

# Bedeutung von Cytohesin-3 in der Signaltransduktions-Kontrolle der T-Zellaktivierung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Margarete Bianca Paul

aus

Bonn

Bonn 2007

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

- |              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| 1. Referent: | Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus |
| 2. Referent: | Prof. Dr. rer. nat. M. Hoch    |

eingereicht am: 02.05.2007

Tag der Promotionsprüfung: 09.07.2007

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.

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum August 2002 bis Juli 2007 von Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus betreut.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht (gemäß § 6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004).

Bonn, den 02.05.2007

Bianca Paul

für mich

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Das adaptive Immunsystem . . . . .  | 1         |
| 1.2      | Die T-Zell-vermittelte Immunität . . . . .  | 2         |
| 1.2.1    | Der T-Zellrezeptorkomplex . . . . .   | 3         |
| 1.2.2    | Kostimulatorische Rezeptoren: Die Familie der B7/CD28 Oberflächenproteine . . . . . | 4         |
| 1.3      | Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung . . . . .                              | 8         |
| 1.3.1    | Der $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg . . . . .                                 | 10        |
| 1.3.2    | Der Proteinkinase-C Signalweg . . . . .   | 10        |
| 1.3.3    | Die MAP-Kinase-und JNK-Signaltransduktionkaskade . . . . .                          | 11        |
| 1.3.4    | Der PI3-Kinase-Signalweg . . . . .  | 11        |
| 1.4      | Immunologische Toleranz . . . . .   | 13        |
| 1.4.1    | Periphere Toleranz . . . . .  | 13        |
| 1.5      | Neue Faktoren in der T-Zell Aktivierung: Cytohesine . . . . .                       | 17        |
| 1.5.1    | Cytohesin-1 . . . . .   | 18        |
| 1.5.2    | Cytohesin-2 . . . . .   | 20        |
| 1.5.3    | Cytohesin-3 . . . . .   | 20        |
| 1.5.4    | Cytohesin-4 . . . . .   | 21        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>22</b> |
| 2.1      | Materialien . . . . .   | 22        |
| 2.1.1    | Geräte . . . . .  | 22        |
| 2.1.2    | Chemikalien . . . . .   | 24        |
| 2.1.3    | Verbrauchsmaterialien . . . . .   | 26        |
| 2.1.4    | Kulturmedien, Seren und Puffer . . . . .  | 26        |
| 2.1.5    | Kommerzielle Reaktionssysteme . . . . .   | 27        |
| 2.1.6    | Lösungen und Puffer . . . . .   | 27        |
| 2.1.7    | Antikörper . . . . .  | 29        |
| 2.1.8    | Bakterienstämme . . . . .   | 30        |
| 2.1.9    | Eukaryotische Zelllinien . . . . .  | 30        |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.1.10 | Längenstandards . . . . .   | 31 |
| 2.1.11 | Plasmide . . . . .  | 31 |
| 2.1.12 | Proteinfusionsanteile . . . . .   | 32 |
| 2.1.13 | Oligonukleotide . . . . .   | 32 |
| 2.1.14 | siRNAs . . . . .  | 33 |
| 2.1.15 | Sonden . . . . .  | 34 |
| 2.2    | Molekularbiologische Arbeitstechniken . . . . .                             | 35 |
| 2.2.1  | PCR . . . . .   | 35 |
| 2.2.2  | RNA Isolation . . . . .   | 36 |
| 2.2.3  | RT-PCR . . . . .  | 37 |
| 2.2.4  | Quantitative PCR . . . . .  | 37 |
| 2.2.5  | Agarose-Gelelektrophorese . . . . .   | 38 |
| 2.2.6  | <i>In-vitro</i> Mutagenese . . . . .  | 39 |
| 2.2.7  | DNA-Fällung . . . . .   | 39 |
| 2.2.8  | DNA Restriktionsanalysen . . . . .  | 39 |
| 2.2.9  | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen . . . . .                 | 40 |
| 2.2.10 | Entfernung der 5'-Phosphatenden von dem geschnittenen Vektor . . . . .      | 40 |
| 2.2.11 | Ligation und Transformation . . . . .                                       | 40 |
| 2.2.12 | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> nach Scott . . . . .                  | 41 |
| 2.2.13 | Transformation kompetenter <i>E.coli</i> . . . . .                          | 42 |
| 2.2.14 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> . . . . .                      | 42 |
| 2.2.15 | DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .                                      | 43 |
| 2.3    | Zellkulturtechniken . . . . .   | 44 |
| 2.3.1  | Stammhaltung eukaryotischer Zellen . . . . .                                | 44 |
| 2.3.2  | Präparation von peripheren Blut Lymphozyten (PBL) aus buffy-coats . . . . . | 45 |
| 2.3.3  | Zellstimulation . . . . .   | 45 |
| 2.3.4  | Transfektionsmethoden . . . . .   | 46 |
| 2.4    | Proteinbiochemische Arbeitstechniken . . . . .                              | 47 |
| 2.4.1  | Herstellung von Total-Zellysaten . . . . .                                  | 47 |
| 2.4.2  | Detergenz-basierte Zellyse . . . . .  | 47 |
| 2.4.3  | Proteinbestimmung . . . . .   | 48 |
| 2.4.4  | Immunpräzipitation . . . . .  | 48 |
| 2.4.5  | SDS-PAGE und Western Blot . . . . .   | 49 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4.6    | Immunmarkierung von Western Blot . . . . .  | 50        |
| 2.5      | Funktionelle Versuchsansätze . . . . .  | 50        |
| 2.5.1    | T-Zell Aktivierungsstudien . . . . .  | 50        |
| 2.5.2    | Immunfluoreszenzuntersuchungen . . . . .  | 51        |
| 2.5.3    | Durchflusszytometrie . . . . .  | 52        |
| 2.5.4    | Ca <sup>2+</sup> -Fluxexperimente . . . . .   | 53        |
| 2.5.5    | Ex-vivo Toleranz Model . . . . .  | 53        |
| 2.5.6    | native Mitochondrienisolation . . . . .   | 53        |
| 2.6      | Elektronische Datenverarbeitung . . . . .   | 54        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>55</b> |
| 3.1      | Cytohesin-3 ist mit peripherer, T-Zell-vermittelter Immuntoleranz assoziiert  | 55        |
| 3.1.1    | Die Stimulation der Oberflächenproteine CD28 und PD-1 reguliert die Aktivierung von T-Zellen und die Cytohesin-3 Expression . . . . | 62        |
| 3.1.2    | Die Expression von Cytohesin-3 in T-Zellen wird von der PI3-Kinase reguliert . . . . .  | 67        |
| 3.1.3    | Cytohesin-3 ist ein Zielgen des Forkhead Transkriptionsfaktors FoxO-1 . . . . .   | 71        |
| 3.2      | Cytohesine sind zentrale Signalkomponenten der T-Zellaktivierung . . . . .  | 72        |
| 3.2.1    | Cytohesin-3 ist ein negativer Faktor der T-Zellaktivierung, während Cytohesin-1 die T-Zellaktivierung positiv reguliert . . . . .   | 73        |
| 3.2.2    | Cytohesin-4 reprimiert die T-Zell Aktivierung . . . . .   | 95        |
| 3.3      | Mechanismen der Cytohesin-abhängigen T-Zellaktivierung . . . . .  | 98        |
| 3.3.1    | Cytohesin-3 kompetiert mit Cytohesin-1 um eine Interaktion mit PCKs . . . . .   | 98        |
| 3.3.2    | Die PIP-Bindungsaffinität vermittelt die antagonistischen Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 . . . . .                         | 100       |
| 3.4      | Identifikation und Charakterisierung der mit Cytohesin-1 interagierenden mitochondrialen ATPase CYMA . . . . .                      | 103       |
| 3.4.1    | Lokalisierung von CYMA . . . . .  | 105       |

---

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.4.2    | CYMA interagiert mit der Sec-7 Domänen von Cytohesin-1 und ARNO . . . . .                           | 108        |
| 3.4.3    | Topologie und Domänenstruktur von CYMA . . . . .  | 109        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>112</b> |
| 4.1      | Cytohesin-3 ist ein PD-1 reguliertes Zielgen der PI3-Kinase . . . . .                               | 112        |
| 4.2      | Cytohesin-3 ist ein zentraler, negativ regulatorischer Signalfaktor der T-Zellaktivierung . . . . . | 118        |
| 4.3      | Funktion von Cytohesin-3 Funktion in nicht-T-Zellen . . . . .                                       | 127        |
| 4.4      | Cytohesin-3 als Faktor eines neuen, Anergie-induzierenden Signalwegs . . . . .                      | 131        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>136</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang</b>   | <b>138</b> |
| <b>7</b> | <b>Abkürzungen</b>  | <b>143</b> |
| <b>8</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>147</b> |
|          | <b>Lebenslauf</b>   | <b>167</b> |
|          | <b>Danksagung</b>   | <b>168</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem der Vertebraten beruht auf der zellulären Immunantwort von Lymphozyten gegen eindringende Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Die Lymphozyten teilen sich dabei in B- und T-Zellen auf, die sich beide aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle entwickeln. Neben der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen ist eine wesentliche Eigenschaft des adaptiven Immunsystems, körpereigene von körperfremden Strukturen (Antigenen, Ag) zu unterscheiden und nur gegen letztere zu reagieren. Für die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen sind die MHC-Moleküle (Haupthistokompatibilitäts Komplex, **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) von zentraler Bedeutung. MHC-Moleküle sind Zelloberflächenproteine, die intrazellulär mit körpereigenen oder körperfremden Peptiden beladen und zur Zelloberfläche transportiert werden. Dort präsentieren sie das gebundene Peptid gegenüber T-Zellen. Erkennt eine T-Zelle diesen Peptid/MHC-Komplex, so kann sie aktiviert werden und eine Immunantwort einleiten. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I (MHCI) finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und präsentieren vorwiegend zytosolische Proteine von körpereigenem oder körperfremden Ursprung. MHC-Klasse-II (MHCII) werden dagegen nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (**A**ntigen **P**resenting **C**ell, APC) exprimiert und präsentieren phagozytierte und lysosomal degradierte Peptide. Dabei kann es sich ebenfalls um körpereigene oder körperfremde Peptide handeln.

Während die Reifung der B-Zellen ausschließlich im Knochenmark stattfindet, wandern die lymphoiden Vorläuferzellen für die T-Zell-Reifung in den Thymus. Analog zur Immunglobulin-Rekombination während der B-Zell-Reifung im Knochenmark durchlaufen die T-Vorläuferzellen im Thymus eine somatische Rekombination und Hypermutation des T-Zellrezeptors (TCR). Die Reifung der T-Zellen im Thymus dient neben der Schaffung eines möglichst großen TCR-Repertoires von ca.  $10^{18}$  möglichen Spezifitäten auch der Identifizierung und Eliminierung autoreaktiver T-Zellen. Diese klonale Eliminierung autoreaktiver T-Zellen wird als Mechanismus der zentralen Toleranz bezeichnet und in späteren Kapiteln näher beschrieben. Unreife T-Zellen exprimieren während der Reifung

die Korezeptoren CD4 und CD8 auf ihrer Zelloberfläche. Durch den Vorgang der positiven Selektion entwickeln sich die T-Zellen, die mit höherer Affinität an MHC I binden zu CD8<sup>+</sup>T-Zellen aus. T-Zellen mit einer höheren Affinität für MHC II differenzieren dagegen zu CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

Nach der Reifung werden die noch naiven T-Zellen in den Blutstrom entlassen und zirkulieren durch das Blut und die peripheren lymphatischen Organe. Identifiziert ein Lymphozyt in einem peripheren lymphatischen Organ ein zu seinem TCR passendes Antigen, löst dies seine Aktivierung und Proliferation und damit eine adaptive Immunantwort aus. Dieser komplexe und streng regulierte Vorgang soll im Folgenden näher besprochen werden.

## 1.2 Die T-Zell-vermittelte Immunität

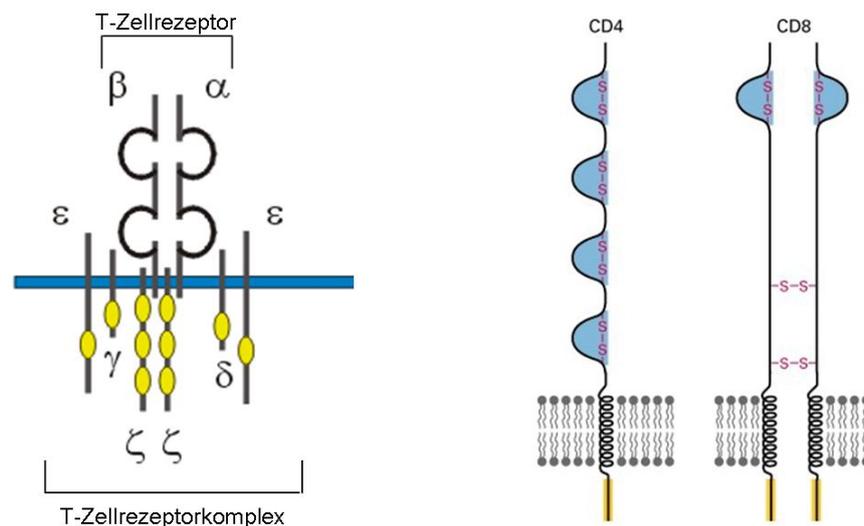
Die Bindung des TCR einer naiven T-Zelle an einen passenden Peptid/MHC-Komplex einer APC löst die klonale Expansion der T-Zelle und die Differenzierung zu einer bewaffneten CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Effektorzelle aus. CD4<sup>+</sup>T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung in der Peripherie zu T<sub>H1</sub>-Zellen oder zu T<sub>H2</sub>-Zellen. Ob sich dabei eine CD4<sup>+</sup>T-Zellen in eine T<sub>H1</sub>- oder T<sub>H2</sub>-Zelle differenziert, hängt unter anderem von den auf sie einwirkenden Zytokinen ab. Das von Makrophagen und B-Zellen gebildete IL-12 begünstigt die Bildung von T<sub>H1</sub>-Zellen. Dagegen fördert das von T-Zellen und Mastzellen gebildete IL4 die Differenzierung zu T<sub>H2</sub>-Zellen. Beide CD4<sup>+</sup>T-Zell-Subtypen erfüllen unterschiedliche Funktionen in der Immunantwort: Während die inflammatorischen T<sub>H1</sub>-Zellen nach Stimulation überwiegend IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sekretieren und damit eine Aktivierung der Makrophagen hervorrufen, sekretieren T<sub>H2</sub>-Zellen überwiegend IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine bewirken eine Inhibition der Makrophagen und eine Aktivierung von B-Zellen.

CD8<sup>+</sup>T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die durch verschiedene Mechanismen eine Eliminierung virusinfizierter Körperzellen einleiten können. Zum einen bewirkt die Sekretion von Perforin und Granzym eine Perforation der Zielzelle. Zum Anderen führt die Aktivierung einer CD8<sup>+</sup>T-Zelle zu der Expression des Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche. Bindet die Zielzelle diesen Liganden, so wird in der Zielzelle Apoptose ausgelöst.

### 1.2.1 Der T-Zellrezeptorkomplex

Für eine vollständige T-Zellaktivierung müssen zunächst die Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche an ihre entsprechenden Liganden auf der Zielzelle binden. Neben der Bindung des TCR an ein MHC-präsentiertes Peptid ist die Aktivierung verschiedener kostimulatorischer Rezeptoren entscheidend.

Der TCR ist ein Heterodimer, das durch die Zusammenlagerung einer  $\alpha$ - mit einer  $\beta$ -Kette bzw. einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit entsteht. Die Antigenspezifität ergibt sich durch die Zusammenlagerung der extrazellulären variablen Regionen. Wie der B-Zellrezeptor besitzt der TCR selbst keine Signalfunktion. Für eine Signalweiterleitung ist der TCR assoziierte CD3-Komplex essentiell. Der CD3-Komplex besteht seinerseits aus einer  $\gamma$ -,  $\delta$ - und einer  $\epsilon$ -Kette, sowie zwei  $\zeta$ -Ketten (siehe Abbildung 1.1). Dieser Komplex ist konstitutiv mit den Untereinheiten des TCRs assoziiert. Im Gegensatz zu den kurzen zytoplasmatischen Domänen des TCR weisen die langen CD3-Ketten Tyrosinphosphorylierungsmotive, sogenannte ITAMs (Immunorezeptor Tyrosine-based Activation Motifs), auf. Bei diesen ITAMs handelt es sich um Konsensussequenzen, die in der intrazellulären Signalweiterleitung zentral sind.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes und der Korezeptoren CD4 und CD8. An die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette de TCR lagern sich die Untereinheiten des CD3-Komplexes an. Die ITAMs des CD3-Komplexes sind gelb dargestellt.

## 1.2.2 Kostimulatorische Rezeptoren: Die Familie der B7/CD28 Oberflächenproteine

Die erstmals von Bretscher und Chon vorgeschlagene "Zwei-Signaltheorie" bezog sich zunächst auf die Aktivierung von B-Zellen und ist heute allgemein auch für die Aktivierung von T-Zellen akzeptiert (Bretscher et al. 1970; Chambers 2001). Sie besagt, dass für die Aktivierung ruhender T-Zellen neben den durch den TCR initiierten Signalen auch die Aktivierung kostimulatorischer Moleküle der B7/CD28-Familie essentiell sind. Nicht nur für die Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen, sondern auch für die zeitliche Begrenzung der T-Zellaktivierung und für die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie ist die Familie der B7/CD28 kostimulatorischen Moleküle von Bedeutung. Zu den Mitgliedern der B7/CD28 Familie zählen neben CD28 und CTLA-4 (**C**ytotoxic **T** **L**ymphocyte-associated **A**ntigen-4) auch die weniger charakterisierten Rezeptoren ICOS (**I**nducible **C**ostimulator), PD-1 (**P**rogrammed **D**eath) und BTLA-4. Alle CD28-ähnlichen Rezeptoren und ihre Liganden sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I und Mitglieder der Ig-Superfamilie. Ihre zytoplasmatischen Anteile enthalten potentielle SH2- und SH3-Bindedomänen, über die eine Signalweiterleitung in das Zellinnere erfolgt.

### CD28

Das positiv-kostimulatorische Molekül CD28 wird als Homodimer auf mehr als 80% der humanen T-Zellen (nahezu allen CD4<sup>+</sup>- und ca. 50-80% der CD8<sup>+</sup>T-Zellen) konstitutiv exprimiert (Aruffo et al. 1987). Die Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 ist auf aktivierte APCs, wie Dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen beschränkt. Die Bindung von CD28 an seine Liganden führt zu einer Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Ketten von CD28. Es gibt verschiedene Ansichten darüber, wie CD28 zu einer vollständigen T-Zellaktivierung beiträgt. Zunächst ging man von einer Verstärkung der vom TCR ausgehenden Signale durch CD28-Aktivierung aus (Acuto et al. 2003). Verschiedene Gruppen zeigten, dass die Stimulation von CD28 eine erhöhte PI3-Kinase-Aktivität, eine Stabilisierung der IL-2-mRNA sowie die Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und anti-apoptotischer Gene zur Folge hat (Appleman et al. 2002; Kane et al. 2001; Lindstein et al. 1989; Prasad et al. 1994). Eine Stimulation von CD28 verstärkt außerdem die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle, wie CTLA-4 und ICOS, die zu späteren Zeitpunkten die T-Zellaktivierung modulieren.

Da die Abwesenheit einer Kostimulation für die Induktion eines anergen Zustands auto-reaktiver T-Zellen essentiell ist, stellt die auf aktivierte APCs beschränkte Expression der CD28-Liganden einen wichtigen Kontrollmechanismus der peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen dar (Linsley et al. 1991).

## PD-1

PD-1 ist auf aktivierten B-, T-Zellen und Makrophagen exprimiert und ist ein negativ-regulatorischer Faktor der T-Zellaktivierung (Bennett et al. 2003). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der CD28/B7-Familie liegt PD-1 als Monomer vor (Zhang et al. 2004a). Die PD-1-Liganden, B7-H1 und B7-DC, unterscheiden sich sowohl in ihrer Affinität zu PD-1 als auch in ihrem Expressionsmuster voneinander. Während B7-DC (PD-2) ausschließlich auf DCs und Makrophagen zu finden ist, hat B7-H1 ein breites Expressionsmuster. B7-H1 (PD-1L) findet sich auf B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, DCs sowie anderen professionellen und nicht-professionellen APCs. Außerdem wird B7-H1 auch von vielen Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs, wie z.B. den Sinus-Endothelien der Leber (LSECs) oder den Inselzellen des Pankreas, exprimiert. Inflammatorische Zytokine wie IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  führen zu einer verstärkten Expression von B7-H1 auf APCs, Endothelien und Epithelien (Eppihimer et al. 2002; Muhlbauer et al. 2006). B7-H1 hat im Gegensatz zu B7-DC eine geringere Affinität zu PD-1. Die Expression von PD-1 auf der Oberfläche scheint eines der frühesten Ereignisse der T-Zellaktivierung zu sein und eine Stimulation von PD-1 durch B7-H1 bestimmt über einen aktivierten bzw. anergen Zustand der T-Zelle (Tsushima et al. 2007). Tsushima *et al.* zeigte, dass die Stimulation von PD-1 durch B7-H1, nicht aber durch B7-DC, zu T-Zell-Anergie in peripheren lymphatischen Organen führt (Tsushima et al. 2007). PD-1 defiziente Mäuse entwickeln, abhängig vom verwendeten Maus-Stamm, spontan systemische Autoimmunerkrankungen und Splenomegalie (Nishimura et al. 1998; Salama et al. 2003; Nishimura et al. 1999; Nishimura et al. 2001).

In der zytoplasmatische Domäne von PD-1 ist ein ITIM (**I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **I**nhibitory **M**otif) und ein für die immuninhibitorische Funktion wichtiges ITSM (**I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **S**witch **M**otif) lokalisiert (Chemnitz et al. 2004; Okazaki et al. 2001). Die Bindung der Phosphatasen SHP1 und SHP2 führt zu einer Dephosphorylierung TCR-proximaler Signalmoleküle, wie ZAP-70, PKC- $\theta$  und CD3 $\zeta$ , und damit zu einer Abschwächung des TCR Signals. Parry *et al.* identifizierten die PI3-Kinase

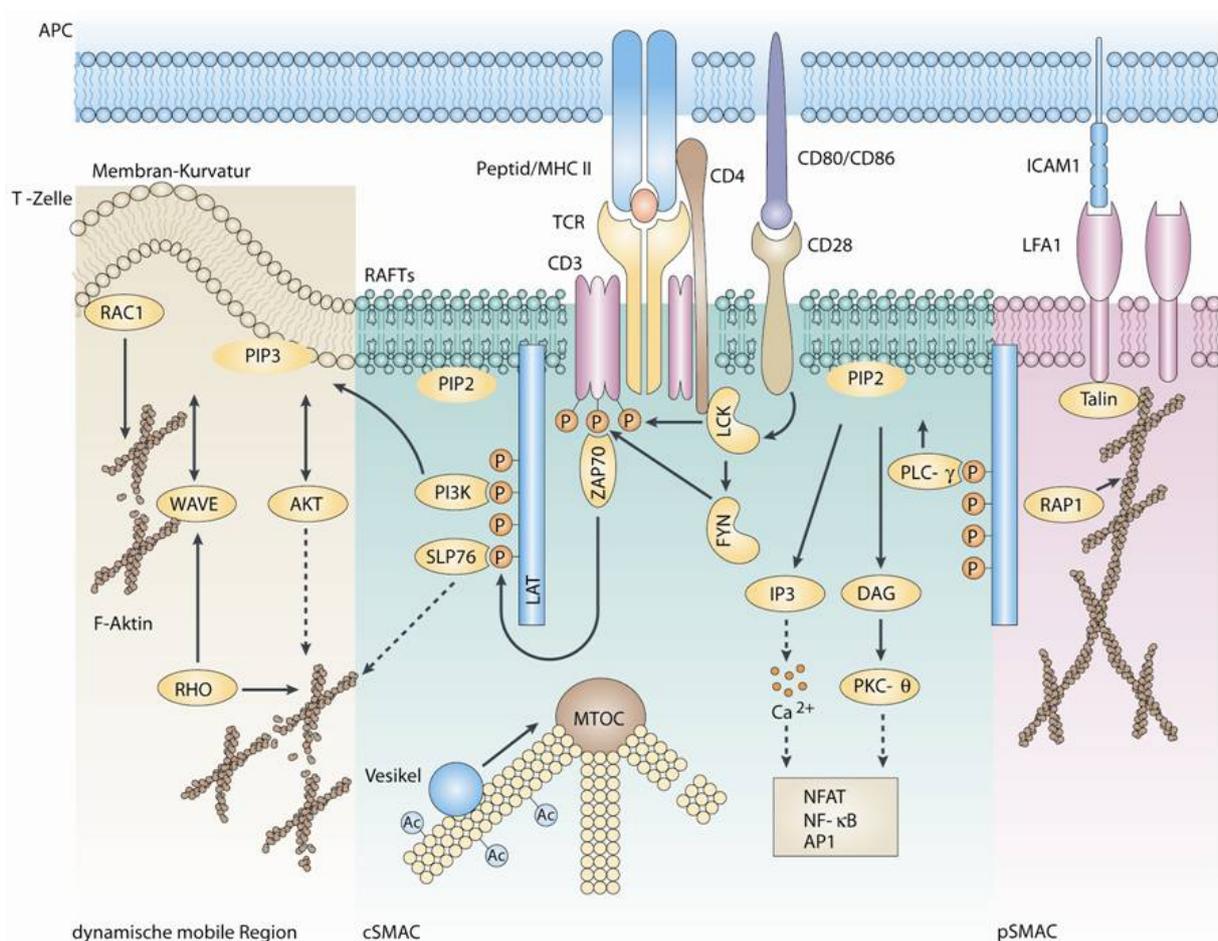
als ein Zielmolekül für die inhibitorische Wirkung von PD-1. Aktivierung von PD-1 blockiert, im Gegensatz zu CTLA-4, die durch CD28-Stimulation induzierte Gentranskription von Bcl-XL (Parry et al. 2005). Der genaue molekulare Mechanismus dieser Inhibition ist weitgehend ungeklärt. Als sicher gilt jedoch, dass nach Antigenstimulation die Tyrosinphosphatase SHP2 an das ITSM rekrutiert wird. Die Aktivierung von SHP2 hat die Dephosphorylierung von wichtigen Effektormolekülen, wie die PI3-Kinase, zur Folge (Okazaki et al. 2006).

### CTLA-4

Das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) induziert in T-Zellen Toleranz und Anergie und zählt zu den stärksten Inhibitoren der T-Zellaktivierung (Alegre et al., 2001). CTLA-4 ist ausschließlich auf T-Zellen exprimiert und liegt als Homodimer in der Plasmamembran vor. Ca. 24 Stunden nach T-Zellaktivierung wird CTLA-4 hochreguliert und hat eine 10-100x höhere Affinität für CD86 als CD28 (Janeway und Travers, 1997). Die Bindung von CTLA-4 an die Liganden CD80/86 hat einen Abbruch der von CD28 ausgehenden Signalkaskade zur Folge und begrenzt damit zeitlich die proliferative Antwort aktivierter T-Zellen (Chambers et al. 1999). Dies beruht u.a. auf der Hemmung der IL-2-Synthese durch die Aktivierung der AKT/PKB-Phosphatase PP2A (Parry et al. 2005).

Neben einer Kostimulation durch Ligation der CD28/B7-Proteinfamilie müssen APCs auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, ICAM-2 und LFA-3 exprimieren. Der initiale Kontakt einer naiven T-Zelle mit einer APC wird hauptsächlich durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Erkennt eine T-Zelle einen Peptid/MHC-Komplex, kommt es zu einer charakteristischen Organisation von Signal- und Adhäsionsmolekülen. Nur die genaue räumliche Anordnung aller beteiligten Moleküle führt zur einer korrekten Ausbildung einer Signal-Plattform, der sogenannten Immunologischen Synapse (IS), und damit zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle. Innerhalb weniger Minuten bilden der TCR/MHC-Komplex und die akzessorischen Rezeptoren die zentrale Region der IS, das sogenannte cSMAC (**C**entral **S**upramolecular **A**ctivation **C**luster). An diesem cSMAC konzentrieren sich die intrazellulären Signalkomponenten PKC- $\theta$ , ZAP-70, Lck und Fyn. Das cSMAC ist umgeben von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen, bestehend aus LFA-1 und ICAM-1, die für die Stabilität der IS entscheidend sind. Dieser Ring aus Adhäsionsmolekülen wird als pSMAC (**P**eripheral **S**upramolecular **A**ctivation **C**luster) bezeichnet (Friedl et al. 2005).

In Abbildung 1.2 ist der Aufbau der IS schematisch dargestellt. In vollständig aktivierten T-Zellen bleibt die IS über mehrere Stunden hinweg stabil. Anergie T-Zellen zeichnen sich unter anderem durch eine instabile IS aus, die eine effektive T-Zellaktivierung verhindert. Diese Instabilität wird unter anderem durch einen Mangel an DAG hervorgerufen, der essentiell für die stabile Interaktion von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 ist (Heissmeyer et al. 2004).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Immunologischen Synapse (IS).** Dargestellt sind die im zentralen Bereich der IS (cSMAC) lokalisierten Signalmoleküle und Membranrezeptoren. Die für die Stabilität der IS verantwortlichen Adhäsionsmoleküle bilden einen Ring um den inneren Bereich der Synapse (pSMAC). Abbildung verändert nach Friedl et al. 2005.

### 1.3 Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung

Die Bindung naiver T-Zellen an einen passenden MHC/Peptid-Komplex, zusammen mit der Aktivierung kostimulatorischer Moleküle, löst verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aus, die in der Induktion T-Zellspezifischer Gene und der klonalen Expansion von T-Zellen resultieren. In den ersten Schritten der T-Zellaktivierung kommt es durch die Aggregation des TCR/MHC-Komplexes mit den Korezeptoren CD4 bzw. CD8 und CD45 zu einer Phosphorylierung der ITAMs des CD3-Komplexes. Die ITAM-Phosphorylierung wird durch die Src-Kinasen Lck und Fyn katalysiert, die erst durch die Aggregation des TCR mit den Korezeptoren in die räumliche Nähe des CD3-Komplexes gelangen. Die Tyrosinphosphorylierungen der ITAMs bilden die Bindungstellen der Tyrosinkinase Zap-70 und Syk, die ihrerseits verschiedene Adapterproteine aktivieren (siehe Abbildung 1.3). Die Rekrutierung von Adapterproteinen wie SLP76 und LAT ermöglicht die Aktivierung verschiedener Signaläste, die eine Signalamplifikation gewährleisten. Zu den wichtigsten vom TCR ausgehenden Signalästen zählt die MAP-Kinasekaskade, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Calcineurin- und NFAT-Aktivierung sowie die von verschiedenen PKC-Isoformen vermittelte  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung.

Wie oben erwähnt, sind die durch TCR-Stimulation initiierten Signalwege für eine T-Zellaktivierung nicht hinreichend. Die zusätzlichen, durch CD28-Stimulation ausgelösten Signalwege gewährleisten eine vollständige Aktivierung und verhindern den nicht-reaktiven Zustand der T-Zellenergie. Die durch die Bindung von B7-1 ausgelöste Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Ketten von CD28 führt zum Einen zu der Aktivierung des Adapterproteins GRB2 und damit zu der Aktivierung der MAP-Kinasekaskade. Zum Anderen wird durch CD28-Stimulation ein PI3-Kinase-abhängiger Signalweg aktiviert.

Die durch die T-Zellstimulation ausgelösten Signalkaskaden sind in Abbildung 1.3 schematisch zusammengefasst und werden im Folgenden einzeln besprochen. Diese Darstellung zeigt nur die wichtigsten Wege der T-Zell-Signalkaskade und ist keinesfalls vollständig. Diese Abbildung wird im Laufe dieser Arbeit detaillierter dargestellt und erklärt.



### 1.3.1 Der $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg

Ausgangspunkt für den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweg ist die Bindung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) an das oben erwähnte Adapterprotein LAT. Die Aktivierung von PLC- $\gamma$  durch Lck und Itk hat die Hydrolyse des Phospholipids PIP<sub>2</sub> zu Inositol(1,4,5)-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) zur Folge. IP<sub>3</sub> bindet an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums sowie der Plasmamembran und erhöht so die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex aktiviert nun die zyttoplasmatische Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die inhibitorische Phosphatgruppen von dem Transkriptionsfaktor NFAT entfernt. Unphosphoryliertes NFAT kann im Kern an seine Promotorelemente binden und eine Gentranskription ermöglichen.

### 1.3.2 Der Proteinkinase-C Signalweg

Das durch die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> entstandene Spaltprodukt DAG aktiviert die verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Man unterscheidet drei Gruppen von PKCs: zu den konventionellen cPKCs zählen die  $\text{Ca}^{2+}$ - und DAG-abhängigen Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$  und  $\gamma$ . Zu der Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen nPKCs ("novel" PKCs) zählen die Isoformen  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\mu$ . Die atypischen PKCs (aPKCs)  $\zeta$  und  $\iota/\lambda$  benötigen dagegen weder  $\text{Ca}^{2+}$  noch DAG für ihre Aktivierung (Spitaler et al. 2004). Für die T-Zellaktivierung ist die ausschließlich in T-Zellen exprimierte PKC $\theta$  von Bedeutung. Die Stimulation von TCR und CD28 führt zu einer selektiven Rekrutierung der PKC- $\theta$  zur IS, wo die Interaktion mit verschiedensten Signalmolekülen zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 führt. Der genaue Regulationsmechanismus und die Zielmoleküle der PKC- $\theta$  sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Die Isoform  $\theta$  ist in der PKC-Familie die einzige, die über den VAV/Rac-Signalweg reguliert werden kann und in Teilen mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert ist (Villalba et al. 2000). Im Gegensatz zu anderen PKC-Isoformen existiert für die Aktivierung und Membranrekrutierung der PKC- $\theta$  ein PLC- $\gamma$ -abhängiger, aber auch ein PLC- $\gamma$ -unabhängiger Aktivierungsweg (Villalba et al. 2002). Die Aktivierung der PKC- $\theta$  führt sowohl zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B als auch über RasGRP zu einer Aktivierung des AP-1-Transkriptionskomplexes (Baier-Bitterlich et al. 1996; Coudronniere et al. 2000; Lin et al. 2000). Außerdem interagiert die PKC- $\theta$  mit Calcineurin und aktiviert so auch den Transkriptionsfaktor NFAT (Werlen et al. 1998).

### 1.3.3 Die MAP-Kinase- und JNK-Signaltransduktionkaskade

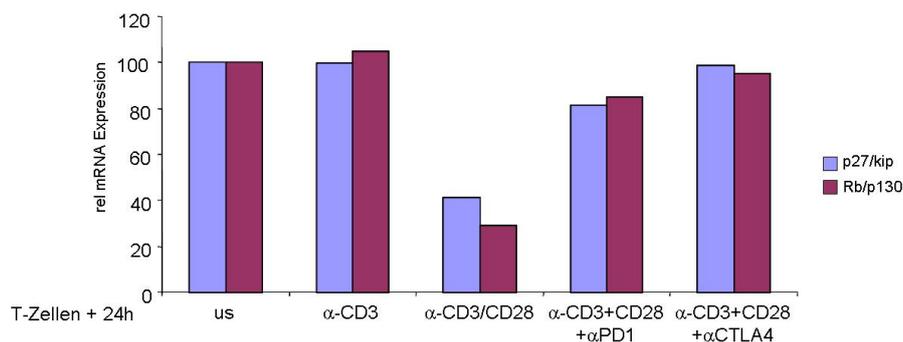
Ausgehend von der Aktivierung der Adapterproteine LAT und SLP76 durch ZAP-70 folgt eine Rekrutierung der Guaninnukleotidaustauschfaktoren (Guanine nucleotide Exchange Factor, GEF) VAV und SOS. Diese GEFs aktivieren kleine G-Proteine der Ras-Familie (Ras, Rac-1, Cdc42 und Rho) durch die Substitution von GDP gegen GTP. Aktiviertes, GTP-gebundenes Ras aktiviert verschiedene Effektormoleküle und ist daher für die Aktivierung mehrere Signalwege wichtig. Ras-GTP katalysiert zum Einen die Phosphorylierung und Oligomerisierung der Proteinkinase Raf und löst damit eine MAP-Kinasekaskade (Mitogen Activated Protein Kinase) aus. Am Ende der MAP-Kinasekaskade steht die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie Elk1 und Fos. Der zweite durch Ras-GTP vermittelte Signalweg beginnt mit der Aktivierung der PI3-Kinase und ihrem Reaktionsprodukt PIP3. Die Bindung von VAV an PIP3 resultiert in der Aktivierung des G-Proteins Rac-1, in dessen Folge über eine JNK-Kaskade (Jun N-terminale Kinase) der Transkriptionsfaktor Jun aktiviert wird. Jun und Fos bilden zusammen den für die Induktion des IL-2-Promotors wichtigen Transkriptionsfaktor AP-1. Während für die oben beschriebene Elk1-Aktivierung die TCR-Stimulation ausreicht, ist für die Bildung von Jun eine Kostimulation der T-Zellen essentiell.

### 1.3.4 Der PI3-Kinase-Signalweg

Die PI3-Kinase bindet über ihre regulatorische Untereinheit (p85) an die phosphorylierten Tyrosine der zytoplasmatischen Domäne von CD28. Durch diese membran-naher Lokalisierung kann die PI3-Kinase Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3) phosphorylieren. Der "second-messenger" PIP3 aktiviert, wie bereits erwähnt, die GEFs VAV und SOS, die über JNK und die MAP-Kinase Kaskade zur Transkription der IL-2-mRNA führen. Außerdem regulieren die Mitglieder des PI3-Kinase-Signalweges, VAV und Rac, die Rekrutierung von PKC- $\theta$  zu der IS und führen somit zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Villalba et al. 2000).

PIP3 ist vor allem ein zentraler "second-messenger" für die durch die Kostimulation ausgelösten Signalwege. An dieses Phospholipid bindet über seine PH-Domäne PDK1 (Phosphatidylinositol-Dependent Kinase-1) und aktiviert AKT/PKB (Protein Kinase B) durch die Phosphorylierung eines Threoninrestes. Vollständig aktiviertes AKT/PKB

phosphoryliert seinerseits eine Reihe von Substraten, unter Anderem auch den Forkhead-Transkriptionsfaktor FoxO1 (Appleman et al. 2002). Phosphoryliertes FoxO ist ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und ist somit nicht mehr in der Lage die Transkription von Zellzyklusinhibitoren wie p27/kip zu ermöglichen. p27/kip ist ein Inhibitor der für den Zellzyklus essentiellen Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk). *In-vivo* sind p27/kip und andere Zellzyklusinhibitoren in ruhenden T-Zellen in hohen Mengen nachweisbar, in aktivierten T-Zellen jedoch stark reduziert. Dies trifft auch für *in-vitro* stimulierte humane T-Zellen zu, wie sie in Teilen dieser Arbeit verwendet wurden (siehe Abbildung 1.4). Die Reduktion der Zellzyklusinhibitoren nach PI3-Kinase-Aktivierung durch CD28 ist somit ein notwendiger Schritt für den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die klonale Expansion aktivierter Effektor T-Zellen (Appleman et al. 2000).



**Abbildung 1.4: Transkriptionelle Regulation von p27/kip- und Rb/p130-mRNA nach *in-vitro* T-Zell Stimulation.** Quantitative PCR-Analyse der relativen mRNA-Mengen von p27/kip und Rb/p130 in stimulierten humanen T-Zellen. Die für dieses Experiment verwendeten PBLs wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Antikörpern stimuliert und so der Aktivierungsstatus der T-Zellen verändert. Die mit  $\alpha$ -CD3/CD28 stimulierten T-Zellen weisen verringerte mRNA-Mengen der Zellzyklusinhibitoren p27/kip und Rb/p130 auf. In anergenen T-Zellen (behandelt mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD3/CD28/PD1 oder  $\alpha$ -CD3/CD28/CTLA4) bleibt die Transkription der Zellzyklusinhibitoren dagegen unverändert. Daten freundlicherweise von J. Schultze (Universitätsklinikum Köln) zur Verfügung gestellt.

## 1.4 Immunologische Toleranz

Die Schaffung des TCR Repertoires von  $10^{18}$  theoretisch möglichen Spezifitäten während der T-Zellreifung ermöglicht dem Immunsystem zwar die Bekämpfung vieler Pathogene, beinhaltet aber auch die Gefahr, selbstreaktive TCRs zu generieren. Eine Reaktion von T-Zellen gegen körpereigene Strukturen oder aus der Nahrung aufgenommene Nährstoffe wäre nicht nur kontraproduktiv, sondern lebensbedrohlich. Toleranzverlust ist mit den Krankheitsbildern der Multiplen Sklerose, Rheumatoider Arthritis und TypI-Diabetes assoziiert (Ridgway et al. 1994). Daher müssen autoreaktive T-Zellen identifiziert und kontrolliert werden, ohne eine effektive Immunreaktion gegen Pathogene zu verhindern. Diese Forderung wird durch die verschiedenen Mechanismen der immunologischen Toleranz, d.h. der Unterscheidung der Lymphozyten zwischen "Selbst" und "Fremd" gewährleistet. Die T-Zell-Toleranz des Organismus gegenüber körpereigenen oder aus der Nahrung aufgenommenen Strukturen wird über verschiedene Mechanismen erzielt.

Der erste Kontrollmechanismus zur Identifikation selbstreaktiver T-Zellen findet bereits während der embryonalen T-Zellreifung im Thymus statt und ist unter dem Begriff der zentralen Toleranz zusammengefasst. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf der Expression möglichst vieler körpereigener Antigene durch die medullären Thymusepithelzellen (MECs, engl. **M**edullary **E**pithelial **C**ells) (Derbinski et al. 2001). Die Transkription dieser gewebsspezifischen Antigene unterliegt wahrscheinlich dem AIRE-Protein. Obwohl bei AIRE bisher noch kein klassisches DNA-Bindemotiv nachgewiesen werden konnte, wird es dennoch als Transkriptionsfaktor betrachtet. Bindet während der T-Zell Reifung ein Thymozyt mit entsprechendem TCR an eines dieser von MECs exprimierten gewebsspezifischen Antigene, kommt es zur negativen Selektion, d.h. zur klonalen Deletion dieses potentiell autoreaktiven Thymozyten (Mathis et al. 2004).

### 1.4.1 Periphere Toleranz

Der im Thymus durchgeführte Prozess der klonalen Deletion ist nicht vollständig, so dass autoreaktive T-Zellen auch in die Peripherie gelangen. Diese Zellen werden durch verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz kontrolliert. Man unterscheidet bei der peripheren Toleranz zwischen intrinsischen und extrinsischen Mechanismen. Zu den intrinsischen Mechanismen zählen jene, die direkt die autoreaktive T-Zelle beeinflussen, wie beispielsweise Ignoranz (Oldstone et al. 1991; Ohashi et al. 1991), Anergie (Schwartz

et al. 1989) oder klonale Deletion (Webb et al. 1990; Jones et al. 1990a). Die extrinsischen Mechanismen kontrollieren autoreaktive T-Zellen durch die Aktivierung regulativer Zellpopulationen, wie z.B. tolerogene DCs oder regulatorische T-Zellen.

### **Anergie als intrinsischer Mechanismus der peripheren Toleranz**

Der Begriff der Anergie wurde erstmals durch Nossal und Pike geprägt, als sie nach Injektion von löslichem Antigen die Bildung von Ag-spezifischen B-Zellen beobachteten, die nach Restimulation keine Immunglobuline bildeten. Ein aneger Zustand von T-Zellen wurde zunächst ebenfalls nach Injektion von löslichem Antigen in CD4<sup>+</sup>T-Zellen beobachtet. Später wurde gezeigt, dass neben der Erkennung des MHC-gebundenen Antigens die Abwesenheit einer CD28-Stimulation für einen anergen Zustand der T-Zelle oder Apoptose zentral ist (Blackman et al. 1990; Jones et al. 1990b). Das aktuelle Modell der Anergie-Induktion *in-vivo* besagt, dass nicht nur die fehlende CD28 Stimulation, sondern auch die Stimulation negativ-regulatorischer Rezeptoren, wie CTLA-4 oder PD-1, essentiell für die Induktion von T-Zellanergie ist (Perez et al. 1997; Nishimura et al. 1999).

Anergie ist ein zellulärer Zustand, in dem T-Zellen zwar leben, aber nicht mehr in der Lage sind, auf rezeptorspezifische Stimulation des TCR in Anwesenheit von Kostimulation IL-2 zu synthetisieren, Effektor-Funktionen zu entwickeln oder zu proliferieren (Schwartz 1990; Mueller et al. 1991). Die IL-2-mRNA-Transkription ist in anergen T-Zellen um das 8-fache, die IL-2-Proteinsynthese um das 20-fache reduziert (Kang et al. 1992). Außerdem sind anerge Zellen unfähig, in periphere Lymphknoten einzuwandern, um dort mit B-Zellen zu interagieren (Kearney et al. 1994). Durch die verringerte Expression von CD40 auf der Oberfläche anerer CD4<sup>+</sup>T-Zellen kann die Proliferation von B-Zellen nicht mehr angeregt werden (Bowen et al. 1995). Experimentell kann Anergie durch hohe Dosen von Antigen, orale oder intravenöse Antigen-Gabe in Abwesenheit von Adjuvantien oder durch TCR-Stimulation mit einem  $\alpha$ -CD3-Antikörper erreicht werden (Jenkins et al. 1990; Mueller et al. 1989a).

Die molekularen Mechanismen, die zur Anergieinduktion bzw. Anergieerhalt führen, sind weitgehend unbekannt. Anergien T-Zellen ist unter Anderem eine Blockade des Zellzyklus in der G1 Phase (Boussiotis et al. 1994; Boussiotis et al. 2000) sowie eine aberrante Komposition der IS (Eisenbraun et al. 2000) gemeinsam. Fields *et al.* postulieren, dass eine Inhibition der Ras-Aktivierung nach TCR-Stimulation in Abwesenheit von Kostimulation zu der Blockade der IL-2 Transkription in CD4<sup>+</sup>T-Zellen führt (Fields et al. 1996).

Die verringerte Ras-Aktivierung hat eine reduzierte Aktivität der Map-Kinase Proteine Erk und c-Jun (JNK) und damit das Fehlen des für die Aktivierung des IL-2-Promotors wichtigen Transskriptionsfaktors AP1 zur Folge (Kang et al. 1992; Li et al. 1996). Eine *in-vitro* Anergie Induktion ist von einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Flux) abhängig, da EGTA oder Cyclosporin A die Induktion der Anergie unterbinden (Sloan-Lancaster et al. 1993; Mueller et al. 1989b; Sloan-Lancaster et al. 1996).

### Lebervermittelte Toleranz

Neben verschiedenen Stoffwechsel-Funktionen nimmt die Leber bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine herausragende Rolle ein. Sie ist zeitlebens in der Lage, gegenüber oralen, aus der Nahrung stammenden Antigenen Toleranz zu induzieren. Eine für diese Funktion wichtige Zellpopulation stellen die sinusoidalen Leberendothelzellen (**L**iver **S**inusoidale **E**pithelial **C**ells, LSECs) dar. Sie kleiden die Innenwände der Lebersinusoiden aus und stehen daher in engem räumlichen Kontakt zu den die Sinusoiden durchwandernden T-Zellen. LSECs sind leberresidente APCs, die über Mannose- und Scavenger-Rezeptoren lösliche Antigene aus dem Blutstrom aufnehmen und auf MHC-I-Molekülen präsentieren können (Knolle et al. 1998). Die Präsentation exogener Antigene auf MHC-I-Molekülen gegenüber  $\text{CD8}^+$ T-Zellen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. LSECs sind 100-10000x effektiver in Bezug auf die Kreuzpräsentation MHC-I gebundener Antigene als DCs oder Makrophagen. Diese Kreuzpräsentation der LSECs führt zu der Induktion einer systemischen antigenspezifischen Immuntoleranz in  $\text{CD8}^+$ T-Zellen (Limmer et al. 2000). Neben für die Interaktion mit T-Zellen wichtigen Adhäsionsmolekülen CD54 und CD106, finden sich kostimulatorische Moleküle, wie PD-L1, CD80 CD86 oder CD40 auf der Zelloberfläche von LSECs.

### Regulatorische T-Zellen

Man unterscheidet heute verschiedene Klassen von immunmodulatorischen T-Suppressor-Zellen. Neben den besser erforschten  $\text{CD4}^+$ -Suppressor-T-Zellen gehören  $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ T-Zellen, NK-Zellen und doppelt negative  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ T-Zellen ebenfalls zu den T-Zellen mit supressiven Eigenschaften (Cosmi et al. 2003).

Bei den  $\text{CD4}^+$ -Suppressor-T-Zellen differenziert man zwischen den in der Peripherie induzierten, FoxP3-unabhängigen regulatorischen T-Zellen und den natürlich vorkommenden, FoxP3-abhängigen regulatorischen T-Zellen, die im Folgenden als  $T_{\text{regs}}$  bezeichnet werden.

Beide supprimieren sowohl antigenabhängig als auch antigenunabhängig immunpathologische Vorgänge, wie Autoimmunreaktionen oder überstarke Immunreaktionen gegenüber Pathogenen *in vivo*, und stellen damit die extrinsischen Kontrollmechanismen der peripheren Toleranz dar.

Die induzierbaren CD4<sup>+</sup>-Suppressor-T-Zellen werden in TR1-Zellen und TH3-Zellen unterteilt. TR1-Zellen sezernieren das immunsupprimierende Zytokin IL-10 und inhibieren so die Proliferation von naiven T-Zellen *in-vitro* und die Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in-vivo* (Groux et al. 1997; Roncarolo et al. 2003). Ihre Hauptaufgabe liegt in der Kontrolle von APCs und der kontrollierten Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Pasare et al. 2003). Die TGF- $\beta$ -sezernierenden TH3 Zellen wurden im Zusammenhang mit oraler Toleranz beschrieben.

Die natürlich vorkommenden T<sub>reg</sub>-Zellen bilden ca. 5-10 % der CD4<sup>+</sup> Population in der Maus und exprimieren konstitutiv CD25 und CTLA-4 auf ihrer Zelloberfläche (Shevach 2000; Sakaguchi et al. 1995; Read et al. 2000). Sie werden hauptsächlich postnatal im Thymus aus solchen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T-Zellen gebildet, die sich zu CD4<sup>+</sup>T-Zellen entwickeln werden. Untersuchungen einer TCR spezifischen transgenen Maus zeigten, dass eine hohe Affinität des TCR für Autoantigene bei der Entwicklung von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T-Zellen zentral ist (Hsieh et al. 2004). Warum nicht alle T-Zellen mit einer hohen Affinität zu einem Autoantigen/MHC-Komplex deletiert werden, sondern sich einige zu regulatorischen T-Zellen entwickeln, ist unbekannt. Als zuverlässigster Oberflächenmarker der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> gilt der Forkhead-Transkriptionsfaktor FoxP3 (Hori et al. 2003; Fontenot et al. 2003). FoxP3 wird ausschließlich in T<sub>regs</sub> exprimiert und ist für deren Entwicklung und die Expression anderer <sub>reg</sub>-assoziierter Moleküle, wie CD25 und CTLA-4, essentiell. FoxP3 "Loss-of-function" Mutationen in Maus und Mensch verhindern die Bildung einer T<sub>reg</sub>-Zellpopulation und gehen einher mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus TypII, Thyroiditis sowie atopischen Erkrankungen und Nahrungsmittelallergien (Ramsdell 2003; O'Garra et al. 2003). Die klinische Bedeutung einer veränderten Anzahl oder dem Verlust der Suppressorfunktion von T<sub>regs</sub> ist im kausalen Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, wie Multipler Sklerose, malignen Erkrankungen, Diabetes mellitus oder Myasthenia gravis beschrieben. Eine Autoimmunantwort naiver, autoreaktiver T-Zellen wird von T<sub>regs</sub> hauptsächlich durch Zell-Zell-Kontakt inhibiert. Die Proliferation und Differenzierung vorhandener Effektor-T-Zellen reprimieren T<sub>regs</sub> über die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine, wie z.B. IL-10 und TGF- $\beta$

sowie direkten Zell-Zell-Kontakt. Neben dem beschriebenen  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -Phänotypen ist ein aneuger Zustand *in-vitro* charakteristisch für  $T_{regs}$ . Dies scheint allerdings nicht für eine *in-vivo* Situation zu gelten, da hier eine begrenzte Proliferation von  $T_{regs}$  nach Antigenstimulation nachgewiesen werden konnte (Walker et al. 2003).

