

**Die Hämatopoetische Progenitor Kinase (HPK) 1 und
NFAT-Transkriptionsfaktoren unterstützen
die Apoptose von T-Lymphozyten**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan Schulze-Lührmann

geb. am 15.09.1972 in Schlema

Würzburg, Mai 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1998 bis Januar 2002

am Institut für Pathologie, Abt. Molekulare Pathologie

der Universität Würzburg

unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Serfling angefertigt.

Eingereicht am: 23. Mai 2002

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. R. Hedrich (Dekan)

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. sc. Edgar Serfling

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 7. August 2002

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

(gemäß §4 Abs. 3 Nrn. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung für die Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe keine anderen als die im Lebenslauf angegebenen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im Mai 2002

Jan Schulze-Lührmann

Abkürzungsverzeichnis

4-Hydroxytamoxifen	([Z]-4-[1-(p-[Dimethylaminoethoxy]phenyl)-2-phenyl-1-butenyl]phenol)
7-AAD	7-Amino-actinomycin D
aa	„Amino Acid“ (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid hydrochlorid
Ag	Antigen
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
AP-1	„Activator Protein 1“
Apaf	apoptotischer Protease-aktivierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	„AntiSense“ (Gegensinn)
ATCC	„American Type Culture Collection“ (Am. Zellkultursammlung)
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine Serum Albumine“ (Rinder-Serum-Albumin)
BZR	B-Zell-Rezeptor
Caspase	Cystein-Aspartase
CD	„Cluster of Differentiation“ (Differenzierungscluster)
CD95L (FasL)	CD95-Ligand (Fas-Ligand)
cDNA	copy DNA
CsA	Cyclosporin A
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-Ag-4
DAG	Diazylglyzerin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dI/dC	desoxy-Inositol/desoxy-Cytosin
DISC	Zelltod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	„Desoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zelle (professionelle APZ)
ECACC	Europäische Sammlung von Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EGFP	verstärktes Grünfluoreszenz-Protein
EGTA	Ethylen Glykol-bis(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorter” (Durchflußzytometer)
FADD	Fas-assoziiertes Todesdomäne-enthaltendes Protein
FCS (FKS)	„Fetale Calf Serum“ (Fötales Kälberserum)
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärts-Streulicht
GALT	darmassoziierte lymphatische Gewebe
GCK	„Germinal centre kinase“ (Keimzentrums-Kinase)
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
Grb2	Wachstumsfaktor-gebundenes Protein 2
GSK	Glykogen-Synthetase-Kinase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HPK1	Hämatopoetische Progenitor (Vorläufer) Kinase 1
HRP	„Horse Radish Peroxidase“ (Meerrettich Peroxidase)
IAP	inhibitorische Apoptose-Proteine
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICOS	induzierbarer Kostimulator
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat

ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatormotiv
I κ B	inhibitorisches Protein von NF κ B
JAK	Janus-Familie der Tyrosin-Kinasen
JIP	JNK-interagierendes Gerüstprotein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAT	Linker aktivierter T-Zellen
LFA	„Lymphocyte Function-associated Ag“ (Leukozytenintegrin)
Luziferin	4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)-4-thiazol-carboxylsäure; C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂
MALT	Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCS	multiple Klonierungsstelle
MEK	MAP/ERK-Kinasen
MEKK	MEK-Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK	MAPK-Kinase
MLK3	„Mixed Lineage Kinase 3“
MOMP	„mitochondrial outer membrane permeabilisation“ (Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran)
mRNA	Boten-RNA
NC	Nitrozellulose
NFAT	Nukleärer Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen
NF κ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD1	programmierter Tod 1
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLC _γ	Phospholipase C _γ
Polybren	1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen polymethobromid Polybren
PTB	Phospho-Tyrosin-Bindedomäne
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNA (RNS)	„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffmetabolite
RT	Raumtemperatur
S _{Ag}	Superantigen
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEK	SAPK/ERK-Kinase
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
SSC	Seitwärts-Streulicht
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
Tab.	Tabelle
TAD	transaktivierende Domäne
tg	transgen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	„Unit“ (Enzym-Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
wt	wildtyp oder wildtypisch
ZAP-70	ζ -assoziiertes Protein von 70 kDa

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	16
1.1.	Zellen und Funktionen des Immunsystems	16
1.2.	Aktivierung und Differenzierung peripherer Lymphozyten.....	16
1.3.	Kostimulatorische Signale bei der T-Zell-Aktivierung.....	17
1.4.	Antigen-Erkennung durch T-Zellen	19
1.5.	Zytokine.....	20
1.6.	Der T-Zell-Rezeptor-Komplex.....	21
1.7.	Signaltransduktion nach T-Zell-Aktivierung	22
1.8.	Adaptor-Proteine	23
1.9.	Die intrazelluläre Signalweiterleitung.....	24
1.9.1.	Der Kalzium-Signalweg	24
1.9.2.	Der Proteinkinase C (PKC) -Signalweg	25
1.9.3.	Der Ras-Signalweg	26
1.9.4.	Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg	27
1.9.5.	Der MAP-Kinasen-Signalweg.....	27
1.9.6.	NFκB-Transkriptionsfaktoren	29
1.10.	T-Helferzell-Differenzierung	30
1.11.	Nekrose, Apoptose und AICD von T-Zellen.....	31
1.11.1.	Nekrose.....	31
1.11.2.	Apoptose.....	32
1.11.3.	Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg	33
1.11.4.	Typ-I- und Typ-II-Zellen.....	34

1.11.5.	Pro- und anti-apoptotisch wirksame Moleküle	35
1.11.6.	Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD)	37
1.12.	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	38
1.13.	Die Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 (HPK1).....	39
1.14.	Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren.....	43
1.15.	Zielsetzung dieser Arbeit.....	46
2.	<i>Material und Methoden</i>	48
2.1.	Chemikalien und Reaktionssysteme.....	48
2.2.	Lösungen und Puffer	52
2.3.	Enzyme	63
2.4.	Antikörper und Peptide.....	63
2.4.1.	Primäre monoklonale Antikörper	64
2.4.2.	Primäre polyklonale Antikörper	64
2.4.3.	Primäre gekoppelte Antikörper	64
2.4.4.	Sekundäre polyklonale Antikörper.....	65
2.4.5.	Sekundäre gekoppelte Antikörper	65
2.4.6.	Peptide	65
2.5.	Eingesetzte Oligonukleotide und Primer.....	65
2.6.	Größenstandards	67
2.6.1.	DNA-Fragmentlängenstandards	67
2.6.2.	Protein-Größenstandards	67
2.7.	Verwendete Plasmide und Konstruierte Vektoren	68
2.7.1.	Retrovirale Verpackungs- und Genexpressions-Vektoren.....	68

2.7.2.	Eukaryontische Expressionsplasmide	72
2.7.3.	Expressionsvektoren für bakterielle GST-Fusionsproteine.....	73
2.7.4.	Reporterplasmide für Luziferase-Assays	74
2.8.	Nährmedien	74
2.8.1.	Flüssigmedien und Agarplatten für die Bakterienkultur	74
2.8.2.	Zellzucht-Kulturmedien	76
2.9.	Antibiotika.....	76
2.10.	Bakterien.....	77
2.11.	Gewebekulturzellen.....	77
2.12.	Verbrauchsmaterialien.....	78
2.13.	Geräte	79
2.14.	Angaben zu den Herstellern	80
2.15.	Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	82
2.15.1.	Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien.....	82
2.15.2.	Induktion der Zellen	83
2.15.3.	Transiente Transfektionen	83
2.15.4.	Beschichtung von Gewebekulturplatten mit α CD3- oder α CD95-Antikörpern...	84
2.15.5.	Präparation und Stimulation von CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	84
2.15.5.1.	Isolation von Lymphknotenzellen.....	84
2.15.5.2.	Anreicherung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	84
2.15.5.3.	Anreicherung dendritischer Zellen der Milz	85
2.15.5.4.	T-Helferzell-Aktivierung und -Differenzierung	85
2.15.5.4.1.	T-Zell-Stimulation mit α CD3- und α CD28-Antikörpern.....	85
2.15.5.4.2.	T-Zell-Stimulation mit OVA-Peptid.....	85
2.15.5.4.3.	T-Zell-Differenzierung	86
2.15.6.	Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion der Zielzellen	86
2.15.6.1.	Kotransfektion in 293T-Zellen.....	86

2.15.6.2.	Ernte und Lagerung der retroviralen Überstände.....	87
2.15.6.3.	Infektion von WEHI-231 zur Kontrolle der retroviralen Überstände.....	87
2.15.6.4.	Infektion von Zielzellen.....	88
2.15.6.5.	Zeocin-Selektion transduzierter Zelllinien.....	88
2.15.7.	Induktion und Nachweis des apoptotischen Zelltodes.....	88
2.15.7.1.	Apoptose-Induktion.....	88
2.15.7.1.1.	Apoptose-Induktion durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	89
2.15.7.1.2.	Apoptose-Induktion primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten mit αCD3-Antikörpern.....	89
2.15.7.1.3.	Apoptose-Induktion primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten mit αCD95-Antikörpern.....	89
2.15.7.2.	Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG ₁ -Technik.....	89
2.15.7.3.	Bestimmung der Apoptoserate durch Markierung mit Annexin V-PE.....	90
2.15.8.	FACS-Färbung des zellulären CD95 (Fas)-Liganden.....	90
2.15.9.	Auswertung am FACScan.....	91
2.16.	Molekularbiologische Methoden.....	91
2.16.1.	Bakterienkulturen.....	91
2.16.1.1.	Übernachtskulturen.....	91
2.16.1.2.	Erhaltungskulturen.....	91
2.16.2.	Herstellung kompetenter Bakterien.....	92
2.16.3.	Transformation kompetenter Bakterien.....	92
2.16.4.	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> durch alkalische Lyse.....	92
2.16.4.1.	Plasmidisolierung in analytischen Mengen (Mini-Präparation).....	92
2.16.4.2.	Plasmidisolierung in präparativen Mengen (Maxi-Präparation).....	93
2.16.5.	Agarose-Gelelektrophorese.....	93
2.16.6.	Reinigung von DNA aus Agarose.....	94
2.16.7.	Enzymatische Manipulationen an DNA.....	94
2.16.7.1.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	94
2.16.7.2.	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	95
2.16.7.3.	Erzeugung glatter DNA-Enden durch die Klenow-Polymerase.....	95
2.16.7.4.	Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle.....	96
2.16.8.	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	96
2.16.9.	DNA-Sequenzierung.....	97

2.16.10.	DNA/Protein-Bindungsstudien mittels EMSA.....	98
2.16.10.1.	Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide	98
2.16.10.2.	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde mit ³² P-γATP.....	98
2.16.10.3.	Aufreinigung von ³² P-markierten DNA-Sonden.....	99
2.16.10.4.	Der Gelshift-Assay (EMSA).....	99
2.16.11.	RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen.....	100
2.16.12.	Die Ribonuklease-Protektions-Analyse.....	100
2.17.	Proteinbiochemische Methoden	101
2.17.1.	Präparation von rekombinantem GST-cJun ₅₋₈₉ -Protein.....	101
2.17.2.	Präparation von Proteinextrakten	102
2.17.2.1.	Präparation von Gesamtproteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	102
2.17.2.2.	Isolierung von Kernprotein- und Zytoplasmaextrakten eukaryontischer Zellen.....	102
2.17.3.	Immunpräzipitation (IP)	103
2.17.4.	<i>In vitro</i> Kinase-Assay	103
2.17.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Westernblot-Analyse	104
2.17.5.1.	SDS-PAGE	104
2.17.5.2.	Transfer auf eine Nitrozellulose- (NC-) Membran (Westernblot)	104
2.17.5.3.	Immundetektion	104
2.17.5.4.	Entfernung gebundener Ak von NC-Membranen (Strippen).....	105
2.17.6.	Reportergen-Analysen.....	105
2.17.6.1.	Luziferase-Reportergen-Assays	105
2.17.6.2.	β-Galaktosidase-Assays	106
2.17.6.3.	Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität.....	106
3.	<i>Ergebnisse</i>	107
3.1.	Die Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 unterstützt die Apoptose primärer T-Lymphozyten	107
3.1.1.	Die endogene HPK1-Expression und Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) werden während des AICD von CD4 ⁺ T-Zellen verstärkt	107

3.1.2.	Retroviral überexprimierte HPK1-Konstrukte sind funktional aktiv, doch nicht über eine modifizierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors regulierbar	109
3.1.3.	Die HPK1 fördert die spontane und unterstützt die α CD3-vermittelte Apoptose primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten	113
3.1.4.	Sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide sind an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt.....	115
3.1.5.	Die Expression des Fas-Liganden (CD95L) auf T-Lymphozyten wird durch die HPK1 gesteigert.....	118
3.2.	Die HPK1 verstärkt die ROS-vermittelte Apoptose über eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und die Inhibierung des NF κ B Signalweges	119
3.2.1.	Die endogene Expression und Spaltung der HPK1 wird durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) induziert	119
3.2.2.	Die Überexpression der HPK1 verstärkt die H ₂ O ₂ -induzierte Apoptose, während ein RNA-“antisense“ Konstrukt den apoptotischen Zelltod inhibiert ..	120
3.2.3.	Die ROS-vermittelte und durch HPK1 geförderte Apoptose in EL-4 T-Zellen ist nicht auf mRNA-Ebene reguliert.....	125
3.2.4.	Durch H ₂ O ₂ -Induktion ist eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung in HPK1-exprimierenden EL-4 T-Zellen zu beobachten	126
3.2.5.	Die HPK1 verstärkt die JNK- und, in geringerem Maße, die ERK- und p38 MAP-Kinase-Aktivierung in H ₂ O ₂ -induzierten EL-4 T-Zellen	127
3.2.6.	Das Gesamt-HPK1-Protein stimuliert, das C-terminale HPK1-Peptid hemmt die Aktivierung von NF κ B.....	129
3.2.7.	Die HPK1 hemmt die AP-1/ NFAT-vermittelte Gentranskription.....	132
3.3.	Auch in primären T-Lymphozyten aktiviert die HPK1 den JNK- und inhibiert den NF κ B-Signalweg.....	133
3.4.	Im Gegensatz zu NFATp und NFATc/C fördert NFATc/A nicht die Apoptose primärer T-Lymphozyten	136
3.4.1.	Während des AICD primärer CD4 ⁺ T-Helferzellen kommt es zu einer veränderten endogenen Expression der NFATc-Isoformen und der HPK1	136
3.4.2.	NFATp ^{-/-} -T-Zellen haben einen Defekt in der α CD3-vermittelten Apoptose ...	137
3.4.3.	NFATc/A übt im Gegensatz zu NFATp keinen proapoptotischen Effekt auf CD4 ⁺ T-Zellen aus.....	138
3.4.4.	NFATc/C fördert wie NFATp die spontane und α CD3-vermittelte Apoptose von T-Lymphozyten.....	140

4.	<i>Diskussion</i>	144
4.1.	Die HPK1 unterstützt die Apoptose primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten durch verstärkte FasL-Expression	144
4.2.	Die HPK1 verstärkt die ROS-vermittelte Apoptose durch erhöhte JNK-Aktivierung und Inhibierung des NFκB-Signalweges.....	148
4.3.	Während des AICD primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten aktiviert die HPK1 den JNK- und inhibiert den NFκB-Signalweg	155
4.4.	NFATc/A fördert im Gegensatz zu NFATc/C und NFATp nicht den AICD primärer CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	159
5.	<i>Zusammenfassung</i>	165
6.	<i>Summary</i>	168
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	170

1. Einleitung

1.1. Zellen und Funktionen des Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten, das sich aus den Zellen sowie Mechanismen der angeborenen unspezifischen Immunität und der erworbenen (adaptiven) spezifischen Immunreaktion zusammensetzt, dient als inneres Abwehrsystem gegen eindringende Bakterien, Viren, Protozoen, Pilze und Würmer sowie Krebserkrankungen. Eine wesentliche Eigenschaft dieses Systems ist es, körpereigene von körperfremden Strukturen (Antigenen) zu unterscheiden und nur gegen letztere zu reagieren.

Immunreaktionen werden durch Leukozyten vermittelt, die von Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen. Aus diesen bilden sich die polymorphkernigen Leukozyten und die Makrophagen des angeborenen Immunsystems sowie die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems.

Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: (1.) die B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen und (2.) die T-Lymphozyten, die sich im Thymus entwickeln. Darum bezeichnet man das Knochenmark und den Thymus als zentrale lymphatische Organe. Lymphozyten wandern ständig vom Blut zu den peripheren lymphatischen Organen, wo Antigene (Ag's) fixiert werden, und kehren über die Lymphgefäße in den Blutkreislauf zurück. Die drei Haupttypen des peripheren lymphatischen Gewebes, in denen die adaptiven Immunantworten ausgelöst werden, sind: die Milz, die Ag's aus dem Blut sammelt; die Lymphknoten (LN), die Ag's aus Infektionsherden im Gewebe festhalten; und die darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), die Ag's aus dem Darm aufnehmen [Janeway und Travers, 1997].

1.2. Aktivierung und Differenzierung peripherer Lymphozyten

Die Proliferation der B-Lymphozyten wird durch Interaktionen des B-Zell-Rezeptors (BZR) mit entsprechenden Ag's und von T-Helferzellen sezernierten Zytokinen induziert (klonale Selektion und -Expansion). Die B-Zellen differenzieren dann zu Plasmazellen, die Antikörper (sog. Immunglobuline – Ig's) sezernieren und so die humorale Immunität vermitteln. Dabei wirken die Ig's neutralisierend, fördern die Phagozytose durch „Markierung“ der Erregeroberfläche (Opsonisierung) und aktivieren das Komplementsystem. Die BZR's und ihre sezernierten Formen, die Ig's, erkennen dreidimensionale Strukturen unterschiedlichster

Molekülklassen, wie z.B. Strukturen von Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren oder Lipiden [Janeway und Travers, 1997].

Alle Reaktionen von Lymphozyten auf ein Ag erfordern ein zweites Signal, das von einer anderen Zelle stammt. Für T-Lymphozyten kann dieses Signal von drei verschiedenen Zelltypen kommen: von dendritischen Zellen (DZ's), Makrophagen oder B-Zellen. Die Vorläufer dieser Zellen halten in der Peripherie Ag's fest und wandern dann zu den lymphatischen Geweben, wo sie die Ag's den T-Zellen präsentieren. Deshalb werden sie als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet [Janeway und Travers, 1997].

Das Erkennen des Ag's führt zuerst zu einer Expansion des spezifischen T-Zell-Klons und zur Synthese von Lymphokinen in diesen Zellen. Während der primären Immunantwort differenzieren die jeweiligen Klone zu spezialisierten Zellen mit verschiedenen Funktionen. Einerseits entstehen Gedächtniszellen, die bei einem zweiten Ag-Kontakt eine schnellere und stärkere Immunantwort vermitteln. Auf der anderen Seite differenzieren die naiven T-Lymphozyten zu verschiedenen T-Effektorzellen, die bei der Immunabwehr unterschiedliche Funktionen ausüben. Das heutige Zwei-Signal-Modell der T-Zell-Aktivierung stammt von der Theorie der B-Zell-Aktivierung [Bretscher und Cohn, 1970] und deren Übertragung auf T-Zellen [Lafferty und Cunningham, 1975] ab. Es besagt, dass neben der T-Zell-Stimulation durch Interaktion von Ag, Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und T-Zell-Rezeptor (TZR) noch andere kostimulatorische Signale zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle erforderlich sind [Janeway und Bottomly, 1994]. Zudem beeinflussen Zytokine das Entwicklungsschicksal aktivierter Immunzellen erheblich [Mosmann und Sad, 1996].

1.3. Kostimulatorische Signale bei der T-Zell-Aktivierung

In verschiedenen experimentellen Systemen wurde nachgewiesen, dass die TZR-Ligation allein nicht zur Aktivierung naiver T-Zellen führt, sondern Zelltod oder Anergie auslösen kann [Schwartz, 1996; Janssen *et al.*, 2000]. T-Zellen, deren Rezeptoren ihre Liganden ohne gleichzeitige kostimulierende Signale binden, produzieren kein Interleukin-2 (IL-2). Diese unvollständig stimulierten T-Zellen fallen stattdessen in den refraktären Zustand der Anergie und können nicht mehr proliferieren. Zu den in diesen Zellen gestörten Signalwegen gehören die durch Ras aktivierten MAP-Kinasekaskaden, wodurch sowohl die ERK- als auch die JNK-Aktivierung ausfällt [Fields *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Chirmule *et al.*, 1999].

Aktivierung und Proliferation der T-Zellen werden durch zusätzliche kostimulatorische Signale induziert. Der bekannteste Rezeptor für kostimulatorische Interaktionen ist das als Homodimer auf T-Zellen exprimierte CD28 [Aruffo und Seed, 1987; Lenschow *et al.*, 1996]. Die am besten charakterisierten kostimulierenden Moleküle auf APZ's sind die strukturverwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die Liganden des CD28 sind [Larsen *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1993]. 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 die Signalweiterleitung in das Zellinnere u.a. über Adaptoren (s. 1.8.) und Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt.

Bei naiven T-Zellen ist CD28 der einzige Rezeptor für B7. Das über CD28 vermittelte kostimulatorische Signal beeinflusst verschiedene Aspekte der T-Zell-Physiologie und führt in der Gesamtheit zu einer verstärkten T-Zell-Immunantwort. So wird die Zytokinsekretion (wie von IL-2) und Zelladhäsion erhöht, die Expression des anti-apoptotischen Bcl_{XL} induziert sowie Anergie verhindert [McAdam *et al.*, 1998; Lanzavecchia *et al.*, 1999].

Aktivierte T-Zellen exprimieren zusätzliche CD28-ähnliche Rezeptoren [Chambers und Allison, 1997]. Der induzierbare Kostimulator ICOS sorgt für eine längere proliferative Phase nach TZR-Stimulation und fördert T-Effektorzell-Funktionen [Hutloff *et al.*, 1999]. ICOS spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-abhängigen B-Zell-Hilfe über die erhöhte Zytokinsekretion von IL-4, IL-5, IL-10, Interferon γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und durch die verstärkte Expression des CD40-Liganden [Coyle *et al.*, 2000]. Der natürliche Ligand für ICOS ist das B7 Homolog (B7h), das auf B-Zellen sowie einigen Makrophagen und DZ's exprimiert wird [Yoshinaga *et al.*, 1999].

Über das zytotoxische T-Lymphozyten-Ag-4 (CTLA-4) werden inhibitorische Signale vermittelt. CTLA-4 (CD152) hat eine 20-fach höhere Bindeaffinität als CD28 für B7-Moleküle und spielt eine wesentliche Rolle bei der Begrenzung der proliferativen Antwort aktivierter T-Zellen auf Ag's [Chambers, 2001]. Dies beruht u.a. auf der Hemmung der IL-2-Synthese [Janeway und Travers, 1997]. Das kostimulatorische CTLA-4-Signal kann in der T-Zelle Toleranz und Anergie induzieren [Guerder *et al.*, 1994; Alegre *et al.*, 2001].

Ein weiterer Korezeptor ist PD1 (programmierter Tod 1), dessen physiologische Funktion noch untersucht wird. Durch das PD1-vermittelte Signal wird in T-Zellen die Sekretion der Zytokine IL-2, IL-10 und IFN γ inhibiert [Freeman *et al.*, 2000]. Außerdem wird diskutiert, dass PD1 in B-Zellen ein inhibitorisches Signal vermittelt [Nishimura *et al.*, 1998].

Das Zwei-Signal-Modell der T-Zell-Aktivierung wieder aufgreifend wurde von Chambers (2001) folgende Hypothese für die Stimulierung naiver T-Zellen postuliert:

- (1.) APZ initiieren über die B7/CD28-vermittelte Kostimulation in Verbindung mit dem MHC/Peptid-vermittelten TZR-Signal die Aktivierung der T-Zelle.
- (2.) Dadurch wird u.a. die Expression von ICOS und indirekt die von Proteinen der B7-Familie induziert. Die über ICOS vermittelte Kostimulation kann zu einer weiteren T-Zell-Expansion führen und beeinflusst die Differenzierung sowie die Effektorfunktionen der T-Zellen.
- (3.) Gleichzeitig kommt es zur Hochregulierung und Translokation von CTLA-4 zur Zellmembran, das durch die Konkurrenz mit CD28 zur Inhibierung der T-Zell-Aktivierung in einer frühen Phase der Stimulation führen kann.
- (4.) CTLA-4 und PD1 werden verstärkt über mehrere Tage nach der T-Zell-Aktivierung exprimiert und können die adaptive Immunantwort über die von ihnen übertragenen inhibitorischen Signale einschränken, abschwächen oder gar verhindern.

Außer den B7-Molekülen müssen APZ auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, ICAM-2 und LFA-3 exprimieren. Nur die genau regulierte Interaktion aller beteiligten Moleküle führt zur kompletten Aktivierung der T-Zelle und damit zu einer Immunantwort nach Ag-Erkennung.

1.4. Antigen-Erkennung durch T-Zellen

Das charakteristischste Merkmal der Ag-Erkennung durch T-Zellen ist die Form des Liganden, der vom T-Zell-Rezeptor (TZR) erkannt wird. Dieser Ligand besteht aus einem Peptid, das vom fremden Ag stammt und an ein MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex)-Molekül gebunden ist. MHC-Moleküle sind Glykoproteine auf der Zelloberfläche, deren extrazellulärer Teil eine peptidbindende Furche aufweist. Diese kann eine Vielzahl verschiedener Peptide aufnehmen. Das MHC-Molekül bindet das Peptid an einem intrazellulären Ort und befördert es an die Zelloberfläche, wo der kombinierte Ligand von einer T-Zelle erkannt werden kann [Janeway und Travers, 1997]. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I- (MHC-I) und MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II).

Peptide von viralen Pathogenen, die sich im Zytoplasma der Zelle vermehren, werden von MHC-I-Molekülen an die Zelloberfläche gebracht und CD8⁺ T-Zellen präsentiert, die zu zytotoxischen T-Zellen ausdifferenzieren und infizierte Zellen töten.

Antigene von Krankheitserregern, die in intrazellulären Vesikeln persistieren bzw. sich vermehren, und solche, die von aufgenommenen extrazellulären Bakterien und Toxinen abstammen, werden von MHC-II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und den CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. Diese können zu zwei Arten von Effektorzellen differenzieren (s. 1.10.). Pathogene, die sich in großer Zahl in Vesikeln von Makrophagen ansammeln, regen gewöhnlich die Differenzierung von T_H1-Zellen an. Extrazelluläre Ag's stimulieren dagegen eher die Bildung von T_H2-Zellen. T_H1-Zellen aktivieren die keimtötenden Eigenschaften von Makrophagen und regen B-Zellen dazu an, IgG-Antikörper (Ak) zu synthetisieren. Diese opsonisieren sehr effektiv extrazelluläre Pathogene für die Aufnahme durch phagozytierende Zellen. T_H2-Zellen lösen, indem sie naive Ag-spezifische B-Zellen anregen, IgM-Ak zu bilden, eine humorale Immunantwort aus. Im Anschluss daran aktivieren sie je nachdem zusätzlich noch die Bildung verschiedener Ig-Isotypen (u.a. IgA und IgE) sowie von neutralisierenden und/oder schwach opsonisierenden Subtypen von IgG [Janeway und Travers, 1997].

Eine weitere Form der T-Zell-Aktivierung erfolgt über sogenannte Superantigene (SAg), die von verschiedenen pathogenen Keimen produziert werden und direkt, d.h. ohne eine Prozessierung in der Zelle, an MHC-II-Moleküle und spezifitätsunabhängig an den TZR binden [Herman *et al.*, 1991]. Ein SAg kann 2-10 % aller T-Zellen stimulieren, während ein normales Ag nur von etwa 1/10.000 der T-Zellen erkannt wird. Prototypen dieser Moleküle sind die an Lebensmittelvergiftungen beteiligten Enterotoxine A-E von *Staphylococcus aureus* [Hacker und Heesemann, 2000].

1.5. Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine von Zellen, die als lösliche Botenstoffe das Verhalten und/oder die Eigenschaften der eigenen oder anderer Zellen verändern. Von Lymphozyten produzierte Zytokine nennt man oft auch Lymphokine oder Interleukine (IL's). Sie wirken über spezifische Rezeptoren auf ihre Zielzellen. Bisher sind mehr als 200 Zytokine, zu denen IL's, Wachstumsfaktoren, Hämatopoetine, Chemokine und Interferone sowie die Mitglieder der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Familie zählen, identifiziert worden [Callard *et al.*, 1999]. Sowohl die Sekretion von Zytokinen als auch die Expression der Zytokin-Rezeptoren unterliegen einer komplexen biologischen Regulation. Im Gegensatz zu Hormonen werden Zytokine meist nicht konstitutiv, sondern erst nach Aktivierung der entsprechenden Zelle synthetisiert und wirken überwiegend in der Umgebung der sezernierenden Zelle. Aufgrund

der ähnlichen genomischen Struktur und gemeinsamer Rezeptorbenutzung zeigen Zytokine häufig ähnliche und redundante Funktionen. Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt oft über den JAK (Janus-Familie der Tyrosin-Kinasen)/STAT (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription)-Signaltransduktionsweg [Imada und Leonard, 2000]. Weitere bedeutsame Signalübertragungswege nach der Zytokin-Rezeptor-Aktivierung sind der Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweg und der PKB/Akt-Signalweg [Van Parijs *et al.*, 1999]. Außerdem kommt es zur Aktivierung der Src-ähnlichen Kinasen Lck, Fyn und Syk [Ihle und Kerr, 1995].

Im Folgenden soll auf IL-2 und seine Rezeptoren, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, näher eingegangen werden. IL-2 wird in der Regel von aktivierten T-Zellen synthetisiert und ist als T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) beschrieben worden [Gillis *et al.*, 1982]. Es wirkt *in vitro* sowohl auto- als auch parakrin auf die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen, B-Zellen und auf einige nicht-lymphoide Zellen [Taniguchi und Minami, 1993]. IL-2 regt die Synthese und Sezernierung weiterer Zytokine an. Außerdem wurde eine entscheidende Rolle des IL-2 bei der Sensibilisierung der T-Zellen für den CD95-vermittelten Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) nachgewiesen [Kneitz *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1999]. Die Bindung von IL-2 sowie die Signalübertragung erfolgt über den IL-2-Rezeptorkomplex, der sich im optimalen Fall aus 3 unabhängig voneinander regulierten Untereinheiten zusammensetzt. Dabei ist die Expression dieser 3 Ketten (α , β , γ) auf lymphoiden Zellen vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig. Der konstitutiv auf lymphoiden Zellen exprimierte IL-2R γ ist sowohl bei der intrazellulären Signalweiterleitung als auch bei der IL-2-Internalisation und für die Stabilität des IL-2-Rezeptorkomplexes von Bedeutung [Takeshita *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 1993]. Die γ -Kette ist nicht spezifisch für den IL-2R. Vielmehr ist diese herkömmliche („common“) γ -Kette ein Bestandteil der Rezeptorenkomplexe für die Interleukine 4, 7, 9, 15 und 21. Zum IL-15-Rezeptorkomplex gehört zudem die IL-2R β -Kette [Bamford *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1995]. Die Expression der IL-2 spezifischen IL-2R α -Kette wird wie das IL-2 Gen erst nach T-Zell-Aktivierung induziert.

1.6. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Der TZR ist ein multimerischer, über Disulfidbrücken verbundener Polypeptidketten-Komplex, der sich aus Ag-spezifischen α/β - oder γ/δ -Heterodimeren zusammensetzt, die den Peptid/MHC-Liganden über ihre variablen Regionen erkennen [Sun *et al.*, 1995; Sant'Angelo

et al., 1996]. Der überwiegende Teil der T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen exprimiert den α/β -TZR, während nur 1-5 % den γ/δ -TZR exprimieren. In anderen Geweben wie im Epithelium, insbesondere in der Epidermis und dem Dünndarm der Maus, tragen die meisten T-Zellen den γ/δ -TZR. Den Ketten des TZR-Heterodimers fehlt eine große zytoplasmatische Domäne, die die Übertragung eines Signals in die Zelle bewerkstelligen könnte. Stattdessen übernehmen die Transmembranproteine des CD3-Komplexes (γ , δ , ϵ) diese Funktion, die wie die ζ/ζ -Ketten oder ζ/η -Heterodimere in der Maus nicht kovalent mit dem TZR verbunden sind [de la Hera *et al.*, 1991; Manolios *et al.*, 1991; Weiss und Littman, 1994]. Der typische CD3-Komplex des Menschen setzt sich aus einem CD3 ζ -Dimer sowie einem CD3 $\epsilon\delta$ - und einem CD3 $\epsilon\gamma$ -Heterodimer zusammen [van Leeuwen und Samelson, 1999]. Außerdem werden die Korezeptoren („Differenzierungsantigene“) CD4 und CD8 zu den TZR-assoziierten Proteinen gezählt.

