western Blot mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 analysiert. Die Stimulation mit PMA resultiert in einer Reduktion von endogenem CYTIP. B) Humane PBL wurden nicht stimuliert oder für eine, zwei, vier oder acht Stunden mit PMA stimuliert und im Western Blot analysiert. Auch nach achtstündiger Stimulation mit PMA ist CYTIP nicht detektierbar. C) Unreife und reife dendritische Zellen (DC) wurden nicht stimuliert (unstim.) oder für 30 Minuten mit 0,1% DMSO als Kontrolle bzw. mit 50 ng/ml PMA inkubiert und lysiert. Detektion der Totallysate mit 2F9 zeigt auch in diesen Zellen eine Reduktion des endogenen CYTIP nach PMA-Simulation. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert.

Um zu prüfen, ob die PMA-induzierte Reduktion von CYTIP auf einer proteasomalen Degradation des Proteins beruht, wurde der Proteasomen-Inhibitor MG132 eingesetzt. Durch Vorinkubation der Zellen mit MG132 wird die PMA-induzierte Reduktion inhibiert (Abb. 3.18). Gleichzeitig werden hierbei mehrere höher migrierende Banden angereichert, die phosphorylierte und/oder ubiquitinierte Formen des Proteins darstellen könnten.



### Abb. 3.18 Der Proteasomen-Inhibitor MG132 inhibiert die CYTIP-Degradation

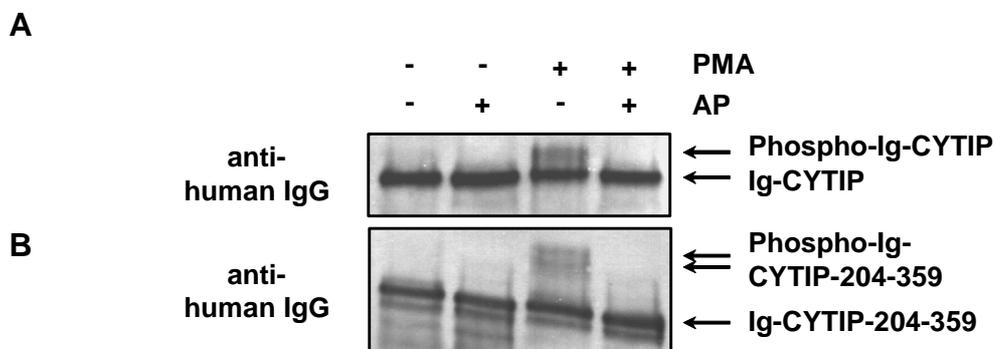
Humane PBL wurden nicht stimuliert, als Kontrolle mit 0,1% DMSO inkubiert, 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA stimuliert oder 30 Minuten mit 50  $\mu$ M MG132 vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten mit PMA stimuliert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit 2F9 analysiert (oberer Blot). Durch MG132 wird die PMA-induzierte CYTIP-Degradation inhibiert. Zusätzlich werden mehrere Banden über der CYTIP-Bande detektiert (Pfeilspitzen), welche phosphorylierte und/oder ubiquitinierte Formen des Proteins darstellen könnten. Bei Cytohesin-1 (Cyh-1) ist keine Modifikation sichtbar (unterer Blot).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass CYTIP nach PMA-Stimulation für einen Abbauweg markiert wird. Die Degradation könnte dabei durch eine Phosphorylierung des Proteins induziert werden.

### 3.2.4 CYTIP wird nach PMA-Stimulation phosphoryliert

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde beobachtet, dass überexprimiertes Ig-CYTIP nach PMA-Stimulation der transfizierten Zellen eine höher migrierende Bande im Western Blot aufweist [Thomas Boehm, unveröffentlicht]. Überexprimiertes N- oder C-terminal Ig-fusioniertes CYTIP wird nach PMA-Stimulation nicht degradiert, was auf eine stabilisierende Wirkung des Fusionsanteils zurückzuführen sein könnte. Das veränderte Laufverhalten des Ig-CYTIP nach PMA-Stimulation deutet auf eine Phosphorylierung des Proteins hin, könnte jedoch auch auf einer anderen posttranslationalen Modifikation beruhen. Um zu prüfen, ob es sich bei der höher migrierenden Bande um eine phosphorylierte Form des Proteins handelt, wurde immunpräzipitiertes Ig-CYTIP mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase wird die höher migrierende Bande entfernt (Abb. 3.19 A). Dies zeigt, dass es sich bei der Modifikation um eine Phosphorylierung handelt. Da die höher migrierende Bande nicht mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörpern detektierbar ist (nicht gezeigt), sollte es sich dabei um eine Serin- und/oder Threonin-

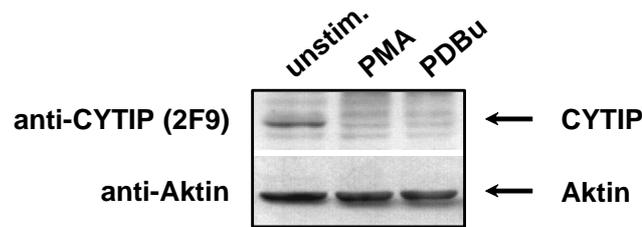
Phosphorylierung handeln. Die Phosphorylierung von CYTIP ist unabhängig von der PDZ-Domäne und der Leucin-Zipper-Region, da auch die isolierte C-terminale Domäne des Proteins (Ig-CYTIP-204-359) nach PMA-Stimulation phosphoryliert wird. In dieser verkürzten Form wird aufgrund der weiteren Auftrennung in der SDS-PAGE sichtbar, dass es sich bei der modifizierten Form um eine Doppelbande handelt, was vermuten lässt, dass das Protein an mehreren Resten phosphoryliert wird. Auch die höher migrierende Doppelbande des immunpräzipitierten Fusionsproteins Ig-CYTIP-204-359 wird durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase entfernt (Abb. 3.19 B). Bei dem Ig-Fusionsanteil tritt nach PMA-Stimulation keine modifizierte Form auf (vergleiche Abb. 3.4).



### Abb. 3.19 *In-vitro*-Dephosphorylierung von Ig-CYTIP

Jurkat E6 Zellen wurden transient mit Ig-CYTIP (A) oder Ig-CYTIP-204-359 (B), einer N-terminal verkürzten Mutante, der die PDZ-Domäne und die Leucin-Zipper-Region fehlen, transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (- PMA) oder für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA stimuliert (+ PMA). Die überexprimierten Fusionsproteine wurden an Protein A-Sepharose präzipitiert und mit 1 µl 50% Glycerin als Kontrolle (- AP) oder mit 1 U Alkalischer Phosphatase (+ AP) behandelt. Durch Dephosphorylierung fallen die höher migrierenden Banden von Ig-CYTIP und Ig-CYTIP-204-359 weg.

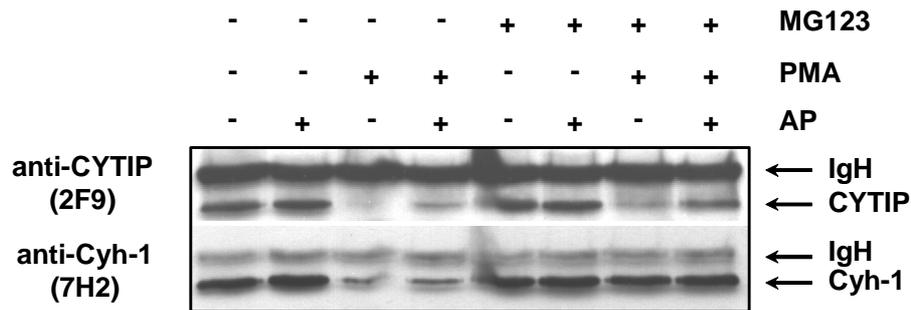
Bei überexprimiertem, Ig-fusioniertem CYTIP wurde keine PMA-induzierte Degradation festgestellt. Dies könnte bedeuten, dass das Protein durch den Ig-Fusionsanteil stabilisiert wird, oder dass die beobachtete Degradation in Jurkat Zellen nicht stattfindet. Um dies zu überprüfen, wurde endogenes CYTIP in PMA-stimulierten Jurkat Zellen analysiert. Wie Abbildung 3.20 zeigt, wird endogenes CYTIP auch in Jurkat Zellen nach PMA-Stimulation degradiert, so dass offenbar der Ig-Fusionsanteil die Degradation des Proteins verhindert.



**Abb. 3.20 CYTIP wird in Jurkat Zellen nach PMA-Stimulation degradiert**

Jurkat E6 Zellen wurden nicht stimuliert (unstim.) oder für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA oder 10 ng/ml PDBu stimuliert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 analysiert (oberer Blot). Endogenes CYTIP wird in Jurkat E6 Zellen nach PMA- bzw. PDBu-Stimulation degradiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

Um zu untersuchen, ob in den durch MG132 angereicherten höher migrierenden Banden (Abb. 3.18) phosphorylierte Formen von CYTIP vorliegen, wurde immunpräzipitiertes endogenes CYTIP mit Alkalischer Phosphatase behandelt (Abb. 3.21). Durch Dephosphorylierung tritt die unmodifizierte Form von CYTIP sowohl in nicht Proteasomen-inhibierten als auch in mit MG132 Proteasomen-inhibierten, PMA-stimulierten Zellen wieder stärker in Erscheinung, was anzeigt, dass die höher migrierenden Banden des endogenen CYTIP, zumindest teilweise, phosphorylierte Formen des Proteins darstellen. In Proteasomen-inhibierten Zellen bleibt die Kopräzipitation von Cytohesin-1 in PMA-stimulierten im Vergleich zu unstimulierten Zellen unverändert, was zeigt, dass die Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst wird. In nicht mit MG132 vorinkubierten Zellen ist kopräzipitiertes Cytohesin-1 dagegen reduziert, da CYTIP hier offenbar phosphorylierungsabhängig degradiert wird.



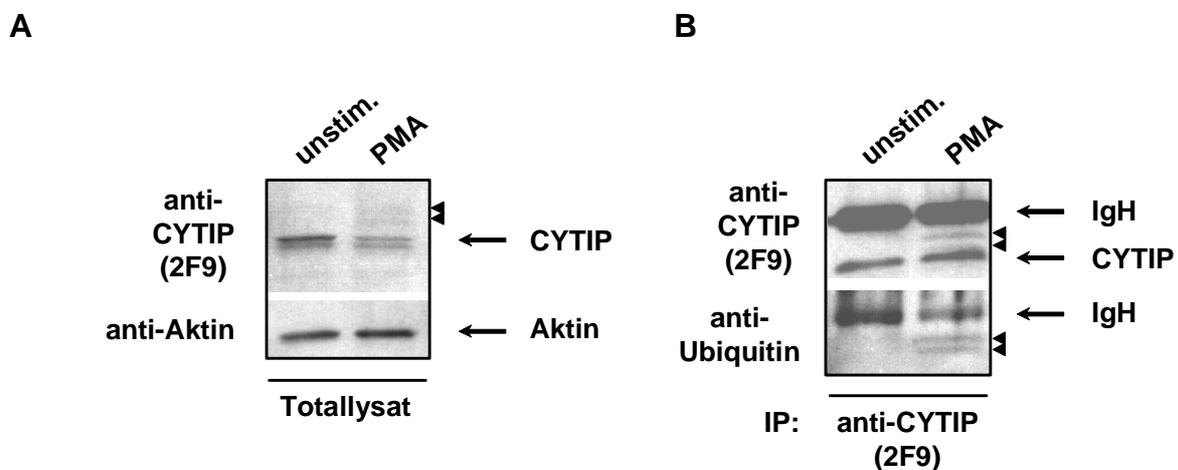
**Abb. 3.21 Durch MG132 wird phosphoryliertes CYTIP stabilisiert**

Humane PBL wurden für 30 Minuten mit 0,1% DMSO (- MG132) bzw. 50  $\mu$ M MG132 (+ MG132) vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 0,1% DMSO (- PMA) bzw. 50 ng/ml PMA (+ PMA) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und endogenes CYTIP mit 2F9 immunpräzipitiert. Immunpräzipitiertes CYTIP wurde für 30 Minuten bei 37°C mit 1  $\mu$ l 50% Glycerin als Kontrolle (- AP) bzw. 1 U Alkalischer Phosphatase (+ AP) behandelt. In unstimulierten Zellen zeigt Behandlung mit AP keinen Effekt (vergleiche Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6, oberer Blot). In PMA-stimulierten Zellen wird die Bande von unmodifiziertem CYTIP durch Behandlung mit AP verstärkt (vergleiche Spuren 3 und 4 bzw. 7 und 8, oberer Blot), was zeigt, dass phosphorylierte Formen vorliegen. In MG132-vorinkubierten Zellen bleibt kopräzipitiertes Cytohesin-1 annähernd unverändert zwischen unstimulierten und PMA-stimulierten Zellen (vergleiche Spuren 7/8 mit 5/6, unterer Blot). Dies zeigt, dass Cytohesin-1 mit nicht sichtbaren, modifizierten Formen von CYTIP kopräzipitiert wurde (Spur 7), bzw. dass CYTIP hier zwar modifiziert, nämlich wie Behandlung mit AP verdeutlicht, phosphoryliert vorliegt, jedoch nicht degradiert wird. In nicht Proteasomen-inhibierten Zellen dagegen ist kopräzipitiertes Cytohesin-1 in PMA-stimulierten Zellen reduziert (vergleiche Spuren 3/4 mit 1/2, unterer Blot), da CYTIP hier sowohl phosphoryliert (vergleiche Spuren 4 und 5 oberer Blot) als auch degradiert wird.

Wie Abbildung 3.21 zeigt, wird unmodifiziertes CYTIP in MG132-vorinkubierten PMA-stimulierten Zellen durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase fast vollständig wiederhergestellt. Diese Beobachtung spricht gegen eine durch Phosphorylierung induzierte zusätzliche Modifikation, wie eine Ubiquitinierung. Desweiteren ist in Totallysaten MG132-behandelter, PMA-stimulierter Zellen mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper keine für eine Poly-Ubiquitinierung typische Banden-„Leiter“ detektierbar. Das Epitop, das durch den monoklonalen anti-CYTIP Antikörper 2F9 detektiert wird, könnte durch eine poly-Ubiquitinierung maskiert werden, so dass ubiquitiniertes CYTIP durch 2F9 möglicherweise schwächer immunpräzipitiert und detektiert wird.

### 3.2.5 CYTIP wird nach PMA-Stimulation ubiquitiniert

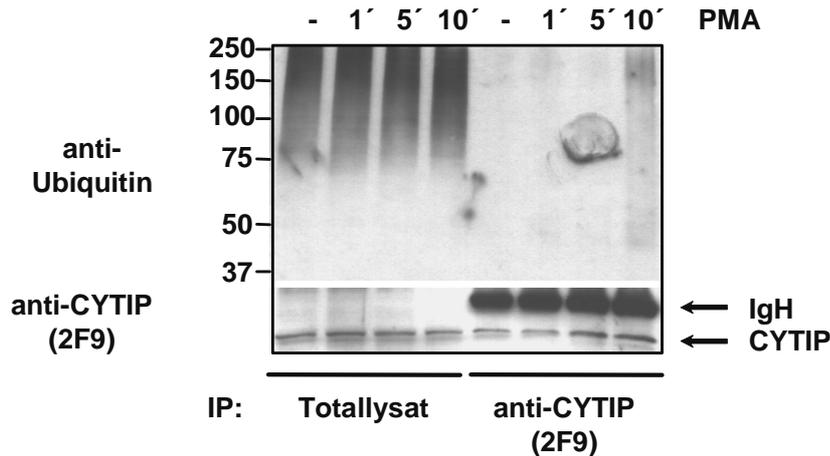
Um zu prüfen, ob phosphoryliertes CYTIP ubiquitiniert wird, wurde immunpräzipitiertes CYTIP aus MG132-behandelten, PMA-stimulierten Zellen mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper analysiert. Für diese Untersuchung wurden lymphoblastoide 721 B-Zellen gewählt, da der PMA-induzierte Abbau des Proteins in dieser Zell-Linie verlangsamt stattfindet. Abbildung 3.22 B zeigt, dass in der Immunpräzipitation zwei Banden oberhalb der CYTIP-Bande sowohl durch 2F9 als auch durch den anti-Ubiquitin Antikörper detektiert werden.



**Abb. 3.22 CYTIP wird in 721 Zellen nach PMA-Stimulation ubiquitiniert**

Lymphoblastoide 721 Zellen wurden für 30 Minuten mit 50  $\mu$ M MG132 vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 0,1% DMSO als Kontrolle (unstim.) bzw. 50 ng/ml PMA stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und CYTIP mit 2F9 immunpräzipitiert. Detektion des Totallysats (A) mit 2F9 (oberer Blot) zeigt einen leichten Abbau des endogenen Proteins sowie zwei höher migrierende Banden (Pfeilspitzen). Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot). Detektion der Immunpräzipitation (B) mit 2F9 zeigt wiederum zwei höher migrierende Banden (oberer Blot, Pfeilspitzen). Beide Banden werden von einem polyklonalen anti-Ubiquitin Antikörper detektiert (unterer Blot, Pfeilspitzen). IgH: schwere Kette des 2F9 Antikörpers.

Zur Untersuchung der CYTIP Ubiquitinierung in PBL wurde der Versuch wie mit 721 Zellen wiederholt. Da CYTIP in PBL jedoch schneller degradiert wird, wurden diese Zellen für kürzere Zeiten mit PMA stimuliert. In der CYTIP Immunpräzipitation aus PBL werden nach 10-minütiger PMA-Stimulation im anti-Ubiquitin Blot hoch migrierende Banden detektiert (Abb. 3.23). In der 2F9-Isotyp-Kontrolle waren keine ubiquitinierten Banden nachweisbar (nicht gezeigt).



**Abb. 3.23 CYTIP-Ubiquitinierung in PBL**

Humane PBL wurden für 30 Minuten mit 50  $\mu$ M MG132 vorinkubiert und anschließend für 10 Minuten mit 0,1% DMSO als Kontrolle (-) bzw. für eine, fünf oder zehn Minuten mit 50 ng/ml PMA stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 durchgeführt. Ubiquitin-Detektion zeigt im Totallysat (links) in allen Spuren hoch migrierende Banden polyubiquitiniertes Proteine. In der CYTIP-Immunpräzipitation (rechts) sind mit dem Ubiquitin-spezifischen Antikörper bei 10-minütiger PMA-Stimulation höher migrierende Banden detektierbar.

### 3.2.6 Die CYTIP-Phosphorylierung ist PKC-abhängig

Phorbolster wie PMA oder PDBu sind Strukturanaloga des Signalmoleküls Diacylglycerol (DAG) und aktivieren Isoenzyme der Proteinkinase C- (PKC-) Familie. Außer der PKCs sind noch weitere Proteine bekannt, die DAG und Phorbolster binden und dadurch aktiviert werden. Hierzu gehören Chimaerine, DAG-Kinasen und RasGRPs [Brose und Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2002; Geiger *et al.*, 2003].

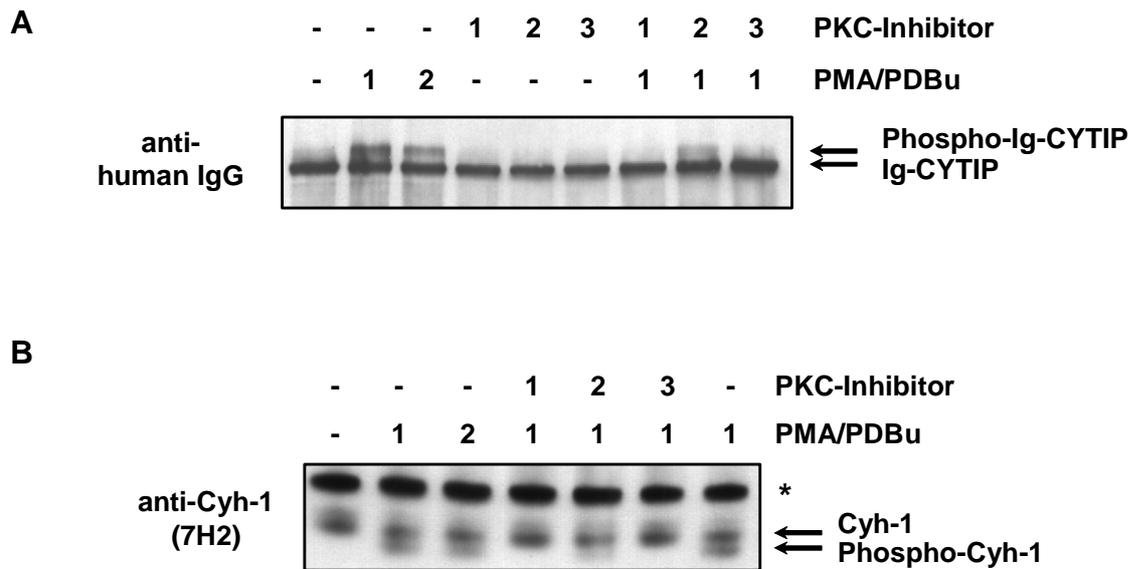
Für die Untersuchung, ob PKCs an der Phosphorylierung von CYTIP beteiligt sind, wurden PKC-Inhibitoren verwendet (Abb. 3.24). Die Familie der PKCs ist in drei Gruppen unterteilt, die „konventionellen“ cPKCs, die „novel“ nPKCs und die „atypischen“ aPKCs. Die Unterteilung der Enzymfamilie erfolgte anhand der für die Aktivierung erforderlichen Kofaktoren. Die Gruppe der cPKCs, bestehend aus PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ <sub>I</sub>,  $\beta$ <sub>II</sub> und  $\gamma$ , benötigt Calcium und DAG für ihre Aktivierung, wohingegen die nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\mu$ ) DAG-abhängig, jedoch Calcium-unabhängig aktiviert werden. Die atypischen aPKCs  $\zeta$  und  $\iota/\lambda$  benötigen weder Calcium noch DAG und sind nicht durch Phorbolster aktivierbar [Spitaler und Cantrell, 2004]. Gö6850 (Bisindolylmaleimid I, GF109203X) ist ein selektiver Inhibitor der c- und nPKCs [Toullec *et al.*, 1991; Martiny-Baron *et al.*, 1993; Hermann-Kleiter *et al.*, 2006] Der

Inhibitor Gö6976 hemmt spezifisch die Calcium-abhängigen cPKC-Isoformen. Die Aktivität der Calcium-unabhängigen Isoenzyme  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  wird selbst bei höheren Konzentrationen im mikromolaren Bereich nicht beeinträchtigt [Martiny-Baron *et al.*, 1993]. Die Spezifität des Inhibitors Novartis-299136 ist noch nicht genau bekannt. Dieser Inhibitor ist derzeit nicht kommerziell erhältlich und wurde von Professor Dr. Gottfried Baier (Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Universität Innsbruck) zur Verfügung gestellt.

Wie Abbildung 3.24 A zeigt, wird die CYTIP-Phosphorylierung durch Gö6850 und Novartis-299136 vollständig blockiert. Der cPKC-spezifische Inhibitor Gö6976 zeigt keinen oder einen wesentlich geringeren Einfluss auf die PMA-induzierte Phosphorylierung von CYTIP. Damit ist gezeigt, dass die CYTIP-Phosphorylierung durch ein nPKC-Isoenzym oder eine nachgeschaltete Kinase katalysiert wird. Ob die Phosphorylierung direkt durch eine nPKC katalysiert wird oder indirekt durch eine nachgeschaltete Kinase, kann hierdurch jedoch nicht geklärt werden.

Das gleiche Inhibitions-Muster wurde für die PMA-induzierte Phosphorylierung von endogenem Cytohesin-1 in Jurkat Zellen beobachtet (Abb. 3.24 B). Cytohesin-1 wird nach PMA-Stimulation an den Serinen 393 und 394 innerhalb der carboxyterminalen polybasischen Region phosphoryliert [Kathrin Obrusnik, unveröffentlicht]. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 kann mittels nicht-denaturierender PAGE detektiert werden [Dierks *et al.*, 2001]. Die phosphorylierte Form bildet hier eine schneller migrierende Bande.

Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 wird durch Gö6850 und Novartis-299136 vollständig inhibiert, wohingegen der cPKC-Inhibitor Gö6976 keinen Einfluss zeigt (Abb. 3.24 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von Cytohesin-1 und CYTIP durch die gleiche Kinase katalysiert werden könnte und somit möglicherweise im gleichen Signalweg induziert wird.



### Abb. 3.24 Die CYTIP- und Cytohesin-1-Phosphorylierung ist nPKC-abhängig

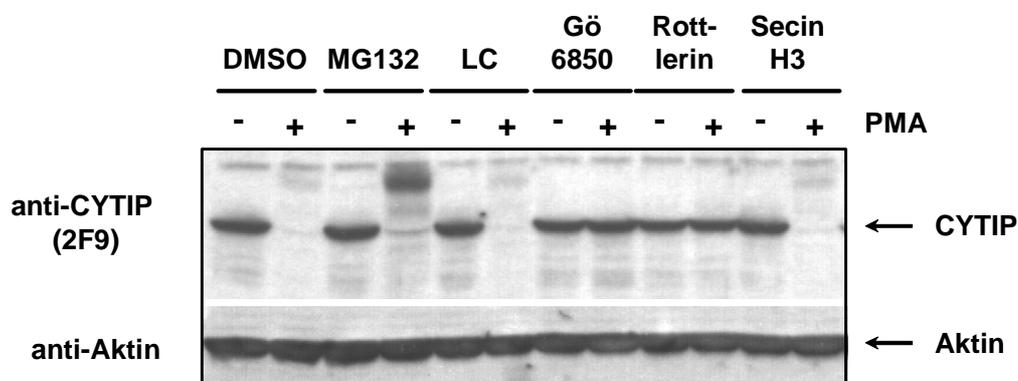
A) Ig-CYTIP wurde in Jurkat E6 überexprimiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten ohne PKC-Inhibitor (- PKC-Inhibitor) oder mit Gö6850 (1), Gö6976 (2) oder Novartis-299136 (3) (je 0,5  $\mu$ M) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen nicht stimuliert (-) oder für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA (1) bzw. 10 ng/ml PDBu (2) stimuliert. Das überexprimierte Fusionsprotein wurde an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit anti-human IgG detektiert. Durch Vorinkubation der Zellen mit Gö6850 oder Novartis-299136 wird die PMA-induzierte Phosphorylierung von Ig-CYTIP inhibiert, wohingegen durch den cPKC-Inhibitor Gö6976 keine Hemmung der Phosphorylierung eintritt.

B) Jurkat E6 Zellen wurden wie unter A) beschrieben mit PKC-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend nicht stimuliert (-) oder für 30 Minuten mit PMA (1) oder PDBu (2) stimuliert. Totallysate der Zellen wurden einer nicht-denaturierenden PAGE unterzogen und im Western Blot mit dem Cytohesin-1-spezifischen Antikörper 7H2 analysiert. Phosphoryliertes Cytohesin-1 bildet eine schneller migrierende Bande in der nativen PAGE. Durch die Inhibitoren Gö6850 und Novartis-299136, nicht jedoch durch Gö6976, wird die Phosphorylierung von endogenem Cytohesin-1 unterbunden. Mit „\*“ ist eine unspezifische Bande markiert.

### 3.2.7 Die Degradation von CYTIP ist PKC $\delta$ - oder PKC $\theta$ -abhängig

Rottlerin, auch bekannt als Mallotoxin, ist ein Inhibitor der PKC $\delta$  ( $IC_{50}$  = 3-6  $\mu$ M) und PKC $\theta$ . Die Aktivität der Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  ( $IC_{50}$  = 30-42  $\mu$ M) sowie  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\zeta$  ( $IC_{50}$  = 80-100  $\mu$ M) wird erst bei höheren Konzentrationen inhibiert [Gschwendt *et al.*, 1994]. Wie aus Abbildung 3.25 hervorgeht, wird der PMA-induzierte Abbau von CYTIP durch Rottlerin wie durch den c- und nPKC Inhibitor Gö6850 vollständig unterbunden. Die Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität durch den Inhibitor Secin H3 zeigt keinen Einfluss auf die Degradation von CYTIP. Der Proteasomen-Inhibitor MG132 bewirkt, wie bereits zuvor gezeigt (Abb. 3.18), eine partielle Inhibition der Degradation, wobei es zu einer Anreicherung höher migrierender Banden kommt.