## 1.5 Neue Faktoren in der T-Zell Aktivierung: Cytohesine

Die Familie der Cytohesine sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Guanine nucleotide Exchange Factor, GEF) für kleine ADP-Ribosylierungsfaktoren (ADP Ribosylation Factors, ARFs). Mit einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa gehören sie zu der Gruppe der kleinen BFA-unempfindlichen GEFs. Im murinen und humanen System wurden bisher vier verschiedene Cytohesine, Cytohesin-1 bis -4, identifiziert; in *D. melanogaster* ist dagegen ein Vertreter der Cytohesine, *steppke*, bekannt. Alle Cytohesin-Familienmitglieder bestehen aus ca. 400 Aminosäuren und weisen eine stark konservierte Domänenstruktur auf, die in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist. N-terminal findet sich eine Coiled-coil Domäne, ein weit verbreitetes Protein-Protein-Interaktionsmotiv, von dem angenommen wird, bei der Dimerisierung von Cytohesin-1 beteiligt zu sein (Moss et al. 2002). Daran schließt sich mit 200 Aminosäuren die für die GEF-Aktivität an ARFs essentielle Sec-7 Domäne an (Meacci et al. 1997). Die nur in GTP-gebundener Form aktiven ARFs sind monomere GTPasen und am zellulären Vesikeltransport und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Sie werden in drei Gruppen unterteilt: Zur Gruppe 1 gehören die zytoplasmatischen ARF1 und ARF3, die den Vesikeltransport zum Golgi Apparat und zum Endoplasmatischen Retikulum ermöglichen. ARF4 und ARF5 gehören der Gruppe 2 an und sind mit dem Trans-Golgi-Netzwerk assoziiert. ARF6 bildet die dritte Gruppe der ARFs und ist an der Plasmamembran lokalisiert, wo es an endo- und exozytotischen Prozessen beteiligt ist (Pacheco-Rodriguez et al. 1999). Die der Sec-7 Domäne folgende Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) ermöglicht die Rekrutierung der Cytohesine an die Plasmamembran. Die Membranrekrutierung entsteht durch die Bindung der PH-Domäne an die Phospholipide PIP2 und PIP3 (Nagel et al. 1998). Die Affinität der Cytohesine für PIP2 oder PIP3 wird in erster Linie durch ein Di- bzw. Tri-Glyzin-Motiv innerhalb der PH-Domäne determiniert (Klarlund et al. 2000; Cronin et al. 2004). Klarlund et al. konnten zeigen, dass Cytohesine mit einem Di-Glyzin Motiv in ihrer PH-Domäne ei-

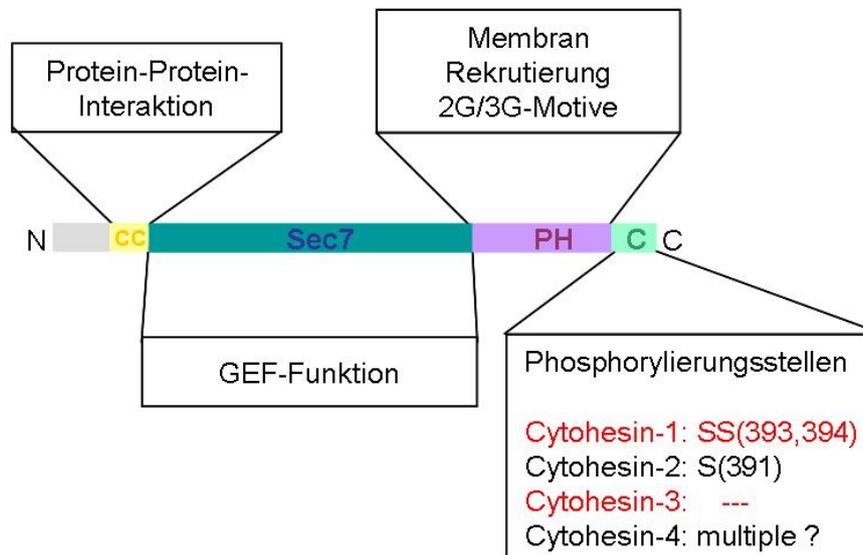
ne vergleichsweise höhere Affinität zu PIP3 als zu PIP2 aufweisen. Die Tri-Glyzin Motive unterscheiden sich dagegen in ihrer Affinität für PIP3 und PIP2 nur wenig voneinander. Der PH-Domäne folgt die C-terminale polybasische Domäne mit einer für die einzelnen Cytohesine unterschiedlichen Anzahl an Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen.

Durch die Generierung und Untersuchung einer transheterozygoten *steppke*-Mutante, dem einzigen in Fliegen exprimierten Cytohesin, konnte *steppke* als eine essentielle Komponente der PI3-Kinase abhängigen Insulin-Signalkaskaden identifiziert werden (Fuss et al. 2006). Die verringerte *steppke*-Expression in diesen Fliegen hatte eine Reduktion der Körpergröße und des Gewichts in allen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* zur Folge. Zeitgleich wurden von Hafner *et al.* durch die Verwendung des Cytohesin-spezifischen GEF-Inhibitors SecinH3 auch eine Beteiligung der Cytohesine in der Insulin-Signaltransduktionskaskade von Vertebraten gezeigt (Hafner et al. 2006). Beide Gruppen konnten einen Einfluss von Cytohesin auf die PI3-Kinase und damit auf frühe Ereignisse des Insulin-Signalweges nachweisen.

Trotz der hohen Sequenzhomologie scheinen die verschiedenen Vertreter der Cytohesin-Familie nicht redundant in Zellen exprimiert zu sein. Die im Folgenden näher dargestellten strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Cytohesinen könnten dabei für eine differentielle Funktion essentiell sein. In dem dieser Arbeit angefügten Anhang findet sich unter Abbildung 6.2 ein Sequenzvergleich der verschiedenen humanen Cytohesine.

### 1.5.1 Cytohesin-1

Das zytoplasmatische Protein Cytohesin-1 wird überwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und wurde als spezifischer Interaktionspartner der beta2-Untereinheit (CD18) des Integrins LFA-1 identifiziert (Kolanus et al. 1997). Die Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18 reguliert die Affinität von LFA-1 gegenüber seinem Liganden ICAM-1 und wird als “inside-out signaling“ bezeichnet. Die Interaktion mit CD18 wird, wie die GEF-Funktion, von der Sec-7 Domäne vermittelt (Geiger et al. 2000). Eine GEF-Funktion von Cytohesin-1 gegenüber ARF-1 konnte sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* nachgewiesen werden (Meacci et al. 1997; Franco et al. 1998; Meacci et al. 1997). Eine GDP/GTP-Austauschfunktion von Cytohesin-1 an ARF6 ist hingegen weitgehend umstritten (Frank et al. 1998; Langille et al. 1999; Knorr et al. 2000; Weber et al. 2001). Die Expression einer dominant-negativen Cytohesin-1 Sec-7 Mutante (Cytohesin-1 E157K) in Jurkat E6 T-Zellen unterbindet nicht nur den GDP/GTP-Austausch an ARF1, son-



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Cytohesin-Domänenstruktur.** Die vier Cytohesin-Familienmitglieder weisen N-terminal eine Coiled-coil Domäne und eine zentrale Sec-7 Domäne auf. Die PH-Domäne wird gefolgt von der C-terminalen polybasischen Domäne.

dern auch die LFA-vermittelte Adhäsion an ICAM-1 (Geiger et al. 2000). Cytohesin-1 weist in der polybasischen Domäne zwei Serine auf (S393, S394), die durch verschiedene PKC Isoformen nach PMA-Stimulation von Jurkat E6 T-Zellen phosphoryliert werden [Kellersch und Obrusnik, unveröffentlicht]. Dierks *et al.* zeigten, dass phosphoryliertes Cytohesin-1 mit dem kortikalen Aktinzytoskelett assoziiert (Dierks et al. 2001). Es sind zwei Spleissvarianten von Cytohesin-1 bekannt, die sich lediglich durch ein zusätzliches, für ein Glyzin kodierendes Triplet innerhalb der PH-Domäne unterscheiden. Da in Zellen überwiegend die Tri-Glyzin Variante von Cytohesin-1 nachgewiesen werden kann, wurde in dieser Arbeit ausschließlich, bis auf gesondert gekennzeichnete Experimente, die Tri-Glyzin-Variante von Cytohesin-1 verwendet.

Untersuchungen der durch das Herpes-Virus kontrollierten zellulären Signalwege zeigten einen Einfluss von Cytohesin-1 auf die Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinase (Kliche et al. 2001). Eine Beteiligung von Cytohesin-1 an Signalkaskaden der T-Zellaktivierung wurde erstmals 2003 beschrieben (Perez et al. 2003). Die Gruppe zeigte eine Beteiligung von Cytohesin-1 an der ICAM-2 induzierten Aktivierung von T-Zellen. Phosphorylier-

tes Cytohesin-1 soll hier als positiver Signalfaktor oberhalb von ERK1/2 in der MAP-Kinasekaskade lokalisiert sein (Perez et al. 2003).

### 1.5.2 Cytohesin-2

Cytohesin-2, auch als ARNO (**ARF Nucleotide-binding site Opener**) bezeichnet, weist eine 83%ige Sequenzhomologie zu Cytohesin-1 auf und ist im Gegensatz zu Cytohesin-1 ubiquitär exprimiert. Analog wie für Cytohesin-1 beschrieben, gibt es auch für Cytohesin-2 zwei verschiedene Spleissvarianten, die für ein Di- oder ein Tri-Glyzin Motiv innerhalb der PH-Domäne kodieren (Ogasawara et al. 2000; Klarlund et al. 2000). *In-vitro* konnte sowohl eine GEF-Funktion von Cytohesin-2 an ARF1 als auch an ARF6 nachgewiesen werden (Chardin et al. 1996). Überexprimiertes Cytohesin-2 ist sowohl an der Plasmamembran als auch im Zytoplasma zu finden und ist in der Lage, das Aktin Zytoskelett zu modulieren (Frank et al. 1998). Theis *et al.* zeigten, dass Cytohesin-2 im Gegensatz zu Cytohesin-1 an der MAP-Kinasekaskade in Nicht-Immunzellen beteiligt ist (Theis et al. 2004).

### 1.5.3 Cytohesin-3

Klarlund *et al.* beschrieben das murine Cytohesin-3-Homolog GRP1 (**G**eneral **R**eceptor for **P**hosphoinositides, GRP1) als Interaktor für PIP3 (Klarlund et al. 1997). Das auch als ARNO3 bezeichnete humane Cytohesin-3 weist eine 88%ige Sequenzhomologie zu Cytohesin-1 auf und ist, mit Ausnahme von Leber und Thymus, in nahezu allen Körperzellen exprimiert (Franco et al. 1998). Die Sequenzen des murinen GRP1 und des humanen Cytohesin-3 sind, bis auf vier Aminosäuren, zueinander vollständig identisch (Sequenzvergleich siehe Anhang, Abbildung 6.1). Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede zwischen GRP1 und dem humanen Cytohesin-3 wird GRP1 in dieser Arbeit in allen Experimenten verwendet und als Cytohesin-3 bezeichnet. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Cytohesinen ist überexprimiertes Cytohesin-3 fast ausschließlich an der Plasmamembran von Zellen zu finden. Cytohesin-3 reguliert ebenfalls die Adhäsion von LFA-1 zu seinem Bindungspartner ICAM-1 und beeinflusst somit die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelien (Korthäuer et al. 2000). Eine GEF Aktivität von Cytohesin-3 konnte zunächst nur für ARF1 nachgewiesen werden, später wurde jedoch auch *in-vitro* eine Austauschfunktion von Cytohesin-3 an ARF6 gezeigt (Franco et al. 1998; Klarlund et al. 1998; Langille et al. 1999).

Cytohesin-3 unterscheidet sich in zwei für diese Arbeit wesentlichen Punkten von den anderen bekannten Cytohesinen: Zum Einen ist Cytohesin-3 das einzige Familienmitglied, das in der C-terminalen, polybasischen Domäne keine Phosphorylierungsstellen aufweist. Wie von verschiedenen Gruppen bereits gezeigt, ist die durch verschiedene Stimuli hervorgerufene Cytohesin-1-Phosphorylierung für unterschiedliche zelluläre Signalwege von Bedeutung (Perez et al. 2003; Dierks et al. 2001). Zum Anderen wird Cytohesin-3, im Unterschied zu Cytohesin-1 und Cytohesin-2, nur als Di-Glyzin-Transkriptionsvariante exprimiert und hat damit eine höhere Affinität zu PIP3 als die Cytohesine mit einem Tri-Glyzin-Motiv (Ogasawara et al. 200; Klarlund et al. 2000).

Korthäuer *et al.* beschreiben eine selektiv verstärkte Expression von Cytohesin-3-mRNA in *in-vitro* generierten anergen T<sub>H1</sub>-Zellen. Eine veränderte IL-2 Produktion der T<sub>H1</sub>-Zellen nach retroviraler Expression von Cytohesin-3 konnte jedoch nicht gezeigt werden (Korthäuer et al. 2000). Daher konnte bisher kein funktioneller Zusammenhang zwischen Cytohesin-3 und Anergie-Induktion oder -Erhalt hergestellt werden.

#### 1.5.4 Cytohesin-4

Das im Jahr 2000 von Ogasawara *et al.* identifizierte Cytohesin-4 ist als jüngster Vertreter der Cytohesin-Familie bisher kaum charakterisiert. Es hat von allen Mitgliedern der Familie mit 69% die geringste Sequenzhomologie mit Cytohesin-1 und wird fast ausschließlich in peripheren Leukozyten exprimiert (Ogasawara et al. 2000). Es katalysiert den GDP/GTP-Austausch an ARF1 und ARF5, nicht aber an ARF6. In der polybasischen Domäne weist Cytohesin-4 mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen auf, die allerdings nicht experimentell nachgewiesen sind. Interessanterweise wird Cytohesin-4, genau wie Cytohesin-3, ausschließlich in der Di-Glyzin-Variante exprimiert und weist somit eine hohe Bindungsaffinität zu dem "second-messenger" PIP3 auf.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

|   |   |
|---|---|
| Agarosegeldokumentation                 | Gel Max, INTAS                                  |
| Agarosegelelektrophoresekammer          | Polymehr  |
| Autoklav                                | Model 135T, H+P                                 |
| Bakterien-Schüttler                     | Edmund Bühler VKS-75 control, Johanna Otto GmbH |
| Durchflußzytometer                      | Epics XL, Beckman Coulter                       |
| Drehrad                                 | Rotator, Neolab                                 |
| Elektrophoresekammer                    | Mini Trans-Blot Cell, Biorad                    |
| Elektroporationsapparatur               | GenePulser Xcell, Biorad<br>Nucleofector, Amaxa |
| Elektrowaage                            | College, Mettler Toledo                         |
| Entwicklermaschine                      | Optimax Typ TR, MS Laborgeräte                  |
| Feinwaage                               | Mettler Toledo                                  |
| Fluoreszenz- und<br>Absorptionsmeßgerät | Synergy HT, MWG                                 |
| Heizblock                               | Thermomixer compact, Eppendorf                  |
| Konfokales Laser-<br>Scanning-Mikroskop | FV-1000, Olympus                                |
| Lichtmikroskop                          | DMIL, Leica                                     |
| Magnetrührer                            | ARE, VELP scientifica                           |
| Netzgerät für Elektrophorese            | Elite300Plus, Schütt Labortechnik               |
| PCR-Maschine                            | Mycycler, Biorad                                |
| Real-Time PCR Cyclus                    | iCycler iQ5, Bio-Rad                            |
| pH-Meter                                | MP220, Mettler Toledo                           |
| Photometer                              | Biophotometer, Eppendorf                        |

---

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Pipetten                          | P2, P10, P100, P1000, Eppendorf  |
| Pipettierhilfe                    | Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte   |
| Protein-Minigel-Apparaturen       | Mini-Protean, BioRad   |
| Stabsonifikator                   | UW/HD 2070, Bandelin Elektronik  |
| Sterilbank für Zellkulturarbeiten | Euroflow, Thermolife   |
| Vortex                            | Zx3, VELP scientifica  |
| Wasserbad                         | Typ 1004, GFL  |
| Wippe                             | Rocky, Fröbel Labortechnik   |
| Zellkulturinkubator               | Model 381, ThermoForma   |
| Zentrifugen                       | Multifuge 4KR, Heraeus instrument<br>Biofuge pico, Heraeus instrument<br>Biofuge fresco, Heraeus instrument<br>Avanti J-20XP, Beckman Coulter<br>Optima LE-80K Ultracentrifuge,<br>Beckman Coulter |

### 2.1.2 Chemikalien

Alle nicht hier aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

|  |                 |
|--|-----------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (29:1) 30 % | Roth            |
| Agarose                                | Invitrogen      |
| Agarose (LMP-Agarose)                  | NuSieve, Biozym |
| Alkalische Phosphatase                 | MBI Fermentas   |
| Ammoniumacetat                         | Merck           |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)           | Roth            |
| Ampicillin                             | Roth            |
| Aprotinin                              | Sigma           |
| BCA-Reagenzlösungen                    | Pierce          |
| Bromphenolblau                         | Roth            |
| n-Butanol                              | Roth            |
| Cäsiumchlorid                          | Roth            |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                | Roth            |
| Dithiothreitol (DTT)                   | Roth            |
| DNS-Auftragspuffer 6x Loading Dye      | MBI Fermentas   |
| dNTP-Mix                               | MBI Fermentas   |
| EDTA                                   | Roth            |
| EGTA                                   | Roth            |
| Ethidiumbromid                         | Roth            |
| Gentamicin                             | Gibco           |
| Glycerin                               | Roth            |
| Glycerolphosphat                       | Sigma           |
| HEPES                                  | Roth            |
| ECL Western Blotting Reagenz           | Pierce          |
| Igepal                                 | Sigma           |
| Imidazol                               | Roth            |
| Kanamyzin                              | Roth            |

---

|  |                      |
|--|----------------------|
| LB-Agar  | Difco                |
| Leupeptin  | Sigma                |
| Lithiumchlorid   | Roth                 |
| LMP-Agarose NuSieve                                    | GTG Agarose, Biozym  |
| Luciferase assay reagent                               | Promega              |
| 2-Mercaptoethanol                                      | Roth                 |
| Methanol   | Roth                 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                             | Roth                 |
| Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) | Sigma                |
| Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)                     | Sigma                |
| 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA)              | Sigma                |
| Paraformaldehyd  | Merck                |
| Phenol   | Roth                 |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                     | Sigma                |
| Phorbolster  | Sigma                |
| Phosphatase-Inhibitor-Cocktail                         | Sigma                |
| 2-Propanol   | Roth                 |
| Protein A Sepharose <sup>TM</sup> 6MB                  | Amersham Biosciences |
| Protein G Sepharose <sup>TM</sup> , 4 fast flow        | Amersham Biosciences |
| Restriktionsendonukleasen                              | MBI Fermentas        |
| RNAaseA  | MBI Fermentas        |
| Reporter lysis buffer                                  | Promega              |
| Rinderserumalbumin (BSA)                               | Roth                 |
| T4 DNA Ligase  | MBI Fermentas        |
| T4 Polynukleotidkinase                                 | MBI Fermentas        |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)                    | Roth                 |
| Tris-[hydroxymethyl]aminomethan (Tris)                 | Roth                 |
| TRIzol   | Invitrogen           |
| Triton X-100   | Roth                 |
| Trypsin/EDTA-Lösung                                    | Gibco                |
| Tween-20   | Roth                 |
| Vent Polymerase  | NEB                  |

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

|  |                        |
|--|------------------------|
| Elektroporationsküvetten, 4 mm Spalt                 | BioRad                 |
| Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)                     | Starlab                |
| Filterpapier Whatman Nr.4                            | Schleicher und Schuell |
| Magnetic beads                                       | Dynal Biotech          |
| Mikrotiterplatten (96 Loch)                          | Nunc                   |
| Mikrotiterplatten (96 Loch)                          | Greiner Bio-one        |
| weiss opaq   |                        |
| Nitrozellulosemembran PROTRAN                        | Schleicher und Schuell |
| PCR-Reaktionsgefäße 200 $\mu$ l                      | Thin Wall Tubes Biorad |
| PCR-Multititerplatten (96 Loch)                      | Biorad                 |
| Röntgenfilm Hyperfilm <sup>TM</sup> MP               | Amersham Biosciences   |
| Sterilfilter (0,2 $\mu$ m/0,45 $\mu$ m)              | Schleicher und Schuell |
| Ultrafiltrationsmembran<br>(Ausschlußvolumen 10 kDa) | Millipore              |
| Ultrazentrifugationsröhrchen                         | Beckman                |
| Verbandmull  | Hartmann               |
| Zellkulturflaschen 175/75/25 cm <sup>2</sup> )       | Greiner Bio-one        |
| Zellkulturschalen<br>(145/20 mm;100/20 mm; 60/15 mm) | Greiner Bio-one        |

### 2.1.4 Kulturmedien, Seren und Puffer

|               |             |
|---------------|-------------|
| DMEM          | Invitrogen  |
| FCS           | Invitrogen  |
| Ficoll        | Pan Biotech |
| HBSS          | PAA         |
| Optimem       | Invitrogen  |
| PBS           | PAA         |
| RPMI 1640     | PAA         |
| Trypsin/EDTA  | Invitrogen  |
| VLE-RPMI 1640 | Biochrom    |

### 2.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| BCA Reagenz                   | Pierce             |
| cDNA Archive Kit              | Applied Biosystems |
| HRP Detektionssystem          | Amersham           |
| iQ Supermix                   | Bio-Rad            |
| Human T-cell Nucleofector Kit | AMAXA              |
| Metafectene                   | Biontex            |
| Reporter Lyse Puffer          | Promega            |
| Luziferase Substrat           | Promega            |

### 2.1.6 Lösungen und Puffer

|                       |  |                            |  |
|-----------------------|--|----------------------------|--|
| 50x TAE:              | 242 g Tris<br>57 ml 100% Essigsäure<br>50 mM EDTA<br>ad 1 H <sub>2</sub> O   | 10x TBST:                  | 121,1 g Tris pH 7.5<br>87,66 g NaCl<br>0,05 % Tween<br>ad 1 l H <sub>2</sub> O |
| 10x PBS:              | 80 g NaCl<br>2 g KCl<br>14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>ad 1 H <sub>2</sub> O pH 7.4 | Igepal-Lysepuffer:         | 1 mM Hepes pH 7.5<br>10 mM KCl<br>10 mM MgCl<br>150 mM NaCl<br>1% Igepal       |
| 3 x Proben<br>-puffer | 150 mM Tris/HCl,<br>pH 6.8<br>6% SDS (w/v)<br>30% Glycerin (v/v)<br>300 mM DTT<br>0,3% Bromphenolblau<br>(w/v)                           | TritonX-100<br>Lysepuffer: | 150 mM NaCl<br>1 mM EDTA<br>1 mM EGTA<br>20 mM Tris pH 7.5<br>1 % TritonX-100  |

---

|                   |   |            |  |
|-------------------|---|------------|--|
| Lämmli-<br>Puffer | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>0,1 % SDS (w/v)<br>ad 1 l A. bidest. | Blotpuffer | 192 mM Glycin<br>25 mM Tris-Base<br>20 % Methanol (v/v)<br>0,002 % SDS (w/v) |
|-------------------|---|------------|--|

## Sammelgel 5 %ig

|  |             |
|--|-------------|
| A. bidest                                | 2,05 ml     |
| 1 M Tris/HCl (pH 6.8)                    | 375 $\mu$ l |
| 10 % SDS                                 | 30 $\mu$ l  |
| 10 % APS                                 | 30 $\mu$ l  |
| Temed                                    | 3 $\mu$ l   |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (37,5:1) | 0,5 ml      |

## Trenngel 10 %ig

|  |            |
|--|------------|
| A. bidest                                | 2 ml       |
| 1 M Tris/HCl (pH 6.8)                    | 1,25 ml    |
| 10 % SDS                                 | 50 $\mu$ l |
| 10 % APS                                 | 50 $\mu$ l |
| Temed                                    | 2 $\mu$ l  |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (37,5:1) | 1,515 ml   |

### 2.1.7 Antikörper

#### Primäre Antikörper

| Bezeichnung                       | Verdünnung                                   | Spezies   | Herkunft                     |
|-----------------------------------|--|-----------|------------------------------|
| CAD9                              | 1:20 (WB)                                    | Ratte     | E. Kremmer,<br>GSF (München) |
| Okt3 $\alpha$ -TCR $\epsilon$     | 3 $\mu$ g/ml<br>(T-Zellaktivierungsstudien)  | Maus      | LGC Promochem,<br>ATCC       |
| $\alpha$ -CD28                    | 10 $\mu$ g/ml<br>(T-Zellaktivierungsstudien) | Maus      | Beckton Dickinson            |
| 7H2<br>$\alpha$ -Cytohesin-1      | 1:20 (WB)<br>Hybridomüberstand               | Ratte     | E. Kremmer,<br>GSF (München) |
| 8B4<br>$\alpha$ -Cytohesin-3      | 1:50 (WB)<br>Hybridomüberstand               | Ratte     | E. Kremmer,<br>GSF (München) |
| $\alpha$ -Human IgG               | 1:1000 (WB)                                  | Ziege     | Dianova                      |
| $\alpha$ -phospho-<br>Cytohesin-1 | 1:1000 (WB)                                  | Kaninchen | BioSource                    |
| $\alpha$ -Flag                    | 1:1000 (WB)                                  | Maus      | Sigma                        |
| $\alpha$ -Aktin                   | 1:300 (WB)                                   | Kaninchen | Sigma                        |
| $\alpha$ -Hsc70                   | 1:1000 (WB)                                  | Maus      | Stressgen                    |
| $\alpha$ -GRP1                    | 1:300 (WB)                                   | Ziege     | Santa-Cruz                   |
| $\alpha$ -Cytohesin-1             | 1:300 (WB)                                   | Ziege     | Santa-Cruz                   |
| $\alpha$ -phospho AKT<br>(T308)   | 1:1000 (WB)                                  | Kaninchen | Cell Signaling               |
| $\alpha$ -PD-L1                   | Blocking-<br>Experimente                     | Ratte     | eBiosciences                 |
| $\alpha$ -Tubulin                 | 1:1000 (IFL)                                 | Ratte     | Chemicon                     |
| $\alpha$ -Prohibitin              | 1:300 (IFL)                                  | Kaninchen | Abcam                        |

## Sekundäre Antikörper

| Bezeichnung             | Verdünnung  | Spezies | Herkunft   |
|-------------------------|-------------|---------|------------|
| HRP $\alpha$ -Ratte     | 1:5000 (WB) | Ziege   | Dianova    |
| HRP $\alpha$ -Maus      | 1:5000 (WB) | Ziege   | Dianova    |
| HRP $\alpha$ -Ziege     | 1:5000 (WB) | Ziege   | Santa Cruz |
| HRP $\alpha$ -Kaninchen | 1:5000 (WB) | Ziege   | Dianova    |
| TRITC $\alpha$ -Maus    | 1:400 (IFL) | Ziege   | Dianova    |
| Cy3 $\alpha$ -Ratte     | 1:400 (IFL) | Ziege   | Dianova    |

## 2.1.8 Bakterienstämme

| Stamm        | Genotyp   | Verwendung                | Referenz                          |
|--------------|---|---------------------------|-----------------------------------|
| MC1061       | araD139, $\Delta$ (ara-leu)7696,<br>galE15, galK16, $\Delta$ (lac) <sub>x74</sub> ,<br>rpsL(Str <sup>r</sup> ), hsdRR2(m <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ),<br>mcrA, mcrB | Plasmid-<br>amplifikation | Casadaban<br><i>et al.</i> , 1980 |
| DH5 $\alpha$ | endA1, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), su-<br>pE44, thi1, recA1, gyrA,<br>(Nal <sup>r</sup> ), relA1  | Plasmid-<br>amplifikation | Casadaban<br><i>et al.</i> , 1980 |

## 2.1.9 Eukaryotische Zelllinien

| Bezeichnung | Phänotyp  | Verwendung                                    | Referenz  |
|-------------|---|---|---|
| Jurkat E6   | humane T-Zell-Linie aus<br>Patient mit akuter<br>Leukämie | Transiente Expression<br>von Fusionsproteinen | Weiss <i>et al.</i> ,<br>1984                     |
| Jurkat LT   | SV-40 LT-Antigen<br>exprimierendes Jurkat<br>E6-Derivat   | Reporter-Gen<br>Versuche                      | Clipstone<br>und Crabtree<br><i>et al.</i> , 1992 |
| HeLa        | fibroblastenartige<br>Zelllinie aus<br>Zervixkarzinom     | Transiente Expression<br>von Fusionsproteinen | Tyndall <i>et al.</i> ,<br>1965                   |

## 2.1.10 Längenstandards

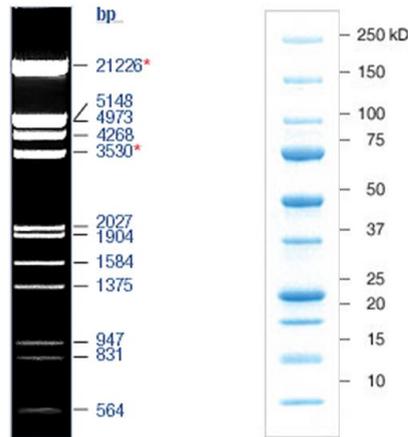


Abbildung 2.1: Verwendete Standards für die DNA- und Protein-Längenabschätzung. a: λ/EcoRI+HindIII Marker 3 DNA-Längenstandard der Firma MBI Fermentas, b: Precision Plus Protein-Längenstandard (prestained) All blue der Firma Biorad.

## 2.1.11 Plasmide

| Bezeichnung | Resistenz              | Verwendung               | Referenz   |
|-------------|------------------------|--------------------------|--|
| pRK5        | Ampizillin             | eukaryotische Expression | Eaton <i>et al.</i> , 1986, modifiziert durch W. Kolanus         |
| pN1         | Kanamycin              | eukaryotische Expression | Sangameswaran <i>et al.</i> , 1997, modifiziert durch W. Kolanus |
| pGL-IL2:Luc | Ampizillin             | Reporter-Gen Studien     | Zeitlman <i>et al.</i> , 1998                                    |
| pEG202      | Ampizillin, Histidin   | Hefe-2-Hybrid Versuch    | Ruden <i>et al.</i> , 1991                                       |
| pJG4-5      | Ampizillin, Tryptophan | Hefe-2-Hybrid Versuch    | Gyuris <i>et al.</i> , 1993                                      |

### 2.1.12 Proteinfusionsanteile

| Bezeichnung | Aufbau   | Verwendung      | Referenz                     |
|-------------|--|-----------------|------------------------------|
| Ig          | CH2- und CH3-Domäne der humanen IgG <sub>1</sub> -cDNA | Detektion (WB)  | Kolanus <i>et al.</i> , 1996 |
| eGFP        | modifizierte cDNA des GFP aus <i>Aequoria victoria</i> | Detektion (IFL) | Chalfie <i>et al.</i> , 1994 |
| Flag        | MDYKDDDDK  | Detektion (WB)  | Hopp <i>et al.</i> , 1988    |

### 2.1.13 Oligonukleotide

| Bezeichnung     | Sequenz   | Verwendung                         |
|-----------------|---|------------------------------------|
| psCyh3-for      | 5'- GATCCCCGCATGTTGTGCTCGGAC<br>AATTCAAGAGATTGTCCGAGCACAAC<br>ATGCTTTTTTGAAA-3' | pSUPER<br>Cytohesin-3<br>Konstrukt |
| psCyh3-rev      | 5'-GATCCCCGCATGTTGTGC<br>TCGGACAATTCAAGAGATTGTCCGAGC<br>ACAACATGCTTTTTTGAAA-3'  | pSUPER<br>Cytohesin-3<br>Konstrukt |
| pSUPER-RL-121s  | 5'- GATCCCCAAACATGCAGAA<br>AATGCTGTTCAAGAGACAGCATTTT<br>CTGCATGTTTTTTTTTGAAA-3' | pSUPER<br>Renilla<br>Konstrukt     |
| pSUPER-RL-121as | 5'-AGCTTTTCCAAAAAAA<br>CATGCAGAAAATGCTGTCTCTTGA<br>ACAGCATTTTCTGCATGTTTGGG-3'   | pSUPER<br>Renilla<br>Konstrukt     |
| Cyh3 Mlu for    | 5'-GGGGCGACGCGTATGGA<br>CGAAGGCGGTGGC-3'  | Cytohesin-3<br>Amplifikation       |
| Cyh3 Mlu rev    | 5'-GGGGCGGCGGCCGCCT<br>ATTTCTTATTGGCAAT-3'                                      | Cytohesin-3<br>Amplifikation       |
| Cyh3E161K-for   | 5'-CTTCCTGGGAAGGCAC<br>AGAAGATCGACCGC-3'  | Cytohesin-3<br>Mutagenese          |

| Bezeichnung            | Sequenz  | Verwendung                              |
|------------------------|--|---|
| Grp1-E161K-<br>rev-new | 5'-CTTCTGTGCCTTCCCGGG<br>AAGTCTGAAGCTCCATAGG-3'                                | Cytohesin-3<br>Mutagenese               |
| mCyh1PCR for           | 5' CATCAACGACGGAGGAGACC 3'   | Cytohesin-1<br>Amplifikation<br>aus PCR |
| mCyh3PCR for           | 5'-CTTGCACAACAACAACGTGC-3'   | Cytohesin-3<br>Amplifikation<br>aus PCR |
| mCyh3PCR rev           | 5'-CTTGACCTTTGTGACTGGGG-3'   | Cytohesin-3<br>Amplifikation<br>aus PCR |
| pSUPER<br>Cyt-1-s1     | 5'-GATCCCCTGACCTCACTCACA<br>CTTTCTTCAAGAGAGAAAGTGTGA<br>GTGAGGTCATTTTTGGAAA-3' | pSUPER<br>Cytohesin-1<br>Konstrukt      |
| pSUPER<br>Cyt1-as1     | 5'-AGCTTTTCCAAAAATGACCTC<br>ACTCACACTTTCTCTCTTGAA<br>GAAAGTGTGAGTGAGGTCAGGG-3' | pSUPER<br>Cytohesin-1<br>Konstrukt      |

### 2.1.14 siRNAs

SiRNAs sind 19 Basen-umfassende, doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem Überhang aus zwei Desoxynukleotiden am 5'-Ende. Durch Anlagerung an ihre Zielsequenz führen diese siRNAs zu einer sequenzspezifischen Degradation von eukaryotischer mRNA. Dieser evolutionär konservierte Prozess wird von dem Enzymkomplex RISC katalysiert und führt zu einem selektiven Abbau, oder "knock-down" der Ziel-mRNA.

| Zielgen           | Zielsequenz                 |
|-------------------|-----------------------------|
| Renilla(†)        | 5'-AAACAUGCAGAAAUGCUGtt-3'  |
| Cytohesin-1(†)    | 5'-UGACCUCACUCACACUUUCtt-3' |
| Cytohesin-3(†)(‡) | 5'-GCAUGUUGUGCUCGGACAAtt-3' |

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden von der Firma Dharmacon (†) oder Qiagen (‡) synthetisiert und in RNase-freiem Wasser bzw. dem mitgelieferten Puffer zu einer

Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  gelöst. Die Hybridisierung der sense- und anti-sense Stränge wurde durch das Erhitzen der Proben für 1 min bei 90 °C und anschließender Inkubation für 30 min bei 37 °C erreicht.

### 2.1.15 Sonden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Sonden zur Quantifizierung der mRNA Expression verschiedener Gene wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen.

| Bezeichnung          | Spezies     | Sondennr.     | Verwendung                           |
|----------------------|-------------|---------------|--------------------------------------|
| beta-2 Microglobulin | human/murin | Hs99999907m1  | Referenzgen                          |
| 18S                  | human       | pre-developed | Referenzgen                          |
| HPTR                 | murin/human | pre-developed | Referenzgen                          |
| GAPDH                | human       | Hs01922876u1  | Referenzgen                          |
| Tbp                  | human       | pre-developed | Referenzgen                          |
| PSCD1                | human/murin | Hs00245092m1  | Quantifizierung der Cytohesin-1 mRNA |
| PSCD3                | human/murin | Hs00188456m1  | Quantifizierung der Cytohesin-3 mRNA |
| PSCD4                | human/murin | Mm00511435    | Quantifizierung der Cytohesin-4 mRNA |
| IL-2                 | human       | Hs00174114m1  | Quantifizierung der IL-2 mRNA        |
| p27/kip              | human       | Hs00153277    | Quantifizierung der p27/kip mRNA     |
| Rb/p130              | human       |               | Quantifizierung der Rb/p130 mRNA     |

## 2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.2.1 PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine enzymatische Kettenreaktion zur gezielten, exponentiellen Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1987; Saiki et al. 1988). Sie beruht auf der Eigenschaft thermostabiler DNA-Polymerasen aus einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt doppelsträngige DNA zu amplifizieren. Dazu muss ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück vorhanden sein. Dieses doppelsträngige Stück wird durch die Anlagerung eines einzelsträngigen Primers ermöglicht. Das Produkt eines Reaktionszyklus kann dabei erneut als Substrat der Polymerase fungieren. Wegen der höheren Amplifikationsgenauigkeit wurde in dieser Arbeit die Vent-Polymerase der Firma NEBiolabs verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

|               |                          |
|---------------|--------------------------|
| 200 ng        | Template                 |
| 5 $\mu$ l     | 10-fach Thermopolpuffer  |
| 5 $\mu$ l     | 2,5 mM dNTP-Mix          |
| 1 $\mu$ l     | 100 pmol Vorwärtsprimer  |
| 1 $\mu$ l     | 100 pmol Rückwärtsprimer |
| 0,75 $\mu$ l  | Vent-Polymerase          |
| ad 50 $\mu$ l | H <sub>2</sub> O         |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| 10x Vent-Polymerase-Puffer: | 100 mM KCl   |
|                             | 200 mM Tris/HCl pH 88                                  |
|                             | 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|                             | 20 mM MgSO <sub>4</sub>                                |
|                             | 1 % (v/v) Triton X-100                                 |

|                 |             |
|-----------------|-------------|
| 2,5 mM dNTP-Mix | 2,5 mM dGTP |
|                 | 2,5 mM dCTP |
|                 | 2,5 mM dATP |
|                 | 2,5 mM dTTP |

Die PCR Reaktionen wurden in einem Block-PCR-Gerät (Bio-Rad) mit den entsprechenden Temperaturen für Strangtrennung (Denaturierung), Primeranlagerung (Hybridisierung) und Produktverlängerung (Elongation) durchgeführt. Für eine typische PCR-Reaktion wurden folgenden Bedingungen gewählt:

|                 |       |        |                 |
|-----------------|-------|--------|-----------------|
| Denaturierung:  | 95 °C | 5 min  |                 |
| Denaturierung:  | 95 °C | 30 sec |                 |
| Hybridisierung: | 55 °C | 45 sec |                 |
| Elongation:     | 72 °C | 60 sec | 25x Schritt 2-4 |
| Elongation:     | 72 °C | 10 min |                 |
|                 | 4 °C  | ∞      |                 |

### 2.2.2 RNA Isolation

Um die Expression verschiedener Zielgene in PBLs zu untersuchen wurde zunächst die Gesamt-RNA mit Hilfe von TRIzol in Anlehnung an das Herstellerprotokoll isoliert. Zur Vermeidung unerwünschter Kontaminationen mit RNasen wurden als vorbeugende Maßnahmen grundsätzlich Handschuhe getragen sowie RNase/DNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.  $1 \cdot 10 \cdot 10^6$  humane PBLs bzw. murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden nach entsprechender Stimulation bei 900 x g sedimentiert, einmal mit PBS gewaschen und in 1000  $\mu$ l TRIzol resuspendiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Proben 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt. Die Probe wurde danach etwa 15 Sekunden geschüttelt, über 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Phasentrennung für 15 Minuten bei 4 °C und 11000 x g zentrifugiert. Die in der oberen (wässrigen) Phase befindliche RNA wurde abgenommen und in ein 2ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt. Der Rest der Probe wurde verworfen. Zur Präzipitation der RNA wurde die Probe mit 500  $\mu$ l Isopropanol vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C, 11000 x g für 10 min wurde die RNA pelletiert und anschließend durch Zugabe von 1 ml 75 %igen Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet bis es ein glasiges Aussehen angenommen hatte. Danach wurde das Pellet in 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser resuspendiert, dem 1 U/ $\mu$ l RNase-Inhibitor zur Unterdrückung der RNase-spezifischen Enzymaktivität zugegeben worden war. Eine Behandlung der gewonnenen RNA-Proben mit DNase wurde vor jeder RT-PCR durchgeführt, um eine Amplifikation

von eventuell in der Probe vorhandenen genomischen Sequenzen. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt.

### 2.2.3 RT-PCR

Ribonukleinsäuren können nicht als Template für eine Polymerasenkettenreaktion (PCR) dienen, so dass diese zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden müssen. Hierzu bedient man sich einer reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNAPolymerase. Für diese Reaktion wurde das cDNA-Archive Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Da die hierzu verwendeten Primern eine Zufallssequenz aufweisen kann davon ausgegangen werden, dass die synthetisierte cDNA repräsentativ für die eingesetzte RNA ist. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.4 Quantitative PCR

Die quantitative oder "Real-Time PCR" (qPCR) repräsentiert eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Freeman et al. 1999; Wilhelm et al. 2003). Im Vergleich zur Endprodukt-PCR (konventionelle PCR), bei der DNA-Produkte nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, ermöglicht es die qPCR, bei welcher jedem Amplifikationszyklus der Gehalt an doppelsträngiger DNA gemessen, Aussagen über die Ausgangsmenge an DNA treffen (Higuchi et al. 1993). Das Verfahren der quantitativen PCR dient zur Bestimmung der Menge einer Ziel-DNA aus einer cDNA Probe. Bei dem hier verwendeten Taq-man System wird zusätzlich zu den sequenzspezifischen 3'- und 5'- Primern eine Oligonukleotid-Sonde benutzt. Diese Sonde trägt einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff an seinem 5'-Ende, sowie einen Quencher an dem 3'-Ende. Bei der Hybridisierung der Sonde an das Template befinden sich Farbstoff und Quencher in räumlicher Nähe zueinander, so dass die durch die Anregung des Farbstoffs entstehende Fluoreszenz von dem Quencher absorbiert wird. Erst in der Elongations-Phase der führt die 3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zur Hydrolyse der Sonde und hebt so die räumliche Nähe des Farbstoffs zum Quencher auf. Das hierbei detektierte Licht ist dabei direkt proportional zu der Menge an amplifizierten PCR-Produkt. Zur Quantifizierung der cDNA-Menge wurden verschiedene Gene zur Normalisierung verwendet. Die quantitative PCR wurde in dem iQ5 der Firma Bio-Rad in einer 96-Loch Platte durchgeführt. Eine typische Reaktion setzte wie folgt zusammen:

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| cDNA 1:10 verdünnt | 2,5 $\mu$ l |
| IQ Supermix 2x     | 5 $\mu$ l   |
| A.bidest           | 2 $\mu$ l   |
| Primer/Sonde Mix   | 0,5 $\mu$ l |

Um eine aussagekräftige statistische Auswertung vornehmen zu können wurden alle Reaktionen in Triplikaten durchgeführt.

Für das PCR Programm wurden folgende Parameter gewählt:

|                |       |        |                 |
|----------------|-------|--------|-----------------|
| Denaturierung  | 95 °C | 3 min  |                 |
| Denaturierung  | 95 °C | 15 sec | Schritt 2-3 35x |
| Hybridisierung | 60 °C | 1 min  | Messung         |

Die gemittelten CT-Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des GOI (**Gene Of Interest**) mit Hilfe der ddCt-Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak et al. 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte Ct-Wert des GOI jeder Probe zunächst gegen den gemittelten Ct-Wert des Referenzgens (siehe 2.7.5) normalisiert. Optional können anschließend die normalisierten Ct-Werte des GOI unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden, um die Abweichung in der Expressionsrate des GOI zwischen den Proben zu ermitteln.

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größen- und Mengenabschätzung von PCR-Produkten können diese auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Agarose ist ein Polysaccharid aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten und bildet die Gelmatrix in der DNA Fragmente aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuremoleküle im Gel ist proportional zur negativen Eigenladung der DNA Fragmente und der angelegten Spannung. Die DNA Fragmente können mittels des interkalierenden DNA Farbstoff Ethidiumbromid durch UV Bestrahlung detektiert werden. TAE-Puffer dient zum einen zur Lösung der Agarose und zum anderen als Laufpuffer für die Elektrophorese. Die PCR-Produkte werden mit 6x Probenpuffer versetzt, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und bei 100 V aufgetrennt.

---

|                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| 6x Probenpuffer | 0,25 % (w/v) Bromphenolblau |
|                 | 0,25 % (w/v) Xylencyanol    |
|                 | 30 % (w/v) Glycerin         |
|                 | 50 mM EDTA                  |

### 2.2.6 *In-vitro* Mutagenese

Die PCR kann, durch den Einsatz entsprechend modifizierter Primer, dazu genutzt werden gezielte Veränderungen einer bestimmten DNA Sequenz vorzunehmen. Dieses Verfahren erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion einer Aminosäure-Sequenz, oder aber auf die Funktion eines ganzen Proteins. In dieser Arbeit wurden mehrere Punkt- und Deletionsmutanten von Cytohesin-1, -3 und -4 mit Hilfe der PCR-Mutagenese hergestellt. In zwei unabhängigen PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe von internen Primern, welche die einzuführende Mutation enthielt, zueinander überlappende Zwischenprodukte hergestellt. In einer dritten PCR-Reaktion kommt es zur Anlagerung der beiden Zwischenprodukte und so zur Amplifikation des gewünschten mutierten DNS Stranges.

### 2.2.7 DNA-Fällung

Zur Erhöhung des Reinheitsgrads wurden DNA-haltige Lösungen gefällt. Hierfür wurde die Lösung mit 1/10 Volumenteil 3M Natriumacetat (pH 4.8) und 2,5 Volumenteilen 100 % Ethanol(pa) versetzt 10 min lang bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen A.bidest aufgenommen.

### 2.2.8 DNA Restriktionsanalysen

Zur Charakterisierung und Klonierung von Plasmid -DNA und PCR Fragmenten wurde eine enzymatische Spaltung der DNA mittels Restriktionsenzymen durchgeführt. Dazu wurden 2 µg Plasmid-DNA, bzw. der gesamte PCR-Ansatz eingesetzt und mit der jeweils benötigten Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Waren Restriktionen mit zwei Enzymen gleichzeitig nötig, so wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers verfahren und der jeweils für beide Restriktionsendonukleasen günstigste Reaktionspuffer gewählt. Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte in der

Regel über eine Stunde bei 37 °C, während PCR-Fragmente einer 2 stündigen Inkubation bei 37 °C unterzogen wurden.

### 2.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Reinigung und Abtrennung unerwünschter Fragmente und Enzyme nach Restriktionsspaltung von DNA wurde diese vor der Weiterverarbeitung (z.B. Ligation) auf ein niedrigschmelzendes Agarosegel (NuSieve-Agarose, FMC) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Erhitzen auf 65 °C wurde der DNA-haltige Agaroseblock geschmolzen und Aliquots konnten so für weitere Klonierungstechniken eingesetzt werden.

### 2.2.10 Entfernung der 5'-Phosphatenden von dem geschnittenen Vektor

Um eine unspezifische Selbstligation von geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurde die Shrimp-alkalische Phosphatase verwendet. Nach dem Restriktionsverdau der DNA-Probe wurde dem Ansatz 1 U alkalische Phosphatase zugesetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch eine Inkubation der Probe für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

### 2.2.11 Ligation und Transformation

Bei der Ligation werden die zueinander komplementären Restriktionsschnittstellen des Vektors und des PCR-Produktes miteinander verknüpft. Diese Reaktion wird durch die T4-Ligase katalysiert, welche die 3'-Hydroxyl-Gruppen des Vektors mit den 5'-Phosphat-Gruppen des PCR-Produktes kovalent verknüpft. Für den optimalen Verlauf der Ligation sollte das zu inserierenden Fragments im 3-fach molaren Überschuss gegenüber der Vektor-DNA vorliegen. Aus diesem Grund wurden jeweils die beiden Restriktionsansätze in äquimolaren Menge auf das präparative Gel aufgetragen und die isolierten Fragmente folgendermaßen in die Ligationsreaktion eingesetzt:

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| Ligationsansatz: | 1 $\mu$ l geschnittener Vektor      |
|                  | 3 $\mu$ l geschnittenes PCR-Produkt |
|                  | 2 $\mu$ l 10x Ligationspuffer       |
|                  | 1 $\mu$ l T4-Ligase                 |
|                  | ad 20 $\mu$ l A.bidest              |

Die Ligation erfolgt über 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

### 2.2.12 Herstellung kompetenter *E.coli* nach Scott

Bei dem Verfahren zur Gewinnung kompetenter *E.coli* nach Scott können durch die Verwendung von  $\text{CaCl}_2$  bis zu  $10^6$  transformierte Bakterien-Kolonien pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid-DNA erzielt werden. Der gewünschte Bakterienstamm wurde dazu auf einer Antibiotika-freien LB-Agarplatte vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 20 ml TYM wurden mit einer Bakterieneinzelkolonie inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm in einem Schüttelinkubator bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 - 0,9 kultiviert. Diese Vorkultur wurde in einem 2L Erlenmeyer-Kolben überführt, in dem 100 ml TYM auf 37 °C temperiert wurde. Nach einer weiteren Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde nach Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 - 0,9 diese Kultur mit 380 ml vorgewärmtem TYM auf 500 ml verdünnt. Anschließend wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 weiterinkubiert und die Bakterienkultur durch Schwenken in einem Eis-Wasser-Bad möglichst rasch auf 4 °C abgekühlt und 10 min bei 3000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die sedimentierten Bakterien in 100 ml kaltem Tfb II resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, wurden die Zellen in 20 ml Tfb II aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 200  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung kompetenter *E.coli*-Stämme erfolgt bei -80 °C.

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

|       |                         |       |                         |
|-------|-------------------------|-------|-------------------------|
| TfBI: | 30 mM KoAc              | TfBII | 10 mM HEPES (pH7,0)     |
|       | 100 mM KCl              |       | 75 mM CaCl <sub>2</sub> |
|       | 10 mM CaCl <sub>2</sub> |       | 10 mM KCl               |
|       | 15 % (v/v) Glycerin     |       | 15 % (v/v) Glycerin     |
|       | Sterilisation           |       | Sterilisation           |
|       | 50 mM MnCl <sub>2</sub> |       |                         |

### 2.2.13 Transformation kompetenter *E.coli*

Die Transformation dient der *in-vivo* Amplifikation eines DNA-Konstrukts in *E.coli*. Dazu wurden 100  $\mu$ l einer kompetenten *E. coli*-Suspension auf Eis aufgetaut und mit einem Ligationsansatz bzw. 1  $\mu$ g einer Plasmid-DNA-Präparation vermischt. Die Bakterien wurden anschließend weitere 5 min auf Eis und danach 5 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten mit den Antibiotika der Plasmidresistenz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### Minipräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Mini-Präparation) wurde zur schnellen Überprüfung der Transformanten auf das gewünschte DNA-Fragment angewendet. Dazu wurde eine 5 ml LB-Übernachtskultur mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum bei 37°C auf dem Bakterienschüttler inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden bei 20000 x g pelletiert und in 250  $\mu$ l Puffer I resuspendiert. Durch Zugabe von 250  $\mu$ l Puffer II erfolgte eine alkalische Lyse der Bakterien. Eine Präzipitation der chromosomalen-DNA wurde durch die Zugabe von 250  $\mu$ l Puffer III erreicht. Zur Abtrennung chromosomaler DNA, von RNA und Proteinen, wurde 15 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Aus dem ca 700  $\mu$ l Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurden noch vorhandene Proteine mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert (Zentrifugation: 5 min bei 20000 x g und RT) und die DNA anschließend durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt und pelletiert (15 min, 20800 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 50  $\mu$ l A. bidest gelöst. Die noch vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ g RNaseA hydrolysiert.