1.7. Signaltransduktion nach T-Zell-Aktivierung

Die zytoplasmatischen Domänen der CD3-Proteine enthalten Sequenzmotive, die man als ITAM's (Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivator-motive) bezeichnet [Irving *et al.*, 1993]. Diese Sequenzen ermöglichen es den CD3-Proteinen, nach der Stimulierung des Rezeptors mit zytosolischen Proteintyrosinkinasen (PTK) zu assoziieren und so das Signal in das Zellinnere zu übertragen, wobei dafür besonders CD3 ϵ und die ζ -Ketten wichtig sind [Weiss und Littman, 1994; Janeway und Travers, 1997]. Während Wachstumsfaktor-Rezeptoren selbst PTK's sind [van der Geer *et al.*, 1994], fehlt dem TZR-Komplex eine intrinsische enzymatische Aktivität, so dass Protein-Protein-Wechselwirkungen für die TZR-Signaltransduktion erforderlich sind. Zu einer optimalen Nachrichtenübermittlung durch den TZR kommt es nur nach einer Komplexbildung des Rezeptors mit den Korezeptoren CD4 und CD8, wobei die Aggregation des Rezeptors zusammen mit der Proteintyrosinphosphatase (PTP) CD45, die die Lck-Tyrosinkinase aktiviert [Frearson und Alexander, 1996; Musci *et al.*, 1997], eine Kaskade von Signalreaktionen auslöst, die in ihrer Gesamtheit die T-Zelle aktivieren können.

Die ersten Schritte der Signalgebung beruhen wahrscheinlich auf zwei PTK's der Src-Familie: der Lck (p56), die konstitutiv mit der zytoplasmatischen Domäne der Korezeptormoleküle CD4 und CD8 verbunden ist, und der zytosolischen Fyn (p59), die sich bei der Rezeptoraggregation an die zytoplasmatischen Domänen der CD3 ζ - und CD3 ϵ -Kette anlagert

[Chalupny *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 1991; Glaichenhaus *et al.*, 1991]. Nach Phosphorylierung der ITAM's können weitere zytosolische PTK's an den TZR-Komplex binden.

Besonders wichtig für die weitere Signalübertragung ist die Phosphorylierung des ζ -assoziierten Proteins-70 (ZAP-70) durch Fyn und Lck [Gobel und Bolliger, 2000; Kane *et al.*, 2000]. Personen, denen ZAP-70 fehlt, besitzen T-Zellen, die zwar normal reifen, aber nicht auf Signale reagieren, die ihre Ag-Rezeptoren weitergeben [Arpaia *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1994]. Aktiviertes ZAP-70 kann multiple Substrate phosphorylieren und damit ein TZR-Signal an verschiedene Signaltransduktionskaskaden weiterleiten. So kommt es zur Rekrutierung von Adaptormolekülen und zur Bildung eines hochkomplexen Signalosoms, das (1.) die Aktivierung des Ras-MAPK-Signalweges, (2.) eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die wiederum zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin und des Transkriptionsfaktors NFAT führt, und (3.) „über“ die Proteinkinase $\text{C}\theta$ (PKC θ) die Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren bewirkt [Sun *et al.*, 2000b; Bi und Altman, 2001; Arendt *et al.*, 2002].

1.8. Adaptor-Proteine

Als Adaptoren werden Signalmoleküle bezeichnet, denen eine eigene enzymatische oder transkriptionelle Aktivität fehlt. Sie bestehen aus mehreren Interaktionsdomänen, wie Src-Homologie-Domäne 2 (SH2), SH3 und Phospho-Tyrosin-Bindedomänen (PTB's). Außerdem enthalten sie oft mehrere Bindemotive für diese Domänen. Adaptoren ermöglichen über Protein-Protein-Wechselwirkungen die Integration verschiedener Signalübertragungswege in der Zelle. Sie werden oftmals Zelltyp-spezifisch exprimiert und tragen zur Bildung von Signalkomplexen bei, die der Kopplung Zelltyp-spezifischer Rezeptoren mit ubiquitären Signalübertragungswegen dienen.

Wichtige Adaptor-Proteine für die T-Zell-Signaltransduktion sind der Linker aktivierter T-Zellen (LAT), das Wachstumsfaktor-gebundene Protein 2 (Grb2), ein Grb2 verwandter Adaptor in hämatopoetischen Zellen (GADS) sowie das SH2-Domäne-enhaltende Leukozyten-Protein von 76 kDa (SLP-76) [Zhang und Samelson, 2000; Judd und Koretzky, 2001; Liu *et al.*, 2001; Wonerow und Watson, 2001].

Der Prototyp eines Adaptormoleküls ist Grb2, das aus einer zentralen SH2-Domäne besteht, die von zwei SH3-Domänen flankiert wird [Lowenstein *et al.*, 1992; Matuoka *et al.*, 1992]. Grb2 ist im Zytoplasma konstitutiv über seine N-terminale SH3-Domäne mit dem Guanin-

nukleotid-Austauschfaktor Sos verbunden [Chardin *et al.*, 1993; Olivier *et al.*, 1993; Raabe *et al.*, 1995]. Eine Liganden-induzierte Aktivierung der PTK's führt zur Translokation des Grb2-Sos-Komplexes an die Zellmembran, wo Sos die GTP-Beladung und damit die Aktivierung des prominenten Onkogens Ras bewirkt [Rozakis-Adcock *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1993; Pawson, 1994; Ellis und Clark, 2000; Schlessinger, 2000], welches ein zentrales Schaltermolekül der zellulären Wachstumskontrolle ist [Bar-Sagi und Hall, 2000; Avruch *et al.*, 2001].

1.9. Die intrazelluläre Signalweiterleitung

Phosphorylierte Tyrosinreste sind Bindungsstellen für SH2- und SH3-Domänen enthaltende Proteine. Weitere, in der Kaskade vorkommende Zielmoleküle der TZR-stimulierten PTK's sind die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) sowie Ras [Exley *et al.*, 1994; Hallberg *et al.*, 1994; Weiss und Littman, 1994].

1.9.1. Der Kalzium-Signalweg

Bereits 15 s nach der Aktivierung der PTK's wird ein weiteres Enzym, die PLC γ 1, durch die p56 Lck/ZAP-70-vermittelte Phosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten aktiviert [Dustin und Chan, 2000]. Die PLC bindet an den als Gerüstprotein („Scaffold“-Protein) fungierenden LAT und wird so an die Zellmembran rekrutiert. Gerüstproteine binden gleichzeitig mehrere Proteine und erlauben damit die Komplexbildung von Schlüsselkomponenten spezifischer Signalübertragungswege und die Abgrenzung zu anderen, ähnlichen Signalkaskaden [Whitmarsh und Davis, 1998].

PLC γ 1 hydrolysiert das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-di-phosphat (PIP $_2$) zu den zwei „Second-Messenger“-Molekülen Diazylglyzerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$). Während DAG zur Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)-Signalwegen führt, spielt IP $_3$, das an intrazelluläre Rezeptoren bindet, eine bedeutende Rolle im Kalzium-Signalübertragungsweg [Clapham, 1995]. Diese durch die PLC γ initiierten Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der IL-2-Transkription führen [Weiss und Imboden, 1987], können durch Phorbolester (z.B. TPA, das in seiner Struktur dem DAG ähnelt) und Kalzium-Ionophore (z.B. Ionomycin) imitiert werden [Ullman *et al.*, 1990].

IP $_3$ setzt Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern frei. Zusätzlich werden in den T-Zell-Membranen spezifische Ca $^{2+}$ -Kanäle geöffnet, so dass extrazelluläres Ca $^{2+}$ eindringen kann. Die erhöhte

Ca²⁺-Konzentration im Zytosol aktiviert über einen Ca²⁺/Calmodulin-Komplex die zytosolische Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin, die von den NFAT-Proteinen Phosphatgruppen entfernt [Clipstone und Crabtree, 1992]. Dadurch können die NFAT's in den Zellkern eindringen und oft zusammen mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 an DNA binden [Rao *et al.*, 1997; Serfling *et al.*, 2000]. AP-1 setzt sich aus Heterodimeren der Kernproteine Fos und Jun zusammen. Während AP-1 in vielen Zellen aktiv ist, kommt das zytosolische NFAT in den höchsten Konzentrationen in T-Zellen vor. Deshalb ist die Blockade des Signalweges, der zur NFAT-Aktivierung führt, ein wichtiges Mittel, um spezifisch die T-Zell-Reaktion zu hemmen. Die Signalübertragung wird in T-Zellen durch 2 Immunsuppressiva wirksam blockiert: Cyclosporin A (CsA) und FK506 [Mattila *et al.*, 1990; Brabletz *et al.*, 1991]. Diese bilden Komplexe mit ihren intrazellulären Rezeptoren, den Immunophilinen. Die Komplexe binden dann an Calcineurin und maskieren die Calmodulin-Bindestelle dieser Phosphatase, die dadurch inhibiert wird [Schreiber, 1992]. Calcineurin ist auch an der Ca²⁺-abhängigen Induktion der NFκB-Transkriptionsfaktoren beteiligt [Frantz *et al.*, 1994; Marienfeld *et al.*, 1997]. Weiterhin spielt das Ca²⁺-Signal bei der Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) nach TZR/CD28-Stimulation eine Rolle [Su *et al.*, 1994].

1.9.2. Der Proteinkinase C (PKC) -Signalweg

Mitglieder der Familie der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen C (PKC's) werden oft gewebespezifisch exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung der Zelle; aber auch bei der Apoptose, wobei sie durch zahlreiche Stimuli aktiviert werden und selbst verschiedene Signalübertragungswege aktivieren [Newton, 1997; Jaken und Parker, 2000]. Die PKC's untergliedern sich in 3 Subfamilien: **(1.)** die typischen Ca²⁺-abhängigen PKC's α, β und γ; **(2.)** die Ca²⁺-unabhängigen PKC's δ, ε, η, θ und μ sowie **(3.)** die atypischen PKC's ζ und ι/λ [Parolini *et al.*, 1999]. Einzelne PKC's binden nach Aktivierung durch PLCγ freigesetztes DAG und anderen Kofaktoren wie z.B. Ca²⁺ an spezifische intrazelluläre Gerüstproteine - den Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen (RACK's) - und werden so unterschiedlich sublokalisiert sowie in die Nähe ihrer Substrate gebracht [Mochly-Rosen, 1995; Monks *et al.*, 1997].

Von den in T-Zellen exprimierten PKC's spielt die Ca²⁺-unabhängige PKCθ (theta) eine besondere Rolle bei der TZR/CD28-vermittelten Signalübertragung [Arendt *et al.*, 2002]. PKCθ ist nach TZR-Stimulation als einzigste PKC in den Lipid-Rafts lokalisiert und wichtig für die IL-2-Expression [Altman *et al.*, 2000; Bi und Altman, 2001; Bi *et al.*, 2001;

Stinchcombe *et al.*, 2001]. PKC θ aktiviert spezifisch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B [Baier-Bitterlich *et al.*, 1996; Coudronniere *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000] sowie gemeinsam mit Calcineurin NFAT und das IL-2-Gen [Werlen *et al.*, 1998]. Periphere T-Zellen PKC θ -defizienter Mäuse sind unfähig, nach TZR/CD28-Stimulation zu proliferieren, zeigen keine AP-1- oder NF κ B-Aktivierung, exprimieren kein IL-2 und nur schwach CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors [Sun *et al.*, 2000b]. Die proximalen Signalkaskaden sowie die ERK/JNK/p38-MAPK-Aktivierung und NFAT-Aktivität sind dagegen nicht gestört [Sun *et al.*, 2000b]. Diese Veränderungen sind spezifisch für die TZR-Signalübertragung in PKC θ -defizienten peripheren T-Zellen und fehlen dagegen in PKC θ -defizienten Thymozyten. PKC θ reguliert die AP-1-Aktivität unabhängig vom JNK-Signalübertragungsweg, offenbar auf der Ebene der c-Fos- oder c-Jun-Transkription [Sun *et al.*, 2000b]. Die PKC θ -vermittelte NF κ B-Aktivierung wird durch den IKK-Signalweg gefördert [Khoshnan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000], wobei eine wichtige Rolle von IKK ϵ diskutiert wird [Peters *et al.*, 2000]. Nach TZR-Stimulation assoziiert die PKC θ mit den Tyrosinkinase Lck und Fyn sowie dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav [Ron *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000b; Villalba *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2001]. Letzterer ist wichtig für den Ca²⁺-Flux und die NFAT-Aktivierung und beeinflusst PKC θ -unabhängige Signalwege [Sun *et al.*, 2000b]. Nach Substraten der PKC θ und damit weiteren Effektor-Funktionen wird intensiv gesucht. Als erste mögliche Kandidaten wurden das Adaptor-Protein Cbl und das pro-apoptotische Molekül Bad beschrieben, das durch PKC θ inhibiert wird [Liu *et al.*, 1999b; Villalba *et al.*, 2001]. Der Phänotyp Bcl-10-defizienter Mäuse ist mit dem der PKC θ -defizienten Mäuse fast identisch [Sun *et al.*, 2000b; Ruland *et al.*, 2001]. Deshalb wird angenommen, dass das pro-apoptotische Bcl-10, das offenbar eine wichtige Rolle in Mukosa-assoziierten Tumoren lymphatischer Gewebe (MALT-Lymphomen) spielt, ein unmittelbares PKC θ -Substrat in der NF κ B-Aktivierung nach TZR-Stimulation ist [Willis *et al.*, 1999; Gaide *et al.*, 2001; Ruland *et al.*, 2001].

1.9.3. Der Ras-Signalweg

Die PTK's aktivieren das GTP-bindende Protein Ras (p21 Ras) über den rekrutierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) Sos/Grb2-Komplex (s. 1.8.). Die Interaktion von Ras-GDP mit einem GEF führt zur Dissoziation von GDP und nachfolgender GTP-Bindung, dessen intrazelluläre Konzentration höher ist als die von GDP. Unterschiedliche Signale aktivieren verschiedene zelluläre GEF's [Bar-Sagi und Hall, 2000]. Außerdem können andere GTP-

bindende Proteine wie Cdc42, Rho und Rac die Funktionen von Ras übernehmen [Hunter, 1997]. Ras-GTP ist in der Lage, multiple Effektorproteine zu aktivieren.

Für die Signalweiterleitung nach TZR-Stimulation ist die Ras-GTP-vermittelte Aktivierung (Phosphorylierung an Serin- und Tyrosinresten) und Oligomerisierung der Serin/Threonin-Proteinkinase Raf bedeutend, die dazu an die Plasmamembran translokalisiert wird [Farrar *et al.*, 1996; Avruch *et al.*, 2001]. Raf steht am Anfang einer hierarchischen dreistufigen Kinasekaskade, die zur Aktivierung der prototypischen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen oder MAPK's) ERK1/2 (Extrazellulär-regulierte Kinasen) führt. Raf phosphoryliert zuerst Threonin/Tyrosin-spezifische MAP/ERK-Kinasen (MEK's), die ihrerseits ERK1/2 phosphorylieren und damit aktivieren [Marshall, 1994]. Die durch Phosphorylierung aktivierten Formen der MAPK's wandern vom Zytoplasma in den Zellkern, in dem sie verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Elk1 oder Fos phosphorylieren und damit zur Aktivierung des AP-1 und verwandter Proteine wie ATF-2 beitragen [Karin, 1996]. Der Ras/Raf-Signalweg ist an der Induktion der Zytokine beteiligt und wichtig für die Aktivierung der NFAT's [Whitmarsh und Davis, 2000].

1.9.4. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg

Die Lipidkinase PI3K katalysiert nach der Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste eines Rezeptors (z.B. CD28) und damit Aktivierung dieser Kinase durch GTP-bindende Proteine die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat [Rodriguez-Viciana *et al.*, 1996]. Dieser „Second Messenger“ kann Rac aktivieren, ein weiteres GTP-bindendes Protein, das seinerseits eine Protein-Kinasekaskade initiiert, die zur Aktivierung von JNK1/2 führt [Wennstrom *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000]. Das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat wird zudem zu Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat dephosphoryliert. Dieser „Second Messenger“ aktiviert die Serin-spezifische Proteinkinase B (PKB, auch Akt), dessen bekanntestes Substrat, die Glukose-Synthetase-Kinase 3 (GSK3), an der Kontrolle der intrazellulären NFAT-Lokalisation wesentlich beteiligt ist [Cross *et al.*, 1995; Beals *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1997].