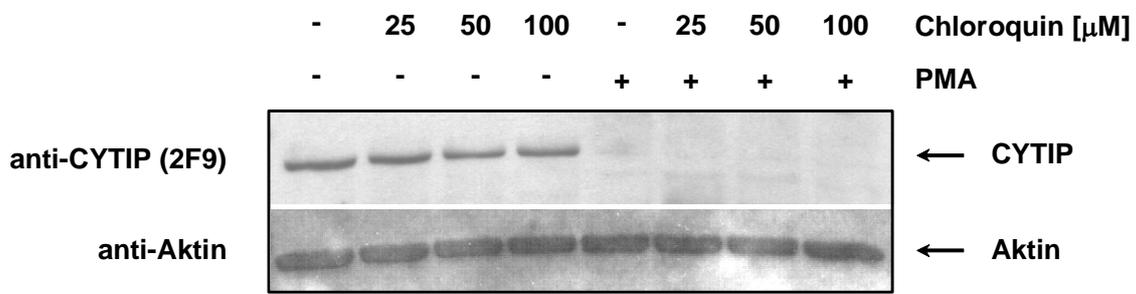
MG132 inhibiert reversibel proteasomale Degradation, allerdings werden durch MG132 auch Calpain, Cathepsine und  $\gamma$ -Secretase gehemmt [Kisselev und Goldberg, 2001; Skovronsky *et al.*, 2000]. Aufgrund dieser relativ geringen Spezifität des Inhibitors MG132 für proteasomale Degradation wurde der Inhibitor Lactacystin getestet (Abb. 3.25). Lactacystin ist ein hoch spezifischer Inhibitor der 20S katalytischen „core“-Einheit des 26S Proteasoms. Durch kovalente Bindung an das N-terminale Threonin der katalytischen Domäne einiger  $\beta$ -Untereinheiten inhibiert Lactacystin irreversibel die Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms. Calpain, Cathepsin B, Chymotrypsin, Trypsin und Papain werden selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M nicht inhibiert [Fenteany *et al.*, 1995]. Mit dem Proteasomen-Inhibitor Lactacystin wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M und einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten keine Inhibition der PMA-induzierten CYTIP-Degradation beobachtet (Abb. 3.25). Da Lactacystin zunächst intrazellulär umgesetzt werden muss, könnte die Vorinkubation von 30 Minuten möglicherweise zu kurz angesetzt sein, um eine Inhibition der CYTIP-Degradation durch Lactacystin feststellen zu können.



**Abb. 3.25 Die CYTIP-Degradation wird durch Rottlerin blockiert**

Humane PBL wurden für 30 Minuten mit 0,5% DMSO als Kontrolle, 50  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M Lactacystin (LC), 0,5  $\mu$ M Gö6850, 20  $\mu$ M Rottlerin oder 10  $\mu$ M SecinH3 vorinkubiert und anschließend mit 0,1% DMSO versetzt (-) bzw. für 30 Minuten mit 50 ng/ml PMA (+) stimuliert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit 2F9 analysiert (oberer Blot). Durch den Proteasomen-Inhibitor MG132 wird die CYTIP-Degradation partiell inhibiert, wobei eine Anreicherung höher migrierender Banden auftritt. Der Proteasomen-Inhibitor Lactacystin (LC) bewirkt dagegen keine Inhibition. Durch den PKC $\delta$ / $\theta$ -spezifischen Inhibitor Rottlerin wird die PMA-induzierte CYTIP-Degradation wie durch Gö6850 vollständig blockiert. Der Cytohesin-GEF-Inhibitor Secin H3 zeigt keinen Einfluss auf die Degradation.

Nachdem die PMA-induzierte Degradation von CYTIP durch den Inhibitor Lactacystin zumindest unter den gewählten Bedingungen nicht inhibiert wird, wurde geprüft, ob die Degradation des Proteins lysosomal erfolgt. Lysosomale Degradation kann durch schwache Basen wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder Chloroquin gehemmt werden, wobei die Inhibition bereits nach wenigen Minuten durch Anstieg des intralysosomalen pH eintritt [Ohkuma und Poole, 1978]. Für die Untersuchung wurden PBL für 30 Minuten mit 25, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  Chloroquin vorinkubiert und anschließend mit PMA stimuliert. Wie aus Abbildung 3.26 hervorgeht, wird die PMA-induzierte Degradation durch die Behandlung der Zellen mit Chloroquin nicht inhibiert, was zeigt, dass CYTIP sehr wahrscheinlich nicht lysosomal degradiert wird.

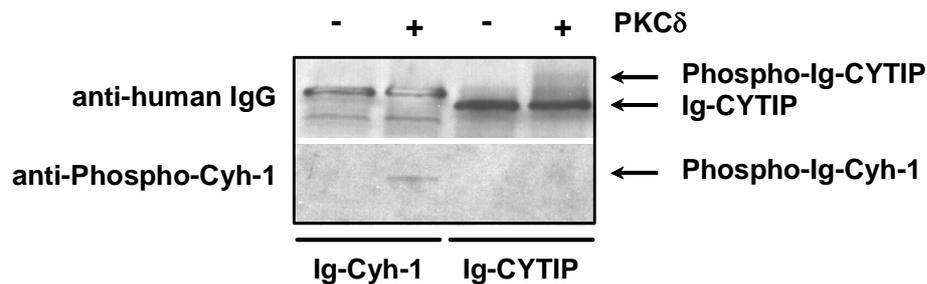


### Abb. 3.26 Die CYTIP-Degradation wird durch Chloroquin nicht inhibiert

Humane PBL wurden für 30 Minuten ohne (-) oder mit 25, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  Chloroquin vorinkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 0,1% DMSO als Kontrolle (-) bzw. 50 ng/ml PMA stimuliert (+). Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit 2F9 analysiert (oberer Blot). Die PMA-induzierte CYTIP-Degradation wird durch Chloroquin nicht inhibiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

### 3.2.8 CYTIP wird *in vitro* durch PKC $\delta$ phosphoryliert

Anhand der PKC-Inhibitoren kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob die PMA-induzierte Phosphorylierung von Ig-CYTIP direkt durch eine PKC oder durch eine nachgeschaltete Kinase katalysiert wird. Cytohesin-1 wird *in vitro* durch PKC $\delta$  phosphoryliert [Dierks *et al.*, 2001]. Daher wurde im folgenden untersucht, ob auch Ig-CYTIP *in vitro* durch PKC $\delta$  phosphoryliert werden kann (Abb. 3.27). Als Positiv-Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion wurde Ig-Cytohesin-1 verwendet. Die Phosphorylierung des Ig-Cytohesin-1 kann im Gegensatz zu unfusioniertem Cytohesin-1 nicht in der nativen PAGE nachgewiesen werden, da die Auftrennung zwischen phosphorylierter und unphosphorylierter Form aufgrund der Größe des Ig-Fusionsanteils zu gering ist. Daher wurde in diesem Versuchsansatz die Phosphorylierung des Ig-Cytohesin-1 mit einem Phospho-Cytohesin-1-spezifischen Antikörper nachgewiesen, der am Serin 394 phosphoryliertes Cytohesin-1 erkennt.



**Abb. 3.27** *In-vitro* Phosphorylierung des Ig-CYTIP durch PKC $\delta$

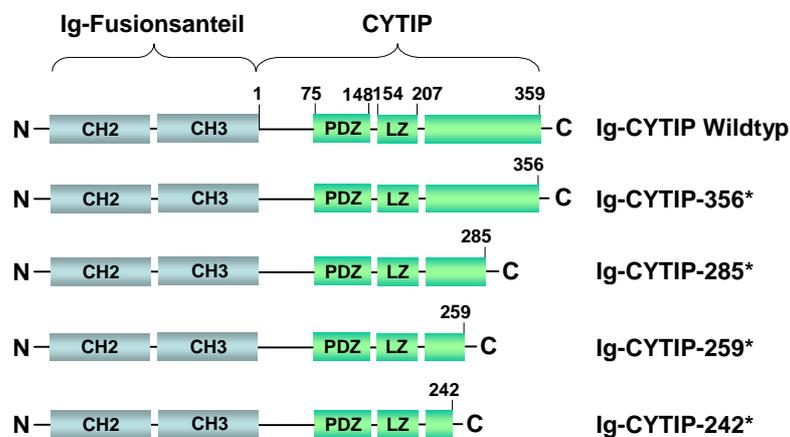
Ig-Cytohesin-1 (Ig-Cyh-1) als Positiv-Kontrolle und Ig-CYTIP wurden in Jurkat E6 Zellen über-exprimiert, an Protein A-Sepharose präzipitiert und 30 Minuten ohne (-) bzw. mit PKC $\delta$  (+) inkubiert. Die Detektion mit anti-human IgG (oberer Blot) zeigt eine höher migrierende Bande des Ig-CYTIP nach Behandlung mit PKC $\delta$ . Die Detektion mit dem anti-Phospho-Cytohesin-1 Antikörper (Ser394) zeigt phosphoryliertes Ig-Cytohesin-1 nach Behandlung mit PKC $\delta$  (unterer Blot).

Durch die *in-vitro*-Phosphorylierung von Ig-CYTIP entsteht eine, mit anti-human IgG detektierbare, höher migrierende Bande im Western Blot (Abb. 3.27). Die Laufhöhe dieser Bande entspricht der der phosphorylierten Form, die durch PMA-Stimulation transfizierter Zellen entsteht. Daher ist anzunehmen, dass bei der *in-vitro*-Phosphorylierung mit PKC $\delta$  die gleiche Phosphorylierung erfolgt, wie in Zellen durch PMA-Stimulation.

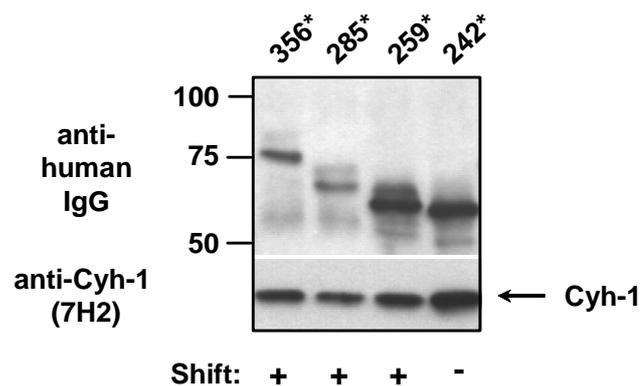
### 3.2.9 Identifizierung der CYTIP-Phosphorylierungsstellen

Da die carboxyterminale Domäne von CYTIP, CYTIP-204-359, nach PMA-Stimulation phosphoryliert wird (Abb. 3.19 B), sollten in diesem Bereich Phosphorylierungsstellen liegen. Die in Abbildung 3.28 A schematisch dargestellten, C-terminalen Deletionsmutanten von Ig-CYTIP wurden verwendet, um zu prüfen, ab welcher Position die Phosphorylierung nicht mehr auftritt. Abbildung 3.28 B zeigt, dass die Deletionsmutante Ig-CYTIP 259\* noch phosphoryliert wird, während Ig-CYTIP 242\* keine höher migrierende Bande mehr bildet.

A



B



#### Abb. 3.28 Deletionsmutanten zur Eingrenzung der Phosphorylierungsstellen

A) Schematische Darstellung des Wildtyps und C-terminaler Deletionsmutanten des Ig-CYTIP. B) Jurkat E6 Zellen wurden mit den unter A) dargestellten Mutanten transient transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit PMA stimuliert. Die überexprimierten Fusionsproteine wurden an Protein A-Sepharose präzipitiert und im Western Blot mit anti-human IgG analysiert. Ig-CYTIP 242\* zeigt keine phosphorylierte Form (oberer Blot). Die Interaktion mit Cytohesin-1, die durch die Leucin-Zipper-Region (LZ) vermittelt wird, ist in keiner der Mutanten beeinträchtigt, da endogenes Cytohesin-1 mit allen Deletionsmutanten kopräzipitiert (unterer Blot).

Im Bereich zwischen Aminosäure 242 und 259 könnten somit Phosphorylierungsstellen liegen. Anhand dieses Ergebnisses kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung des Ig-CYTIP 242\* aufgrund einer Missfaltung oder durch die Zerstörung eines Bindemotivs der entsprechenden Kinase entfällt. Desweiteren könnte durch die C-terminale Deletion die Interaktion mit einem für die Phosphorylierung benötigten dritten Protein fehlen.

Zur Identifizierung der Phosphorylierungsstellen wurde die CYTIP-Aminosäuresequenz mit dem Programm NetPhos 2.0 analysiert. Da nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass CYTIP nicht direkt durch eine PKC, sondern durch eine nachgeschaltete Kinase phosphoryliert wird, wurde die Analyse nicht für spezifische Kinasen durchgeführt, sondern ohne Einschränkung. Die CYTIP-Sequenz enthält insgesamt 50 Serine und 22 Threonine. Abbildung 3.29 zeigt die Analyse der CYTIP-Aminosäure-Sequenz durch das Programm. Danach zeigen 25 Serine und 4 Threonine eine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit größer 0,5.

**A**

MSLQRLQLQHS	SNGNLADFC	GPAYSSYSTL	TGSLTMNDNR	RIQMLADTVA	TLPRGRKQLA	60
LTRSSSLDF	SWSQRKLVTV	EKQDNETFGF	EIQSYRPNQ	NACSEMFTL	ICKIQEDSPA	120
HCAGLQAGDV	LANINGVSTE	GFTYKQVVDL	IRSSGNLLTI	ETLNGTMILK	RTELEAKLQV	180
LKQTLKQKVV	EYRSLQLQEH	RL LHGDAANC	PSLENMDLDE	LSLFGPLPGP	GPALVDRNRL	240
SSSSCKSWL	SSMTMSEDG	YQTCVSEDSS	RGAFSRQTST	DDECIFPKEG	DDFLRRSSSR	300
RNRSISNTSS	GSMSPLEWGN	LSSMFGTLPR	KSRKGSVRKQ	LLKFIPGLHR	AVEEEESRF	359
.....	.....	.....	.....	.....	.....	60
....SS.S..	S.S.....	.....	.....	.....	.....	120
.....	.....	.....	.....	.....	.....	180
...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	240
SS.SS..S..	.S.....	..T..S..SS	.....TST	.....	SSS.	300
...S.S..SS	...S.....	.....	.S..S.....	.....	.....	359

Putative Phosphorylierungsstellen: Serine: 25 Threonine: 4

**B**

Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten der Serine

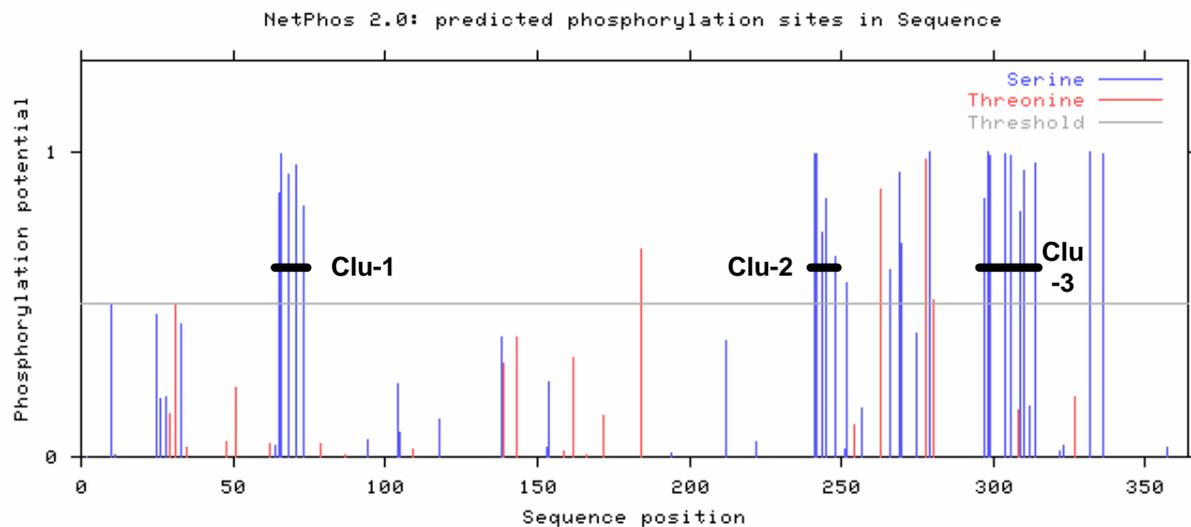
Pos	Context	Score	Pred	Pos	Context	Score	Pred	Pos	Context	Score	Pred
2	---MSLQRL	0.003	.	138	INGVSTEGF	0.395	.	275	RGAFSRQTS	0.405	.
10	LLQHSSNGN	0.496	.	153	DLIRSSGNL	0.031	.	279	SRQTSTDDE	0.998	*S*
11	LQHSSNGNL	0.007	.	154	LIRSSGNLL	0.244	.	297	FLRRSSRRR	0.847	*S*
25	GPAYSSYST	0.469	.	194	VEYRSLQLQ	0.013	.	298	LRRSSRRRN	0.998	*S*
26	PAYSSYSTL	0.189	.	212	ANCPLENM	0.379	.	299	RRSSRRNR	0.990	*S*
28	YSSYSTLTG	0.194	.	222	LDELSLFGP	0.048	.	304	RNRSISNT	0.995	*S*
33	TLTGSLTMN	0.434	.	241	RNRLSSESS	0.996	*S*	306	NRSISNTSS	0.989	*S*
64	ALTRSSSL	0.034	.	242	NRLSSESSC	0.992	*S*	309	ISNTSSGSM	0.806	*S*
65	LTRSSSLSD	0.862	*S*	244	LSSESSCKS	0.733	*S*	310	SNTSSGSM	0.939	*S*
66	TRSSSLDF	0.996	*S*	245	SSESSCKSW	0.845	*S*	312	TSSGMSPL	0.168	.
68	SSSLDFSW	0.924	*S*	248	SSCKSWLSS	0.657	*S*	314	SGMSPLWE	0.962	*S*
71	LSDFSWSQR	0.955	*S*	251	KSWLSSMTM	0.022	.	322	EGNLSSMFG	0.019	.
73	DFSWSQRKL	0.821	*S*	252	SWLSSMTMD	0.573	*S*	323	GNLSSMFGT	0.037	.
94	FEIQSYRQP	0.054	.	257	MTMSEDGY	0.160	.	332	LPRKSRKGS	0.998	*S*
104	QNACSEMFT	0.238	.	266	QTCVSEDSS	0.614	*S*	336	SRKGSVRKQ	0.996	*S*
105	NACSEMFT	0.081	.	269	VSEDSSRGA	0.930	*S*	357	EEEEERF--	0.028	.
118	IQEDSPAHC	0.122	.	270	SEDSSRGAF	0.696	*S*				

**C**

Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten der Threonine

Pos	Context	Score	Pred	Pos	Context	Score	Pred
29	SSYSTLTGS	0.139	.	159	GNLLTIETL	0.021	.
31	YSTLTGSLT	0.497	.	162	LTIETLNGT	0.326	.
35	TGSLTMNDN	0.033	.	166	TLNGTMILK	0.006	.
48	MLADTVATL	0.050	.	172	ILKRTELEA	0.134	.
51	DTVATLPRG	0.225	.	184	VLKQTLKQK	0.681	*T*
62	QLALTRSSS	0.042	.	254	LSSMTMDSE	0.106	.
79	RKLVTVEKQ	0.044	.	263	DGYQTCVSE	0.875	*T*
87	QDNETFGFE	0.006	.	278	FSRQTSTDD	0.974	*T*
109	SEMFTLICK	0.025	.	280	RQTSTDDEC	0.517	*T*
139	NGVSTEGFT	0.306	.	308	SISNTSSGS	0.156	.
143	TEGFTYKQV	0.390	.	327	SMFGTLPRK	0.199	.

D



**Abb. 3.29 Analyse der Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten der CYTIP Serine und Threonine mit NetPhos 2.0**

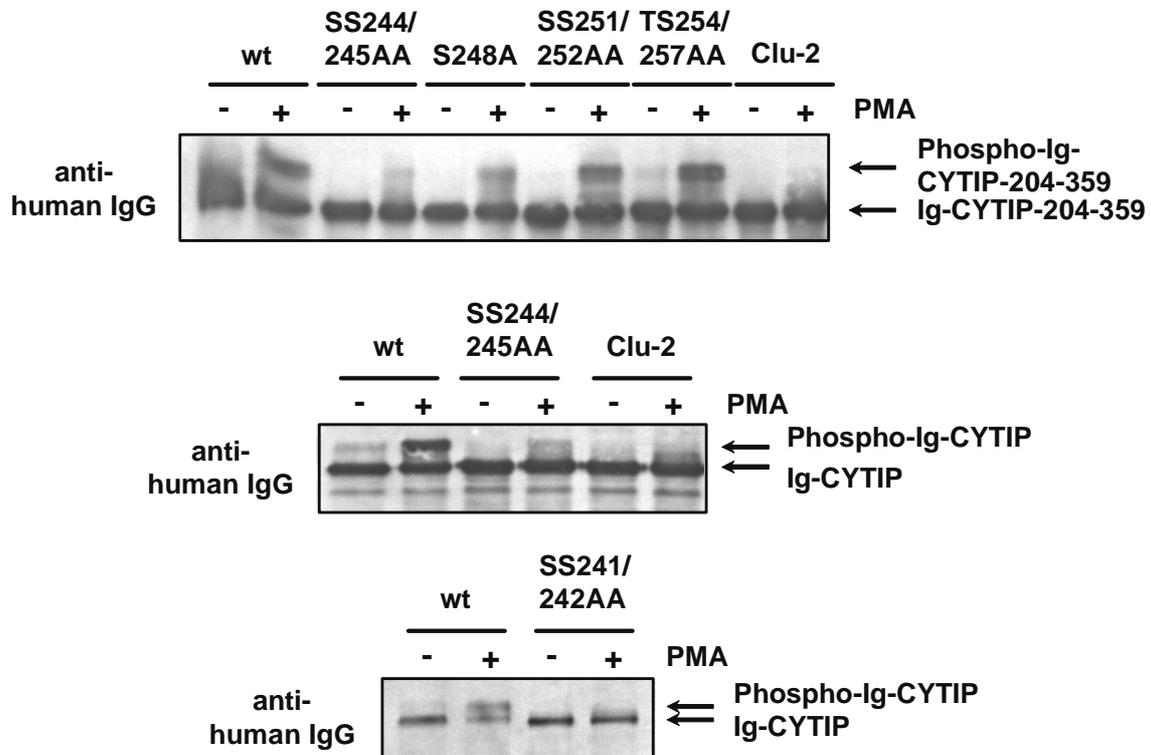
A) Serine und Threonine mit einer Phosphorylierungswahrscheinlichkeit  $> 0,5$  sind in der CYTIP-Aminosäuresequenz rot hervorgehoben, bzw. darunter einzeln dargestellt. Blockweise gegen Alanine ausgetauschte Serine (65/66/68/71/73 und 241/242/244/245/248 sowie 297/298/299/304/306/309/310/314) sind grau unterlegt. B) Tabelle der vorhergesagten Phosphorylierungswahrscheinlichkeit aller enthaltenen Serine. Serine mit Phosphorylierungswahrscheinlichkeit  $> 0,5$  sind mit \*S\* gekennzeichnet. Die blockweise gegen Alanine ausgetauschten Serine sind schwarz eingrahmt. C) Tabelle der vorhergesagten Phosphorylierungswahrscheinlichkeit aller enthaltenen Threonine. Threonine mit Phosphorylierungswahrscheinlichkeit  $> 0,5$  sind mit \*T\* gekennzeichnet. D) Serine und Threonine sind mit ihrer jeweiligen Position und Phosphorylierungswahrscheinlichkeit als Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die in A) und B) hervorgehobenen Serin-Cluster sind durch Querbalken markiert und mit Clu-1, -2 und -3 bezeichnet.

Die Serine und Threonine mit hoher Phosphorylierungswahrscheinlichkeit ( $> 0,8$ ) liegen großenteils eng benachbart in „Clustern“ vor. Eines dieser Cluster liegt im N-terminalen Bereich und besteht aus den Serinen 65, 66, 68, 71 und 73 (Abb. 17 D, Clu-1). Die Mutante Ig-CYTIP-Clu-1, in der diese fünf Serine gegen Alanine ausgetauscht sind, zeigt jedoch keine veränderte Phosphorylierung (nicht gezeigt).

Alle anderen putativen Phosphorylierungsstellen liegen im C-terminalen Drittel der Sequenz. Die blockweise Substitution der Serine 297, 298, 299, 304, 306, 309, 310 und 314 (Abb. 17 D, Clu-3) gegen Alanine zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die PMA-induzierte Phosphorylierung (nicht gezeigt).

In der Region um die Aminosäuren 242 bis 259, in der nach der Analyse der C-terminalen Deletionsmutanten Phosphorylierungsstellen enthalten sein müssten, liegen fünf benachbarte Serine (241, 242, 244, 245 und 248) mit hoher Phosphorylierungswahrscheinlichkeit (Abbildung 17 D, Clu-2). Das Cluster dieser

fünf Serine wurde in Voll-Längen- und N-terminal verkürztem (CYTIP-204-359) CYTIP gegen Alanine ausgetauscht. Die resultierenden Mutanten wurden mit CYTIP-204-359-Clu-2 und CYTIP-Clu-2 bezeichnet.



### Abb. 3.30 CYTIP-Phosphorylierungsmutanten

Wildtyp (wt) und verschiedene Serin/Threonin-Mutanten von Ig-CYTIP oder Ig-CYTIP-204-359 wurden in Jurkat E6 Zellen überexprimiert, aus unstimulierten (-) oder PMA-stimulierten (+) Zellen präzipitiert und im Western Blot mit anti-human IgG analysiert. Die verkürzte und Voll-Längen Cluster-Mutante Clu-2, in der die Serine 241, 242, 244, 245 und 248 gegen Alanine ausgetauscht sind, zeigt keine phosphorylierte Form. Austausch der weiter C-terminal gelegenen Serine 251/252 sowie von Threonin 254/Serin 257 gegen Alanin hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung. Mutation der Serine 244/245 sowie 248 schwächen die Phosphorylierung. Ig-CYTIP-SS241/242AA weist wie die Cluster-Mutante Clu-2 keine phosphorylierte Form auf.

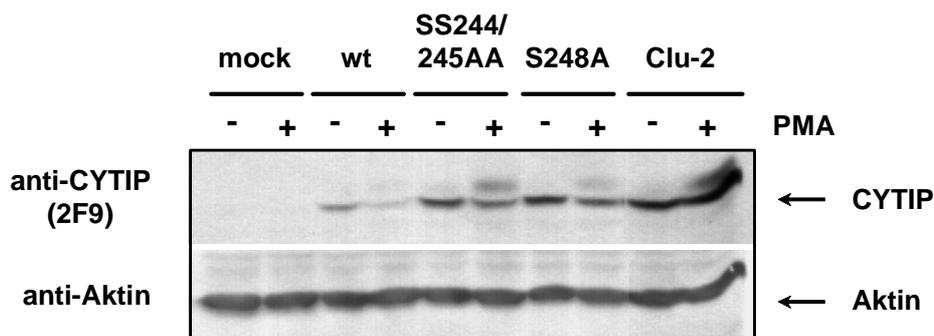
Wie Abbildung 3.30 zeigt, weisen die Clu-2 Mutanten gegenüber dem Wildtyp eine stark abgeschwächte Phosphorylierung auf. Um die phosphorylierten Serine innerhalb des Clusters zu identifizieren, wurden verschiedene Doppel- und Einzelmutanten getestet. Die Substitution der weiter C-terminal gelegenen Serine 251 und 252, sowie des Threonins 254 und des Serins 257 gegen Alanine zeigt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung. Die Mutationen SS244/245AA und S248A führen zu einer Reduktion der Phosphorylierung, während bei der SS241/242AA Mutante die Phosphorylierung wie bei der Cluster Mutante Clu-2 fast vollständig

entfällt (Abb. 3.30). Somit stellen die Serine 241 und/oder 242 die hauptsächlich phosphorylierten Reste dar.

### 3.2.10 Die Mutante CYTIP-Clu-2 wird nicht degradiert

Der PKC-Inhibitor Gö6850, der die Phosphorylierung des Ig-CYTIP inhibiert, blockiert auch den PMA-induzierten Abbau des endogenen Proteins. Demnach ist die CYTIP Degradation abhängig von einer PKC-vermittelten Phosphorylierung (Abb. 3.25).

Um zu prüfen, ob die Degradation von einer Phosphorylierung von CYTIP selbst abhängt, wurde die Degradation der phosphorylierungsdefizienten Mutanten untersucht. Da der Ig-Fusionsanteil mit dem PMA-induzierten Abbau interferiert, wurden die Mutanten ohne Fusionsanteil in Jurkat E6 Zellen exprimiert (Abb. 3.31).



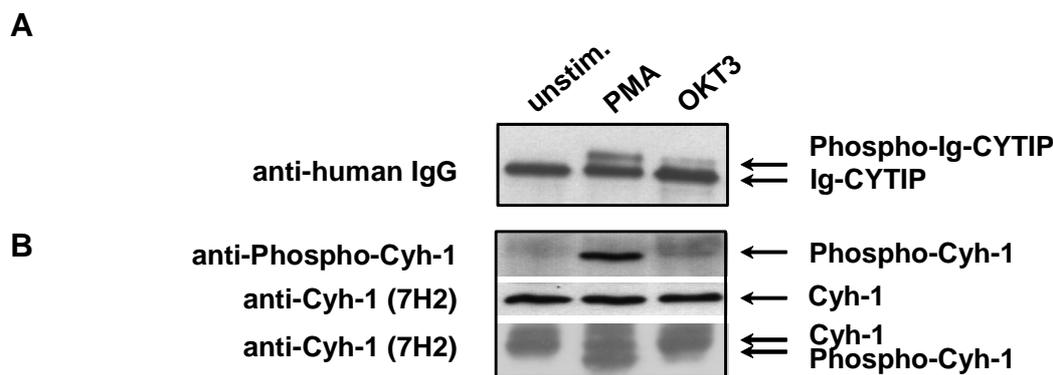
### Abb. 3.31 Die Mutante CYTIP-Clu-2 wird nicht degradiert

Jurkat E6 Zellen wurden transient mit leerem Vektor (mock), CYTIP Wildtyp (wt), oder den CYTIP-Mutanten SS244/245AA, S248A oder Clu-2 transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (-) oder mit PMA (+) stimuliert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 analysiert (oberer Blot). Überexprimiertes CYTIP wird nach PMA-Stimulation reduziert. Die drei Mutanten werden stärker exprimiert als der Wildtyp. In den beiden Mutanten SS244/245AA und S248A, in welchen die Phosphorylierung der Ig-fusionierten Konstrukte reduziert ist, ist auch der induzierte Abbau inhibiert. Die Mutante Clu-2, die keine Phosphorylierung zeigt, wird nicht degradiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

Die phosphorylierungsdefiziente Mutante Clu-2, in der die Serine 241, 242, 244, 245 und 248 durch Alanine ersetzt sind, wird nach PMA-Stimulation nicht degradiert (Abb. 3.31). In der Mutante wird nach PMA-Stimulation dennoch eine höher migrierende Bande detektiert, die möglicherweise durch alternative Phosphorylierung hervorgerufen wird, durch welche die Degradation des Proteins jedoch nicht induziert wird.