---

|            |                                  |
|------------|----------------------------------|
| Puffer I   | 10 mM EDTA (pH8.0)               |
| Puffer II  | 2 M NaOH<br>1 % (w/v) SDS        |
| Puffer III | 2,5 M KOAc<br>2,5 M HOAc (pH4.7) |

### Maxipräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. Dazu wurde eine 1 l LB-Übernachtskultur bei 5000 x g pelletiert und die Bakterien in 40 ml Puffer I resuspendiert. Die Zellyse erfolgte ähnlich der Mini- Präparation alkalisch, durch Zugabe von 80 ml Puffer II. Nach Zugabe von 40 ml Puffer III und kräftigem durchmischen, wurden Bakterienzellreste 10 min bei 5000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde durch mehrlagigen Verbandmull in einen 500 ml-Zentrifugenbecher filtriert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 250 ml Isopropanol ausgefällt und anschließend 10 min bei 5000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 4 ml Puffer I gelöst, mit 5,5 g CsCl und 4,4 g EtBr versetzt. Ungelöste Substanzen wurden 5 min bei 12300 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Die Gradientenzentrifugation im NVT90-Rotor erfolgte bei 50900 x g für vier Stunden. Nach erfolgter Zentrifugation war die DNA-Bande im CsCl Gradienten sichtbar und konnte mit Hilfe einer Spritze abgezogen werden. Das EtBr wurde anschließend durch mehrmaliges Ausschütteln mit n-Butanol (gesättigt mit 1 M NaCl) entfernt. Zur DNA-Fällung wurde die Lösung mit dem äquivalenten Volumen einer 1 M Ammoniumacetat- Lösung und mit 2 Vol. absolutem EtOH versetzt und gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 6700 x g und 4 °C wurde das Pellet mit 70 % kaltem EtOH gewaschen, getrocknet und je nach Ausbeute in 1 - 1,5 ml A.bidest gelöst.

#### 2.2.15 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgt durch photometrische Messung bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm nach Warburg und Christian. Die DNA-Lösung wurde hierzu 1:50 in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt und in eine geeignete Küvette überführt. Für längere, doppelsträngige DNA-Moleküle wurde eine OD<sub>260</sub>=1 von 50  $\mu$ /ml angenom-

men (Sambrook et al., 1989). Folgender Bezug wurde zugrunde gelegt:

$$c = \frac{OD_{260} \cdot k}{\varepsilon \cdot d} \quad (2.1)$$

c= Konzentration in mM/l

k= Verdünnungsfaktor

$\varepsilon$ = Extinktionskoeffizient in  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

d= Kuvettenschichtdicke in cm

Wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutete dies auf die Anwesenheit von Proteinen in der Lösung hin. Das Abschätzen des Proteingehalts bei  $OD_{280}$  beruht in erster Linie auf seinen Tyrosin- und Tryptophangehalt. Der Koeffizient  $OD_{260}/OD_{280}$  beschreibt den Reinheitsgrad der DNA und liegt im Idealfall bei 1,8. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf eine Verunreinigung mit Proteinen, höhere Werte dagegen können ein auf größere Mengen RNA in der Probe hindeuten. Messbare Absorption bei  $OD_{320}$  deutet auf partikuläre Bestandteile in der Lösung hin.

## 2.3 Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank, mit sterilen Glas- und Plastikmaterialien durchgeführt. Biologisches Material wurde durch Autoklavieren inaktiviert.

### 2.3.1 Stammhaltung eukaryotischer Zellen

Eukaryontische Suspensionszellen wurden in sterilen Plastikzellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (56°C für 30 min) und 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycinsulfat in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 96% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von 0,2 bis max.  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert und zur Verdünnung mit vorgewärmtem (37°C) Medium (mit Zusätzen, siehe oben) versetzt.

### 2.3.2 Präparation von peripheren Blut Lymphozyten (PBL) aus buffy-coats

Die Isolation der Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) erfolgte aus Leukozyten angereicherten buffy-coats gesunder Spender. Durch Dichte-Gradientenzentrifugation auf Ficoll-Hypaque werden zunächst mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Dazu werden 10 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/l) in 50 ml-Zentrifugengefäße vorgelegt. Das Ficoll wird nun langsam mit 40 ml einer 1:1 Blut/PBS Mischung überschichtet. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation mit 900 x g bei RT ohne Bremse. Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich bei der Zentrifugation am Boden des Röhrchens, da sie eine höhere Dichte als 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 einen weisse Ring aus. Nach erfolgter Zentrifugation werden die PBMC-Schicht 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/2 mM EDTA gewaschen. Die Zentrifugation der einzelnen Waschschrte erfolgt bei RT für 7 min mit 640 x g beim ersten, 500 x g beim zweiten und 400 x g beim dritten und 300 x g beim vierten Waschschrte. Danach sollte der Überstand klar und das Zellpellet weiss erscheinen. Die so isolierten PBMC werden in VLE-RPMI 1640/10 % 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.

### 2.3.3 Zellstimulation

Zur Induktion der PI3-Kinase Zielgene wurden die PBLs nach Transfektion für 16 Stunden mit plattengebundenem Antikörper stimuliert. Die Kopplung der Antikörper an die Plastikoberfläche der Multiwell-Zellkulturschalen erfolgte durch eine zweistündige Inkubation einer PBS/Antikörperversdünung bei 37 °C in einem Volumen von 100-200 µl. Alternativ kann die Kopplung auch über Nacht bei 4 °C erfolgen. Okt3 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml, CD28 in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation mit

dem pan-Cytohesin Inhibitor SeciH3 erfolgte entweder über nacht oder 2 Stunden vor der eigentlichen Stimulation mit einer Konzentration von 12,5 und 25  $\mu\text{M}$ . Die Stimulation der sortierten humanen  $\text{CD4}^+\text{T}$ -Zellen erfolgte mit Hilfe Antikörper-gekoppelter magnetischer Kugeln (aAPCs) in der AG Schultze (Universitätsklinik Köln). Dazu wurden suboptimale Konzentrationen Okt3 (5 %),  $\alpha\text{-CD28}$  (14 %),  $\alpha\text{-MHCI}$  (14 %) und  $\alpha\text{-PD-1}$  verwendet. Die Zellen wurden in einem Verhältnis Kugeln/Zellen von 3:1 für ca. 5 Stunden stimuliert. Der genaue Ablauf ist nachzulesen unter Parry et al. 2005.

### 2.3.4 Transfektionsmethoden

Für sämtliche, im Verlauf dieser Arbeit hergestellten transient transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der Elektroporation hergestellt. Diese Technik beruht auf der kurzfristigen Permeabilisierung der Zellmembran durch das Anlegen starker elektrische Felder, so dass große Moleküle, wie beispielsweise DNA, in die Zelle aufgenommen werden können. Für den Transfer von DNA wurde ein exponentieller Spannungsverlauf, für die Transfektion von siRNA ein rechteck-Puls gewählt. Die genauen Elektroporations-Parameter wurden für jede Zelllinie empirisch ermittelt und sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst: Die entsprechende Zellzahl wurde bei 900 x g sedimentiert, das Pellet einmal mit PBS gewaschen und in entsprechenden Volumen des geeigneten Elektroporationsmedium aufgenommen. Die zu transfizierende DNA oder siRNA wurde in einer 4 mm Elektroporationsküvette mit den Zellen vermischt und mit unten angegebenen Bedingungen in die Zellen transfiziert.

Elektroporations-Parameter für exponentielle Spannungsverläufe

| Zelllinie | Zellzahl         | Medium      | $\mu\text{g}$ DNA    | Spannung [V] | Feldstärke [ $\mu\text{F}$ ] |
|-----------|------------------|-------------|----------------------|--------------|------------------------------|
| Jurkat E6 | $1 \cdot 10^7$   | 50%FCS/RPMI | bis 40 $\mu\text{g}$ | 240          | 1500                         |
| Jurkat LT | $0,9 \cdot 10^7$ | 50%FCS/RPMI | bis 40 $\mu\text{g}$ | 250          | 1500                         |

Elektroporations-Parameter für rechteckige Spannungsverläufe

| Zellen    | Zellzahl       | Medium  | $\mu\text{g}$ siRNA | Spannung [V] | Zeit [ms] |
|-----------|----------------|---------|---------------------|--------------|-----------|
| Jurkat E6 | $1 \cdot 10^7$ | Optimem | 2 $\mu\text{g}$     | 300          | 25        |
| PBL       | $4 \cdot 10^7$ | Optimem | 1,5 $\mu\text{g}$   | 1000         | 2,5       |

Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml RPMI1640/10 %FCS/13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin aufgenommen und für ca. 16 Stunden im Inkubator bei 37 °C/ 5 %CO<sub>2</sub> kultiviert.

Neben den empirische ermittelten Elektroporationsprotokollen wurden für die Transfektion von PBLs mit DNA oder siRNA auch das Nukleofektionssystem der Firma AMAXA verwendet. Dabei wurde das für die Transfektion von PBL optimierte T-cell Nucleofection-Kit verwendet.  $1 \cdot 10^7$  Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen, in 100  $\mu\text{l}$  Nucleofection-Reagenz aufgenommen und mit 10  $\mu\text{g}$  DNA bzw. RNA vermischt. Nach erfolgter Elektroporation mit Programm U14 wurden die Zellen in 5 ml RPMI überführt und wie oben beschrieben weiterkultiviert. HeLa-Zellen wurden mit dem Lipofektionsreagenz Metafectene transfiziert. Die am Vortag auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden bei einer optischen Konfluenz von ca. 80 % für die Lipofektion verwendet. Dazu wurden 1  $\mu\text{g}$  DNA in 400  $\mu\text{l}$  DMEM mit 4  $\mu\text{l}$  Metafectene für 30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben.

## 2.4 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

### 2.4.1 Herstellung von Total-Zellysaten

Die Untersuchung von Proteinphosphorylierungen erfordert wegen der hohen Aktivität zellulärer Phosphatasen eine schnelle Lyse der Zellen. Für die Analyse der AKT-Phosphorylierung wurden die Zellen unmittelbar nach der Stimulation einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 5  $\mu\text{l}$  6x Probenpuffer und 25  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Nach dem Kochen der Proben für 5 min bei 99 °C wurden die Lysate sonifiziert und anschließend auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

### 2.4.2 Detergenz-basierte Zellyse

Für alle Immunpräzipitationsversuche und Expressionsanalysen wurden die Zellen nach Stimulation zunächst gewaschen und anschließend in Igepal- oder TritonX-100 Lysepuffer mit den Proteaseinhibitoren bzw. Phosphataseinhibitoren für 10 min auf Eis lysiert. Kerne und nicht lysierte Zellen wurden mit einer Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde einer Proteinbestimmung unterzogen. Entsprechende Proteinmengen wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

| Proteaseinhibitoren | Konzentration                            |
|---------------------|--|
| Aprotinin           | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$               |
| Leupeptin           | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$               |
| PMSF                | 1:1000<br>aus gesättigter<br>Stammlösung |

| Phosphataseinhibitoren       | Konzentration |
|------------------------------|---------------|
| $\text{Na}_3\text{VO}_4$     | 1 mM          |
| Glycerolphosphat             | 1 mM          |
| Phosphataseinhibitor-coctail | 1:100         |

### 2.4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch einen BCA-Test (Smith et al., 1985). Die Methode beruht auf der Biuretreaktion: Proteine bilden mit  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischer Lösung einen Komplex, in dem die Ionen durch Cystein-, Cystin-, Tyrosin-, Tryptophanreste und Peptidbindungen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden. Diese bilden mit BCA (bicinchoninic acid) einen violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden 6  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz in einer 96-Loch-Platte für 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch den Vergleich des Messwerts mit einer Eichkurve bekannter Konzentrationen des Standardproteins BSA (0,05; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wird die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

### 2.4.4 Immunpräzipitation

Die Isolation eines spezifischen Protein aus einem Gesamtzell-Lysat erfolgt mit Hilfe der Immunpräzipitation. 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 Seharose-Kügelchen gekoppeltes Protein A oder G immobilisiert. Für die Präzipitation mit Antikörpern aus Ratte, Maus oder Ziege wird Protein G-Sepharose verwendet. Die Präzipitation eines Ig-Fusionsproteins erfolgte ohne

Antikörper, direkt an Protein-A Sepharose. Zu 500  $\mu$ l Zellysat werden 300  $\mu$ l Hybridoma-Überstand oder 8  $\mu$ g eines gereinigten Antikörpers gegeben. Der Ansatz wird für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. 40  $\mu$ l einer 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.

### 2.4.5 SDS-PAGE und Western Blot

In der SDS-PAGE erfolgt eine Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts. Das proteinhaltige Gesamtzellysat oder ein Immunpräzipitationsansatz wird zunächst in SDS-haltigem Ladepuffer für 5 min bei 99 °C aufgeköcht. Das stark anionische Detergens SDS bindet dabei an hydrophobe Regionen und positiv geladene Reste der Proteine, denaturiert diese dadurch und bringt gleichzeitig über seine anionischen Kopfgruppen eine hohe negative Gesamtladung in die entstandenen SDS-Protein-Komplexe ein, so dass die ursprüngliche Eigenladung des nativen Proteins vernachlässigbar wird. Da etwa ein SDS-Anion pro zwei Aminosäurereste gebunden wird, ist die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe der Masse des Proteins ungefähr proportional. In Polyacrylamid-Gelen ist die Beweglichkeit der SDS-Proteinkomplexe umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts und kann über den Vernetzungsgrad des Gels kontrolliert werden. Daher wird abhängig vom erwarteten Molekulargewicht der Proteine beim Trenngel unterschiedliche Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnisse gewählt. Um die Proteine in scharfe Banden aufzutrennen, führte Laemmli 1970 die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ein. Hierbei wird eine Bandenschärfung durch Einsatz eines Sammelgels erreicht, das eine niedrigere Polyacrylamidkonzentration als das Trenngel und einen leicht sauren pH besitzt. In diesem Sammelgel werden die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe im Bereich hoher elektrischer Feldstärke zwischen Glycin-Folgeionen und der Chloridionen-Lauffront fokussiert. Beim Eintritt in das kleinporeige, basische Trenngel erfolgt dann die Auftrennung nach der Masse der Proteine. Anhand eines parallel aufgetragenen Proteinstandards kann das Molekulargewicht eines Proteins später abgeschätzt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für ca. 1,5 h bei 110 V.

Im Western Blot Verfahren werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten, stark negati-

ven SDS-Protein Komplexe entlang eines elektrischen Feldes von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bei dem verwendeten Naßblot-Verfahren werden zunächst die Membran, das Gel und sechs Filterpapiere sowie zwei poröse Schwämmchen kurz in Transferpuffer getränkt. Dann werden ein Schwämmchen, drei der Filterpapiere, das zu blottende Gel, die Membran, die übrigen drei Filterpapiere und das zweite Schwämmchen in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinandergelegt. Diese Anordnung wird in eine mit Transferpuffer gefüllte Naßblotkammer eingesetzt, so daß die Membran auf Seite der Anode zu liegen kommt. Der Transfer erfolgt nun bei einer konstanten Spannung von 75 V über 2 Stunden oder bei 12 Volt über Nacht, wobei negativ geladene Proteine bzw. Protein-SDS-Komplexe aus dem Gel in Richtung Anode zur Membran wandern.

### 2.4.6 Immunmarkierung von Western Blot

Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper und dem, auf dem HRP-System basierenden ECL-Verfahren detektiert. Um noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Nitrozellulose anschließend 30 min oder über Nacht in TBST/1%Milchpulver geschwenkt. Nach 3x 5 min Waschen mit 1x TBST, inkubierte man die Membran mit dem spezifischen Antikörper, der in geeigneter Weise in 10 ml 1x TBST verdünnt wurde 1 Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken auf einer Wippe. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3 x 5 min mit 1x TBST gewaschen und mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (gerichtet gegen den ersten Antikörper) für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran abermals 3x 5 min mit 1x TBST gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Proteine wurde anschließend ein ECL-Reagenz verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Entsprechend der Intensität der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm für 1 sek bis 10 min exponiert und anschließend entwickelt.

## 2.5 Funktionelle Versuchsansätze

### 2.5.1 T-Zell Aktivierungsstudien

Für die T-Zellaktivierung ist die transkriptionelle Aktivität des IL-2 Promotors von zentraler Bedeutung. Die Expression des autokrinen Wachstumsfaktors Interleukin-2 lei-

tet den Eintritt der Zellen in den Teilungszyklus ein und führt zur Entwicklung von Effektorfunktionen. Daher kann die Aktivität des IL-2 Promotors als Maß für die T-Zellaktivierung herangezogen werden. Die Quantifizierung der Promotoraktivität wird mit Hilfe eines Reporter-Gens, hier Luziferase, ermöglicht. In dieser Arbeit wurden sowohl Reporter-Gen Konstrukte mit dem vollständigen als auch mit isolierte Kassetten des IL-2 Promotors verwendet. Dazu wurden Jurkat LT-Zellen mit 15  $\mu\text{g}$  Reporter-Gen, 20  $\mu\text{g}$  Expressionsplasmid und 5  $\mu\text{g}$  Markerplasmid (N1: GFP) transient transfiziert. Etwa 12h nach Elektroporation wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen für 6-7h bei 37 °C stimuliert und anschließend geerntet. Folgende Reagenzien wurden zur Stimulation verwendet:

| Reagenz         | Konzentration              |
|-----------------|----------------------------|
| PMA             | 50 ng/ml                   |
| anti-CD3 (Okt3) | 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  |
| anti-CD28       | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| SecinH3         | 12,5-25 $\mu\text{M}$      |

Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  1x Reporter Lysis Buffer (Promega) und Lagerung der Proben bei -20 °C. Für die Bestimmung der Luziferase-Expression wurden 100  $\mu\text{l}$  des Lysates mit 100  $\mu\text{l}$  Luziferase-Reagenz in einem 96-Loch Platten-Luminometer vermischt und analysiert. Um einen Effekt der Expressionskonstrukte auf die IL-2 Promotoraktivität untersuchen zu können musste die Transfektionseffizienz ermittelt werden. Diese wurde im Durchflusszytometer anhand der Expression des Markerplasmids analysiert und in die Auswertung der Daten miteinbezogen. Indem zusätzlich die Proteinkonzentration der Proben bei der Auswertung mit berücksichtigt wurde kann Schwankung der Luziferase-Aktivität aufgrund von unterschiedlichen Zellzahlen in den Proben ausgeschlossen werden.

### 2.5.2 Immunfluoreszenzuntersuchungen

Die mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen wird mittels Immunfluoreszenz-Markierungen fixierter Zellen durchgeführt. Sowohl die Absorption als auch die Emission der verschiedenen Fluorochrome ist Farbstoffabhängig und wird je nach Fragestellung ausgewählt. HeLa Zellen werden am Vortag auf Deckgläschen ausgesät

und am folgenden Tag bei einer optischen Konfluenz von ca. 50-80 % weiterverwendet. Die Zellen werden mit eiskaltem Methanol für 10 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert und anschließend mit PBS bei RT rehydriert. Anschließend erfolgte das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 1%BSA/PBS für 30 min bei RT. Die Immunfluoreszenz-Markierung erfolgt durch 1-stündige Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung eines primären Antikörpers in  $100\mu\text{l}$  PBS/1% BSA (w/v) bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit einer 1:200 Verdünnung eines sekundären, Fluorochromgekoppelten Antikörpers in PBS/1% BSA (w/v) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS und einmal kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gewaschen, mit  $20\mu\text{l}$  Gelmount/50 mg/ml Dabco versetzt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Die Analyse der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (FV-1000, Olympus).

### 2.5.3 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 angeregt 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  $1 \times 10^6/\text{ml}$  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. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, in  $100\mu\text{l}$  PBS mit in der Regel  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  des primärem Antikörpers resuspendiert und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen in  $100\mu\text{l}$  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, in PBS aufgenommen und eingemessen.

### 2.5.4 Ca<sup>2+</sup>-Fluxexperimente

Die Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Spiegels durch das Öffnen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in den zellulären Speicherkompartimenten und der Plasmamembran kann durch einen Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Farbstoff Fluo-3 im FACS sichtbar gemacht werden. Dazu werden pro Messung  $3 \cdot 10^5$  Jurkat E6.1-Zellen in 1 ml HBSS aufgenommen und mit 1  $\mu$ l Fluo-3 für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und in 1 ml HBSS aufgenommen. Die Zellen werden in FACS eingemessen und nach ca 10-20 sec wird 3  $\mu$ g Okt3 hinzupipetiert. Dies löst das Öffnen der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aus und wird im FACS als ein Anstieg der Fluoreszenz in Kanal1 sichtbar.

### 2.5.5 Ex-vivo Toleranz Model

Die Generierung aneurer und aktivierter muriner CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurden ausschließlich von der AG Knoll (IMMEI, Universitätsklinik Bonn) durchgeführt.

### 2.5.6 native Mitochondrienisolation

Die native Mitochondrienisolation erfolgte aus HeLa Zellen. Alle Schritte erfolgten bei 4°C. Zellen aus 4-8 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen werden zunächst mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Die trypsinierten Zellen werden in DMEM/10%FCS aufgenommen und bei 1000 x g für 10 min pelletiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit 5 ml PBS werden die Zellen wie oben zentrifugiert und anschließend in 5 ml Homogenisationspuffer aufgenommen. Die Zellen werden in einem 10 ml Homogenisator durch 35 Plestierbewegungen homogenisiert. Kerne und intakte Zellen werden durch eine Zentrifugation bei 4500 x g für 10 min sedimentiert. Vom Überstand wird ein 40  $\mu$ l Aliquot zur SDS-PAGE Analyse entnommen. Optional kann das Pellet erneut in 5 ml Homogenisationspuffer mit 35 Plestierbewegungen homogenisiert und wie oben zentrifugiert werden. Die Überstände werden gesammelt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Mitochondrien werden für 20 min bei 16000 x g in einer gekühlten Tischzentrifuge pelletiert. Vom Überstand (zytosolische Fraktion) wird ein 100  $\mu$ l Aliquot entnommen. Das mitochondrienreiche Pellet wird mit einer abgeschnittenen gelben Spitze in 200  $\mu$ l Suspensionspuffer aufgenommen und für 20 min bei 16000 x g gewaschen. Die sedimentierten Mitochondrien werden in 200  $\mu$ l Suspensionspuffer aufgenommen und die Proteinkonzentration in einem BCA-Test gemessen. 20  $\mu$ g des Isolats

werden mit 20  $\mu\text{g}$  Proteinase K für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 mM PMSF abgestoppt. Die Proben werden mit 6  $\mu\text{l}$  5x Probenpuffer versetzt und gekocht. Es erfolgt eine Analyse auf einem 10% SDS PAGE Gel.

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| Homogenisationspuffer | 250 mM Sucrose      |
|                       | 5 mM Tris-HCl pH7.5 |
|                       | 0,1 mM PMSF         |

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| Suspensionspuffer | 250 mM Sucrose      |
|                   | 5 mM Tris-HCl pH7.5 |
|                   | 1 mM EDTA           |

## 2.6 Elektronische Datenverarbeitung

Die vorliegende Arbeit unter Verwendung des Textsatzprogramm  $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$  erstellt. Quellenverweise wurden mit Bibliographix5 eingefügt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop 7.0 (Adobe). Schemata wurden mit PowerPoint 2003 (Microsoft) oder Adobe Illustrator 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. Quantifizierung von Bandenstärken erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ.

## 3 Ergebnisse

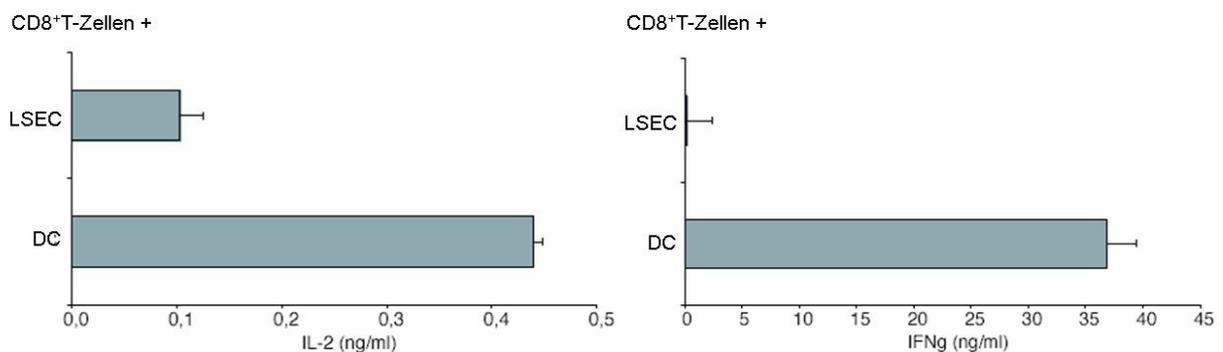
### 3.1 Cytohesin-3 ist mit peripherer, T-Zell-vermittelter Immuntoleranz assoziiert

Die Induktion und der Erhalt peripherer, T-Zell-vermittelter Toleranz ist von zentraler Bedeutung für die Vermeidung von Immunreaktionen gegen körpereigene oder oral aufgenommene Antigene. Ein Mechanismus der peripheren Toleranz ist die Erzeugung der T-Zell Anergie. Anergie T-Zellen befinden sich in einem refraktären Zustand und sind nicht in der Lage, nach Restimulation durch eine APC den autokrinen Wachstumsfaktor IL-2 zu synthetisieren oder zu proliferieren. CTLA-4 und PD-1 sind negativ-regulatorische Oberflächenmoleküle, deren Expression und Stimulation einen anergen Zustand von T-Zellen induzieren können (Phan et al. 2003; Bennett et al. 2003). Parry *et al.* zeigten, dass die Stimulation von PD-1 bzw. CTLA-4 eine verminderte IL-2 Expression, sowie einen eingeschränkten Glukosemetabolismus der T-Zellen zur Folge hat (Parry et al. 2005). Es ist jedoch weitgehend unbekannt, welche intrazellulären Signalvorgänge der verminderten IL-2 Synthese in anergen Zellen zugrunde liegen. Korthäuer *et al.* zeigten in einem “Differential-Display“ von aktivierten und anergen T-Zellen eine verstärkte Expression des Cytohesin-3 Maus-Homolog GRP1. Hierbei wurde durch die Stimulation des TCR in Abwesenheit von Kostimulation *in-vitro* ein aneger Zustand von T-Zellen erzeugt. Allerdings konnte die Gruppe keinen Einfluss von GRP1 auf die Synthese von IL-2 nachweisen (Korthäuer et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Cytohesin-3 in toleranten T-Zellen mit Hilfe eines antigenspezifischen murinen *ex-vivo* Anergie-Modells in Kollaboration mit der AG Knolle (IMMEI, Universitätsklinik Bonn) untersucht. In diesem Modell werden leberresidente sinusoidale Endothelzellen (**L**iver **S**inusoidal **E**ndothelial **C**ells) zur Toleranzinduktion in T-Zellen verwendet. Diese Endothelzellen sind in der Lage, lösliche Antigene aufzunehmen und sie CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>T-Zellen zu präsentieren (Knolle et al. 2003). Die Kreuzpräsentation von antigenbeladenen MHCI Molekülen auf LSECs gegenüber CD8<sup>+</sup>T-Zellen führt *ex-vivo* zu toleranten CD8<sup>+</sup>T-Zellen, gekennzeichnet durch

eine signifikant verringerte Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ , sowie durch das Fehlen zytotoxischer Effektorfunktionen (Limmer et al. 2000).

Zur Generierung der toleranten und aktivierten T-Zellen werden naive CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit DCs (Dendritic Cells, Dendritische Zellen) oder LSECs in Anwesenheit des Antigens Ovalbumin kultiviert. Der T-Zellstatus wird anhand der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand mit Hilfe einer ELISA-Messung (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) festgestellt. Das Expressionsmuster der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  aneurer und aktivierter T-Zellen ist exemplarisch in Abbildung 3.1 gezeigt. Die durch DCs aktivierten T-Zellen synthetisieren nach anschließender Restimulation mit einem  $\alpha$ -CD3 Antikörper deutlich messbare Mengen der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Dagegen produzieren die aneuren, mit LSECs kultivierten T-Zellen nach Restimulation vergleichsweise geringe Mengen der gemessenen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Die Generierung der toleranten und aktivierten T-Zellen, sowie die ELISA- und Zytotoxizitäts-Versuche zur Überprüfung des T-Zell Status wurden sämtlichst von Linda Diehl, AG Knolle (IMMEI, Universitätsklinik Bonn) durchgeführt.



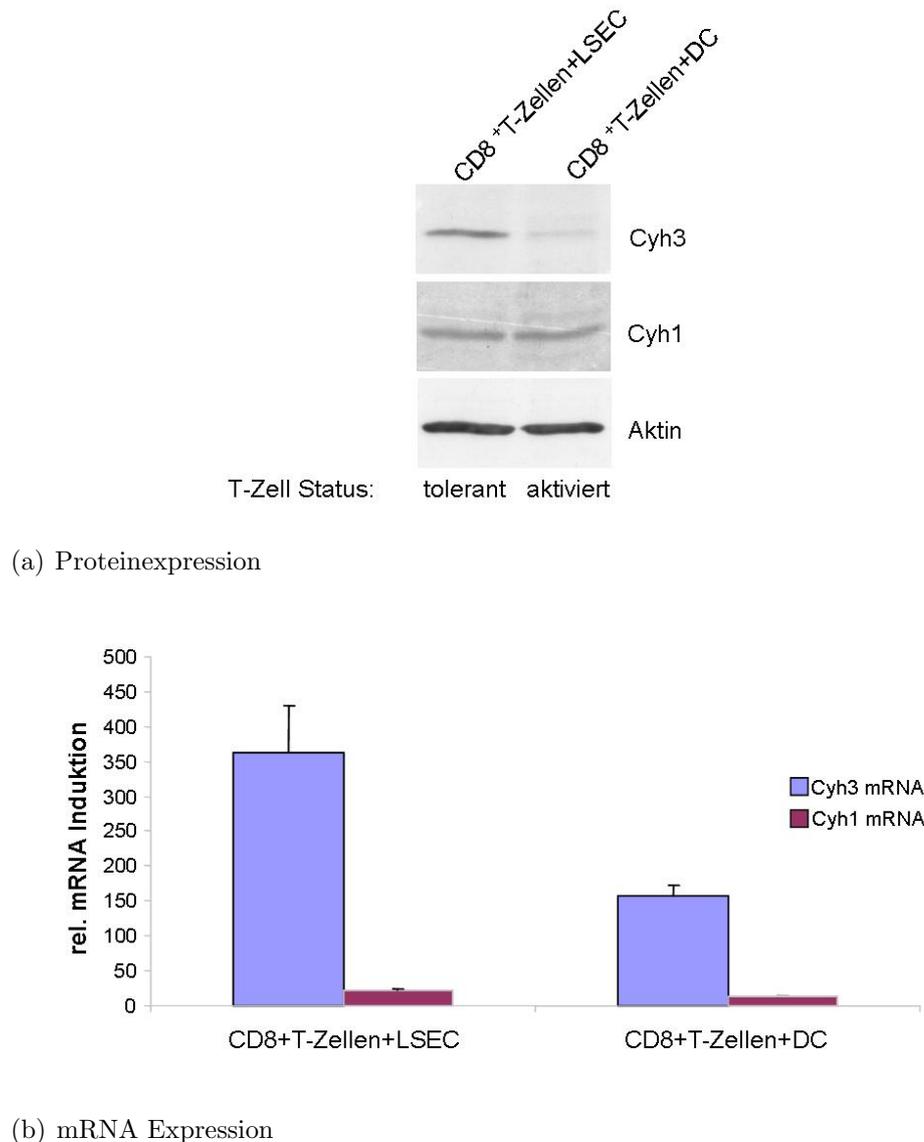
**Abbildung 3.1: IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion von toleranten (LSEC) und aktivierten (DC) CD8<sup>+</sup>T-Zellen.** Nach Restimulation mit einem  $\alpha$ -CD3 Antikörper wurde die IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion der toleranten (LSEC) bzw. aktivierten (DC) T-Zellen mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Verglichen mit aktivierten T-Zellen wird nach Kokultur der T-Zellen mit LSECs eine deutlich verringerte Produktion der beiden Zytokine detektiert. Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. Diehl, IMMEI, Universitätsklinik Bonn.

Die Cytohesin-1 und -3 Expression in den *ex-vivo* generierten aktivierten bzw. toleranten T-Zellen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und quantitativer PCR analysiert. Für die Analyse der Proteinexpression wurden die CD8<sup>+</sup>T-Zellen lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion

erfolgte mit den monoklonalen, Cytohesin-1 spezifischen Antikörper 7H2 bzw. Cytohesin-3 spezifischen Antikörper der Firma Santa Cruz und ist in Abbildung 3.2(a) dargestellt. Die Antikörpermarkierung zeigt eine differentielle Expression von Cytohesin-1 und -3 in toleranten und aktivierten T-Zellen. Cytohesin-3 ist in toleranten T-Zellen im Vergleich zu aktivierten T-Zellen verstärkt exprimiert (oberer Blot, linke Spur). Dagegen unterscheidet sich die Expression von Cytohesin-1 in toleranten und aktivierten T-Zellen nicht voneinander (mittlerer Blot). Eine differentielle Expression von Mitgliedern der Cytohesin Familie wurde auch in anergen  $T_{H1}$ -Zellen aus einem murinen *in-vitro* Toleranz-Modell beschrieben. Hier wurde ebenfalls eine selektiv verstärkte Expression von Cytohesin-3 in toleranten T-Zellen beobachtet, während die Proteinmenge der anderen untersuchten Cytohesine durch die Toleranzinduktion nicht reguliert wurde (Korthäuer et al. 2000).

Neben der Proteinmenge wurde auch die mRNA von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in toleranten und aktivierten T-Zellen untersucht. Dazu wurde zunächst total-RNA aus  $CD8^+$ T-Zellen isoliert und die mRNA anschließend in einer RT-PCR-Reaktion in cDNA transformiert. Die Quantifizierung der Cytohesin mRNA erfolgte mittels einer "quantitativen Real-Time"-PCR. Wie schon für die Proteinexpression von Cytohesin-3 gezeigt, ist auch die Cytohesin-3 mRNA Menge in toleranten  $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zu der in aktivierten T-Zellen deutlich erhöht. Die Cytohesin-1 mRNA Expression in aktivierten und toleranten T-Zellen unterscheidet sich dagegen nicht signifikant voneinander. Somit ist gezeigt, dass Cytohesin-3 nicht aber Cytohesin-1, in anergen  $CD8^+$ T-Zellen aus einem *ex-vivo* Toleranz Modell signifikant verstärkt exprimiert wird. Dabei wird die erhöhte Proteinexpression durch eine verstärkte Transkription und Translation der Cytohesin-3 mRNA erreicht.

Da die Transkription von GAPDH nicht durch T-Zellstimulation reguliert wird, diente GAPDH hier als Referenzgen (J. Schultze, unveröffentlichte Daten). Die in Abbildung 3.2(b) dargestellten Werte stellen relative Veränderungen gegenüber dem Referenzgen GAPDH dar.



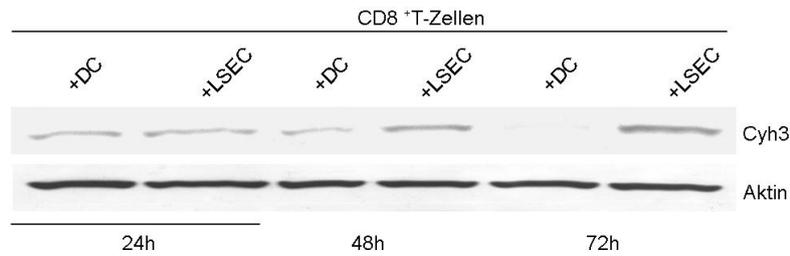
**Abbildung 3.2: Cytohesin-3 ist in toleranten T-Zellen selektiv erhöht.** Die endogene Expression von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-3 in toleranten und aktivierten T-Zellen wurde mittels SDS-PAGE und Immunmarkierung der Western-Blots analysiert (a). Mit Hilfe eines  $\alpha$ -Cytohesin-3 Antikörpers konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-3 in aktivierten T-Zellen nur schwach exprimiert wird, während eine deutlich stärkere Proteinmenge in toleranten T-Zellen detektiert werden kann (Cyh3, oberer Blot). Dagegen ist die Expression von Cytohesin-1 in toleranten und aktivierten T-Zellen gleich (Cyh1, mittlerer Blot). Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle (Aktin, unterer Blot). Mittels quantitativer PCR wurde in toleranten T-Zellen auch eine verstärkte Cytohesin-3 mRNA Transkription festgestellt (b). Die Mengen an Cytohesin-1 mRNA in toleranten und aktivierten T-Zellen unterscheiden sich nur unsignifikant voneinander. Die dargestellten Werte wurden auf die für das Referenzgen GAPDH gemessenen Ct-Werte normiert.

### Die Kinetik der Cytohesin-3 Expression korreliert mit dem Verlust von T-Zell Aktivierungsmarkern

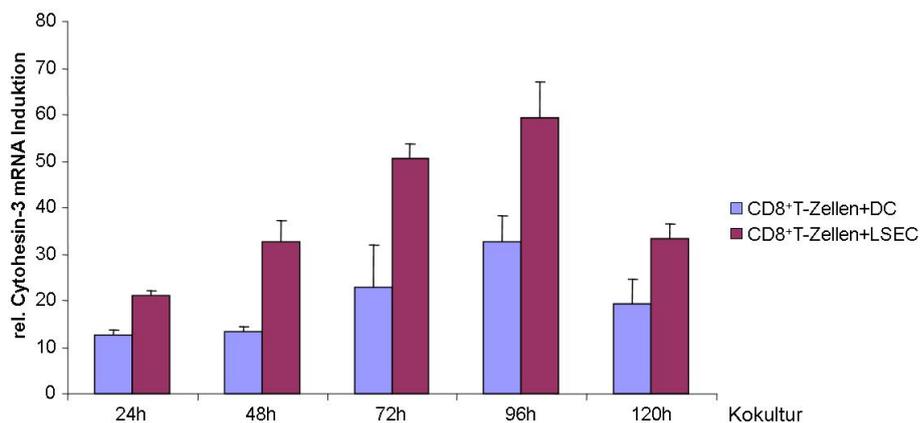
Die T-Zell Toleranzinduktion in dem hier verwendeten murinen *ex-vivo* Anergie-Modell erfolgt während einer fünftägigen Kokultur der CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit Leberendothelzellen. Auf den CD8<sup>+</sup>T-Zellen wird während dieses Zeitraums die Proteinmenge verschiedener Aktivierungsmarker wie beispielsweise die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptor (CD25) deutlich reduziert.

Um eine Expressionskinetik von Cytohesin-3 während der Toleranzinduktion zu untersuchen, wurde die Protein- (Abbildung 3.3 a) und die mRNA-Menge (Abbildung 3.3 b) von Cytohesin-3 in CD8<sup>+</sup>T-Zellen an Tag 1 bis Tag 5 der Kokultur analysiert. Zur Detektion der Cytohesin-3 Proteinexpression wurden die Zellysate in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer Nitrozellulosemembran mit dem  $\alpha$ -Cytohesin-3 spezifischen Antikörper 8B4 detektiert. Die Cytohesin-3 Proteinmenge in CD8<sup>+</sup>T-Zellen ist nach 24 und 48 Stunden Kokultur mit DCs und LSECs zunächst vergleichbar. Nach 72 Stunden Kokultur ist in mit DCs kultivierten T-Zellen nur eine sehr schwache Cytohesin-3 Expression detektierbar. Zum gleichen Zeitpunkt ist in mit LSECs kultivierten T-Zellen dagegen ein Anstieg der endogenen Cytohesin-3 Menge nachweisbar. Die Kinetik der Cytohesin-3 mRNA Transkription wurde, wie oben beschrieben, mittels quantitativer PCR untersucht. Wie in Abbildung 3.3 b dargestellt, wird an allen untersuchten Zeitpunkten in den mit LSEC kultivierten T-Zellen vergleichsweise mehr Cytohesin-3 mRNA gebildet als in den mit DCs kultivierten T-Zellen. Diese ist bereits nach 24 Stunden Kokultur mit LSECs zu beobachten. Allerdings ist die Cytohesin-3 mRNA Menge in mit DC kokultivierten T-Zellen im Gegensatz zu der untersuchten Proteinexpression nach 72 Stunden nicht minimal, sondern steigt bis 96 Stunden Kokultur weiter an. In beiden untersuchten CD8<sup>+</sup>T-Zellpopulationen ist eine maximale Cytohesin-3 mRNA Transkription nach 96 Stunden Kokultur erreicht, die nach 120 Stunden wieder leicht abfällt.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der von Korthäuer *et al.* beschriebenen Cytohesin-3 Expressionskinetik in *in-vitro* generierten anergen T<sub>H1</sub>-Zellen. Hier wurde ebenfalls im Verlauf der Kultivierung ein Expressionsmaximum der Cytohesin-3 mRNA und Proteinmenge detektiert, das im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder abfällt. Auch hier liegt die mRNA-Expression am letzten Messpunkt (200 Stunden) der *in-vitro* Anergie Induktion deutlich über dem der Kontrollzellen (Korthäuer *et al.* 2000).



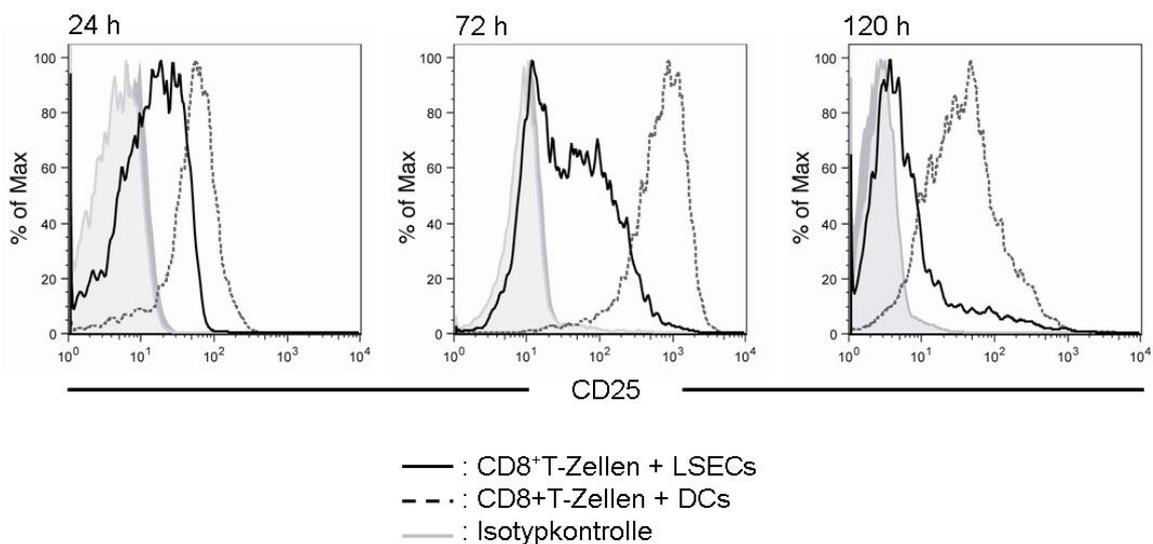
(a) Kinetik der Proteinexpression



(b) Kinetik der mRNA- Transkription

**Abbildung 3.3: Kinetiken der Cytohesin-3 Protein- und mRNA-Menge während der Aktivierung bzw. Toleranzinduktion in CD8<sup>+</sup>T-Zellen.** Die Kinetik der Cytohesin-3 Expression wurde während der fünftägigen Kokultur der CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit DCs oder LSECs untersucht. Die Analyse der Zellen in der SDS-PAGE zeigt eine verstärkte Proteinexpression von Cytohesin-3 nach 72 Stunden Kokultur mit LSECs, während die Kokultur von T-Zellen mit DCs nach 72 Stunden zu einer deutlichen Verringerung der Proteinmenge führt (a). Die Quantifizierung der mRNA-Menge mittels “Real-Time“-PCR zeigte, dass die Cytohesin-3 mRNA Transkription nach 72 Stunden und 96 Stunden Kokultur mit LSECs maximal ist (b). Eine der Proteinexpression entsprechende Reduktion der Cytohesin-3 mRNA nach 72 Stunden Kokultur mit DCs wurde nicht detektiert. Die dargestellten Werte verstehen sich relativ zu den für das Referenzgen Tbp gemessenen Ct-Werten.

Die hier beschriebene Expressionskinetik der Cytohesin-3 Proteinmenge in anergen  $CD8^+$ T-Zellen korreliert stark mit der Reduktion der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD25. Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, kann auf  $CD8^+$ T-Zellen nach 72 Stunden Kokultur mit LSECs eine signifikant reduzierte Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (L. Diehl, unveröffentlicht). Die Fähigkeit zu zytotoxischen Effektorfunktionen der  $CD8^+$ T-Zellen ist erstmals nach 72 Stunden Kokultur mit LSECs reduziert. Somit ist nach 72 Stunden der Kokultur ein für die *ex-vivo* Toleranzinduktion kritischer Zeitpunkt erreicht, an dem auch erstmals die Cytohesin-3 Expression in aktivierten und toleranten T-Zellen differentiell reguliert wird. Die Expression von Cytohesin-3 ist daher nicht nur mit Anergie in  $CD8^+$ T-Zellen assoziiert, sondern korreliert auch mit dem Verlust von Effektorfunktionen der anergen T-Zellen.



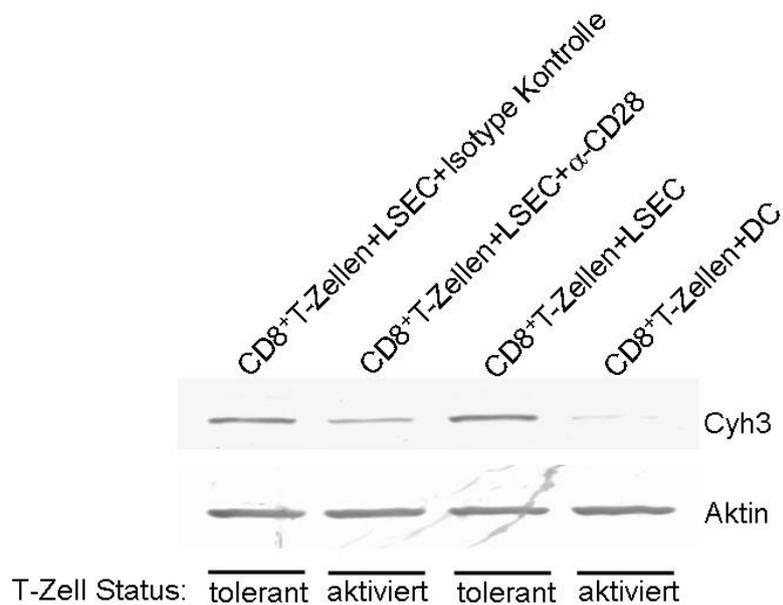
**Abbildung 3.4: Kinetik der CD25-Oberflächenexpression während der Toleranzinduktion in  $CD8^+$ T-Zellen.** FACS-Analyse der CD25-Oberflächenexpression auf  $CD8^+$ T-Zellen. Die CD25 Expression auf der Zelloberfläche von  $CD8^+$ T-Zellen ist erstmals nach 72 Stunden Kokultur mit LSEC reduziert. Minimale Expression wird nach 120 Stunden Kokultur detektiert. Schwarze Linie:  $CD8^+$ T-Zellen + LSEC, gestrichelte Linie:  $CD8^+$ T-Zellen + DC, gefüllte Kurve: Isotypkontrolle. Daten zur Verfügung gestellt von L. Diehl, IMMEI, Universitätsklinik Bonn.

### 3.1.1 Die Stimulation der Oberflächenproteine CD28 und PD-1 reguliert die Aktivierung von T-Zellen und die Cytohesin-3 Expression

#### Kostimulation von CD28 führt zu einer Reduktion der Cytohesin-3 Proteinexpression in CD8<sup>+</sup>T-Zellen

In verschiedenen experimentellen Systemen wurde gezeigt, dass eine TCR-Ligation ohne positiv-kostimulatorische Signale nicht zur Aktivierung naiver T-Zellen führt, sondern Zelltod oder Anergie auslöst (Schwartz 1996). Der bekannteste Rezeptor für positiv-kostimulatorische Interaktionen ist CD28. CD28 ist als Homodimer auf ruhenden T-Zellen exprimiert und wird durch die Bindung an seine auf APCs exprimierten Liganden B7-1 und B7-2 aktiviert (Aruffo et al. 1987; Lenschow et al. 1996). Zusammen mit den vom TCR/MHC-Komplex ausgehenden Signalkaskaden führt dies zu einer vollständigen T-Zellaktivierung und IL-2 Produktion. Entsprechend unterdrückt in dem hier verwendeten *ex-vivo* Toleranz-Modell die Zugabe eines stimulierenden  $\alpha$ -CD28 Antikörpers in der fünftägigen Kokultur von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit LSECs eine Toleranzinduktion in T-Zellen (L. Diehl, unveröffentlichte Daten). Die mit dem  $\alpha$ -CD28 Antikörper inkubierten T-Zellen aus der LSEC-Kokultur produzieren, im Vergleich zu den mit der Isotypkontrolle behandelten T-Zellen, wieder verstärkt IL-2 sowie IFN- $\gamma$  und üben zytotoxische Effektorfunktionen aus.

Ob durch die Zugabe eines Kostimulus die verstärkte Cytohesin-3 Expression nach Kokultur von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit LSECs ebenfalls unterdrückt werden kann, wurde proteinbiochemisch untersucht. Zellysate wurden dazu in der SDS-PAGE separiert und im Western Blot mit dem Cytohesin-3 spezifischen Antikörper 8B4 analysiert. In Abbildung 3.5 ist zu erkennen, dass die Zugabe des stimulierenden  $\alpha$ -CD28 Antikörpers zu der LSEC-Kokultur (zweite Bande) im Vergleich zu der Inkubation mit einer Isotypkontrolle (erste Bande) zu einer Reduktion der Cytohesin-3 Expression in CD8<sup>+</sup>T-Zellen führt. Übertragen auf eine physiologische Situation verhindert die Stimulation von CD28 durch die Bindung an einen entsprechenden Liganden auf den APCs somit nicht nur einen anergen Zustand von T-Zellen, sondern verhindert auch aktiv eine verstärkte Expression von Cytohesin-3 in aktivierten T-Zellen.

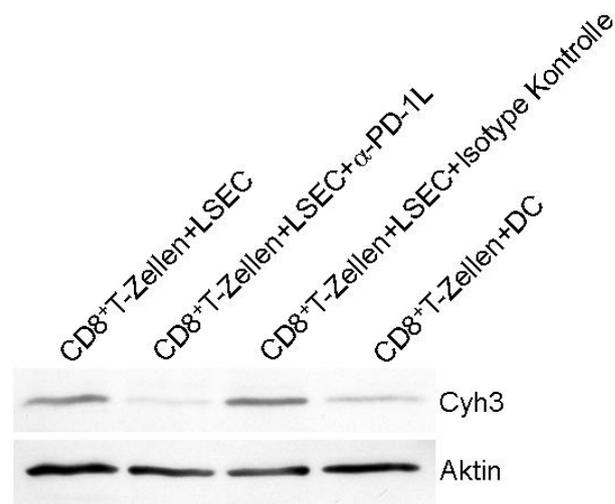


**Abbildung 3.5: Die Aktivierung von CD28 reprimiert die Cytohesin-3 Expression während der Toleranzinduktion.** SDS-PAGE und Western-Blot Analyse der Cytohesin-3 Proteinexpression in toleranten und aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen nach CD28 Stimulation. Die Zugabe eines stimulierenden α-CD28 Antikörpers zu der fünftägigen Kokultur von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit LSECs reduziert die Cytohesin-3 Proteinexpression und verhindert die Toleranzinduktion. Die Detektion des endogenen Cytohesin-3 erfolgte mit dem monoklonalen α-Cytohesin-3 Antikörpers 8B4. Die Markierung von Aktin diente als Ladekontrolle.