1.9.5. Der MAP-Kinasen-Signalweg

Zusätzlich zu den ERK-Kinasen, die durch den Ras-Signalweg aktiviert werden (s. 1.9.3.), gibt es zwei weitere MAPK's, die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38-MAPK, die hauptsächlich durch pro-inflammatorische Zytokine (wie TNF α und IL-1), Umwelttoxine wie

UV-Licht und ionisierende Strahlung sowie genotoxischen Stress aktiviert werden [Kiefer *et al.*, 1997; Han und Ulevitch, 1999; Schaeffer und Weber, 1999; Davis, 2000]. Deshalb gehören diese zwei MAPK's zu den Stress-aktivierten Proteinkinasen, und JNK wird auch als SAPK bezeichnet. Während für die ERK-Aktivierung die TZR-Stimulation ausreicht, werden für die Aktivierung der JNK- und der p38-MAPK neben dem TZR-Signal noch kostimulatorische Signale benötigt [Su *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000].

Jede MAPK-Kaskade, deren Komponenten in ihrer Struktur und Organisation evolutionär hochkonserviert sind, besteht aus einer Anordnung dreier zytoplasmatischer Proteinkinasen. Die MAP3K ist eine Serin/Threonin-Kinase, die von einem membranassoziierten Rezeptorkomplex aktiviert wird und anschließend eine spezifische MAP2K phosphoryliert. Diese aktivierte MAP2K phosphoryliert kritische Threonin- und Tyrosinreste der entsprechenden Serin/Threonin-spezifischen MAPK, die dadurch aktiviert wird [Hagemann und Blank, 2001; Rincon *et al.*, 2001]. Eine Zusammenfassung der einzelnen MAPK-Kaskaden ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

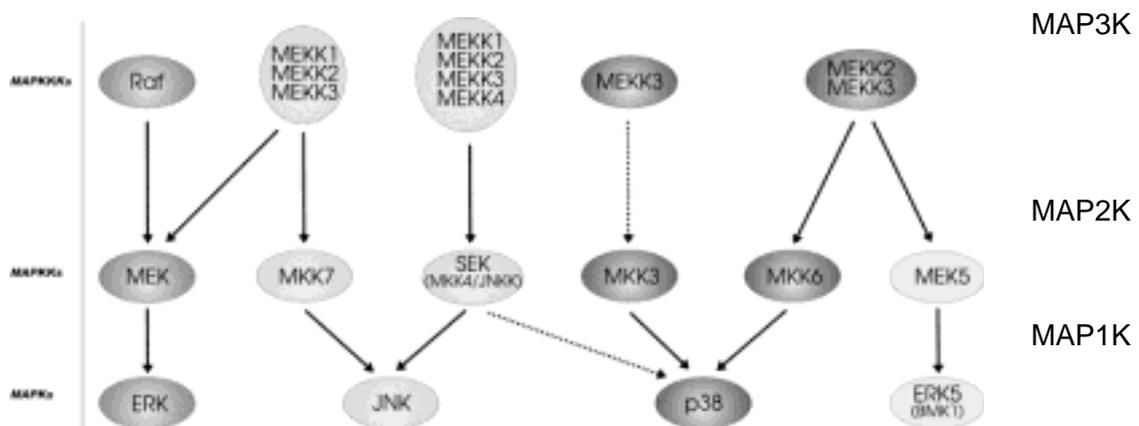


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der MEKK-regulierten MAP-Kinase-Kaskaden.

Die gestrichelten Pfeile markieren Signalwege, für die es bisher keinen direkten experimentellen Nachweis gibt [aus Hagemann und Blank, 2001].

Die spezifische Interaktion der einzelnen Komponenten wird durch die subzelluläre Lokalisation, regulatorische Proteine und die Zusammenfassung einzelner Signalübertragungsmoleküle durch Gerüstproteine erreicht [Yuasa *et al.*, 1998; Yujiri *et al.*, 1999]. So verbindet das Gerüstprotein JNK-interagierendes Protein (JIP) die MAPK-Kaskadekomponenten MLK3, MKK7 und JNK miteinander [Hagemann und Rapp, 1999]. Der ERK-Signalweg wird über das GTP-bindende Protein Ras und die MAP3K Raf induziert. Im Falle des JNK- und p38-Signalweges sind GTP-bindende Proteine der Rho-Familie (z.B. Rac und Cdc42) an der

Aktivierung der MAP3K's beteiligt. Während JNK die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2, Jun B und Jun D aktiviert, stimuliert p38 die Transkriptionsfaktoren MEF2C, ATF2 und Elk1 [Rincon *et al.*, 2001]. Die MAPK's beeinflussen viele verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung, Wachstumsstop und Zelltod (Apoptose), onkogene Transformation sowie Entzündungsreaktionen [Ichijo, 1999; Davis, 2000; Rincon *et al.*, 2000].

1.9.6. NFκB-Transkriptionsfaktoren

NFκB wurde ursprünglich als ein B-Zell-spezifisches Kernprotein beschrieben, das an den κ-„Enhancer“ des Iκκ-Ketten-Gens bindet [Sen und Baltimore, 1986]. Bald wurde deutlich, dass es sich um eine Familie von Transkriptionsfaktoren handelt, deren Mitglieder ubiquitär exprimiert werden. Faktoren der NFκB/Rel-Familie sind als inaktive Dimere im Zytoplasma mit inhibitorischen Proteinen, den IκB's, verbunden. Das vorherrschende p50/p65 (RelA)-Dimer ist im Zytoplasma mit IκBα assoziiert. Nach der Stimulation durch eine Vielzahl unterschiedlichster Aktivatoren wird IκBα sehr schnell phosphoryliert, ubiquitinyliert und durch das Proteasom degradiert [Karin, 1999]. Das nun freie NFκB-Dimer kann in den Zellkern eindringen und dort die Transkription zahlreicher Zytokin- (TNFα, IL-2) und anderer Gene (CD95L) anschalten [Stancovski und Baltimore, 1997; Sha, 1998; Bowie und O'Neill, 2000; Hatada *et al.*, 2000]. Wichtige NFκB-Induktoren sind u.a. IL-1 und TNFα, die zur Aktivierung von IκB-Kinasen (IKK) führen. Diese NFκB-Signalmoleküle (u.a. IKKα, IKKβ und NEMO) sind in einem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, dem IKK-Signalosom, zusammengefasst [Woronicz *et al.*, 1997]. NFκB ist ein für das Überleben der Zelle wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler anti-apoptotisch wirkender Proteine stimuliert. Dazu gehören die inhibitorischen Apoptose-Proteine (IAP's) sowie viele Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie (s. 1.11.5.). Außerdem unterdrückt NFκB die Expression des proapoptotischen Proteins Bax. Wie andere onkogene Signalmoleküle hat auch NFκB paradoxerweise die Eigenschaft, unter bestimmten Umständen den Zelltod zu fördern [Kuhnel *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2000].

Die Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NFκB wirken gemeinsam auf die Chromosomen der T-Zelle ein. Dadurch kommt es zur Transkription neuer Gene, was schließlich zur Differenzierung, Proliferation und zu Effektorreaktionen der T-Zellen führt.

1.10. T-Helferzell-Differenzierung

Aktivierete $CD4^+$ T-Helferzellen lassen sich anhand ihrer sezernierten Zytokine in mindestens zwei funktionelle Zell-Populationen einteilen. T_H1 -Zellen produzieren Interferon γ ($IFN\gamma$), IL-2 und Lymphotoxin (LT), während T_H2 -Zellen vor allem durch die Sekretion der Interleukine 4, 5, 6, 9, 10 und 13 charakterisiert sind [Glimcher und Singh, 1999]. T_H1 -Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort. Sie aktivieren Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen. Außerdem können sie Immunüberreaktionen vom verzögerten Typ (die sog. „delayed hypersensitive reaction“) induzieren. T_H2 -Zellen kontrollieren die humorale Immunantwort. Das sekretierte IL-4 führt zur Synthese von IgG_1 und IgE . Letzteres ist bei der Ausbildung von Soforttyp-Allergien von Bedeutung [Mosmann und Sad, 1996]. Auch T_H0 -Zellen, von denen die beiden funktionalen Klassen abstammen, bilden Zytokine (einschließlich IL-2) und sind in viele Immunreaktionen involviert. In neueren *in vitro* Untersuchungen wurde eine weitere heterogene $CD4^+$ T-Zell-Subpopulation, die „regulatorische T_H -Zelle“, beschrieben, die nach fortwährender Stimulation in Gegenwart von IL-10 entsteht [Groux *et al.*, 1997]. Diese Zellen, deren Anteil in den Lymphknoten und Milzen naiver Mäuse 7-10 % der $CD4^+$ T-Zellen beträgt, exprimieren konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) und hohe Mengen CD5 [Sakaguchi *et al.*, 1995]. Sie synthetisieren das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, jedoch kein IL-2 [Moore *et al.*, 1993; Papiernik *et al.*, 1997]. Die „regulatorischen T_H -Zellen“ sind an der Kontrolle unterschiedlicher Immunfunktionen beteiligt: der T-Zell-Homöostase, der durch virale SAg's induzierten klonalen Deletion (Toleranz-Induktion), Autoimmunreaktionen und inflammatorische Immunantworten [Jonuleit *et al.*, 2001; Papiernik und Banz, 2001].

Die T-Helferzell-Differenzierung wird zusätzlich zur übergeordneten Regulation durch Zytokine (IL-12: Immunantwort Richtung T_H1 ; IL-4: Polarisierung zu T_H2) und den von ihnen beeinflussten Signaltransduktionsfaktoren von weiteren Faktoren wie der Ag-Dosis, den APZ's, der Art der kostimulatorischen Signale und von genetischen Faktoren bestimmt [Jankovic *et al.*, 2001]. In Abbildung 1.2 ist die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung naiver T-Helferzellen zu T_H1 - und T_H2 -Zellen dargestellt. Während für die Polarisierung naiver T-Helferzellen zu T_H1 -Zellen STAT4 und T-bet von Bedeutung sind [Kaplan *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2000], sind für die Differenzierung in Richtung T_H2 -Zellen vor allem STAT6 und GATA3 wichtig [Hodge *et al.*, 1996a; Hodge *et al.*, 1996b; Reiner, 2001]. Übersichten der T-Helferzell-Differenzierung sind u.a. in Glimcher und Singh (1999) sowie in Serfling *et al.* (2000) zu finden. Die Mitglieder der Familie der NFAT-Transkrip-

tionsfaktoren beeinflussen ebenfalls die T-Helferzell-Differenzierung. Während NFATc (das auch NFAT2 oder NFATc1 bezeichnet wird) die Differenzierung zu beiden T-Helferzell-Subpopulationen fördert, führen NFATp (NFAT1 oder NFATc2) und NFAT4 (NFATx oder NFATc3) zur Polarisierung in Richtung T_H1-Zellen.

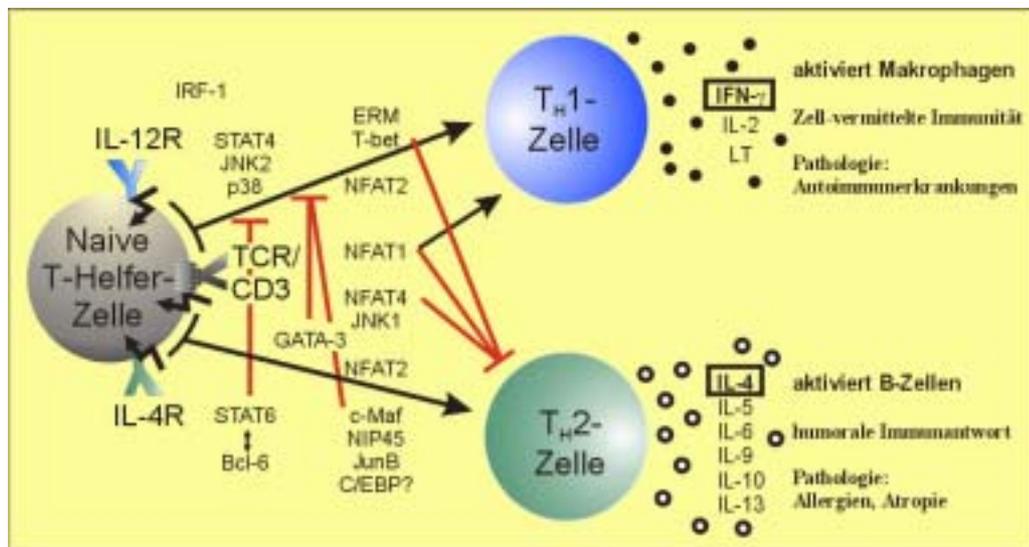


Abb. 1.2: Die Kontrolle der T-Helferzell-Differenzierung durch Transkriptionsfaktoren. Schematische Darstellung der Differenzierung naiver T-Helferzellen zu T_H1-Zellen und T_H2-Zellen. Rot markiert sind inhibierende Effekte der Transkriptionsfaktoren [modifiziert nach Serfling *et al.*, 2000 sowie Glimcher und Singh, 1999].

Effektorzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Ag nicht mehr vorhanden ist, werden die meisten Ag-spezifischen Zellen, die bei der klonalen Expansion entstanden sind, durch den programmierten Zelltod eliminiert [Janeway und Travers, 1997].

1.11. Nekrose, Apoptose und AICD von T-Zellen

Aktivierung, klonale Expansion und Zelltod bilden die Basis für die Generation eines Repertoires immunkompetenter Zellen, die es dem Immunsystem ermöglichen, fremde Moleküle zu bekämpfen und eigene zu verschonen. Es gibt zwei Hauptwege für eine Zelle zu sterben: die Nekrose und die Apoptose [Lockshin und Zakeri, 2001].

1.11.1. Nekrose

Die Nekrose ist eine drastische, pathologische Form des Zelltodes, die mit dem Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der betroffenen Zelle verbunden ist [Schwartz und Osborne, 1993]. Durch starke Noxen, Gewebsschädigungen und Entzündungsreaktionen sowie bei

Targetzellen der zytotoxischen T-Lymphozyten und der Aktivierung des Komplementsystems kommt es innerhalb von Minuten zu einem Verlust der osmotischen Stabilität der Membran, einem Ca^{2+} -Influx und passivem H_2O -Einstrom, in deren Folge die Zelle anschwillt und schließlich unter Ausschüttung ihrer Inhaltsstoffe platzt [Dong *et al.*, 1997]. Dieser Vorgang wird als „Lysis“ bezeichnet. Im umgebenden Gewebe der nekrotischen Zelle kann es dadurch zu inflammatorischen Prozessen kommen. Die DNA bleibt stabil und wird erst später unspezifisch abgebaut [Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Bortul *et al.*, 2001].

1.11.2. Apoptose

Ganz anders verläuft der Zelltod durch den geordnet verlaufenden, aktiven Prozess der Apoptose. Die Apoptose [Kerr *et al.*, 1972] ist eine durch spezifische Veränderungen der Morphologie der betroffenen Zelle charakterisierte Form des programmierten Zelltodes [Majno und Joris, 1995]. Sie ist ein aktiver, energieabhängiger Mechanismus zur schonenden Entsorgung von überflüssigen, selbstreaktiven oder fehlerhaften sowie maligne-entarteten Zellen und trägt zu einer größeren Fitness des Gesamtorganismus bei. Eine Dysregulation der Apoptose wird als Ursache für Krankheitsbilder wie Krebs, verschiedene Autoimmunerkrankheiten (reduzierte Apoptose), neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson) und AIDS (gesteigerte Apoptose der CD4^+ T-Lymphozyten) diskutiert [Abbas, 1996; Hetts, 1998; O'Shea *et al.*, 2002]. Bei der Apoptose kommt es zu starken Faltungen und blasigen Ausstülpungen der Zellmembran („Zeiosis“), die eine erhöhte osmotische Stabilität aufgrund der Quervernetzung von Proteinen aufweist [Lizard *et al.*, 1995]. In der Zellmembran wird Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite translokalisiert [Martin *et al.*, 1995; Bratton *et al.*, 1997]. Das Zellvolumen sinkt, und die Zellorganellen werden im Zytoplasma dichter gepackt. Lichtmikroskopisch lassen sich Veränderungen des Chromatins beobachten: stark aggregiert lagert es sich halbmondförmig an der Kernmembraninnenseite an. Schließlich zerfällt der kollabierte, homogen gefärbte Zellkern in mehrere Kompartimente. Aus der Zelle entstehen durch osmotisch noch immer stabile Membranen umschlossene Vesikel, die als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden [Martin *et al.*, 1994; Nagata, 1997; Thornberry und Lazebnik, 1998]. Im Organismus der Vertebraten werden apoptotische Zellen bereits in der „Zeiosis“ durch den Vorgang der Phagozytose unter Ausschluss entzündlicher Prozesse beseitigt [Savill *et al.*, 1993]. Die DNA bleibt nicht wie bei der Nekrose intakt, sondern wird durch eine induzierte Endonuklease internukleosomal in Vielfache von ca. 180 bp gespalten [Wyllie *et al.*, 1984]. Dieses Schlüsselkriterium kommt jedoch nicht bei allen Formen der Apoptose und auch nicht bei allen Zelltypen vor [Cohen *et al.*, 1994; Schulze-Osthoff *et al.*,

1994]. Außerdem kommt es zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose zum Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien und damit zur Ausschüttung von Cytochrom C ins Zytosol [Bossy-Wetzel *et al.*, 1998].