### 3.2.11 CYTIP und Cytohesin-1 werden nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation phosphoryliert

Durch Signale des T-Zell-Rezeptors wird die Aktivierung von Isoenzymen der PKC-Familie ausgelöst. Daher wurde im folgenden untersucht, ob die Phosphorylierung von CYTIP und Cytohesin-1 durch Stimulation des TCR induziert wird. Wie in Abbildung 3.32 gezeigt, wird die Phosphorylierung von überexprimiertem Ig-CYTIP durch OKT3-vermittelte Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors induziert. Die OKT3-induzierte Phosphorylierung ist im Vergleich zur PMA-induzierten jedoch schwächer. Die Phosphorylierung des endogenen Cytohesin-1 ist wie aus Abbildung 3.32 hervorgeht ebenfalls durch TCR-Quervernetzung induzierbar. Das Signal ist gegenüber der PMA-induzierten Phosphorylierung allerdings wesentlich schwächer. Die OKT3-induzierte Phosphorylierung von Cytohesin-1 ist darüber hinaus sehr transient und konnte bei Stimulationszeiten länger als 15 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

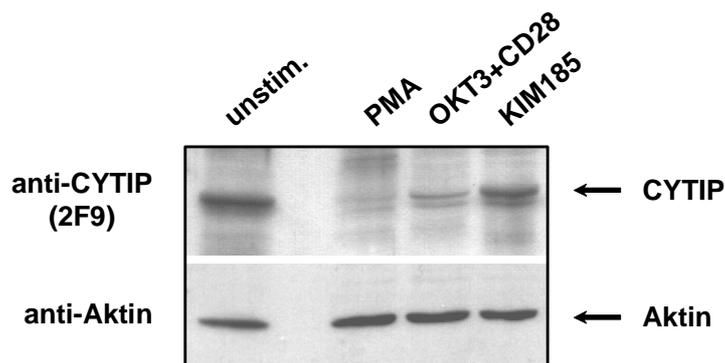


### Abb. 3.32 Cytohesin-1 und CYTIP werden nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation phosphoryliert

A) Ig-CYTIP wurde in Jurkat E6 Zellen überexprimiert und aus nicht stimulierten (unstim.) oder 30 Minuten mit PMA (50 ng/ml) bzw. OKT3 (2  $\mu$ g/ml) stimulierten Zellen an Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Phosphorylierung von Ig-CYTIP wird durch OKT3-Stimulation induziert, ist jedoch im Vergleich zur PMA-induzierten Phosphorylierung schwächer. B) Endogenes Cytohesin-1 wurde aus unstimulierten, 30 Minuten mit PMA, oder 10 Minuten mit OKT3 stimulierten Jurkat Zellen immunpräzipitiert und im Western Blot mit einem Phospho-Cytohesin-1-spezifischen Antikörper analysiert (oberer Blot). In OKT3-stimulierten Zellen ist eine schwache Bande von phosphoryliertem Cytohesin-1 detektierbar, wohingegen keine Phosphorylierung in unstimulierten Zellen vorliegt. Zur Präzipitationskontrolle wurde Cytohesin-1 nach „Stripping“ der Membran mit 7H2 detektiert (mittlerer Blot). Parallel wurde die Phosphorylierung von Cytohesin-1 mittels nativer PAGE nachgewiesen. Nach OKT3-Stimulation ist eine schwache Phosphorylierung von Cytohesin-1 detektierbar (unterer Blot).

### 3.2.12 Die CYTIP-Degradation ist durch TCR-Stimulation induzierbar

Die Phosphorylierung von überexprimiertem Ig-CYTIP wird durch PMA-Stimulation wie auch durch OKT3-vermittelte Quervernetzung des TCR induziert (Abb. 3.32), so dass vermutet wurde, dass auch die Degradation des endogenen Proteins in humanen PBL durch TCR-Stimulation ausgelöst wird. Die Phosphorylierung des überexprimierten Ig-CYTIP wird durch 30-minütige Stimulation transfizierter Zellen mit 2 µg/ml OKT3 in Kulturmedium induziert. Unter diesen Stimulationsbedingungen wurde in PBL keine Reduktion oder Modifikation des endogenen CYTIP beobachtet. Auch bei längeren (2 Stunden, 16 Stunden) oder kürzeren Stimulationszeiten (1, 5 oder 10 Minuten) wurde keine Veränderung festgestellt. Auch zusätzliche kostimulatorische Signale durch CD28- oder LFA-1-Quervernetzung führten nicht zu einer Degradation des Proteins. Die Stimulation der Zellen in Serum-freiem HBSS über 16 Stunden mit OKT3 und anti-CD28 resultiert in einer Reduktion von CYTIP (Abb. 3.33).

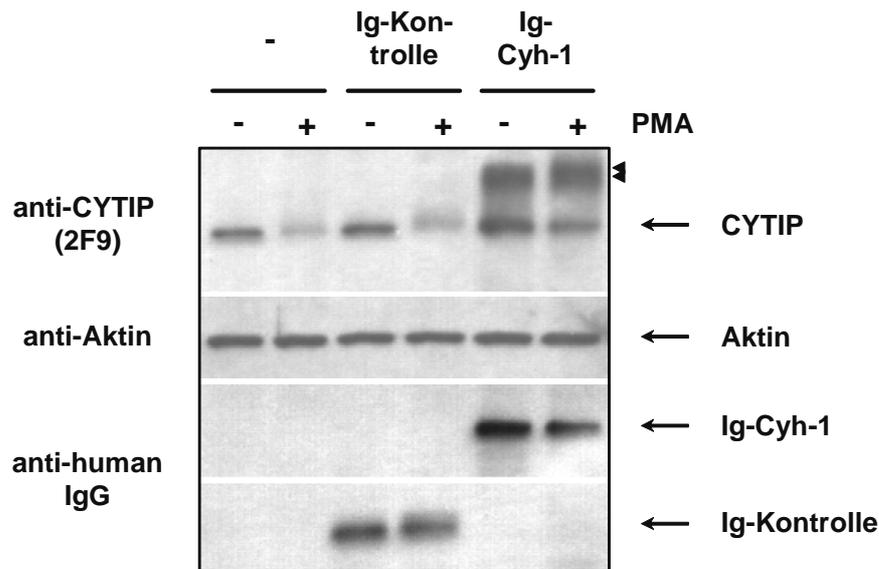


**Abb. 3.33** Durch OKT3/CD28 Stimulation kann die Degradation von CYTIP ausgelöst werden

Humane PBL wurden für 16 Stunden in HBSS ohne Antikörper (unstim.) oder mit OKT3 und anti-CD28 (je 2 µg/ml) oder mit dem LFA-1-aktivierenden anti-CD18 Antikörper KIM185 (1,6 µg/ml) inkubiert, bzw. 30 Minuten mit PMA stimuliert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit 2F9 analysiert (oberer Blot). Durch OKT3/CD28-Stimulation wird ein Abbau von CYTIP induziert, wohingegen durch KIM185 keine Reduktion eintritt. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

### **3.2.13 CYTIP wird durch die Überexpression von Cytohesin-1 stabilisiert**

Es wurde festgestellt, dass die PMA-induzierte Phosphorylierung von Ig-CYTIP unabhängig von der Interaktion mit Cytohesin-1 ist, da auch die isolierte C-terminale Domäne des Proteins, die nicht mit Cytohesin-1 interagiert, phosphoryliert wird (Abb. 3.19). Es kann dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Cytohesin-1 die Phosphorylierung und die daraus resultierende Degradation beeinflussen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden CYTIP und Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen koexprimiert. Wie aus Abbildung 3.34 hervorgeht, wird CYTIP in Cytohesin-1 kotransfizierten Zellen stärker exprimiert als in der Kontrolle und die PMA-induzierte CYTIP-Degradation ist hier reduziert. Darüber hinaus ist sowohl in unstimulierten als auch PMA-stimulierten Zellen phosphoryliertes CYTIP angereichert. Dieses Resultat zeigt, dass CYTIP sowie phosphoryliertes CYTIP durch Cytohesin-1 stabilisiert werden. Dass Cytohesin-1 auch mit phosphoryliertem CYTIP interagiert, wurde bereits zuvor durch Kopräzipitationsanalysen gezeigt (Abb. 3.21). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cytohesin-1 phosphoryliertes CYTIP stabilisiert oder möglicherweise die Phosphorylierung selbst induziert.



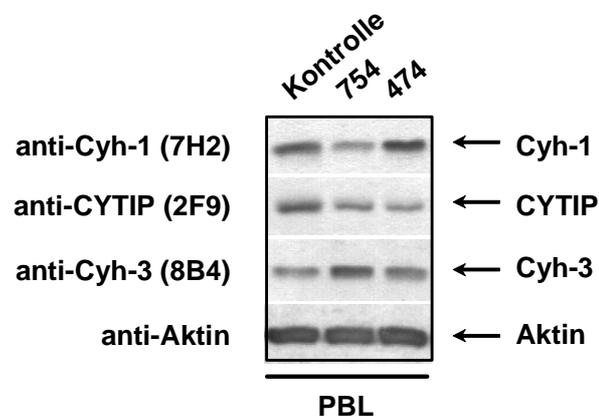
**Abb. 3.34 Cytohesin-1 inhibiert die CYTIP-Degradation**

Jurkat E6 Zellen wurden mit CYTIP allein (-) oder in Kombination mit dem Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle) oder Ig-Cytohesin-1 (Ig-Cyh-1) transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion für 30 Minuten mit 0,1% DMSO (-) oder 50 ng/ml PMA (+) inkubiert und lysiert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit 2F9 analysiert (oberer Blot). Durch Koexpression von Cytohesin-1 wird CYTIP in unstimulierten Zellen etwas stärker exprimiert als allein oder mit der Ig-Kontrolle und der PMA-induzierte Abbau ist reduziert. In PMA-stimulierten wie auch unstimulierten, Cytohesin-1 koexprimierenden Zellen sind modifizierte Formen von CYTIP angereichert (Pfeilspitzen). Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (mittlerer Blot). Zur Expressionskontrolle wurde der Ig-Fusionsanteil mit anti-human IgG nachgewiesen (unterer Blot, geteilt).

### 3.2.14 Durch Cytohesin-1-„knock-down“ wird die CYTIP-Expression reduziert und die Cytohesin-3-Expression verstärkt

Die vorangegangenen Ergebnisse deuten auf eine CYTIP-stabilisierende Funktion von Cytohesin-1 hin. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Expression von CYTIP in Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen untersucht. Die Expression von Cytohesin-1 wurde dazu in humanen PBL mittels der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 reprimiert. Die verringerte Expression von Cytohesin-1 führt zu einer verminderten CYTIP-Expression, wohingegen der „knock-down“ der CYTIP-Expression mittels der siRNA 474 die Expression von Cytohesin-1 nicht beeinflusst (Abb. 3.35). Ob die beobachtete verminderte Expression von CYTIP tatsächlich auf einer Destabilisierung des Proteins beruht, oder ob hierbei transkriptionelle oder translationale Regulation beteiligt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht

untersucht. Der „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression zeigt weiterhin eine Auswirkung auf die Expression von Cytohesin-3. Durch die Suppression von Cytohesin-1 wird die Expression von Cytohesin-3 verstärkt (Abb. 3.35).



**Abb. 3.35 Der Cytohesin-1-„knock-down“ reduziert die CYTIP-Expression und verstärkt die Cytohesin-3-Expression**

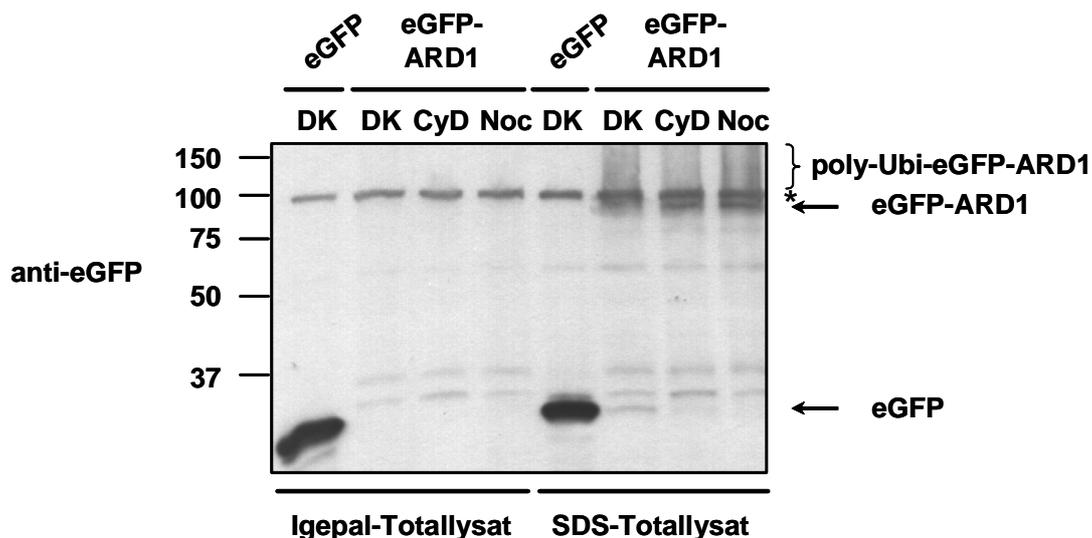
Humane PBL wurden mit 10 µg Kontroll-siRNA, oder Cytohesin-1- (754) oder CYTIP- (474) spezifischer siRNA transfiziert und 96 Stunden nach der Transfektion lysiert. Totallysate der Zellen wurden im Western Blot mit den monoklonalen Antikörpern 7H2 (anti-Cyh-1), 2F9 (anti-CYTIP) und 8B4 (anti-Cyh-3) analysiert. Der „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression vermindert die Expression von CYTIP, während die Expression von Cytohesin-1 durch den CYTIP-„knock-down“ unbeeinflusst bleibt. Durch die Reduktion von Cytohesin-1 wird die Expression von Cytohesin-3 verstärkt. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterster Blot).

### 3.2.15 Die E3 Ubiquitin-Ligase ARD1 könnte an der Degradation von CYTIP beteiligt sein

Die spezifische Interaktion zwischen ARD1 und Cytohesin-1 legt die Vermutung nahe, dass die E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität von ARD1 eine Funktion bei der Degradation des Cytohesin-1-Interaktionspartners CYTIP ausüben könnte.

In Jurkat E6 Zellen ist eGFP-ARD1 nur minimal exprimierbar. Die Transfektion der Zellen mit eGFP-ARD1 lieferte ca. 1% schwach fluoreszierender Zellen, während die Transfektion mit eGFP oder anderen eGFP-Fusionsproteinen unter gleichen Bedingungen üblicherweise in 40-60% positiver Zellen resultierte. In COS-7 Zellen ist eGFP-ARD1 stärker exprimierbar. Die Transfektion mit eGFP-ARD1 lieferte ca. 20 – 30% positiver Zellen. Aus diesem Grund wurde diese Zell-Linie für die Untersuchungen gewählt. Trotz der Transfektionseffizienz von 20 – 30% konnte

eGFP-ARD1 nicht in kerndepletierten Igepal-Totallysaten der transfizierten Zellen detektiert werden. Da eGFP-ARD1 in COS-7 Zellen nicht im Kern lokalisiert ist, wurde geprüft, ob das Fusionsprotein in einer Igepal-unlöslichen Zytoskelett-Fraktion enthalten ist. Dazu wurden eGFP-ARD1 transfizierte COS-7 Zellen vor der Lyse für 4,5 Stunden mit Cytochalasin D oder Nocodazol behandelt. Wie Abbildung 3.36 zeigt, ist eGFP-ARD1 auch nach Zerstörung des Aktin- oder Microtubuli-Zytoskeletts nicht in Igepal-Lysaten detektierbar. Der Nachweis des Fusionsproteins gelang nur in SDS-Totallysaten. Die eGFP-Detektion der SDS-Totallysate zeigt eine Anreicherung höher migrierender Banden, die poly-ubiquitinierte Formen des Fusionsproteins darstellen könnten. Es wurde gezeigt, dass sich ARD1 *in vitro* selbst ubiquitiniert [Vichi *et al.*, 2005]. Wie aufgrund der höher migrierenden Banden des Fusionsproteins zu vermuten ist, könnte dies auch intrazellulär oder während der Lyse der Fall sein.

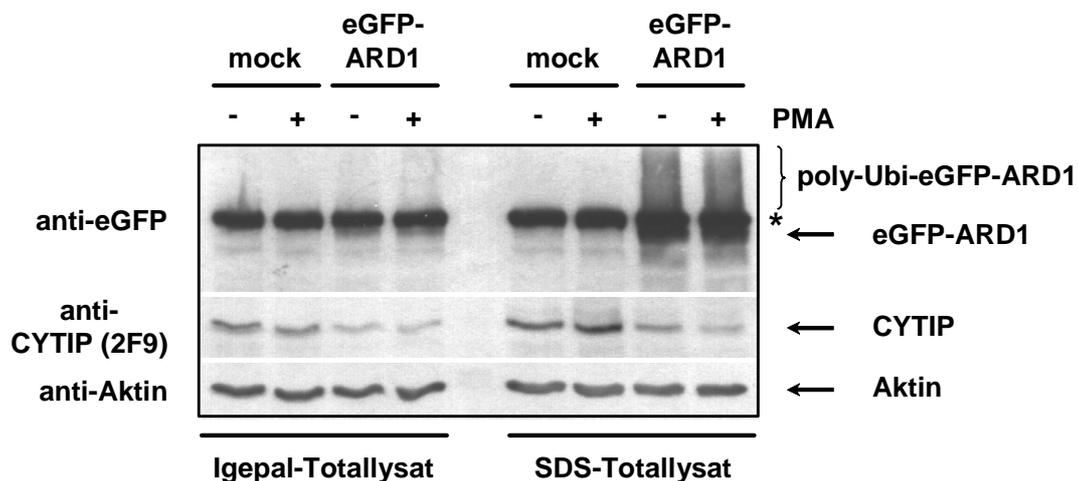


**Abb. 3.36 Detektion des eGFP-ARD1 in COS-7-Zellen**

COS-7 Zellen wurden mit eGFP oder eGFP-ARD1 transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion für 4,5 Stunden mit 0,5% DMSO als Kontrolle (DK), 10 mM Cytochalasin D (CyD) oder 10  $\mu$ M Nocodazol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1% Igepal oder 1% SDS lysiert. Die Igepal- und SDS-Totallysate wurden im Western Blot analysiert. eGFP-ARD1 ist in Igepal-Lysaten nicht nachweisbar. Die Detektion der SDS-Lysate zeigt unmodifiziertes und polyubiquitiniertes ARD1 (poly-Ubi-eGFP-ARD1). Mit „\*“ ist eine unspezifisch detektierte Bande markiert.

Für die Untersuchung einer möglichen Funktion von ARD1 bei der PMA-induzierten Degradation von CYTIP wurden CYTIP und eGFP-ARD1 in COS-7 Zellen koexprimiert. Überexprimiertes CYTIP wird in COS-7 Zellen nach PMA-Stimulation nicht degradiert, obwohl Ig-CYTIP nach PMA-Stimulation phosphoryliert wird (nicht

gezeigt). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesen Zellen für die Degradation relevante Proteine nicht exprimiert werden. In eGFP-ARD1 koexprimierenden Zellen wurde eine schwächere Expression von CYTIP beobachtet als in der Kontrolle (Abb. 3.37).



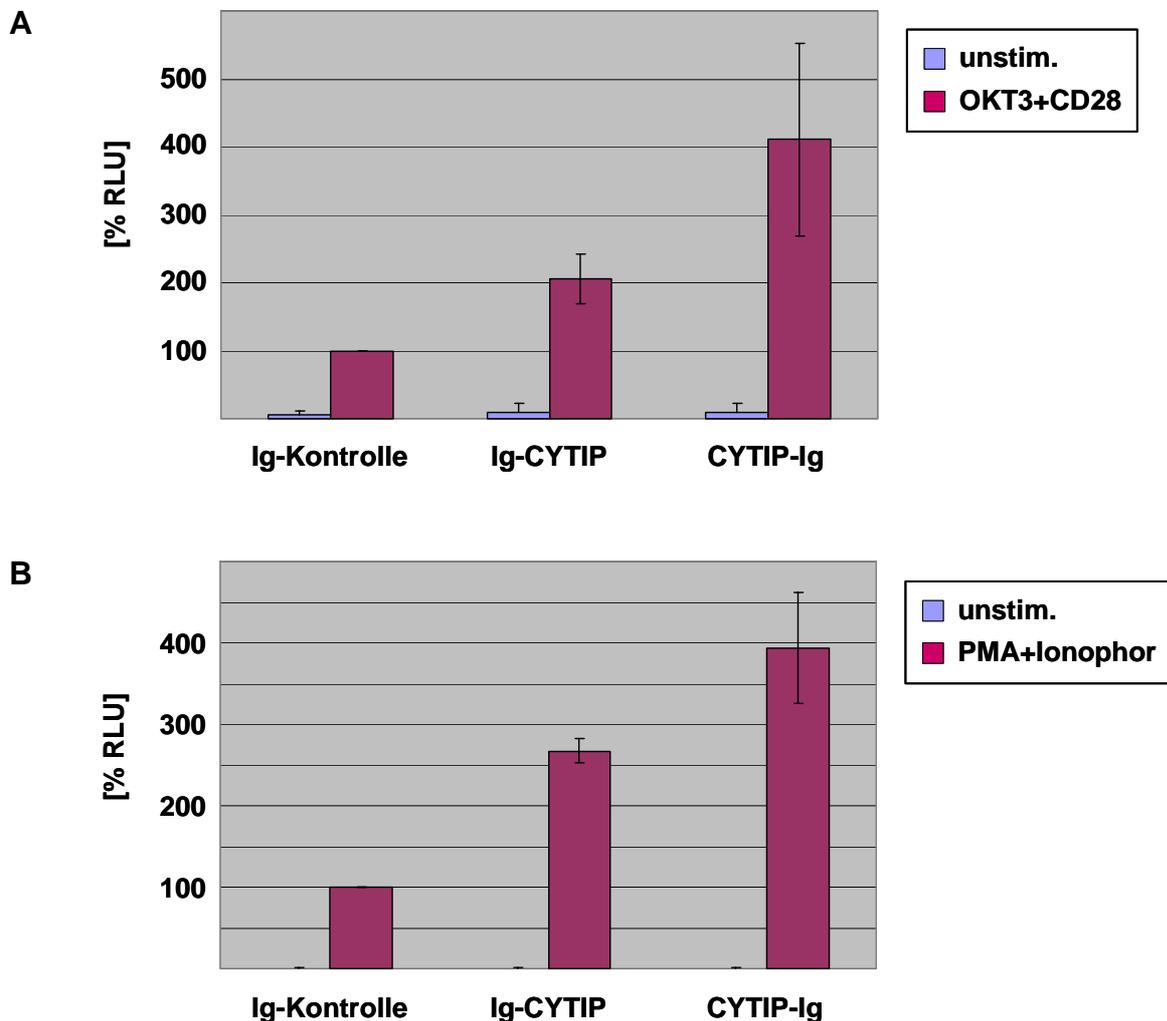
**Abb. 3.37 Koexpression von ARD1 vermindert die Expression von CYTIP**

COS-7 Zellen wurden mit CYTIP in Kombination mit leerem Vektor (mock) oder eGFP-ARD1 transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (-) oder für 1 Stunde mit PMA stimuliert (+) und anschließend mit Igepal oder SDS lysiert. Die Igepal- und SDS-Totallysate wurden im Western Blot analysiert. Detektion mit anti-eGFP (oberer Blot) zeigt in SDS-Totallysaten polyubiquitiniertes ARD1 (poly-Ubi-eGFP-ARD1). Mit \* ist eine unspezifisch detektierte Bande markiert. Detektion mit dem CYTIP-spezifischen Antikörper 2F9 zeigt, dass die Expression von CYTIP in ARD1-kotransfizierten Zellen reduziert ist, wobei jedoch keine modifizierten Formen detektierbar sind (mittlerer Blot). Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

Die reduzierte Expression von CYTIP durch Koexpression von ARD1 könnte auf eine ARD1-katalysierte Ubiquitinierung von CYTIP zurückzuführen sein. Dennoch wurden weder in Igepal- noch in SDS-Totallysaten modifizierte Formen von CYTIP detektiert, so dass eine ARD1-katalysierte Ubiquitinierung von CYTIP nicht direkt nachgewiesen werden konnte. Um eine mögliche Beteiligung von ARD1 an der Degradation von CYTIP zu analysieren, könnten *in-vitro*-Ubiquitinierungs-Versuche durchgeführt werden, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen wurden.

### 3.2.16 CYTIP verstärkt die IL-2-Promotor-Aktivierung

Die Überexpression von Ig-GRASP oder GRASP-Ig in T-Ag Jurkat Zellen resultiert in einer Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung nach OKT3/CD28- oder PMA/Ionophor-Stimulation (vgl. Abb. 3.12 und 3.13). Entsprechend wurde nun mittels des IL-2-Luziferase-Reporter-Systems der Einfluss von überexprimiertem CYTIP auf die Induktion des IL-2-Promotors untersucht. Wie Abbildung 3.38 zeigt, bewirkt die Überexpression von N- oder C-terminal Ig-fusioniertem CYTIP im Gegensatz zu GRASP eine Verstärkung der IL-2-Induktion nach der Stimulation mit OKT3 und anti-CD28 oder mit PMA und Ionophor.



**Abb. 3.38 CYTIP verstärkt die transkriptionelle Induktion des IL-2-Promotors**

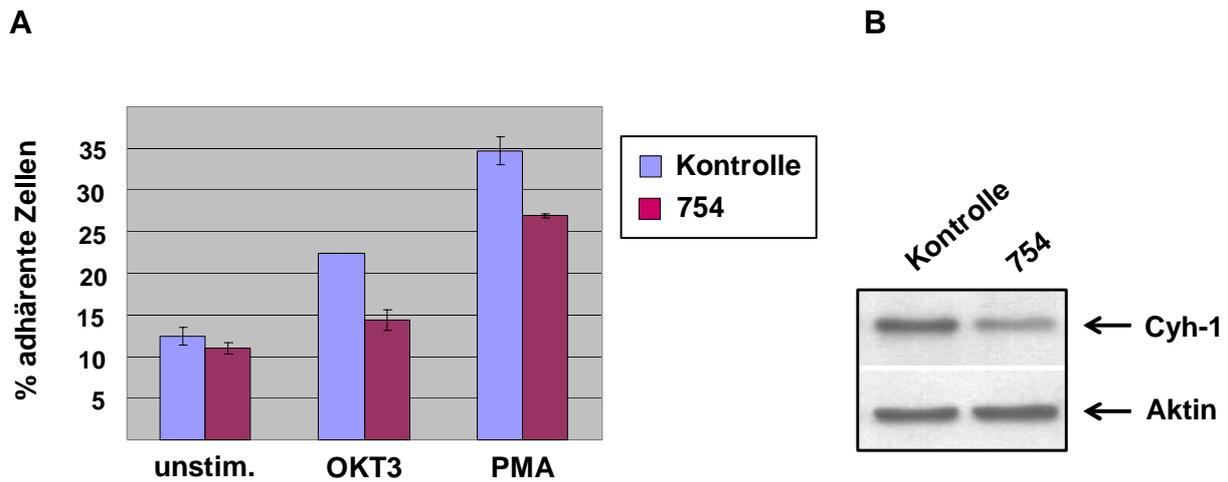
T-Ag Jurkat Zellen wurden transient mit IL-2-Luc in Kombination mit dem Ig-Fusionsanteil (Ig-Kontrolle) oder N- oder C-terminal Ig-fusioniertem CYTIP (Ig-CYTIP, CYTIP-Ig) transfiziert und 17 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (unstim.) oder für 6 Stunden mit (A) OKT3 und anti-CD28 (OKT3+CD28) oder (B) mit PMA und Ionophor stimuliert. Die Luciferase-Aktivität wurde quantifiziert und prozentual zur stimulierten Ig-Kontrolle (100%) dargestellt [%RLU].

### **3.3 Die Regulation des Integrins LFA-1 durch Cytohesin-1 und dessen Guaninnukleotid-Austauschfaktor-Aktivität**

Cytohesin-1 wurde in einem Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta_2$ -Kette CD18 isoliert [Kolanus *et al.*, 1996]. Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat Zellen verstärkt die Adhäsion der Zellen an den LFA-1-Liganden ICAM-1. Überexpression einer Cytohesin-1 Punktmutante (E157K), in der die Guaninnukleotid-Austauschfaktor- (GEF-) Funktion defekt ist, inhibiert dagegen die Adhäsion dominant [Geiger *et al.*, 2000]. Daher scheint die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 gegenüber GTPasen der ARF-Familie für die positive Regulation von LFA-1 relevant zu sein.