### Die Expression von Cytohesin-3 wird von der Stimulation des Membranrezeptors PD-1 durch die Bindung seines Liganden B7-H1 reguliert

Der negativ regulatorische Korezeptor PD-1 gehört zu der Familie der B7/CD28 kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und wird *in-vivo* nach Stimulation von CD3 auf peripheren T-Zellen exprimiert (Agata et al. 1996). PD-1 wird durch die Bindung an B7-H1 (PD-L1) oder B7-DC (PD-L2) stimuliert. Während B7-H1 sowohl auf Makrophagen und DCs, als auch auf B- und T-Zellen exprimiert ist, findet sich B7-DC lediglich auf Makrophagen und DCs. Die Bindung von PD-1 an seine Liganden unterbindet die IL-2 Synthese sowie Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen und ruft damit einen anergen T-Zell Phänotypen hervor (Freeman et al. 2000). Der einzige für PD-1 bisher bekannte molekulare Mechanismus beschreibt eine durch PD-1 Ligation induzierte Inhibition der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und somit eine Blockade der kostimulatorischen Signalkaskade (Parry et al. 2005).

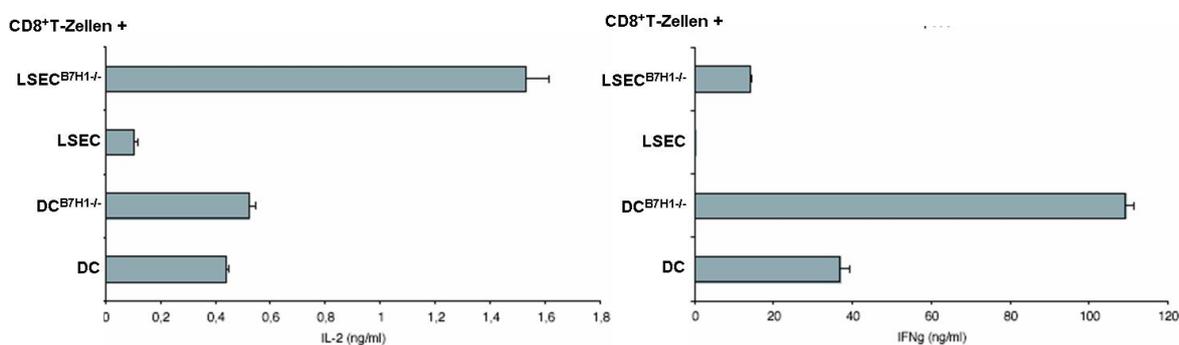
Eine Beteiligung von PD-1 an der differentiellen Cytohesin-3 Expression in anergen CD8<sup>+</sup>T-Zellen wird hier durch die Zugabe eines blockierenden  $\alpha$ -PD-L1 Antikörpers zu der fünftägigen Kokultur von CD8<sup>+</sup>T-Zellen und LSECs untersucht. Durch die Bindung des Antikörpers an den auf LSECs exprimierten PD-L1 wird eine Stimulation von PD-1 durch PD-L1 und die damit induzierte Signalkaskade inhibiert. Die Zugabe des blockierenden PD-L1 Antikörpers zu der LSEC/CD8<sup>+</sup>T-Zell Kokultur verhindert die Induktion eines anergen T-Zell Phänotypen. Die so generierten T-Zellen synthetisieren mehr IL-2 und IFN $\gamma$  als die mit wild-typ LSEC kultivierten T-Zellen und weisen außerdem zytotoxische Effektorfunktionen auf (L. Diehl, unveröffentlicht). Die Cytohesin-3 Expression in diesen CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurde mittels SDS-PAGE und Immunmarkierung von Western-Blots mit dem Cytohesin-3 spezifischen Antikörper 8B4 untersucht. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, führt die Blockade von PD-L1 zu einer verringerten Cytohesin-3 Expression in CD8<sup>+</sup>T-Zellen (Bande 2) im Vergleich zu den unbehandelten (Bande 3) oder mit einem Isotyp-Kontrollantikörper behandelten T-Zellen (Bande 1).



**Abbildung 3.6:  $\alpha$ -PD-L1 reprimiert die Hochregulation von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen.** SDS-PAGE Analyse der Cytohesin-3 Proteinexpression in T-Zellen nach fünftägiger Kokultur mit LSECs bzw. DCs in Anwesenheit eines blockierenden PD-L1 Antikörpers bzw. eines Isotyp Kontroll-Antikörpers. Die Zugabe des blockierenden PD-L1 Antikörpers zu der Kokultur von T-Zellen und LSECs führt zu einer geringen Cytohesin-3 Expression (oberer Blot, zweite Spur) verglichen mit der Cytohesin-3 Expression in der Isotypkontrolle (oberer Blot, dritte Spur). Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle (unterer Blot).

Um auszuschließen, dass in dem oben beschriebenen Versuchsansatz die beobachtete Reduktion der Cytohesin-3 Expression durch eine unspezifische Bindung des  $\alpha$ -PD-L1 (B7-H1) Antikörpers hervorgerufen wird, wurde in weiterführenden Experimenten die von Dong *et al.* beschriebene B7-H1 “knock-out“ Maus verwendet (B7-H1<sup>-/-</sup>) (Dong et al. 2004). Der Phänotyp dieser Maus ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation von CD8<sup>+</sup>T-Zellen in der Leber und durch eine erhöhte Anfälligkeit und Letalität für eine experimentell-induzierte Autoimmun-Hepatitis.

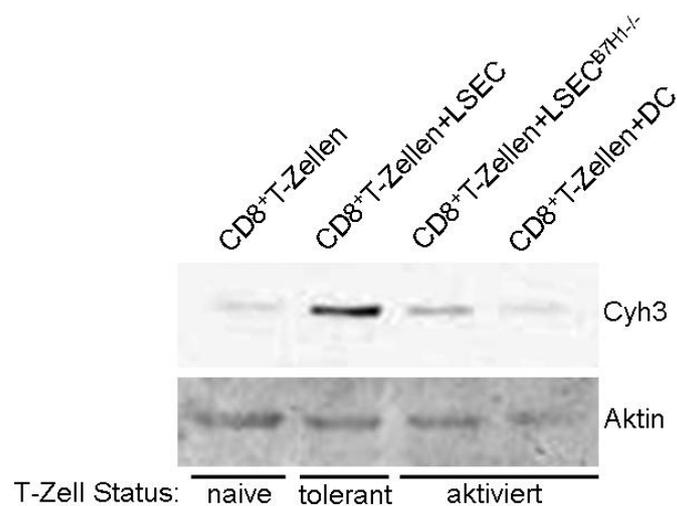
Aus diesen Mäusen wurden LSECs (LSEC<sup>B7H1-/-</sup>) isoliert und für die folgenden Experimente verwendet. Die Kultivierung von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit LSEC<sup>B7H1-/-</sup> resultiert nicht in der Induktion aneurer CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Vielmehr weisen diese CD8<sup>+</sup>T-Zellen einen aktivierten T-Zellphänotyp auf. Die in Abbildung 3.7 gezeigten ELISA Messungen der IL-2 und IFN- $\gamma$  Konzentration in den Kulturüberständen zeigen, dass die mit LSEC<sup>B7H1-/-</sup> kultivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen deutlich mehr IL-2 und IFN- $\gamma$  produzieren, als die mit wild-typ LSEC kultivierten T-Zellen. Für das Zytokin IL-2 wird sogar eine stärkere Produktion von T-Zellen aus LSEC<sup>B7H1-/-</sup> Kokultur beobachtet, als bei aktivierten T-Zellen.



**Abbildung 3.7: ELISA basierte Konzentrationsbestimmung von IL-2 und IFN- $\gamma$  in Kulturmedien von CD8<sup>+</sup>T-Zellen nach Kokultur.** Im Vergleich zu den mit wild-Typ LSECs kultivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen sind die Zytokinekonzentrationen von IL-2 und IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen der LSEC<sup>B7H1-/-</sup> + CD8<sup>+</sup>T-Zellen Kokulturen deutlich erhöht. Abbildung zur Verfügung gestellt von L. Diehl IMMEI, Universitätsklinik Bonn.

Die mit Hilfe des blockierenden PD-L1 Antikörpers gezeigte PD-1 abhängige Expression von Cytohesin-3 wurde durch die Verwendung von LSEC<sup>B7H1-/-</sup> für die Kokultur mit CD8<sup>+</sup>T-Zellen bestätigt. Die Analyse der Cytohesin-3 Proteinexpression in mit LSEC<sup>B7H1-/-</sup> kultivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen zeigt, dass die fehlende PD-1 Stimulation der T-Zellen durch Verwendung von LSEC<sup>B7H1-/-</sup> zu einer reduzierten Cytohesin-3 Expres-

sion führt (Abb. 3.8). Die Menge an Cytohesin-3 in T-Zellen aus LSEC<sup>B7H1-/-</sup> Kokultur (Bande 3) ist dabei vergleichbar mit den Mengen in naiven oder aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen (Bande 1 bzw. Bande 4). Damit ist eine klare Abhängigkeit der Cytohesin-3 Expression in anergen T-Zellen von der Aktivierung der T-Zelle durch den PD-1 Liganden B7-H1 gezeigt. In dem hier verwendeten *ex-vivo* Anergie Modell ist die Stimulation von PD-1 durch seinen Liganden eine essentielle Voraussetzung für die LSEC-vermittelte Toleranzinduktion in CD8<sup>+</sup>T-Zellen (L. Diehl, unveröffentlicht). Die verstärkte, PD-1 abhängige Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen ist somit eine direkte Konsequenz der von PD-1 ausgehenden Signalwege und koppelt die Expression von Cytohesin-3 an die PD-1 abhängige Anergie-Induktion in CD8<sup>+</sup>T-Zellen.



**Abbildung 3.8: Die verstärkte Expression von Cytohesin-3 in toleranten T-Zellen ist abhängig von der PD-1 Stimulation durch B7-H1 (PD-L1).** T-Zellen aus Kokultur mit wild-Typ LSECs, LSEC<sup>B7H1-/-</sup> und DCs wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Hilfe des Cytohesin-3 spezifischen Antikörpers 8B4 hinsichtlich der Cytohesin-3 Expression untersucht. Eine hohe Expression von Cytohesin-3 konnte in den T-Zellen nachgewiesen werden, die mit wild-Typ LSECs kultiviert wurden (oberer Blot, zweite Spur). In T-Zellen aus LSEC<sup>B7H1-/-</sup> Kokultur ist nur eine sehr schwache Expression von Cytohesin-3 zu detektieren (oberer Blot, dritte Spur), vergleichbar mit der in aktivierten T-Zellen nachgewiesenen Menge (oberer Blot, vierte Spur). Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle (untere Blot).

### 3.1.2 Die Expression von Cytohesin-3 in T-Zellen wird von der PI3-Kinase reguliert

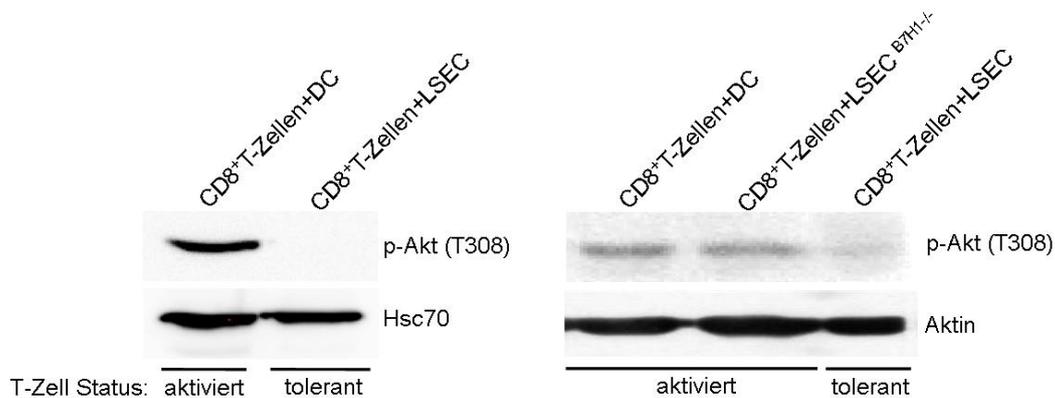
Die genauen Signalwege, die durch negative und positive Kostimulation in T-Zellen ausgelöst werden, sind nur unvollständig verstanden. Als sicher gilt jedoch, dass die Aktivierung der B7-CD28 Familie durch entsprechende Stimulation zu einer differentiellen Aktivierung der PI3-Kinase führt (Appleman et al. 2002). Eine T-Zell Kostimulation durch Bindung von CD28 an den Liganden CD86 bewirkt beispielsweise eine Aktivierung der PI3-Kinase und damit verbunden eine verstärkte Synthese von Phosphatidylinositol(3,4,5)Phosphat (PIP3) (Stokoe et al. 1997). Die vermehrte Synthese dieses Phospholipids hat unter anderem die Aktivierung der Proteinkinase AKT/PKB zur Folge und ermöglicht schlussendlich den Eintritt in den Zellzyklus (Appleman et al. 2002).

#### Die Stimulation des negativ-regulatorischen Signalfaktors PD-1 hemmt die Phosphorylierung von AKT/PKB

Der von Parry *et al.* vorgeschlagene molekulare Mechanismus zur inhibitorischen Funktionsweise von PD-1 beschreibt eine durch PD-1 Stimulation hervorgerufene Hemmung der PI3-Kinase Aktivität (Parry et al. 2005). In dem von dieser Gruppe angewendeten *in-vitro* Anergie Modell resultiert die Hemmung der PI3-Kinase in einer reduzierten Phosphorylierung von AKT/PKB und entsprechend in einer verringerten IL-2 Produktion sowie reduziertem Glukosemetabolismus. Dieser Mechanismus wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten *ex-vivo* Anergie Modell nachvollzogen.

Dazu wurden SDS-Totallysate toleranter und aktivierter CD8<sup>+</sup>T-Zellen hinsichtlich der AKT/PKB Phosphorylierung (p-AKT/PKB) untersucht (Abb. 3.9). In aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen ist eine deutliche AKT/PKB Phosphorylierung an Threonin(308) detektierbar (linker Blot, erste Spur) In toleranten CD8<sup>+</sup>T-Zellen kann dagegen keine Phosphorylierung von AKT/PKB nachgewiesen werden. Der Nachweis von phospho-AKT/PKB in mit LSEC<sup>B7H1-/-</sup> kultivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen zeigt, dass AKT/PKB in diesen Zellen stärker als in toleranten T-Zellen phosphoryliert wird (rechter Blot, zweite Spur). Damit führt die Stimulation von PD-1 durch B7-H1 auch *in-vivo* zu einer Hemmung der PI3-Kinase Aktivität, und bestätigt das Ergebnis von Parry *et al.* Durch welche molekularen Mechanismen eine PD-1 Stimulation die Hemmung der AKT-Phosphorylierung induziert und damit eine reduzierte IL-2 Synthese und einem anergen Zustand der

CD8<sup>+</sup>T-Zellen bewirkt, ist allerdings unbekannt.



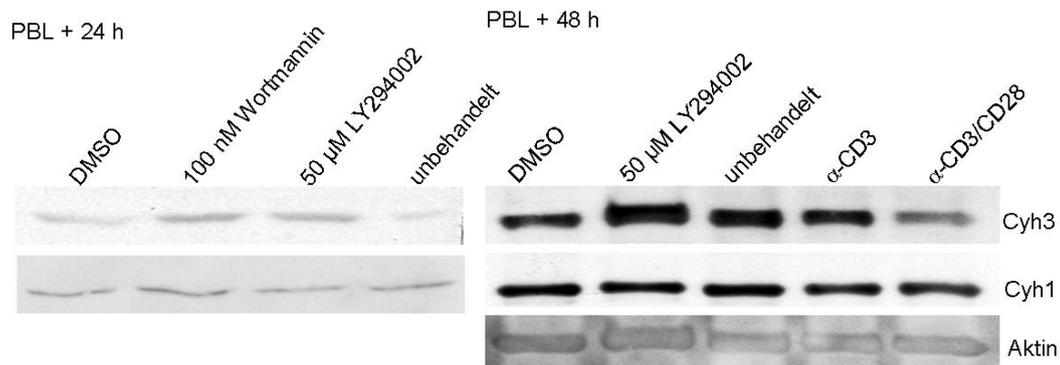
**Abbildung 3.9: PD-1 abhängige AKT/PKB Phosphorylierung in toleranten und aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen.** SDS-Totallysate wurden in der PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes AKT mit einem monoklonalen Phospho-Threonin(308) spezifischen AKT-Antikörper im Western-Blot detektiert. In aktivierten T-Zellen ist eine starke AKT-Phosphorylierung detektierbar (Blot oben links, linke Spur), in toleranten T-Zellen dagegen ist kein phosphoryliertes AKT nachweisbar (Blot oben links, rechte Spur). Die Kultivierung von CD8<sup>+</sup>T-Zellen mit LSEC<sup>B7H1-/-</sup> zeigt, dass die fehlende Stimulation von PD-1 durch seinen Liganden B7-H1 zu einer reduzierten Threonin-Phosphorylierung von AKT führt, vergleichbar mit der in aktivierten Zellen nachgewiesenen Menge. Der Nachweis von Hsc70 bzw. Aktin diente der Ladekontrolle.

Nachdem ein Zusammenhang von PD-1 Stimulation durch PD-L1 und Cytohesin-3 Expression sowie AKT/PKB Phosphorylierung gezeigt wurde (vergl. Abb. 3.8 und Abb. 3.9), konnte durch die Verwendung eines PI3-Kinase-Inhibitors eine direkte Abhängigkeit der Cytohesin-3 Expression von der Aktivität der PI3-Kinase nachgewiesen werden. Als PI3-Kinase Inhibitor wurde die zellgängige Substanz LY294002 verwendet, die spezifisch und reversibel die ATP-Bindung an der katalytischen Untereinheit (p110) der PI3-Kinase inhibiert. Humane periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden für 24 bzw. 48 Stunden mit LY294002 inkubiert und die Cytohesin-3 Expression anschließend sowohl auf Protein- (Abb.3.10 a) als auch auf mRNA-Ebene (Abb.3.10 b) untersucht.

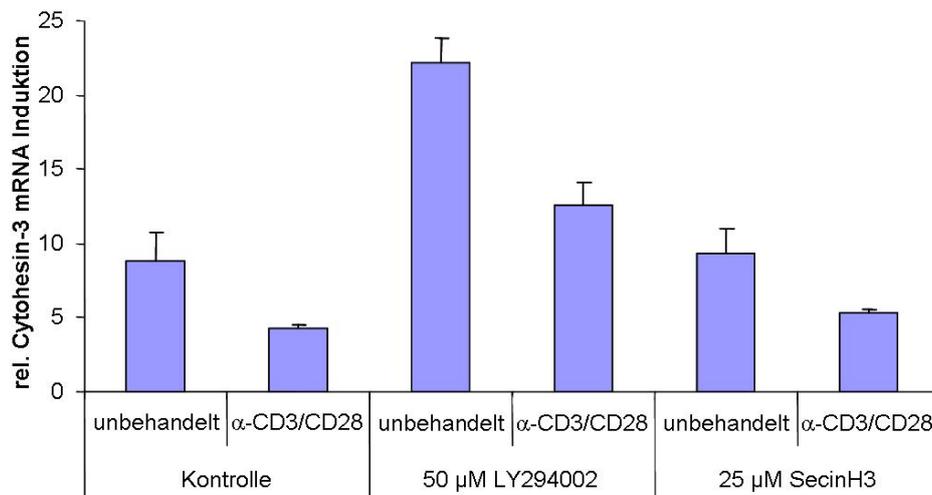
Die Inkubation der PBLs mit LY294002 für 48 Stunden (rechter Blot, Bande 2) führte sowohl im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (Bande 3) als auch mit den DMSO-Kontrollzellen (Bande 1) zu einer deutlich verstärkten Cytohesin-3 Proteinexpression. Die Aktivierung der PI3-Kinase durch Stimulation der PBLs mit  $\alpha$ -CD3/CD28 Antikörpern bewirkt entsprechend eine Reduktion der Cytohesin-3 Proteinmenge (Bande 5). Anders als von Korthäuer *et al.* beschrieben, führte die Stimulation der PBLs mit dem  $\alpha$ -CD3 An-

tikörper nach 48 Stunden nicht zu einer verstärkten Cytohesin-3 Expression (Bande 4). Eine PI3-Kinase abhängige Expression von Cytohesin-3 wurde ebenfalls nach 24 Stunden Inkubation mit LY294002 bzw. Wortmannin, einem weiteren verwendeten PI3-Kinase Inhibitor, beobachtet (linker Blot). Bereits nach 24 Stunden hat die Inhibition der PI3-Kinase eine erhöhte Cytohesin-3 Proteinmenge in den Zellen zur Folge. Wie die Markierung mit dem Cytohesin-1 spezifischen Antikörper 7H2 zeigt, ist die Expression von Cytohesin-1 durch die Inhibition der PI3-Kinase nicht signifikant beeinflusst, da weder nach 24 noch nach 48 Stunden Inkubation mit LY294002 eine veränderte Cytohesin-1 Proteinexpression detektiert werden konnte.

Durch die Analyse der Cytohesin-3 mRNA Menge nach Inkubation mit LY294002 wurde geprüft, ob die PI3-Kinase direkt die Transkription des Cytohesin-3 Gens beeinflusst. Die Quantifizierung der Cytohesin-3 mRNA wurde mittels "Real-Time"-PCR vorgenommen und ist in Abbildung 3.10 b dargestellt. Wie bereits proteinbiochemisch beobachtet, führt eine  $\alpha$ -CD3/CD28 Stimulation von PBLs zu einer deutlich verringerten Cytohesin-3 mRNA Transkription im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 führt dagegen zu einer signifikant verstärkten Cytohesin-3 mRNA Transkription in unstimulierten PBLs und revertiert die durch die  $\alpha$ -CD3/CD28 Stimulation hervorgerufene Reduktion der Cytohesin-3 mRNA Menge vollständig (Abb.3.10 b). Daher bewirkt die Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 nicht eine Stabilisierung von Cytohesin-3 auf Proteinebene, sondern induziert eine verstärkte mRNA-Transkription des Cytohesin-3 Gens. Durch die Verwendung des pan-Cytohesin-spezifischen GEF Inhibitors SecinH3 konnte kein spezifischer Effekt auf die Cytohesin-3 Gentranskription festgestellt werden. Damit unterliegt die Cytohesin-3 Expression in T-Zellen nicht dem für das *D. melanogaster* Cytohesin Homolog *steppke* beschriebenen negativen Rückkopplungsmechanismus (Fuss et al. 2006).



(a) Cytohesin-3 Proteinexpression



(b) Cytohesin-3 mRNA- Transkription

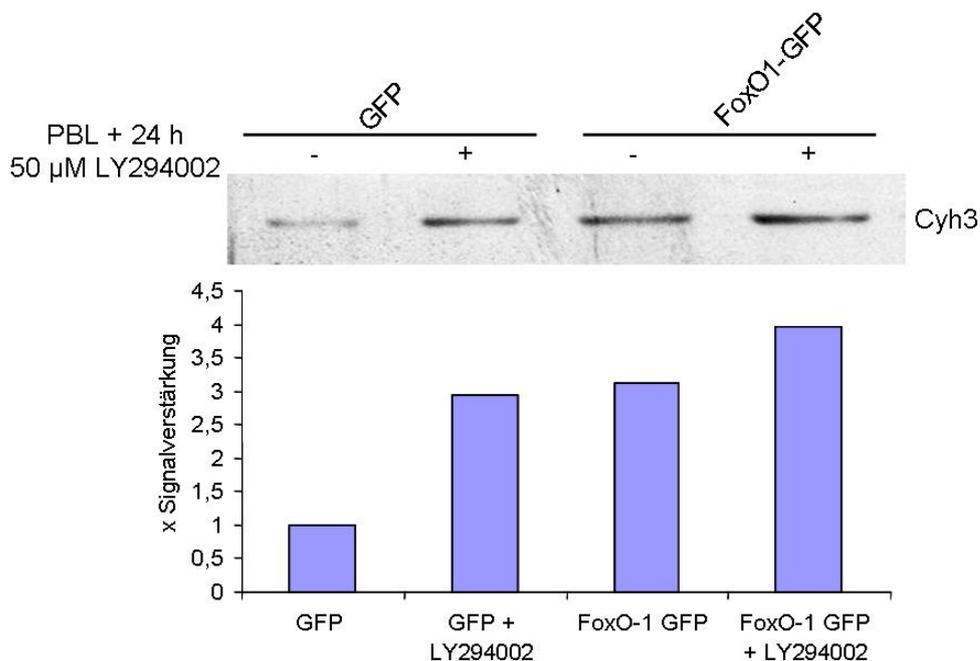
**Abbildung 3.10: Einfluss der PI3-Kinase-Aktivität auf die Cytohesin-3 Protein- und mRNA-Expression.** 48 Stunden Inkubation von PBLs mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 führt sowohl auf Proteinebene (a, zweite Bande) als auch auf mRNA Ebene (b) zu einer verstärkten Cytohesin-3 Expression. Der Nachweis von Cytohesin-3 erfolgte durch Immunmarkierung des Western-Blots mit dem spezifischen Antikörper 8B4. Die Markierung von Aktin diente der Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Cytohesin-3 mRNA erfolgte relativ zu dem Referenzgen beta-2-Mikroglobulin.

### 3.1.3 Cytohesin-3 ist ein Zielgen des Forkhead Transkriptionsfaktors FoxO-1

Für verschiedene negativ regulatorische Proteine, wie beispielsweise p27/kip und Rb/p130, ist eine von der PI3-Kinase regulierte Expression bekannt (Collado et al. 2000). Die Aktivierung der PI3-Kinase durch ein positiv kostimulatorisches Signal führt zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase AKT/PKB. Aktivierte AKT/PKB ist nun ihrerseits in der Lage, den Transkriptionsfaktor FoxO-1 zu phosphorylieren und ihn damit aus dem Kern auszuschließen. Die zytoplasmatische Lokalisation von FoxO-1 verhindert die weitere Transkription der Zellzyklusinhibitoren p27/kip und Rb/p130 (Birkenkamp et al. 2003). Neben anderen Faktoren sorgt der Wegfall von p27/kip und Rb/p130 für einen Wiedereintritt in den Zellzyklus. Bleibt eine PI3-Kinase Aktivierung durch ein kostimulatorisches Signal aus oder wird durch eine PD-1 Stimulation unterdrückt, liegt AKT/PKB weiterhin in der unphosphorylierten Form vor. Demnach bleibt FoxO-1 kernlokalisiert und ermöglicht weiterhin die Transkription von p27/kip und Rb/p130. Damit ist die Expression dieser Zellzyklus-Inhibitoren direkt an eine Kostimulation der T-Zelle durch CD28 gekoppelt.

Durch eine Überexpression von GFP-Fusionsproteinen wurde hier eine durch FoxO-1 regulierte Cytohesin-3 Expression in PBLs untersucht. Abbildung 3.11 zeigt einen Western Blot auf dem durch Immunmarkierung mit dem monoklonalen Antikörper 8B4 Cytohesin-3 detektiert wurde. Im Vergleich zu den mit GFP transfizierten Kontrollzellen ist in Spur 3 und 4 des Blots eine durch GFP-FoxO-1 bedingte, verstärkte Cytohesin-3 Expression zu erkennen. Die Zugabe des PI3-Kinase Inhibitors LY294002 führt nach 24 Stunden sowohl in den mit GFP transfizierten Kontrollzellen, als auch in den mit GFP-FoxO-1 transfizierten Zellen zu einer Zunahme der Cytohesin-3 Expression (Spur 2 und 4).

Damit ist gezeigt, dass Cytohesin-3, wie andere negativ regulatorische Proteine, ein Zielgen des FoxO-1 Transkriptionsfaktors ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von Cytohesin-3 an die Stimulation der B7-CD28 Familie kostimulatorischer Oberflächenproteine gekoppelt ist und direkt von der Aktivierung der PI3-Kinase abhängt.



**Abbildung 3.11: Der Transkriptionsfaktor FoxO-1 reguliert die Cytohesin-3 Expression.** Überexpression von FoxO-1 GFP in PBLs und anschließende Analyse der Cytohesin-3 Expression nach SDS-PAGE und Western Blot zeigt, dass die erhöhte Menge an FoxO-1 eine verstärkte Cytohesin-3 Expression zur Folge hat. Eine Quantifizierung der Signalstärke weist eine bis zu 3-fach verstärkte Cytohesin-3 Expression in FoxO-1-GFP transfizierten Zellen nach (Histogramm). Diese Expressionsteigerung entspricht der durch den Einsatz des PI3-Kinase Inhibitors LY294002 erreichten Signalsteigerung. Die Signalquantifizierung wurde mit dem Programm ImageJ vorgenommen.

## 3.2 Cytohesine sind zentrale Signalkomponenten der T-Zellaktivierung

Bei der Familie der Cytohesine handelt es sich um zytoplasmatische Proteine, die bisher hauptsächlich als wichtige Regulatoren der LFA-1 vermittelten Adhäsion von Leukozyten beschrieben wurden (Kolanus et al. 1996; Dierks et al. 2001; Geiger et al. 2000; Weber et al. 2001). Perez *et al.* identifizierte Cytohesin-1 erstmals als eine Signalkomponente der LFA-1 vermittelten Aktivierung von Leukozyten (Perez et al. 2003). Mit Hilfe eines dominant negativen Cytohesin-1 Peptids zeigte die Gruppe, dass Cytohesin-1 die MAP-Kinase ERK1/2 aktiviert und die IL-2 Synthese von T-Zellen positiv beeinflusst. Eine Beteiligung von Cytohesin-1 oder anderen Mitgliedern der Cytohesin-Familie an der klassischen,

durch Stimulation von TCR und CD28 induzierten T-Zellaktivierung wird erstmals in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Der Einfluss der Cytohesine auf die Aktivierung oder Attenuation von T-Zellen wurde im Folgenden durch Verwendung humaner T-Zelllinien sowie humaner PBLs charakterisiert und eine Positionierung der Cytohesine in den Signalkaskaden der T-Zellaktivierung vorgenommen.

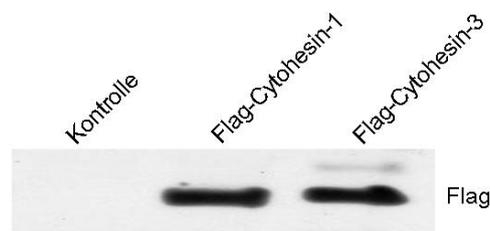
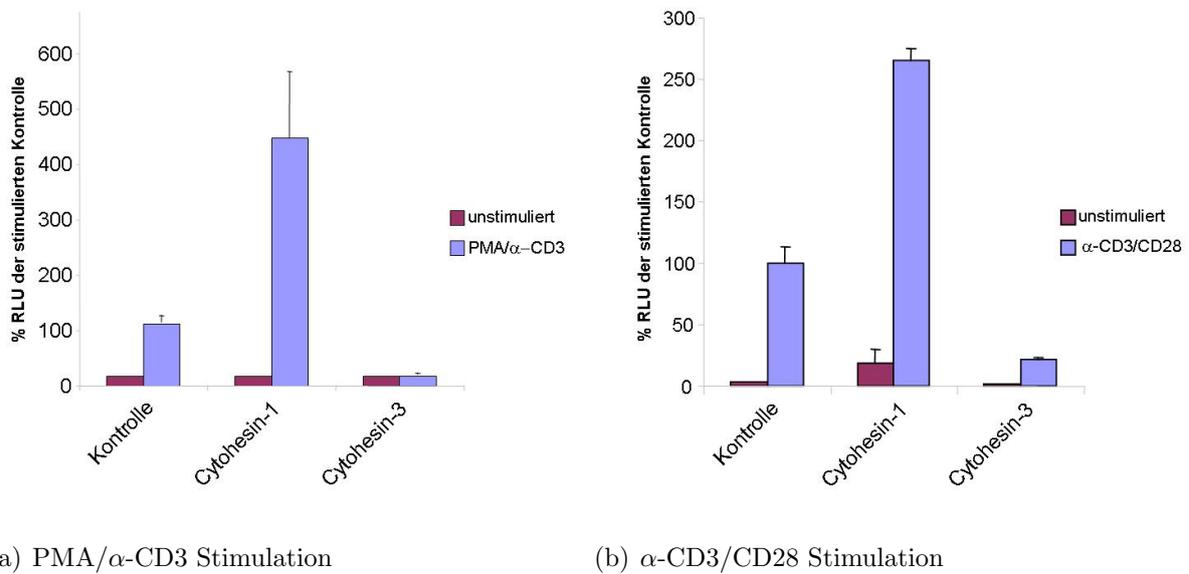
### 3.2.1 Cytohesin-3 ist ein negativer Faktor der T-Zellaktivierung, während Cytohesin-1 die T-Zellaktivierung positiv reguliert

Als klassischer Ansatz zur Untersuchung der T-Zellaktivierung dient die Analyse der transkriptionellen Induktion T-Zellspezifischer Gene, wie beispielsweise IL-2. Hierfür wurde ein Modellsystem etabliert, in dem durch den Einsatz eines IL-2 Luziferase Reporter-Gens die transkriptionelle Aktivität des IL-2 Promotors quantifiziert werden kann. Durch die transiente Transfektion von Jurkat-LT Zellen mit verschiedenen Cytohesin Plasmiden und dem Reporter-Konstrukt konnte der Einfluss der Cytohesine auf die T-Zellsignalkaskade analysiert werden (siehe Kapitel 2.5.1). Eine Induktion des IL-2 Reportergens wurde durch die Stimulation der transfizierten T-Zellen mit PMA/OKT3 bzw.  $\alpha$ -CD28/OKT3 erreicht. Bei dem Phorbolster PMA handelt es sich um ein Diacylglycerol (DAG) Analogon, das zu einer Aktivierung aller Protein Kinase C (PKC) Isoformen führt. Die Zugabe des monoklonalen Antikörpers OKT3 (im weiteren als  $\alpha$ -CD3 Antikörper bezeichnet) führt durch die Bindung an die  $\epsilon$ -Kette des CD3 Komplexes zu einer Quervernetzung der TCRs und damit zu einer Aktivierung der vom TCR ausgehenden Signalkaskaden. Daher induziert die Stimulation der Jurkat LT-Zellen mit  $\alpha$ -CD3/CD28 *in-vitro* eine vollständige T-Zell Aktivierung. Im Folgenden versteht sich die Darstellung der Luziferaseaktivität, und damit der IL-2 Promotoraktivität als prozentuale Darstellung der gemessenen Lichteinheiten (**R**elative **L**ight **U**nits, RLU) relativ zu den gemessenen Werten der stimulierten Kontrollzellen.

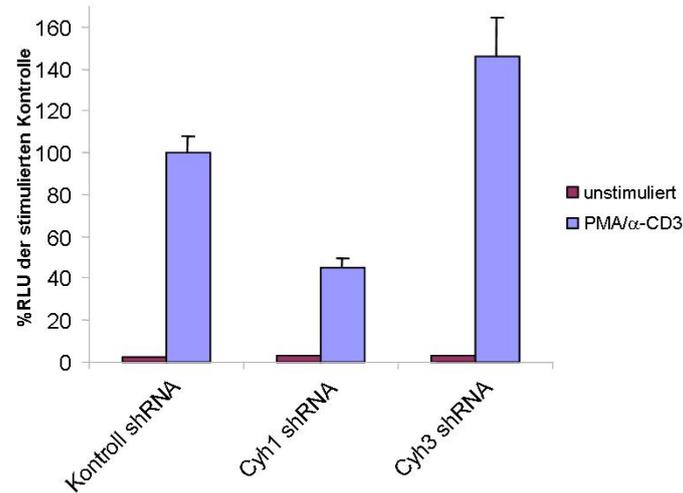
Wie aus Abbildung 3.12 hervorgeht, führt die Stimulation der Jurkat LT-Zellen mit PMA/ $\alpha$ -CD3 (Abb.3.12 a) bzw.  $\alpha$ -CD3/CD28 (Abb.3.12 b) zu einer ca. 20-30 fach verstärkten Aktivierung des IL-2 Promotors im Vergleich zu der basalen IL-2 Promotoraktivität in den unstimulierten Kontrollzellen. Die Überexpression von Cytohesin-1 hat eine

weitere Steigerung der Promotoraktivität um das 2-3 fache der für die Kontrollpopulation gemessenen Werte zur Folge. Dieser Effekt konnte für beide verwendeten Stimulationen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu reduziert die Überexpression von Cytohesin-3 die Induktion des IL-2 Promotors auf ca. 25-30% der Kontrollpromoteraktivität, ebenfalls unabhängig von der eingesetzten Stimulation. Die in Abschnitt 3.5 beschriebene Reduktion des endogenen Cytohesin-3 durch die verwendete CD28 Stimulation kann aufgrund des konstitutiv aktiven Promotors der transfizierten Expressionsplasmide vernachlässigt werden.

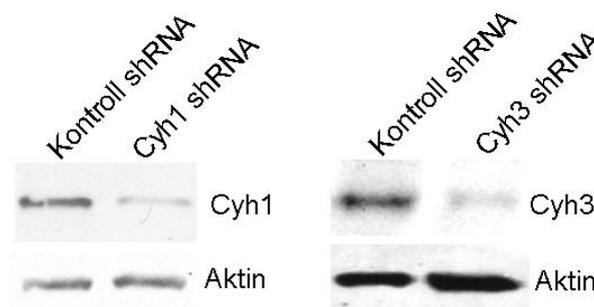
Durch eine Reduktion der endogenen Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-3 Proteinexpression konnte eine Modulation der IL-2 Promotoraktivität durch die Cytohesine bestätigt werden. Dazu wurden Jurkat LT-Zellen mit einem Vektorsystem transient transfiziert, das die Synthese von shRNAs in Säugerzellen erlaubt. Dieser Vektor enthält einen Polymerase-III H1-RNA Promotor, der die Transkription haarnadelartiger RNA (shRNA) Moleküle ermöglicht. Nach enzymatischer Spaltung resultiert daraus ein 19-mer siRNA-Duplex (Brummelkamp et al. 2002), der durch die bekannten Mechanismen zu einer Reduktion der entsprechenden zellulären mRNA führt (Elbashir et al. 2001). Abbildung 3.13 zeigt, dass die Reduktion des endogenen Cytohesin-1 in Jurkat LT-Zellen nach Stimulation zu einer Reduktion der Promotoraktivität um über 50% führt. Entsprechend den oben dargestellten Ergebnissen hat eine Verringerung der Cytohesin-3 Menge einen Anstieg der IL-2 Promotorinduktion auf ca. 150% der Kontrollpromoteraktivität zur Folge.



**Abbildung 3.12: Cytohesin-1 und Cytohesin-3 modulieren die Aktivität des IL-2 Promotors im Reporter-gen-Versuch.** Die Überexpression von Cytohesin-1 in LT-Jurkat Zellen führt nach Stimulation der T-Zellen mit PMA/ $\alpha$ -CD3 (a) oder  $\alpha$ -CD3/CD28 (b) zu einer Verstärkung der IL-2 Promotoraktivität. Dagegen induziert die Überexpression von Cytohesin-3 eine deutliche Repression der IL-2 Promotoraktivität, unabhängig von der verwendeten T-Zell Stimulation (a, b). Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte durch die Expression des Luziferase-Reportergens. Aufgetragen sind die Luziferaseaktivitäten in RLUs relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLUs erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration. Die Expression der Flag-Fusionsproteine wurde nach SDS-PAGE und Western Blot mit einem  $\alpha$ -Flag Antikörper nachgewiesen (c).



(a) IL-2 Reporter-Gen Versuch



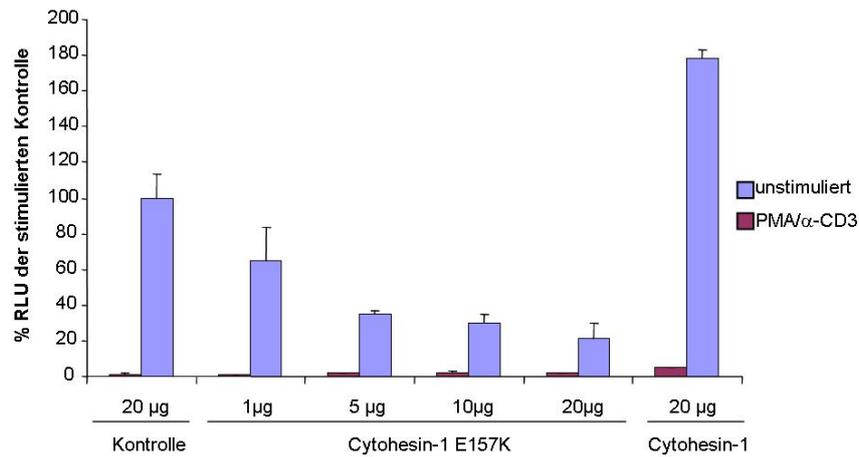
(b) Kontrolle der Cytohesin-1 und Cytohesin-3 Proteinexpression

**Abbildung 3.13: Die endogene Cytohesin-1 und Cytohesin-3 Expression beeinflusst die Induktion des IL-2 Promotors nach Stimulation.** Die Reduktion der endogenen Cytohesin-1 oder Cytohesin-3 Menge mittels siRNA Technik moduliert die Aktivität des IL-2 Promotors. Die Reduktion des endogenen Cytohesin-1 resultiert nach Stimulation in einer verringerten Aktivität des IL-2 Promotors. Dagegen bewirkt eine Reduktion des zellulären Cytohesin-3 eine verstärkte Induktion des IL-2 Promotor Elementes. Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte auch hier durch die Expression des Luziferase-Reportergens. Aufgetragen sind die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLU erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration.

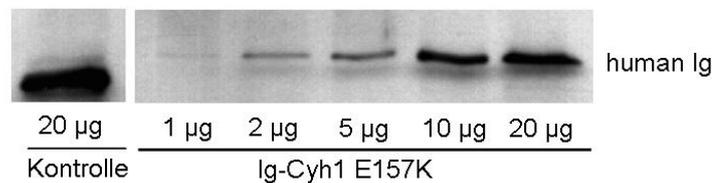
### Die GEF-Funktion von Cytohesin-1, nicht aber von Cytohesin-3 ist ein kritischer Faktor in der Aktivierung von T-Zellen

Knorr *et al.* zeigten, dass die Aminosäure Glutamin an Position 157 in der Sec-7 Domäne von Cytohesin-1 essentiell für den GDP/GTP Austausch an ARF1 und ARF6 ist (Knorr *et al.* 2000). Die Überexpression einer GEF-defekten Mutante Cytohesin-1 E157K blockiert nicht nur den GDP-GTP Austausch an ARF1 und ARF6, sondern inhibiert auch die LFA-1 vermittelte Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 dominant (Geiger *et al.* 2000). Nachfolgend wurde der Einfluss der dominant negativen Cytohesin-1 Sec-7 Mutante auf die T-Zellaktivierung mit Hilfe des IL-2 Luziferase Reportersystems getestet. Dazu wurden steigende Mengen eines Ig-Fusionsproteins von Cytohesin-1 E157K in Jurkat LT-Zellen transient exprimiert und die Zellen wie oben beschrieben mit PMA/ $\alpha$ -CD3 stimuliert. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, führt die zunehmende Menge der dominant negativen Sec-7 Cytohesin-1 Mutante in den T-Zellen zu einer abnehmenden Aktivität des IL-2 Promotors. Die Reduktion der Promotoraktivität korreliert dabei mit der zunehmenden Expression von Cytohesin-1 E157K. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die GEF Aktivität von Cytohesin-1 eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen spielt.

Wie Cytohesin-1 katalysiert auch Cytohesin-3 den Guanosin-Nukleotid Austausch an ARF1 und ARF6 (Klarlund *et al.* 1998; Langille *et al.* 1999). Daher wurde für diese Arbeit eine E161K Mutante von Cytohesin-3 generiert und deren Einfluss auf die T-Zellaktivierung in einem Reporter-Gen Versuch getestet. Da es sich bei der für die GEF Aktivität kritische Glutaminsäure um eine zwischen den verschiedenen Cytohesinen konservierte Aminosäure handelt, ist davon auszugehen, dass die hier hergestellte Mutante E161K keine GEF Aktivität an ARF1 und ARF6 vermittelt. Jurkat LT-Zellen wurden transient mit steigenden Mengen des Cyh3 E161K Plasmids transfiziert und die Induktion des IL-2 Promotors nach PMA/ $\alpha$ -CD3 Stimulation gemessen. Die zunehmende Expression der Sec-7 Mutante von Cytohesin-3 korreliert wie die transiente Expression des wild-Typ Proteins mit einem Rückgang der IL-2 Promotoraktivität (Abbildung 3.15). Der Verlust der GEF-Aktivität ist somit, anders als bei Cytohesin-1, nicht verantwortlich für den Effekt auf die Initiation des IL-2 Promotors.

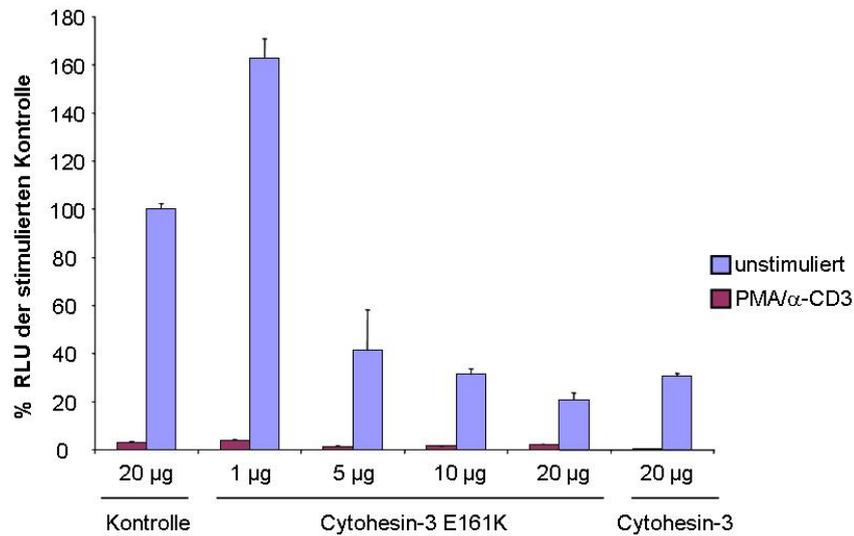


(a) IL-2 Reporter-Gen Versuch

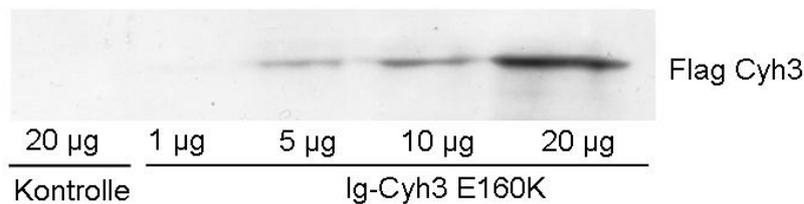


(b) Expressionskontrolle von Cytohesin-1 E157K

**Abbildung 3.14: Der Verlust der Guaninnukleotid Austauschfunktion von Cytohesin-1 inhibiert die Induktion des IL-2 Promotors.** IL-2 Reporter Gen Versuch mit LT-Jurkat Zellen (a). Die zunehmende Expression der dominant negativen Sec-7 Cytohesin-1 Mutante E157K korreliert mit einer dosisabhängigen Verringerung der IL-2 Promotoraktivität. Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte hier durch die Expression des Luziferase-Reportergens. Aufgetragen sind die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLU erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration. (b) Western Blot zur Expressionskontrolle der steigenden Proteinmengen von Cytohesin-1 E157K. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch die Immunmarkierung der an Cytohesin-1 fusionierten Immunglobulin Domäne mittels eines  $\alpha$ -Ig-Antikörpers. Das abgebildete Experiment wurde durchgeführt von A. Knorre und B. Kellersch.



(a) IL-2 Reporter-Gen Versuch

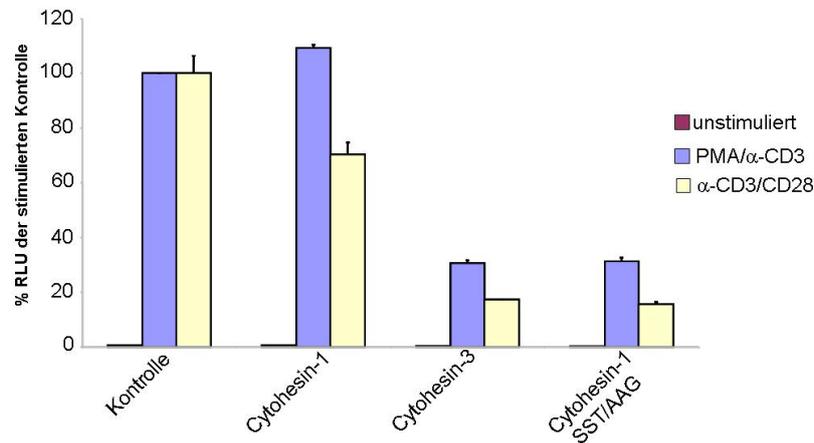


(b) Expressionskontrolle von Cytohesin-3 E161K

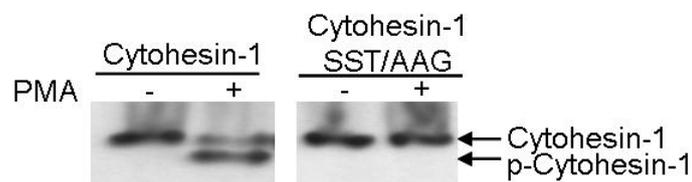
**Abbildung 3.15: Die Guaninnukleotid Austauschfunktion von Cytohesin-3 ist nicht verantwortlich für die Repression der IL-2 Promotoraktivität.** IL-2 Reporter Gen Versuch mit LT-Jurkat Zellen (a). Die zunehmende Expression der dominant negativen Sec-7 Cytohesin-3 Mutante E161K induziert, wie der wild-Typ von Cytohesin-3, eine Repression der IL-2 Promotoraktivität. Die Quantifizierung der Promotoraktivität erfolgte ebenfalls durch die Expression des Luziferase-Reportergens. Aufgetragen ist die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLUs erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration. (b) Western Blot zur Expressionskontrolle der steigenden Proteinmengen von Cytohesin-3 E161K. Der Nachweis des chimären Proteins erfolgte durch die Immunmarkierung der an Cytohesin-3 fusionierten Flag-Domäne mittels eines  $\alpha$ -Flag Antikörpers.

### Der Phosphorylierungsstatus von Cytohesin-1 ist essentiell für die Aktivierung von T-Zellen

Ein wichtiger struktureller Unterschied zwischen Cytohesin-1 und Cytohesin-3 besteht in der Anzahl der phosphorylierbaren Aminosäuren in der carboxyterminalen, polybasischen Domäne der Proteine. Während Cytohesin-3 keine phosphorylierbaren Seitenketten innerhalb des C-terminus aufweist, kann Cytohesin-1 nach PMA-Stimulation durch verschiedene PKC Isoformen an mehreren Seitenketten phosphoryliert werden. Dierks *et al.* identifizierte zunächst die Aminosäuren Serin(394) und Threonin(395), welche nach PMA-Stimulation phosphoryliert werden, später erfolgte eine weitere Eingrenzung auf die Serinen 393 und 394 innerhalb der polybasischen Region. (siehe Abbildung 1.5) (Obrusnik, unveröffentlicht). Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 kann mittels nicht-denaturierender PAGE nachgewiesen werden, in der die phosphorylierte Form als schneller migrierende Bande detektiert werden kann (siehe Abbildung 3.16, linker Blot) (Dierks et al., 2001). Durch die Substitution der Aminosäuren SST(393/394/395) gegen Alanine und Glycin wurde eine Phosphomutante von Cytohesin-1 generiert (Cytohesin-1 SST/AAG), die nach PMA Stimulation nicht phosphoryliert werden kann. Wird diese Mutante in T-Zellen exprimiert, verdrängt sie das endogene Cytohesin-1 von seinen Bindungspartnern. Dementsprechend kann in der nicht-denaturierenden PAGE nur eine unphosphorylierte Form von Cytohesin-1 detektiert werden (siehe Abbildung 3.16, rechter Blot). Der Einfluss des Phosphorylierungs-Status von Cytohesin-1 auf die Aktivität des IL-2 Promotors wurde durch die transiente Expression von Cytohesin-1 SST/AAG zusammen mit dem oben beschriebenen IL-2 Reporter gen in Jurkat LT-Zellen getestet. In Abbildung 3.16 ist erkennbar, dass der Verlust der Phosphorylierungsstellen zu einer Reprimierung der IL-2 Promotor Aktivität um ca. 60 % führt. Dieser Effekt kann sowohl nach PMA/ $\alpha$ -CD3 als auch nach  $\alpha$ -CD3/CD28 Stimulation beobachtet werden. Dabei entspricht die Stärke der Repression der, die auch durch eine Überexpression von Cytohesin-3 erzeugt werden kann.