1.11.3. Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg

Der apoptotische Zelltod kann durch eine sehr große Anzahl unterschiedlichster Signale induziert werden. Diese münden normalerweise in einen der zwei bekannten Zelltod-induzierenden Signaltransduktionswege [Budihardjo *et al.*, 1999; Green, 2000].

Der **intrinsische Signalweg** wird über die Mitochondrien vermittelt. Mit Unterstützung des aus den Mitochondrien über die Permeabilisierung der äußeren Membran („MOMP“) freigesetzten Cytochroms C wird der Zelltod über die Bildung eines makromolaren Komplexes, dem Apoptosom, initiiert. In diesem lagern sich die aktiven Komponenten Cytochrom C, der oligomerisierte Adaptor apoptotischer Protease-aktivierender Faktor (Apaf1) sowie die Pro-Caspase 9 zusammen [Stennicke *et al.*, 1999; Goldstein *et al.*, 2000; Martinou und Green, 2001].

Caspasen (Cystein-Aspartasen) sind hochspezifische Cystein-Proteasen, die ihre Substrate nach einem Aspartatsäurerest spalten. Die inaktiven Vorstufen (Pro-Caspasen) werden analog zu den Zymogenen selbst durch Spaltung und anschließender Oligomerisierung der großen und kleinen Untereinheiten aktiviert [Thornberry und Lazebnik, 1998]. Zwei wichtige Caspase-Erkennungssequenzen für den apoptotischen Signalweg sind die Tetrapeptide YVAD und DEVD [Enari *et al.*, 1996]. Die Caspasen können in inflammatorische und pro-apoptotische Caspasen unterteilt werden, die wiederum in Initiator- und Effektor-Caspasen unterschieden werden [Leist und Jaattela, 2001]. Sie sind im apoptotischen Signalübertragungsweg sequentiell, in einer festgelegten Reihenfolge (Kaskade) angeordnet [Budihardjo *et al.*, 1999].

In den letzten Jahren wurde die zentrale Rolle der Mitochondrien in der Apoptose intensiv untersucht. So kann bereits vor der DNA-Fragmentierung ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden. Verursacht wird dieser Abfall durch das Öffnen der Permeabilitäts-Transitions-poren (PTP), die für Moleküle bis zu 1,5 kDa durchlässig sind [Budihardjo *et al.*, 1999; Strasser *et al.*, 2000]. Zudem wurden auf mitochondrialer Ebene verschiedene Apoptose-relevante Faktoren identifiziert. Einer dieser Faktoren ist der Apoptose-induzierende Faktor (AIF), der Caspase-unabhängig eine nukleäre DNA-Fragmentierung

auslösen kann. Außerdem verursacht AIF die Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran [Susin *et al.*, 1999].

Der **extrinsische Signalweg** überträgt Informationen von extrazellulären Molekülen der TNF-Superfamilie (wie von TNF α , CD95L und Trail), die an spezifische Rezeptoren binden, in die Zelle. Am zytoplasmatischen Teil des typischerweise trimerisierten Rezeptors bildet sich dabei ein Zelltod-induzierender Signalkomplex (DISC) mit dem Adaptorprotein FADD/Mort (Fas-assoziiertes Todesdomäne-enthaltendes Protein). In diesem wird die rekrutierte Pro-Caspase 8 (auch bekannt als FLICE) autokatalytisch aktiviert. Im Fall des aktivierten Trail-Rezeptors wird die Pro-Caspase 10 im DISC gebunden. Die aktive Initiator-Caspase 8 wandert dann in Form eines Heterotetramers aus je zwei kleinen und großen Untereinheiten aus dem DISC ins Zytoplasma [Kischkel *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2000].

Nach der Aktivierung der Initiator-Caspasen über einen der zwei Signalwege läuft der weitere Signalübertragungsweg auf der Ebene der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 zusammen, die verschiedene zelluläre Substrate proteolytisch spalten [Enari *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 2001]. In ihrer Gesamtheit führen diese Prozesse dann zum geordneten Ablauf der Apoptose. Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische apoptotische Signalweg werden durch regulatorische Polypeptide wie das FLICE-inhibierende Protein (cFLIP, extrinsisch) oder Mitglieder der Bcl-2-Familie (intrinsisch) stark beeinflusst. Außerdem gibt es Verbindungen zwischen diesen beiden Signalwegen [Roy und Nicholson, 2000].

1.11.4. Typ-I- und Typ-II-Zellen

Lange Zeit glaubte man, dass das über den CD95 (Fas)-Rezeptor vermittelte Todessignal die klassische Caspase-Kaskade aktiviert, ohne dabei den mitochondrialen Signalweg zu beeinflussen bzw. von diesem beeinflusst zu werden. In den letzten Jahren kristallisierten sich jedoch zwei verschiedene Apoptose-Signalwege nach Stimulation des CD95-Rezeptors (s. Abb. 1.3) in unterschiedlichen Zelllinien heraus [Scaffidi *et al.*, 1998]. Der Signalweg in sogenannten Typ-I-Zellen entspricht dem klassischen extrinsischen Signalweg. Bei Typ-II-Zellen kommt es zu einem reduzierten DISC, in dessen Folge die Pro-Caspase 8 nicht ausreichend aktiviert wird, um den Zelltod allein durch die klassische Caspase-Kaskade zu induzieren. Für die Auslösung des apoptotischen Zelltodes benötigen diese Zellen die Unterstützung durch den mitochondrialen, intrinsischen Signalweg. Dazu wird die Spaltung von BID, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, am DISC induziert. Das gespaltene, aktive BID

induziert die Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien und damit den intrinsischen Signalweg [Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999a; Scaffidi *et al.*, 1999b; Roy und Nicholson, 2000].

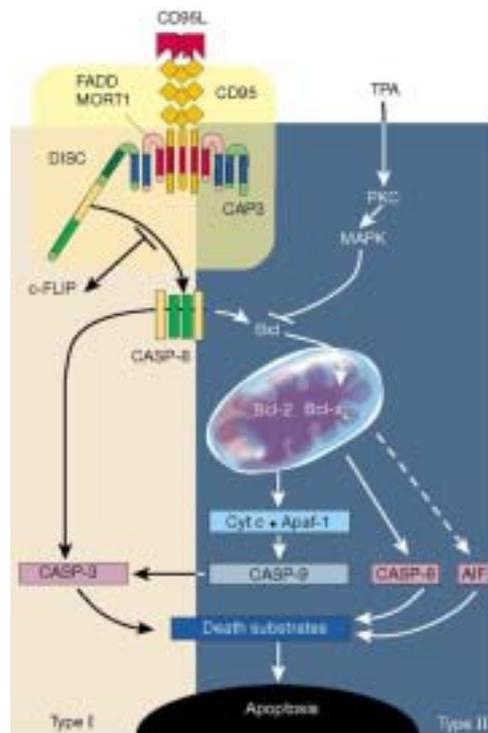


Abb. 1.3: CD95-induzierte Signaltransduktionswege in Typ-I- und Typ-II-Zellen [aus Krammer, 2000].

1.11.5. Pro- und anti-apoptotisch wirksame Moleküle

Die zytoplasmatischen Proteine der Bcl-2-Familie sind bei der Regulation des apoptotischen mitochondrialen Signalweges von entscheidender Bedeutung. Zu den bekannten anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie gehören u.a. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und A1. Bax, Bak und Bok können demgegenüber Apoptose auslösen bzw. verstärken. Zu den pro-apoptotisch wirkenden Molekülen der „BH3-only“-Subgruppe (diese besitzen nur die Bcl-2-Homologie-Domäne 3) der Bcl-2-Familie zählen Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa und Puma [Adams und Cory, 1998; Davis, 2000; Huang und Strasser, 2000]. Über ihre Homologie-Domänen bilden die einzelnen Mitglieder der Bcl-2-Familie Homo- und Heterodimere. Die Balance zwischen den pro- und anti-apoptotisch wirkenden Molekülen dieser Familie bestimmt die Sensivität der Zelle für ein Todessignal [Chao und Korsmeyer, 1998; Gross *et al.*, 1999].

Bid bindet nach der Aktivierung durch die Caspase 8 an Bax oder Bak und bewirkt deren Oligomerisierung, die zum „MOMP“ führt [Wei *et al.*, 2001]. Bim ist an Mikrotubuli gebun-

den und wird z.B. durch Entzug von Wachstumsfaktoren freigesetzt. Es bindet dann an Bcl-2 oder Bcl-x_L und inhibiert deren anti-apoptotische Wirkung [O'Connor *et al.*, 1998; Zong *et al.*, 2001]. Die pro-apoptotische Funktion von Bad wird durch Phosphorylierung und Bindung an das Gerüstprotein 14-3-3 inhibiert. Überlebenssignale aktivieren die Serin/Threonin-Proteinkinase Akt (PKB), die Bad phosphoryliert. Stress-Signale führen zur Dephosphorylierung und damit Aktivierung von Bad, das daraufhin an Bcl-2 und/oder Bcl-x_L binden kann. Bad kann je nach auftretenden Überlebenssignalen durch die PI3K erneut phosphoryliert werden [Zha *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 1997].

Die inhibitorischen Apoptose-Proteine (IAP's) fungieren als endogene Caspase-Inhibitoren [Holcik und Korneluk, 2001]. Das X-chromosomale IAP (XIAP) kann durch Bindung an die Pro-Caspase 9 dessen Aktivierung verhindern. XIAP kann auch den extrinsischen Signalweg über die Bindung an die Caspasen 3 und 7 inhibieren [Budihardjo *et al.*, 1999]. Außerdem werden durch XIAP aktive Caspasen über eine E3-Ubiquitinligase-Funktion für eine schnelle Degradation markiert [Suzuki *et al.*, 2001b]. Die IAP's selbst werden durch Smac/DIABLO und Htra2/Omi inhibiert, die beim „MOMP“ von den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt werden [Verhagen *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2002]. Htra/Omi kann zudem über seine intrinsische Serin-Protease-Aktivität einen Caspase-unabhängigen Zelltod induzieren [Suzuki *et al.*, 2001a].

Das anti-apoptotische FLICE-hemmende Protein (FLIP) kann, wie schon zuvor beschrieben, durch das Verdrängen der Pro-Caspase 8 die Bildung eines funktionsfähigen DISC verhindern. FLIP wird während der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung exprimiert und wieder herunterreguliert, wenn T-Zellen sensitiv für den extrinsischen Signalweg werden [Krammer, 2000; Krueger *et al.*, 2001].

Der CD95-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Apoptose der Immunzellen. Während der CD95-Rezeptor (auch Apo-1 oder Fas bezeichnet) fast auf allen Zellen exprimiert wird, muss die komplex regulierte Expression des CD95-Liganden (CD95L oder auch FasL) induziert werden [Suda *et al.*, 1995; Krammer, 2000]. Dabei spielen Transkriptionsfaktoren (NFAT's, NFκB's) und Mitglieder der MAPK-Familie (JNK, p38) als positive Regulatoren der CD95L-Transkription und -Expression eine wichtige Rolle [Xia *et al.*, 1995; Latinis *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1998; Faris *et al.*, 1998; Kasibhatla *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000]. Außerdem wurde ein Einfluss der MAPK's auf die Expression und Aktivierung der Proteine der Bcl-2-Familie nachgewiesen [Villunger *et al.*, 2000].

1.11.6. Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD)

Die Apoptose der Lymphozyten dient der Homöostase und Selbsttoleranz des Immunsystems. So werden unreife Thymozyten, die ein Selbst-Ag erkennen, durch Apoptose entfernt (negative Selektion). Nach der Aktivierung durchlaufen T-Zellen verschiedene Phasen: (1.) eine IL-2 abhängige klonale Expansion und Effektorphase nach Ag-Kontakt, (2.) eine Kontraktionsphase, in der die meisten Ag-spezifischen T-Zellen apoptotisch eliminiert werden, und (3.) eine Phase, in der sich überlebende T-Zellen zu ruhenden Gedächtniszellen umwandeln. Zellen, die sich in der ersten Phase befinden, und Gedächtniszellen sind relativ Apoptose-unempfindlich [Inaba *et al.*, 1999]. Sie zeigen einen gestörten DISC, eine starke FLIP-Expression und eine gesteigerte Expression von Bcl-x_L [Kirchhoff *et al.*, 2000]. In der Kontraktionsphase dagegen werden die T-Zellen in Gegenwart von IL-2 immer empfindlicher für den sog. Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) [Lenardo, 1991]. Dieser spezielle apoptotische Zelltod wird durch wiederholte TZR-Stimulation hervorgerufen und ist auch für die Entfernung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie wichtig [Green und Scott, 1994; Russell, 1995]. Der AICD ist abhängig von der Interaktion des CD95 (Fas), einem Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, mit seinem Liganden CD95L (FasL) [Dhein *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 2000; Krammer, 2000]. In voraktivierten T-Lymphozyten kann der AICD durch α CD3-spezifische mAk induziert werden [Janssen *et al.*, 1991; Russell *et al.*, 1991]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der AICD von einer induzierten PTK-Aktivität abhängig ist [Anel *et al.*, 1994]. IL-2 erfüllt somit zwei Funktionen: zuerst ist es ein wichtiger Wachstumsfaktor während der klonalen Expansion und später sensibilisiert es die T-Zellen für den AICD [Van Parijs *et al.*, 1999; O'Shea *et al.*, 2002]. Letzteres erfolgt durch die Förderung der STAT5-abhängigen Transkription von Fas, FasL und FADD sowie der Hemmung der FLIP-Expression [Refaeli *et al.*, 1999].

Nach Ko-Stimulation (TZR und CD28) zeigen proliferierende T-Zellen eine höhere Vitalität. Dies ist auf eine verstärkte FLIP- und Bcl-x_L-Expression sowie eine Hemmung der FasL-Transkription und -Expression zurückzuführen [Boise *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1999; Kirchhoff *et al.*, 2000].

T-Helferzell-Subtypen sind unterschiedlich sensitiv für den TZR-induzierten AICD. Humane AICD-sensitive T_H1-Zellklone exprimieren nach TZR-Stimulation signifikant höhere Mengen des FasL als die weniger empfindlichen T_H2-Klone unter den gleichen Bedingungen [Ramsdell *et al.*, 1994]. In murinen *in vitro*-Kulturen polarisierter T-Helferzellen konnte dagegen kein Unterschied in der Expression des CD95L beobachtet werden. Die höhere

Sensitivität der T_H1-Zellen in diesem System wurde auf die verstärkte Expression der inhibierenden Fas-assoziierten Phosphatase (FAP-1) in den AICD-resistenten T_H2-Zellen zurückgeführt [Sato *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997]. Im Gegensatz dazu wurde in komplett ausdifferenzierten murinen T-Helferzellen weder ein Unterschied in der Expression des FasL noch in der Empfindlichkeit für den Fas-vermittelten AICD zwischen T_H1- und T_H2-Zellen festgestellt [Watanabe *et al.*, 1997].

1.12. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und andere ROS wie das Superoxid-Anion-Radikal (O₂^{•-}), das Hydroxylradikal (OH[•]), der Singulett-Sauerstoff (¹O₂) und die Hypochlorsäure (HOCl) sind gefährliche Nebenprodukte verschiedener Stoffwechselwege, vor denen sich die Zelle mit Hilfe anti-oxidativer Systeme wie Katalase, Superoxid-Dismutase, Metalloenzyme und Komponenten des Glutathion-Zyklus schützt [Buttke und Sandstrom, 1994; Greenspan und Aruoma, 1994; Davies, 1995].

Sind die antioxidativen Mechanismen überfordert oder fallen sie aus, so kommt es zu „oxidativem Stress“. Dieser geht mit einem Anstieg des freien intrazellulären Ca²⁺, einer Aktivierung von Phospholipasen, der Schädigung von Proteinen und Nukleinsäuren sowie Lipidperoxidation einher. Die Gesamtheit der durch den „oxidativen Stress“ ausgelösten Prozesse kann zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen [Wiese *et al.*, 1995; Quillet-Mary *et al.*, 1997; Wang und Sul, 1998]. Die ROS-induzierte Apoptose läuft mit Beteiligung des mitochondrialen „MOMP“ und damit des intrinsischen Signalweges ab [Desagher und Martinou, 2000].