#### **3.3.1 Cytohesin-1-„knock-down“ inhibiert die LFA-1-vermittelte Adhäsion**

Um zu untersuchen, ob die LFA-1-vermittelte Adhäsion von Cytohesin-1 abhängig ist, wurden Adhäsionstests mit Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen durchgeführt. Dazu wurden humane PBL mit der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 transfiziert. 72 - 96 Stunden nach der Transfektion wurde die Adhäsion der Zellen auf immobilisiertem ICAM-1 analysiert. Die Expression von Cytohesin-1 ist 72 Stunden nach der Transfektion um etwa 50% reduziert (Abb. 3.39 B) und liegt 96 Stunden nach der Transfektion noch auf etwa dem gleichen Niveau. Die Expression von CD11a und CD18 wird durch die Reduktion von Cytohesin-1 nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 3.39 A zu sehen ist, führt die Suppression der Cytohesin-1-Expression zu einer verminderten Adhäsion der Zellen an ICAM-1 nach T-Zell-Rezeptor- oder PMA-Stimulation.



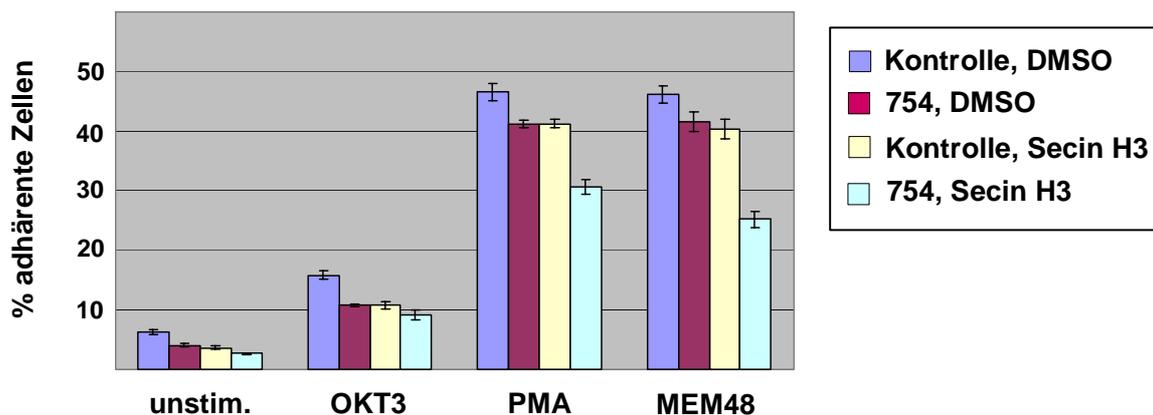
**Abb. 3.39 Cytohesin-1-„knock-down“ reduziert die Adhäsion an ICAM-1**

A) Humane PBL wurden mit 10  $\mu\text{g}$  einer Kontroll-siRNA oder der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid markiert und unstimuliert (unstim.) oder OKT3- (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. PMA- (50  $\text{ng}/\text{ml}$ ) stimuliert auf immobilisiertem ICAM-1 ausgesät. Nach einer 45-minütigen Adhäsion wurden nicht-adhärerende Zellen durch Waschen entfernt und die Adhäsion durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert. 754-transfizierte Zellen zeigen sowohl nach OKT3- als auch nach PMA-Stimulation eine reduzierte Adhäsion im Vergleich zu Kontroll-Zellen. B) Die Effizienz des Cytohesin-1-„knock-down“ wurde im Western Blot mit dem Cytohesin-1-spezifischen Antikörper 7H2 kontrolliert (oberer Blot). 72 Stunden nach der Transfektion liegt eine Reduktion von Cytohesin-1 um ca. 50% vor. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (unterer Blot).

### 3.3.2 Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität reduziert die LFA-1-Adhäsion

Die GEF-Funktion von Cytohesin-1 an GTPasen der ARF-Familie ist für die Regulation von LFA-1 relevant, da die Überexpression der GEF-defekten Punktmutante Cytohesin-1 E157K die Adhäsion an ICAM-1 dominant inhibiert. Das Toxin Brefeldin A inhibiert die Austauschfaktor-Aktivität einiger ARF-GEFs, nicht jedoch die der Mitglieder der Cytohesin-Familie [Cox *et al.*, 2004]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Famulok wurde das Molekül Secin H3 selektiert, welches das Cytohesin-1-spezifische RNA-Aptamer M69 von der Cytohesin-1-Sec7-Domäne verdrängt. *In vitro* inhibiert Secin H3 den Guaninnukleotid-Austausch durch Cytohesin-1, -2 und -3 an ARF1. Mit Hilfe des Inhibitors wurde untersucht, ob die LFA-1-vermittelte Adhäsion durch Hemmung der GEF-Funktion beeinflusst wird. Für die Untersuchungen wurden mit Kontroll-siRNA oder der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 transfizierte PBL für 96 Stunden mit DMSO als Kontrolle oder Secin H3 behandelt. Die Adhäsion auf ICAM-1 wurde in unstimulierten sowie OKT3-, PMA- oder MEM48-stimulierten Zellen analysiert. Wie Abbildung 3.40 zeigt, wird die Adhäsion auf ICAM-1 durch Secin H3 inhibiert. Die Reduktion der Adhäsion ist dabei

vergleichbar mit der durch den Cytohesin-1-„knock-down“ verursachten. Gleichzeitige Reduktion der Cytohesin-1-Expression und Inhibition der GEF-Funktion bewirkt eine zusätzliche Verminderung der Adhäsion. Sowohl durch den Cytohesin-1-„knock-down“ als auch durch Inhibition der GEF-Funktion wird sowohl die basale als auch die stimulierte Adhäsion unabhängig vom jeweiligen Stimulus inhibiert.



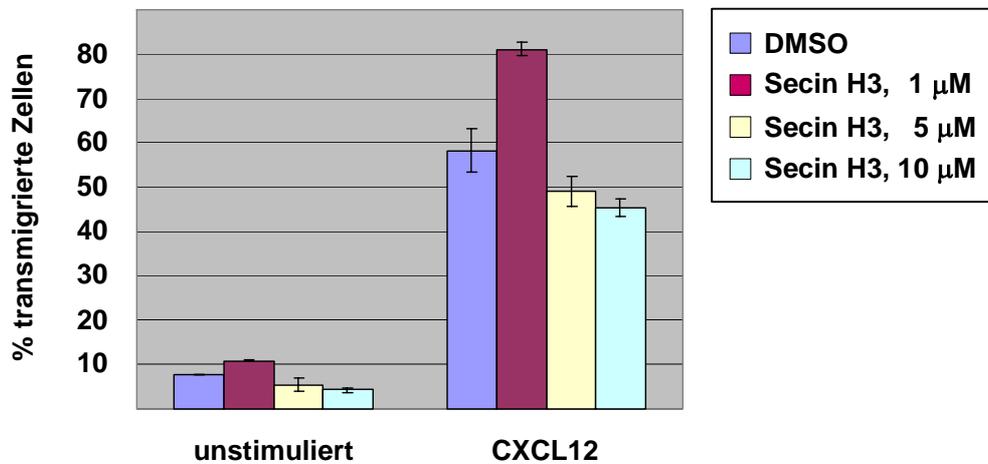
**Abb. 3.40 Inhibition der Cytohesin-GEF-Funktion reduziert die Adhäsion**

Mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 transfizierte PBL wurden nach der Transfektion für 96 Stunden mit 0,5% DMSO oder 10  $\mu$ M Secin H3 inkubiert. Die Zellen wurden unstimuliert (unstim.) oder OKT3- (2  $\mu$ g/ml), PMA- (50 ng/ml) oder MEM48- (5  $\mu$ g/ml) stimuliert auf immobilisiertem ICAM-1 ausgesät. Secin H3-behandelte Zellen zeigen eine zu Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen vergleichbare Inhibition der Adhäsion, während Cytohesin-1-„knock-down“ und zusätzliche GEF-Inhibition einen synergistischen Effekt zeigen.

### 3.3.3 Secin H3 inhibiert die Migration

Die gerichtete Migration der Lymphozyten in lymphatischen Organen oder an einen Entzündungsherd wird großenteils durch Chemokine gesteuert [Campbell *et al.*, 2003; Stein und Nombela-Arrieta, 2005]. Um einen möglichen Einfluss der Cytohesin-GEF-Aktivität auf die Migration zu untersuchen, wurde die Migration in modifizierten Transwell-Boyden-Kammern analysiert. Die Transwell-Boyden-Kammer ermöglicht es, die Transmigration von Zellen durch eine poröse Membran entlang eines Chemokin-Gradienten zu quantifizieren. Das Chemokin CXCL12 (SDF-1, *stromal cell-derived factor-1*) ist ein potenter chemoattraktiver Stimulus für Monozyten, Neutrophile, B-Vorläuferzellen und T-Lymphozyten [Bleul *et al.*, 1996;

D'Apuzzo *et al.*, 1997]. Für die Transwell-Versuche wurden PBL für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Secin H3 inkubiert und die Transmigration im CXCL12-Gradienten analysiert. Wie in Abbildung 3.41 gezeigt, wird die Migration durch 5 oder 10  $\mu\text{M}$  des Inhibitors gehemmt, während eine erhöhte Transmigrationsrate bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Secin H3 zu beobachten ist. Secin H3 wirkt sich dabei in gleicher Weise auf die CXCL12-induzierte wie auf die spontane Migration aus.



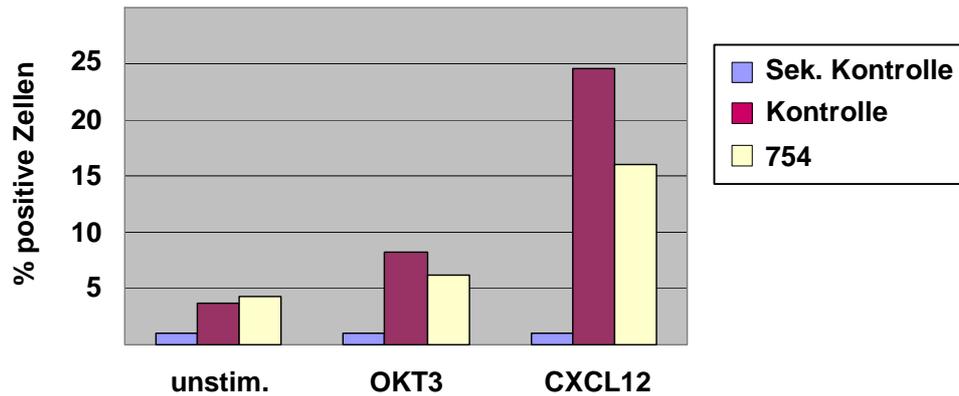
**Abb. 3.41 Secin H3 inhibiert die Migration in der Transwell-Boyden-Kammer**

Humane PBL wurden für eine Stunde mit 0,5% DMSO oder 1-, 5- oder 10  $\mu\text{M}$  Secin H3 inkubiert. Die Zellen wurden in die Kammer überführt und für drei Stunden ohne Chemokin (unstim.) oder mit 200 ng/ml CXCL12 im unteren Kompartiment der Boyden-Kammer inkubiert. Die Transmigration der Zellen ist prozentual zur eingesetzten Zellzahl angegeben. Durch 5 oder 10  $\mu\text{M}$  Secin H3 wird die Migration in Richtung des Chemokin-Gradienten sowie auch die spontane Transmigration ohne Chemokin inhibiert. Durch 1  $\mu\text{M}$  Secin H3 wird die Transmigrationsrate dagegen sowohl unstimuliert als auch CXCL12-induziert, gesteigert.

### 3.3.4 Cytohesin-1-„knock-down“ inhibiert die 327C-Induktion

Durch die Überexpression von Cytohesin-1 oder der GEF-defekten Mutante Cytohesin-1 E157K wird in Jurkat Zellen ein CD18-Neoepitop induziert, das durch den Reporter-Antikörper mAb24 detektiert wird. Die basale Affinität für lösliches ICAM-1 wird durch die Überexpression von Cytohesin-1 oder der GEF-defekten Mutante Cytohesin-1 E157K jedoch nicht beeinflusst [Geiger *et al.*, 2000]. Das mAb24-Epitop ist in ruhenden PBL durch Integrin-aktivierende Agenzien wie  $Mg^{++}$ /EGTA, PMA sowie schwach durch Chemokine induzierbar [Shamri *et al.*, 2005]. Allerdings korreliert das durch den mAb24 Reporter-Antikörper detektierte Epitop nicht unbedingt mit hoher Affinität [Salas *et al.*, 2004].

Der monoklonale Antikörper 327C erkennt ein Neoepitop der regulatorischen I-ähnlichen Domäne der Integrin  $\beta_2$ -Kette, das mit einer Konformation hoher Affinität assoziiert ist [Beals *et al.*, 2001; Lum *et al.*, 2002]. Das 327C-Neoepitop ist in ruhenden PBL durch  $Mg^{++}$ /EGTA, PMA sowie die Chemokine CXCL12, CCL21 und schwach durch CXCL9 induzierbar [Shamri *et al.*, 2005]. Mit Hilfe des 327C Reporter-Antikörpers wurde die LFA-1-Aktivierung in Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen untersucht. Dazu wurden PBL 72 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll- bzw. der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754, unstimuliert oder OKT3- oder CXCL12-stimuliert mit 327C markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Durch T-Zell-Rezeptor-Stimulation wurde eine schwache Induktion des 327C-Neoepitops erreicht. Wie Abbildung 3.42 zeigt, ist die OKT3-induzierte Expression des Aktivierungsepitops in 754-transfizierten Zellen leicht reduziert. Eine stärkere Reduktion ist bei der CXCL12-Stimulation zu beobachten.

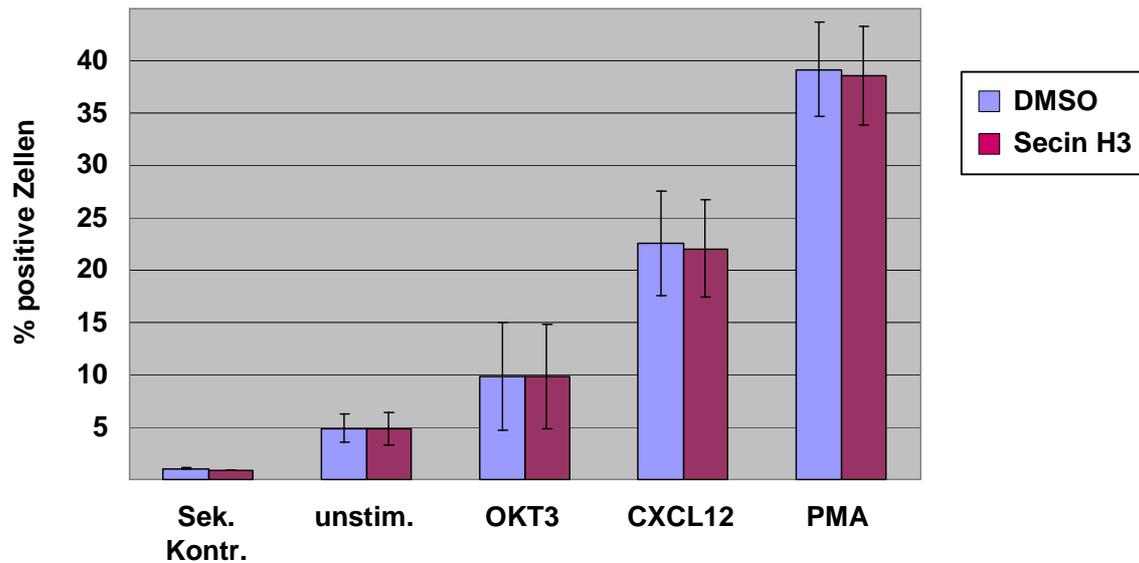


**Abb. 3.42 Cytohesin-1-„knock-down“ inhibiert die LFA-1-Aktivierung**

Mit Kontroll-siRNA oder der Cytohesin-1-spezifischen siRNA 754 transfizierte PBL wurden 72 Stunden nach der Transfektion nicht stimuliert (unstim.) oder für 30 Minuten mit OKT3 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) oder für 1 Minute mit CXCL12 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 327C (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus IgG<sub>1</sub> (1:200) markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Sekundärkontrolle (Sek. Kontrolle) dienten unstimulierte und stimulierte, mit Kontroll-siRNA transfizierte Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper markiert wurden. Die basale Expression des 327C-Aktivierungsepitops (unstimuliert) liegt unter 5%, wird jedoch durch die Transfektion gegenüber untransfizierten Zellen leicht induziert (nicht gezeigt). T-Zell-Rezeptor-Stimulation (OKT3) bewirkt eine schwache Induktion des Epitops. In Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen ist eine etwas schwächere Induktion des Epitops nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation zu beobachten. Die CXCL12-induzierte Expression des CD18-Neoepitops ist in 754-transfizierten Zellen um etwa 1/3 reduziert.

### 3.3.5 Die 327C-Induktion ist unabhängig von der GEF-Aktivität

Mit Hilfe des Inhibitors Secin H3 wurde untersucht, ob die Cytohesin-GEF-Funktion für die Aktivierung von LFA-1 erforderlich ist. Dazu wurden PBL für eine Stunde mit 10  $\mu\text{M}$  Secin H3 inkubiert und die Induktion des 327C-Neoepitops durchflusszytometrisch quantifiziert. Wie aus Abbildung 3.43 hervorgeht, zeigt die Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion des CD18-Aktivierungsepitops.



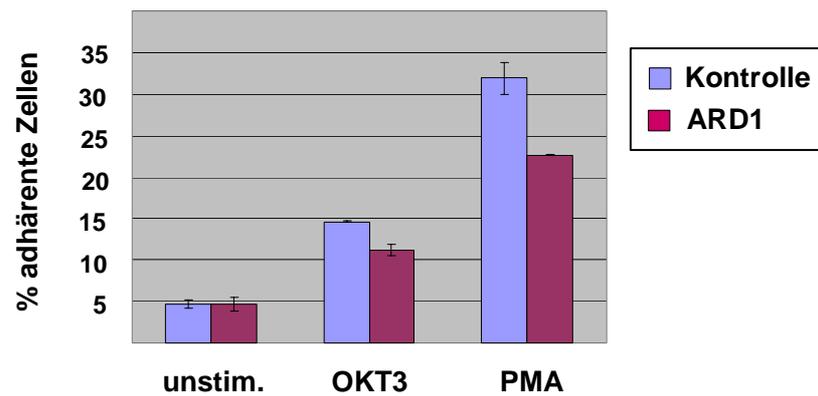
**Abb. 3.43 Die Cytohesin-GEF-Aktivität ist nicht essentiell für die Induktion des 327C-Aktivierungsepitops**

Humane PBL wurden für eine Stunde mit 0,5% DMSO bzw. 10  $\mu\text{M}$  Secin H3 inkubiert und anschließend nicht stimuliert (unstim.) oder für 30 Minuten mit OKT3 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1 Minute mit CXCL12 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder 30 Minuten mit PMA (50 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 327C markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Als Sekundärkontrolle (Sek. Kontr.) dienen unstimulierte mit DMSO oder Secin H3 inkubierte Zellen. Bei Secin H3-behandelten Zellen ist keine signifikante Veränderung des Aktivierungsepitops gegenüber der Kontrolle zu beobachten.

### 3.3.6 ARD1-„knock-down“ inhibiert die LFA-1-vermittelte Adhäsion

Die Cytohesin-GEF-Aktivität an ARF-GTPasen ist nach den gezeigten Ergebnissen für die LFA-1-vermittelte Adhäsion an ICAM-1, nicht jedoch für die LFA-1-Aktivierung relevant. *In vitro* katalysiert Cytohesin-1 den GDP/GTP Austausch an ARF1, ARF6 sowie dem ARF-Domänen Protein ARD1 [Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998; Knorr *et al.*, 2000; Vitale *et al.*, 2000b]. Für keines dieser ARF-Proteine wurde bislang eine Funktion bei der Regulation von LFA-1 gezeigt. Überexpression sowohl der dominant negativen als auch der konstitutiv aktiven Mutanten von ARF1 oder ARF6 zeigt keinen Einfluss auf die Adhäsion an ICAM-1 [Weber *et al.*, 2001].

Um zu untersuchen, ob das ARF-Domänen Protein ARD1 in die Regulation von LFA-1 involviert ist, wurde die Adhäsion an ICAM-1 in ARD1 „knock-down“-PBL analysiert. Wie Abbildung 3.44 zeigt, ist die prozentuale Adhäsion der ARD1 „knock-down“-Zellen gegenüber Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen sowohl nach OKT3- als auch nach PMA-Stimulation reduziert.



### Abb. 3.44 ARD1-„knock-down“ reduziert die Adhäsion an ICAM-1

Humane PBL wurden mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder einer Kombination aus zwei ARD1-spezifischen siRNAs (ARD1) transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurde die Adhäsion der Zellen an ICAM-1 quantifiziert. Sowohl nach T-Zell-Rezeptor- (OKT3) als auch nach PMA-Stimulation zeigen ARD1 „knock-down“-Zellen eine reduzierte Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle.

Cytohesin-1 ist der einzig bekannte Austauschfaktor, der *in vitro* den GDP/GTP-Austausch an ARD1 katalysiert [Vitale *et al.*, 2000b]. Die Reduktion der LFA-vermittelten Adhäsion in ARD1 „knock-down“-Zellen deutet auf eine Funktion von ARD1 als Cytohesin-1 nachgeschalteter Effektor hin.

## 4 Diskussion

Das Integrin LFA-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Leukozyten an Endothel- und Antigen-präsentierende Zellen, der transendothelialen Migration sowie bei T-Zell-Effektor-Funktionen. Die adhäsiven Eigenschaften des Integrins unterliegen der dynamischen Regulation durch intrazelluläre Signale.

Cytohesin-1 ist ein direkter Interaktionspartner und positiver Regulator des Integrins LFA-1. Die Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta_2$ -Kette CD18 wird durch die zentrale Sec7-Domäne vermittelt. Die Sec7-Domäne besitzt darüber hinaus eine katalytische Funktion als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) an GTPasen der ARF-Familie. Cytohesin-1 ist weiterhin an einem LFA-1-induzierten Signalweg beteiligt, der zur Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt.

Die beiden homologen Cytohesin-Interaktionspartner CYTIP und GRASP besitzen eine PDZ-Domäne nahe dem Aminoterminal, gefolgt von einer Leucin-Zipper-Region und einer C-terminalen Domäne unbekannter Funktion. Die PDZ-Domäne ist eine strukturell konservierte Interaktionsdomäne, die häufig die Bindung an ein carboxyterminales PDZ-Bindemotiv vermittelt. Die Leucin-Zipper-Domäne beider Proteine vermittelt die Interaktion mit der coiled-coil-Domäne von Mitgliedern der Cytohesin-Familie. Die beiden Protein-Interaktionsdomänen lassen eine Funktion der Homologen als Gerüstproteine vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion dieser beiden Proteine untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der funktionalen Rolle von Cytohesin-1 und dessen GEF-Aktivität bei der Regulation von LFA-1. Die LFA-1-vermittelte Adhäsion sowie die Aktivierung des Integrins wurden dabei in primären Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen untersucht. Mit Hilfe des Inhibitors Secin H3 konnte selektiv die Rolle der Cytohesin-GEF-Funktion bei der LFA-1-vermittelten Adhäsion, der Migration sowie der LFA-1-Aktivierung analysiert werden.

Welche GTPase der ARF-Familie *in vivo* durch Cytohesin-1 aktiviert wird, ist bislang nicht bekannt. Das ARF-Domänen-Protein ARD1 gehört zur TRIM/RBCC-Familie von E3 Ubiquitin-Ligasen und besitzt eine C-terminale ARF-GTPase-Domäne. Cytohesin-1 ist der einzig bekannte Austauschfaktor, der ARD1 *in vitro* aktiviert. Somit könnte ARD1 eine Funktion in Cytohesin-1-vermittelten Signalwegen besitzen.

## **4.1 Charakterisierung des ITAM-Proteins GRASP**

### **4.1.1 GRASP interagiert mit Cytohesin-1**

Während CYTIP mit Cytohesin-1, -2 und -3 interagiert, wurde für GRASP bislang nur eine Interaktion mit Cytohesin-2 und -3 gezeigt. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen CYTIP und GRASP innerhalb der Leucin-Zipper-Domäne stellte sich die Frage, ob GRASP auch mit Cytohesin-1 interagieren kann. Da gegen humanes GRASP derzeit kein Antikörper erhältlich ist, wurde GRASP für die Untersuchungen mit geeigneten Fusionsanteilen überexprimiert. Zur Überexpression des Proteins wurde die cDNA des murinen Homologs verwendet. Nachdem humanes und murines GRASP annähernd identisch sind, kann davon ausgegangen werden, dass das murine Protein die Funktion des humanen vollständig übernehmen kann.

Mittels Koimmunpräzipitation wurde eine Interaktion zwischen GRASP und Cytohesin-1 in der humanen T-Zell-Linie Jurkat E6 nachgewiesen (Abb. 3.3). Endogenes Cytohesin-1 kopräzipitiert mit überexprimiertem, murinem GRASP, wobei die Interaktion der beiden Proteine durch PMA-Stimulation der transfizierten Zellen nicht beeinflusst wird (Abb. 3.4).

Die Interaktion zwischen GRASP bzw. CYTIP und den Mitgliedern der Cytohesin-Familie könnte partiell durch unterschiedliche gewebespezifische Expression reguliert sein. Während Cytohesin-1 und CYTIP hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden [Kolanus *et al.*, 1996; Boehm *et al.*, 2003], wurde die GRASP-mRNA am stärksten im Gehirn, schwächer in Herz und Lunge und sehr schwach in Niere, Ovar und embryonalen Zellen nachgewiesen [Nevrivy *et al.*, 2000; Kitano *et al.*, 2002]. Da Cytohesin-1 auch in Zellen des Nervensystems exprimiert wird und Funktionen des Proteins in diesen Zellen beschrieben wurden, könnte die Interaktion mit GRASP in neuronalen Zellen eine Rolle spielen [Ashery *et al.*, 1999; Neeb *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Restituto *et al.*, 2005].

Microarray-Analysen lieferten einen Hinweis auf die Expression von GRASP in reifen dendritischen Zellen [Jessica Nickel, unveröffentlicht]. Unreife dendritische Vav-1 „knock-down“-Zellen zeigen *in vitro* einen Reifungsdefekt. In Vav-1-supprimierten Zellen wurde eine etwa zweifache Reduktion der GRASP-mRNA im Vergleich zu normal maturierten Kontroll-Zellen festgestellt. Daher ist anzunehmen, dass GRASP während der Reifung dendritischer Zellen hochreguliert wird.

Mittels RT-PCR wurde die GRASP-mRNA in humanen PBL nachgewiesen [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Demnach könnte die Interaktion zwischen GRASP und Cytohesin-1 auch in hämatopoetischen Zellen von funktionaler Bedeutung sein.

GRASP ist ein Retinolsäure-induzierbares Genprodukt. In embryonalen P19 Karzinomzellen wird die Expression der GRASP-mRNA durch all-*trans*-Retinolsäure stark hochreguliert [Nevrivy *et al.*, 2000]. Die Induktion der mRNA wird dabei durch Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid nicht gehemmt, was zeigt, dass die Expression direkt durch Retinolsäure induziert wird und nicht in Abhängigkeit von anderen, *de novo* synthetisierten Proteinen.

Retinolsäure ist ein Differenzierungsfaktor, der durch intrazelluläre Oxidation von Vitamin A (Retinol) durch Alkohol-Dehydrogenasen zu Retinal und weitere Oxidation durch Retinal-Dehydrogenasen entsteht. Retinolsäure kommt im Körper hauptsächlich in der all-*trans*- und der 9-*cis*-Form vor. Beide Formen binden an die nukleären Rezeptoren des Typs RAR (*retinoic acid receptor*), wohingegen nur die 9-*cis* Form an RXR (*retinoid X receptor*) bindet. Die RAR- und RXR-Rezeptoren sind homodimere oder heterodimere Transkriptionsfaktoren der Steroid-/Thyroidhormon-Rezeptor-Superfamilie, welche die Transkription von Zielgenen, nach Bindung des Liganden Retinolsäure, in Abhängigkeit von Koaktivatoren induzieren [Wei, 2003].

T-Zellen exprimieren die Retinolsäure-Rezeptoren RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  und RXR $\beta$  [Rasooly *et al.*, 2005]. Die GRASP-Expression könnte somit auch in T-Zellen durch Retinolsäure induziert werden.

Retinolsäure beeinflusst die Differenzierung aktivierter T-Zellen, wobei die T<sub>H</sub>1-Differenzierung supprimiert und die T<sub>H</sub>2-Differenzierung begünstigt wird [Iwata *et al.*, 2003]. Eine Induktion der GRASP-Expression durch Retinolsäure hätte eine komplementäre Expression zwischen CYTIP und GRASP in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen zur Folge, da CYTIP in T<sub>H</sub>1-Zellen stärker exprimiert wird [Tang *et al.*, 2002]. Retinolsäure hat darüber hinaus eine wichtige Funktion bei der Prägung der Darm-Homing-Spezifität in T-Zellen. Darm-residente dendritische Zellen produzieren Retinolsäure, wodurch in aktivierten T-Zellen die Expression der Darm-Tropie-vermittelnden Rezeptoren LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ) und CCR9 induziert und gleichzeitig die Expression der Haut-Homing-Rezeptoren E-Selektin-Ligand und CCR4 supprimiert wird [Iwata *et al.*, 2004].