(a) IL-2 Luziferase Versuch

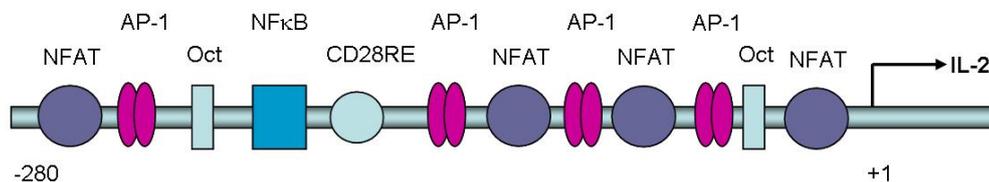


(b) Native-PAGE

**Abbildung 3.16: Phosphorylierungsstatus von Cytohesin-1 ist kritisch für die T-Zell Aktivierung.** Reporter-Gen Versuch in LT-Jurkat Zellen (a, Histogramm). Die Überexpression der Cytohesin-1 Phosphomutante Cyh1 SST/AAG reprimiert die Induktion des IL-2 Promotors nach Stimulation mit PMA/ $\alpha$ -CD3 oder  $\alpha$ -CD3/CD28. Mittels einer nativen PAGE und Western Blot (b) konnte durch die Immunmarkierung von Cytohesin-1 mit dem monoklonalen Antikörper 7H2 gezeigt werden, dass wildtyp Cytohesin-1 durch PMA Stimulation phosphoryliert wird (p-Cytohesin-1 untere Bande). Von der Cytohesin-1 Punktmutante SST/AAG kann jedoch keine phosphorylierte Form nachgewiesen werden (obere Bande).

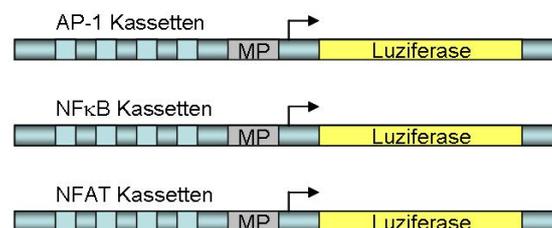
### Cytohesin-1 und -3 regulieren antagonistisch die Aktivierung der IL-2 Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1

Der IL-2 Promotor enthält viele hochkonservierte Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, sogenannte responsive Elemente. Zu den wichtigsten zählen die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF $\kappa$ B, NFAT, CD28RE und Oct (Serfling et al. 1995). In Abbildung 3.17 ist die Architektur des IL-2 Promotors mit den Bindungsstellen der oben genannten Transkriptionsfaktoren schematisch dargestellt.



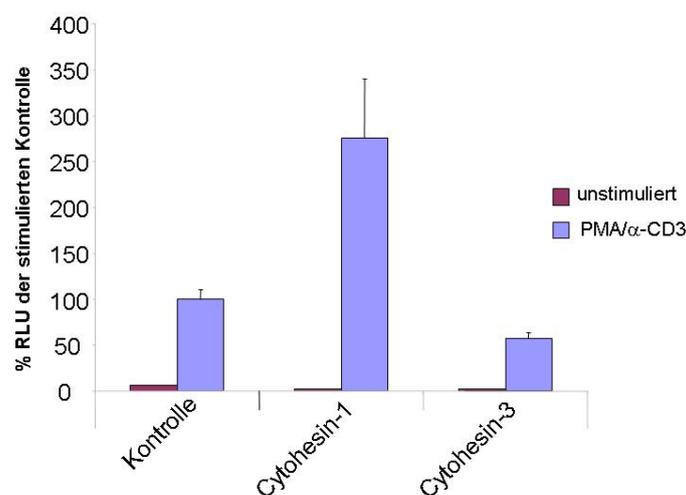
**Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des IL-2 Promotors.** Dargestellt ist die Anordnung der Transkriptionsfaktoren, die an den IL-2 Promotor binden. Abbildung verändert nach Serfling *et al.* 1995.

Um zu untersuchen, welche dieser Elemente bei der IL-2 Induktion durch Cytohesine beeinflusst werden, wurden Reporterplasmide verwendet, bei denen mehrere Kopien des NFAT, AP-1 und NF $\kappa$ B -responsiven Elements vor ein Luziferase Reporter-Gen geschaltet sind. Diese sind schematisch in Abbildung 3.18 dargestellt.



**Abbildung 3.18: Aufbau der verwendeten Reporterplasmide AP-1-Luc, NF $\kappa$ B-Luc und NFAT-Luc.** Mehrere hintereinander geschaltete Kassetten des jeweiligen responsiven Elements kontrollieren zusammen mit einem Minimalpromoter (MP) die Expression des Luziferase-Gens.

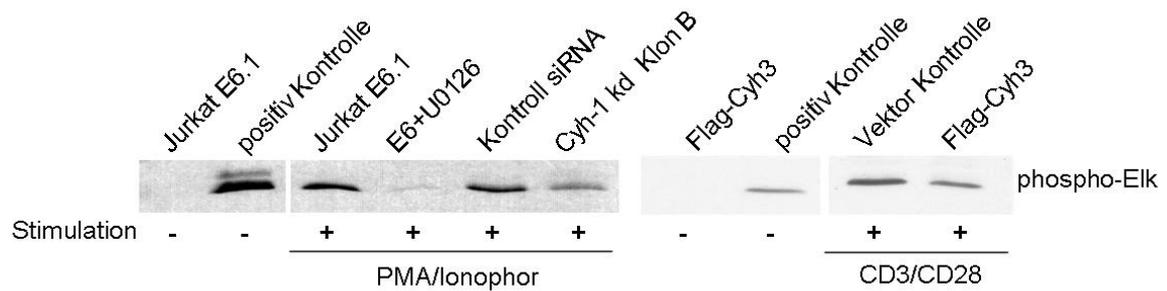
In Abbildung 3.19 ist der Einfluss von Cytohesin-1 und -3 auf die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors gezeigt. Verglichen mit der Promotoraktivität der Kontrollzellen führt die Expression des Cytohesin-1 Fusionsproteins nach Stimulation mit PMA/ $\alpha$ -CD3 zu einer ca. 2,5-fach verstärkten Induktion des AP-1 Transkriptionselements. Die transiente Expression von Cytohesin-3 verursacht dagegen eine Repression des AP-1 Elements auf ca. 50 % des Kontrollzelleniveaus.



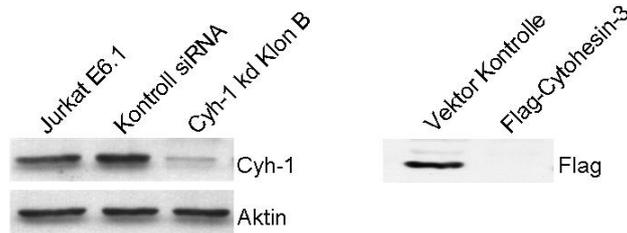
**Abbildung 3.19: Cytohesin-1 und Cytohesin-3 sind antagonistische Komponenten des AP-1 Signalweges.** Reporter-Gen Versuch in LT-Jurkat Zellen. Die Verwendung von isolierten AP-1 Promotor Kassetten in einem Reporter-Gen Versuch zeigte, dass die Überexpression von Cytohesin-1 das AP-1 Promotorelement positiv reguliert. Dagegen resultierte die Überexpression von Cytohesin-3 in einer reduzierten Aktivität der AP-1 Promotor Kasette (a). Aufgetragen ist die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLUs erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration.

Der AP-1 Transkriptionsfaktor ist ein Heterodimer, bestehend aus den Signalkomponenten c-Jun und c-fos. Diese Komponenten werden durch die Aktivität der Mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) kontrolliert. Diese Gruppe der MAP-Kinasen werden auch als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet, zu der die p44/p42 MAP-Kinase (ERK-1/2) gehört. Durch Aktivierung von ERK1/2 erfolgt die Translokation der ERK-Proteine in den Zellkern (Lenormand et al. 1993). Dort aktivieren sie Transkriptionsfaktoren wie c-jun (Pulverer et al. 1991), c-myc, c-fos, Elk-1, SAP-1 und CREB, die notwendig sind für die Induktion des AP-1 Elements (Kovary et al. 1991).

Durch die Bestimmung der ERK1/2 Aktivität wurde im Folgenden der Effekt der Cytohesine -1 und -3 auf die MAP-Kaskade untersucht. Dabei korreliert die nach Stimulation detektierte Phosphorylierung des ERK1/2 Substrates Elk1 mit der Aktivität der p44/42 MAP-Kinase. In Abbildung 3.20 ist der ERK1/2 Aktivierungs Versuch dargestellt. Elk1 liegt im unstimulierten Zustand in der nichtphosphorylierten Form vor (Spur 1), erst die Stimulation der Jurkat E6 Zellen führt zu einer detektierbaren Elk-Phosphorylierung (Spur 3, Blot a). Die Reduktion der endogenen Cytohesin-1 Proteinmenge, durch stabile Transfektion mit einem für Cytohesin-1 shRNA kodierenden Vektor, hat eine deutliche Reduktion der Elk1-Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollzellen zur Folge (vergleiche Spur 5 und 6, Blot a). Die Hemmung der MAP-Kinasen MEK1 und MEK2 durch den chemischen Inhibitor U0126 verhindert eine Elk1 Phosphorylierung nach Stimulation der T-Zellen (Spur 4). Ebenso resultiert die Überexpression eines Cytohesin-3 Fusionsproteins, verglichen mit den Kontrollzellen, in einer reduzierten Elk-Phosphorylierung (siehe Spur 9 und 10, Blot a). Diese Ergebnisse erlauben eine Positionierung von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 oberhalb der MAP-Kinase ERK-1/2 in der MAP-Kinase Kaskade.



(a) ERK1/2 Aktivierungsversuch

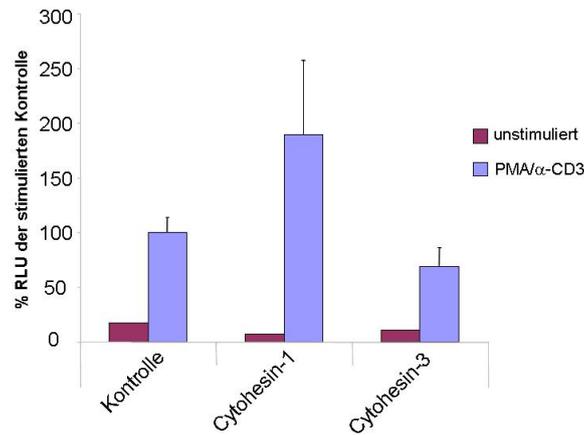


(b) Expressionskontrolle

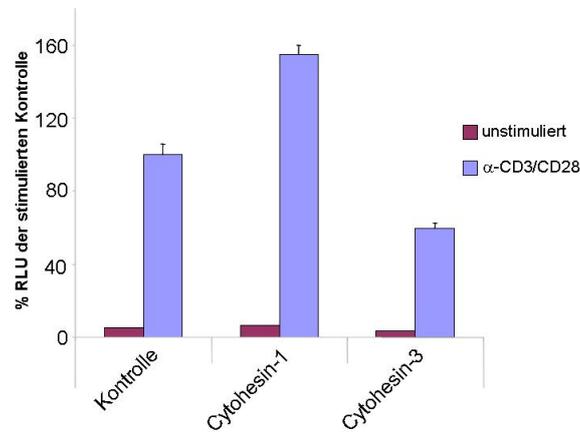
**Abbildung 3.20: Cytohesin-1 und Cytohesin-3 sind in der MAP-Kinase Kaskade oberhalb von ERK1/2 positioniert.** Durch die Detektion des phosphorylierten ERK1/2 Substrates Elk1 konnte in einem ERK1/2 Aktivierungsversuch gezeigt werden, daß sowohl Cytohesin-1 als auch Cytohesin-3 in der MAP-Kinase Kaskade oberhalb von Erk1/2 positioniert werden können (a). positiv Kontrolle: Zusatz von aktiven, bakteriell exprimierten ERK1/2 zum Präziptationsansatz. Die erfolgreiche Reduktion der endogenen Cytohesin-1 Proteinmenge durch shRNA Technologie, bzw. die Expression des Flag-Cytohesin-3 Fusionsproteins wurde durch SDS-PAGE und Western Blotting überprüft (b).

Analog zu dem oben verwendeten AP-1 Luziferase Reporter-Gen, wurde auch die Beeinflussung des NF $\kappa$ B Promotorelements durch Cytohesin-1 und Cytohesin-3 untersucht. LT Jurkat T-Zellen wurden dazu mit dem oben beschriebenen NF $\kappa$ B-Luc Reporter Gen Konstrukt sowie Plasmiden kodierend für Cytohesin-1 und -3 Fusionsproteine transfiziert (siehe Abb. 3.21).

Nach Stimulation mit PMA/ $\alpha$ -CD3 oder  $\alpha$ -CD3/CD28 zeigten die mit Cytohesin-1 transfizierten Zellen eine verstärkte Expression des Reportergens, und damit NF $\kappa$ B Promotoraktivität. Die Cytohesin-3 überexprimierenden Zellen wiesen dagegen eine verminderte Aktivität des NF $\kappa$ B-Reportergens auf. Dieser Effekt konnte ebenfalls für beide verwendeten Stimulationen beobachtet werden. Damit entspricht der Einfluss von Cytohesin-1 und -3 auf die AP-1 und NF $\kappa$ B responsiven Elemente dem, für den vollständigen IL-2 Promotor beschriebenen Effekt. Damit kann die aktivierende Wirkung von Cytohesin-1 auf den IL-2 Promotor durch eine verstärkte Induktion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B erklärt werden. Entsprechend resultiert die durch Cytohesin-3 Überexpression hervorgerufene Repression der IL-2 Promotor Initiation in einer verringerten Aktivität von AP-1 und NF $\kappa$ B.



(a) PMA/α-CD3 Stimulation

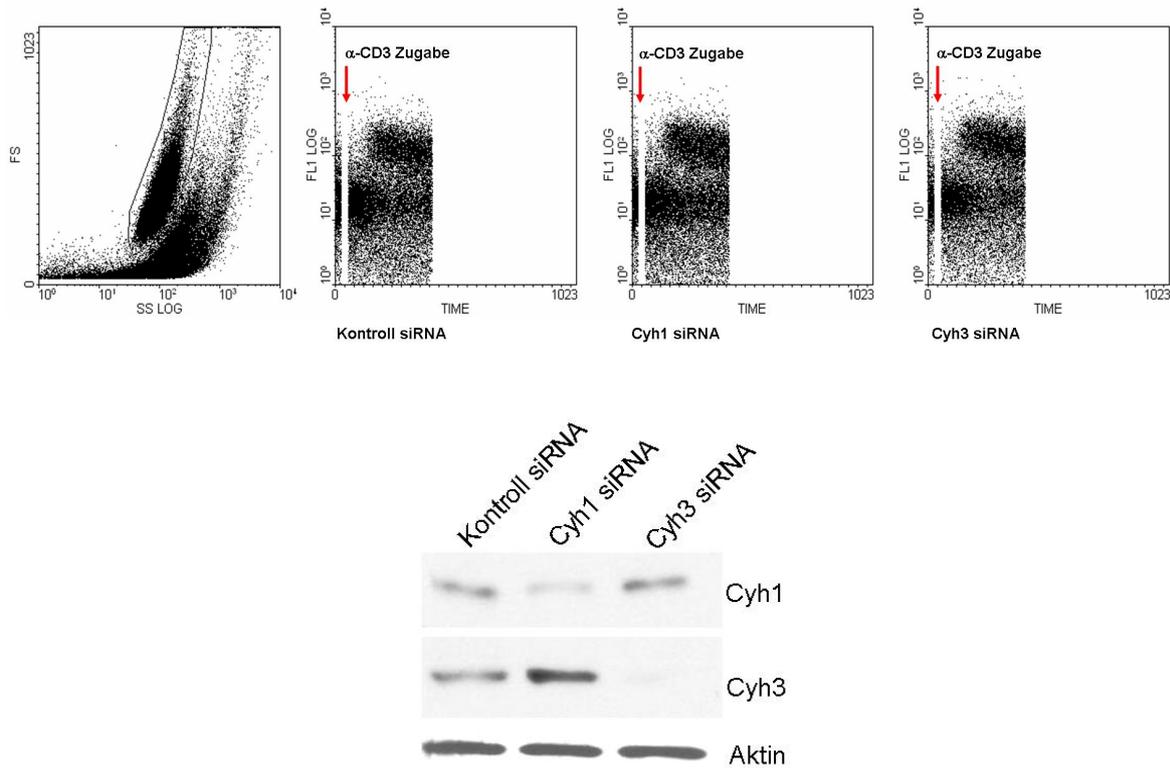


(b) α-CD3/CD28 Stimulation

**Abbildung 3.21: Die Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 Überexpression auf das  $\text{NF}\kappa\text{B}$  Promotorelement sind entgegengesetzt.** Reporter-Gen Versuch in LT-Jurkat Zellen. Nach PMA/α-CD3 Stimulation induziert die Überexpression von Cytohesin-1 eine deutlich verstärkte Promotoraktivierung. Die Überexpression von Cytohesin-3 wirkt sich dagegen reprimierend auf die Aktivität der  $\text{NF}\kappa\text{B}$  Promotorkassette aus (a). Entsprechende Beobachtungen wurden auch nach α-CD3/CD28 Stimulation gemacht (b). Aufgetragen ist die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLU erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration.

### Die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation nach T-Zellaktivierung wird durch Cytohesin-1 und Cytohesin-3 nicht beeinflusst

Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speicherkompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder das Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Plasmamembran, sind zentrale Vorgänge der durch TCR-Stimulation verursachten T-Zellaktivierung. Beide Mechanismen führen zu einer kurzzeitigen Anhebung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und letztendlich zu der Aktivierung des NFAT-Transkriptionselements (Nuclear Factor for Activated T cells). Ein möglicher Einfluss von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wurde mittels eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux Experiments untersucht. Dazu wurden Jurkat E6.1 T-Zellen mit dem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 markiert. Die durch Zugabe des  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ -quervernetzenden Antikörpers OKT3 stimulierte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration kann durchflusszytometrisch als ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in Kanal FL1 detektiert werden. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt, hat die Reduktion der endogenen Cytohesin-1 oder Cytohesin-3 Menge durch die Transfektion der Jurkat E6.1 T-Zellen mit Cytohesin-spezifischen siRNAs keinen Effekt auf die intrazellulären Kalzium Mobilisation nach Applikation des OKT3 Antikörpers. Damit bleibt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation als ein kritisches Ereignis der T-Zellaktivierung von der Expressionsmenge der Cytohesine-1 und -3 unbeeinflusst. Ein Einfluss der Cytohesine auf spätere Ereignisse des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweges, wie Calcineurin, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.



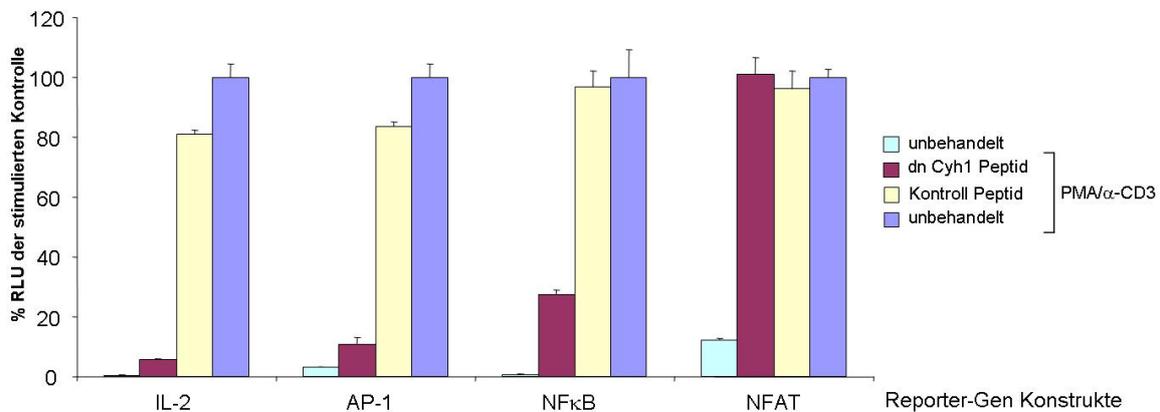
(b) Expressions Kontrolle

**Abbildung 3.22: Die untersuchten Cytohesine -1 und -3 haben keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisation in T-Zellen.** FACS-Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisation mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoffes Fluo-3. Die durch die Zugabe des  $\alpha$ -CD3 Zugabe wird die Freisetzung des intrazellulären Kalziums aus dem ER und die Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran induziert. Dies führt zu einer Anregung des Farbstoffes Fluo-3 und somit zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, dargestellt auf der Y-Achse der Histogramme. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Antikörperzugabe ist nicht von der Expression von Cytohesin-1 oder -3 beeinflusst. Gemessene und dargestellte Parameter sind die Zeit (X-Achse) und die Fluoreszenzintensität (Y-Achse) (a). Western Blot zur Expressionskontrolle der endogenen Cytohesin Proteinmengen nach siRNA Transfektion (b).

### Ein dominant negatives Cytohesin-1 Peptid blockt die T-Zellaktivierung

Perez *et al.* zeigten eine Beteiligung von Cytohesin-1 an der ICAM-2 induzierten T-Zellaktivierung (Perez *et al.* 2003). Mit Hilfe eines zellgängigen, dominant-negativen Cytohesin-1 Peptids positionierte die Gruppe Cytohesin-1 als Signalmolekül in der MAP-Kinase Kaskade. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, eine durch ICAM-2 stimulierbare T-Zellaktivierung in dem IL-2 Reporter-Gen Versuch zu reproduzieren. In Einzelfällen konnte eine ICAM-2 stimulierte Aktivierung des IL-2 Promotors detektiert werden, eine konsistente Reproduktion des von Perez *et al.* beschriebenen ICAM-2 Einflusses auf die T-Zellaktivierung konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Die Verwendung des in Perez *et al.* beschriebenen dominant-negativen Cytohesin-1 Peptids in einem Reporter-Gen Versuch bestätigte allerdings den in dieser Arbeit durch Überexpressionsexperimente beobachteten Einflusses von Cytohesin-1 auf die Aktivierung des IL-2 Promotors (siehe Kapitel 3.12). Des Weiteren konnte der in den Abbildungen 3.19, 3.21 und 3.22 gezeigte Einfluss von Cytohesin-1 auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B, nicht aber auf die NFAT Transkriptionsfaktoren bestätigt werden. Bis auf das NFAT-Reporterkonstrukt konnte für alle untersuchten Reporter-Genkonstrukte eine Inhibition der Promotoraktivität, bedingt durch eine Inkubation mit dem dominant-negativen Cytohesin-1 Peptid, beobachtet werden (siehe Abbildung 3.23). Somit kann auch eine Beteiligung von Cytohesin-1 an späten Ereignissen der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signaltransduktionskaskade die zu einer Aktivierung von NFAT führen ausgeschlossen werden.

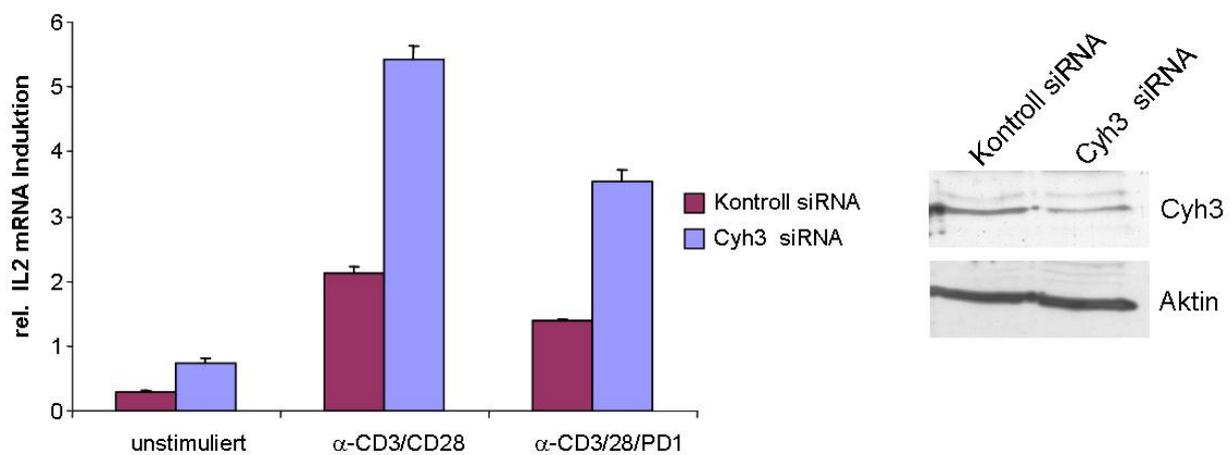


**Abbildung 3.23: Dominant-negatives Cytohesin-1 Peptid blockt T-Zellaktivierung nach PMA/ $\alpha$ -CD3 Stimulation.** Reporter-Gen Versuch in LT-Jurkat Zellen mit verschiedenen Reporter-Gen Konstrukten. Die Inkubation der Zellen mit einem dominant-negativen (dn) Cytohesin-1 Peptid führt zu einer verminderten Promotoraktivität der verwendeten IL-2, AP-1 und NF $\kappa$ B Reportergene im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Kontroll-Peptid). Die Aktivität des NFAT-Promotors ist jedoch unbeeinflusst von der Anwesenheit des dominant negativen Cytohesin-1 Peptids.

### Der “knock-down“ von Cytohesin-3 führt in primären, humanen CD4<sup>+</sup>T-Zellen nach Stimulation zu einer verstärkten IL-2 Synthese

Die mit Hilfe des Luziferase-Reportersystems gezeigten reprimierenden Effekte von Cytohesin-3 auf den IL-2 Promotor wurden bisher in der Jurkat-LT Zelllinie gezeigt. Obwohl diese Zellen für die Analyse der Signalvorgänge in T-Zellen vielfach verwendet und akzeptiert werden, gelten Versuchsergebnisse aus primären T-Zellen als noch verlässlichere Daten. Da bisher keine Cytohesin-3 “knock-out“ Maus generiert wurde und primäre T-Zellen murinen Ursprungs schwer transfizierbar sind, wurden primäre humane T-Zellen für das folgende Experiment verwendet. Humane PBLs wurden zunächst mit Cytohesin-3 spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Bei PBLs handelt es sich hauptsächlich um eine Mischpopulation von naiven T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und wenigen B-Zellen. Um eine unkontrollierte Aktivierung der T-Zellen durch die spendereigenen APCs zu vermeiden, wurde in Kolaboration mit der AG Schultze (Universitätsklinikum Köln) CD4<sup>+</sup>T-Zellen isoliert und im Folgenden weiterverwendet. Die Reinheit dieser CD4<sup>+</sup>Zellpopulation betrug ca. 95%. Diese Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit artifiziellen APCs (aAPCs) für weitere 24 Stunden stimuliert.

Bei diesen aAPC handelt es sich um magnetische “beads“ an die  $\alpha$ -CD3/CD28 bzw.  $\alpha$ -CD3/CD28/PD-1 Antikörper kovalent gekoppelt sind. Dies ermöglicht eine effiziente und fokussierte Stimulation der Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die mRNA Isolation, cDNA Synthese und eine quantitative Analyse der IL-2 mRNA Expression. Wie in Abbildung 3.24 dargestellt, führt die Stimulation der CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3/CD28 aAPCs zu einer effizienten T-Zellaktivierung, da eine deutlich verstärkte IL-2 mRNA Transkription nach Stimulation detektiert werden kann. Die Stimulation des negativ-kostimulatorischen Oberflächerezeptors PD-1 hat dagegen eine Reduktion der IL-2 mRNA Transkription zur Folge, verglichen mit den  $\alpha$ -CD3/CD28 stimulierten T-Zellen. Die Reduktion der endogenen Cytohesin-3 Menge führt, verglichen mit der Kontroll-siRNA, bei allen verwendeten Stimulationen zu einer deutlichen Induktion der IL-2 mRNA Menge. Damit ist ein negativ regulatorischer Effekt von Cytohesin-3 auf die Transkription des IL-2 Promotors in primären humanen T-Zellen gezeigt.

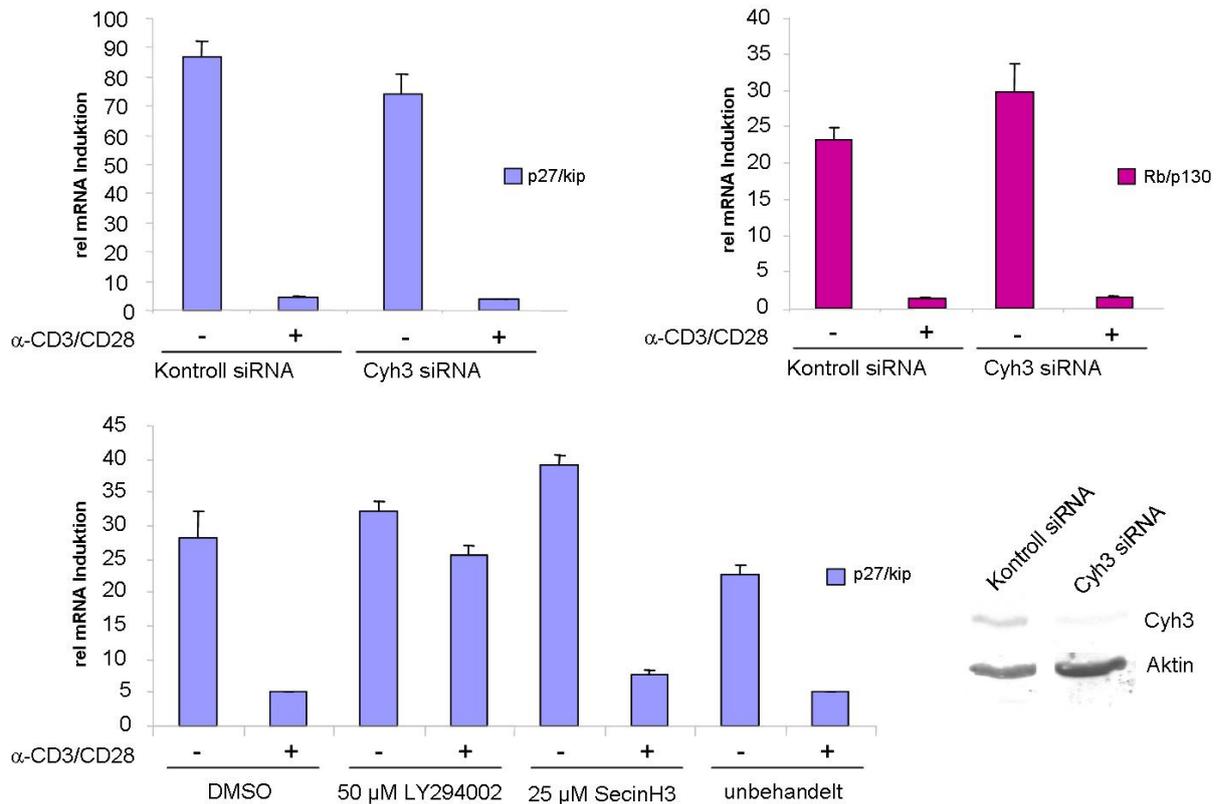


**Abbildung 3.24: Cytohesin-3 moduliert die IL-2 mRNA Transkription in primären CD4<sup>+</sup>T-Zellen.** Quantitative PCR Analyse der IL-2 mRNA Menge in primären, CD4<sup>+</sup>T-Zellen nach Cytohesin-3 “knock-down“. Die Reduktion der Cytohesin-3 mRNA Menge hat einen deutlichen Einfluss auf die Transkription der IL-2 mRNA Expression. Für alle untersuchten Stimulationen hat die Reduktion des endogenen Cytohesin-3 eine signifikante Induktion der IL-2 mRNA Menge zur Folge. Die Quantifizierung der mRNA Mengen erfolgte relativ zu den für das Referenzgen GAPDH gemessenen Ct-Werten. Der Nachweis der Cytohesin-3 Proteinreduktion nach siRNA Transfektion erfolgte anhand SDS-PAGE und Western-Blot Nachweis.

### Die Aktivität der PI3-Kinase ist durch Cytohesin-3 nicht beeinflusst

Wie schon in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, ist die Kostimulation von CD28 durch eine APC essentiell für eine vollständige T-Zellaktivierung. Die von CD28 ausgehende Signalkaskade führt unter anderem zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, deren Aktivität in einer reduzierten Transkription verschiedener Zellzyklusinhibitoren, wie p27/kip und Rb/p130, resultiert.

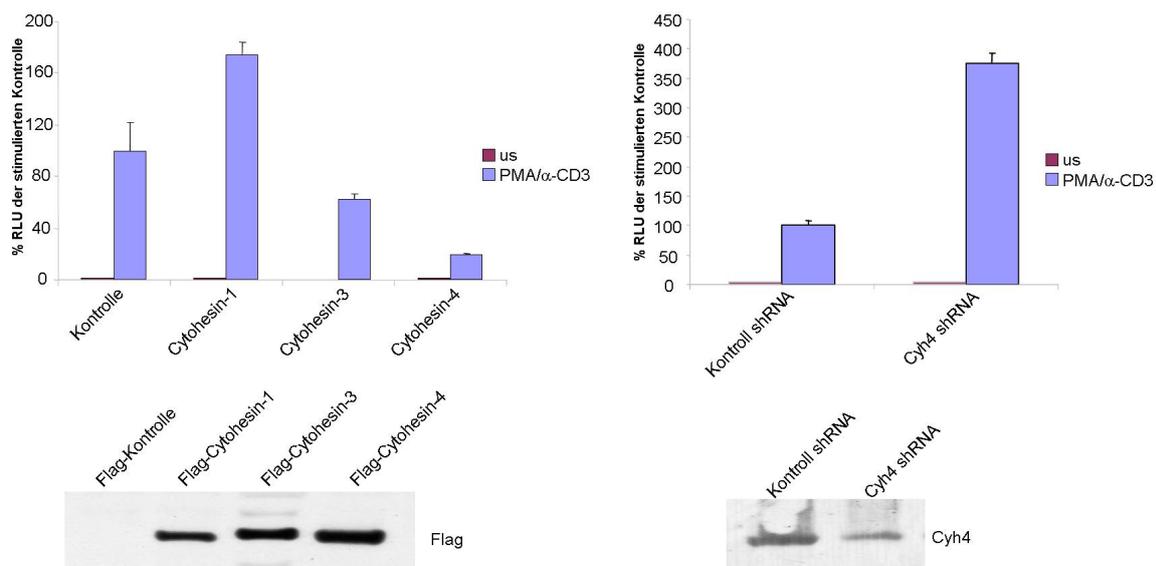
Die Beteiligung von Cytohesin-3 an dem PI3-Kinase-Signalweg soll hier durch Quantifizierung der p27/kip und Rb/p130 mRNA analysiert werden. Die mit Cytohesin-3 spezifischer siRNA transfizierten PBLs wurden für 16 Stunden mit plattengebundenen  $\alpha$ -CD3/CD28 Antikörpern stimuliert und die p27/kip und p130/Rb mRNA Menge mittels "Real-Time"-PCR quantifiziert. Es wurde festgestellt, dass die Reduktion der endogenen Cytohesin-3 Menge keinen Effekt auf die Transkription der PI3-Kinase Zielgene p27/kip und Rb/p130 hat (Abb. 3.25, obere Diagramme). Im Gegensatz dazu kann durch die Inkubation der PBLs mit einem PI3-Kinase Inhibitor eine deutlich verstärkte mRNA Transkription von p27/kip detektiert werden (Abb. 3.25, unteres Diagramm). Auch die Verwendung des Moleküls SecinH3, welches *in-vitro* die GEF-Aktivität von Cytohesin-1, -2 und -3 an ARF1 inhibiert (Hafner et al. 2006), zeigt keinen Effekt auf die Transkription der PI3-Kinase Zielgene. Somit scheint Cytohesin-3, anders als in Hepatozyten beobachtet, kein essentieller Faktor in der PI3-Kinase Signalkaskade zu sein.



**Abbildung 3.25: Die Transkription von PI3-Kinase Zielgenen p27/kip und Rb/p130 ist unabhängig von der Cytohesin-3 Expression.** Quantitative PCR Analyse der p27/kip und Rb/p130 mRNA Menge in PBL nach Cytohesin-3 "knock-down". Die Reduktion der Cytohesin-3 mRNA Menge hat keinen Einfluss auf die Transkription der PI3-Kinase Zielgene (obere Diagramme). Dagegen hat die Inkubation mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 eine Reduktion der p27/kip mRNA Transkription zur Folge (unteres Diagramm). Die Quantifizierung der mRNA Mengen erfolgte relativ zu den für das Referenzgen GAPDH gemessenen Ct-Werten. Nachweis der Cytohesin-3 Proteinreduktion nach siRNA Transfektion erfolgte anhand SDS-PAGE und Western-Blot Nachweis.

### 3.2.2 Cytohesin-4 reprimiert die T-Zell Aktivierung

Ein weiteres, bisher kaum charakterisiertes Mitglied der Cytohesin Familie ist das von Ogasawara 2000 identifizierte Cytohesin-4. *In-vitro* konnte die Gruppe eine GEF Aktivität von rekombinantem Cytohesin-4 an ARF-1 und ARF-5, nicht aber an ARF-6 nachweisen (Ogasawara et al. 2000). Aufgrund der streng hämatopoetischen Expression wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von Cytohesin-4 an der T-Zellaktivierung mit Hilfe von Reporter-Gen Versuchen untersucht. In Abbildung 3.26 ist deutlich zu erkennen, dass eine Überexpression von Cytohesin-4 zu einer starken Repression des IL-2 Reporter-Gens führt. Dabei ist der inhibierende Effekt von Cytohesin-4 deutlich stärker als der für Cytohesin-3 beobachtete und liegt im Versuchsdurchschnitt nur wenig oberhalb der Grundaktivität des IL-2 Promotors.

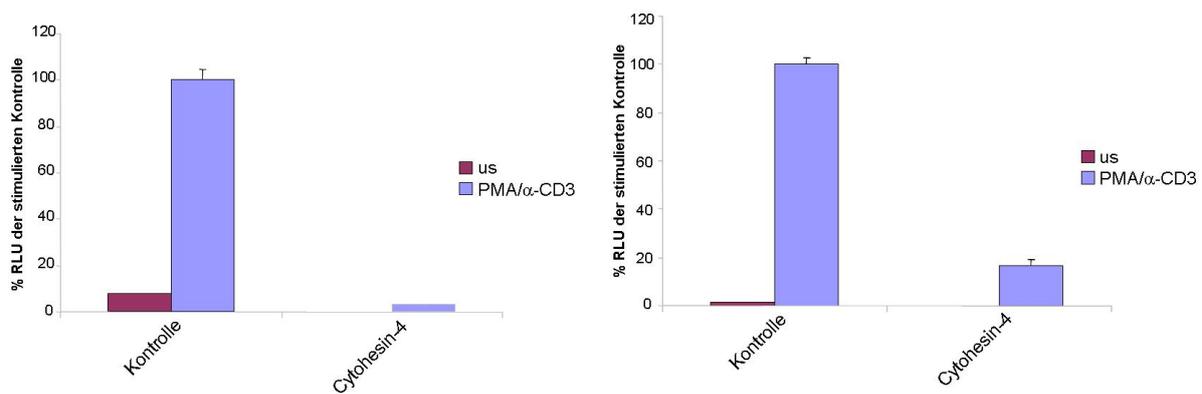


(a) Cytohesin-4 Überexpression

(b) "knock-down" des endogenen Cytohesin-4 mittels shRNA bildenden Vektors.

**Abbildung 3.26: Cytohesin-4 blockiert die Aktivierung von T-Zellen.** IL-2 Reporter-Gen Versuch in transient transfizierten Jurkat-LT Zellen. Die Überexpression von Cytohesin-4 hat nach PMA/α-CD3 Stimulation eine starke Repression der Aktivität des IL-2 Reporter Gens zu Folge. Die Reduktion der endogenen Cytohesin-4 Proteinmengen resultiert dagegen nach Stimulation in einer Induktion des IL-2 Luziferase Reporters. Aufgetragen sind die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur stimulierten Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLUs erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration.

Wie für Cytohesin-1 und Cytohesin-3 wurde auch der Effekt von Cytohesin-4 auf die einzelnen Elemente des IL-2 Promotors getestet. Die in Abschnitt 3.2.1 verwendeten AP-1 und NF $\kappa$ B-Luziferase Reporterkonstrukte wurden zusammen mit einem Cytohesin-4 Fusionsprotein transient in Jurkat LT-Zellen exprimiert und die Aktivität der einzelnen Promotorkassetten nach Stimulation anhand der Luziferase-Aktivität bestimmt. Aus Abbildung 3.27 ist zu entnehmen, dass die Überexpression von Cytohesin-4 nach der Stimulation der T-Zellen einen stark reprimierenden Effekt auf die isolierte AP-1 sowie auf die NF $\kappa$ B Kasette des IL-2 Promotors hat. Damit entspricht der Effekt von Cytohesin-4 auf das AP-1 und NF $\kappa$ B Promotor Element dem für den vollständigen IL-2 Promotor beobachteten Effekt.



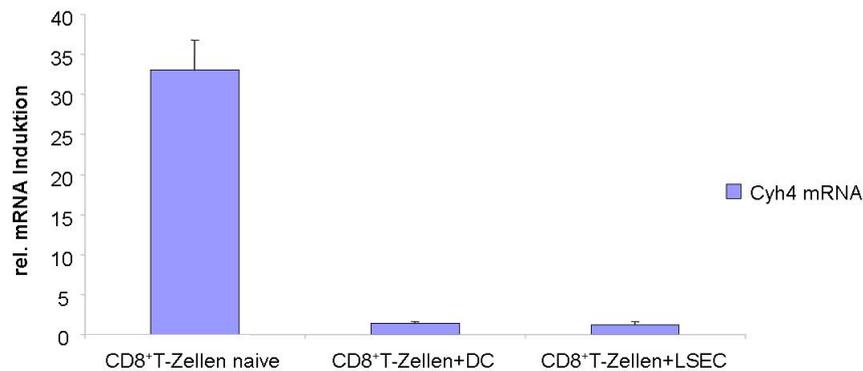
(a) AP-1 Promotor Element

(b) NF $\kappa$ B Promotor Element

**Abbildung 3.27: Cytohesin-4 blockiert die AP-1 und NF $\kappa$ B Elemente des IL-2 Promotors.** Reporter-Gen Versuch in LT-Jurkat Zellen. Die Verwendung einer isolierten AP-1 und NF $\kappa$ B Promotor Kasette in einem Reporter-Gen Versuch zeigte, dass die Überexpression von Cytohesin-4 sowohl den AP-1 als auch den NF $\kappa$ B Promotor stark reprimiert. Aufgetragen ist die Luziferaseaktivitäten in RLU relativ zur Kontrolle. Eine Normierung der gemessenen RLUs erfolgte auf die Transfektionseffizienz und Proteinkonzentration.

Da es sich bei Cytohesin-4 um einen sehr potenten Repressor des IL-2 Promotors handelt, wurde im Folgenden die Expression von Cytohesin-4 in naiven, toleranten und aktivierten murinen CD8<sup>+</sup>T-Zellen analysiert. Da zu diesem Zeitpunkt kein spezifischer Cytohesin-4 Antikörper zur Verfügung stand, wurde die mRNA Expression von Cytohesin-4 in der "Real-Time"PCR quantifiziert. Im Vergleich zu der Cytohesin-4 Expression in toleranten und aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen konnte eine ca. 30-fach stärkere Cytohesin-4 mRNA

Expression in naiven T-Zellen detektiert werden (Abb. 3.28). Dagegen unterscheiden sich die Mengen an Cytohesin-4 mRNA in aktivierten oder toleranten CD8<sup>+</sup>T-Zellen nicht signifikant voneinander. Die gezeigte inhibitorische Wirkung von Cytohesin-4 auf die Aktivierung von T-Zellen zusammen mit der auf ruhende CD8<sup>+</sup>T-Zellen beschränkte mRNA Expression, legen die Vermutung nahe, dass es sich bei Cytohesin-4 um einen starken Inhibitor der T-Zellaktivierung handelt, der naive Zellen bis zur vollständigen Stimulation in einem ruhenden Zustand hält.



**Abbildung 3.28: Cytohesin-4 ist ein Markerprotein für naive CD8<sup>+</sup>T-Zellen.** Quantitative PCR Analyse der Cytohesin-4 mRNA Transkription in ruhenden (naiven), aktivierten und toleranten CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Die mRNA Transkription in naiven CD8<sup>+</sup>T-Zellen ist um das 30-fache höher als in aktivierten oder toleranten T-Zellen. Die Normierung der gemessenen Werte erfolgte relativ zu den für das Referenzgen beta-2 Mikroglobulin gemessenen Ct-Werten.

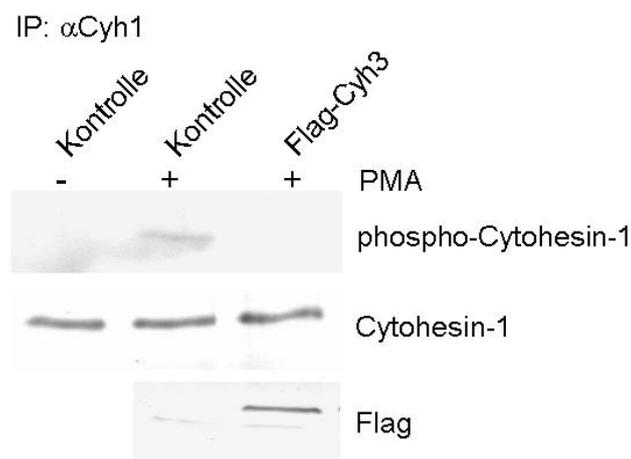
### 3.3 Mechanismen der Cytohesin-abhängigen T-Zellaktivierung

Die geringen Sequenzunterschiede zwischen den Cytohesin-1 und Cytohesin-3 lassen zunächst eine redundante Funktion dieser Familienmitglieder für die Aktivierung von T-Zellen vermuten. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen antagonistischen Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 auf die T-Zellaktivierung müssen also auf die geringen strukturellen Unterschiede der beiden homologen Proteine zurückzuführen sein. Ausgehend von dieser Hypothese wurde im Folgenden eine Kompetition von Cytohesin-1 mit Cytohesin-3 um eine Interaktion mit PKCs untersucht.

#### 3.3.1 Cytohesin-3 kompetiert mit Cytohesin-1 um eine Interaktion mit PKCs

PKCs bilden essentielle Schaltelemente in der T-Zellaktivierung, von denen die verschiedenen Äste der T-Zell Signalkaskade aktiviert werden können. K. Obrusnik konnte zeigen, dass Cytohesin-1 nach PMA-Stimulation an Serin(394/395) phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung wird von der Klasse der nPKCs katalysiert, zu denen die Isoformen  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\mu$  gehören (B.Kellersch, unveröffentlicht). Cytohesin-3 weist dagegen keine phosphorylierbaren Aminosäureseitenketten auf und kann daher durch PKCs nicht phosphoryliert werden. Ausgehend von der in dieser Arbeit nachgewiesenen zentralen Rolle der Cytohesin-1 Phosphorylierung für die Induktion des IL-2 Promotors (vergleiche Abbildung 3.16), ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung von Cytohesin-1 zu einer Aktivierung noch unbekannter Signalfaktoren führt. Die verstärkte Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen könnte daher zu einer verringerten Cytohesin-1 Phosphorylierung führen und somit eine Aktivierung von folgenden Signalfaktoren verhindern. Dieses Modell der Cytohesin-3 induzierten T-Zellreprimierung wurde anhand von Jurkat E6.1 Zellen getestet. Die Zellen wurden entweder mit einem Flag-Kontrollkonstrukt oder einem Flag-Cytohesin-3 Konstrukt transient transfiziert. Nach einer 30-minütigen PMA Stimulation erfolgte eine Präzipitation von Cytohesin-1 mit Hilfe des Ratte- $\alpha$ -Cytohesin-1 Antikörpers 7H2 an Protein-G Sepharose. Nach SDS-PAGE und Western-Blotting wurde phosphoryliertes Cytohesin-1 durch den einen phospho-spezifischen Cytohesin-1 Antikörper nachgewiesen (Spezifität charakterisiert durch K. Obrusnik, unveröffentlicht). Wie aus Abbil-

dung 3.29 hervorgeht, kann in unstimulierten Zellen keine Cytohesin-1 Phosphorylierung nachgewiesen werden (Bande 1, oberer Blot). Eine Stimulation der Zellen mit PMA führt in den Kontroll-Zellen zu einer deutlichen Cytohesin-1 Phosphorylierung (Bande2, oberer Blot). Dagegen verhindert die Überexpression von Cytohesin-3 eine Phosphorylierung von Cytohesin-1 nach PMA-Stimulation (Bande 3, oberer Blot). Eine vergleichbare Präzipitationseffizienz in den verschiedenen Proben wurde durch eine Markierung des präzipitierten Cytohesin-1 nachgewiesen (mittlerer Blot). Damit könnte die durch Cytohesin-3 vermittelte Repression des IL-2 Promotors durch eine verminderte Cytohesin-1 Phosphorylierung in anergen T-Zellen begründet sein.

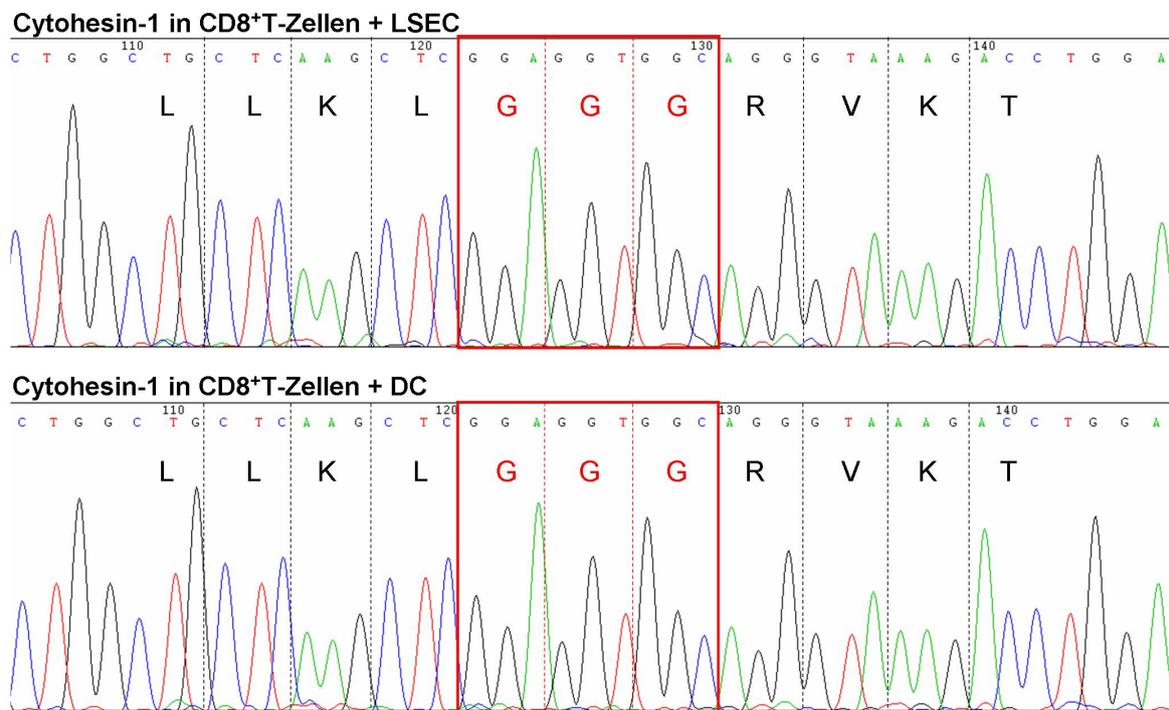


**Abbildung 3.29: Eine verstärkte Cytohesin-3 Expression reduziert die Cytohesin-1 Phosphorylierung.** Immunpräzipitation von Cytohesin-1 in transient transfizierten Jurkat E6.1 T-Zellen. Nach PMA- Stimulation und Lyse erfolgte die Präzipitation des endogenen Cytohesin-1 mit Hilfe des monoklonalen Cytohesin-1 spezifischen Antikörpers 7H2. Nach SDS-PAGE und Western Blotting wurde die Detektion des phosphorylierten Cytohesin-1 mit Hilfe eines phospho-spezifischen Cytohesin-1 Antikörpers durchgeführt. Die Überexpression von Cytohesin-3 resultiert in einer reduzierten Phosphorylierung von Cytohesin-1 (oberer Blot). Der Nachweis von unphosphoryliertem Cytohesin mit dem Antikörper 7H2 weist eine einheitliche Effizienz der Immunpräzipitation für alle Proben nach (mittlerer Blot). Mit Hilfe eines  $\alpha$ -Flag Antikörpers wurde die Expression des Cytohesin-3 Fusionsproteins nachgewiesen (unterer Blot).