Exogenes und intrazelluläres H₂O₂ beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie die Genaktivierung, die Proliferation sowie die Apoptose [Kamata und Hirata, 1999]. H₂O₂ entsteht bei der Zellatmung in den Mitochondrien und spielt eine wichtige Rolle bei der mikrobiellen Abwehr durch Makrophagen [Elsner *et al.*, 1994]. Eine generelle Funktion des H₂O₂ ist seine Fähigkeit, PTK's zu hemmen [Denu und Tanner, 1998; Finkel, 1998]. Das im Vergleich mit anderen ROS oxidativ milde H₂O₂ wirkt in physiologisch geringen Mengen als normales Signalmolekül („Second Messenger“) [Remacle *et al.*, 1995]. Zahlreiche Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zytokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren führen nach ihrer Stimulation zu einem Anstieg der lokalen H₂O₂-Konzentration [Bae *et al.*, 1997; Ushio-Fukai *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2000]. „Oxidativer Stress“ in T-Zellen führt zur Aktivierung von

Signalwegen, die denen nach TZR-Stimulation ähneln [Griffith *et al.*, 1998]. So ist H₂O₂ als „Second Messenger“ an der Regulation des AICD beteiligt [Hildeman *et al.*, 1999]. Es führt zur Aktivierung der MAPK-Signalwege, der Caspasen, der FasL-Expression, der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und kann die Aktivität von NFκB- sowie AP-1-Transkriptionsfaktoren beeinflussen [Meyer *et al.*, 1993; Schulze-Osthoff *et al.*, 1995; Williams und Henkart, 1996; Bauer *et al.*, 1998; Tatla *et al.*, 1999; Lee und Esselman, 2001; Devadas *et al.*, 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der zytoplasmatischen Serin/Threonin-spezifischen **Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 (HPK1)** und der Einfluss von Mitgliedern der Familie der **NFAT-Transkriptionsfaktoren** auf den αCD3-vermittelten AICD von CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht. Deshalb sollen diese beiden Signalübertragungsmoleküle im folgenden charakterisiert werden.

1.13. Die Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 (HPK1)

Die murine Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 (HPK1) wurde ursprünglich durch subtraktive Hybridisierung aus der cDNA eines neutrophilen Granulozyten der Maus kloniert [Kiefer *et al.*, 1996]. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 97 kDa und besteht aus 827 Aminosäuren (aa). Mit Hilfe dieser murinen cDNA als Probe konnte die humane HPK1 (833 aa) aus einer humanen, fötalen Leberzellen-cDNA-Datenbank isoliert werden [Hu *et al.*, 1996]. Während der Embryonalentwicklung der Maus wird die HPK1 in allen Geweben exprimiert. In adulten Tieren ist eine verringerte Expression der HPK1 auf hämatopoetische Gewebe (Knochenmark, Thymus und Milz) beschränkt [Kiefer *et al.*, 1996]. Außerdem wurde die HPK1-Expression in unterschiedlichen myeloiden und lymphoiden Zelllinien sowie primären Lymphozyten nachgewiesen [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Liou *et al.*, 2000]. Da die humane (hHPK1) und murine HPK1 (mHPK1) nahezu identische Strukturen und funktionelle Eigenschaften aufweisen, sollen diese im folgenden zusammenfassend behandelt werden (HPK1).

Die Struktur der zytoplasmatischen Serin/Threonin-Protein-Kinase HPK1 besteht aus einer N-terminalen Kinase-Domäne und einer langen C-terminalen, vermutlich regulatorischen Region. Letztere wiederum untergliedert sich in die C-terminale Citron-Homologie-Domäne, der bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte und den in der Linker-Region befindlichen 4 Prolin-reichen Sequenzmotiven. An die Prolin-reichen Sequenzmotive der

HPK1 können verschiedene Adaptorproteine über ihre SH3-Domänen binden. So konnten Interaktionen der HPK1 mit den Adaptoren Grb2, Nck, Gads/Grap2, Crk, CrkL und HIP-55 nachgewiesen werden [Anafi *et al.*, 1997; Oehrl *et al.*, 1998; Ensenat *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000a]. Eine Suche für SH3-Domänen-Liganden aus embryonalem Gewebe identifizierte das hämatopoetisch-spezifische Protein 1 (HS1) als Bindepartner der HPK1 [Nagata *et al.*, 1999].

Die HPK1 gehört zur Superfamilie der Ste20-homologen Kinasen, wobei Ste20 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Sterilität führt [Herskowitz, 1995]. Die Ste20-homologen Kinasen lassen sich in höheren Eukaryonten in die durch Ras-Proteine aktivierten PAK's (p21 aktivierte Kinasen) und in die Familie der GCK's („Germinal Centre Kinases“), zu der die HPK1 zählt, untergliedern. In die Untergruppe I der GCK's gehört neben der HPK1 die GCK [Katz *et al.*, 1994], die Nck-interagierende Kinase NIK bzw. HGK [Su *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1999], die GCK-ähnliche Kinase GLK [Diener *et al.*, 1997] und die SPS1/Ste20-homologe Kinase KHS bzw. GCKR [Shi und Kehrl, 1997; Tung und Blenis, 1997]. Für GCK, KHS/GCKR und GLK wird eine Funktion im TNF-Rezeptor-Signalübertragungsweg diskutiert, während alle GCK's den JNK-Signalweg aktivieren [Kyriakis, 1999].

Es wurden drei Möglichkeiten der JNK-Aktivierung durch die als MAPKKKK (MAP4K) fungierende HPK1 beschrieben. Der erste Signalweg führt über die direkte Aktivierung der MLK3 („Mixed lineage kinase 3“) durch Phosphorylierung nach SH2/SH3-Interaktion mit der HPK1 zur MAPKK SEK1 und weiter zu JNK [Kiefer *et al.*, 1996; Tibbles *et al.*, 1996; Leung und Lassam, 2001]. Außerdem kann die HPK1 die MAP3K's MEKK1 und TAK1 (TGF β aktivierte Kinase 1) aktivieren, die beide über SEK1 wiederum zur JNK-Phosphorylierung führen [Hu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1999]. Allerdings gibt es zur Zeit keine funktionellen biologischen Hinweise auf eine Funktion der HPK1 bei der TGF β -Signalübertragung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass unterschiedliche Ste20-homologe Kinasen gewebespezifisch bzw. abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle die MAPK-Kaskade aktivieren. Dieses umso mehr, da die Prolin-reichen Sequenzmotive nur schwach zwischen den einzelnen GCK's konserviert sind und diese durch die mögliche Bindung unterschiedlicher Adaptor-Proteine in verschiedene Signalwege integriert werden können.

Ein zweiter, durch die HPK1 beeinflusster Signalübertragungsweg ist die Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren. Dies wurde durch transiente Überexpression in 293T-Zellen [Hu *et al.*, 1999] und durch retrovirale Expression in einer hämatopoetischen Vorläufer-Zelllinie (FDC-P1) [Arnold *et al.*, 2001] nachgewiesen. Der genaue molekulare NF κ B-Aktivie-

rungsmechanismus, der von der HPK1-vermittelten Phosphorylierung der IKK's abhängt, ist noch nicht aufgeklärt. Demzufolge kann die HPK1 als sogenannter Signal-Multiplikator fungieren, d.h. ein erhaltenes Signal an mehrere Signalübertragungswege weitergeben.

Die HPK1 kann durch Caspasen hinter einem DDVD-Motiv (aa 382-385) vor der Prolinreichen Region 2 gespalten werden [Chen *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001]. Eine daraus folgende funktionelle Relevanz wurde erst kürzlich publiziert: während das N-terminale Kinase-Domäne enthaltende Peptid weiterhin in der Lage ist, JNK zu aktivieren, wird die NFκB-Aktivierung durch das C-terminale Peptid inhibiert [Arnold *et al.*, 2001; Schulze-Luehrmann *et al.*, 2002].

Die Identifikation der Stimuli, die eine Aktivierung der HPK1 bewirken, wird durch die Tatsache erschwert, dass die Überexpression von HPK1 zu einer konstitutiven Aktivierung seiner Kinase-Domäne führt. Erste Hinweise erbrachte eine Studie, die nachwies, dass eine Stimulation des Erythropoietin-Rezeptors eine Steigerung der HPK1-Kinaseaktivität hervorruft [Nagata *et al.*, 1999].

In der Folge konnte gezeigt werden, dass auch in T- und B-Zellen die Kinaseaktivität der HPK1 nach Rezeptorstimulation gesteigert wird [Liou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000a; Ling *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Es handelt sich dabei um eine schnelle und transiente Aktivierung. In Jurkat T-Zellen hängt diese Aktivierung von den Src-Kinasen Lck und Fyn, der PTK ZAP-70 und den Adaptoren LAT sowie SLP-76 ab [Liou *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2001]. Dabei scheint HPK1 konstitutiv mit Grb2 zu interagieren, während eine Bindung an Gads/Grap2 erst nach TZR-Stimulation nachweisbar ist [Liu *et al.*, 2000a; Liu *et al.*, 2001]. Es konnte keine stärkere HPK1-Kinaseaktivität nach Ko-Stimulation mit αCD28 beobachtet werden, und eine Stimulation über CD28 führte zu keiner Aktivierung der HPK1 [Liou *et al.*, 2000]. In DT40 B-Zellen ist die BZR-vermittelte HPK1-Aktivität von der Gegenwart der Src-Kinase Lyn, der PTK Syk und den Adaptoren der Grb2-Familie sowie SLP-65 abhängig [Liou *et al.*, 2000; Tsuji *et al.*, 2001].

Es scheint also, dass die HPK1 eine Funktion bei der Immunrezeptor-Signalübertragung ausüben könnte. In Abbildung 1.4, die mir freundlicherweise von Dr. Friedemann Kiefer (MPI für Physiologische und Klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein mögliches Modell der HPK1-Aktivierung und Interaktion mit Adaptormolekülen nach TZR-Stimulation aufgeführt.

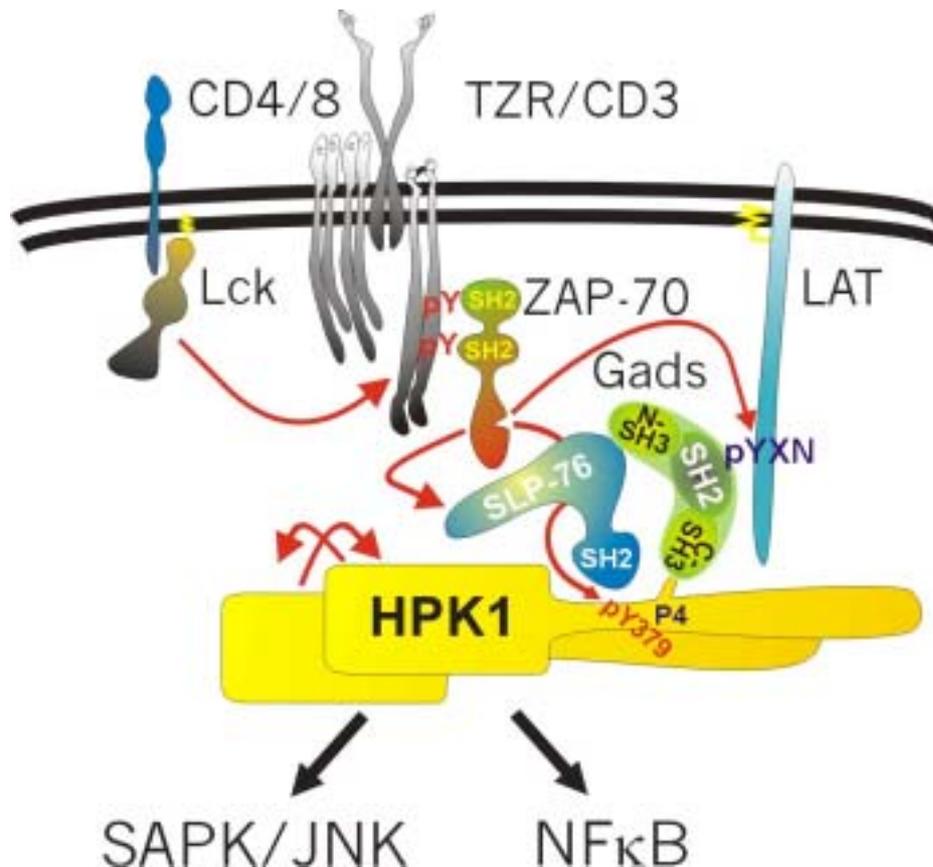


Abb. 1.4: Aktivierung von HPK1 in T-Zellen nach TZR-Stimulation [nach F. Kiefer].

In diesem Modell wird HPK1 über die Adaptoren SLP-76 und Gads an den aktivierten TZR rekrutiert. Die Bindung von HPK1 an die C-terminale SH3-Domäne von Gads ist phosphorylierungsunabhängig. Die Bindung der C-terminalen SH2-Domäne von SLP-76 bedarf der vorherigen Phosphorylierung von Tyrosin 379 in der HPK1 durch eine Src-Kinase oder ZAP-70. SLP-76 und Gads interagieren über die N-terminale SH3-Domäne von Gads. Der Adaptor LAT dient als Membrananker für den gesamten Komplex. Rote Pfeile symbolisieren Phosphorylierungsereignisse. Eine Kinase der Src-Familie (gezeigt Lck) phosphoryliert ITAM-Motive in den zytoplasmatischen Ketten des TZR's. Dies führt zur Rekrutierung der Tyrosin-Kinase ZAP-70, die dann LAT, SLP-76 und HPK1 phosphoryliert. Die eigentliche Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase HPK1 erfolgt durch Auto-Phosphorylierung von benachbarten HPK1-Molekülen in trans. HPK1 aktiviert in der Folge Substrate in den SAPK/JNK- und NFκB-Signalübermittlungskaskaden.

Zytokin-stimulierte Zellen exprimieren ein drittes Mitglied der SLP-76-Familie, den Adaptor Clnk. Dieser ist ebenfalls in der Lage, an HPK1 zu binden, weshalb eine Funktion der HPK1 in Zytokin-vermittelten Signalwegen vermutet wird [Yu *et al.*, 2001].

Die biologische Funktion und die Zielgene der HPK1 im Rahmen der Immunrezeptor-Signalübertragung sind trotz allem Wissenszuwachs in den letzten Jahren bislang unbekannt. Meine experimentellen Arbeiten sollten einen Beitrag dazu leisten, diese in T-Zellen aufzuklären.

1.14. Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die Nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen (NFAT's) sind entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten [McCaffrey *et al.*, 1993; Northrop *et al.*, 1994; Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; Rooney *et al.*, 1995a; Rooney *et al.*, 1995b]. Sie nehmen damit eine zentrale Rolle bei der Induktion der Transkription wichtiger Gene (z.B. Zytokine, FasL) während der Immunantwort ein [Rao *et al.*, 1997; Serfling *et al.*, 2000]. Ursprünglich wurden die NFAT's als mutmaßliche Transkriptionsfaktoren in Kernproteinextrakten aktivierter Jurkat T-Zellen beschrieben, die an den humanen IL-2-Promotor binden [Shaw *et al.*, 1988]. Mittlerweile wurde darüber hinaus eine Schlüsselrolle der NFAT's bei der Zellaktivierung in verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen [Schuh *et al.*, 1996; Molkentin *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998a; De Windt *et al.*, 2000; Rengarajan *et al.*, 2000].

Die NFAT's besitzen eine hochkonservierte ca. 300 Aminosäuren (aa) umfassende DNA-bindende Domäne, die wegen ihrer Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der Rel/NFκB-Transkriptionsfaktoren auch als Rel-ähnliche Domäne (RSD) bezeichnet wird [Jain *et al.*, 1995; Serfling *et al.*, 2000]. Diese RSD zeigt eine 70 %-ige Homologie zwischen den vier typischen NFAT-Mitgliedern (NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4) sowie eine 40 %-ige Homologie zu einem weiteren, ungewöhnlichem Mitglied dieser Familie, dem NFAT5 [Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999].

Die Aktivierung und Translokation der zytoplasmatischen, typischen NFAT's in den Zellkern erfolgt durch den Kalzium-Signalweg (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin; s. 1.9.1.). Calcineurin bindet an die regulatorische Domäne und dephosphoryliert dabei mehrere Stellen dieser Domäne [Crabtree, 1999]. Die NFAT's binden im Kern kooperativ mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, cMaf und GATA-Faktoren) an die DNA, wodurch die Spezifität der transkriptionellen Aktivierung und die Integration in andere Signalwege vermittelt wird [Crabtree, 1999; Macian *et al.*, 2001]. Verschiedene Serin/Threonin-Protein-Kinasen wie z.B. die Glykogen-Synthetase-Kinase-3 (GSK3) oder die Casein-Kinase (CK) können die NFAT's sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma phosphorylieren und damit deren transkriptionelle Aktivität inhibieren [Zhu *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 2000]. GSK-3 induziert den Export von NFAT aus dem Kern ins Zytoplasma [Beals *et al.*, 1997].