In humanen PBL wird die GRASP-mRNA durch Behandlung mit Retinolsäure etwa 3,5-fach, durch die Behandlung mit dem T<sub>H</sub>2-polarisierenden Zytokin IL-4 etwa 5-fach

induziert. Durch die Behandlung mit IL-12, welches die T<sub>H</sub>1-Differenzierung fördert tritt keine Induktion der GRASP-mRNA ein [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Demnach scheint GRASP komplementär zu CYTIP stärker in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert zu sein.

Die mögliche differentielle GRASP-Expression in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen, könnte mittels eines spezifischen Antikörpers in folgenden Arbeiten auf Protein-Ebene analysiert werden. Für die Herstellung eines GRASP-spezifischen monoklonalen Antikörpers wurde zur Immunisierung von Ratten murines GRASP als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (nicht gezeigt). Derzeit liegen jedoch noch keine Hybridome vor.

### **4.1.2 GRASP lokalisiert in T-Zellen an der Plasmamembran**

Überexprimiertes eGFP-GRASP lokalisiert in Jurkat E6 Zellen partiell an der Plasmamembran (Abb. 3.5). Eine ähnliche Lokalisation des überexprimierten Proteins wurde in HEK293 Zellen beschrieben, wobei der N-terminale Teil des Proteins, der die PDZ-Domäne beinhaltet, die Assoziation mit der Plasmamembran vermittelt [Nevrivy *et al.*, 2000]. Die PDZ-Domäne könnte auch in Jurkat Zellen für die Plasmamembran-Lokalisation des Proteins ausschlaggebend sein. Die GRASP-PDZ-Domäne bindet an das C-terminale PDZ-Bindemotiv der metabotropen Glutamat-Rezeptoren der Gruppe I, mGluR1 und mGluR5. GRASP wurde im Komplex mit mGluR1 und Cytohesin-2 aus neuronalen Zellen präzipitiert [Kitano *et al.*, 2002]. Die Überexpression von GRASP fördert die Zelloberflächenexpression von mGluR1, wohingegen eine Mutante, der die Leucin-Zipper-Domäne fehlt, die Expression inhibiert. Es wurde daher postuliert, dass GRASP durch die Assoziation mit dem ARF-GEF Cytohesin-2 den intrazellulären Transport und die Organisation der metabotropen Glutamat-Rezeptoren an Synapsen reguliert.

In der humanen T-Zell-Linie Jurkat werden beide GRASP-bindenden Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 konstitutiv exprimiert und könnten somit die Lokalisation von GRASP an der Plasmamembran bewirken [Pacheco *et al.*, 2004]. In ruhenden PBL wird mGluR5 konstitutiv exprimiert, während die Expression von mGluR1 durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) induziert wird. Lymphozyten treten in Glutamat-reichen peripheren Organen wie Leber, Niere, Lunge, Muskel und Blut mit Glutamat in Kontakt. Signale des konstitutiv exprimierten mGluR5 bewirken in T-Lymphozyten die Aktivierung der Adenylat-Zyklase. Es wird daher vermutet, dass Glutamat-induzierte, proliferationsinhibierende Signale dazu beitragen, T-Zellen in

einem ruhenden Stadium zu halten. Stimulation des induzierbaren Rezeptors mGluR1 resultiert dagegen in der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2. Die proliferationsinhibierenden Signale von mGluR5 werden somit durch Signale des induzierbaren Rezeptors mGluR1 revertiert [Pacheco *et al.*, 2004]. Die Bindung an mGluR1 und mGluR5 legt die Vermutung nahe, dass GRASP eine Funktion in Glutamat-Signalwegen ausüben könnte. Cytohesin-1 reguliert die Aktivierung von ERK1/2 in einem LFA-1-Signalweg [Perez *et al.*, 2003]. Durch die Interaktion mit GRASP könnte Cytohesin-1 auch an einer Glutamat-induzierten ERK1/2-Aktivierung beteiligt sein. Die Stimulation der Gruppe I mGluR bewirkt in verschiedenen Zelltypen die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) [Klein *et al.*, 1997]. Da die PLD durch ARF-GTPasen aktiviert werden kann [Brown *et al.*, 1993], könnte die GRASP-Cytohesin-1-Interaktion auch zu einer mGluR-induzierten Aktivierung der PLD beitragen.

Durch PMA-Stimulation transfizierter Zellen wird die Membran-nahe Lokalisation des eGFP-GRASP reduziert (Abb 3.5). Die PMA-induzierte Relokalisation könnte dabei durch eine Modifikation des gebundenen Rezeptors bewirkt werden. Für den metabotropen Glutamat-Rezeptor mGluR4 wurde eine Liganden-unabhängige, PMA-induzierte Internalisierung beschrieben [Mathiesen und Ramirez, 2006]. Eine PKC-abhängige Internalisierung der homologen Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 wurde bislang nicht gezeigt, könnte jedoch eine mögliche Ursache für die beobachtete, PMA-induzierte Relokalisierung des eGFP-GRASP sein.

Auch überexprimiertes CYTIP dissoziiert in Jurkat Zellen nach PMA-Stimulation von der Plasmamembran ab [Boehm *et al.*, 2003]. Allerdings wird die Plasmamembran-Assoziation von CYTIP durch die Adhäsion der Zellen an Integrin-Liganden induziert, wohingegen GRASP auch in unspezifisch auf poly-L-Lysin adhärennten Jurkat Zellen an der Plasmamembran lokalisiert. Demnach binden die PDZ-Domänen der beiden Homologen offenbar trotz ihrer Ähnlichkeit an unterschiedliche Liganden. Bislang wurde jedoch noch kein Ligand der CYTIP-PDZ-Domäne identifiziert.

Die Lokalisation des eGFP-GRASP am Zellkortex wird durch die PMA-Stimulation nicht gänzlich aufgehoben. Für die GRASP-PDZ-Domäne wurden weitere, neuronal-exprimierte Proteine als Bindungspartner identifiziert [Kitano *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2006]. Über die Expression dieser Interaktionspartner in T-Zellen liegen jedoch in der Literatur bislang keine Hinweise vor. Die Mitglieder der Cytohesin-Familie binden mittels ihrer PH-Domäne und der polybasischen Region an

das Phospholipid PIP<sub>3</sub> [Nagel *et al.*, 1998a]. Aufgrund eines Defekts in der Expression der D3 Phosphoinositid-Phosphatase PTEN weisen Jurkat Zellen ein erhöhtes PIP<sub>3</sub>-Level auf [Shan *et al.*, 2000]. Cytohesin-1 lokalisiert daher in Jurkat Zellen partiell an der Plasmamembran, wobei die Lokalisierung durch PMA-Stimulation nicht beeinflusst wird [Dierks *et al.*, 2001]. Somit könnte die verbleibende Plasmamembran-Lokalisation durch die Bindung an PIP<sub>3</sub>-gebundenes, endogenes Cytohesin-1 vermittelt sein.

In eGFP-GRASP und Ig-Cytohesin-1 koexprimierenden Jurkat Zellen wurde eine Kolokalisation der beiden Fusionsproteine an der Plasmamembran festgestellt (Abb. 3.6). In HEK293 Zellen wurde beobachtet, dass überexprimiertes GRASP die Plasmamembran-Assoziation von koexprimiertem GRP1 verstärkt [Nevrivy *et al.*, 2000]. Demnach könnte die Bindung der PDZ-Domäne von GRASP bzw. CYTIP an einen membranständigen Rezeptor einen zweiten, PI3-Kinase-unabhängigen Weg zur Rekrutierung von Cytohesinen an die Plasmamembran darstellen.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass GRASP/Tamalin an die verkürzte, Kinase-defiziente Spleiss-Variante des Neurotrophin-3-Rezeptors TrkC, TrkCT1, bindet, wobei die Bindung durch den Rezeptor-Liganden Neurotrophin-3 (NT-3) induziert wird [Esteban *et al.*, 2006]. Die Stimulation mit NT-3 resultiert in der Translokation von ARF6 an die Plasmamembran, der Aktivierung von Rac1 und der Formation von Membran-„Ruffles“. Die Translokation von ARF6 und das Membran-„Ruffling“ wird durch die Expression einer GRASP-Mutante, der die Leucin-Zipper-Region fehlt, blockiert. Durch die Überexpression von Wildtyp-ARNO bzw. der GEF-defekten Mutante ARNO E156K wird die NT-3-induzierte Formation der „Ruffles“ verstärkt bzw. blockiert. Diese Daten zeigten einen neuen Signalweg, in dem Cytohesin-2/ARNO und ARF6 durch die Bindung von GRASP an den NT-3-aktivierten Rezeptor TrkCT1 an die Plasmamembran rekrutiert werden und dadurch die Aktivierung von Rac-1 und eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts vermitteln.

Neurotrophine sind eine Familie von Wachstumsfaktoren. Die wichtigsten Vertreter der Familie sind NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 und NT-4. Diese Faktoren sind essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Vertebraten-Nervensystems. Seit einigen Jahren gibt es jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass Neurotrophine auf ein breiteres Spektrum von Körperzellen wirken [Ehrhard *et al.*, 1994; Burgi *et al.*, 1996; Levi-Montalcini *et al.*, 1996; Maroder *et al.*, 1996]. Neurotrophine regulieren verschiedene

Immunfunktionen und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Thymus [Vega *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2004]. Der hochaffine NT-3-Rezeptor TrkC wird in  $T_H2$ -, nicht jedoch in  $T_H1$ - oder naiven  $CD4^+$  T-Zellen exprimiert, wobei die Expression durch anti- $IFN\gamma$ - bzw. anti-IL-4- Antikörper verstärkt bzw. inhibiert wird [Sekimoto *et al.*, 2003]. Der TrkC-Ligand NT-3 verstärkt die anti-CD3-induzierte IL-4-Produktion der  $T_H2$ -Zellen, während die  $IFN\gamma$ -Produktion der  $T_H1$ -Zellen nicht beeinflusst wird. Die NT-3-mRNA wurde in IL-4-stimulierten, nicht jedoch in unstimulierten, anti-CD3- oder IL-2-stimulierten PBMC nachgewiesen [Besser und Wank, 1999]. Diese Daten deuten eine Funktion von NT-3 und dessen Rezeptor TrkC bei der Regulation der  $T_H1/T_H2$ -Balance an. Aufgrund der Funktion von NT-3 und dessen Rezeptor TrkC bei der  $T_H2$ -Differenzierung und der Interaktion zwischen GRASP und TrkCT1, wäre es interessant zu klären, ob GRASP möglicherweise komplementär zu CYTIP stärker in  $T_H2$ -Zellen exprimiert wird.

Cytohesin-1 koexprimierende Zellen zeigen eine stärker polarisierte Morphologie als Kontroll-Zellen (Abb. 3.6). Diese vermehrte Bildung von Membranprotrusionen könnte, wie von Esteban *et al.* [2006] für Cytohesin-2/ARNO gezeigt, durch eine Cytohesin-1-vermittelte Aktivierung von ARF6 und der daraus resultierenden Aktivierung von Rac1 bewirkt werden. Die Plasmamembran-Assoziation des eGFP-GRASP sowie die Kollokalisierung mit Ig-Cytohesin-1 bleiben in PMA-stimulierten Ig-Cytohesin-1 koexprimierenden Zellen erhalten (Abb 3.7), während eGFP-GRASP nach PMA-Stimulation in Kontroll-Zellen von der Plasmamembran abdissoziiert. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass GRASP in Jurkat Zellen durch Cytohesin-1 an die Plasmamembran rekrutiert werden kann. Somit kann die Plasmamembran-Lokalisation des GRASP/Cytohesin-Komplexes offenbar sowohl durch die PDZ-Domäne von GRASP als auch durch die PH-Domäne der Cytohesine vermittelt werden.

#### **4.1.3 GRASP inhibiert die transkriptionelle Induktion des IL-2-Promotors**

GRASP beinhaltet in seiner N-terminalen Alanin- und Prolin-reichen Region SH3-Bindemotive sowie ein klassisches ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Das GRASP-ITAM lässt eine Funktion des Proteins in hämatopoetischen Zellen vermuten, da die meisten bekannten ITAM-Proteine fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden und bislang nur wenige ITAM-

Signalwege in Zellen außerhalb des Immunsystems bekannt sind [Fodor *et al.*, 2006; Grande *et al.*, 2006]. ITAM-Motive sind in den zytoplasmatischen Domänen der T- und B-Zell-Rezeptor-assoziierten Ketten sowie in F<sub>c</sub>-Rezeptor-assoziierten Proteinen enthalten [Isakov, 1997; Amigorena und Bonnerot, 1999]. Weitere ITAM-Proteine sind DAP12 [Lanier *et al.*, 1998], CNAIP/NFAM1 [Yang *et al.*, 2003; Ohtsuka *et al.*, 2004], STAM1 [Takeshita *et al.*, 1997], STAM2 [Pandey *et al.*, 2000] sowie mehrere virale (Onco-) Proteine [Miller *et al.*, 1994; Du *et al.*, 1995; Willems *et al.*, 1995; Lagunoff *et al.*, 1999; Geimonen *et al.*, 2003]. STAM1 ist mit den Tyrosinkinase Jak2 und Jak3 assoziiert und an der IL-2- und GM-CSF-Signaltransduktion beteiligt [Takeshita *et al.*, 1997]. STAM1 knock-out-Mäuse zeigen jedoch keinen Defekt in der Entwicklung oder Zytokinresponsivität hämatopoetischer Zellen, sondern vielmehr einen Verlust der pyramidalen CA3 Zellen des Hippocampus [Yamada *et al.*, 2001]. Diese Daten geben einen Hinweis auf ITAM-basierte Signalwege in neuronalen Zellen.

Überexprimiertes GRASP wird in Jurkat Zellen nach TCR-Stimulation Tyrosinphosphoryliert, wobei die Phosphorylierung durch CD28-Kostimulation verstärkt wird (Abb 3.9). Die Phosphorylierung findet hauptsächlich an den Tyrosinen des ITAM statt, da eine Mutante, in der beide Tyrosine des Motivs gegen Phenylalanine ausgetauscht sind, eine wesentlich schwächere Phosphorylierung zeigt (Abb. 3.10). Die Verstärkung der GRASP-Phosphorylierung durch die CD28-Kostimulation könnte durch eine gesteigerte Aktivierung der PI3-Kinase und damit durch eine vermehrte Rekrutierung des GRASP/Cytohesin-1-Komplexes an die Plasmamembran bewirkt werden. Die Phosphorylierung wird entsprechend auch durch die Koexpression von Cytohesin-1 gesteigert (Abb. 3.11). Durch TCR-Stimulation sowie durch die Koexpression von Cytohesin-1 wird die Expression von GRASP verstärkt (Abb. 3.9 und 3.11). Dieses Resultat deutet auf eine Stabilisierung des Proteins hin, die durch eine Komplex-Bildung bewirkt werden könnte. Die Stabilisierung des Proteins ist dabei unabhängig von der Phosphorylierung des ITAM, da auch die Expression der ITAM-Mutante durch OKT3/CD28-Stimulation verstärkt wird (Abb.3.10).

Aufgrund der TCR-induzierten ITAM-Phosphorylierung wurde untersucht, ob GRASP an der Weiterleitung TCR-induzierter Signale beteiligt ist. In Luziferase-Reporter-Analysen wurde festgestellt, dass die Überexpression von GRASP eine Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung nach OKT3/CD28-Stimulation verursacht (Abb. 3.12). Da die OKT3/CD28-Stimulation eine Stabilisierung des überexprimierten GRASP bewirkt,

die möglicherweise durch die Bindung aktivierter Src-Kinasen verursacht wird, wurde vermutet, dass die Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung auf einer Sequestrierung aktivierter Src-Kinasen beruhen könnte. Durch die Stimulation mit PMA und Ionophor werden proximale Signale des TCR umgangen, indem direkt ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und eine Aktivierung von PKCs erreicht wird. Daher wird die Induktion des IL-2-Promotors durch PMA/Ionophor-Stimulation als unabhängig von proximalen Signalen des TCR betrachtet. Die Überexpression von GRASP bewirkt auch bei der Stimulation mit PMA und Ionophor eine Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung (Abb. 3.13). GRASP scheint daher die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors nicht auf der Ebene TCR-proximaler Ereignisse, sondern auf einer nachgeschalteten Ebene zu inhibieren. Luziferase-Reporter-Analysen ergaben, dass die ITAM-Mutante die Aktivierung des IL-2-Promotors in gleicher Weise inhibiert, wie das Wildtyp-Protein (Abb. 3.14). Demnach erfolgt die beobachtete Inhibition der IL-2-Promotor-Aktivierung durch GRASP unabhängig von der Integrität des ITAM. Die Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung des GRASP-ITAM könnte in einem anderen Signalweg eine funktionale Rolle spielen, da Src-Kinasen durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert werden [Thomas und Brugge, 1997].

RT-PCR-Analysen haben ergeben, dass die GRASP-mRNA in humanen PBL durch IL-4 etwa 5-fach induziert wird, wohingegen keine Induktion durch das  $T_H1$ -polarisierende Zytokin IL-12 eintritt. Nachdem IL-4 die  $T_H2$ -Differenzierung begünstigt und  $T_H2$ -Zellen kein IL-2 mehr sezernieren, könnte GRASP in  $T_H2$ -Zellen zur Suppression der IL-2-Transkription beitragen. Ob GRASP eine Funktion in hämatopoetischen Zellen besitzt, könnte vermutlich durch eine GRASP knock-out-Maus geklärt werden.

## **4.2 Die CYTIP-Regulation durch Phosphorylierung und Degradation**

### **4.2.1 CYTIP wird PKC-vermittelt phosphoryliert**

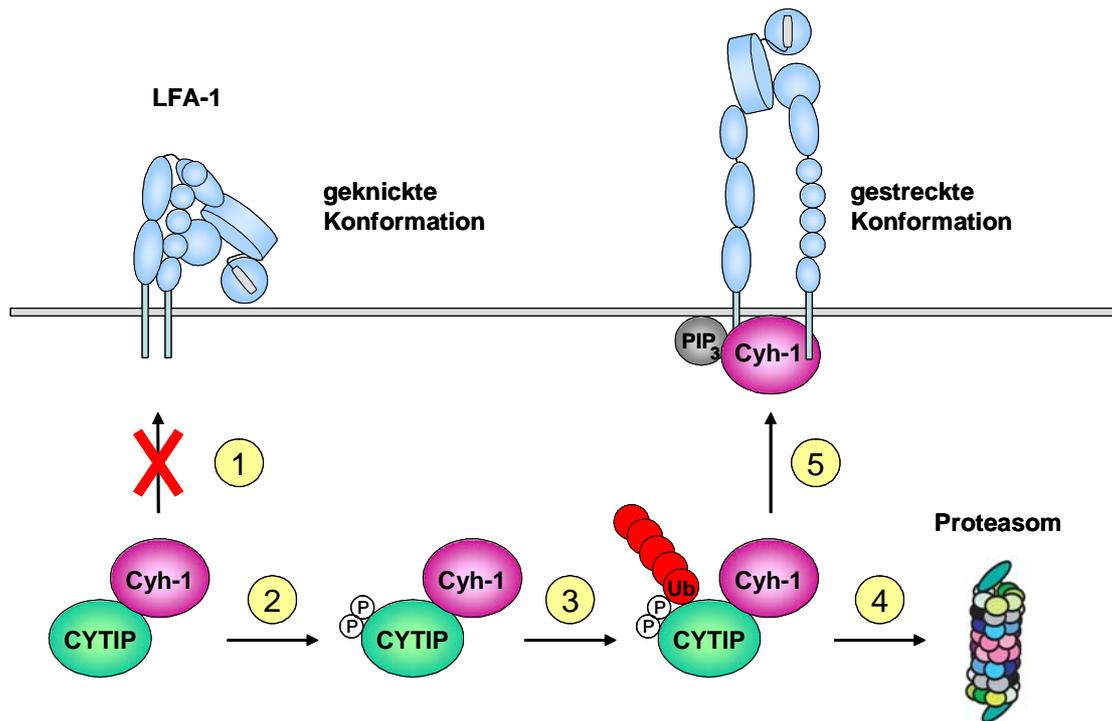
Das GRASP-homologe Protein CYTIP wird in Lymphozyten durch die Zytokine IL-2 und IL-12 sowie in dendritischen Zellen während der Reifung hochreguliert [Tang *et al.*, 2002; Boehm *et al.*, 2003]. Die Überexpression von CYTIP in Jurkat Zellen resultiert in einer Inhibition der LFA-1-vermittelten Adhäsion an ICAM-1. Durch die Adhäsion der Zellen an Integrin-Liganden wird überexprimiertes CYTIP an die Plasmamembran rekrutiert. In reifen dendritischen Zellen akkumuliert CYTIP an der Kontaktzone mit T-Zellen [Hofer *et al.*, 2005]. Der siRNA-vermittelte „knock-down“ der CYTIP-Expression führt zu einer verstärkten Adhäsion reifer dendritischer Zellen an Fibronektin sowie an immobilisierte T-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass CYTIP ein negativer Regulator Integrin-vermittelter Adhäsion ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass endogenes CYTIP in humanen PBL nach der Aktivierung von PKCs phosphoryliert und daraufhin degradiert wird. Die Phosphorylierung des Proteins konnte mittels Alkalischer Phosphatase gezeigt werden. In Jurkat Zellen überexprimiertes Ig-fusioniertes CYTIP wird nicht degradiert, sondern zeigt nach der Stimulation der Zellen mit dem Phorbolster PMA eine höher migrierende Doppelbande im Western Blot. Diese modifizierte Form des Ig-CYTIP wird durch *in-vitro*-Dephosphorylierung mittels Alkalischer Phosphatase entfernt und entsteht durch *in-vitro*-Phosphorylierung mittels PKC $\delta$  (Abb. 3.19 und 3.27). CYTIP enthält im C-terminalen Drittel der Aminosäuresequenz einen hohen Anteil an Serinen und Threoninen, die großenteils eng benachbart in „Clustern“ vorliegen (Abb. 3.29 D). Mit Hilfe C-terminaler Deletionsmutanten konnte die Region, die die Phosphorylierungsstellen enthält, ermittelt werden (Abb. 3.28). Punkt- und Doppelmutationen der Serine und Threonine in diesem Bereich zeigten, dass die Serine 241, 242, 244, 245 und 248 die hauptsächlich phosphorylierten Reste darstellen. Die Ig-fusionierte CYTIP-Mutante (Ig-CYTIP-Clu-2), in der diese fünf Serine gegen Alanine ausgetauscht sind, zeigt nach PMA-Stimulation keine modifizierte Form im Western Blot (Abb. 3.30) und die korrespondierende Mutante ohne Fusionsanteil wird nach PMA-Stimulation nicht degradiert (Abb. 3.31). Demnach ist die Degradation von CYTIP abhängig von der Phosphorylierung dieser Serine.

PMA ist ein Aktivator der c- und nPKCs sowie weiterer Proteine, die eine DAG-bindende C1-Domäne enthalten [Brose und Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2002; Geiger *et al.*, 2003]. Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die CYTIP-Phosphorylierung und die damit einhergehende Degradation PKC-abhängig sind (Abb. 3.24 und 3.25). Die CYTIP-Phosphorylierung sowie die Degradation werden durch den c- und nPKC Inhibitor Gö6850 vollständig blockiert, nicht jedoch durch den cPKC-Inhibitor Gö6976. Der Inhibitor Rottlerin, der spezifisch die nPKCs  $\delta$  und  $\theta$  hemmt, blockiert die PMA-induzierte Degradation des Proteins ebenfalls vollständig (Abb. 3.25).

Demnach wird die Phosphorylierung, die zur Degradation von CYTIP führt, durch die PKC $\delta$  und/oder die PKC $\theta$  oder durch eine nachgeschaltete Kinase katalysiert. Nachdem Ig-CYTIP *in vitro* durch die PKC $\delta$  phosphoryliert wird, ist anzunehmen, dass CYTIP direkt durch eine der beiden oder durch beide PKC-Isoenzyme phosphoryliert wird.

Da Cytohesin-1 ein positiver Regulator, CYTIP dagegen ein negativer Regulator LFA-1-vermittelter Adhäsion ist, könnte eine induzierte Degradation von CYTIP zur Aktivierung von LFA-1 beitragen. Von Katagiri *et al.* [1999] wurde gezeigt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System an der PMA-induzierten LFA-1-vermittelten Adhäsion in HL-60 Zellen beteiligt ist. Proteasomen-Inhibitoren verhinderten hier die PMA-induzierte LFA-1-Adhäsion und verursachten eine starke Akkumulation poly-ubiquitinerter Proteine in der Membran-Fraktion PMA-behandelter Zellen. Auf welche Weise CYTIP die LFA-1-vermittelte Adhäsion an ICAM-1 inhibiert, ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass CYTIP durch die Bindung an Cytohesin-1 dessen Interaktion mit der Integrin  $\beta_2$ -Kette verhindert. Durch die Degradation von CYTIP würde die Interaktion mit CD18 ermöglicht. Dieses Modell ist in folgendem Schema graphisch veranschaulicht.



**Abb. 4.1 Modell der LFA-1-Regulation durch Cytohesin-1 und CYTIP**

1) Die Interaktion mit CYTIP könnte die Bindung von Cytohesin-1 (Cyh-1) an die LFA-1- $\beta$ -Kette verhindern. 2) Durch die PMA-vermittelte Aktivierung von PKC-Isoenzymen wird die Phosphorylierung von CYTIP induziert. 3) Die Phosphorylierung von CYTIP löst seine Ubiquitinierung aus. 4) Die Ubiquitinierung resultiert in der proteasomalen Degradation von CYTIP. 5) Nicht an CYTIP gebundenes Cytohesin-1 kann nun mit der Integrin  $\beta_2$ -Kette interagieren und dadurch an der Aktivierung von LFA-1 mitwirken. P: Phosphat; Ub: Ubiquitin.

Da PKCs durch Signale des TCR aktiviert werden, wurde untersucht, ob die Stimulation des TCR die CYTIP-Degradation auslöst. Durch die Stimulation des TCR wird hauptsächlich die PKC $\theta$  aktiviert. Diese Kinase wird ins Zentrum der immunologischen Synapse rekrutiert und ist an der Aktivierung von NF $\kappa$ B und NF-AT beteiligt [Sun *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Pfeifhofer *et al.*, 2003]. PKC $\theta$ -defiziente T-Zellen zeigen daher eine reduzierte Induktion von IL-2 und der IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette und damit einhergehend eine schwächere Proliferation und verstärkte Anergie [Berg-Brown *et al.*, 2004]. Die PKC $\theta$  ist darüber hinaus wichtig für die T<sub>H</sub>2-Differenzierung [Marsland *et al.*, 2004].

Überexprimiertes Ig-CYTIP wird in Jurkat Zellen nach der Stimulation des TCR phosphoryliert (Abb. 3.32). Die TCR-induzierte Phosphorylierung ist jedoch im Vergleich zur PMA-induzierten schwächer. Da die PKC $\theta$  durch TCR-vermittelte

Signale aktiviert wird, könnte die TCR-induzierte CYTIP-Phosphorylierung durch diese Kinase katalysiert werden. Durch TCR-Stimulation humaner PBL tritt jedoch keine Degradation des endogenen Proteins ein. Da CYTIP durch die Adhäsion an Integrin-Liganden an die Plasmamembran rekrutiert wird, wurde geprüft, ob die Degradation des Proteins durch TCR-Stimulation adhärerter Zellen ausgelöst wird. Auch die TCR-Stimulation auf Fibronectin oder ICAM-1 adhärerter Zellen bewirkt keine Reduktion des Proteins (nicht gezeigt). Durch die zusätzliche Stimulation verschiedener kostimulatorischer Rezeptoren, wie CD28, ICOS, CD4, CD45 oder CD40L sowie durch das Chemokin CXCL12 wird die Degradation ebenfalls nicht induziert (nicht gezeigt). Einzig durch die Stimulation der Zellen in Serum-freiem HBSS über 16 Stunden mit OKT3/CD28 wird eine Reduktion von CYTIP bewirkt (Abb. 3.33). Somit scheint die Degradation von CYTIP nicht durch TCR-vermittelte Signale induziert zu werden und demnach keine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung zu spielen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die CYTIP-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene durch TCR-Stimulation induziert wird [Chen *et al.*, 2006]. Endogenes Cytohesin-1 wird in Jurkat Zellen nach TCR-Stimulation phosphoryliert (Abb. 3.32). Allerdings ist die TCR-induzierte Cytohesin-1-Phosphorylierung im Vergleich zur PMA-induzierten ebenfalls wesentlich schwächer und überdies nur bei kurzzeitiger Stimulation detektierbar. Die TCR-induzierte Phosphorylierung von Cytohesin-1 unterliegt demnach offenbar einer schnellen Dephosphorylierung. Durch die Stimulation mit dem Phorbolster PMA wird das Gleichgewicht dagegen vermutlich stark zur phosphorylierten Form verschoben. Möglicherweise ist auch die TCR-induzierte Phosphorylierung des endogenen CYTIP einer schnellen Dephosphorylierung unterworfen, so dass keine Degradation des Proteins eintritt. Weiterhin wäre denkbar, dass durch TCR-Stimulation eine nur lokal begrenzte CYTIP-Degradation an der Plasmamembran induziert wird, die unter der Detektionsgrenze liegen könnte.