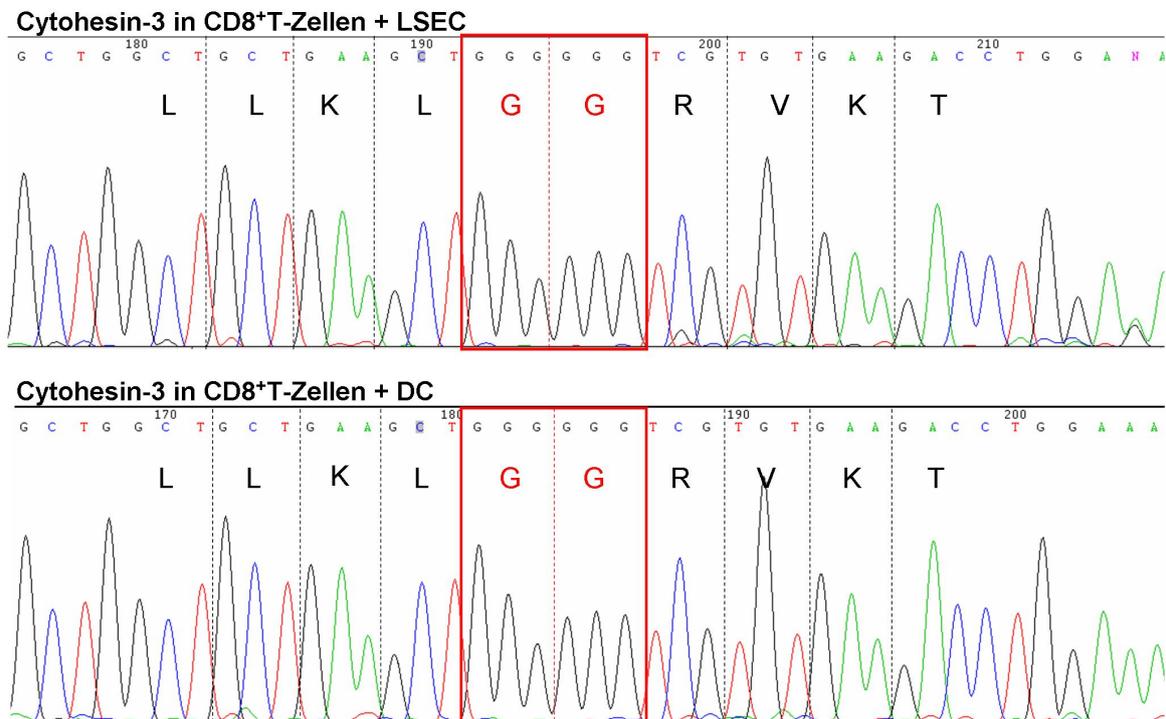
### 3.3.2 Die PIP-Bindungsaffinität vermittelt die antagonistischen Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3

Die Membranrekrutierung der Cytohesine wird durch die Bindung der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) an die Phospholipide PIP2 und PIP3 vermittelt (Nagel et al. 1998). Klarlund *et al.* zeigten, dass verschiedene Spleißvarianten innerhalb der PH-Domäne von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 existieren, die sich lediglich in der Expression eines zusätzlichen Glyzins unterscheiden (Klarlund et al. 2000). Während Cytohesin-1 hauptsächlich in der Tri-Glyzin Variante exprimiert wird, konnte von Cytohesin-3 bisher nur eine Di-Glyzin Form identifiziert werden. Die daraus resultierenden Di- bzw. Tri-glyzinmotive weisen eine deutlich unterschiedliche Affinität zu PIP2 oder PIP3 auf. Die Gruppe zeigte, dass das Di-Glyzinmotiv innerhalb der PH-Domäne von Cytohesin-3 für dessen besonders hohe Bindungsaffinitäten zu PIP3 verantwortlich ist. Da das Phospholipid PIP3 in vielen zellulären Signalprozessen als “second-messenger“ dient und erst durch Stimulation der PI3-Kinase aus PIP2 gebildet wird könnten die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Cytohesin-3 und Cytohesin-1 zu PIP3 von zentraler Bedeutung für ihre antagonistischen Effekte für die T-Zellaktivierung sein. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Expression der verschiedenen Cytohesine hinsichtlich ihrer Glyzin-Motive untersucht. Dazu wurde zunächst total-RNA aus anergen und aktivierten CD8<sup>+</sup>T-Zellen isoliert und die mRNA in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR-Reaktion wurden mit Cytohesin-1 und Cytohesin-3 spezifischen Primern ca. 200 bp Fragmente amplifiziert, die das beschriebene Di- bzw. Tri-Glyzinmotiv enthalten. Diese Fragmente wurden von der Firma MWG sequenziert.

Wie in Abbildung 3.30 und 3.31 dargestellt, wurden in allen Sequenzierungsreaktionen nur eindeutige Signale detektiert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nur eine Glyzinvariante in den untersuchten Zellpopulationen exprimiert wird. Von dem in toleranten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + LSEC) und aktivierten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + DC) CD8<sup>+</sup>T-Zellen untersuchten Cytohesin-1 konnte in beiden Fällen die Tri-Glyzinvariante nachgewiesen werden. Dagegen wurde von Cytohesin-3 in beiden Fällen ausschließlich die Di-Glyzinvariante amplifiziert. Es ist denkbar, dass diese differentielle Expression der Glyzinmotive innerhalb der PH-Domäne eine selektive Rekrutierung von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 an die Plasmamembran ermöglicht.



**Abbildung 3.30: Cytohesin-1 wird in toleranten und aktivierten T-Zellen nur in der Tri-Glyzin Version exprimiert.** Sequenzierung Cytohesin-1 spezifischer PCR Produkte aus toleranten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + LSEC) und aktivierten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + DC) T-Zellen. Wie aus der Sequenz zu entnehmen ist, liegt Cytohesin-1 in beiden untersuchten T-Zellpopulationen in der Tri-Glyzin-Variante (rot) vor.

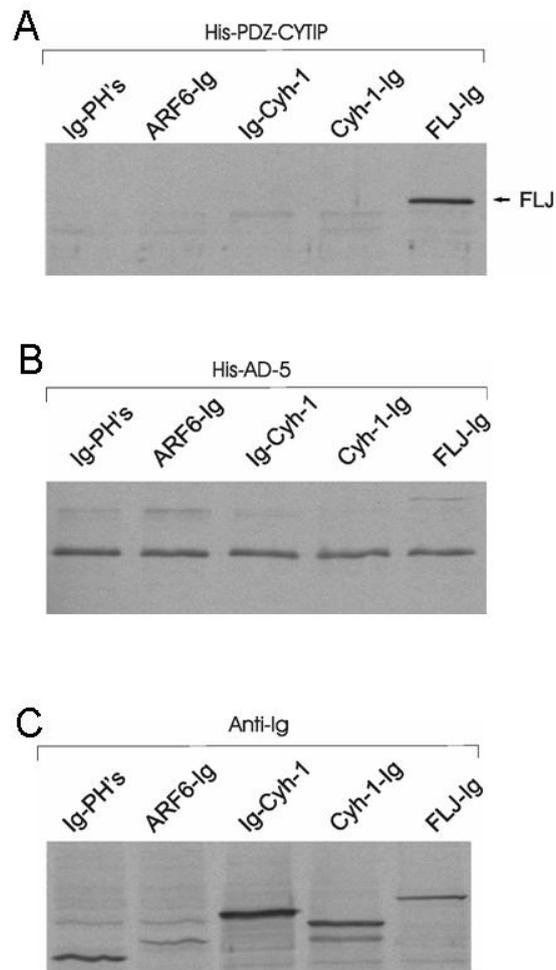


**Abbildung 3.31: Cytohesin-3 wird in toleranten und aktivierten T-Zellen nur in der Di-Glyzin Version exprimiert.** Sequenzierung Cytohesin-3 spezifischer PCR Produkte aus toleranten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + LSEC) und aktivierten (CD8<sup>+</sup>T-Zellen + DC) T-Zellen. Die Sequenzierreaktion weist in beiden analysierten T-Zellpopulationen eindeutig eine Di-Glyzinvariante von Cytohesin-3 auf (rot markiert).

### 3.4 Identifikation und Charakterisierung der mit Cytohesin-1 interagierenden mitochondrialen ATPase CYMA

Für die Suche nach neuen Interaktionspartnern des mit Cytohesin-1 interagierenden Proteins CYTIP wurden "Pull-Down" Experimente mit einer kovalent an Ni-NTA Agarose gebundenen PDZ Domäne von CYTIP durchgeführt. Lysate reifer und unreifer DCs wurden dazu mit der His-PDZ-CYTIP Agarose inkubiert und mögliche Interaktionspartner auf einem Silbergel visualisiert. Die MALDI-TOF Analyse identifizierte dabei ein ca. 70 kDa schweres Protein (Gene Bank Eintrag FLJ10709), das zu ca. 95% homolog zu dem als AAA-ATPase beschriebenen TOB3 Protein ist (C.Geiger, unveröffentlicht). Im Folgenden wird das hier identifizierte und charakterisierte Protein als CYMA (Cytohesin-1 interacting mitochondrial AAA-ATPase, CYMA) bezeichnet.

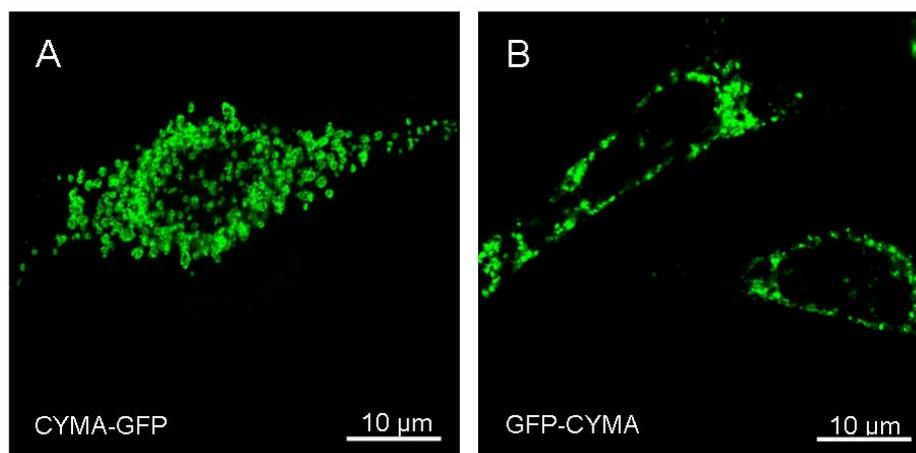
Zur weiteren Charakterisierung und Funktionsanalyse wurden im Verlauf dieser Arbeit verschiedene Fusionsproteine von CYMA hergestellt. Die gezeigte Interaktion von CYMA mit der PDZ-Domäne von CYTIP wurde mittels des oben beschriebenen "Pull-Down" Experiments bestätigt. Hierzu wurde die Bindung des in Jurkat Zellen transient exprimierten CYMA-Ig mit einer säulengebundenen CYTIP-PDZ analysiert. Die Bindung von CYMA-Ig an die His-Fusionsproteine konnte nach SDS-PAGE und anschließender Immunmarkierung der Western Blot mit einem  $\alpha$ -human Ig Antikörper nachgewiesen werden. Aus Abbildung 3.32 geht hervor, dass CYMA-Ig spezifisch mit der PDZ Domäne von CYTIP interagiert. Keine Interaktion mit der CYTIP PDZ-Domäne wurde für die verwendeten Kontrollproteine Cytohesin-1 oder ARF6 beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen die von C. Geiger gezeigte Interaktion von CYMA mit der PDZ Domäne von CYTIP.



**Abbildung 3.32: Pull-down Experiment von CYMA (FLJ) an der His-PDZ Domäne von CYTIP.** “Pull-Down“ Experiment in Jurkat E6-Zellen mit CYMA und der PDZ-Domäne von CYTIP. Die Interaktion der Proteine wurde durch SDS-PAGE Analyse der Proteinkomplexe und Immunmarkierung der Western Blots mit einem  $\alpha$ -human Ig Antikörper nachgewiesen. Eine spezifische Interaktion mit der CYTIP PDZ-Domäne kann nur für CYMA-Ig detektiert werden (Pfeil, erster Blot). Es konnten keine spezifischen Interaktionen der exprimierten Fusionsproteine mit dem viralen Kontrollprotein AD5 nachgewiesen werden (mittlerer Blot). Die Expressionskontrolle erfolgte anhand einer Immunmarkierung der Ig-Fusionsanteile der exprimierten Proteine (rechter Blot). Abgebildetes Experiment durchgeführt von C. Geiger.

### 3.4.1 Lokalisierung von CYMA

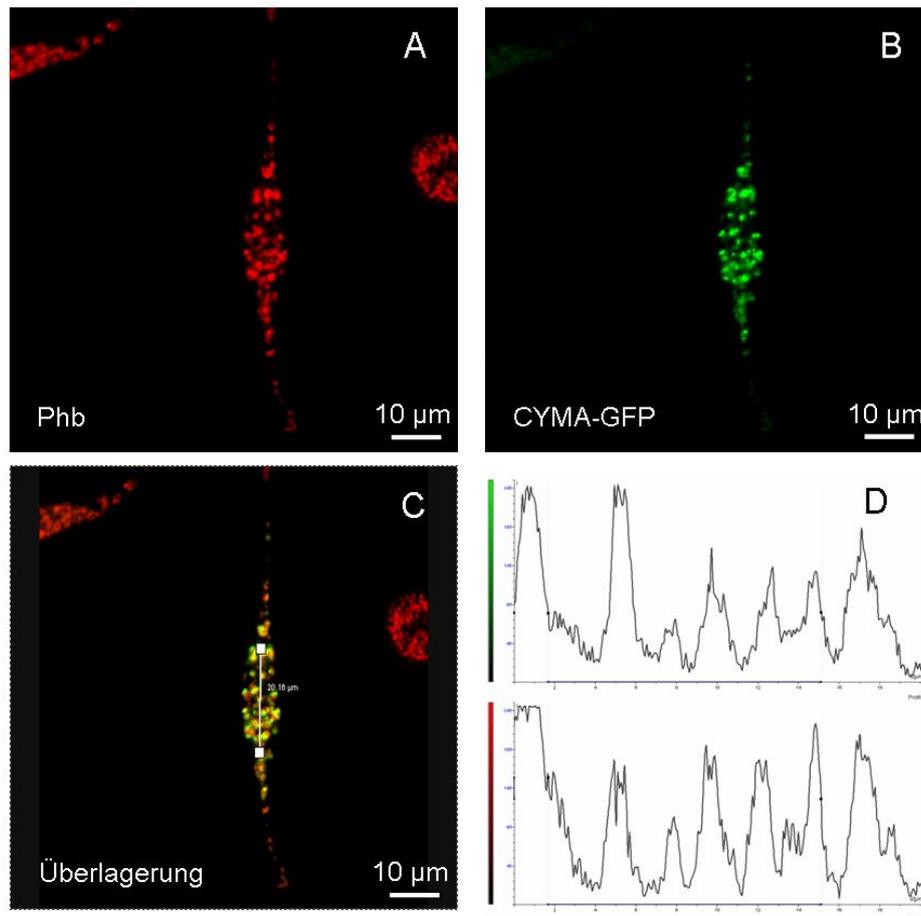
Zur Charakterisierung von CYMA wurden Lokalisationsstudien mit N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteine von CYMA durchgeführt. In Abbildung 3.33 sind die Immunfluoreszenzuntersuchung von transient exprimiertem GFP-CYMA und CYMA-GFP in HeLa-Zellen dargestellt. Zellen, die das CYMA-Fusionsprotein exprimieren weisen zahlreiche, “vesikelartige“, zytoplasmatische Strukturen von 0,3-1  $\mu\text{m}$  Durchmesser auf.



**Abbildung 3.33: Expression von GFP-CYMA und CYMA-GFP in HeLa-Zellen.** Immunfluoreszenzuntersuchungen von CYMA-GFP und GFP-CYMA exprimierenden HeLa -Zellen. Beide Fusionsproteine sind auf der Oberfläche “vesikelartiger“ Kompartimente lokalisiert.

Die Identifizierung der “vesikelartigen“ Strukturen gelang durch Kolokalisationsstudien von CYMA-GFP und kompartimentspezifischer Proteine in der Immunfluoreszenz. Aufgrund der Morphologie der CYMA-positiven Strukturen wurden lysosomale, frühe und späte endosomale Kompartimente, Golgi und post-Golgi Strukturen sowie mitochondriale Proteine hinsichtlich einer Kolokalisation mit CYMA untersucht. Es konnte eine Kolokalisation von CYMA-GFP mit dem mitochondrialen Protein Prohibitin (Phb) nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Bei Prohibitin handelt es sich um ein integrales Membranprotein der inneren mitochondrialen Membran und wurde mit einem monoklonalen Maus-Antikörper nachgewiesen. Die Überlagerung von Prohibitin (roter Kanal, A) mit CYMA-GFP (grüner Kanal, B) führt bei gleicher Lokalisation der Fluoreszenzen zu einem gelben Signal (Überlagerung, C). Auch die graphische Darstellung der Fluoreszenzprofile von CYMA-GFP und Prohibitin weist eine Kolokalisation der beiden Proteine nach (D). Eine Mislokalisierung des GFP-Fusionsproteins von CYMA konnte durch die Generierung und Charakteri-

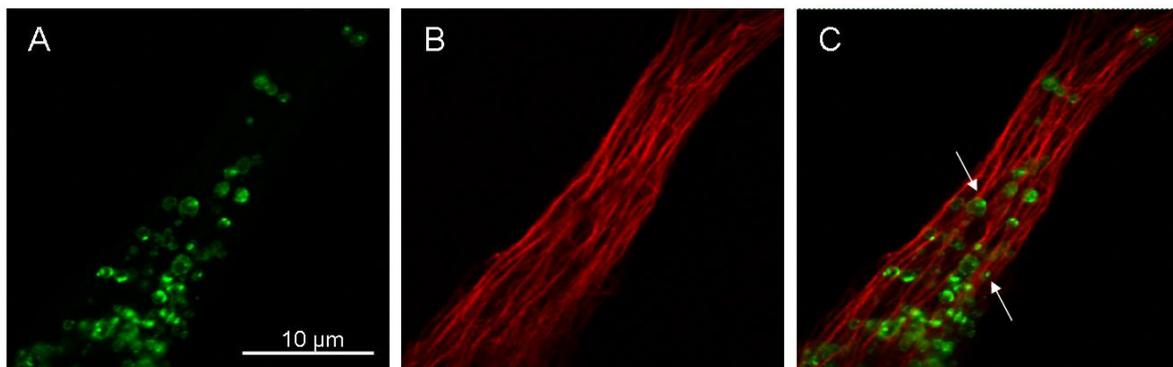
sierung eines CYMA-spezifischen Antikörpers ausgeschlossen werden. Die Untersuchung verschiedener Zelllinien zeigte immer eine mitochondriale Lokalisation von CYMA. Somit handelt es sich bei der AAA-ATPase CYMA um ein ubiquitär exprimiertes, mitochondriales Protein.



**Abbildung 3.34: CYMA kolokalisiert mit dem mitochondrialen Protein Prohibitin.** Immunmarkierung von HeLa Zellen. HeLa Zellen, transient transfiziert mit einem für CYMA-GFP kodierenden Plasmid wurden fixiert und mit einem  $\alpha$ -Prohibitin (Phb) Antikörper immunmarkiert (rot). Die Überlagerung des roten und grünen Kanals zeigt durch Bildung eines gelben Signals eine Kolokalisation von Phb und CYMA an (C). Auch die Darstellung der Fluoreszenzprofile der beiden Kanäle weist eine mitochondriale Lokalisation von CYMA nach (D).

Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, deren Bewegungen sich innerhalb der Zelle entlang des zellulären Zytoskeletts richten. In mehreren zellulären Systemen wurde eine Bewegung der Mitochondrien entlang von Mikrotubuli beobachtet (Hollenbeck et

al. 2005). Dabei scheint die Regulation und Richtung der Mitochondrienbewegung im Zusammenhang mit intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu stehen (Yi et al. 2004). Eine Immunmarkierung von Mikrotubuli in CYMA-GFP transfizierten HeLa-Zellen zeigte, dass auf der Oberfläche von Mitochondrien eine Konzentration von CYMA proximal zu den umliegenden Mikrotubuli detektierbar ist (Abb. 3.35, Pfeil). Ob diese Signalkonzentration eine physiologische Bedeutung hat, ist an dieser Stelle unklar. Eine durch die AAA-ATPase Funktion von CYMA katalysierte Fortbewegung der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli ist denkbar und könnte durch die Verwendung von WalkerA/B Mutanten in der lebend-Mikroskopie untersucht werden. Außerdem könnte so eine durch Fixierung bedingte Konzentration des CYMA Signals ausgeschlossen werden. Diese Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.



**Abbildung 3.35: CYMA ist auf der Mitochondrienoberfläche in unmittelbarer Nähe zu Mikrotubuli konzentriert.** Konfokale Immunfluoreszenzuntersuchung von Mikrotubuli (B, rot) und CYMA-GFP (A, grün) in HeLa-Zellen. In unmittelbarer Nähe zu den Mikrotubuli kann eine Konzentration von CYMA-GFP auf der Oberfläche von Mitochondrien detektiert werden (C, Pfeil).

### 3.4.2 CYMA interagiert mit der Sec-7 Domänen von Cytohesin-1 und ARNO

Der Nachweis einer Interaktion von CYMA mit CYTIP beschränkt sich auf die Verwendung des rekombinanten His-PDZ-CYTIP Proteins. Dabei handelt es sich um ein Teilfragment von CYTIP, das neben der PDZ-Domäne auch Teile der angrenzenden Coiled-coil Domäne umfasst. Eine direkte Interaktion von CYMA und dem vollständigen CYTIP konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Versuchs sollten weitere Interaktionspartner von CYMA identifiziert werden. Diese Untersuchungen wurden von C. Krings-Rocha durchgeführt. Hefe-2-Hybrid Köder-Konstrukte für den N-terminalen Bereich und den C-terminalen Abschnitt wurden erstellt und mögliche Interaktionspartner aus einer DC cDNA Bank isoliert. Als Interaktionspartner wurde unter anderem die Sec-7 Domäne von Cytohesin-1 identifiziert und die Interaktion mit verschiedenen experimentellen Ansätzen bestätigt.

Ob es sich bei der Interaktion von CYMA und der Sec-7 Domäne um eine für Cytohesin-1 spezifische Interaktion handelt oder ob es sich um eine für die Sec-7 Domänen verschiedener GEF Proteine konservierte Interaktion handelt konnte ebenfalls mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems geklärt werden. Dazu wurden folgende Sec-7 Domänen in die Hefe-2-Hybridvektoren kloniert und getestet:

| GEF-Protein | Spezies                |
|-------------|------------------------|
| Cytohesin-1 | <i>H. sapiens</i>      |
| Cytohesin-1 | <i>D. melanogaster</i> |
| Cytohesin-2 | <i>H. sapiens</i>      |
| Cytohesin-3 | <i>M. musculus</i>     |
| Gea-2       | <i>S. cerevisiae</i>   |

Die Sec-7 Domänen der oben aufgeführten Proteine wurden sowohl in den Beute-Vektor, als auch in den Köder-Vektor kloniert und in der Hefe zusammen mit dem N-terminalen CYMA-Konstrukt exprimiert. Eine Interaktion konnte durch die Blaufärbung der Hefekolonien, bedingt durch die Expression des Reportergens X-Gal, identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.36 zusammengefasst. Die Interaktion von CYMA und der Sec-7 Domäne konnte nur für humanes Cytohesin-1 und Cytohesin-2 nachgewiesen werden. Keine Interaktion konnte mit der Sec-7 Domäne von Cytohesin-3 oder *scGea2*

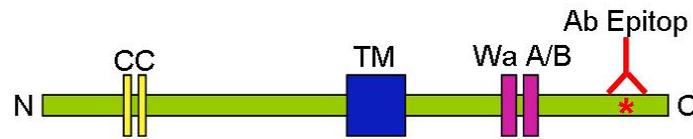
detektiert werden. Die humane und murine Sec-7 Domäne von Cytohesin-3 unterscheidet sich durch eine Aminosäure an Position 125. In der humanen Sequenz wird dort Glutaminsäure, in der murinen Sequenz Asparaginsäure exprimiert. Da es sich hierbei um eine konservative Substitution handelt scheint eine Interaktion von CYMA mit der humanen Sec-7 Domäne von Cytohesin-3 ebenfalls unwahrscheinlich. Auch die Cytohesin-1 Sec-7 Domäne aus *D. melanogaster* interagiert nicht mit CYMA, so dass hier von einer spezie-spezifischen Interaktion gesprochen werden kann.

|             | Sec7<br><i>h</i> -Cyh1 | Sec7<br><i>d</i> -Cyh1 | Sec7<br><i>h</i> -Arno | Sec7<br><i>m</i> -Cyh3 | Sec7<br><i>S. c.</i> Gea2 | CYTIP |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|-------|
| CYMA 1-273  | +                      | -                      | +                      | -                      | -                         | -     |
| Cytohesin-1 |                        |                        |                        |                        |                           | +++   |

**Abbildung 3.36: Tabellarische Darstellung des Interaktionstest von CYMA mit verschiedenen Sec7 Domänen in der Hefe.** CYMA interagiert selektiv mit den humanen Sec-7 Domänen von Cytohesin-1 und -2. Eine Interaktion von CYMA mit der PDZ-Domäne von CYTIP konnte im Hefe-2-Hybridversuch nicht nachgewiesen werden.

### 3.4.3 Topologie und Domänenstruktur von CYMA

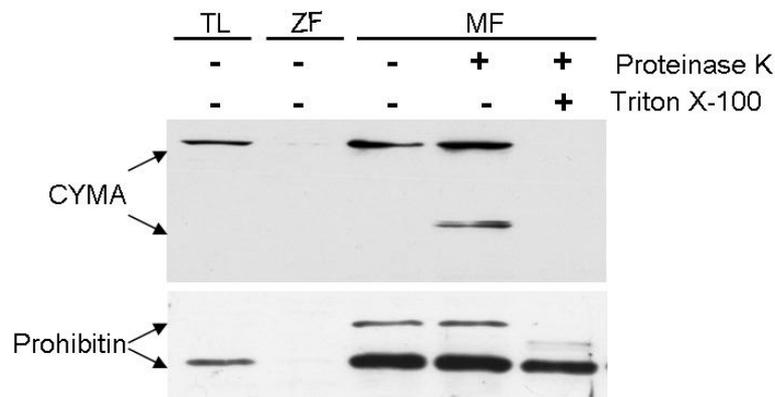
CYMA besteht aus 586 Aminosäuren und besitzt vier putative Domänen (Abb. 3.37). An dem aminoterminalen Ende von CYMA liegen zwei coiled-coil-Domänen (ermittelt mit dem Programm Paircoil, [paircoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/paircoil](http://paircoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/paircoil)), etwa in der Mitte des Proteins wird eine 16 Aminosäuren lange Transmembran-Domäne vermutet (DAS-Transmembrane Prediction Server, [www.sbc.su.se/~miklos/DAS](http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS)) und im C-terminalen Bereich ist das für die ATP-Hydrolyse verantwortliche Walker A/B-Motiv und die Antigen Bindungsstelle des CYMA-spezifischen monoklonalen Ratten Antikörpers 4D5 lokalisiert. Die zytoplasmatische Orientierung des N-Terminus von CYMA ist eine Voraussetzung für die oben beschriebene Interaktion von CYMA mit der Sec-7 Domäne von Cytohesin-1. Daher wurde die mitochondriale Topologie von CYMA anhand eines analytischen Verdau einer intakten Mitochondrien-Fraktion mit Proteinase K untersucht. Mitochondrien wurden dazu in einem nativen und intakten Zustand aus HeLa Zellen isoliert (siehe Abschnitt 2.5.6) und die aus der äußeren mitochondrialen Membran herausragenden Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgedaut. Die so behandelten Mitochondrien



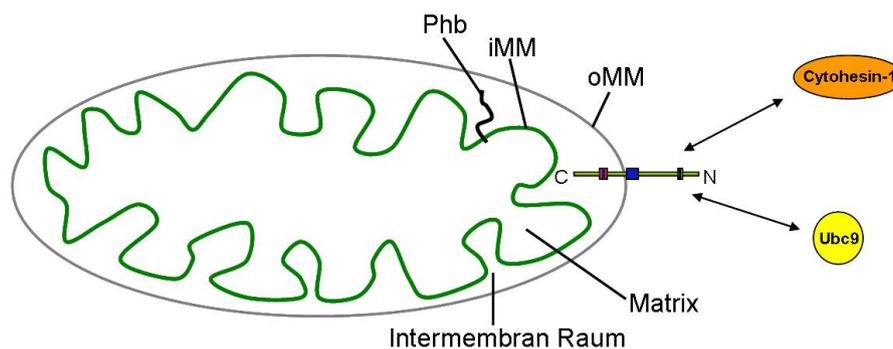
**Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der CYMA Domänenstruktur** Dargestellt sind die N-terminalen Coiled-coil Domäne (cc), die zentralen Transmembrandomäne (TM) und die C-terminalen Walker A/B Motive (Wa A/B). Ebenfalls C-terminal befindet sich die Bindungsstelle des CYMA-spezifischen monoklonalen Antikörpers 4D5.

wurden anschließend auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Detektion des endogenen CYMAs mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers können so Rückschlüsse auf die Topologie von CYMA gezogen werden. Wie in Abbildung 3.38 dargestellt, ist CYMA sowohl in dem verwendeten Totallysat und der mitochondrialen Fraktion, nicht aber in der zytoplasmatischen Fraktion nachweisbar (Spuren 1-3, oberer Blot). Dies spricht für eine streng mitochondriale Lokalisation von CYMA. Wird die mitochondriale Fraktion mit Proteinase K (PK) behandelt, so detektiert der CYMA-spezifische Antikörper ein kleineres, ca. 35 kDa schweres Fragment (Spur 4, oberer Blot). Die Größe des Fragmentes entspricht den Aminosäuren 265-586 des vollständigen C-terminalen Bereichs von CYMA bis zur Transmembrandomäne. Dieses Fragment ist nicht mehr nachweisbar in mit TritonX-100 und Proteinase K behandelten Zellen, da durch die Permeabilisierung auch der zum Intermembranraum orientierte C-Terminus des Proteins für den Proteinase K Verdau zugänglich wird (Spur 5 oberer Blot). Die Integrität der mitochondrialen Membran wurde ebenfalls durch den Nachweis von Prohibitin, einem Protein der inneren mitochondrialen Membran, bestätigt (unterer Blot).

Damit ist gezeigt, dass CYMA ein Transmembranprotein der äußeren mitochondrialen Membran ist und dass der N-Terminus von CYMA eine zytoplasmatische Orientierung aufweist. Daher ist eine direkte Interaktion von CYMA mit der Sec-7 Domäne von Cytohesin-1 und -2 möglich. Diese Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 3.39 zusammengefasst.



**Abbildung 3.38: Untersuchung zur Topologie von CYMA in Mitochondrien.** Native Mitochondrienaufreinigung und analytischer Verdau mit Proteinase K zeigen, dass CYMA ein Transmembranprotein der äußeren mitochondrialen Membran ist und dass der N-terminus von CYMA eine zytoplasmatische Orientierung aufweist (oberer Blot). Die Integrität der mitochondrialen Membranen wurde durch die Immunmarkierung von Prohibitin nachgewiesen (unterer Blot). TL: Total Lysat, ZF: zytosolische Fraktion, MF: mitochondriale Fraktion.



**Abbildung 3.39: Schematische Darstellung der Topologie von CYMA in Mitochondrien.** Während Prohibitin ein integrales Protein der inneren mitochondrialen Membran ist, ist CYMA in der äußeren Membran des Mitochondriums lokalisiert. Die Orientierung des N-Terminus von CYMA Richtung Zytosol ermöglicht die Interaktion mit den Interaktionspartnern hUbc9 und Cytohesin-1

## 4 Diskussion

### 4.1 Cytohesin-3 ist ein PD-1 reguliertes Zielgen der PI3-Kinase

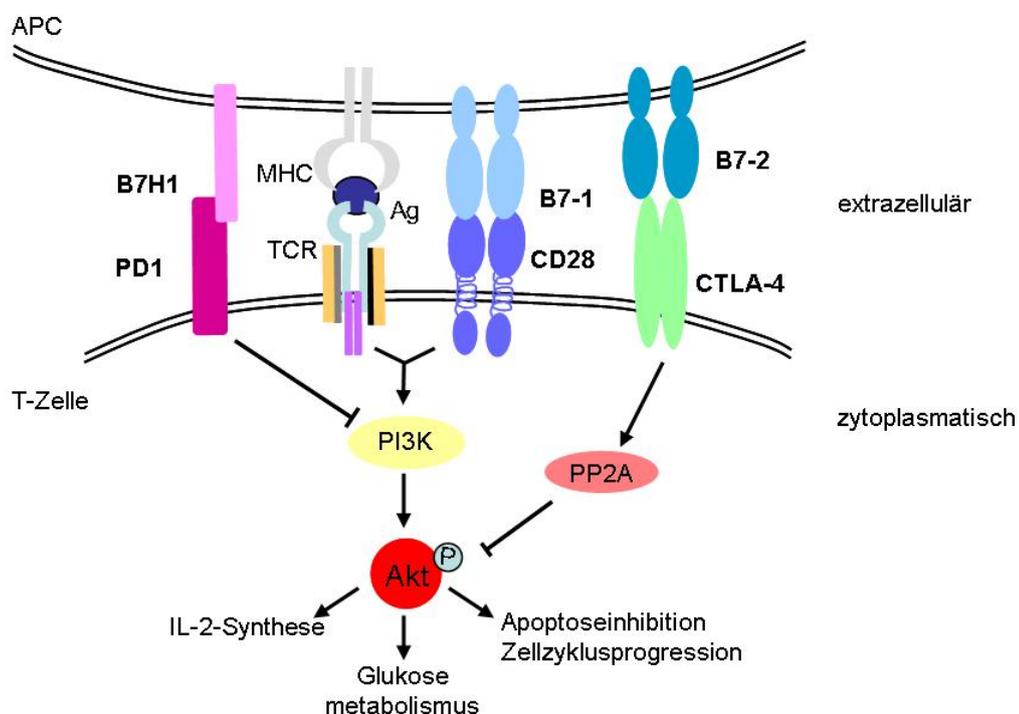
Die homologe Familie der Cytohesine ist in der Literatur überwiegend als GDP-GTP Austauschfaktoren für kleine ARFs charakterisiert, die außerdem an der Regulation der LFA-1 vermittelten Adhäsion von Lymphozyten beteiligt sind. Korthäuer *et al.* beschreiben erstmals in einem Antikörper-basierten murinen Anergie-System eine selektive Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen. Eine funktionelle Relevanz dieses Phänomens, wie einen Einfluss von Cytohesin-3 auf die IL-2 Synthese oder auf die Proliferation der T-Zellen, konnte jedoch nicht gezeigt werden (Korthäuer et al. 2000). Die Beteiligung von

Cytohesinen an Mechanismen der peripheren Toleranz wird erstmals in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Ausgehend von einem *ex-vivo* Antigen-abhängigen Toleranz-Modell konnte hier eine differentielle Expression von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in aktivierten bzw. anergen CD8<sup>+</sup>T-Zellen nachgewiesen werden. Während Cytohesin-1 in anergen und aktivierten T-Zellen in vergleichbaren Mengen detektiert wird, ist Cytohesin-3 in anergen im Vergleich zu aktivierten T-Zellen deutlich stärker exprimiert. Die hier beschriebene differentielle Cytohesin-1 und Cytohesin-3 Expression in aktivierten und anergen T-Zellen konnte auch in anderen Toleranz-Modellen beobachtet werden. In Kooperation mit der AG Schultze (Universitätsklinikum Köln) wurde durch die Kokultur von primären humanen CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>) anerge T-Zellen generiert und diese hinsichtlich ihrer Cytohesin-3 Expression untersucht. Vorläufige Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen eine durch T<sub>regs</sub> induzierte, selektive Induktion von Cytohesin-3 mRNA in den anergen CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Dieselbe Gruppe konnte auch in den T<sub>regs</sub> selbst eine verstärkte Cytohesin-3 mRNA Expression im Vergleich zu naiven T-Zellen nachweisen. Interessanterweise wurde in diesen T<sub>regs</sub>, anders als in dieser Arbeit und von Korthäuer *et al.* beschrieben, eine Reduktion der Cytohesin-1 mRNA Expression beobachtet. Da T<sub>regs</sub> nicht in der Lage sind, in Anwesenheit eines Peptid-beladenen MHC Komplexes und Kostimulation IL-2 zu synthetisieren, entspricht ihr Phänotyp dem

wichtigsten Kriterium einer anergen T-Zelle. Damit wurde in dieser Arbeit, sowie in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen eine differentielle Regulation von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen aus verschiedenen Toleranzmodellen und Spezies nachgewiesen. Daher handelt es sich bei Cytohesin-3 um ein verlässliches Markerprotein aneurer T-Zellen.

Im Weiteren wurde durch biochemische Ansätze und der Verwendung von B7-H1 defizienten Mäusen eine Kopplung der Cytohesin-3 Expression an die Stimulation von PD-1 durch seinen Liganden B7-H1 gezeigt. Die Stimulation des negativ-regulatorischen Faktors PD-1 durch B7-H1 gilt mittlerweile als ein Hauptkriterium zur Induktion von klonaler T-Zell Anergie in peripheren Geweben (Okazaki et al. 2001; Tsushima et al. 2007). Die Verwendung B7-H1 defizienter LSECs in einer CD8<sup>+</sup>T-Zellkultur zeigte deutlich, dass die Interaktion von PD-1 mit B7-H1 nicht nur für die Schaffung eines anergen T-Zellphänotyps (L. Diehl, unveröffentlicht), sondern auch für eine verstärkte Cytohesin-3 Expression essentiell ist (siehe Abbildung 3.8). Parry *et al.* zeigten, dass eine PD-1 Stimulation zusammen mit einer TCR/MHC Ligation die Aktivierung der frühen Schritte in der T-Zell-Signalkaskade unterbindet. PD-1 unterdrückt dabei direkt die Aktivität der PI3-Kinase und reprimiert so nachfolgende zentrale zelluläre Vorgänge, wie die IL-2 Synthese oder den Glukosemetabolismus von T-Zellen (siehe Abbildung 4.1) (Parry et al. 2005). In dieser Arbeit zeigte die Verwendung verschiedener PI3-Kinase Inhibitoren eine von der PI3-Kinase Aktivität abhängige Cytohesin-3 Proteinexpression in T-Zellen. Die Hemmung der PI3-Kinase löst bereits nach 24 Stunden eine deutlich verstärkte Cytohesin-3 Proteinexpression in humanen PBLs aus. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt konnte eine Akkumulation des bereits vorhandenen endogenen Cytohesin-3 Proteins nach Inhibition der PI3-Kinase durch stabilisierende Proteinmodifikationen mit dem Nachweis einer verstärkten Cytohesin-3 mRNA Induktion ausgeschlossen werden. Entsprechend dem von Parry *et al.* postulierten Modell, verhindert in dem hier verwendeten *ex-vivo* Toleranz-System die Aktivierung der PI3-Kinase durch Stimulation des positiv-kostimulatorischen Rezeptors CD28 nicht nur die Induktion eines anergen T-Zell Phänotypen (L. Diehl, unveröffentlicht), sondern unterdrückt ebenfalls die verstärkte Expression von Cytohesin-3 (siehe Abbildung 3.5). Somit ist gezeigt, dass die Cytohesin-3 Expression in T-Zellen von der PD-1 Stimulation durch B7-H1 und damit direkt von der Aktivität der PI3-Kinase abhängt. Diese Abhängigkeit der Cytohesin-3 Expression von der PI3-Kinaseaktivität erlaubt der T-Zelle eine direkte Kopplung der Cytohesin-3 Menge an das Vorhandensein negativ- oder positiv kostimula-

torischer Signale. Obwohl für B7-H1 bisher nur PD-1 als Interaktionspartner identifiziert wurde, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass durch B7-H1 neben PD-1 noch andere Oberflächenrezeptoren stimuliert werden. Durch die Verwendung von PD-1 defizienten T-Zellen oder eines PD-1-blockierenden Antikörpers könnte eine zweifelsfreie Beteiligung von PD-1 an der Cytohesin-3 Expression bewiesen werden.



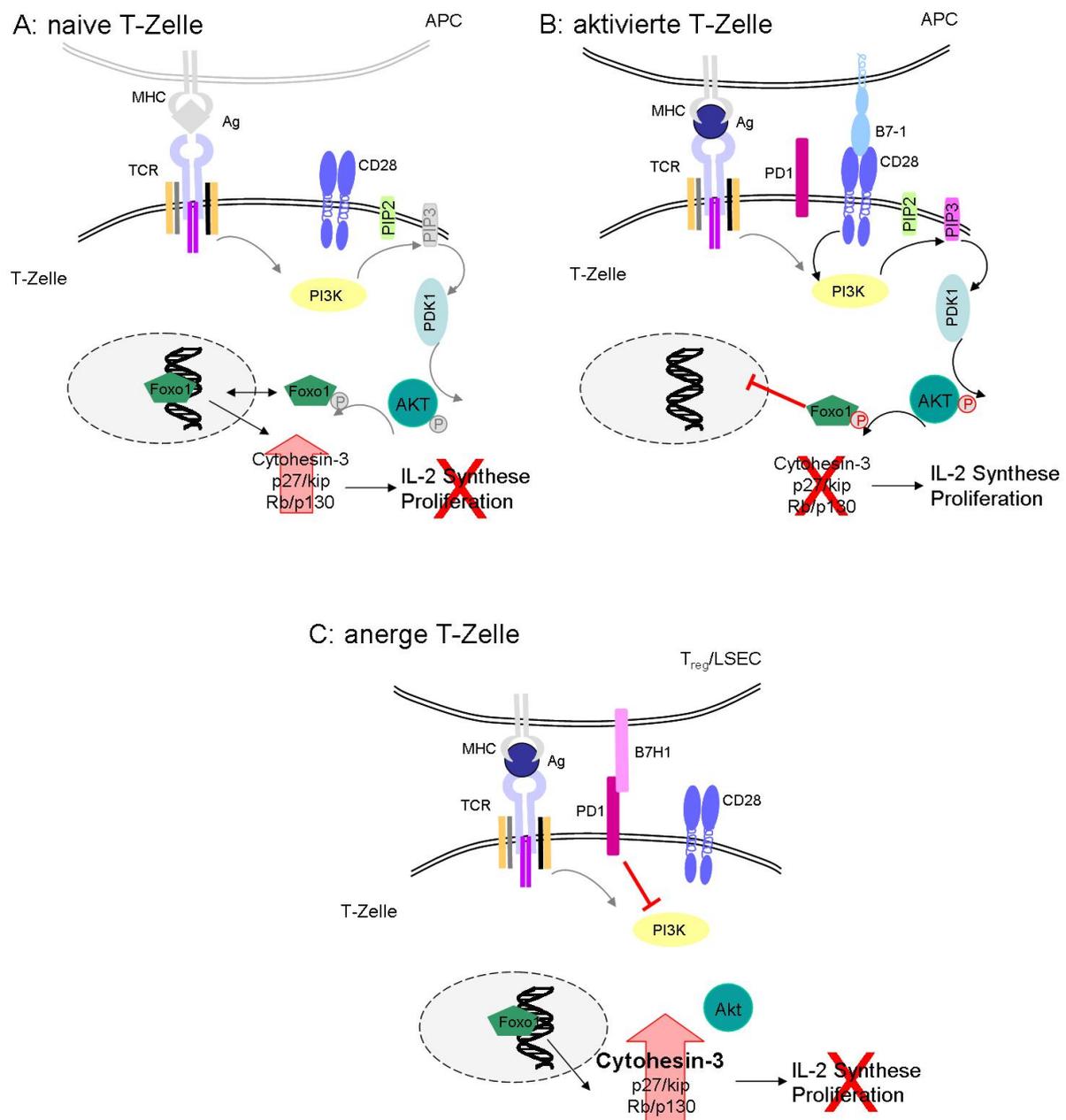
**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der durch Kostimulation beeinflussten Signalwege. TCR- und CD28-Stimulation führen zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, die ihrerseits AKT aktiviert. Die von AKT ausgehenden Signalwege betreffen sowohl die Synthese von IL-2, als auch die Stoffwechselregulation und Proliferation der T-Zellen. PD-1-Aktivierung reprimiert AKT-Phosphorylierung, indem die CD28-induzierte PI3-Kinase Aktivierung unterbunden wird. Abbildung verändert nach Parry et al. 2005.

Die Expression verschiedener negativ-regulatorischer Proteine wird über die Aktivität der PI3-Kinase direkt an das Vorhandensein eines positiv-kostimulatorischen Signals gekoppelt. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass die Abwesenheit eines positiv-kostimulatorischen Signals (z.B. CD28) bzw. die Anwesenheit negativ-kostimulatorischer Signale

(z.B. PD-1/CTLA-4) unter anderem den für die klonale Expansion von T-Zellen notwendigen Wiedereintritt in den Zellzyklus verhindert (Appleman et al. 2002; Collado et al. 2000). Einige dieser PI3-Kinase regulierten Gene werden durch die Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie kontrolliert. In ruhenden oder anergen T-Zellen liegt FoxO kernlokalisiert vor und ermöglicht so unter anderem die Transkription des Zellzyklusinhibitors p27/kip. Kommt es zu einer produktiven T-Zellaktivierung, führt die CD28 Stimulation zu einer Aktivierung der PI3-Kinase. Dies führt zu der Aktivierung der Proteinkinase AKT/PKB, die FoxO phosphoryliert, damit aus dem Kern ausschließt und so eine weitere Transkription von p27/kip verhindert. Dies ermöglicht, zusammen mit anderen Faktoren, den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus. Zu den am besten charakterisierten Forkhead-Transkriptionsfaktoren in Immunzellen zählt FoxP3. FoxP3 gilt momentan als der einzige verlässliche Marker für  $T_{\text{regs}}$ , die für eine Abschwächung der Immunantwort naiver  $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in der Peripherie essentiell sind. Der Verlust von FoxP3 führt zu schweren Autoimmunerkrankungen, bedingt durch eine Dysregulation der T-Zellaktivierung und den Verlust der T-Zell Homöostase (Hori et al. 2003; Shevach 2000). Ein weiteres Familienmitglied, FoxO-1, reguliert in nicht-haematopoetischen Zellen den Insulin-Signalweg, in Immunzellen ist FoxO-1 dagegen für die Inhibition von Proliferation und die Induktion von Apoptose verantwortlich (Medema et al. 2000; Charvet et al. 2006).

Die Expression eines FoxO-1 Fusionsproteins in PBLs führt, wie unter Abschnitt 3.1.3 dargestellt, zu einer ca. 3-fach verstärkten Cytohesin-3 Proteinexpression. Damit gehört Cytohesin-3 zu den FoxO-1 kontrollierten Zielgenen der PI3-Kinase. Ob andere Mitglieder der Forkhead-Familie ebenfalls die Transkription von Cytohesin-3 beeinflussen, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. In *D. melanogaster* wurde vor Kurzem ebenfalls eine FoxO-1 regulierte Expression des Cytohesin-3 Homologs *steppke* nachgewiesen. Außerdem konnten die Autoren FoxO-1 Konsensus-Sequenzen innerhalb der *steppke* Promotorregion nachweisen (Fuss et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Konsensussequenzen für FoxO-1 im humanen Cytohesin-3 Promotor identifiziert. Ob es sich hierbei um eine signifikante Häufung von Bindungsstellen für FoxO-1 in der Promotorregion von Cytohesin-3 handelt oder dem normalen Vorkommen dieser Bindungsmotive im humanen Genom entspricht, wurde im Laufe dieser Arbeit nicht näher untersucht. In Ab-

Abbildung 4.2 ist schematisch die in dieser Arbeit gezeigte PI3-Kinase abhängige Regulation der Cytohesin-3 Expression dargestellt. Die durch dieses Modell geforderten unterschiedlichen Cytohesin-3 Expressionsmengen in naiven, aktivierten und anergen T-Zellen wurden experimentell nachgewiesen (siehe z.B. Abbildung 3.8). Die geringste Cytohesin-3 Menge wurde, aufgrund der voll aktivierten PI3-Kinase, in aktivierten T-Zellen detektiert. In naiven T-Zellen kann, im Vergleich zu aktivierten T-Zellen, mehr Cytohesin-3 nachgewiesen werden. Dies könnte an einer schwachen TCR-Stimulation durch das Absuchen der T-Zellen nach einer APC mit passendem Peptid-MHC Komplex bedingt sein. Diese schwache TCR Stimulation könnte eine basale PI3-Kinase-Aktivität bewirken und somit eine starke Cytohesin-3 Expression verhindern. In anergen T-Zellen kommt es durch Stimulation von PD-1 mit B7-H1 zu einer Inhibition der PI3-Kinase und damit zu der stärksten Cytohesin-3 Expression in allen untersuchten Zellpopulationen.



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der PI3-Kinase abhängigen Cytohesin-3 Expression.** In naiven T-Zellen kommt es vermutlich durch das Absuchen passender Peptid/MHC Komplexe auf den APCs zu einer schwachen TCR- und damit PI3-Kinase-Stimulation (graue Pfeile). Dies hätte zur Folge, dass FoxO sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma lokalisiert und ist so nur geringe Cytohesin-3 Menge transkribiert werden können. Eine Aktivierung einer T-Zelle durch eine APC hat die vollständige PI3-Kinase Aktivierung und damit den Kernausschluss von FoxO zur Folge. Cytohesin-3 und verschiedene negativ-regulatorische Proteine werden nicht mehr exprimiert und die Zelle beginnt IL-2 zu synthetisieren und zu proliferieren. In anergen T-Zellen resultiert die Stimulation von PD-1 durch B7-H1 in einer Hemmung der PI3-Kinase. Das somit ausschließlich kernlokalisierte FoxO ermöglicht die Expression von Cytohesin-3 und verschiedener Zellzyklusinhibitoren und verhindert damit die IL-2 Synthese und die Zellteilung.