NFAT5 dagegen besitzt weder Bindestellen für Calcineurin noch die typischen Kontaktpunkte für die NFAT/AP-1-Wechselwirkung sowie keine transaktivierenden Domänen (TAD).

Dieses ungewöhnliche NFAT-Mitglied kommt konstitutiv im Zellkern vor und ist Ca^{2+} -unabhängig, so dass seine Aktivität durch CsA oder FK506 nicht beeinflusst wird. NFAT5 wird in allen Zellen des Körpers exprimiert [Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999; Miyakawa *et al.*, 1999].

Die schematische Struktur und die synonymen Bezeichnungen der einzelnen NFAT's sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst [Serfling *et al.*, 2000]. Entsprechend den Empfehlungen einer internationalen Nomenklaturkommission sollte sich folgende Nomenklatur durchsetzen: NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5.

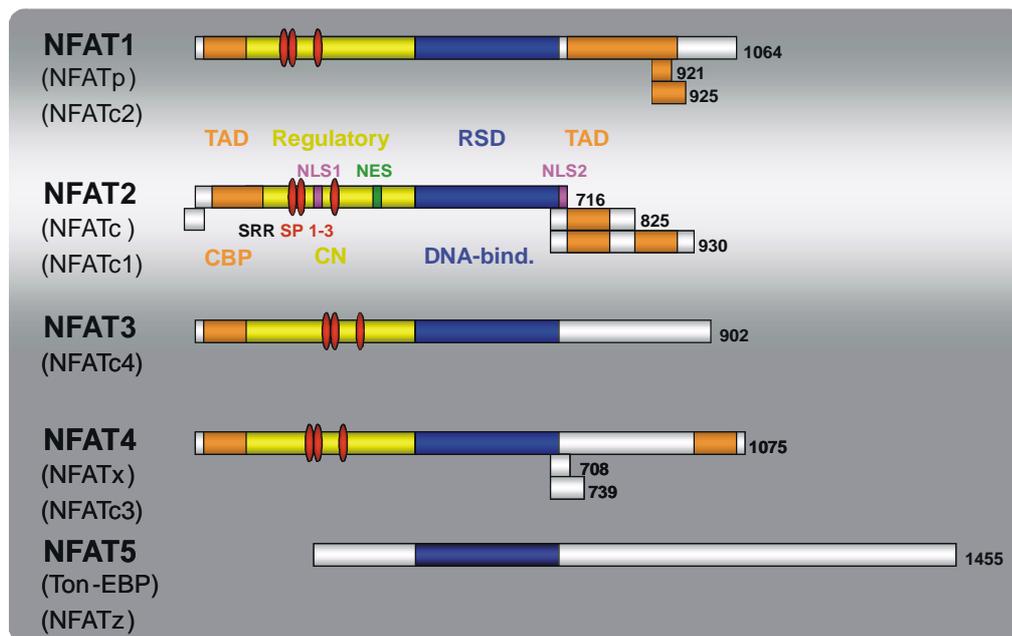


Abb. 1.5: Schematische Struktur der NFAT-Faktoren [aus Serfling *et al.*, 2000].

Dargestellt sind die DNA-bindende „Rel-similarity-domain“ (RSD, blau), N- und C-terminale transaktivierende Domänen (TAD, orange), die Calcineurin-Erkennungsregion (CN), Serin/Prolin-Phosphorylierungsmotive (SP 1-3, rot), Signalsequenzen für den Transport in den Zellkern (NLS, margenta) sowie Kern-Exportsignale (NES, grün).

Durch alternatives „Splicen“ werden unterschiedliche Isoformen der NFATs exprimiert. So konnten für NFATc (NFATc1) drei verschiedene Varianten (A, B und C) mit unterschiedlich langem C-Terminus nachgewiesen werden [Chuvpilo *et al.*, 1999b]. In letzter Zeit konnte die Organisation und Regulation des chromosomalen NFATc-Gens der Maus aufgeklärt werden [Chuvpilo *et al.*, 2002]. Die längste Isoform des NFATc (NFATc1/C) enthält in der C-terminalen Region eine zusätzliche transaktivierende Domäne, die eine 30 %-ige Sequenzhomologie zum transaktivierenden C-Terminus von NFATp (NFATc2) aufweist [Luo *et al.*, 1996b; Avots *et al.*, 1999]. In unterschiedlichen Zellen und nach verschiedenen Stimulationen konnte eine heterogene Expression der einzelnen NFAT's nachgewiesen werden. NFAT4 (NFATc3)

wird hauptsächlich in Thymozyten exprimiert; NFAT3 (NFATc4) ist in nicht-lymphoiden Zellen zu finden [Northrop *et al.*, 1994; Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995]. Während NFATp (NFATc2) und NFAT4 (NFATc3) konstitutiv in T-Zellen exprimiert werden, wird die Expression von NFATc (NFATc1) in peripheren T-Zellen nach TZR-Stimulation stark induziert [Northrop *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1997]. In naiven und ruhenden T-Zellen herrschen NFATc/B und NFATc/C vor, während in aktivierten T-Zellen hauptsächlich NFATc/A autoregulativ in großen Mengen exprimiert wird [Chuvpilo *et al.*, 2002]. NFATp und NFATc sind an der Kontrolle der T-Zell-Effektorfunktionen beteiligt. Dies wird hauptsächlich durch die regulierte Transkription der Lymphokin-Gene IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ und TNF α erreicht [Rooney *et al.*, 1995b; Serfling *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1996a; Tsai *et al.*, 1996b; Duncliffe *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1997; Kel *et al.*, 1999]. Trotzdem sind die unterschiedlichen physiologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder der NFAT-Familie und deren Isoformen bisher nur unvollständig aufgeklärt. Diskutiert werden Hauptfunktionen in der Kontrolle der Zellteilung und der Apoptose aber auch eine physiologische Rolle der NFAT's als Tumorsuppressor-Gene [Sorensen *et al.*, 1996; Tsytsykova *et al.*, 1996; Latinis *et al.*, 1997; Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 2000; Youn *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2001].

NFATp und NFATc besitzen eine 72 %-ige Homologie ihrer RSD und reagieren in vielen funktionellen Untersuchungen ähnlich. Trotzdem zeigen Knock-out-Mäuse mit funktioneller Inaktivierung der Gene für NFATp oder NFATc stark unterschiedliche Phänotypen [Serfling *et al.*, 2000]. NFATc-defiziente Mäuse sterben aufgrund von Fehlbildungen des Herzens bereits im Uterus, während NFATp-defiziente Embryos sich normal entwickeln [de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b]. Lymphozyten von NFATp-defizienten Mäusen, die älter als 3 Monate sind, entwickeln ein hyperproliferatives Syndrom, das sich in einer moderaten Größenzunahme der peripheren lymphatischen Organe (Thymus, Milz und Lymphknoten) widerspiegelt [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998a]. Als Ursache wurde ein Defekt im AICD identifiziert, der wahrscheinlich durch eine reduzierte FasL-Expression hervorgerufen wird [Hodge *et al.*, 1996b; Schuh *et al.*, 1998a]. Dieser Phänotyp der NFATp-defizienten Mäuse ist in Mäusen, die defizient für NFATp und NFAT4 sind, noch verstärkt [Ranger *et al.*, 1998c]. Im Gegensatz dazu zeigen NFATc-defiziente T-Zellen aus RAG Knock-out-Mäusen eine gestörte Proliferation, jedoch keine Defekte in der Apoptose [Ranger *et al.*, 1998b; Yoshida *et al.*, 1998]. Lymphozyten, die defizient für NFATc und NFATp sind, verlieren die Fähigkeit, IL-2 und IL-4 zu synthetisieren. Sie zeigen ein durch Hochregulation von Aktivierungsmarkern und durch hohe Mengen von IgG₁ und IgE

im Serum gekennzeichnetes hyperproliferatives Syndrom [Peng *et al.*, 2001]. Die Daten der NFAT-defizienten Mäuse bzw. Zellen zeigen somit individuelle aber auch überlappende Funktionen für NFATc und NFATp. So liegt die Vermutung nahe, dass sowohl die Menge der gesamten NFAT's in einer Zelle als auch das Verhältnis zwischen den einzelnen Familienmitgliedern und Isoformen bestimmend dafür sind, welches Genmuster exprimiert wird.

1.15. Zielsetzung dieser Arbeit

Die **Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 (HPK1)** ist eine in hämatopoetischen Zellen exprimierte zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase, die zur Familie der „Germinal Centre Kinases“ (GCK's) gehört. Sie stimuliert als sogenannter Signal-Multiplikator zwei hochkonservierte, ubiquitäre Signalübertragungswege, die zur Aktivierung von SAPK/JNK und NFκB führen. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass diese GCK an der Signalübertragung von Immun- und Zytokin-Rezeptoren beteiligt ist. Dabei wird die HPK1 nach Rezeptorstimulation in einen membranständigen Komplex rekrutiert und aktiviert. So scheint die HPK1 eine ihrem begrenzten Expressionsmuster entsprechende, spezialisierte Funktion in Leukozyten auszuüben. Die biologische Funktion und die Zielgene der HPK1 im Rahmen der Immunrezeptor-Signalübertragung sind trotz allem Wissenszuwachs in den letzten Jahren bislang unbekannt geblieben.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten deshalb Zielgene der HPK1 in lymphoiden Zellen und besonders in T-Zellen identifiziert werden, um so Hinweise auf die biologische Funktion dieser Protein-Kinase im Immunsystem zu erhalten. Dazu sollten verschiedene Plasmide und retrovirale Expressionsvektoren konstruiert und die Methode der retroviralen Transduktion von Zelllinien sowie die Infektion primärer Zellen in unserem Labor etabliert werden. Da die HPK1 in Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktiv ist, könnte diese GCK zudem - durch die Aufklärung ihrer molekularen Funktion - ein mögliches Ziel zur Beeinflussung des Immunsystems darstellen.

Bedeutende Funktionen im Immunsystem erfüllen die Transkriptionsfaktoren der Familie der sog. „**Nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen**“ (NFAT's), die im Mittelpunkt der Forschungen unseres Labors stehen. Die NFAT's - besonders NFATp - wurden als wichtige Regulatoren der Proliferation, Differenzierung und Apoptose lymphoider Zellen beschrieben. NFATp und NFATc, die in großen Mengen hauptsächlich in T-Zellen exprimiert werden,

besitzen einen hohen Homologiegrad und reagieren in vielen funktionellen Untersuchungen ähnlich. Mäuse mit funktioneller Inaktivierung der Gene für NFATp oder NFATc zeigen jedoch stark unterschiedliche Phänotypen, die auf individuelle aber auch überlappende Funktionen für NFATc und NFATp hinweisen. Lymphozyten NFATp-defizienter Mäusen, die älter als 3 Monate sind, entwickeln ein hyperproliferatives Syndrom, das sich in einer moderaten Größenzunahme von Thymus, Milz und Lymphknoten widerspiegelt. Als eine der Ursachen wurde ein Defekt im Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) identifiziert, der wahrscheinlich durch eine reduzierte FasL-Expression hervorgerufen wird. Die unterschiedlichen physiologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder der NFAT-Familie und deren Isoformen sind bisher allerdings nur unvollständig aufgeklärt worden.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden, ob neben NFATp auch die individuellen Isoformen von NFATc den AICD in T-Lymphozyten beeinflussen können. Zum einen sollten primäre T-Zellen mit verschiedenen NFAT's retroviral infiziert und die Induktion des AICD in diesen Populationen analysiert werden. Zum anderen sollte versucht werden, den gestörten AICD in NFATp-defizienten T-Lymphozyten durch retrovirale Expression von NFATp, NFATc/A oder NFATc/C zu „heilen“.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reaktionssysteme

– 4-Hydroxytamoxifen (C ₂₆ H ₂₉ NO ₂ , Z-isomer)	Sigma-Aldrich
– β-Glycerophosphat (C ₃ H ₇ O ₆ PNa ₂)	Carl Roth
– β-Mercaptoethanol	Carl Roth
– Acrylamidlösung	Carl Roth
– AEBSF (Pefabloc SC)	Roche
– Agar-Agar	Carl Roth
– Agarose	Sigma-Aldrich
– APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck Eurolab
– ATP-Dinatriumsalz (C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₃ P ₃ Na ₂)	Sigma-Aldrich
– Aufreinigungs-kit für murine CD4 ⁺ Zellen	CEDARLANE®
– BioRad Protein Assay (5 x Bradford Reagenz)	BioRad
– Borsäure	Merck Eurolab
– Bromphenol Blau	Merck Eurolab
– BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Carl Roth
– Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	Carl Roth
– Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth
– Coomassie Brilliant Blue R-250	Roche Applied Science
– CsA (Cyclosporin A)	Novartis Pharma
– DEPC (Diethylpyrokarbonat)	Carl Roth
– Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O)	Merck Eurolab
– D-Luziferin (C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂)	AppliChem
– DMEM	Gibco BRL
– DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
– dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI-Fermentas
– DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth
– ECL Chemoluminiszenz-System	Amersham, Roche
– EDTA (Na ₂ EDTA • 2H ₂ O)	Carl Roth
– EGTA (Na ₄ EGTA)	Sigma-Aldrich
– Eisen(II)sulfat (FeSO ₄)	Carl Roth

– Eisen(III)chlorid Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
– Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Carl Roth
– Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Carl Roth
– Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich
– FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco BRL
– Ficoll	Amersham Pharmacia
– Gelextraktionskit „jetsorb“	Genomed
– Glutathion-Sepharose	Sigma-Aldrich
– Glycerin (87%)	Carl Roth
– Glyzin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Merck Eurolab
– HBSS (Hanks´ gepufferte Kochsalzlösung)	Gibco BRL
– HEPES; N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N´-(3-Propansulfonsäure)	Carl Roth, Gibco BRL
– Interleukin-2, Maus, Rekombinant, <i>E.coli</i>	Calbiochem
– Interleukin-4, Maus, Rekombinant, <i>E.coli</i>	Dr. E. Schmitt, Mainz
– Interleukin-12, Maus, Rekombinant, <i>E.coli</i>	Dr. E. Schmitt, Mainz
– Ionomycin	Sigma-Aldrich
– IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid)	Boehringer-Ingelheim
– Isoamylalkohol	Carl Roth
– Isopropanol (2-Propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)	Carl Roth
– Kaliumazetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$)	Carl Roth
– Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
– Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
– Kaliumhydrogenphosphat (KHPO_4)	Sigma-Aldrich
– Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth
– Kalziumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth
– Leupeptin Hydrochlorid	Roche Applied Science
– L-Glutamin	Gibco BRL
– L-Glutathion	Serva
– Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich
– Magermilchpulver	Saliter
– Magnesiumazetat ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
– Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth
– Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth

– Manganchlorid (MnCl ₂)	Fluka
– MEM (Non-essential amino acids, 100x)	Gibco BRL
– MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure, C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	Sigma-Aldrich
– Methanol (CH ₄ O)	Carl Roth
– Metrizamid (C ₁₈ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈)	Serva
– MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure, C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)	Carl Roth
– Natriumazetat (CH ₃ COONa • 3H ₂ O)	Merck Eurolab
– Natriumazid (NaN ₃)	Merck Eurolab
– Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth
– Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
– Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
– Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O)	Merck Eurolab
– Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
– Natrium-Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Fluka
– Natrium-Pyruvat (C ₃ O ₃ H ₃ Na)	Gibco BRL (100 mM)
– Natrium-Zitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ • 2H ₂ O)	Carl Roth
– PCR-Aufreinigungskit	Quiagen
– PEG (Polyethylenglykol) 4000	NEB
– Phenol (C ₆ H ₆ O, mit TE äquilibriert)	Carl Roth
– PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure))	Serva
– Plasmid-DNA Isolationskit (Maxi)	Macharey-Nagel, Quiagen
– Plasmid-DNA Isolationskit (Mini)	Genomed
– PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva
– poly dI/dC	Boehringer-Ingelheim
– Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich
– Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich
– p-ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid)	Sigma-Aldrich
– Propidiumjodid (PI 1 mg/ ml ddH ₂ O)	Sigma-Aldrich
– Protease-Inhibitor-Tabletten (complete Mini)	Roche Applied Science
– Protein-A/G Sepharose	SantaCruz
– radioaktive Nukleotide (γ ³² P-ATP, α ³² P-dCTP, α ³² P-UTP)	Amersham Pharmacia
– RNase-Protektions-Analyse-Kit (RiboQuant)	BD Pharmingen
– RPMI 1640 (DUTCH modifiziert)	Gibco BRL

– RPMI 1640	Gibco BRL
– Rubidiumchlorid (RbCl)	Carl Roth
– Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab
– SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
– Sephadex G50	Amersham Pharmacia
– Sulfosalicylsäure (2-Hydroxy-5-sulfobenzoessäure)	Sigma-Aldrich
– TaqDyePrimer Sequenzierungskit	Perkin Elmer
– TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
– TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich
– Transfektionsreagentien (SuperFect™, PolyFect™)	Quiagen
– Trichloressigsäure (C ₂ HCl ₃ O ₂)	Sigma-Aldrich
– Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)-1,3-Propanediol)	Carl Roth
– Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
– Trizol-Reagenz	Gibco BRL
– Trypanblau 0,1%	Gibco BRL
– Trypsin-EDTA	Gibco BRL
– Tween 20	Carl Roth
– Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth
– X-VIVO 15	BioWhittaker
– Xylencyanol FF	Serva
– Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ • H ₂ O)	Carl Roth

2.2. Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien wurden in jeweils höchstmöglichem Reinheitsgrad von den angegebenen Herstellern bezogen. Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem bzw. deionisiertem (Millipore-Filter) Wasser bereitet und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in der Regel bei Raumtemperatur (RT).