Die PKC $\delta$  spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose [Ghayur *et al.*, 1996; Bharti *et al.*, 1998; Cross *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2003] sowie bei der Kontrolle des Zellwachstums [Watanabe *et al.*, 1992] und der Zell-Differenzierung [Mischak *et al.*, 1993; Emoto *et al.*, 1996]. Im Gegensatz zu den anderen PKCs ist dieses Isoenzym ein Tumor-Suppressor [Lu *et al.*, 1997; Brodie und Blumberg, 2003]. Die PKC $\delta$  wird ubiquitär exprimiert [Leibersperger *et al.*, 1991; Wetsel *et al.*, 1992]. Die stärkste Expression liegt in Milz, Lymphknoten, Thymus und Darm vor

[Miyamoto *et al.*, 2002]. PKC $\delta$ -defiziente Mäuse zeigen eine B-Zell-Hyperproliferation aufgrund einer verstärkten Expression von IL-6 [Miyamoto *et al.*, 2002]. Weiterhin treten in den knock-out-Mäusen gehäuft Autoimmunreaktionen durch autoreaktive Antikörper auf [Mecklenbrauker *et al.*, 2002]. Die PKC $\delta$  hat somit eine essentielle Funktion bei der Induktion der B-Zell-Anergie. Außerdem ist die PKC $\delta$  ein negativer Regulator der Mast-Zell-Degranulation und der T-Zell-Aktivierung [Leitges *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 2005]. PKC $\delta$  knock-out-Mäuse zeigen ein stark erhöhtes IL-2-Level im Blutplasma, jedoch keine Veränderung des IL-4-, IFN- $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - oder IL-6-Levels nach anti-CD3-Applikation *in vivo*. Im Einklang damit zeigen T-Zellen der PKC $\delta$  knock-out-Mäuse *in vitro* eine signifikant erhöhte Proliferation nach der Stimulation mit allogenen MHC.

CYTIP verstärkt die IL-2-Induktion nach TCR/CD28-Stimulation (Abb. 3.38). Überdies wird die CYTIP-Expression durch Signale des TCR induziert [Chen *et al.*, 2006]. Durch die Degradation von CYTIP könnte daher die IL-2-Expression eingedämmt werden. Nachdem die PKC $\delta$  ein negativer Regulator der IL-2-Induktion ist, wäre denkbar, dass eine PKC $\delta$ -vermittelte Phosphorylierung die CYTIP-Degradation auslösen könnte. Unter welchen physiologischen Bedingungen die PKC $\delta$  in T-Zellen aktiviert wird, ist jedoch nicht bekannt.

### 4.2.2 CYTIP wird durch Cytohesin-1 stabilisiert

Der siRNA-vermittelte „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression in humanen PBL führt zu einer Reduktion der CYTIP-Expression, während die Expression von Cytohesin-1 durch den „knock-down“ der CYTIP-Expression nicht beeinflusst wird (Abb. 3.35).

Die Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat Zellen resultiert in einer verstärkten Expression von koexprimiertem CYTIP, wobei sowohl die basale Expression erhöht, als auch die PMA-induzierte Degradation reduziert ist (Abb. 3.34). Da das Konstrukt zur Überexpression von CYTIP nur die CYTIP-codierende cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors und keine regulatorischen 3'- und 5'-untranslatierten Sequenzen enthält, ist anzunehmen, dass die verstärkte CYTIP-Expression durch eine Stabilisierung des Proteins bewirkt wird. Entsprechend könnte auch die beobachtete Reduktion von CYTIP durch den Cytohesin-1-„knock-down“ auf einer Destabilisierung beruhen. Die Koexpression von Cytohesin-1 bewirkt eine

Anreicherung höher migrierender CYTIP-Banden, die phosphorylierte Formen des Proteins darstellen (Abb. 3.34). Demnach wird phosphoryliertes CYTIP durch die Überexpression von Cytohesin-1 offenbar vor der Degradation geschützt. Diese Daten lassen vermuten, dass die Reduktion von CYTIP bei dem siRNA-vermittelten „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression, wie die PMA-induzierte Degradation, von einer Phosphorylierung des Proteins abhängt.

Möglicherweise unterliegt nicht an Cytohesin-1 gebundenes CYTIP einer konstitutiven Phosphorylierung, wodurch es für eine Degradation anfällig wird. CYTIP könnte durch die fehlende Interaktion mit Cytohesin-1 konformationsbedingt für eine Phosphorylierung leichter zugänglich sein. Weiterhin könnte diese durch eine veränderte Lokalisierung des ungebundenen CYTIP begünstigt werden. Ob die Reduktion von CYTIP in Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen von einer Phosphorylierung abhängt, könnte durch PKC-Inhibitoren überprüft werden. Die Expression von CYTIP sollte durch Gö6850 oder Rottlerin stabilisiert werden, falls die beobachtete Reduktion bei dem siRNA-vermittelten Cytohesin-1-„knock-down“ durch eine phosphorylierungsabhängige Degradation erfolgt.

Die Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP liegt möglicherweise nicht konstitutiv vor sondern könnte selbst einer Regulation unterliegen. Durch eine Trennung der Interaktionspartner könnte die Bindung von Cytohesin-1 an die zytoplasmatische Domäne von CD18 ermöglicht und CYTIP phosphorylierungsabhängig degradiert werden. Während der transendothelialen Migration und der Migration in peripheren lymphatischen Organen müssen räumliche Informationen eines Chemokin-Reizes integriert und in eine gerichtete Bewegung umgesetzt werden. Eine räumliche Regulation der Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP könnte zu einer Abfolge von LFA-1-Aktivierung und -Deaktivierung beitragen. Im vorderen Bereich der migrierenden Zelle könnte CYTIP so durch eine PKC-vermittelte Phosphorylierung der Degradation unterliegen, wodurch eine Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine durch Cytohesin-1 ermöglicht würde. Durch die Bindung an  $\beta_2$ -Liganden wird nicht-phosphoryliertes oder dephosphoryliertes CYTIP an die Plasmamembran rekrutiert und könnte dort die Interaktion zwischen Cytohesin-1 und der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta_2$ -Kette lösen. Dadurch könnte das Integrin in eine Konformation niedriger Affinität zurückfallen und die Trennung von gebundenem ICAM-1 erleichtert werden.

Die vorliegenden Daten zeigen an, dass die CYTIP-Expression durch eine posttranslationale Regulation an die Expression von Cytohesin-1 angepasst wird, wobei „überschüssiges“ CYTIP degradiert wird. Die Kopplung der CYTIP-Expression an Cytohesin-1 könnte bei der Regulation der LFA-1-vermittelten Adhäsion relevant sein, da Cytohesin-1 und CYTIP hierbei gegensätzliche Funktionen ausüben. Die Regulation der CYTIP-Stabilität könnte einen Mechanismus zur Modulation der Cytohesin-1-vermittelten LFA-1-Aktivierung darstellen. Durch die Stabilisierung von CYTIP durch Cytohesin-1 würde die Cytohesin-1-vermittelte Aktivierung von LFA-1 reprimiert, durch eine phosphorylierungsabhängige Degradation von CYTIP dagegen induziert.

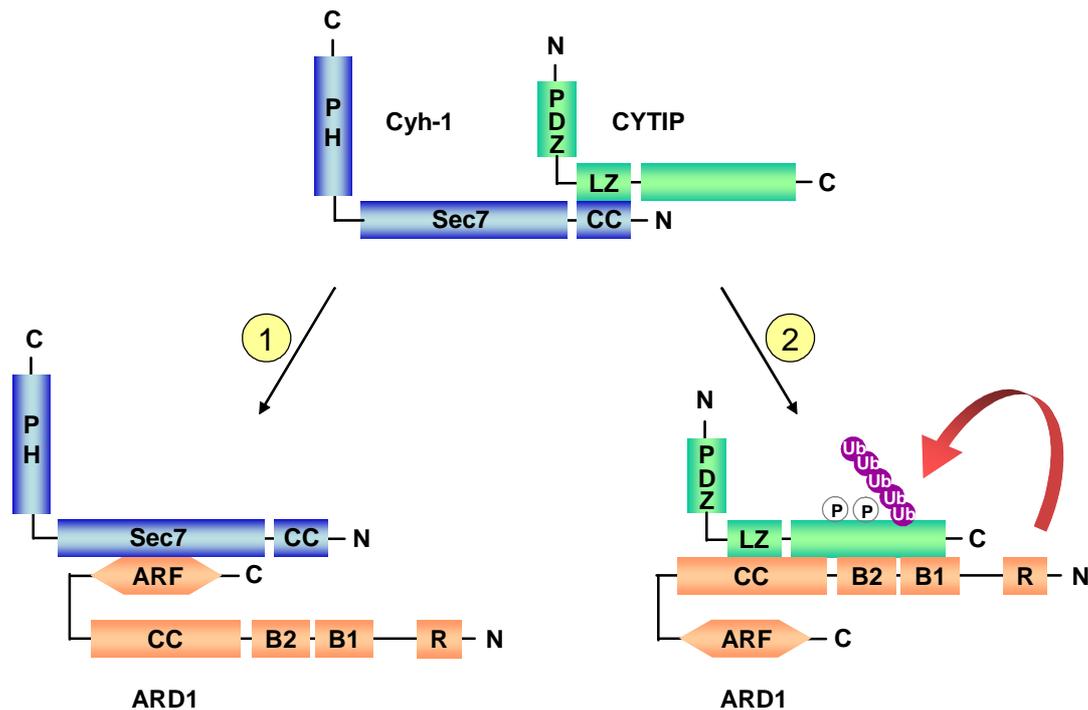
### **4.2.3 Mögliche Funktion von ARD1 bei der CYTIP-Degradation**

Die Stimulation mit dem Phorbolster PMA resultiert in einem raschen und annähernd vollständigen Verlust von CYTIP im Totallysat humaner PBL (Abb 3.17). Die Reduktion setzt dabei bereits nach wenigen Minuten der Stimulation ein. Nach einer 30-minütigen Stimulation ist das Protein meist nicht mehr im Totallysat nachzuweisen. Auch nach 16-stündiger Stimulation der Zellen ist CYTIP nicht wieder detektierbar. Die Reduktion von CYTIP tritt ebenso bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA und Ionophor ein, während die CYTIP-mRNA unter diesen Bedingungen induziert wird [Tang *et al.*, 2002].

Die Hemmung proteasomaler Degradation durch den Inhibitor MG132 bewirkt eine Stabilisierung des Proteins nach PMA-Stimulation, wohingegen die Inhibition lysosomaler Degradation durch Chloroquin keinen Effekt zeigt (Abb. 3.18, 3.25 und 3.26). Demnach erfolgt der phosphorylierungsabhängige Abbau des Proteins vermutlich durch proteasomale Degradation. Durch den Proteasomen-Inhibitor MG132 kommt es neben der Stabilisierung von CYTIP zu einer Anreicherung höher migrierender CYTIP-Banden. Diese höher migrierenden Banden stellen zum Teil phosphorylierte Formen des Proteins dar, da die unmodifizierte Form durch *in-vitro*-Dephosphorylierung mittels Alkalischer Phosphatase partiell wiederhergestellt wird (Abb 3.21). Weiterhin könnten die höher migrierenden Banden ubiquitinierte Formen des Proteins enthalten. Durch anti-Ubiquitin-Detektion von immunpräzipitiertem CYTIP gelang ein Nachweis der Poly-Ubiquitinierung von CYTIP bei kurzzeitiger PMA-Stimulation humaner PBL (Abb 3.23). Somit wird phosphoryliertes CYTIP sehr wahrscheinlich Ubiquitin-abhängig degradiert.

Das ARF-Domänen-Protein ARD1 ist ein multifunktionales Protein bestehend aus einem N-terminalen „Tripartite“-Motiv (TRIM) und einer funktionalen C-terminalen ARF-GTPase-Domäne [Vitale *et al.*, 1996]. ARD1 wird daher der TRIM/RBCC-(RING, B-Box, coiled-coil) Familie zugeordnet und auch als TRIM23 bezeichnet. ARD1 besitzt, wie die meisten Mitglieder der TRIM/RBCC-Familie, eine RING-abhängige Ubiquitin-Ligase-Aktivität [Vichi *et al.*, 2005]. Überexprimiertes CYTIP wird in COS-7 Zellen durch die Koexpression von ARD1 reduziert (Abb. 3.37). Dieses Resultat legt die Hypothese nahe, dass ARD1 die Ubiquitinierung von CYTIP katalysiert. Die Ubiquitin-Ligase-defekte Mutante ARD1 C34A verstärkt die Expression von überexprimiertem CYTIP in Jurkat Zellen [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass CYTIP ein Zielprotein der Ubiquitin-Ligase ARD1 ist.

Cytohesin-1 ist ein Interaktionspartner und spezifischer Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) der ARF-Domäne von ARD1 [Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998]. Überexprimiertes Cytohesin-1 zeigt eine partielle Kolokalisation mit der dominant negativen Mutante ARD1 T418N in COS-7 Zellen [Vitale *et al.*, 2000b]. Da Cytohesin-1 mit ARD1 interagiert, könnte CYTIP durch die Interaktion mit Cytohesin-1 in die Nähe von ARD1 gebracht werden und phosphorylierungsabhängig ubiquitiniert werden. Gegen dieses Modell spricht jedoch, dass die CYTIP-Degradation durch die Überexpression von Cytohesin-1 inhibiert und CYTIP bei einer verringerten Expression von Cytohesin-1 reduziert wird. Diese Daten legen vielmehr die Hypothese nahe, dass ARD1 alternativ mit Cytohesin-1 oder CYTIP interagieren könnte. Auf diese Weise würde nicht an Cytohesin-1 gebundenes, phosphoryliertes CYTIP durch ARD1 ubiquitiniert, wodurch die Expression von CYTIP an Cytohesin-1 angepasst würde. Eine erhöhte Expression von Cytohesin-1 könnte dagegen durch die Interaktion mit ARD1 die Degradation von CYTIP inhibieren. Weiterhin wäre denkbar, dass die Ubiquitin-Ligase-Aktivität durch den Aktivierungszustand der ARF-Domäne reguliert sein könnte. Um zu prüfen, ob CYTIP durch ARD1 ubiquitiniert wird, sind *in-vitro*-Ubiquitinierungs-Analysen mit gereinigtem ARD1 geplant. Folgendes Schema zeigt ein Modell einer möglichen Regulation der CYTIP-Expression durch Cytohesin-1 und ARD1.



**Abb. 4.2 Regulation der CYTIP-Stabilität durch Cytohesin-1 und ARD1**

Cytohesin-1 und CYTIP liegen als Komplex vor, wodurch CYTIP gegen eine Degradation geschützt wird. Durch die Trennung der Interaktion oder ein Ungleichgewicht der Expression zwischen Cytohesin-1 und CYTIP könnte ARD1 alternativ mit Cytohesin-1 oder CYTIP interagieren. 1) Nicht an CYTIP gebundenes Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch an der ARF-Domäne des ARD1 und könnte durch die Interaktion mit ARD1 die Degradation von CYTIP verhindern. 2) Nicht an Cytohesin-1 gebundenes CYTIP wird möglicherweise verstärkt phosphoryliert und könnte daraufhin durch ARD1 ubiquitiniert werden. B1, B2: B-Box 1 und 2; CC: coiled-coil-Domäne; LZ: Leucin-Zipper-Domäne; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne; P: Phosphat; R: RING-Domäne; Ub: Ubiquitin.

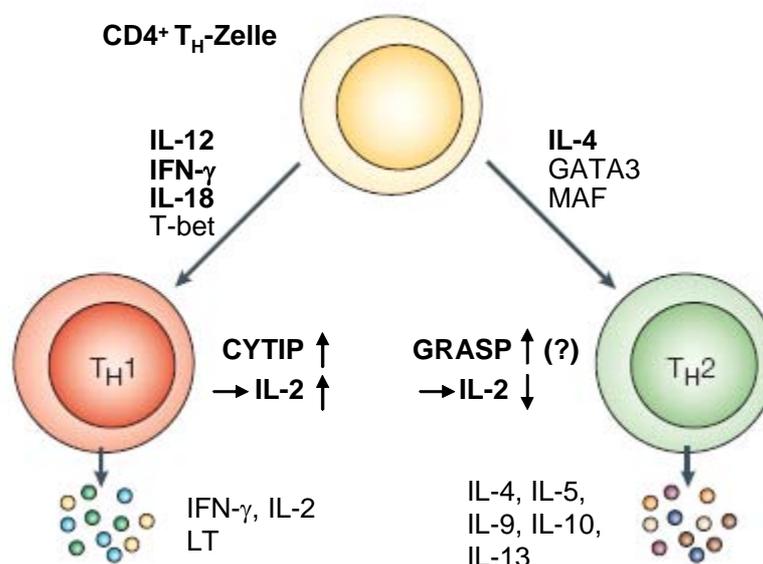
#### 4.2.4 CYTIP verstärkt die transkriptionelle Induktion des IL-2-Promotors

In IL-2-Luziferase-Reportergen-Analysen wurde festgestellt, dass CYTIP, im Gegensatz zu dem homologen Protein GRASP, die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors erhöht (Abb. 3.38). Die verstärkte IL-2-Induktion wurde dabei sowohl nach OKT3/CD28- als auch nach PMA/Ionophor-Stimulation beobachtet, was wiederum darauf hindeutet, dass CYTIP die IL-2-Induktion wie das homologe Protein GRASP nicht auf der Ebene TCR-proximaler Signale, sondern auf einer nachgeschalteten Ebene beeinflusst. CYTIP scheint demnach eine duale Funktion in T-Zellen zu besitzen indem es einerseits die LFA-1-vermittelte Adhäsion negativ, die IL-2-Transkription jedoch positiv reguliert. CYTIP knock-out-Mäuse zeigen eine Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut sowie eine Reduktion der Zellen in

peripheren Lymphknoten. Weiterhin wurde ein Defekt in der Zytokin-modulierten Wanderung der Leukozyten festgestellt [Coppola *et al.*, 2006].

CYTIP wird in PBL durch das  $T_H1$ -polarisierende Zytokin IL-12 induziert [Tang *et al.*, 2002]. Für GRASP wurde bislang nur eine Induktion der mRNA durch Retinolsäure in embryonalen P19 Karzinomzellen gezeigt [Nevrivy *et al.*, 2000]. In humanen PBL wird die GRASP-mRNA durch Retinolsäure sowie durch das  $T_H2$ -polarisierende Zytokin IL-4, nicht jedoch durch IL-12 induziert [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Die Induktion der GRASP-Expression durch IL-4 ist jedoch noch auf Protein-Ebene zu überprüfen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CYTIP und GRASP komplementär in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen exprimiert werden und gegensätzliche Funktionen bezüglich der IL-2-Expression ausüben. Während in  $T_H1$ -Zellen die IL-2-Expression durch die Induktion von CYTIP verstärkt wird, könnte die IL-2-Expression in  $T_H2$ -Zellen durch die Induktion von GRASP supprimiert werden. Diese Hypothese ist in folgendem Schema graphisch veranschaulicht.



**Abb. 4.3 IL-2-Regulation durch CYTIP und GRASP in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen**

Die Differenzierung  $CD4$ -positiver  $T_H$ -Zellen wird größtenteils durch Zytokine gesteuert. IL-12,  $IFN-\gamma$  und IL-18 begünstigen die  $T_H1$ -, IL-4 dagegen die  $T_H2$ -Differenzierung. Die Transkriptionsfaktoren T-bet bzw. GATA3 und MAF sind in die  $T_H1$ - bzw. die  $T_H2$ -Differenzierung involviert. Während CYTIP durch IL-12 induziert wird und die IL-2-Expression fördert, wird GRASP vermutlich durch IL-4 induziert und hemmt die IL-2-Expression. Abbildung verändert nach Schwartzberg *et al.* [2005].

### **4.3 Die funktionale Rolle von Cytohesin-1 bei der LFA-1-Regulation**

#### **4.3.1 Die LFA-1-Aktivierung ist abhängig von Cytohesin-1**

In Adhäsionstests wurde gezeigt, dass die LFA-1-vermittelte Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1 in primären Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen verringert ist, wobei die Expression von LFA-1 dadurch nicht beeinflusst wird (nicht gezeigt). Der spezifische „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression in humanen PBL wurde durch die Transfektion der Zellen mit der siRNA 754 induziert, wodurch eine Reduktion des Proteins um etwa 50% erzielt wurde. Die Adhäsion an ICAM-1 wurde in unstimulierten der Zellen und nach Stimulation mit OKT3, PMA und MEM48 analysiert. Die Reduktion der Cytohesin-1-Expression bewirkt eine Inhibition sowohl der basalen als auch der stimulierten Adhäsion (Abb. 3.39 und 3.40). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cytohesin-1 unabhängig von der jeweiligen Stimulation für die Adhäsion an ICAM-1 erforderlich ist.

Die Plasmamembran-Assoziation von Cytohesin-1 wird durch die Aktivierung der PI3-Kinase induziert und ist möglicherweise für die PI3-Kinase-induzierte Adhäsion wichtig [Nagel *et al.*, 1998b]. Die Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne und die daran anschließende C-terminale polybasische Region von Cytohesin-1 kooperieren in der Bindung an das Phospholipid PIP<sub>3</sub>, welches ein Produkt der PI3-Kinase ist [Nagel *et al.*, 1998a]. TCR- oder LFA-1-vermittelte Signale lösen die Aktivierung der PI3-Kinase aus [Shimizu und Hunt, 1996; Ward *et al.*, 1996; Axelsson *et al.*, 2000]. Durch Phorbolster-Stimulation wird die PI3-Kinase ebenfalls aktiviert. Während die Aktivierung nach TCR- oder LFA-1-Quervernetzung hauptsächlich über Tyrosin-Kinase-abhängige Signalwege erfolgt, wird die PI3-Kinase nach Phorbolster-Stimulation durch einen Ras-abhängigen Signalweg aktiviert. RasGRPs (*Ras guanyl releasing factor*) bilden eine Familie Ras-aktivierender Guaninnukleotid-Austauschfaktoren die durch Phorbolster/DAG und PKCs aktiviert werden [Izquierdo *et al.*, 1992; Ebinu *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2003]. Ras-GTP bindet an die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase und kann sie in Abhängigkeit von der regulatorischen Untereinheit aktivieren [Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996; Jimenez *et al.*, 2002]. Die verminderte Adhäsion der Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen nach OKT3-, PMA- bzw. MEM48-Stimulation könnte somit auf den Verlust der direkten Interaktion zwischen Cytohesin-1 und der LFA-1  $\beta$ -Kette und damit möglicherweise auf eine schwächere Aktivierung des Integrins zurückzuführen sein.

Die LFA-1-vermittelte Adhäsion hängt sowohl von der Aktivierung des Integrins, als auch von Liganden-induzierten, Integrin-vermittelten Signalen ab. Die Quervernetzung von LFA-1 löst die Aktivierung der PI3-Kinase sowie der PLC $\gamma$  aus [Kanner *et al.*, 1993; Axelsson *et al.*, 2000]. Die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> durch die PLC $\gamma$  resultiert in der Aktivierung von PKCs sowie in einem Calcium-Influx. Durch intrazelluläres Calcium wird die Protease Calpain aktiviert, die die proteolytische Spaltung des Proteins Talin katalysiert. Talin ist ein Gerüstprotein, das Integrine am Aktin-Zytoskelett verankert. Durch die proteolytische Spaltung von Talin werden Integrine temporär aus der Zytoskelett-Verankerung gelöst. Es wird vermutet, dass durch die temporäre Entkopplung vom Aktin-Zytoskelett die laterale Mobilität der Integrine in der Plasmamembran gesteigert und damit ein „Clustern“ der Rezeptoren auf der Zelloberfläche ermöglicht wird [Stewart *et al.*, 1998]. Das „Clustern“ der Integrine bewirkt eine erhöhte Avidität für den Liganden ICAM-1. Daher erlaubt die Quantifizierung der zellulären Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1 nicht, zwischen der Integrin-Aktivierung und Liganden-abhängigen, Integrin-vermittelten Signalen, die zur Adhäsion beitragen, zu unterscheiden. Demnach wäre denkbar, dass Cytohesin-1 an der LFA-1-Aktivierung oder an der Weiterleitung LFA-1-vermittelter Signale, oder an beiden Prozessen beteiligt ist.

Der monoklonale Antikörper 327C erkennt spezifisch eine induzierbare Konformation der  $\beta_2$ -I-ähnlichen Domäne, die mit hoher Affinität für lösliches ICAM-1 korreliert [Huth *et al.*, 2000; Beals *et al.*, 2001; Lupper *et al.*, 2001; Lum *et al.*, 2002]. Das 327C-Neoepitop ist durch lösliches ICAM-1, den aktivierenden CD18-Antikörper 240Q, PMA, T-Zell-Rezeptor-Stimulation sowie durch die Chemokine CXCL8, CXCL12 und CCL21 induzierbar [Beals *et al.*, 2001; Lum *et al.*, 2002; Shamri *et al.*, 2005]. Die Induktion des Neoepitops ist abhängig von Konformationsänderungen in der IDAS-Region der  $\alpha$ -Untereinheit und divalenten Kationen, jedoch unabhängig vom Aktin-Zytoskelett und der Anwesenheit des Liganden ICAM-1 [Beals *et al.*, 2001]. Daher ermöglicht es der 327C-Antikörper den Aktivierungszustand der  $\beta_2$ -Integrine unabhängig von Liganden-induzierten Signalen zu quantifizieren.

Mit Hilfe des 327C-Reporter-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 für die Induktion der hochaffinen  $\beta_2$ -Konformation erforderlich ist. In Cytohesin-1 „knock-down“-PBL wurde eine verminderte Induktion des Aktivierungsepitops nach OKT3-vermittelter TCR-Quervernetzung und der Stimulation mit dem Chemokin CXCL12 festgestellt (Abb 3.42). Durch die Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat

Zellen wird ein CD18-Neoepitop in der I-ähnlichen Domäne induziert, das durch den monoklonalen Antikörper mAb24 detektiert wird [Geiger *et al.*, 2000]. Das mAb24-Neoepitop ist in T-Zellen durch  $Mg^{++}$ /EGTA und PMA sowie schwach durch das Chemokin CXCL12 induzierbar [Shamri *et al.*, 2005]. Es zeigt eine gestreckte Konformation der  $\beta_2$ -Untereinheit an, die jedoch nicht unbedingt mit hoher Affinität assoziiert ist [Salas *et al.*, 2004]. Die basale Affinität für lösliches ICAM-1 wird durch die Überexpression von Cytohesin-1 nicht gesteigert [Geiger *et al.*, 2000].

Wie die Analyse des 327C-Neoepitops in Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen zeigt, ist Cytohesin-1 für die Induktion der hochaffinen Konformation erforderlich. Demnach scheint die Bindung von Cytohesin-1 an CD18 für die Induktion einer gestreckten Konformation hinreichend zu sein, nicht jedoch für die Induktion einer Konformation hoher Affinität. Die gestreckte Konformation der  $\beta_2$ -Kette könnte jedoch die Konformation hoher Affinität begünstigen oder eventuell dafür essentiell sein. Die räumliche Separation der  $\alpha_L$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit in der Membran-nahen Gelenk-Region stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung des Integrins dar [Hughes *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2003]. Cytohesin-1 bindet an ein Membran-nahes Motiv der CD18-Untereinheit [Geiger *et al.*, 2000]. Somit könnte die Bindung von Cytohesin-1 an der Separation der zytoplasmatischen Domänen der beiden Untereinheiten beteiligt sein und dadurch für die Aktivierung des Integrins durch intrazelluläre Signale unabkömmlich sein.

Cytohesin-1 „knock-down“-PBL zeigen eine verstärkte Expression von Cytohesin-3 (Abb 3.35). Wodurch die erhöhte Expression von Cytohesin-3 bewirkt wird, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Cytohesin-3 wird in anergen sowie in toleranten T-Zellen hochreguliert [Korthauer *et al.*, 2000; Bianca Paul, unveröffentlicht]. Überexprimiertes Cytohesin-3 verstärkt in Jurkat Zellen die LFA-1-vermittelte Adhäsion ähnlich wie Cytohesin-1, während Cytohesin-2 keinen Einfluss auf die Adhäsion an ICAM-1 zeigt [Korthauer *et al.*, 2000]. Somit könnte die erhöhte Expression von Cytohesin-3 den Adhäsionsdefekt, der durch die Reduktion der Cytohesin-1-Expression verursacht wird, partiell kompensieren.

### 4.3.2 Die GEF-Funktion ist für die LFA-1-Aktivierung nicht erforderlich

Das Molekül Secin H3 bindet spezifisch an die Sec7-Domäne der Mitglieder der Cytohesin-Familie, Cytohesin-1, -2 und -3 und inhibiert *in vitro* den Guaninnukleotid-Austausch, nicht jedoch die Bindung dieser GEFs an ARF1, mit einer halbmaximalen Inhibitionskonstante ( $IC_{50}$ ) von etwa 12  $\mu$ M (Markus Hafner, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe dieses Inhibitors konnte gezeigt werden, dass die Austauschfaktor-Aktivität der Cytohesine für die LFA-1-vermittelte Adhäsion wichtig ist, da die Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1 durch Secin H3 gehemmt wird (Abb. 3.40). Wie bei dem siRNA-vermittelten „knock-down“ der Cytohesin-1-Expression wird auch durch Secin H3 sowohl die basale als auch die OKT3-, PMA- und MEM48-stimulierte Adhäsion inhibiert. Die Hemmung der GEF-Aktivität in Cytohesin-1 „knock-down“-Zellen bewirkt eine zusätzliche Reduktion der Adhäsion. Die beobachtete Reduktion der Adhäsion durch Secin H3 könnte durch die Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität verursacht werden. Weiterhin könnte Secin H3 auch die Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CD18 inhibieren.