## 4.2 Cytohesin-3 ist ein zentraler, negativ regulatorischer Signalfaktor der T-Zellaktivierung

Der molekulare Mechanismus, der zu einer Blockade der T-Zellaktivierung führt und in der Induktion eines anergen T-Zellphänotypen mündet, ist weitgehend unbekannt. Intrazelluläre Signalfaktoren, die einen anergen Zustand von T-Zellen induzieren oder in der Peripherie über längere Zeiträume erhalten, sind in der Literatur nur wenig charakterisiert. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze ein reprimierender Effekt von Cytohesin-3 auf die Induktion des IL-2 Promotors und damit auf die T-Zellaktivierung festgestellt. Dieser Einfluss konnte sowohl in T-Zelllinien als auch in primären CD4<sup>+</sup>T-Zellen unter Verwendung verschiedener Stimulationen beobachtet werden (vergleiche Abbildungen 3.12 und 3.24). Zusammen mit der oben dargestellten PD-1/B7-H1 abhängigen Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen ist in dieser Arbeit das negativ-regulatorische Oberflächenmolekül PD-1 durch den intrazellulären Signalfaktor Cytohesin-3 an eine IL-2 Promotor Repression in anergen T-Zellen geknüpft. Dieses Modell zeigt somit erstmals einen möglichen Mechanismus, der in verschiedenen Zellsystemen beobachteten PD-1 abhängigen Repression von T-Zellen. Damit handelt es sich bei Cytohesin-3 nicht nur um ein Markerprotein aneurer T-Zellen, sondern um ein negativ-regulatorisches Effektormolekül, das zu einer Inhibition der IL-2 Synthese führt. Trotz aller experimenteller Hinweise kann an dieser Stelle noch nicht zweifelsfrei von einer direkten Beteiligung von Cytohesin-3 an der Induktion oder dem Erhalt von klonaler Anergie ausgegangen werden. Würde in dem hier verwendeten Toleranzmodell durch Cytohesin-3 “knock-down“ in CD8<sup>+</sup>T-Zellen die Induktion des anergen Zustands nach LSEC Kokultur verhindert werden, wäre eine essentielle Beteiligung von Cytohesin-3 an den Mechanismen der klonalen Anergie bewiesen.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Cytohesin-1 und -3 erscheint eine redundante Funktion der Cytohesine in der T-Zellaktivierung zunächst als wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit konnte aber interessanterweise gezeigt werden, dass Cytohesin-1 einen zu Cytohesin-3 entgegengesetzten, also aktivierenden, Effekt auf die Stimulierung des IL-2 Promotors hat. Antagonistische Effekte homologer Proteine sind in der Literatur für mehrere Proteinfamilien beschrieben. Die Signalmoleküle STAT1 und STAT3 haben trotz hoher Sequenzhomologie entgegengesetzte Effekte auf Apoptose und Prolife-

ration in verschiedenen Zelltypen (Stephanou et al. 2005). Auch H-Ras und N-Ras, kleine GTPasen der Ras-Superfamilie, unterscheiden sich, bis auf konservative Substitutionen, hauptsächlich in der Anzahl phosphorylierbarer Seitenketten. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die verschiedenen Ras-Isoformen unterschiedliche Spezifitäten für GEFs, GAPs sowie Zielmoleküle aufweisen und aufgrund von Proteinmodifikationen in unterschiedlichen Membrandomänen lokalisiert sind. Es gilt als wahrscheinlich, dass für diese differentiellen Effekte von H-Ras und N-Ras die Expression phosphorylierbarer Seitenketten relevant ist (Castellano et al. 2007).

Obwohl die Aminosäuresequenz von Cytohesin-3 zu 88% der von Cytohesin-1 homolog ist, scheinen geringfügige Sequenzunterschiede zwischen den Cytohesinen für die antagonistischen Effekte auf den IL-2 Promotor verantwortlich zu sein. Cytohesine unterscheiden sich in der Expression von Di- und Tri-Glyzin Motiven innerhalb der PH-Domäne voneinander. Während 80-90% von Cytohesin-1 als Tri-Glyzin Variante vorkommt, ist Cytohesin-3 zu 80% als Di-Glyzin Variante exprimiert (Klarlund et al. 2000; Ogasawara 2000). Diese Glyzinmotive determinieren die Affinität der PH-Domäne zu den Phospholipiden PIP2 und PIP3. Das Phospholipid PIP3 kommt in unstimulierten T-Zellen nur in geringen Mengen vor. Erst durch die Aktivierung der PI3-Kinase wird der "second-messenger" PIP3, ausgehend von PIP2, gebildet. Dieses Phospholipid PIP3 ermöglicht einer Reihe von essentiellen Signalmolekülen der T-Zellaktivierung, wie VAV, Itk oder AKT/PKB, über die Bindung ihrer PH-Domäne an PIP3 an die Plasmamembran zu gelangen. Erst die korrekte zelluläre Lokalisation aller Signalkomponenten ermöglicht dann letztlich eine vollständige Aktivierung der T-Zelle. Klarlund *et al.* zeigten, dass das Maus Cytohesin-3 Homolog Grp1, bedingt durch die Di-Glyzinvariante in der PH-Domäne, eine deutlich höhere Affinität zu PIP3 als zu PIP2 aufweist. Cytohesin-1 dagegen zeigt, aufgrund des Tri-Glyzin Motivs, eine wesentlich geringere Affinität zu PIP3 als Cytohesin-3 (siehe Abbildung 4.3). Interessanterweise unterscheidet sich die Affinität von Cytohesin-1 zu PIP2 und PIP3 nur geringfügig voneinander (Klarlund et al. 2000).

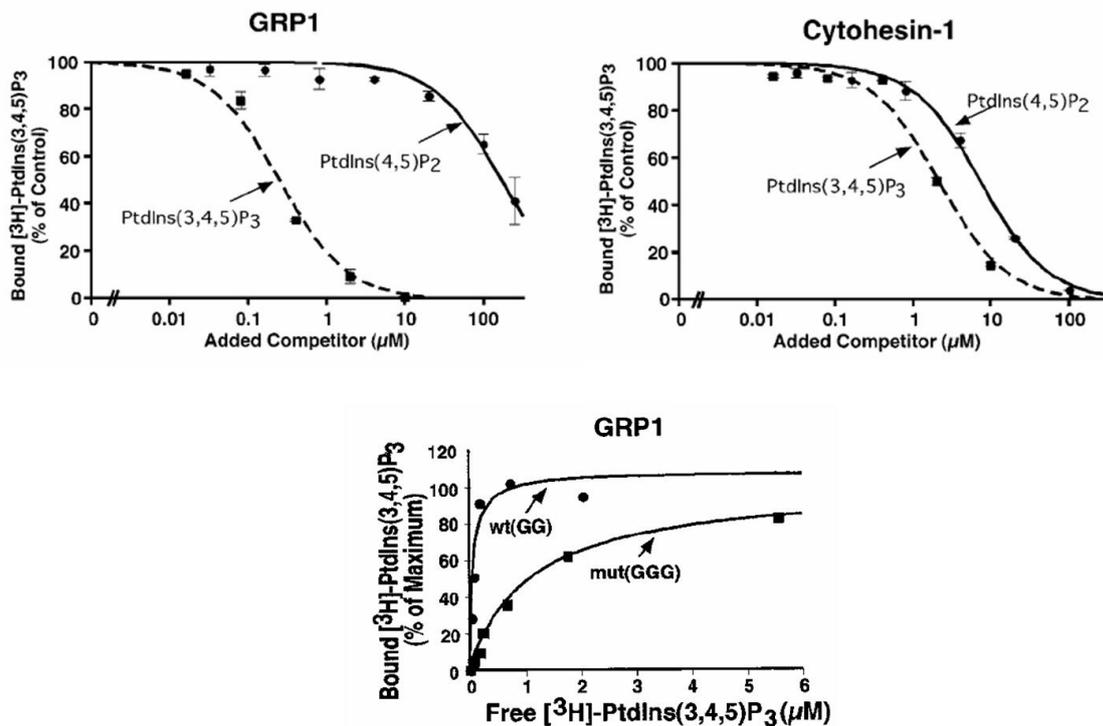


Abbildung 4.3: Glyzin-Motive innerhalb der PH-Domäne von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 determinieren deren Affinität zu PIP2 und PIP3. Das Cytohesin-3 Maus-Homolog GRP1 bindet, aufgrund eines Di-Glyzinmotivs, mit einer höheren Affinität an PIP3 als Cytohesin-1, welches in einer Tri-Glyzinvariante vorliegt. Die Insertion eines weiteren Glyzins in die PH-Domäne von GRP1 resultiert in einer verringerten Affinität zu PIP3. Abbildung aus Klarlund *et al.* 2000.

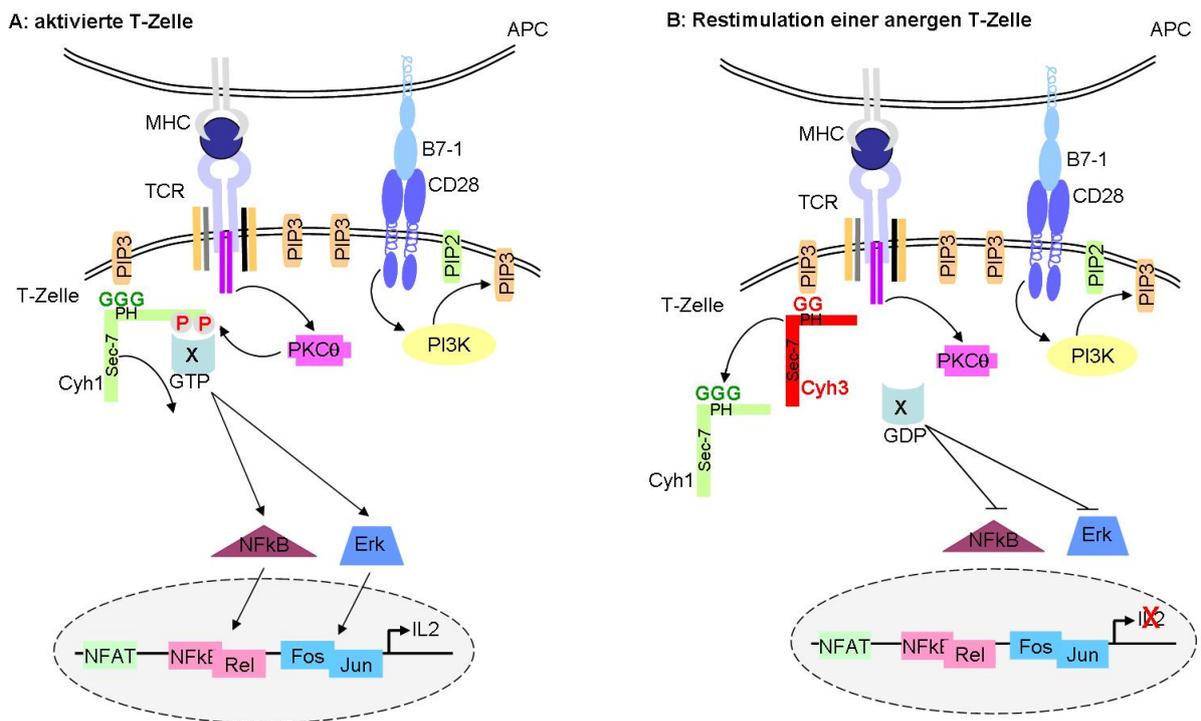
Dieser von Klarlund *et al.* entdeckte Zusammenhang der Glyzinmotive und PIP-Spezifitäten von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 wurde im Folgenden als möglicher Mechanismus für die antagonistischen Effekte der Cytohesine untersucht. In dieser Arbeit ergab die Analyse der Glyzinmotive von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in aktivierten bzw. anergen murinen CD8<sup>+</sup>T-Zellen, dass Cytohesin-1 in beiden Zellpopulationen stets in der Tri-Glyzinvariante, Cytohesin-3 dagegen ausschließlich in der Di-Glyzinvariante exprimiert wird (vergleiche Abbildungen 3.30 und 3.31). Eine Stimulus-abhängige Plasmamembranrekrutierung wurde bereits für ARNO und Cytohesin-1 nach Insulin- bzw. EGF-Stimulation beobachtet (Verkateswarlu *et al.* 1998; Verkateswarlu *et al.* 1999). Entsprechend den Ergebnissen von Klarlund *et al.* müsste damit die verstärkte Cytohesin-3 Expression in anergen T-Zellen dazu führen, dass nach Stimulation vermehrt Cytohesin-3 an die Plasmamembran rekrutiert wird. Diese selektive Membranlokalisierung von

Cytohesin-3 muss dann zu einer negativen Modulation der T-Zellsignalkaskade führen. Für den inhibitorischen Effekt von Cytohesin-3 müssen daher weitere Sequenzunterschiede zu Cytohesin-1 verantwortlich sein.

Analog zu den oben beschriebenen Unterschieden zwischen H-Ras und N-Ras, zählt die Phosphorylierbarkeit zu den offensichtlichsten Unterschieden der Cytohesine (vergleiche Abbildung 6.2, Anhang). Während Cytohesin-1 nach PMA-Stimulation von nPKCs an Serin(393/394) phosphoryliert wird, weist Cytohesin-3 an dieser Stelle die nicht-phosphorylierbaren Aminosäuren Alanin und Asparagin auf. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, hat der Phosphorylierungsstatus der Cytohesine eine essentielle Bedeutung für die Aktivität des IL-2 Promotors. Der Verlust der Phosphorylierungsstellen zusammen mit der Expression eines Di-Glyzin-Motives in der PH-Domäne von Cytohesin-1, führt zu einer starken Repression der IL-2 Promotor Induktion, die in der Stärke dem inhibitorischen Effekt von Cytohesin-3 entspricht. Damit kann durch die Mutation von SST/AAG und einer veränderten PIP3 Affinität von Cytohesin-1 der Effekt von überexprimiertem Cytohesin-3 auf den IL-2 Promotor nachgeahmt werden.

Die hier gezeigten Effekte der Glyzin-Motive und des Phosphorylierungsstatus auf die Aktivität des IL-2 Promotors legen die Vermutung nahe, dass die verstärkte Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen zu einer Konkurrenz mit Cytohesin-1 um PIP3 Bindungsstellen und schließlich zu einer Verdrängung von Cytohesin-1 von der Plasmamembran führt. Diese Konkurrenz bzw. Verdrängung kommt zum einen durch die unterschiedliche Expressionsmenge der Cytohesine in anergen T-Zellen (siehe Abbildung 3.2) und einer damit einhergehenden Gleichgewichtsverschiebung zwischen den beiden Cytohesinen zu Stande. Zum anderen führt das Di-Glyzin-Motiv von Cytohesin-3 zu einer höheren Affinität von Cytohesin-3 zu PIP3, und damit zu seiner bevorzugten Membranlokalisation. Diese Argumente erklären auch die durch eine relativ moderate Cytohesin-3 Hochregulation ausgelöste Inhibition der T-Zellaktivierung in anergen T-Zellen. Diese Hypothese könnte durch eine Visualisierung der Cytohesin-1 Verdrängung von der Plasmamembran durch Cytohesin-3 in der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Ein solcher Versuch muss, aufgrund des PTEN-Defektes der Jurkat-T-Zelllinie, in primären T-Zellen durchgeführt werden. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit verfolgt. Aufgrund der geringen Zellgröße und des gestauchten Zytoplasmas primärer T-Zellen erwies es sich als sehr schwierig eindeutige Membranlokalisationen zu detektieren. Wegen dieser

technischen Schwierigkeiten wäre ein biochemischer Ansatz für zukünftige Experimente zu bevorzugen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, hat eine Überexpression von Cytohesin-3 eine verringerte Cytohesin-1 Phosphorylierung nach PMA Stimulation zur Folge (siehe Abbildung 3.29). Diese Phosphorylierung wird durch eine Isoform der nPKCs (PKC- $\delta$ ,  $-\varepsilon$ ,  $-\eta$ ,  $-\theta$  oder  $-\mu$ ) katalysiert (B.Kellersch, unveröffentlicht). In eigenen, vorläufigen Experimenten konnte durch die Überexpression einer konstitutiv-aktiven PKC- $\theta$  in unstimulierten Jurkat E6.1 Zellen eine Phosphorylierung von Cytohesin-1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, ist die Phosphorylierung von Cytohesin-1 für eine erfolgreiche Signalweiterleitung in der T-Zelle essentiell, da ihr Verlust zu einer Inhibition der T-Zellaktivierung führt. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch nPKCs über direkte oder indirekte Mechanismen zu einer Aktivierung von weiteren Signalmolekülen führt. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der Verlust der GEF Funktion von Cytohesin-1 einen Abbruch der T-Zellsignalkaskade zur Folge hat, könnte es sich bei den durch Cytohesine beeinflussten Signalmolekülen um GTPasen handeln, deren Aktivität von GEFs wie Cytohesine reguliert wird. Beide untersuchten Cytohesine weisen eine GEF-Aktivität für ARF1 und ARF6 auf, Austauschfunktion für andere GTPasen sind bisher allerdings nicht beschrieben. Es erscheint als unwahrscheinlich, dass Cytohesin-3 den GDP/GTP Austausch an einer negativ-regulatorischen GTPase vornimmt, Cytohesin-1 dagegen an einer positiv-regulatorischen, da der Verlust der GEF-Aktivität von Cytohesin-3 nicht zu einem Verlust des inhibitorischen Cytohesin-3 Effekts führt (siehe Abbildung 3.15). Cytohesin-1 und -3 müssen sich nicht notwendigerweise in der GEF-Spezifität unterscheiden. Vielmehr könnte in anergen T-Zellen die Verdrängung von Cytohesin-1 durch das nicht-phosphorylierbare Cytohesin-3 die Rekrutierung einer GTPase verhindern, so dass es schließlich zu einem Abbruch der Signalkaskade kommt. Damit würde Cytohesin-3 in anergen T-Zellen als eine dominant-negative Cytohesin-1 "Protein-Attrappe" dienen und so eine T-Zellaktivierung inhibieren.



**Abbildung 4.4: Modell der Cytohesin-3 induzierten Hemmung der T-Zellaktivierung.**

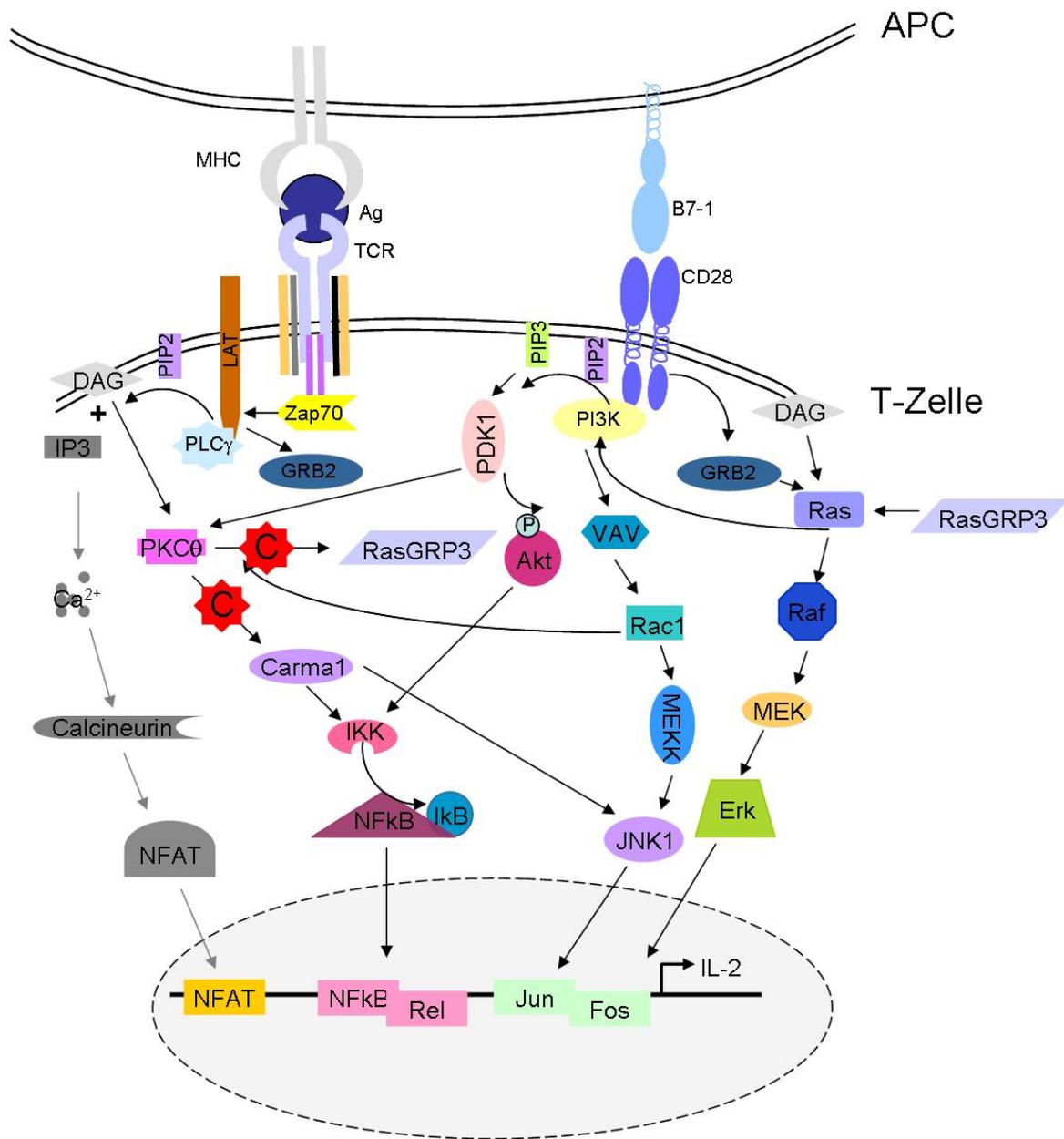
A: In aktivierten T-Zellen bindet Cytohesin-1 über ein Tri-Glyzinmotiv an die Plasmamembran und wird von der PKC- $\theta$  phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen führen zu der Rekrutierung eines unbekannten GDP-gebundenen Faktor X. Durch die GEF Aktivität von Cytohesin-1 wird der Faktor X aktiviert und kann die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B aktivieren. B: Die starke Cytohesin-3 Expression in anergen T-Zellen führt bei Restimulation zu einer bevorzugten Membranlokalisation von Cytohesin-3. Eine Phosphorylierung durch eine PKC kann nicht stattfinden, damit würde Faktor X nicht zu Cytohesin-3 rekrutiert werden und liegt weiterhin in der inaktiven GDP gebundenen Form vor. Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B werden nicht aktiviert und damit unterbleibt eine IL-2 Synthese. Bei dieser Darstellung handelt es sich um ein hypothetisches Modell.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Reporter-Gen Versuchen eine Positionierung von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in der T-Zellsignalkaskade vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden untersuchten Proteine antagonistische Effekte auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B ausüben (Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21). Außerdem konnte eine Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation durch Cytohesin-1 und Cytohesin-3 ausgeschlossen werden. Mit Hilfe eines dominant-negativen Cytohesin-1 Peptids konnte desweiteren nachgewiesen werden, dass Cytohesin-1 keinen Effekt auf den NFAT Transkriptionsfaktor hat. Diese selektiven Effekte der Cytohesine auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 sowie NF $\kappa$ B, nicht aber auf NFAT, sprechen gegen einen generellen, artifiziell-bedingten Effekt der Cytohesine auf die T-Zellaktivierung. Vielmehr spiegelt diese Signalspezifität die von verschiedenen Gruppen beschriebenen Beteiligungen der einzelnen Transkriptionsfaktoren in anergen T-Zellen wieder. T-Zell Anergie ist nicht gekennzeichnet durch eine generelle Blockade der T-Zellaktivierung, vielmehr handelt es sich um selektive Defekte in der Aktivierung einzelner Signaläste (Isakov et al. 2002). Verschiedene Studien zeigen, dass es in anergen T-Zellen zu einer stark verminderten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B kommt, während die Aktivierung von NFAT unbeeinträchtigt ist (Sundstedt et al. 1996; Kang et al. 1992).

Da zwei verschiedene Signaläste der T-Zellaktivierung durch Cytohesin-1 und -3 beeinflusst werden, erscheint eine Positionierung an einem relativ zentralen Schritt der Signalkaskade als wahrscheinlich. Die selektiv in Lymphozyten exprimierte PKC- $\theta$  ist eines der zentralsten Moleküle in der T-Zellaktivierung. Die PKC- $\theta$  führt nach CD3/CD28-Stimulation hauptsächlich zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1. Einige Arbeiten zeigen außerdem einen Zusammenhang der PKC- $\theta$  mit Calcineurin und der Ca<sup>2+</sup>- bzw. NFAT-Mobilisation (Spitaler et al. 2004; Coudronniere et al. 2000; Dienz et al. 2000). PKC- $\theta$ -defiziente T-Zellen weisen eine reduzierte Aktivität des IL-2 Promotors und eine verringerte Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors auf. Dies geht einher mit einer verringerten Proliferation und einer verstärkten Anergie-Induktion in diesen T-Zellen (Berg-Brown et al. 2004). Aufgrund dieser vielfältigen Beteiligung der PKC- $\theta$  an verschiedenen Ästen der T-Zell Signalkaskade und einer möglichen Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch die PKC- $\theta$  ist es denkbar, dass Cytohesin-1 als ein Zielmolekül der PKC- $\theta$  an den AP-1 und NF $\kappa$ B Signalwegen beteiligt ist. Es wurden bisher verschiedene,

durch die PKC- $\theta$  kontrollierte Signalfaktoren, mit einem direkten oder indirekten Einfluss auf die AP-1 und NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren, beschrieben. Das selektiv in Lymphozyten exprimierte CARD-Protein CARMA1 führt nach seiner Phosphorylierung durch die PKC- $\theta$  zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B und der JUN N-terminalen Kinase (JNK). JNK stellt, zusammen mit ERK1/2, die beiden für die Bildung des AP-1 Transkriptionsfaktors wichtigen Signaläste dar (Rawlings et al. 2006). Ein weiteres, sowohl NF $\kappa$ B als auch AP-1 betreffendes Signalmolekül, ist RasGRP3. RasGRP3 ist ein GDP/GTP Austauschfaktor für Ras und wird sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* durch die PKC- $\theta$  aktiviert. Es moduliert direkt den AP-1 Signalweg über seine Interaktion mit Ras und ist über die Aktivierung der PI3-Kinase durch Ras indirekt mit dem NF $\kappa$ B-Ast verbunden (Lorenzo et al. 2000; Teixeira et al. 2003). Lui *et al.* konnten zeigen, dass die PKC- $\theta$  das Adapterprotein Cbl phosphorylieren und damit aktivieren kann (Liu et al. 1999). Neben der Rolle von Cbl als E3 Ubiquitin-Ligase dient es einer Reihe von verschiedenen Signalmolekülen, wie Grb2, p85, VAV und Rap als Adapterprotein (Liu et al. 1998). Dies führt zu der Aktivierung der ERK/JNK Signalwege sowie zu der Aktivierung der PI3-Kinase. Der über die PI3-Kinase laufende Rückkopplungsmechanismus an die PKC- $\theta$  könnte somit wieder die NF $\kappa$ B Aktivierung hervorrufen.

Eine Positionierung von Cytohesin-1 bzw. -3 in der Nähe der PKC- $\theta$  abhängigen Signalmoleküle könnte durch Analyse des Phosphorylierungsstatus von CARMA1, RasGRP3 oder Cbl nach Cytohesin “knock-down“ erfolgen. Mögliche Positionierungen von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in der T-Zellsignalkaskade sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.



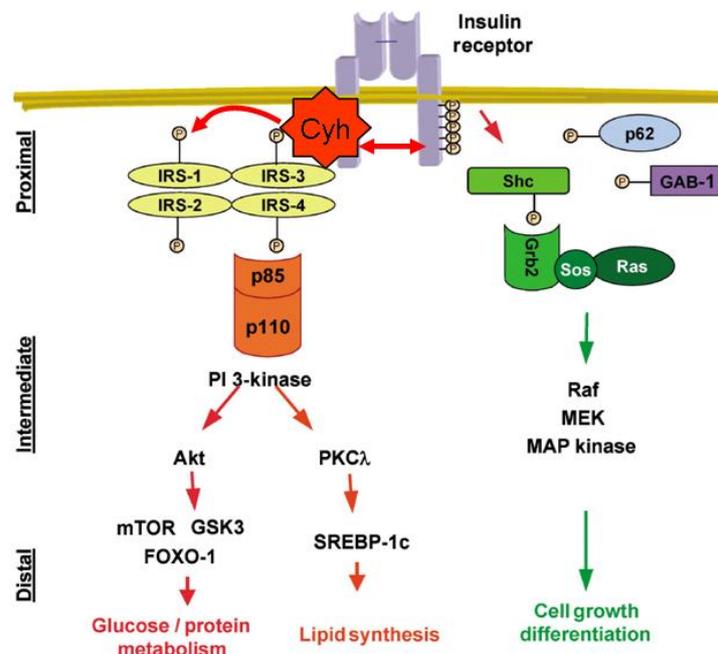
**Abbildung 4.5: Mögliche Positionierung von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in der T-Zellsignalkaskade.** Schematische Darstellung der T-Zellsignalkaskade. Neben den wichtigsten Signalästen sind hier auch die bekanntesten Querverbindungen zwischen den Signalwegen dargestellt. Aufgrund der Signalmodulation des AP-1 und NFκB-Astes ist eine Positionierung von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-3 unterhalb der PKC-θ denkbar. Cytohesin-1 und -3 sind als rote Sterne dargestellt. Die Abbildung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und stellt nur die bekanntesten Signalwege dar.

### 4.3 Funktion von Cytohesin-3 Funktion in nicht-T-Zellen

Kürzlich konnten von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen Cytohesine als essentielle Komponenten des Insulinsignalweges identifiziert werden. Fuss *et al.* generierten von dem einzigen in *D. melanogaster* exprimierten Cytohesin-Homolog *steppke* eine transgene Fliegenlinie, die einen drastischen Größenphänotyp aufweist. Diese transheterozygote *steppke* Mutante ist gekennzeichnet durch eine signifikant verringerte Größe und ein reduziertes Gewicht der Fliegen in allen Entwicklungsstadien (Fuss et al. 2006). Dieser Größenphänotyp wurde ebenfalls in Fliegen, denen das Insulinrezeptorsubstrat *chico* fehlt, und die damit einen defekten Insulinsignalweg aufweisen, beobachtet. Die Identifikation und Verwendung des pan-Cytohesin spezifischen Sec-7 Inhibitors SecinH3 ermöglichte ebenfalls eine Assoziation von Cytohesin-2 und Cytohesin-3 mit dem humanen Insulinsignalweg (Hafner et al. 2006). Die Fütterung von SecinH3 an Mäuse führte zu der Entwicklung einer hepatischen Insulin-Resistenz, Symptomen die dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus TypII entsprechen. Beide Gruppen zeigten, dass die Transkription Insulin-abhängiger Gene durch Cytohesine reguliert werden. Cytohesine sind notwendig für die Bindung von dem Insulin-Rezeptor Substrat (IRS) an den bereits autophosphorylierten Insulinrezeptor (IR). Diese Bindung führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, gefolgt von einer AKT/PKB kontrollierten Hemmung glukoneogener Gene (schematische Darstellung des Insulinrezeptorsignalweges mit einer möglichen Cytohesin-Beteiligung siehe Abbildung 4.6). Die durch die PI3-Kinase ausgelöste PIP3-Synthese führt zu einer verstärkten Membranrekrutierung weiterer Cytohesin-Moleküle und damit zu einer erhöhten Insulinsensitivität. Sowohl in humanen Hepatozyten als auch in *D. melanogaster* gelang somit die Identifikation von Cytohesinen als essentielle Signalkomponente des Insulinsignalweges.

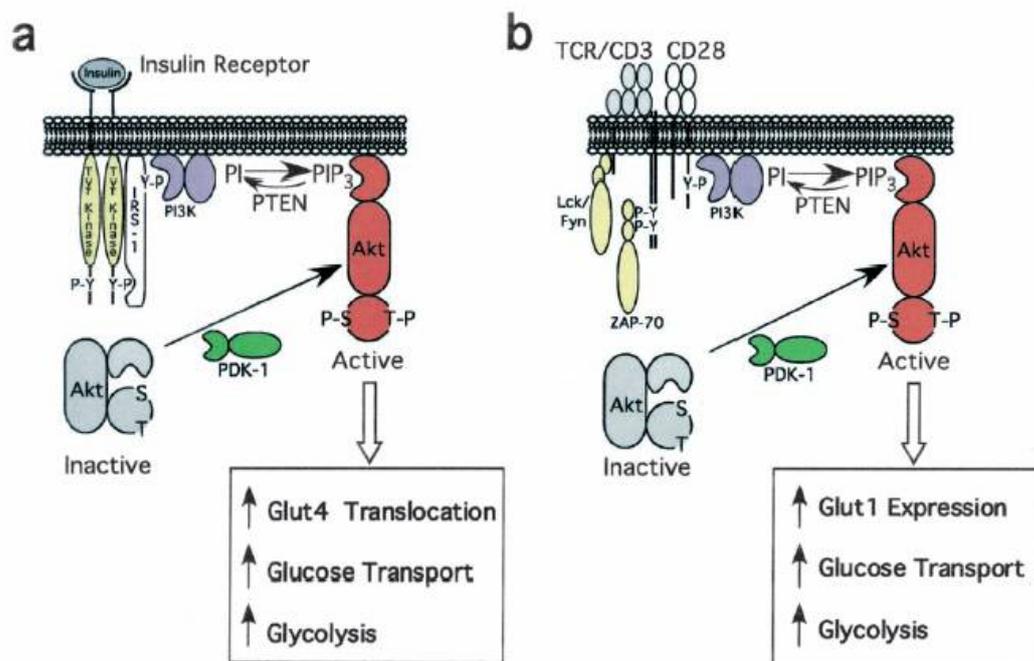
Die Beteiligung von Cytohesin-3 an den PI3-Kinase kontrollierten Signalwegen wurde in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener experimenteller Ansätze untersucht. Die Transkription der PI3-Kinase abhängigen Zielgene p27/kip oder Rb/p130 in PBLs konnte zwar durch die Inkubation mit einem PI3-Kinase Inhibitor induziert werden, die Reduktion der endogenen Cytohesin-3 Menge mittels siRNA hatte dagegen keinen Effekt auf die Transkription dieser Gene. Auch die Verwendung des pan-Cytohesin Inhibitors SecinH3, der zu einer Inhibition der Sec-7 Aktivität aller Cytohesine führt, hatte keinen

signifikanten Einfluss auf die Expression der PI3-Kinase Zielgene (siehe Abbildung 3.25). Desweiteren konnte keine Veränderung der AKT/PKB Phosphorylierung nach Stimulation in Cytohesin-3 “knock-down“ PBLs im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden (nicht gezeigt). Nach dieser Datenlage kann Cytohesin-3 in T-Zellen nicht oberhalb der PI3-Kinase positioniert werden. Diese vermeintliche Diskrepanz der Cytohesin-3 Funktion in der Insulin- und T-Zellsignalkaskade könnte dadurch erklärt werden, dass Cytohesine in Hepatozyten nicht nur oberhalb der PI3-Kinase positioniert sind, sondern durch eine direkte Interaktion die Aktivierung des Insulinrezeptors regulieren. Damit würden Cytohesine nicht nur einen selektiven Effekt auf die PI3-Kinase haben, sondern eine generelle Modulation des Insulinrezeptorsignalweges ermöglichen. Da nachgewiesen wurde, dass die Phosphorylierung des Insulinrezeptors durch SecinH3 unbeeinflusst bleibt, könnte die für die Aktivierung des Rezeptors ebenfalls wichtige Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten durch Cytohesine beeinflusst werden. Diese Hypothese fordert aber ebenfalls einen Effekt der Cytohesine auf den MAP-Kinase Ast des Insulinsignalweges (siehe Abbildung 4.6). Dies kann in mit SecinH3 behandelten Hepatozyten nach EGF bzw. FCS-Stimulation beobachtet werden (AG Famulok, unveröffentlicht). Damit würde es sich nicht um einen generellen Effekt von Cytohesin-3 auf den PI3-Kinase Signalweg handeln, sondern vielmehr um eine rezeptorspezifische Interaktion von Cytohesin-3 mit dem Insulinrezeptor.



**Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Insulinrezeptorsignalweges mit einer möglichen Cytohesin-1 Beteiligung.** Die Stimulation des Insulinrezeptors durch die Bindung seines Liganden induziert sowohl die PI3-Kinase abhängigen Signalwege als auch eine Aktivierung der Map-Kinase Kaskade. Abbildung modifiziert, aus Biddinger et al. 2006.

Eine Beteiligung des Insulinsignalweges an dem Glukosemetabolismus von T-Zellen gilt als unsicher. Auch die Regulation des Energiehaushalts in T-Zellen ist weitgehend unbekannt. Als wahrscheinlich gilt jedoch, dass energieintensive Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung durch das kostimulatorische Molekül CD28 reguliert werden (Frauwirth et al. 2002). Dabei entsprechen die von CD28 aktivierten Signalmoleküle zum Teil denen des Insulinsignalweges (siehe Abbildung 4.7). In T-Zellen führt die Bindung eines passenden MHC/Peptid-Komplexes an den TCR zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase Lck und Fyn. Lck oder Fyn phosphorylieren die zyttoplasmatische Kette des konstitutiv als Dimer vorliegenden CD28. Nach der Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Adapterproteine resultiert dies ebenfalls in der Aktivierung der PI3-Kinase. In naiven T-Zellen, die bisher keine kostimulatorischen Signale durch CD28 erhalten haben, wird die energetische Grundversorgung durch extrazelluläre Signale, z.B. von Zytokinen oder schwacher TCR Stimulation, gewährleistet (Frauwirth et al. 2004).



**Abbildung 4.7: Insulin- und Kostimulatorische-Signalwege kontrollieren ähnliche metabolische Prozesse.** Die Stimulation des Insulinrezeptors durch die Bindung seines Liganden induziert über die PI3-Kinase und AKT die Glut4 Translokation zur Plasmamembran, den Glukosetransport und die Glykolyse. Die vollständige T-Zellstimulation reguliert über CD28 ebenfalls die Aktivierung der PI3-Kinase und AKT. Daher ist in T-Zellen vermutlich CD28 für die Expression von Glut1 auf der Plasmamembran und die Glykolyse verantwortlich. Abbildung aus Frauwirth et al. 2004.

Neben der Identifikation von Cytohesinen als essentielle Faktoren des Insulinsignalweges, zeigten Fuss *et al.*, dass *steppke* über einen negativen Rückkopplungsmechanismus seine eigene Expression reguliert. In diesem Modell bewirkt *steppke*, aktiviert durch Insulin über PI3-Kinase, die Phosphorylierung von AKT/PKB. AKT/PKB bewirkt seinerseits eine zytoplasmatische Lokalisierung von FoxO, was eine weitere Transkription des Insulinrezeptors, aber auch von *steppke* selbst, verhindert. Ein PI3-Kinase abhängiger Regulationsmechanismus wurde auch in dieser Arbeit nachgewiesen und diskutiert. Da aber Cytohesin-3 in T-Zellen nicht selbst an der PI3-Kinase Signalkaskade beteiligt ist, und die Inhibition der Cytohesine durch SecinH3 keinen Einfluss auf die Transkription von Cytohesin-3 hat (siehe Abbildung 3.25), handelt es sich hier nicht um einen selbst-limitierenden Expressionsmechanismus. Die Expression von Cytohesin-3 in T-Zellen scheint vielmehr direkt an die Stimulation von PD-1 durch B7-H1 gekoppelt zu sein.

## 4.4 Cytohesin-3 als Faktor eines neuen, Anergie-induzierenden Signalwegs

Seit T-Zell Anergie als ein Mechanismus der peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen beschrieben wurde, gibt es verschiedene Modelle um dieses Phänomen auf molekularer Ebene zu erklären. Besondere Schwierigkeiten bereiteten die unterschiedlichen experimentellen Systeme, mit denen *in-vitro* oder *in-vivo* T-Zell Anergie induziert wird. Zu den populärsten Methoden zählt die Quervernetzung von CD3 ohne Kostimulation, die orale Gabe von Antigenen und die Inkubation mit Ionophor oder Superantigenen (Serfling et al. 2006). Ein molekulares Schlüsselereignis in der Induktion von klonaler Anergie scheint ein Ungleichgewicht zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT und der AP-1/NF $\kappa$ B Aktivierung zu sein. In vollständig aktivierten T-Zellen binden die AP-1 Komponenten Fos und Jun zusammen mit NFAT als heteromere Komplex an AP-1/NFAT Konsenselemente und ermöglichen so die Transkription verschiedener Gene (Macian et al. 2001). Daher kommt es nur bei einer ausgewogenen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF $\kappa$ B zu einer Aktivierung des IL-2 Promotors und anderer, für die T-Zellaktivierung wichtiger Gene (Macian et al. 2002). In anergen T-Zellen bleibt durch eine fehlende Kostimulation eine AP-1 und NF $\kappa$ B Aktivierung aus, und die alleinige NFAT Aktivierung führt zu der Induktion eines anergen Phänotypen. *Ex-vivo* führt eine alleinige NFAT Aktivierung zu einer reduzierten Synthese von  $\text{T}_{\text{H}1}$  Zytokinen und einer verstärkten Produktion von IL-10 (Macian et al. 2002). Auch *in-vivo* wurde eine Synthese des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 von anergen T-Zellen nachgewiesen (Buer et al. 1998). Heute geht man von einem mehrschrittigen Mechanismus aus, der nicht auf einem generellen Defekt in der Signalkaskade von T-Zellen, sondern vielmehr auf der selektiven Inhibition einzelner Schritte der T-Zellsignalkaskade basiert. Dabei ist nicht der Verlust einzelner Signalkomponenten, sondern die Expression inhibitorischer Moleküle ausschlaggebend. Fusionsexperimente aneurer muriner T-Zell Klone mit humanen T-Zellen zeigten, dass das erzeugte Heterokaryon eine drastische Inhibition der IL-2-Synthese nach Stimulation aufwies (Telander et al. 1999). Dieses Experiment zeigt, dass es in anergen T-Zellen zu der Expression dominant negativ-wirkender Proteine kommt, die eine Aktivierung der T-Zelle verhindern.

Heissmeyer *et al.* zeigten, dass es in anergen T-Zellen, generiert durch Ionophor-Inkubation, zu einer überschießenden NFAT Aktivierung kommt, in deren Folge die E3 Ubiquitin-Ligasen Itch, Cbl-b und GRAIL verstärkt exprimiert werden. Kommt es zu einer Restimulation der T-Zellen durch eine APC, werden diese E3-Ligasen zu Rafts rekrutiert und damit zur Immunologischen Synapse (IS) transportiert. Dort kommt es zu einer spezifischen Mono-Ubiquitinylierung zentraler Signalkomponenten, nämlich PLC- $\gamma$ , RasGAP und PKC- $\theta$ . Die Degradation von PLC- $\gamma$  bewirkt durch den entstehenden Mangel des "second-messenger" DAG, eine verringerte Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 und damit eine Instabilität der IS in anergen T-Zellen. Die Abwesenheit der PKC- $\theta$  verhindert schließlich eine Aktivierung der T-Zellsignalkaskade (Heissmeyer et al. 2004). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Cytohesin-3 Regulation während der Anergie-Induktion und der negativ-regulatorische Effekt von Cytohesin-3 auf die IL-2 Synthese, lassen sich mit dem von Heissmeyer postulierten Modell in Einklang bringen: Als Antwort auf TCR und PD-1 Stimulation würde Cytohesin-3 hierbei, wie Itch, Cbl-b und GRAIL, verstärkt exprimiert. Neben den oben aufgeführten Effekten der Ubiquitin-Ligasen, blockiert Cytohesin-3, wahrscheinlich durch Verdrängung von Cytohesin-1, die Signalwege, die zu einer Aktivierung der AP-1 und NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren führen. Neben der Degradation der PLC- $\gamma$  und PKC- $\theta$  würde Cytohesin-3 somit ein weiteres Sicherungselement darstellen, um eine potentiell autoreaktive T-Zelle in einen anergen Zustand zu bringen bzw. darin zu halten.

Posttranslationale Modifikationen dienen ebenfalls dazu, Signalkaskaden in anergen Zellen zu modulieren. Veränderungen der Palmitoylierung oder Myristoylierung kann zu einem Funktionsverlust oder zu einer Mislokalisierung von Signalfaktoren führen. In anergen T-Zellen kommt es, bedingt durch eine fehlende Palmitoylierung des Adapterproteins LAT, zu einer verringerten Phosphorylierung von LAT (Hundt et al. 2006). Die Phosphorylierung von LAT wird von ZAP-70 katalysiert und findet ausschließlich in der IS statt. Aufgrund der rezeptorproximalen Position von LAT hat eine Mislokalisierung und fehlende Phosphorylierung entsprechend den Abbruch der Signalkaskade zu Folge (Zhang et al. 1998). Andere Beispiele veränderter Signalkomponenten in anergen T-Zellen sind eine veränderte TCR Tyrosinphosphorylierung, die aberrante Expression und Aktivität von Lck und Fyn, Ras und MAP-Kinase Aktivierung sowie die veränderte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B (Boussiotis et al. 1996; Li et al. 1996; Sundstedt

et al. 1996). Obwohl der Verlust oder die Veränderung einer einzelnen Signalkomponente schon zu schweren Störungen der Signalkaskade führen muss, macht die Vielfalt der Defekte deutlich, dass für die Etablierung der T-Zell Anergie die Veränderung, Aktivierung oder Inhibition mehrerer verschiedener Signalschritte gewährleistet sein muss. Cytohesin-3 ist somit ein weiterer Sicherheitsmechanismus anergischer T-Zellen, der wahrscheinlich im Zusammenhang mit der PKC- $\theta$  zu einer Inhibition des AP-1 und NF $\kappa$ B Weges führt.

Neben der Identifizierung und Inhibition autoreaktiver T-Zellen ist der Erhalt des anergen Zustands in der Peripherie über große Zeiträume hinweg eine Notwendigkeit für die Vermeidung von Autoimmunreaktionen. Dieser bisher weitgehend unbekannt Bereich rückt mehr in den Fokus aktueller Forschung. Ein wichtiger Mechanismus zur Erhaltung peripherer Anergie scheinen epigenetische Veränderungen darzustellen. Beispielsweise wurden für den IFN- $\gamma$ - und IL4-Promotor während der T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>-Differenzierung Veränderungen in der Histon-Acetylierung beschrieben. Auch für den IL-2 Promotor sind solche epigenetischen Veränderungen bekannt. In anergen T-Zellen kommt es zu einer selektiven Deacetylierung und damit Verstummung des IL-2 Promotors (Bandyopadhyay et al. 2006). Die Deacetylierung des Histons H4 wird durch eine Interaktion des Transkriptions-Repressors Icaros mit Histon-Deacetylasen hervorgerufen und ermöglicht eine langfristige Repression des IL-2 Promotors. Interessanterweise zählt Icaros zu den Genen, die, wie die oben beschriebenen E3-Ligasen, durch eine überschießende NFAT Aktivierung, ohne Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B vermehrt exprimiert werden.

Durch die in dieser Arbeit beschriebene PD-1 regulierte Cytohesin-3 Expression, ist auch eine Beteiligung von Cytohesin-3 an den Prozessen des langfristigen Anergie-Erhalts denkbar. Chronische, virale Erkrankungen erzeugen in der Peripherie über längere Zeiträume unreaktive, viruspezifische T-Zellen, die auch als "exhausted" oder "erschöpft" bezeichnet werden. Man geht davon aus, dass der Organismus durch diesen Mechanismus versucht, sich selbst vor überstarken, chronischen Immunreaktionen zu schützen. "Erschöpfte" T-Zellen sind sowohl im murinen System, aber auch im Menschen bei einer bestehenden HIV, Hepatitis-B und -C Infektion bekannt. Wie andere refraktäre T-Zellen sind auch "erschöpfte" T-Zellen nicht in der Lage nach Restimulation IL-2 zu synthetisieren. Barber *et al.* zeigten, dass diese T-Zellen außerdem durch eine außergewöhnlich hohe PD-1 Expression auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet sind. Die Blockade dieses Oberflächenmoleküls mit Hilfe eines Antikörpers führt dabei zur Wiedererlangung der Immunkompetenz,

wohingegen die Blockierung von CTLA-4 keinen Effekt auf die Immunantwort gegenüber der viralen Infektion hat. Daher scheint dieser Vorgang von einer direkten Interaktion und Stimulation von PD-1 durch einen Liganden (B7-H1) in der Peripherie erreicht zu werden (Barber et al. 2006). Die Gruppe konnte außerdem zeigen, dass die Splenozyten in chronisch infizierten Mäusen eine deutliche verstärkte Expression von B7-H1 aufweisen. Durch die PD-1/B7-H1 Stimulation der "erschöpften" T-Zellen könnte in der Peripherie eine dauerhaft hohe Expression von Cytohesin-3, und damit eine langfristige Repression des IL-2 Promotors gewährleistet werden. Ob Cytohesin-3 in "erschöpften" T-Zellen tatsächlich verstärkt exprimiert ist, und über welchen Zeitraum Cytohesin-3 ohne PD-1 Stimulation stabil in der Zelle exprimiert bleibt, müssten weiterführende biochemische Untersuchungen zeigen.

Die T-Zell Homöostase in der Peripherie ist nicht nur kontrolliert durch die klonale Anergie autoreaktiver T-Zellen, sondern auch durch Apoptose. Zwei Sonderformen der Apoptose sind bei der Kontrolle aktivierter, autoreaktiver T-Zellen wichtig: der **Activation-Induced Cell Death** (AICD) und der **Activated T-Cell Autonomus Death** (ACAD). Autoreaktive T-Zellen werden nach TCR Stimulation und Ligation von Fas und Fas-Ligand durch AICD eliminiert (Zhang et al. 2004b). Im Gegensatz dazu beruht ACAD nicht auf einer TCR Stimulation, sondern wird durch ein Ungleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Genprodukten der Bcl2 Familie ausgelöst (Arnold et al. 2006). Wie in dieser Arbeit gezeigt, interagiert die mitochondriale AAA-ATPase CYMA mit Cytohesin-1 und Cytohesin-2, nicht aber mit Cytohesin-3. Weiterführende Studien zeigen eine eindeutige Beteiligung von CYMA an apoptotischen Prozessen (B. Paul und B. Hoffzimmer, unveröffentlicht). Der "knock-down" von CYMA führt sowohl in unstimulierten PBLs, als auch nach Apoptose-Induktion durch oxidativen Stress zu einer verstärkten Apoptose der T-Zellen. Die Beteiligung von Cytohesin-1 an den von CYMA kontrollierten anti-apoptotischen Prozessen wurde durch die Verwendung des dominant-negativen Cytohesin-1 Peptids und durch Cytohesin-1 "knock-down" untersucht. Sowohl die Verwendung des Peptids, als auch die Reduktion der endogenen Cytohesin-1 Menge führt zu einer verringerten Apoptoserate der T-Zellen. Aufgrund der selektiven Interaktion von CYMA mit den durch PKCs phosphorylierbaren Cytohesinen-1 und -2 wurde ein Einfluss des Phosphorylierungsstatus von Cytohesinen auf die CYMA-regulierte Apoptose untersucht. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 kann nicht nur durch PMA, sondern auch durch CD3/CD28 Stimu-

lation, hyperosmotischen Schock und oxidativen Stress ausgelöst werden (K. Obrusnik, unveröffentlicht). Die Verwendung einer Cytohesin-1 Phosphomutante zeigte, dass diese zu einer verminderten Apoptose nach oxidativem Stress der T-Zellen führt. Zusammen zeigen diese Ergebnisse eine Beteiligung von Cytohesin-1 an Vorgängen des durch Mitochondrien gesteuerten Zelltod. Ob es sich hierbei um eine weitere, durch Cytohesine kontrollierte Form der peripheren Toleranz handelt, wie der oben erwähnte ACAD, ist an dieser Stelle spekulativ und muss durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Für die Vermeidung von Autoimmunreaktionen ist die Fähigkeit des Immunsystems zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen von zentraler Bedeutung. Diese Fähigkeit wird als immunologische Toleranz bezeichnet und beruht unter anderem auf den Mechanismen der Anergie. T-Zell Anergie ist ein zellulärer Zustand in dem T-Zellen nicht mehr in der Lage sind nach Restimulation den autokrinen Wachstumsfaktor IL-2 zu synthetisieren, zu proliferieren oder Effektorfunktionen auszubilden. Für die Induktion eines anergen T-Zellphänotyps ist die Stimulation der inhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 essentiell. Die molekularen Vorgänge, die durch eine PD-1 Stimulation ausgelöst werden und zu einem anergen Zustand der T-Zellen führen, sind jedoch nur unvollständig verstanden.