Die Relevanz der Cytohesin-1-GEF-Aktivität für die LFA-1-vermittelte Adhäsion konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden [Geiger *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2001]. Die Überexpression der GEF-defekten Mutante Cytohesin-1 E157K in Jurkat Zellen inhibiert die Adhäsion an ICAM-1 dominant, während die Bindung an CD18 durch die Mutation nicht beeinträchtigt wird [Geiger *et al.*, 2000]. Die Mutante Cytohesin-1 E157K induziert in gleicher Weise wie das Wildtyp-Protein das mAb24 Neoepitop der Integrin  $\beta_2$ -Kette. Demnach scheint die Aktivierung von LFA-1 unabhängig von der GEF-Funktion allein durch die Bindung an CD18 induziert zu werden. Darüber hinaus bindet die Sec7-Domäne offenbar nicht gleichzeitig an CD18 und ARF-GTPasen, da sowohl der Guaninnukleotid-Austausch als auch die Bindung an ARF1 spezifisch durch Peptide der zytoplasmatischen Domäne von CD18 inhibiert werden [Christiane Geiger und Thomas Knorr, unveröffentlicht]. Die Überexpression der Mutante Cytohesin-1 E157K resultiert in einem drastisch veränderten Phänotyp des Aktin-Zytoskeletts sowie in einem Defekt der Zellen in der Ausbreitung auf ICAM-1 als Adhäsionssubstrat (*spreading*) [Geiger *et al.*, 2000].

Die Beteiligung der GEF-Funktion an der LFA-1-vermittelten Adhäsion konnte weiterhin mittels des RNA-Aptamers M69 gezeigt werden [Mayer *et al.*, 2001]. Dieses RNA-Molekül bindet an die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 und -2 und

inhibiert *in vitro* den Guaninnukleotid-Austausch an ARF1 durch Cytohesin-1. Die Expression des M69-Aptamers in Jurkat Zellen ruft einen ähnlichen Aktin-Zytoskelett-Phänotyp hervor, wie die GEF-defekte Mutante Cytohesin-1 E157K und inhibiert die PMA-induzierte Adhäsion der Zellen an ICAM-1 [Mayer *et al.*, 2001].

Die Analyse des 327C-Neoepitops in PBL zeigte, dass die LFA-1-Aktivierung durch die Secin H3-vermittelte Inhibition der Cytohesin-GEF-Funktion nicht signifikant beeinträchtigt wird (Abb 3.43). Demnach scheint Secin H3 die Bindung von Cytohesin-1 an CD18 nicht zu inhibieren. Diese Annahme könnte durch Two-Hybrid-Analysen, *in-vitro*-Bindungsanalysen oder Koimmunpräzipitation von Cytohesin-1 und CD18 in Anwesenheit des Inhibitors überprüft werden. Nachdem die Induktion des 327C-Aktivierungsepitops durch Secin H3 nicht inhibiert wird, ist davon auszugehen, dass die reduzierte Adhäsion auf eine verminderte ARF-Aktivierung zurückzuführen ist.

ARF1 lokalisiert hauptsächlich im Golgi-Kompartiment und reguliert die Bildung von Vesikeln und deren Transport in sekretorischen Prozessen [Stearns *et al.*, 1990; Bonifacino und Glick, 2004]. ARF6 zeigt dagegen keinen Effekt auf die Golgi-Membran-Dynamik, sondern ist regulatorisch an der Phagozytose, Endozytose, dem Rezirkulieren von Endosomen und der Organisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts beteiligt [D'Souza-Schorey *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1995; Radhakrishna und Donaldson, 1997; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1999; Radhakrishna *et al.*, 1999; Schafer *et al.*, 2000]. Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch ARF6 ist für die Formation von Pseudopodien und Membran-„Ruffles“ sowie für die Migration erforderlich [D'Souza-Schorey *et al.*, 1997; Santy und Casanova, 2001].

Der Aktin-Zytoskelett-Phänotyp, der durch die Überexpression der Mutante Cytohesin-1 E157K oder des Aptamers M69 hervorgerufen wird, deutet auf eine Beteiligung von ARF6 hin, da diese ARF-GTPase die Modulation des Aktin-Zytoskeletts reguliert. Eine funktionale Rolle von ARF6 bei der LFA-1-vermittelten Adhäsion konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden. Die Überexpression der konstitutiv aktiven oder dominant negativen Mutanten von ARF1 oder ARF6 in der humanen T-Zell-Linie SKW3 zeigte keinen Einfluss auf die Adhäsion an ICAM-1 [Weber *et al.*, 2001]. ARF6 wird *in vitro* durch Cytohesin-1, -2 und -3 sowie durch die ebenfalls Brefeldin A- (BFA-) resistenten GEFs der EFA6-Familie und ARF GEP<sub>100</sub>/BRAG2 aktiviert [Frank *et al.*, 1998; Langille *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 1999;

Someya *et al.*, 2001; Dunphy *et al.*, 2006]. Ob ARF6 *in vivo* durch Cytohesin-1 aktiviert wird, ist nicht geklärt, da die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 an ARF6 *in vitro* durch PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> inhibiert wird [Knorr *et al.*, 2000].

Somit könnte der durch Secin H3 verursachte Adhäsionsdefekt auch auf eine Inhibition der ARF6-Aktivierung durch Cytohesin-2 und/oder Cytohesin-3 zurückzuführen sein, da Secin H3 keine Inhibition des EFA6-katalysierten Guaninnukleotid-Austausches bewirkt (Markus Hafner, persönliche Mitteilung). Über eine mögliche Inhibition der ARF GEP<sub>100</sub>/BRAG2-vermittelten Aktivierung von ARF6 durch Secin H3 ist bislang nichts bekannt. Weiterhin könnte der beobachtete Adhäsionsdefekt auch durch die verminderte Aktivierung eines anderen Mitglieds der ARF-Familie durch ein Mitglied der Cytohesin-Familie verursacht werden.

Um die spezifische Funktion der Austauschfaktor-Aktivität der einzelnen Mitglieder der Cytohesin-Familie getrennt untersuchen zu können, wären spezifische Inhibitoren der verschiedenen Sec7-Domänen erforderlich. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Domänen innerhalb der Familie, ist die Selektion solch spezifischer Moleküle jedoch vermutlich schwierig.

Nachdem Secin H3 keine Reduktion der Integrin-Aktivierung bewirkt, könnte die verminderte Adhäsion auf einen Defekt in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts zurückzuführen sein. Bislang wurde nicht untersucht, ob Secin H3 ähnliche zytoskelettale Veränderungen hervorruft wie die Mutante Cytohesin-1 E157K oder das Aptamer M69. Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts ist von entscheidender Bedeutung bei der Zell-Migration. Der Effekt des Cytohesin-GEF-Inhibitors auf die Zell-Migration wurde in Transwell-Boyden-Kammern untersucht. Secin H3 zeigt hier einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Migration humaner PBL. Die Wanderung der Zellen entlang des CXCL12-Gradienten wird bei einer Konzentration von 1 µM des Inhibitors verstärkt, während sie durch 5 oder 10 µM inhibiert wird (Abb. 3.41). Nachdem die halbmaximale Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität *in vitro* bei 12 µM liegt, scheint der Migrations-verstärkende Effekt durch 1 µM Secin H3 nicht auf einer Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität zu beruhen. Der Inhibitor wirkt sich in gleicher Weise auf die spontane wie auf die CXCL12-induzierte Migration aus. Demnach könnte die Inhibition der Cytohesin-GEF-Aktivität durch Secin H3 einen generellen Defekt in der Motilität der Zellen bewirken und nicht eine spezifische Inhibition der Chemokin-induzierten Migration.

Die vorliegenden Daten unterstützen ein Modell, nach welchem Cytohesin-1 eine duale Funktion bei der Regulation der LFA-1-vermittelten Adhäsion ausübt. Die direkte Interaktion des Proteins mit der Integrin  $\beta_2$ -Kette CD18 ist an der Aktivierung des Integrins beteiligt, wofür die GEF-Funktion jedoch nicht erforderlich ist. Obwohl die GEF-Funktion nicht zur Integrin-Aktivierung beiträgt, spielt sie dennoch eine Rolle bei der LFA-1-vermittelten Adhäsion sowie der Migration. Diese GEF-vermittelten Effekte könnten dabei durch eine ARF-abhängige Modulation des Aktin-Zytoskeletts bewirkt werden.

### 4.3.3 Mögliche Funktion von ARD1 als Cytohesin-1-Effektor

Die Bedeutung der Cytohesin-GEF-Funktion bei der Regulation der LFA-1-vermittelten Adhäsion wirft die Frage auf, welche GTPase der ARF-Familie *in vivo* durch Cytohesin-1 aktiviert wird. Wie zuvor erwähnt, katalysiert Cytohesin-1 *in vitro* den Guaninnukleotid-Austausch an ARF1, ARF6 und dem ARF-Domänen-Protein ARD1. Die Überexpression von ARF1 oder ARF6 beeinflusst die Adhäsion an ICAM-1 jedoch nicht [Weber *et al.*, 2001]. Die Aktivierung von ARF6 durch Cytohesin-1 ist aufgrund der Inhibition des Guaninnukleotid-Austauschs durch  $\text{PIP}_2$  und  $\text{PIP}_3$  unwahrscheinlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Adhäsion an ICAM-1 in humanen PBL durch den siRNA-vermittelten „knock-down“ der ARD1-Expression reduziert wird (Abb. 3.44). Da gegen ARD1 derzeit kein Antikörper erhältlich ist, konnte der „knock-down“ nicht auf Protein-Ebene überprüft werden. Die Expression und der siRNA-vermittelte „knock-down“ konnte jedoch mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt werden [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Der Adhäsionsdefekt der ARD1 „knock-down“-Zellen könnte durch eine verstärkte Expression und/oder reduzierte Degradation von CYTIP bewirkt werden, da CYTIP ein negativer Regulator der LFA-1-vermittelten Adhäsion ist und ARD1 sehr wahrscheinlich die Degradation des Proteins reguliert. Weiterhin könnte die ARF-GTPase-Funktion von ARD1 und deren Aktivierung durch Cytohesin-1 eine funktionale Rolle bei der Regulation der Adhäsion spielen. Über die Funktion der ARF-GTPase-Domäne von ARD1 ist bislang nichts bekannt. Aufgrund der Lokalisation des Proteins im Golgi-Kompartiment und an Lysosomen wurde eine Funktion im Vesikel-Transport zwischen diesen Kompartimenten postuliert [Vitale *et al.*, 2000a]. Koexprimiertes Cytohesin-1 und die konstitutiv in der GDP-Form

vorliegende Mutante ARD1 T418N zeigen in COS-7 Zellen eine partielle Kolokalisation. Die Kolokalisation liegt dabei partiell in vesikulären Strukturen vor, die möglicherweise Lysosomen darstellen. Es wäre denkbar, dass Cytohesin-1 ARD1 an die Plasmamembran rekrutieren könnte. Bisher liegen keine Daten darüber vor, ob ARD1 Phospholipasen, PIP-Kinasen oder Rho-GTPasen aktivieren kann. Die mögliche Beteiligung der ARF-GTPase-Funktion sowie der Ubiquitin-Ligase-Funktion von ARD1 bei der Regulation der Adhäsion könnte durch Überexpression der isolierten Domänen sowie konstitutiv aktiver und dominant negativer Mutanten untersucht werden. Die Untersuchung der Funktion der einzelnen Domänen des Proteins bei der Regulation der LFA-1-vermittelten Adhäsion könnte einen Ausgangspunkt nachfolgender Studien darstellen.

## 5 Ausblick

Die homologen Proteine CYTIP und GRASP vermitteln gegensätzliche Funktionen in T-Zellen. Während CYTIP die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors verstärkt, wird diese durch GRASP inhibiert. Die CYTIP-Expression wird in T<sub>H</sub>1-Zellen induziert [Tang *et al.*, 2002]. Eine komplementäre Induktion der GRASP-Expression in T<sub>H</sub>2-Zellen wurde auf mRNA-Ebene gezeigt [Ina Brillert, unveröffentlicht]. Da derzeit kein GRASP-spezifischer Antikörper erhältlich ist, konnte die Induktion der GRASP-Expression in T<sub>H</sub>2-Zellen noch nicht auf Protein-Ebene analysiert werden. GRASP wird nach TCR-Stimulation spezifisch an den beiden Tyrosinen des ITAM phosphoryliert. Die Funktion der ITAM-Phosphorylierung konnte jedoch nicht adressiert werden, da die ITAM-Mutante den gleichen inhibitorischen Effekt auf die IL-2-Induktion bewirkt, wie das Wildtyp-Protein. Insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Funktion von GRASP in T<sub>H</sub>2-Zellen wäre eine weiterführende Untersuchung der Bedeutung der ITAM-Phosphorylierung interessant. CYTIP ist ein negativer Regulator der LFA-1-vermittelten Adhäsion. Aufgrund der Interaktion von GRASP mit Cytohesin-1 könnte geprüft werden, ob auch GRASP an der LFA-1-Regulation beteiligt ist.

CYTIP wird in verschiedenen Zellen nach der Stimulation mit PMA rasch und annähernd vollständig degradiert. Es wurde gezeigt, dass die Degradation von einer PKC-vermittelten CYTIP-Phosphorylierung abhängt. Aufgrund der überlappenden Spezifitäten der PKC-Inhibitoren konnte die Phosphorylierung und die daraus resultierende Degradation jedoch nicht eindeutig einem PKC-Isoenzym zugeordnet werden, sondern könnte durch die PKC $\delta$  und/oder die PKC $\theta$  vermittelt werden. T-Zellen von PKC $\delta$  und PKC $\theta$  knock-out-Mäusen könnten die eindeutige Identifizierung des beteiligten PKC-Isoenzym ermöglichen und ließen damit eventuell Rückschlüsse auf einen Signalweg zu, durch den die Degradation induziert wird.

Die E3 Ubiquitin-Ligase ARD1 interagiert spezifisch mit Cytohesin-1. In dieser Arbeit wurden Hinweise dafür erhalten, dass ARD1 die Ubiquitinierung von CYTIP katalysiert, da die Expression von CYTIP durch die Koexpression von ARD1 reduziert wird. Um diese Daten zu überprüfen sind *in-vitro*-Ubiquitinierungsversuche mit gereinigtem ARD1 geplant.

## 6 Zusammenfassung

Das Integrin LFA-1 ist essentiell für die Adhäsion und Migration der Leukozyten. Cytohesin-1 ist ein direkter Interaktionspartner und positiver Regulator des Integrins LFA-1 und katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch an GTPasen der ARF-Familie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden homologen Cytohesin-Interaktionspartner CYTIP und GRASP untersucht.

Während CYTIP mit Cytohesin-1, -2 und -3 interagiert, war für GRASP bislang nur eine Interaktion mit Cytohesin-2 und -3 bekannt. Mittels Koimmunpräzipitation und intrazellulärer Kolokalisation wurde eine Interaktion zwischen GRASP und Cytohesin-1 nachgewiesen. GRASP lokalisiert in T-Zellen an der Plasmamembran. Die Plasmamembran-Assoziation wird durch die Stimulation mit dem Phorbolester PMA reduziert, bleibt jedoch in Cytohesin-1-koexprimierenden Zellen erhalten. Dies zeigt, dass GRASP partiell durch Cytohesin-1 an die Plasmamembran rekrutiert wird.

Die beiden homologen Proteine GRASP und CYTIP vermitteln gegensätzliche Funktionen in T-Zellen. Während CYTIP die transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors verstärkt, wird diese durch GRASP inhibiert. Die Expression von CYTIP wird bei der  $T_H1$ -Differenzierung induziert [Tang *et al.*, 2002], die GRASP-mRNA wird dagegen durch das  $T_H2$ -polarisierende Zytokin IL-4, nicht jedoch durch IL-12 induziert. Demnach könnten CYTIP und GRASP bezüglich der Regulation der IL-2-Expression komplementäre Funktionen in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen ausüben.

GRASP besitzt ein typisches ITAM-Motiv, welches in CYTIP nicht konserviert ist. Durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird GRASP spezifisch an den beiden Tyrosinen dieses Motivs phosphoryliert. Der inhibitorische Effekt auf die Induktion des IL-2-Promotors ist jedoch unabhängig von der Integrität des ITAM.

CYTIP wird in humanen PBL nach Phorbolester-Stimulation rasch und annähernd vollständig degradiert. Die Degradation konnte auf eine PKC $\delta$ - oder PKC $\theta$ -vermittelte CYTIP-Phosphorylierung zurückgeführt werden. Die Stabilität von CYTIP ist überdies abhängig von Cytohesin-1. Da CYTIP ein negativer Regulator der LFA-1-vermittelten Adhäsion ist, könnte die induzierte Degradation von CYTIP sowie die Kopplung der CYTIP-Expression an Cytohesin-1 eine Rolle bei der Regulation der LFA-1-vermittelten Adhäsion spielen.

Die Ubiquitin-Ligase ARD1 interagiert spezifisch mit Cytohesin-1 [Vitale *et al.*, 2000b]. Die Expression von CYTIP wird durch die Koexpression von ARD1 reduziert. Demnach ist ARD1 an der Degradation von CYTIP beteiligt und könnte die CYTIP-Ubiquitinierung katalysieren. Der siRNA-vermittelte „knock-down“ der ARD1-Expression resultiert in einer verminderten Adhäsion humaner PBL an immobilisiertes ICAM-1. Dieser inhibitorische Effekt auf die LFA-1-Adhäsion könnte auf eine Stabilisierung von CYTIP zurückzuführen sein. Andererseits könnte auch die Cytohesin-1-katalysierte Aktivierung der ARF-GTPase-Domäne von ARD1 hierbei eine Rolle spielen.

Cytohesin-1 ist für die LFA-1-vermittelte Adhäsion sowie für die LFA-1-Aktivierung erforderlich, da sowohl die Adhäsion an ICAM-1 als auch die Induktion des mit hoher Affinität assoziierten 327C-Neoepitops durch die siRNA-induzierte Reduktion der Cytohesin-1-Expression inhibiert werden. Die Guaninnukleotid-Austauschfaktor-Aktivität der Mitglieder der Cytohesin-Familie ist für die Adhäsion an ICAM-1, nicht jedoch für die LFA-1-Aktivierung erforderlich, da diese durch den Cytohesin-spezifischen Inhibitor Secin H3 nicht inhibiert wird. Durch diese Ergebnisse konnte ein Modell einer dualen Funktion von Cytohesin-1 bestätigt werden, nach dem die Cytohesin-GEF-Funktion zwar für die LFA-vermittelte Adhäsion, nicht jedoch für die konformationsbedingte Aktivierung des Integrins essentiell ist.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abraham, C., Griffith, J. und Miller, J.** "The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand." *J Immunol*, 1999, 162(8), pp. 4399-405.

**Agnello, D., Lankford, C. S. R., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J. J. und Frucht, D. M.** "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." *J Clin Immunol*, 2003, 23(3), pp. 147-61.

**Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E. und Springer, T. A.** "The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1." *J Cell Biol*, 1995, 128(6), pp. 1243-53.

**Amigorena, S. und Bonnerot, C.** "Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing." *Immunol Rev*, 1999, 172pp. 279-84.

**Appleman, L. J., van Puijenbroek, A. A. F. L., Shu, K. M., Nadler, L. M. und Boussiotis, V. A.** "CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells." *J Immunol*, 2002, 168(6), pp. 2729-36.

**Ashery, U., Koch, H., Scheuss, V., Brose, N. und Rettig, J.** "A presynaptic role for the ADP ribosylation factor (ARF)-specific GDP/GTP exchange factor msec7-1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(3), pp. 1094-9.

**Axelsson, L., Hellberg, C., Melander, F., Smith, D., Zheng, L. und Andersson, T.** "Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase." *Exp Cell Res*, 2000, 256(1), pp. 257-63.

**Beals, C. R., Edwards, A. C., Gottschalk, R. J., Kuijpers, T. W. und Staunton, D. E.** "CD18 activation epitopes induced by leukocyte activation." *J Immunol*, 2001, 167(11), pp. 6113-22.

**Berg-Brown, N. N., Gronski, M. A., Jones, R. G., Elford, A. R., Deenick, E. K., Odermatt, B., Littman, D. R. und Ohashi, P. S.** "PKCtheta signals activation versus tolerance in vivo." *J Exp Med*, 2004, 199(6), pp. 743-52.

**Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L. und Butcher, E. C.** "alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow." *Cell*, 1995, 80(3), pp. 413-22.

**Besser, M. und Wank, R.** "Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors." *J Immunol*, 1999, 162(11), pp. 6303-6.

**Bharti, A., Kraeft, S. K., Gounder, M., Pandey, P., Jin, S., Yuan, Z. M., Lees-Miller, S. P., Weichselbaum, R., Weaver, D., Chen, L. B., Kufe, D. und Kharbanda, S.** "Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis." *Mol Cell Biol*, 1998, 18(11), pp. 6719-28.

**Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M. J. und Altman, A.** "Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation." *Nat Immunol*, 2001, 2(6), pp. 556-63.

**Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A. und Springer, T. A.** "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *J Exp Med*, 1996, 184(3), pp. 1101-9.

**Boehm, T., Hofer, S., Winklehner, P., Kellersch, B., Geiger, C., Trockenbacher, A., Neyer, S., Fiegl, H., Ebner, S., Ivarsson, L., Schneider, R., Kremmer, E., Heufler, C. und Kolanus, W.** "Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration." *EMBO J*, 2003, 22(5), pp. 1014-24.

**Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. und Thompson, C. B.** "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity*, 1995, 3(1), pp. 87-98.

**Bonifacino, J. S. und Glick, B. S.** "The mechanisms of vesicle budding and fusion." *Cell*, 2004, 116(2), pp. 153-66.

**Brodie, C. und Blumberg, P. M.** "Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta." *Apoptosis*, 2003, 8(1), pp. 19-27.

**Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. und Dustin, M. L.** "The immunological synapse." *Annu Rev Immunol*, 2001, 19pp. 375-96.

**Brose, N. und Rosenmund, C.** "Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters." *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 23), pp. 4399-411.

**Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. und Sternweis, P. C.** "ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity." *Cell*, 1993, 75(6), pp. 1137-44.

**Burgi, B., Otten, U. H., Ochensberger, B., Rihs, S., Heese, K., Ehrhard, P. B., Ibanez, C. F. und Dahinden, C. A.** "Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor." *J Immunol*, 1996, 157(12), pp. 5582-8.

- Campbell, D. J., Kim, C. H. und Butcher, E. C.** "Chemokines in the systemic organization of immunity." *Immunol Rev*, 2003, 195pp. 58-71.
- Casadaban, M. J. und Cohen, S. N.** "Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*." *J Mol Biol*, 1980, 138(2), pp. 179-207.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C.** "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science*, 1994, 263(5148), pp. 802-5.
- Chen, Q., Coffey, A., Bourgoin, S. G. und Gadina, M.** "Cytohesin binder and regulator augments T cell receptor-induced NFAT-AP-1 activation through regulation of the JNK Pathway." *J Biol Chem*, 2006, 281(29), pp. 19985-94.
- Clipstone, N. A. und Crabtree, G. R.** "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." *Nature*, 1992, 357(6380), pp. 695-7.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C. und Laudanna, C.** "Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow." *Immunity*, 2000, 13(6), pp. 759-69.
- Coppola, V., Barrick, C. A., Bobisse, S., Rodriguez-Galan, M. C., Pivetta, M., Reynolds, D., Howard, O. M. Z., Palko, M. E., Esteban, P. F., Young, H. A., Rosato, A. und Tessarollo, L.** "The scaffold protein cybr is required for cytokine-modulated trafficking of leukocytes in vivo." *Mol Cell Biol*, 2006, 26(14), pp. 5249-58.
- Cox, R., Mason-Gamer, R. J., Jackson, C. L. und Segev, N.** "Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers." *Mol Biol Cell*, 2004, 15(4), pp. 1487-505.
- Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., Gosselin, M., Owen, L. R., Rudd, C. E. und Gutierrez-Ramos, J. C.** "The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses." *Immunity*, 2000, 13(1), pp. 95-105.
- Cross, T., Griffiths, G., Deacon, E., Sallis, R., Gough, M., Watters, D. und Lord, J. M.** "PKC-delta is an apoptotic lamin kinase." *Oncogene*, 2000, 19(19), pp. 2331-7.
- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M. und Moser, B.** "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." *Eur J Immunol*, 1997, 27(7), pp. 1788-93.
- D'Souza-Schorey, C. und Chavrier, P.** "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5), pp. 347-58.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R. L., McDonough, M., Stahl, P. D. und Van Aelst, L.** "A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements." *EMBO J*, 1997, 16(17), pp. 5445-54.

**D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M. I. und Stahl, P. D.** "A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis." *Science*, 1995, 267(5201), pp. 1175-8.

**D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Yang, C., Stahl, P. D. und Peters, P. J.** "ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation." *J Cell Biol*, 1998, 140(3), pp. 603-16.

**Dierks, H., Kolanus, J. und Kolanus, W.** "Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain." *J Biol Chem*, 2001, 276(40), pp. 37472-81.

**Du, Z., Lang, S. M., Sasseville, V. G., Lackner, A. A., Ilyinskii, P. O., Daniel, M. D., Jung, J. U. und Desrosiers, R. C.** "Identification of a nef allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys." *Cell*, 1995, 82(4), pp. 665-74.

**Dunphy, J. L., Moravec, R., Ly, K., Lasell, T. K., Melancon, P. und Casanova, J. E.** "The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins." *Curr Biol*, 2006, 16(3), pp. 315-20.

**Dustin, M. L. und Cooper, J. A.** "The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling." *Nat Immunol*, 2000, 1(1), pp. 23-9.

**Dustin, M. L. und Springer, T. A.** "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1." *Nature*, 1989, 341(6243), pp. 619-24.

**Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J. und Stone, J. C.** "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." *Science*, 1998, 280(5366), pp. 1082-6.

**Ehrhard, P. B., Erb, P., Graumann, U., Schmutz, B. und Otten, U.** "Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation." *J Immunol*, 1994, 152(6), pp. 2705-9.

**Emoto, Y., Kisaki, H., Manome, Y., Kharbanda, S. und Kufe, D.** "Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine." *Blood*, 1996, 87(5), pp. 1990-6.

**Esteban, P. F., Yoon, H., Becker, J., Dorsey, S. G., Caprari, P., Palko, M. E., Coppola, V., Saragovi, H. U., Randazzo, P. A. und Tessarollo, L.** "A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin." *J Cell Biol*, 2006, 173(2), pp. 291-9.

**Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. und Schreiber, S. L.** "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." *Science*, 1995, 268(5211), pp. 726-31.

**Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. und Weiss, A.** "LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway." *Immunity*, 1998, 9(5), pp. 617-26.

- Fodor, S., Jakus, Z. und Mocsai, A.** "ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response." *Immunol Lett*, 2006, 104(1-2), pp. 29-37.
- Forchhammer, K. und Tandeau de Marsac, N.** "The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status." *J Bacteriol*, 1994, 176(1), pp. 84-91.
- Franco, M., Peters, P. J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. und Chavrier, P.** "EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization." *EMBO J*, 1999, 18(6), pp. 1480-91.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S. H. und Casanova, J. E.** "ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6." *J Biol Chem*, 1998, 273(1), pp. 23-7.
- Friedl, P., den Boer, A. T. und Gunzer, M.** "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(7), pp. 532-45.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K. S. und Kolanus, W.** "Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1." *EMBO J*, 2000, 19(11), pp. 2525-36.
- Geiger, M., Wrulich, O. A., Jenny, M., Schwaiger, W., Grunicke, H. H. und Uberall, F.** "Defining the human targets of phorbol ester and diacylglycerol." *Curr Opin Mol Ther*, 2003, 5(6), pp. 631-41.
- Geimonen, E., LaMonica, R., Springer, K., Farooqui, Y., Gavrillovskaya, I. N. und Mackow, E. R.** "Hantavirus pulmonary syndrome-associated hantaviruses contain conserved and functional ITAM signaling elements." *J Virol*, 2003, 77(2), pp. 1638-43.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. und Kufe, D.** "Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis." *J Exp Med*, 1996, 184(6), pp. 2399-404.
- Gluzman, Y.** "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell*, 1981, 23(1), pp. 175-82.
- Gonzalez-Amaro, R. und Sanchez-Madrid, F.** "Cell adhesion molecules: selectins and integrins." *Crit Rev Immunol*, 1999, 19(5-6), pp. 389-429.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. und Dustin, M. L.** "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science*, 1999, 285(5425), pp. 221-7.

**Grande, S. M., Katz, E., Crowley, J. E., Bernardini, M. S., Ross, S. R. und Monroe, J. G.** "Cellular ITAM-containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells." *Oncogene*, 2006, 25(19), pp. 2748-57.

**Greenwald, R. J., Freeman, G. J. und Sharpe, A. H.** "The B7 family revisited." *Annu Rev Immunol*, 2005, 23pp. 515-48.

**Griffiths, E. K., Krawczyk, C., Kong, Y. Y., Raab, M., Hyduk, S. J., Bouchard, D., Chan, V. S., Kozieradzki, I., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Wakeham, A., Ohashi, P. S., Cybulsky, M. I., Rudd, C. E. und Penninger, J. M.** "Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap." *Science*, 2001, 293(5538), pp. 2260-3.

**Gruber, T., Barsig, J., Pfeifhofer, C., Ghaffari-Tabrizi, N., Tinhofer, I., Leitges, M. und Baier, G.** "PKCdelta is involved in signal attenuation in CD3+ T cells." *Immunol Lett*, 2005, 96(2), pp. 291-3.

**Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. und Marks, F.** "Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor." *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 199(1), pp. 93-8.

**Hanahan, D.** "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol*, 1983, 166(4), pp. 557-80.

**Hermann-Kleiter, N., Thuille, N., Pfeifhofer, C., Gruber, T., Schafer, M., Zitt, C., Hatzelmann, A., Schudt, C., Leitges, M. und Baier, G.** "PKCtheta and PKA are antagonistic partners in the NF-AT transactivation pathway of primary mouse CD3+ T lymphocytes." *Blood*, 2006, 107(12), pp. 4841-8.

**Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., Yanagi, S., Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H. und Nakanishi, S.** "Phosphorylation and recruitment of Syk by immunoreceptor tyrosine-based activation motif-based phosphorylation of tamalin." *J Biol Chem*, 2004, 279(31), pp. 32308-15.

**Hofer, S., Pfeil, K., Niederegger, H., Ebner, S., Nguyen, V. A., Kremmer, E., Auffinger, M., Neyer, S., Furhapter, C. und Heufler, C.** "Dendritic cells regulate T-cell de-attachment through the integrin-interacting protein CYTIP." *Blood*, 2005, 107, pp. 1003-9.

**Hogg, N. und Bates, P. A.** "Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes." *Matrix Biol*, 2000, 19(3), pp. 211-22.

**Honda, A., Nogami, M., Yokozeiki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. und Kanaho, Y.** "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." *Cell*, 1999, 99(5), pp. 521-32.

**Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., Urdal, D. L. und Conlon, D. J.** "A short polypeptide tag sequence useful for recombinant protein identification and purification." *Biotechnology*, 1988, 6, pp. 1204-10.

- Huang, J., Lo, P., Zal, T., Gascoigne, N. R. J., Smith, B. A., Levin, S. D. und Grey, H. M.** "CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(14), pp. 9369-73.
- Hughes, P. E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J. A., Shattil, S. J. und Ginsberg, M. H.** "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." *J Biol Chem*, 1996, 271(12), pp. 6571-4.
- Huh, M., Han, J., Lim, C., Lee, S., Kim, S., Kim, E. und Kaang, B.** "Regulation of neuriteogenesis and synaptic transmission by msec7-1, a guanine nucleotide exchange factor, in cultured Aplysia neurons." *J Neurochem*, 2003, 85(1), pp. 282-5.
- Huth, J. R., Olejniczak, E. T., Mendoza, R., Liang, H., Harris, E. A., Lupher, M. L. J., Wilson, A. E., Fesik, S. W. und Staunton, D. E.** "NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(10), pp. 5231-6.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. und Kroczeck, R. A.** "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." *Nature*, 1999, 397(6716), pp. 263-6.
- Hynes, R. O.** "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell*, 1992, 69(1), pp. 11-25.
- Isakov, N.** "Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades." *J Leukoc Biol*, 1997, 61(1), pp. 6-16.
- Iwata, M., Eshima, Y. und Kagechika, H.** "Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors." *Int Immunol*, 2003, 15(8), pp. 1017-25.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. und Song, S.** "Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells." *Immunity*, 2004, 21(4), pp. 527-38.
- Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J. D. und Cantrell, D. A.** "Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells." *Mol Cell Biol*, 1992, 12(7), pp. 3305-12.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B. und Carrera, A. C.** "The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras." *J Biol Chem*, 2002, 277(44), pp. 41556-62.
- Kane, L. P., Andres, P. G., Howland, K. C., Abbas, A. K. und Weiss, A.** "Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines." *Nat Immunol*, 2001, 2(1), pp. 37-44.
- Kanner, S. B., Grosmaire, L. S., Ledbetter, J. A. und Damle, N. K.** "Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(15), pp. 7099-103.

**Katagiri, K., Yokosawa, H., Kinashi, T., Kawashima, S., Irie, S., Tanaka, K. und Katagiri, T.** "Ubiquitin-proteasome system is involved in induction of LFA-1/ICAM-1-dependent adhesion of HL-60 cells." *J Leukoc Biol*, 1999, 65(6), pp. 778-85.

**Kazanietz, M. G.** "Novel nonkinase phorbol ester receptors: the C1 domain connection." *Mol Pharmacol*, 2002, 61(4), pp. 759-67.

**Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Delecluse, H. J., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W. und Hammerschmidt, W.** "B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2." *EMBO J*, 1995, 14(1), pp. 88-96.

**Kim, M., Carman, C. V. und Springer, T. A.** "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." *Science*, 2003, 301(5640), pp. 1720-5.

**Kimura, K., Kitano, J., Nakajima, Y. und Nakanishi, S.** "Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction." *Genes Cells*, 2004, 9(7), pp. 631-40.

**Kinashi, T.** "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(7), pp. 546-59.

**Kinashi, T. und Katagiri, K.** "Regulation of immune cell adhesion and migration by regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues." *Immunology*, 2005, 116(2), pp. 164-71.

**Kisselev, A. F. und Goldberg, A. L.** "Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates." *Chem Biol*, 2001, 8(8), pp. 739-58.

**Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y. und Nakanishi, S.** "Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins." *J Neurosci*, 2002, 22(4), pp. 1280-9.

**Kitano, J., Yamazaki, Y., Kimura, K., Masukado, T., Nakajima, Y. und Nakanishi, S.** "Tamalin is a scaffold protein that interacts with multiple neuronal proteins in distinct modes of protein-protein association." *J Biol Chem*, 2003, 278(17), pp. 14762-8.

**Klein, J., Iovino, M., Vakil, M., Shinozaki, H. und Loffelholz, K.** "Ontogenetic and pharmacological studies on metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D activation." *Neuropharmacology*, 1997, 36(3), pp. 305-11.

**Knorr, T., Nagel, W. und Kolanus, W.** "Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system." *Eur J Biochem*, 2000, 267(12), pp. 3784-91.

- Kolanus, W. und Seed, B.** "Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3." *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(5), pp. 725-31.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. und Seed, B.** "Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule." *Cell*, 1996, 86(2), pp. 233-42.
- van Kooyk, Y. und Figdor, C. G.** "Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion." *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(5), pp. 542-7.
- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T. W. und Figdor, C. G.** "Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes." *Nature*, 1989, 342(6251), pp. 811-3.
- Korthauer, U., Nagel, W., Davis, E. M., Le Beau, M. M., Menon, R. S., Mitchell, E. O., Kozak, C. A., Kolanus, W. und Bluestone, J. A.** "Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family." *J Immunol*, 2000, 164(1), pp. 308-18.
- Lagunoff, M., Majeti, R., Weiss, A. und Ganem, D.** "Deregulated signal transduction by the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(10), pp. 5704-9.
- Langille, S. E., Patki, V., Klarlund, J. K., Buxton, J. M., Holik, J. J., Chawla, A., Corvera, S. und Czech, M. P.** "ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1." *J Biol Chem*, 1999, 274(38), pp. 27099-104.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. und Phillips, J. H.** "Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells." *Nature*, 1998, 391(6668), pp. 703-7.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. und Liddington, R.** "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." *Cell*, 1995, 80(4), pp. 631-8.
- Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M. und Marks, F.** "Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta-type in different species and murine tissues. Predominance in epidermis." *J Biol Chem*, 1991, 266(22), pp. 14778-84.
- Leitges, M., Gimborn, K., Elis, W., Kalesnikoff, J., Hughes, M. R., Krystal, G. und Huber, M.** "Protein kinase C-delta is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation." *Mol Cell Biol*, 2002, 22(12), pp. 3970-80.
- Levi-Montalcini, R., Skaper, S. D., Dal Toso, R., Petrelli, L. und Leon, A.** "Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin." *Trends Neurosci*, 1996, 19(11), pp. 514-20.
- Lin, J., Miller, M. J. und Shaw, A. S.** "The c-SMAC: sorting it all out (or in)." *J Cell Biol*, 2005, 170(2), pp. 177-82.

- Lu, C., Ferzly, M., Takagi, J. und Springer, T. A.** "Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation." *J Immunol*, 2001, 166(9), pp. 5629-37.
- Lu, Z., Hornia, A., Jiang, Y. W., Zang, Q., Ohno, S. und Foster, D. A.** "Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta." *Mol Cell Biol*, 1997, 17(6), pp. 3418-28.
- Lum, A. F. H., Green, C. E., Lee, G. R., Staunton, D. E. und Simon, S. I.** "Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow." *J Biol Chem*, 2002, 277(23), pp. 20660-70.
- Lupher, M. L. J., Harris, E. A., Beals, C. R., Sui, L. M., Liddington, R. C. und Staunton, D. E.** "Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-1 and its affinity are regulated at the I domain allosteric site." *J Immunol*, 2001, 167(3), pp. 1431-9.
- Mansour, M., Lee, S. Y. und Pohajdak, B.** "The N-terminal coiled coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein CASP." *J Biol Chem*, 2002, 277(35), pp. 32302-9.
- Maroder, M., Bellavia, D., Meco, D., Napolitano, M., Stigliano, A., Alesse, E., Vacca, A., Giannini, G., Frati, L., Gulino, A. und Screpanti, I.** "Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival." *J Immunol*, 1996, 157(7), pp. 2864-72.
- Marsland, B. J., Soos, T. J., Spath, G., Littman, D. R. und Kopf, M.** "Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses." *J Exp Med*, 2004, 200(2), pp. 181-9.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D. und Schachtele, C.** "Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976." *J Biol Chem*, 1993, 268(13), pp. 9194-7.
- Marwali, M. R., MacLeod, M. A., Muzia, D. N. und Takei, F.** "Lipid rafts mediate association of LFA-1 and CD3 and formation of the immunological synapse of CTL." *J Immunol*, 2004, 173(5), pp. 2960-7.
- Mathiesen, J. M. und Ramirez, M. T.** "The metabotropic glutamate receptor 4 is internalized and desensitized upon protein kinase C activation." *Br J Pharmacol*, 2006,.
- Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Bohm, T., Knorr, T., Jackson, C. L., Kolanus, W. und Famulok, M.** "Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(9), pp. 4961-5.
- McDowall, A., Leitinger, B., Stanley, P., Bates, P. A., Randi, A. M. und Hogg, N.** "The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)." *J Biol Chem*, 1998, 273(42), pp. 27396-403.

**Meacci, E., Tsai, S. C., Adamik, R., Moss, J. und Vaughan, M.** "Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(5), pp. 1745-8.

**Mecklenbrauker, I., Saijo, K., Zheng, N., Leitges, M. und Tarakhovsky, A.** "Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance." *Nature*, 2002, 416(6883), pp. 860-5.

**Meroni, G. und Diez-Roux, G.** "TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases." *Bioessays*, 2005, 27(11), pp. 1147-57.

**Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E. und Longnecker, R.** "An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(2), pp. 772-6.

**Mischak, H., Pierce, J. H., Goodnight, J., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. und Mushinski, J. F.** "Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta." *J Biol Chem*, 1993, 268(27), pp. 20110-5.

**Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S. und Nakayama, K. I.** "Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta." *Nature*, 2002, 416(6883), pp. 865-9.

**Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. und Kupfer, A.** "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature*, 1998, 395(6697), pp. 82-6.

**Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X. und Phillips, D. M.** "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." *J Exp Med*, 1993, 178(2), pp. 449-60.

**Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. und Kolanus, W.** "The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function." *Mol Biol Cell*, 1998a, 9(8), pp. 1981-94.

**Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J. und Kolanus, W.** "Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1." *J Biol Chem*, 1998b, 273(24), pp. 14853-61.

**Neeb, A., Koch, H., Schurmann, A. und Brose, N.** "Direct interaction between the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor msec7-1 and presynaptic Munc13-1." *Eur J Cell Biol*, 1999, 78(8), pp. 533-8.

**Nevrivy, D. J., Peterson, V. J., Avram, D., Ishmael, J. E., Hansen, S. G., Dowell, P., Hruby, D. E., Dawson, M. I. und Leid, M.** "Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid-induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors." *J Biol Chem*, 2000, 275(22), pp. 16827-36.

**Nurieva, R. I., Duong, J., Kishikawa, H., Dianzani, U., Rojo, J. M., Ho, I. c., Flavell, R. A. und Dong, C.** "Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator." *Immunity*, 2003, 18(6), pp. 801-11.

**Ohkuma, S. und Poole, B.** "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75(7), pp. 3327-31.

**Ohtsuka, M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, T., Moriya, H. und Saito, T.** "NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(21), pp. 8126-31.

**Ostermann, G., Weber, K. S. C., Zerneck, A., Schroder, A. und Weber, C.** "JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes." *Nat Immunol*, 2002, 3(2), pp. 151-8.

**Pacheco, R., Ciruela, F., Casado, V., Mallol, J., Gallart, T., Lluís, C. und Franco, R.** "Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation." *J Biol Chem*, 2004, 279(32), pp. 33352-8.

**Pacheco-Rodriguez, G., Meacci, E., Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M.** "Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain." *J Biol Chem*, 1998, 273(41), pp. 26543-8.

**Pandey, A., Fernandez, M. M., Steen, H., Blagoev, B., Nielsen, M. M., Roche, S., Mann, M. und Lodish, H. F.** "Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways." *J Biol Chem*, 2000, 275(49), pp. 38633-9.

**Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B. und Riley, J. L.** "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms." *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21), pp. 9543-53.

**Perez, O. D., Mitchell, D., Jager, G. C., South, S., Murriel, C., McBride, J., Herzenberg, L. A., Kinoshita, S. und Nolan, G. P.** "Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1." *Nat Immunol*, 2003, 4(11), pp. 1083-92.

**Peter, K. und O'Toole, T. E.** "Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction." *J Exp Med*, 1995, 181(1), pp. 315-26.

**Peters, P. J., Hsu, V. W., Ooi, C. E., Finazzi, D., Teal, S. B., Oorschot, V., Donaldson, J. G. und Klausner, R. D.** "Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments." *J Cell Biol*, 1995, 128(6), pp. 1003-17.

- Peterson, E. J.** "The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion." *Immunol Rev*, 2003, 192pp. 113-21.
- Pfeifhofer, C., Kofler, K., Gruber, T., Tabrizi, N. G., Lutz, C., Maly, K., Leitges, M. und Baier, G.** "Protein kinase C theta affects Ca<sup>2+</sup> mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells." *J Exp Med*, 2003, 197(11), pp. 1525-35.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. und Smith, J. W.** "Ligand binding to integrins." *J Biol Chem*, 2000, 275(29), pp. 21785-8.
- Radhakrishna, H. und Donaldson, J. G.** "ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway." *J Cell Biol*, 1997, 139(1), pp. 49-61.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. und Donaldson, J. G.** "ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements." *J Cell Sci*, 1999, 112 ( Pt 6)pp. 855-66.
- Ragazzo, J. L., Ozaki, M. E., Karlsson, L., Peterson, P. A. und Webb, S. R.** "Costimulation via lymphocyte function-associated antigen 1 in the absence of CD28 ligation promotes anergy of naive CD4<sup>+</sup> T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(1), pp. 241-6.
- Rasooly, R., Schuster, G. U., Gregg, J. P., Xiao, J., Chandraratna, R. A. S. und Stephensen, C. B.** "Retinoid x receptor agonists increase bcl2a1 expression and decrease apoptosis of naive T lymphocytes." *J Immunol*, 2005, 175(12), pp. 7916-29.
- Reitnauer, P. J., DeMars, R. und Sondel, P. M.** "The proliferative immune response to autologous Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. I. Studies with HLA haplotype loss variants demonstrate a role for MHC-linked genes." *Hum Immunol*, 1985, 13(3), pp. 177-91.
- Restituto, S., Couve, A., Bawagan, H., Jourdain, S., Pangalos, M. N., Calver, A. R., Freeman, K. B. und Moss, S. J.** "Multiple motifs regulate the trafficking of GABA(B) receptors at distinct checkpoints within the secretory pathway." *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(4), pp. 747-56.
- Reth, M.** "Antigen receptor tail clue." *Nature*, 1989, 338(6214), pp. 383-4.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G. und Ballabio, A.** "The tripartite motif family identifies cell compartments." *EMBO J*, 2001, 20(9), pp. 2140-51.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D. und Downward, J.** "Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation." *EMBO J*, 1996, 15(10), pp. 2442-51.
- Rogge, L., Bianchi, E., Biffi, M., Bono, E., Chang, S. Y., Alexander, H., Santini, C., Ferrari, G., Sinigaglia, L., Seiler, M., Neeb, M., Mous, J., Sinigaglia, F. und Certa, U.** "Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays." *Nat Genet*, 2000, 25(1), pp. 96-101.

**Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A. N., Harwood, C., von Andrian, U. H. und Springer, T. A.** "Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction." *Immunity*, 2004, 20(4), pp. 393-406.

**Samelson, L. E.** "Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins." *Annu Rev Immunol*, 2002, 20pp. 371-94.

**Santy, L. C. und Casanova, J. E.** "Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D." *J Cell Biol*, 2001, 154(3), pp. 599-610.

**Schafer, D. A., D'Souza-Schorey, C. und Cooper, J. A.** "Actin assembly at membranes controlled by ARF6." *Traffic*, 2000, 1(11), pp. 892-903.

**Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M. und Muller, W. A.** "CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions." *Nat Immunol*, 2002, 3(2), pp. 143-50.

**Schneider, H., Valk, E., da Rocha Dias, S., Wei, B. und Rudd, C. E.** "CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36), pp. 12861-6.

**Schwartzberg, P. L., Finkelstein, L. D. und Readinger, J. A.** "TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation." *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4), pp. 284-95.

**Sekimoto, M., Tsuji, T., Matsuzaki, J., Chamoto, K., Koda, T., Nemoto, K., Degawa, M., Nishimura, S. und Nishimura, T.** "Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells." *Immunol Lett*, 2003, 88(3), pp. 221-6.

**Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M. K., Staunton, D. E., von Andrian, U. H. und Alon, R.** "Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines." *Nat Immunol*, 2005, 6(5), pp. 497-506.

**Shan, X., Czar, M. J., Bunnell, S. C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P. L. und Wange, R. L.** "Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation." *Mol Cell Biol*, 2000, 20(18), pp. 6945-57.

**Shibuya, K., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Ochs, H. D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H. und Shibuya, A.** "Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule." *Immunity*, 1999, 11(5), pp. 615-23.

- Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H. und Shibuya, A.** "CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation." *J Exp Med*, 2003, 198(12), pp. 1829-39.
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J. und Springer, T. A.** "Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation." *Cell*, 2003, 112(1), pp. 99-111.
- Shimizu, Y. und Hunt, S. W. 3.** "Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase?" *Immunol Today*, 1996, 17(12), pp. 565-73.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Ennis, E., Newman, W., Horgan, K. J. und Shaw, S.** "Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion." *J Exp Med*, 1992, 175(2), pp. 577-82.
- Skovronsky, D. M., Pijak, D. S., Doms, R. W. und Lee, V. M.** "A distinct ER/IC gamma-secretase competes with the proteasome for cleavage of APP." *Biochemistry*, 2000, 39(4), pp. 810-7.
- Someya, A., Sata, M., Takeda, K., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Moss, J. und Vaughan, M.** "ARF-GEP(100), a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(5), pp. 2413-8.
- Spitaler, M. und Cantrell, D. A.** "Protein kinase C and beyond." *Nat Immunol*, 2004, 5(8), pp. 785-90.
- Springer, T. A.** "Adhesion receptors of the immune system." *Nature*, 1990, 346(6283), pp. 425-34.
- Springer, T. A.** "Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(1), pp. 65-72.
- Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D. und Kahn, R. A.** "ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(3), pp. 1238-42.
- Stein, J. V. und Nombela-Arrieta, C.** "Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview." *Immunology*, 2005, 116(1), pp. 1-12.
- Stewart, M. P., McDowall, A. und Hogg, N.** "LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca<sup>2+</sup>-dependent protease, calpain." *J Cell Biol*, 1998, 140(3), pp. 699-707.
- Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L. und Littman, D. R.** "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes." *Nature*, 2000, 404(6776), pp. 402-7.

**Suzuki, I., Owada, Y., Suzuki, R., Yoshimoto, T. und Kondo, H.** "Localization of mRNAs for subfamily of guanine nucleotide-exchange proteins (GEP) for ARFs (ADP-ribosylation factors) in the brain of developing and mature rats under normal and postaxotomy conditions." *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 98(1-2), pp. 41-50.

**Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. und Calderwood, D. A.** "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." *Science*, 2003, 302(5642), pp. 103-6.

**Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. und Springer, T. A.** "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." *Cell*, 2002, 110(5), pp. 599-11.

**Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N. und Sugamura, K.** "STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction." *Immunity*, 1997, 6(4), pp. 449-57.

**Tanaka, Y., Albelda, S. M., Horgan, K. J., van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P. J., Buck, C. A. und Shaw, S.** "CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion." *J Exp Med*, 1992, 176(1), pp. 245-53.

**Tang, P., Cheng, T. P., Agnello, D., Wu, C., Hissong, B. D., Watford, W. T., Ahn, H., Galon, J., Moss, J., Vaughan, M., O'Shea, J. J. und Gadina, M.** "Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(5), pp. 2625-9.

**Teixeira, C., Stang, S. L., Zheng, Y., Beswick, N. S. und Stone, J. C.** "Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3." *Blood*, 2003, 102(4), pp. 1414-20.

**Thomas, S. M. und Brugge, J. S.** "Cellular functions regulated by Src family kinases." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997, 13pp. 513-609.

**Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E. und Loriolle, F.** "The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C." *J Biol Chem*, 1991, 266(24), pp. 15771-81.

**Umlauf, S. W., Beverly, B., Lantz, O. und Schwartz, R. H.** "Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics." *Mol Cell Biol*, 1995, 15(6), pp. 3197-205.

**Vega, J. A., Garcia-Suarez, O. und Germana, A.** "Vertebrate thymus and the neurotrophin system." *Int Rev Cytol*, 2004, 237pp. 155-204.

**Vega, J. A., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Perez-Perez, M. und Germana, A.** "Neurotrophins and the immune system." *J Anat*, 2003, 203(1), pp. 1-19.

- Vichi, A., Payne, D. M., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J. und Vaughan, M.** "E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1)." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(6), pp. 1945-50.
- Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P. und Altman, A.** "A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation." *Immunity*, 2000, 12(2), pp. 151-60.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. und Lanzavecchia, A.** "T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains." *Science*, 1999, 283(5402), pp. 680-2.
- Vitale, N., Ferrans, V. J., Moss, J. und Vaughan, M.** "Identification of lysosomal and Golgi localization signals in GAP and ARF domains of ARF domain protein 1." *Mol Cell Biol*, 2000a, 20(19), pp. 7342-52.
- Vitale, N., Horiba, K., Ferrans, V. J., Moss, J. und Vaughan, M.** "Localization of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) in lysosomes and Golgi apparatus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998b, 95(15), pp. 8613-8.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M.** "ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5), pp. 1941-4.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M.** "Characterization of a GDP dissociation inhibitory region of ADP-ribosylation factor domain protein ARD1." *J Biol Chem*, 1997b, 272(40), pp. 25077-82.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M.** "Interaction of the GTP-binding and GTPase-activating domains of ARD1 involves the effector region of the ADP-ribosylation factor domain." *J Biol Chem*, 1997a, 272(7), pp. 3897-904.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M.** "Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1)." *J Biol Chem*, 1998a, 273(5), pp. 2553-60.
- Vitale, N., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V. J., Riemenschneider, W., Moss, J. und Vaughan, M.** "Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1)." *J Biol Chem*, 2000b, 275(28), pp. 21331-9.
- Wang, H. M. und Smith, K. A.** "The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure." *J Exp Med*, 1987, 166(4), pp. 1055-69.
- Ward, S. G., June, C. H. und Olive, D.** "PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation?" *Immunol Today*, 1996, 17(4), pp. 187-97.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J. R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S. K., Hurchla, M. A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T. L., Russell, J. H., Allison, J. P. und Murphy, K. M.** "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." *Nat Immunol*, 2003, 4(7), pp. 670-9.

- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U. und Nishizuka, Y.** "Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(21), pp. 10159-63.
- Weber, K. S., Weber, C., Ostermann, G., Dierks, H., Nagel, W. und Kolanus, W.** "Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines." *Curr Biol*, 2001, 11(24), pp. 1969-74.
- Wei, L.** "Retinoid receptors and their coregulators." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43pp. 47-72.
- Weiss, A., Wiskocil, R. L. und Stobo, J. D.** "The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level." *J Immunol*, 1984, 133(1), pp. 123-8.
- Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., Negro-Vilar, A. und Hannun, Y. A.** "Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes." *J Cell Biol*, 1992, 117(1), pp. 121-33.
- Willems, L., Gatot, J. S., Mammerickx, M., Portetelle, D., Burny, A., Kerkhofs, P. und Kettmann, R.** "The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads." *J Virol*, 1995, 69(7), pp. 4137-41.
- Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S., Murata, K., Kimura, Y., Ishii, N., Nose, M., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J. I., Sasaki, H. und Sugamura, K.** "Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1." *Mol Cell Biol*, 2001, 21(11), pp. 3807-19.
- Yang, J., Hu, G., Wang, S., Li, Y., Martin, R., Li, K. und Yao, Z.** "Calcineurin/nuclear factors of activated T cells (NFAT)-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein (CNAIP), a novel ITAM-containing protein that activates the calcineurin/NFAT-signaling pathway." *J Biol Chem*, 2003, 278(19), pp. 16797-801.
- Yoshida, K., Wang, H., Miki, Y. und Kufe, D.** "Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9." *EMBO J*, 2003, 22(6), pp. 1431-41.
- Zhang, M., Moran, M., Round, J., Low, T. A., Patel, V. P., Tomassian, T., Hernandez, J. D. und Miceli, M. C.** "CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production." *J Immunol*, 2005, 174(3), pp. 1479-90.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. und Samelson, L. E.** "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation." *Cell*, 1998, 92(1), pp. 83-92.

**Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P. und Kolanus, W.** "T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70." *J Biol Chem*, 1998, 273(25), pp. 15445-52.

## 8 Abkürzungen

A <sub>x</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor ( <i>ADP-ribosylation factor</i> )
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cc	coiled-coil-Domäne
CD	Zelloberflächenmarker ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA
Cyh-1	Cytohesin-1
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E <sub>x</sub>	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FACS	fluoreszenzaktivierte Zelltrennung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
Fc	konstante Region der Immunglobuline ( <i>fragment crystallizable</i> )
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	<i>fluorescence resonance electron transfer</i>
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym

h	Stunde
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitionskonstante
IDAS	<i>I-domain allosteric site</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i> )
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LAD	Leukozyten-Adhäsionsdefizienz
LB	Luria-Broth
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LZ	Leucin-Zipper
M	molar (mol/l)
m	Meter
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood lymphocytes</i> )
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrat

PDZ	<u>P</u> SD-95 ( <i>postsynaptic density-95</i> ), <u>D</u> lg ( <i>discs large</i> ), <u>Z</u> O-1 ( <i>zona occludens-1</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PH	Pleckstrin-Homologie
PHA	Phytohämagglutinin
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat oder PtdIns[4,5]P <sub>2</sub>
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat oder PtdIns[3,4,5]P <sub>3</sub>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat ( <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> )
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	quantitative PCR ( <i>real time PCR</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH	Src-Homologie
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TM	transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Waldemar Kolanus für die Bereitstellung des interessanten Themas und die umfassende wissenschaftliche Betreuung. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Kolanus für die Möglichkeit an wissenschaftlichen Kongressen teilzunehmen bedanken.

Herrn Prof. Hoch danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie für die freundliche Aufnahme als Gast in seinem Labor in der Anfangszeit in Bonn.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme und stets heitere Atmosphäre im Labor. Besonders bei Kathrin Obrusnik und Ina Brillert möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Thomas Quast danke ich für die Einweisung in die Mikroskopie. Bianca, Barbara, Jessica und Sergej danke ich für die vielen anregenden Gespräche sowie für die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben sowie an meinen Bruder Peter für seine unentwegte Unterstützung und Ermutigung.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Costa für seine Liebe und dafür, dass er mich stets aufgemuntert hat und mir immer fürsorglich zur Seite stand. Ihm ist diese Arbeit gewidmet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Bettina Ulrike Kellersch  
Geburtsdatum: 24.06.1973  
Geburtsort: München  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1979-1983 Grundschule in München  
1983-1993 Oskar-von-Miller-Gymnasium in München  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1993-1999 Studium der Biologie (Diplom) an der  
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München  
Schwerpunkte:  
Genetik (Hauptfach), Biochemie, Immunologie, Mikrobiologie

1998-1999 Diplomarbeit am Institut für Genetik der LMU  
Betreuer: Prof. Dr. W. Bandlow  
Thema der Diplomarbeit:  
*Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen der  $G_{\alpha}$ -  
Untereinheit Gpa2p der Hefe Saccharomyces cerevisiae mittels  
des Two-Hybrid-Systems*

07/1999 Abschluss: Diplom Biologin (Univ.). Gesamtnote im Diplom: 1,4

### Promotion

2000-2003 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Biochemie,  
Laboratorium für Molekulare Biologie, Genzentrum der LMU  
Betreuer Prof. Dr. W. Kolanus

2003-2006 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Molekulare  
Physiologie und Entwicklungsbiologie der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn  
Betreuer: Prof. Dr. W. Kolanus