In dieser Arbeit wird erstmals eine Beteiligung von Cytohesin-3 an den Prozessen der T-Zell Anergie gezeigt. Die homologe Familie der Cytohesine ist überwiegend als GDP/GTP Austauschfaktoren für ARFs charakterisiert, die außerdem an der Regulation der LFA-1 vermittelten Adhäsion von Lymphozyten beteiligt sind. Mit Hilfe eines antigenbasierten *ex-vivo* Toleranz-Modells konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Cytohesin-3 in anergen und aktivierten T-Zellen differentiell exprimiert wird. Die verstärkte Cytohesin-3 Expression in anergen T-Zellen ist dabei von der Stimulation des inhibitorischen Oberflächenmoleküls PD-1 durch seinen Liganden B7-H1 abhängig. Weitere Experimente bewiesen, dass die Cytohesin-3 Expressionshöhe direkt von der PI3-Kinase Aktivität und dem Transkriptionsfaktor FoxO-1 kontrolliert wird.

Darüber hinaus konnte sowohl in einem murinen als auch in einem humanen Zellsystem Cytohesin-3 als ein Repressor der IL-2 Synthese identifiziert werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass das homologe Protein Cytohesin-1 ein positiv regulatorisches Element der IL-2 Synthese und damit der T-Zellaktivierung ist. Beide Cytohesine modulieren die Aktivität des IL-2 Promotors über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B, wohingegen die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation durch die Cytohesine nicht beeinflusst wird. Für die antagonistischen Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 auf die Aktivität des IL-2 Promotors sind sowohl der Phosphorylierungsstatus als auch die Affinität der Cytohesine für das Phospholipid PIP<sub>3</sub> ausschlaggebend. Cytohesin-1 kann nach Stimulation der Zelle durch Mitglieder der nPKCs phosphoryliert werden, während Cytohesin-3 keine Phosphorylie-

rungsstellen aufweist. Der Verlust der Phosphorylierungsstellen von Cytohesin-1 führt zu einem Abbruch der IL-2 Promotoraktivität und entspricht damit dem inhibitorischen Effekt von Cytohesin-3 auf die Aktivität des IL-2 Promotors. Die Affinität der Cytohesine zu den Phospholipiden PIP2 und PIP3 wird durch Di- bzw. Tri-Glyzinmotive determiniert. Es konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-3 in den untersuchten T-Zellen ausschließlich als Di-Glyzin Variante exprimiert wird, die eine höhere Affinität zu PIP3 als zu PIP2 aufweist. Cytohesin-1 dagegen konnte nur mit einem Tri-Glyzin Motiv nachgewiesen werden, dass eine vergleichsweise geringere Affinität zu PIP3 hat.

Das aus diesen Daten entwickelte Modell zur Funktionsweise der Cytohesine sieht eine Konkurrenz von Cytohesin-1 mit Cytohesin-3 um PIP3 Bindungsstellen vor. Eine Verdrängung des phosphorylierbaren Cytohesin-1 durch das nicht-phosphorylierbare Cytohesin-3 von PIP3 Bindungsstellen führt demnach durch die Inhibition der AP-1 und NF $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren zu einem Abbruch der T-Zellsignalkaskade. Das in anergen T-Zellen verstärkt exprimierte Cytohesin-3 agiert somit als eine funktionsunfähige Cytohesin-1-Protein-Attrappe, die eine Synthese von IL-2 unterbindet. Damit ist in dieser Arbeit erstmals ein Modell der PD-1 regulierten Anergie-Induktion in T-Zellen vorgeschlagen, das auf der antagonistischen Regulation des IL-2 Promotors durch die homologen Proteine Cytohesin-1 und Cytohesin-3 beruht.

## 6 Anhang

|                   |       |   |     |     |     |     |     |
|-------------------|-------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | (1)   | 1   | 10  | 20  | 30  | 49  |     |
| Cytohesin-3 human | (1)   | MDE DGGGEGGG VPEDLSLEEREELDIRRRKKELIDDIERLKYEIAEVM    |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (1)   | MDE GGGGEGGS VPEDLSLEEREELDIRRRKKELIDDIERLKYEIAEVM    |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (1)   | MDE GGGEGG VPEDLSLEEREELDIRRRKKELIDDIERLKYEIAEVM      |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 2   |     |     |     |     |     |
|                   | (50)  | 50  | 60  | 70  | 80  | 98  |     |
| Cytohesin-3 human | (50)  | TEIDNLT SVEESKTTQRNKQIAMGRKKFNMDPKKGIQFLIENDLLQSSP    |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (50)  | TEIDNLT SVEESKTTQRNKQIAMGRKKFNMDPKKGIQFLIENDLLQSSP    |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (50)  | TEIDNLT SVEESKTTQRNKQIAMGRKKFNMDPKKGIQFLIENDLLQSSP    |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 3   |     |     |     |     |     |
|                   | (99)  | 99  | 110 | 120 | 130 | 147 |     |
| Cytohesin-3 human | (99)  | EDVAQFLYKGEGLNKT VIGDYLG ERD EFN IKVLQAFVELHEFADLNLVQ |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (99)  | EDVAQFLYKGEGLNKT VIGDYLG ERD EFN IKVLQAFVELHEFADLNLVQ |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (99)  | EDVAQFLYKGEGLNKT VIGDYLG ERD EFN IKVLQAFVELHEFADLNLVQ |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 4   |     |     |     |     |     |
|                   | (148) | 148   | 160 | 170 | 180 | 196 |     |
| Cytohesin-3 human | (148) | ALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFASRYCLCNPGVFQSTDTTCYVLSFA    |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (148) | ALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFASRYCLCNPGVFQSTDTTCYVLSFA    |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (148) | ALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFASRYCLCNPGVFQSTDTTCYVLSFA    |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 5   |     |     |     |     |     |
|                   | (197) | 197   | 210 | 220 | 230 | 245 |     |
| Cytohesin-3 human | (197) | IIMLNTSLHNNHNRDKPTAERFI AMNRGINEGGDLPEELLRNLYESIKN    |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (197) | IIMLNTSLHNNHNRDKPTAERFI T MNRGINEGGDLPEELLRNLYESIKN   |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (197) | IIMLNTSLHNNHNRDKPTAERFI MNRGINEGGDLPEELLRNLYESIKN     |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 6   |     |     |     |     |     |
|                   | (246) | 246   | 260 | 270 | 280 | 294 |     |
| Cytohesin-3 human | (246) | EPFKIPEDDGNLTH TFFNPDREGWLLKLGGRVKTWKRWFILTDNCLY      |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (246) | EPFKIPEDDGNLTH TFFNPDREGWLLKLGGRVKTWKRWFILTDNCLY      |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (246) | EPFKIPEDDGNLTH TFFNPDREGWLLKLGGRVKTWKRWFILTDNCLY      |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 7   |     |     |     |     |     |
|                   | (295) | 295   | 300 | 310 | 320 | 330 | 343 |
| Cytohesin-3 human | (295) | YFEYTTDK EPRGIIPLENLSIREVEDPRKPNCFELYNP SHKGQVIKACK   |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (295) | YFEYTTDK EPRGIIPLENLSIREVEDPRKPNCFELYNP SHKGQVIKACK   |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (295) | YFEYTTDK EPRGIIPLENLSIREVEDPRKPNCFELYNP SHKGQVIKACK   |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 8   |     |     |     |     |     |
|                   | (344) | 344   | 350 | 360 | 370 | 380 | 392 |
| Cytohesin-3 human | (344) | TEADGRVVEGNHVYRISAPSP EEK EEMKSIKASISRDPFYDMLATRK     |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (344) | TEADGRVVEGNHVYRISAPSP EEK EEMKSIKASISRDPFYDMLATRK     |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (344) | TEADGRVVEGNHVYRISAPSP EEK EEMKSIKASISRDPFYDMLATRK     |     |     |     |     |     |
|                   |       | Section 9   |     |     |     |     |     |
|                   | (393) | 393   | 399 |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 human | (393) | RRIANKK   |     |     |     |     |     |
| Cytohesin-3 murin | (393) | RRIANKK   |     |     |     |     |     |
| Consensus         | (393) | RRIANKK   |     |     |     |     |     |

Abbildung 6.1: Sequenzvergleich zwischen dem humanen und murinen Cytohesin-3. Wie aus dem Sequenzvergleich zu entnehmen unterscheiden sich das humane und murine Cytohesin-3 in vier Aminosäuren an Position 4, 12, 126 und 220.

|                   |       |              |              |                |               |                        |             |               |
|-------------------|-------|--------------|--------------|----------------|---------------|------------------------|-------------|---------------|
|                   | (1)   | 1            | 10           | 20             | 30            | 47                     |             |               |
| human Cytohesin-1 | (1)   | MEEDD        | ---          | SYVPSDLTAEERQ  | ELENIRRRKQELL | ADIQRLKDEIAE           |             |               |
| human Cytohesin-2 | (1)   | ME           | -DG---       | VMFPDLTPPEERME | ELENIRRRKQELL | VEIQRLREELSE           |             |               |
| human Cytohesin-3 | (1)   | MDEDGGGEGGGV | PEDLSLEEREEL | LDI            | RRRKKELLD     | IERLKYEIAE             |             |               |
| human Cytohesin-4 | (1)   | MD           | ---          | LCHPEPAELSSG   | ETEELQRIKWHRK | QLLEDIQRLKDEIAD        |             |               |
| Consensus         | (1)   | MDEDG        |              | YVPADLSAEERE   | ELENIRRRKQELL | DDIQRLKDEIAE           |             |               |
|                   | (48)  | 48           | 60           | 70             | 80            | 94                     |             |               |
| human Cytohesin-1 | (44)  | VANETENL     | SGTEERKNNQ   | RNKQVAMGRKKFN  | MDPKKG        | IQFLIENDLL             |             |               |
| human Cytohesin-2 | (43)  | AMSEVEGLE    | ANEGSKTLQ    | RNRKMG         | GRKKFNMD      | PKKGIQFLVENELL         |             |               |
| human Cytohesin-3 | (48)  | VMTEIDN      | LTSVEESKTT   | QRNKQIAM       | GRKKFNMD      | PKKGIQFLIENDLL         |             |               |
| human Cytohesin-4 | (43)  | VFAQIDCF     | ESAEESRMA    | QKEKEL         | CLGRKKFN      | MDPAKGIQVFIHKLL        |             |               |
| Consensus         | (48)  | VMSEIDN      | LSES         | EESKTLQR       | NKQIAM        | GRKKFNMDPKKGIQFLIENDLL |             |               |
|                   | (95)  | 95           | 100          | 110            | 120           | 130                    | 141         |               |
| human Cytohesin-1 | (91)  | KNTCEDIA     | QFLYKGEGLN   | KTAIGDYL       | GERDEFNI      | QVLHAFV                | ELHEFT      |               |
| human Cytohesin-2 | (90)  | QNTPEEIA     | RFLYKGEGLN   | KTAIGDYL       | GEREELN       | LAVLHAF                | VDLHEFT     |               |
| human Cytohesin-3 | (95)  | QSSPEDVA     | QFLYKGEGLN   | KTVIGDYL       | GERDEFNI      | KVLAQAF                | VDLHEFA     |               |
| human Cytohesin-4 | (90)  | TPDVQDIA     | RFLYKGEGLN   | KTAIGTYL       | GERDPI        | NLQVLQAF               | VDLHEFA     |               |
| Consensus         | (95)  | QNTPEEIA     | RFLYKGEGLN   | KTAIGDYL       | GERDEFNI      | QVLQAF                 | VDLHEFT     |               |
|                   | (142) | 142          | 150          | 160            | 170           | 188                    |             |               |
| human Cytohesin-1 | (138) | DLNLVQAL     | RQFLWSFRL    | PGEAQKID       | RMMEAF        | AQRYCQC                | NNGVFQSTD   |               |
| human Cytohesin-2 | (137) | DLNLVQAL     | RQFLWSFRL    | PGEAQKID       | RMMEAF        | AQRYCL                 | CNPGVVFQSTD |               |
| human Cytohesin-3 | (142) | DLNLVQAL     | RQFLWSFRL    | PGEAQKID       | RMMEAF        | ASRYCL                 | CNPGVVFQSTD |               |
| human Cytohesin-4 | (137) | NLNLVQAL     | RQFLWSFRL    | PGEAQKID       | RMMEAF        | ATRYCL                 | CNPGVVFQSTD |               |
| Consensus         | (142) | DLNLVQAL     | RQFLWSFRL    | PGEAQKID       | RMMEAF        | AQRYCL                 | CNPGVVFQSTD |               |
|                   | (189) | 189          | 200          | 210            | 220           | 235                    |             |               |
| human Cytohesin-1 | (185) | TCYVLSF      | AIIMLNTSL    | LHNPNVKDK      | PTVERFI       | AMNRGIN                | GGDLPEEL    |               |
| human Cytohesin-2 | (184) | TCYVLSF      | AVIMLNTSL    | LHNENVRDK      | KEGLERF       | VAMNRGI                | NEGDLPEEL   |               |
| human Cytohesin-3 | (189) | TCYVLSF      | AIIMLNTSL    | LHNHNVRDK      | PTAERFI       | AMNRGIN                | EGDLPEEL    |               |
| human Cytohesin-4 | (184) | TCYVLSF      | SIIMLNTSL    | LHNENVRD       | KEPFFER       | VSMNRGI                | NNGSDLPEEQ  |               |
| Consensus         | (189) | TCYVLSF      | AIIMLNTSL    | LHNPNVRDK      | PTLERFI       | AMNRGIN                | EGDLPEEL    |               |
|                   | (236) | 236          | 250          | 260            | 270           | 282                    |             |               |
| human Cytohesin-1 | (232) | LRNLYES      | IKNEPFFK     | IPEDDGG        | NDLTH         | TFNPD                  | REGWLLK     | GGGRVKTW      |
| human Cytohesin-2 | (231) | LRNLYDS      | IRNEPFFK     | IPEDDGG        | NDLTH         | TFNPD                  | REGWLLK     | GGGRVKTW      |
| human Cytohesin-3 | (236) | LRNLYES      | IKNEPFFK     | IPEDDGG        | NDLTH         | TFNPD                  | REGWLLK     | GGGRVKTW      |
| human Cytohesin-4 | (231) | LRNLFDS      | IKSEFFS      | IPEDDGG        | NDLTH         | TFNPD                  | REGWLLK     | GGGRVKTW      |
| Consensus         | (236) | LRNLYDS      | IKNEPFFK     | IPEDDGG        | NDLTH         | TFNPD                  | REGWLLK     | GGGRVKTW      |
|                   | (283) | 283          | 290          | 300            | 310           | 329                    |             |               |
| human Cytohesin-1 | (279) | KRRWFIL      | TDNCLYYF     | EYTTDKE        | PRGIIP        | LENLSI                 | REV         | DSKKPNCFE     |
| human Cytohesin-2 | (277) | KRRWFIL      | TDNCLYYF     | EYTTDKE        | PRGIIP        | LENLSI                 | REV         | DDPRKPNCFE    |
| human Cytohesin-3 | (282) | KRRWFIL      | TDNCLYYF     | EYTTDKE        | PRGIIP        | LENLSI                 | REV         | EDPRKPNCFE    |
| human Cytohesin-4 | (277) | KRRWFIL      | TDNCLYYF     | EYTTDKE        | PRGIIP        | LENLSI                 | REV         | QKVDPPKPKFCLE |
| Consensus         | (283) | KRRWFIL      | TDNCLYYF     | EYTTDKE        | PRGIIP        | LENLSI                 | REV         | DDPKKPNCFE    |
|                   | (330) | 330          | 340          | 350            | 360           | 376                    |             |               |
| human Cytohesin-1 | (326) | LYIPDN       | KDQVIK       | ACKTEAD        | GRVVEG        | NHTVYR                 | ISAPTE      | EEKEEWIRCI    |
| human Cytohesin-2 | (324) | LYIPNN       | KGQVIK       | ACKTEAD        | GRVVEG        | NHMVYR                 | ISAPTE      | QEEKDEWIKSI   |
| human Cytohesin-3 | (329) | LYNP         | SHKQVIK      | ACKTEAD        | GRVVEG        | NHVYR                  | ISAPTE      | EEKEEWIKSI    |
| human Cytohesin-4 | (324) | LYNP         | SCRQVIK      | ACKTDG         | DGRVVEG       | KHESYR                 | ISAPTE      | SAEERDQWIESI  |
| Consensus         | (330) | LYNP         | SNKQVIK      | ACKTEAD        | GRVVEG        | NHMVYR                 | ISAPTE      | EEKEEWIKSI    |
|                   | (377) | 377          | 390          | **             | 405           |                        |             |               |
| human Cytohesin-1 | (373) | KAAI         | BRDPFY       | EMLAARK        | KKVSS         | TKRH                   | ---         |               |
| human Cytohesin-2 | (371) | QAAV         | SDVPFY       | EMLAARK        | KRISV         | KKQ                    | EQQP        |               |
| human Cytohesin-3 | (376) | KASI         | BRDPFY       | DMLATR         | KKRIAN        | KK                     | ----        |               |
| human Cytohesin-4 | (371) | RASI         | BRVPFY       | DLVSTR         | KKKI          | ASK                    | Q----       |               |
| Consensus         | (377) | KAAI         | BRDPFY       | DMLATR         | KKKI          | ASK                    |             |               |

**Abbildung 6.2: Sequenzvergleich zwischen den humanen Cytohesinen.** Zwischen den Proteinen identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, konservative Substitutionen in blau. Homologe Abschnitte sind grün hinterlegt. Der rote Kasten markiert die Sec-7 Domäne und der blaue Kasten die PH Domäne. Phosphorylierungsstellen sind durch roten Sterne gekennzeichnet.

# Abbildungsverzeichnis

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.1  | Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes und der Korezeptoren CD4 und CD8 . . . . .   | 3  |
| 1.2  | Schematische Darstellung der Immunologischen Synapse (IS) . . . . .   | 7  |
| 1.3  | Schematische Darstellung der Signalwege in der T-Zellaktivierung . . . . .  | 9  |
| 1.4  | Transkriptionelle Regulation von p27/kip und Rb/p130 mRNA nach <i>in-vitro</i> T-Zell Stimulation . . . . .                                     | 12 |
| 1.5  | Schematische Darstellung der Cytohesin Domänen-Struktur . . . . .   | 19 |
| 2.1  | Längenstandards . . . . .   | 31 |
| 3.1  | IL-2 und IFN $\gamma$ Produktion von toleranten (LSEC) und aktivierten (CD11c+DC) T-Zellen . . . . .  | 56 |
| 3.2  | Expression von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in aktivierten bzw. toleranten T-Zellen . . . . .  | 58 |
| 3.3  | Kinetik der Cytohesin-3 Protein- und mRNA-Menge während der Aktivierung bzw. Toleranzinduktion in T-Zellen . . . . .                            | 60 |
| 3.4  | Kinetik der CD25 Oberflächenexpression während der Toleranzinduktion in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .                                     | 61 |
| 3.5  | Die Aktivierung von CD28 reprimiert die Cytohesin-3 Expression während der Toleranzinduktion . . . . .  | 63 |
| 3.6  | $\alpha$ -PD-L1 reprimiert die Hochregulation von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen . . . . .   | 64 |
| 3.7  | IL-2 und IFN- $\gamma$ Konzentrationen in Kulturmedien von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus LSEC <sup>B7H1-/-</sup> und wt LSEC Kokultur . . . . . | 65 |
| 3.8  | Die Expression von Cytohesin-3 ist PD-1 abhängig . . . . .  | 66 |
| 3.9  | PD-1 abhängige AKT Phosphorylierung in toleranten und aktivierten T-Zellen . . . . .  | 68 |
| 3.10 | Einfluss der PI3-Kinase-Aktivität auf die Cytohesin-3 Protein- und mRNA-Expression . . . . .  | 70 |
| 3.11 | FoxO-1 reguliert die Cytohesin-3 Expression . . . . .   | 72 |

|   |    |
|---|----|
| 3.12 Cytohesin-1 und Cytohesin-3 modulieren die Aktivität des IL-2 Promotors im Reporter-gen-Versuch. . . . .                                   | 75 |
| 3.13 Die endogenen Cytohesin-1 und Cytohesin-3 Expression beeinflusst die Induktion des IL-2 Promotors nach Stimulation . . . . .               | 76 |
| 3.14 Der Verlust der Guaninnukleotid Austauschfunktion von Cytohesin-1 die Induktion des IL-2 Promotors . . . . .                               | 78 |
| 3.15 Die Guaninnukleotid Austauschfunktion von Cytohesin-3 ist nicht kritisch für die Repression der IL-2 Promotoraktivität . . . . .           | 79 |
| 3.16 Phosphorylierungs-Status von Cytohesin-1 ist kritisch für die T-Zell Aktivierung . . . . .   | 81 |
| 3.17 Schematische Darstellung des IL-2 Promotors . . . . .  | 82 |
| 3.18 Aufbau der verwendeten Reporterplasmide AP-1 Luc, NF $\kappa$ B Luc und NFAT Luc . . . . .   | 82 |
| 3.19 Cytohesin-1 und Cytohesin-3 sind antagonistische Komponenten des AP-1 Signalweges . . . . .  | 83 |
| 3.20 Cytohesin-1 und Cytohesin-3 sind in der MAP-Kinase Kaskade oberhalb von ERK1/2 positioniert . . . . .                                      | 85 |
| 3.21 Die Effekte von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 auf das NF $\kappa$ B Promotorelement sind entgegengesetzt . . . . .                           | 87 |
| 3.22 Die untersuchten Cytohesine -1 und -3 haben keinen Einfluss auf die Ca <sup>2+</sup> Mobilisation in T-Zellen . . . . .                    | 89 |
| 3.23 Nachweis einer Beteiligung von Cytohesin-1 an der T-Zellaktivierung unter Verwendung eines dominant negativen Cytohesin-1 Peptids. . . . . | 91 |
| 3.24 Cytohesin-3 moduliert die IL-2 mRNA Transkription in primären CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. . . . .   | 92 |
| 3.25 Die Transkription von PI3-Kinase Zielgenen p27/kip und Rb/p130 ist unabhängig von der Cytohesin-3 Expression . . . . .                     | 94 |
| 3.26 Cytohesin-4 blockiert die Aktivierung von T-Zellen . . . . .   | 95 |
| 3.27 Cytohesin-4 blockiert die AP-1 und NF $\kappa$ B Elemente des IL-2 Promotors . . . . .   | 96 |
| 3.28 Cytohesin-4 ist ein Markerprotein für ruhende CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .  | 97 |
| 3.29 Verstärkte Cytohesin-3 Expression reduziert die Cytohesin-1 Phosphorylierung . . . . .   | 99 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 3.30 | Cytohesin-1 wird in toleranten und aktivierten T-Zellen nur in der 3G Version exprimiert . . . . .                             | 101 |
| 3.31 | Cytohesin-3 wird in toleranten und aktivierten T-Zellen nur in der 2G Version exprimiert . . . . .                             | 102 |
| 3.32 | Pull-down Experiment von CYMA (FLJ) an His-PDZ-CYTIP . . . . .   | 104 |
| 3.33 | Expression von GFP-CYMA und CYMA-GFP in HeLa-Zellen . . . . .  | 105 |
| 3.34 | CYMA kolokalisiert mit dem mitochondrialen Protein Prohibitin . . . . .  | 106 |
| 3.35 | CYMA ist auf der Mitochondrienoberfläche in unmittelbarer Nähe zu Mikrotubuli konzentriert . . . . .                           | 107 |
| 3.36 | Tabellarische Darstellung des Interaktionstest von CYMA mit verschiedenen Sec7 Domänen in der Hefe . . . . .                   | 109 |
| 3.37 | Schematische darstellung der CYMA Domänenstruktur . . . . .  | 110 |
| 3.38 | Untersuchung zur Topologie von CYMA in Mitochondrien . . . . .   | 111 |
| 3.39 | Schematische Darstellung der Topologie von CYMA in Mitochondrien . . .   | 111 |
| 4.1  | Schematische Darstellung der durch Kostimulation beeinflussten Signalwege  | 114 |
| 4.2  | Schematische Darstellung der PI3-Kinase abhängigen Cytohesin-3 Expression  | 117 |
| 4.3  | Glyzin-Motive innerhalb der PH-Domäne von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 determinieren deren Affinität zu PIP2 und PIP3 . . . . . | 120 |
| 4.4  | Modell der Cytohesin-3 induzierten Hemmung der T-Zellaktivierung . . . .   | 123 |
| 4.5  | Mögliche Positionierung von Cytohesin-1 und Cytohesin-3 in der T-Zell Signalkaskade . . . . .                                  | 126 |
| 4.6  | Schematische Darstellung des Insulinrezeptorsignalweges . . . . .  | 129 |
| 4.7  | Insulin- und Kostimulatorische-Signalwege kontrollieren ähnliche metabolische Prozesse . . . . .                               | 130 |
| 6.1  | Aminosäuresequenzvergleich zwischen den humanen Cytohesinen . . . . .  | 138 |
| 6.2  | Aminosäuresequenzvergleich zwischen den humanen Cytohesinen . . . . .  | 139 |



## 7 Abkürzungen

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| $\alpha$                           | anti  |
| Abb.                               | Abbildung   |
| AG                                 | Arbeitsgruppe   |
| APC                                | antigen-präsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)                     |
| APS                                | Ammoniumperoxodisulfat  |
| AS                                 | Aminosäure  |
| bidest.                            | bidestilliert   |
| bp                                 | Basenpaare  |
| BSA                                | Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)                                  |
| °C                                 | Grad Celsius  |
| CD                                 | Zelloberflächenmarker (engl.: clustering of differentiation)                      |
| CsCl                               | Cäsium Chlorid  |
| Cyh-1                              | Cytohesin-1   |
| Cyh-3                              | Cytohesin-3   |
| D                                  | Dalton ( $1D \cong 1,7 * 10^{-24} g$ )  |
| DC                                 | dendritische Zellen   |
| DF                                 | Durchflusszytometrie  |
| dn                                 | dominant negativ  |
| dNTP                               | 2'-deoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat   |
| <i>D. melano-</i><br><i>gaster</i> | <i>Drosophila melanogaster</i>  |
| DTT                                | Dithiothreitol  |
| $E_{595}$                          | Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm                                       |
| eGFP                               | engl.:enhanced green fluorescent protein  |
| EDTA                               | Ethylendiamintetraacetat  |
| EGTA                               | Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat                |
| <i>E. coli</i>                     | <i>Escherischia coli</i>  |
| ELISA                              | engl.:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay   |
| EtBr                               | Ethidium Bromid   |
| Fab                                | Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulin                                    |
| FACS                               | Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence activated cell sorting) |

---

|                |  |
|----------------|--|
| F <sub>c</sub> | konstante Region von Immunglobulinen   |
| ff.            | folgende Seiten  |
| FCS            | Fötales Kälberserum, hier immer hitzeinaktiviert                                   |
| FITC           | Fluorescein-Isothiocyanat  |
| FSC            | Lichtstreuung in gerader Richtung (engl.: forward scatter)                         |
| <i>g</i>       | Erdbeschleunigung  |
| GEF            | Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl.: guanine nucleotide exchange factor)       |
| GOI            | zu untersuchendes Gen (engl.: gene of interest)                                    |
| HRP            | Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)                             |
| ICAM           | interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl.: inter-cellular adhesion molecule)         |
| Ig             | Immunglobulin (z. B. IgE)  |
| IL             | Interleukin (z. B. IL-4)   |
| IP             | Immunpräzipitation   |
| IS             | Immunologische Synapse   |
| kb             | Kilobasen  |
| LFA-1          | funktionelles Leukozytenantigen 1 (engl.: leucocyte function-associated antigen-1) |
| LB             | Luria Broth  |
| LSEC           | engl.: Liver Sinusoidale Liver Endothelial Cells                                   |
| mM             | Millimolar   |
| MCP-1          | (engl.: monocyte/macrophage chemoattractant protein 1)                             |
| $\beta$ -Me    | $\beta$ -Mercaptoethanol   |
| MHC            | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)         |
| <i>n</i> =     | Anzahl <i>n</i> der durchgeführten Versuche  |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |

---

|          |   |
|----------|---|
| PBMC     | (engl.: peripheral blood mononuclear cell)  |
| PBL      | Periphere Blut Lymphozyten  |
| PBS      | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)                   |
| PI 3K    | Phosphatidylinositol 3 Kinase   |
| PI 4K    | Phosphatidylinositol 4 Kinase   |
| PKC      | Proteinkinase C   |
| PMA      | 12-O Tetradecanoylphorbol-13 Acetat   |
| PMSF     | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| RLU      | Relative Lichteinheiten (engl.: Relative Light Units)                                   |
| RNA      | Ribonukleinsäure  |
| rpm      | Umdrehungen pro Minute  |
| RT       | Raumtemperatur  |
| rel.     | relativ   |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat  |
| spez.    | spezifische   |
| SSC      | seitliche Lichtstreuung (engl.: sideward scatter)                                       |
| stim.    | stimuliert  |
| TBS      | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: tris-buffered saline)                            |
| TBST     | Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (engl.: tris-buffered saline with Tween 20) |
| TEMED    | Tetramethylethyldiamin  |
| Tris     | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat   |
| U        | Unit(s): Einheit von Enzymaktivität   |
| vgl.     | vergleiche  |
| v/v      | Verhältnis Volumen zu Volumen (engl.: volume to volume)                                 |
| Vol.     | Volumen   |
| w/v      | Verhältnis Masse zu Volumen (engl.: weight to volume)                                   |
| WB       | Western-Blot  |
| wt       | Wildtyp   |
| WW       | Wechselwirkung(en)  |

## 8 Literaturverzeichnis

Acuto O, FMichel: **CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling** *Nat Rev Immunol* 2003, 3: 939-51.

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, THonjo: **Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes** *Int Immunol* 1996, 8: 765-72.

Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB.: **T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.** *Nat Rev Immunol* 2001 ,1:220-8

Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, VABoussiotis: **CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression** *J Immunol* 2000, 164: 144-51.

Appleman LJ, van Puijenbroek AAFL, Shu KM, Nadler LM, VABoussiotis: **CD28 co-stimulation 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: 2729-36.

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

Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Wachter H, Grunicke H, Utermann G, Altman A, GBaier: **Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes** *Mol Cell Biol* 1996, 16: 1842-50.

Bandyopadhyay S, Dure M, Paroder M, Soto-Nieves N, Puga I, FMacian: **Interleukin 2 gene transcription is regulated by Ikaros-induced changes in histone acetylation in anergic T cells** *Blood* 2006.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, RAhmed: **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection** *Nature* 2006, 439: 682-7.

Becker JC, Brabletz T, Kirchner T, Conrad CT, Brocker EB, RAReisfeld: **Negative transcriptional regulation in anergic T cells** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92: 2375-8.

Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang I, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, BMCarreno: **Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses** *J Immunol* 2003, 170: 711-8.

Beraud-Dufour S, SRobineau: **Expression, purification, and measurements of activity of ARNO1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)** *Methods Enzymol* 2001, 329: 264-71.

Berg-Brown NN, Gronski MA, Jones RG, Elford AR, Deenick EK, Odermatt B, Littman DR, PSOhashi: **PKCtheta signals activation versus tolerance in vivo** *J Exp Med* 2004, 199: 743-52.

Beverly B, Kang SM, Lenardo MJ, RHSchwartz: **Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation** *Int Immunol* 1992, 4: 661-71.

Biddinger SB, CRKahn: **From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes** *Annu Rev Physiol* 2006, 68: 123-58.

Birkenkamp KU, PJCoffer: **FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for?** *J Immunol* 2003, 171: 1623-9.

Blackman MA, Gerhard-Burgert H, Woodland DL, Palmer E, Kappler JW, PMarrack: **A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a** *Nature* 1990, 345: 540-2.

Bourgoin SG, Houle MG, Singh IN, Harbour D, Gagnon S, Morris AJ, DNBrindley: **ARNO but not cytohesin-1 translocation is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in HL-60 cells** *J Leukoc Biol* 2002, 71: 718-28.

Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, Freeman GJ, Gribben JG, Bernstein GM, D'Andrea AD, Ritz J, LMNadler: **Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor** *Science* 1994, 266: 1039-42.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, LMNadler: **The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response** *Immunol Rev* 1996, 153: 5-26.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Taylor PA, Berezovskaya A, Grass I, Blazar BR, LMNadler: **p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes** *Nat Med* 2000, 6: 290-7.

Bowen F, Haluskey J, HQuill: **Altered CD40 ligand induction in tolerant T lymphocytes** *Eur J Immunol* 1995, 25: 2830-4.

Bretscher P, MCohn: **A theory of self-nonsel discrimination** *Science* 1970, 169: 1042-9.

Brummelkamp TR, Bernards R, RAgami: **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells** *Science* 2002, 296: 550-3.

Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, ASarukhan: **Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo** *J Exp Med* 1998, 187: 177-83.

Castellano E, De Las Rivas J, Guerrero C, ESantos: **Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses** *Oncogene* 2007, 26: 917-33.

Chambers CA, JPAllison: **CTLA-4—the costimulatory molecule that doesn't: regulation of T-cell responses by inhibition** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999, 64: 303-12.

Chambers CA: **The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited** *Trends Immunol* 2001, 22: 217-23.

Chardin P, Paris S, Antony B, Robineau S, Beraud-Dufour S, Jackson CL, MChabre: **A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains** *Nature* 1996, 384: 481-4.

Charvet C, Canonigo AJ, Becart S, Maurer U, Miletic AV, Swat W, Deckert M, AAltman: **Vav1 promotes T cell cycle progression by linking TCR/CD28 costimulation to FOXO1 and p27kip1 expression** *J Immunol* 2006, 177: 5024-31.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, JLRiley: **SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation** *J Immunol* 2004, 173: 945-54.

Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, EWLam: **Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1** *J Biol Chem* 2000, 275: 21960-8.

Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, FAnnunziato: **Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes** *Blood* 2003, 102: 4107-14.

Coudronniere N, Villalba M, Englund N, AAltman: **NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 3394-9.

Cronin TC, DiNitto JP, Czech MP, DGLambright: **Structural determinants of phosphoinositide selectivity in splice variants of Grp1 family PH domains** *EMBO J* 2004, 23: 3711-20.

Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, LKlein: **Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self** *Nat Immunol* 2001, 2: 1032-9.

Dienz O, Hehner SP, Droge W, MLSchmitz: **Synergistic activation of NF-kappa B by functional cooperation between vav and PKCtheta in T lymphocytes** *J Biol Chem* 2000, 275: 24547-51.

Dierks H, Kolanus J, WKolanus: **Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain** *J Biol Chem* 2001, 276: 37472-81.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Flies DB, van Deursen JMA, LChen: **B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes** *Immunity* 2004, 20: 327-36.

Eisenbraun MD, Tamir A, RAMiller: **Altered composition of the immunological synapse in an anergic, age-dependent memory T cell subset** *J Immunol* 2000, 164: 6105-12.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells** *Nature* 2001, 411: 494-8.

Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, Leonard J: **Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells** *Microcirculation* 2002, 9: 133-45.

Fields PE, Gajewski TF, Fitch FW: **Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells** *Science* 1996, 271: 1276-8.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudenski AY: **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells** *Nat Immunol* 2003, 4: 330-6.

Franco M, Boretto J, Robineau S, Monier S, Goud B, Chardin P, Chavrier P: **ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 9926-31.

Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE: **Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO** *Mol Biol Cell* 1998, 9: 3133-46.

Frauwirth KA, Thompson CB: **Regulation of T lymphocyte metabolism** *J Immunol* 2004, 172: 4661-5.

Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB: **The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism** *Immunity* 2002, 16: 769-77.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: **Engagement of the PD-1 immunoinhi-**

**bitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation** *J Exp Med* 2000, 192: 1027-34.

Freeman WM, Walker SJ, KEVrana: **Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential** *Biotechniques* 1999, 26: 112-22, 124-5.

Friedl P, den Boer AT, MGunzer: **Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse** *Nat Rev Immunol* 2005, 5: 532-45.

Fuss B, Becker T, Zinke I, MHoch: **The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in Drosophila** *Nature* 2006, 444: 945-8.

Geiger C, Nagel W, Boehm T, van Kooyk Y, Figdor CG, Kremmer E, Hogg N, Zeitlmann L, Dierks H, Weber KS, WKolanus: **Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1** *EMBO J* 2000, 19: 2525-36.

Go C, JMiller: **Differential induction of transcription factors that regulate the interleukin 2 gene during anergy induction and restimulation** *J Exp Med* 1992, 175: 1327-36.

Goldfarb SB, Kashlan OB, Watkins JN, Suaud L, Yan W, Kleyman TR, RCRubenstein: **Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103: 5817-22.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, MGRoncarolo: **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis** *Nature* 1997, 389: 737-42.

Hafner M, Schmitz A, Grune I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W, Quast T, Kremmer E, Bauer I, MFamulok: **Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance** *Nature* 2006, 444: 941-4.

Heissmeyer V, Macian F, Im S, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu Y, Dustin ML, ARao: **Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins** *Nat Immunol* 2004, 5: 255-65.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, RWatson: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions** *Biotechnology (N Y)* 1993, 11: 1026-30.

Hollenbeck PJ, WMSaxton: **The axonal transport of mitochondria** *J Cell Sci* 2005, 118: 5411-9.

Hori S, Nomura T, SSakaguchi: **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3** *Science* 2003, 299: 1057-61.

Hsieh C, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, AYRudensky: **Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors** *Immunity* 2004, 21: 267-77.

Hundt M, Tabata H, Jeon M, Hayashi K, Tanaka Y, Krishna R, De Giorgio L, Liu Y, Fukata M, AAltman: **Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect** *Immunity* 2006, 24: 513-22.

Isakov N, AAltman: **Protein kinase C(theta) in T cell activation** *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 761-94.

Janeway, Travers: **Immunologie 1997, Springer-Verlag**

Jenkins MK, Chen CA, Jung G, Mueller DL, RHSchwartz: **Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody** *J Immunol* 1990, 144: 16-22.

Jones LA, Chin LT, Longo DL, AMKruisbeek: **Peripheral clonal elimination of functional T cells** *Science* 1990a, 250: 1726-9.

Jones LA, Chin LT, Merriam GR, Nelson LM, AMKruisbeek: **Failure of clonal deletion in neonatally thymectomized mice: tolerance is preserved through clonal anergy** *J Exp Med* 1990b, 172: 1277-85.

Kane LP, Andres PG, Howland KC, Abbas AK, AWeiss: **Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines** *Nat Immunol* 2001, 2: 37-44.

Kang SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, MJLenardo: **Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy** *Science* 1992, 257: 1134-8.

Kearney ER, Pape KA, Loh DY, MKJenkins: **Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo** *Immunity* 1994, 1: 327-39.

Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, MPCzech: **Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains** *Science* 1997, 275: 1927-30.

Klarlund JK, Rameh LE, Cantley LC, Buxton JM, Holik JJ, Sakelis C, Patki V, Corvera S, MPCzech: **Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate** *J Biol Chem* 1998, 273: 1859-62.

Klarlund JK, Tsiaras W, Holik JJ, Chawla A, MPCzech: **Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs** *J Biol Chem* 2000, 275: 32816-21.

Kliche S, Nagel W, Kremmer E, Atzler C, Ege A, Knorr T, Koszinowski U, Kolanus W, JHaas: **Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane**

**recruitment of cytohesin-1** *Mol Cell* 2001, 7: 833-43.

Knolle PA, Alimmer: **Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells** *Swiss Med Wkly* 2003, 133: 501-6.

Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, AW-Lohse: **Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells** *Gastroenterology* 1999, 116: 1428-40.

Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Loser E, Schmitt E, Gerken G, AWLohse: **IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules** *Clin Exp Immunol* 1998, 114: 427-33.

Knolle PA: **Involvement of the liver in the induction of CD8 T cell tolerance towards oral antigen** *Z Gastroenterol* 2006, 44: 51-6.

Knorr T, Nagel W, WKolanus: **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: 3784-91.

Kolanus W, BSeed: **Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3** *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9: 725-31.

Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, BSeed: **Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule** *Cell* 1996, 86: 233-42.

Korthauer U, Nagel W, Davis EM, Le Beau MM, Menon RS, Mitchell EO, Kozak CA, Kolanus W, JABluestone: **Anergic T lymphocytes selectively express an integrin**

**regulatory protein of the cytohesin family** *J Immunol* 2000, 164: 308-18.

Kovary K, RBravo: **The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts** *Mol Cell Biol* 1991, 11: 4466-72.

Langille SE, Patki V, Klarlund JK, Buxton JM, Holik JJ, Chawla A, Corvera S, MP-Czech: **ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1** *J Biol Chem* 1999, 274: 27099-104.

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, JPouyssegur: **Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts** *J Cell Biol* 1993, 122: 1079-88.

Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, Qin HY, Fuchs E, Singh B, Thompson CB, JABluestone: **CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes** *Immunity* 1996, 5: 285-93.

Li W, Whaley CD, Mondino A, DLMueller: **Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells** *Science* 1996, 271: 1272-6.

Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, PAKnolle: **Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance** *Nat Med* 2000, 6: 1348-54.

Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, CBThompson: **Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway** *Science* 1989, 244: 339-43.

Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, JALedbetter: **Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation** *J Exp Med* 1991, 173: 721-30.

Liu Y, Liu YC, Meller N, Giampa L, Elly C, Doyle M, AAltman: **Protein kinase C activation inhibits tyrosine phosphorylation of Cbl and its recruitment of Src homology 2 domain-containing proteins** *J Immunol* 1999, 162: 7095-101.

Liu YC, AAltman: **Cbl: complex formation and functional implications** *Cell Signal* 1998, 10: 377-85.

Livak KJ, TDSchmittgen: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method** *Methods* 2001, 25: 402-8.

Lorenzo PS, Beheshti M, Pettit GR, Stone JC, PMBlumberg: **The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high -affinity target for diacylglycerol and phorbol esters** *Mol Pharmacol* 2000, 57: 840-6.

Macian F, Garcia-Cozar F, Im S, Horton HF, Byrne MC, ARao: **Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance** *Cell* 2002, 109: 719-31.

Macian F, Lopez-Rodriguez C, ARao: **Partners in transcription: NFAT and AP-1** *Oncogene* 2001, 20: 2476-89.

Madrenas J, Schwartz RH, RNGermain: **Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 9736-41.

Mathis D, CBenoist: **Back to central tolerance** *Immunity* 2004, 20: 509-16.

Meacci E, Tsai SC, Adamik R, Moss J, MVaughan: **Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 1745-8.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, BMBurgering: **AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1** *Nature* 2000, 404: 782-7.

Moss J, MVAughan: **Cytohesin-1 in 2001** *Arch Biochem Biophys* 2002, 397: 156-61.

Mueller DL, Chiodetti L, Bacon PA, RHSchwartz: **Clonal anergy blocks the response to IL-4, as well as the production of IL-2, in dual-producing T helper cell clones** *J Immunol* 1991, 147: 4118-25.

Mueller DL, Jenkins MK, RHSchwartz: **An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness** *J Immunol* 1989a, 142: 2617-28.

Mueller DL, Jenkins MK, RHSchwartz: **Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy** *Annu Rev Immunol* 1989b, 7: 445-80.

Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Scholmerich J, CHellerbrand: **PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis** *J Hepatol* 2006, 45: 520-8.

Mullis KB, FAFaloon: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction** *Methods Enzymol* 1987, 155: 335-50.

Muschen M, Warskulat U, Douillard P, Gilbert E, DHaussinger: **Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells** *Hepatology* 1998, 27: 200-8.

Muschen M, Warskulat U, Peters-Regehr T, Bode JG, Kubitz R, DHaussinger: **Involvement of CD95 (Apo-1/Fas) ligand expressed by rat Kupffer cells in hepatic immunoregulation** *Gastroenterology* 1999, 116: 666-77.

Nagel W, Schilcher P, Zeitlmann L, WKolanus: **The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function** *Mol Biol Cell* 1998, 9: 1981-94.

Nishimura H, Minato N, Nakano T, THonjo: **Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses** *Int Immunol* 1998, 10: 1563-72.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, THonjo: **Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor** *Immunity* 1999, 11: 141-51.

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, THonjo: **Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice** *Science* 2001, 291: 319-22.

O'Garra A, PVieira: **Twenty-first century Foxp3** *Nat Immunol* 2003, 4: 304-6.

Ogasawara M, Kim SC, Adamik R, Togawa A, Ferrans VJ, Takeda K, Kirby M, Moss J, MVAughan: **Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors** *J Biol Chem* 2000, 275: 3221-30.

Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H: **Ablation of tolerance and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice** *Cell* 1991, 65: 305-17.

Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T: **PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 13866-71.

Okazaki T, Honjo T: **The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance** *Trends Immunol* 2006, 27: 195-201.

Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H: **Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response** *Cell* 1991, 65: 319-31.

Pacheco-Rodriguez G, Patton WA, Adamik R, Yoo HS, Lee FJ, Zhang GF, Moss J, Vaughan M: **Structural elements of ADP-ribosylation factor 1 required for functional interaction with cytohesin-1** *J Biol Chem* 1999, 274: 12438-44.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL: **CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms** *Mol Cell Biol* 2005, 25: 9543-53.

Pasare C, Medzhitov R: **Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells** *Science* 2003, 299: 1033-6.

Perez OD, Mitchell D, Jager GC, South S, Murriel C, McBride J, Herzenberg LA, Kinoshita S, Nolan GP: **Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1** *Nat Immunol* 2003, 4: 1083-92.

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, AKAbbas: **Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement** *Immunity* 1997, 6: 411-7.

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, PHDuray: **Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 8372-7.

Prasad KV, Cai YC, Raab M, Duckworth B, Cantley L, Shoelson SE, CERudd: **T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 2834-8.

Ramsdell F: **Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?** *Immunity* 2003, 19: 165-8.

Rawlings DJ, Sommer K, MEMoreno-Garcia: **The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes** *Nat Rev Immunol* 2006, 6: 799-812.

Read S, Malmstrom V, FPowrie: **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation** *J Exp Med* 2000, 192: 295-302.

Ridgway WM, Weiner HL, CGFathman: **Regulation of autoimmune response** *Curr Opin Immunol* 1994, 6: 946-55.

Roncarolo MG, Gregori S, MLevings: **Type 1 T regulatory cells and their relationship with CD4+CD25+ T regulatory cells** *Novartis Found Symp* 2003, 252: 115-27; discussion 127-31, 203-10.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, HAerlich:

**Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase** *Science* 1988, 239: 487-91.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, NArnheim: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia** *Science* 1985, 230: 1350-4.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, MToda: **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases** *J Immunol* 1995, 155: 1151-64.

Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJI, Akiba H, Tushima F, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, SJKhoury: **Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis** *J Exp Med* 2003, 198: 71-8.

Schneider H, Cai YC, Prasad KV, Shoelson SE, CERudd: **T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras** *Eur J Immunol* 1995, 25: 1044-50.

Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, HQuill: **T-cell clonal anergy** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989, 54 Pt 2: 605-10.

Schwartz RH: **A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy** *Science* 1990, 248: 1349-56.

Schwartz RH: **Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?** *J Exp Med* 1996, 184: 1-8.

Serfling E, Avots A, MNeumann: **The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation** *Biochim Biophys Acta* 1995, 1263: 181-200.

Serfling E, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Bopp T, Stassen M, ESchmitt: **NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance** *Eur J Immunol* 2006, 36: 2837-43.

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, TWMak: **Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice** *Science* 1993, 261: 609-12.

Shevach EM: **Regulatory T cells in autoimmunity\*** *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 423-49.

Sloan-Lancaster J, Evavold BD, PMAllen: **Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells** *Nature* 1993, 363: 156-9.

Sloan-Lancaster J, Steinberg TH, PMAllen: **Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands** *J Exp Med* 1996, 184: 1525-30.

Spitaler M, DACantrell: **Protein kinase C and beyond** *Nat Immunol* 2004, 5: 785-90.

Stephanou A, DSLatchman: **Opposing actions of STAT-1 and STAT-3** *Growth Factors* 2005, 23: 177-82.

Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, PTHawkins: **Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B** *Science* 1997, 277: 567-70.

Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, Hedlund G, Kalland T, MDohlsten: **In vivo anergized CD4+ T cells express perturbed AP-1 and NF-kappa B transcription factors** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 979-84.

Teixeira C, Stang SL, Zheng Y, Beswick NS, JCStone: **Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3** *Blood* 2003, 102: 1414-20.

Telander DG, Malvey EN, DLMueller: **Evidence for repression of IL-2 gene activation in anergic T cells** *J Immunol* 1999, 162: 1460-5.

Theis MG, Knorre A, Kellersch B, Moelleken J, Wieland F, Kolanus W, MFamulok: **Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 11221-6.

Tsushima F, Yao S, Shin T, Flies A, Flies S, Xu H, Tamada K, Pardoll DM, LChen: **Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy** *Blood* 2007.

Venkateswarlu K, Gunn-Moore F, Tavare JM, Cullen PJ.: **EGF-and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain.** *Curr. Biol.* 1998, 8: 463-466.

Venkateswarlu K, Gunn-Moore F, Tavare JM, Cullen PJ.: **EGF-and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain.** *J. Cell Sci.* 1999, 112:1957-1965.

Villalba M, Bi K, Hu J, Altman Y, Bushway P, Reits E, Neefjes J, Baier G, Abraham RT, AAltman: **Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C** *J Cell Biol* 2002, 157: 253-63.

Villalba M, Coudronniere N, Deckert M, Teixeira E, Mas P, AAltman: **A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation** *Immunity* 2000, 12: 151-60.

Walker LSK, Chodos A, Eggena M, Dooms H, AKAbbas: **Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo** *J Exp Med* 2003, 198: 249-58.

Webb S, Morris C, JSprent: **Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity** *Cell* 1990, 63: 1249-56.

Weber KS, Weber C, Ostermann G, Dierks H, Nagel W, WKolanus: **Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines** *Curr Biol* 2001, 11: 1969-74.

Wilhelm J, APingoud: **Real-time polymerase chain reaction** *Chembiochem* 2003, 4: 1120-8.

Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A, Mellon M, Rauscher FJ3, JAKant: **Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression** *Science* 1991, 254: 1791-4.

Yi M, Weaver D, GHajnoczky: **Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit** *J Cell Biol* 2004, 167: 661-72.

Zhang W, Tribble RP, LESamelson: **LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation** *Immunity* 1998, 9: 239-46.

Zhang X, Schwartz JD, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, Cammer M, Chen L, Zhang Z, Edidin MA, Nathenson SG, SCAImo: **Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1** *Immunity* 2004, 20: 337-47.

Zuniga-Pflucker JC: **T-cell development made simple** *Nat Rev Immunol* 2004, 4: 67-72.



# Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Waldemar Kolanus herzlich für das interessante Thema und die stete Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

Michael Hoch danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und für die Ermöglichung meines Gastspiels in der AG Hoch.

Allen Kollegen unserer Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die schöne und humorvolle Atmosphäre, für den Crashkurs in bayrischer Mundart und das freundschaftliche vorder-Arbeit-Abhalten.

Besonders möchte ich mich bei Christa Mandel, Helga Ueing und Elke Thome für die hervorragende technische Unterstützung bedanken.

Im Besonderen danke ich Barbara Tappertzhofen (ohne die ich zweifellos “klaboppt“ geworden wäre) für ihre Schulter, ihre Ohrwürmer und die 15-Uhr-Phasen, die das Leben leichter gemacht haben.

Tom, Michael und Julia gilt mein Dank für die Lösung aller  $\LaTeX$ -Probleme (...obwohl man ja mit  $\LaTeX$  keine hat;-).

Linda Diehl und Marc Beyer danke ich für die unkomplizierte und immer nette Kooperation. Die Selbsthilfegruppe mit Markus Hafner für frustrierte Doktoranden hat maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Freunden gilt meine Anerkennung für das Verständnis gegenüber der wahnsinnig beschäftigte und total gestresste Bianca. Für die Motivation, die Ablenkung und Unterstützung in jeder Lebenslage möchte ich “Danke“ sagen.

Christian und meine Eltern verdienen das größte “Dankeschön“ für die stets liebevolle Unterstützung in nicht immer leichten Zeiten und für die Erkenntnis, was im Leben wirklich wichtig ist.