APS-Stammlösung (10 %)

APS 10 g/ 10 ml

DTT-Stammlösung (1 M)

DTT 3,09 g/ 20 ml

in 10 mM Natriumazetat (pH 5,2) lösen und aliquotiert bei -20 °C lagern

EDTA-Stammlösung (0,5 M)

Na₂EDTA • 2H₂O 186,1 g/ l

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 50 ml) auf 8,0 einstellen;

EDTA löst sich erst bei korrektem pH-Wert

EGTA-Stammlösung (0,25 M)

EGTA 95 g/ l

pH-Wert mit KOH auf 8,0 einstellen; EGTA löst sich erst bei korrektem pH-Wert

Ethidiumbromid-Stammlösung (1 %)

EtBr 1 g/ 100 ml

lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren

Hepes/ KOH-Stammlösung (1 M)

Hepes 238,33 g/ l

pH-Wert mit KOH auf 7,2/ 7,4/ 7,9 einstellen

Kaliumchlorid-Stammlösung (1 M)

KCl 74,6 g/ l

Kaliumhydrogenphosphat-Stammlösung (1 M)

KHPO₄ 135,1 g/ l

pH-Wert mit KOH auf 7,8 einstellen

Kalziumchlorid-Stammlösung (1 M)

CaCl₂ 110,98 g/ l

Lithiumchlorid-Stammlösung (1 M)

LiCl 42,4 g/ l

Magnesiumazetat-Stammlösung (1 M)

Mg(C₂H₃O₂)₂ • 4H₂O 214,5 g/ l

Magnesiumchlorid-Stammlösung (1 M)

MgCl₂ 95,21 g/ l

Magnesiumsulfat-Stammlösung (1 M)

MgSO₄ • 7H₂O 246,5 g/ l

MES-Stammlösung (1 M)

C₆H₁₃NO₄S 195,2 g/ l

Natriumazetat-Stammlösung (3 M)

CH₃COONa • 3H₂O 408,24 g/ l

pH-Wert mit konzentrierter Essigsäure (Eisessig) auf 5,2 einstellen

Natriumazid-Stammlösung (10 %)

NaN₃ 5 g/ 50 ml

Natriumchlorid-Stammlösung (5 M)

NaCl 292,22 g/ l

zum Lösen auf 60 °C erwärmen

Natriumhydroxid-Stammlösung (10 M)

NaOH 400 g/ l

Propidiumjodid-Stammlösung (100 ml)

PI 0,1 g

lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren

SDS –Stammlösung (10 %)

SDS 100 g/ l

auf 70 °C erwärmen, pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,2 einstellen

Tris/ HCl-Stammlösung (1,5 M)

Tris 181,7 g/ l

pH-Wert mit 1 N HCl auf 6,8/ 7,5/ 7,8/ 8,0/ 8,8 einstellen

PBS (10x)

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
CaCl ₂	1 g/l
MgCl ₂	1 g/l
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	26,8 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l

pH-Wert auf 7,4 mit 1 N HCl einstellen

PBS (1x)

PBS (10x)	100 ml/l
-----------	----------

PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ (10x)

NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	26,8 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l

pH-Wert auf 7,4 mit 1 N HCl einstellen

PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ (1x)

PBS -Ca ²⁺ /-Mg ²⁺ (10x)	100 ml/l
------------------------------------------------	----------

PBS MM

PBS -Ca ²⁺ /-Mg ²⁺ (10x)	100 ml/l
0,5 M EDTA-Stammlösung	10 ml/l
0,25 M EGTA-Stammlösung	20 ml/l
NaF	0,5 g/l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe von 250 µl DTT-Stammlösung (1 M) pro 50 ml

DNA-Extraktionslösung

Phenol	25 Teile
Chloroform	24 Teile
Isoamylalkohol	1 Teil

kurz vor Verwendung frisch hergestellt

TE-Puffer (Tris/EDTA; Aufnehmen, Lösen von DNA) pH 8,0

1,5 M Tris/HCl (pH 8,0)	6,7 ml/l
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,2 ml/l

EB-Puffer (Aufnehmen, Lösen von DNA) pH 8,5

1,5 M Tris/HCl (pH 8,5)	6,7 ml/l
-------------------------	----------

6x „Gel loading“ - Probenpuffer (Bluejuice) von MBI Fermentas

Glyzerin	60 %
EDTA	60 mM
Bromphenolblau	0,09 %
Xylenzyanol FF	0,09 %

TAE-Puffer (Tris/Azetat/EDTA; 50x)

Tris	242 g/ l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	100 ml/ l
konzentrierte Essigsäure	57,1 ml/ l

TAE-Puffer (1x, DNA-Elektrophorese-Laufpuffer)

TAE-Puffer (50x)	20 ml/ l
------------------	----------

Zugabe von 0,1 ml EtBr-Stammlösung pro Liter für Elektrophorese

TAE-Agarosegele (DNA-Elektrophorese)

TAE (50x)	20 ml/ l
-----------	----------

Gel [%]	Agarose [g/l]	Auftrennung [bp]
0,5	5	1.000 - 30.000
0,7	7	800 - 12.000
1,0	10	500 - 10.000
1,2	12	400 - 7.000
1,4	14	200 - 4.000
2,0	20	50 - 2.000

Zugabe von 0,25 ml EtBr-Stammlösung pro Liter Gellösung, zum Lösen der Agarose aufkochen (vorsicht, Siedeverzug!)

DEPC-behandeltes ddH₂O (RNase-frei, Handschuhe tragen!)

DEPC	2 ml/ l
------	---------

gut vermischen und über Nacht (~ 16 h) unterm Abzug inkubieren, autoklavieren und bei RT lagern; alle Lösungen und Puffer beim Arbeiten mit RNA in DEPC-ddH₂O ansetzen

denaturierendes PAA-Gel für RNase-Protektions-Analyse (5 %-ige Gellösung)

Harnstoff	35,82 g
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	12,42 ml
10x TBE-Puffer	7,45 ml

mit ddH₂O auf 74,5 ml auffüllen;

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 0,5-1 h) Zugabe von:

10 % APS	450 µl
TEMED	60 µl

Protease Inhibitoren (Stammlösungen, eingesetzte Endkonzentrationen)

Aprotinin	(Stammlösung (0,3 M): 2 mg/ ml ddH ₂ O)	0,3 µM
Leupeptin	(Stammlösung (2 mM): 1 mg/ ml ddH ₂ O)	2 µM
AEBSF	(Stammlösung (0,2 M): 50 mg/ ml ddH ₂ O)	1 mM

Phosphatase Inhibitor (Stammlösung, eingesetzte Endkonzentration)

Natrium-Orthovanadat (Na₃VO₄-Stammlösung (0,2 M): 4 mg/ ml ddH₂O) 1 mM

pH-Wert mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf 10,0 einstellen (Lösung gelb), 10 min bei 100 °C kochen (Lösung farblos), abkühlen auf Raumtemperatur (RT) und pH-Wert anschließend wieder auf 10,0 einstellen; das Aufkochen und Einstellen des pH-Wertes solange wiederholen bis die Lösung bei RT farblos bleibt und der pH-Wert sich bei 10,0 stabilisiert; Aliquots bei -20 °C lagern und vor Gebrauch erneut für 5 min bei 100 °C kochen, auf RT abkühlen lassen

KLBM-Puffer (Kyriakis Lysis Buffer Modified, Ganzzellproteinextrakte)

1 M HEPES/KOH (pH 7,4)	20 ml/ l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	8 ml/ l
NaF	2,1 g/ l
β-Glycerophosphat	10,8 g/ l
Glyzerin (87 %)	115 ml/ l
Triton X-100	10 ml/ l
NaN ₃ -Stammlösung (10 %)	4 ml/ l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml KLBM-Puffer von: 10 µl DTT-Stammlösung (1 M), Protease- Inhibitoren (1 Tablette der „complete Mini“ von Roche bzw. 50 µl AEBSF (0,2 M), jeweils 10 µl Leupeptin (2 mM) und Aprotinin (0,3 M)) und je nach Experiment Phosphatase-Inhibitor (50 µl Natrium-Orthovanadat (0,2 M))

Extraktions-Puffer A (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, hypotonisch)

1 M HEPES/KOH (pH 7,9)	10 ml/ l
1 M KCl	10 ml/ l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	200 µl/ l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	400 µl/ l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer A von: 10 µl DTT-Stammlösung (1 M), 50 µl AEBSF (0,2 M)

Extraktions-Puffer C (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, Hochsalz-Extraktionspuffer)

1 M Hepes/KOH (pH 7,9)	20 ml/ l
1 M KCl	400 ml/ l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	2 ml/ l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	4 ml/ l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer C von:
10 µl DTT-Stammlösung (1 M) und 1 Tablette der „complete Mini“ von Roche
oder 100 µl AEBSF (0,2 M), 10 µl Leupeptin (2 mM), 10 µl Aprotinin (0,3 M)

Sammelgel für SDS-Page (5 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	34,75 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	8,5 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	6,25 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 5 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	10 µl

Trenngel für SDS-Page (8 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	23,7 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	13,3 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	8 µl

Trenngel für SDS-Page (10 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	20,3 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	16,7 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	10 µl

Trenngel für SDS-Page (12,5 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	16,2 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	20,8 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	12,5 ml
10 % SDS	0,5 ml

zum Starten der Polymerisierung je 10 ml Gellösung Zugabe von:

10 % APS	60 µl
TEMED	15 µl

4 x Lämmli-Puffer (SDS-PAGE Probenpuffer)

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	20 ml/ 100 ml
SDS	2,4 g/ 100 ml
Glyzerin (87 %)	50 ml/ 100 ml
β-Mercaptoethanol	25 ml/ 100 ml
Bromphenol Blau	0,04 %

auf 70 °C erwärmen, Stock bei -20 °C lagern

Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)

Tris	30,3 g/ l
Glycin	144,1 g/ l
10 % SDS	100 ml/ l

pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,5 einstellen

Laufpuffer für SDS-PAGE (1x)

Laufpuffer (10x)	100 ml/ l
------------------	-----------

Coomassie-Blau-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250	2,5 g/ l
Methanol	450 ml/ l
Essigsäure	100 ml/ l

Coomassie-Blau-Entfärbelösung

Methanol	450 ml/ l
Essigsäure	100 ml/ l

Transferpuffer für Westernblot

Glyzin	2,9 g/ l
Tris	5,8 g/ l
10 % SDS	3,7 ml/ l
Methanol	200 ml/ l

Ponceau-Färbelösung

Ponceau-Rot	2 g/ 100 ml
Trichloressigsäure	30 g/ 100 ml
Sulfosalicylsäure	30 g/ 100 ml

TBS (20x)

Tris	121,0 g/ l
NaCl	175,2 g/ l
KCl	7,5 g/ l

pH-Wert mit 1M HCl (~ 10,2 ml) auf 7,6 einstellen

TBS/Tween (TBST)

TBS (20x)	50 ml/ l
Tween 20	1 ml/ l

“Blocking”-Puffer für Westernblot (MPT)

Milchpulver	5 g
auf 100 ml mit TBS/Tween auffüllen	

“Blocking”-Puffer für Westernblot mit Phospho-spezifischen Antikörpern

BSA Fraktion V	5 g
auf 100 ml mit TBS/Tween auffüllen	

“Stripping”-Puffer

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	41,7 ml/ l
10 % SDS	200 ml/ l

vor jedem Gebrauch Zugabe von 700 µl β-Mercaptoethanol je 100 ml „Stripping“-Puffer

Lithiumchlorid-Waschpuffer für Kinase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	67 ml/ l
1 M LiCl	200 ml/ l
Triton X-100	1 ml/ l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe von 50 µl AEBSF (0,2 M) pro 10 ml

Kinase-Assay-Puffer

1 M HEPES/KOH (pH 7,4)	20 ml/ l
5 M NaCl	20 ml/ l
1 M MgCl ₂	5 ml/ l
NaF	0,21 g/ l
MnCl ₂	0,63 g/ l
β-Glycerophosphat	4,32 g/ l
Tween 20	1 ml/ l

Lagerung bei 4 °C, vor Verwendung Zugabe von 50 µl DTT-Stammlösung (1 M) pro 50 ml

ATP-Mix (Kinase-Assay)

1 M MgCl ₂	2,5 ml/ 50 ml
ATP-Dinatriumsalz	0,02 g/ 50 ml

mit ddH₂O auf 50 ml auffüllen; Aliquote bei -20 °C lagern, vor Verwendung auf Eis auftauen

Bindungspuffer für EMSA (3x)

1M HEPES/KOH (pH 7,9)	3 ml/ 50 ml
1 M KCl	7,5 ml/ 50 ml
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	300 µl/ 50 ml
1 M DTT	150 µl/ 50 ml
Ficoll	6 g/ 50 ml

Aliquote bei -20 °C lagern, vor Verwendung auf Eis auftauen

TBE (1x, DNA-EMSA-Laufpuffer)

TBE (10x)	100 ml/ l
-----------	-----------

TBE-Puffer (10x, Tris/Borat/EDTA)

Tris	108 g/ l
Borsäure	55 g/ l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	40 ml/ l

PAA-Gel für Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden (12 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	30 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	18 ml
10x TBE-Puffer	2 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1 h) Zugabe von:

10 % APS	300 µl
TEMED	60 µl

PAA-Gel für EMSA (6 %-ige Gellösung)

ddH ₂ O	72 ml
30 %-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	20 ml
10x TBE-Puffer	8 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1-3 h) Zugabe von:

10 % APS	500 µl
TEMED	50 µl

Hochsalz-Elutionspuffer (PAA-Gel)

1,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	6,7 ml/ l
5 M NaCl	200 ml/ l
0,5 M Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O (pH 8,0)	2 ml/ l

Lagerung bei 4 °C

RF1-Puffer (Herstellung kompetenter Bakterien)

Kaliumazetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	2,9 g/ l
RbCl	12,1 g/ l
MnCl ₂	6,3 g/ l
1 M CaCl ₂	10 ml/ l
Glyzerin (87 %)	150 ml/ l

pH-Wert mit 0,2 N Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

RF2-Puffer (Herstellung kompetenter Bakterien)

RbCl	1,2 g/ l
MOPS	2,1 g/ l
1 M CaCl ₂	75 ml/ l
Glyzerin (87 %)	150 ml/ l

pH-Wert mit 0,2 M NaOH auf 6,8 einstellen, sterilfiltrieren

IPTG-Stammlösung (0,1 M)

IPTG	1,19 g/ 50 ml
------	---------------

steril filtrieren, bei -20 °C stabil für 2-4 Monate

Glutathion-Elutionspuffer (für GST-Fusionsproteine)

1,5 M Tris/HCl (pH 8,0)	67 ml/ l
5 M NaCl	30 ml/ l
Glutathion	6,2 g/ l

Lagerung bei -20 °C, vor Verwendung Zugabe von 10 µl DTT-Stammlösung (1M) pro 10 ml Elutionspuffer

Kaliumphosphat-Puffer (0,2 M)

KH ₂ PO ₄	27,2 g/ l
---------------------------------	-----------

pH-Wert mit 1 M KOH auf 7,0 einstellen

Natriumphosphat-Puffer (0,2 M)

NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	27,6 g/ l
-----------------------------------------------------	-----------

„Harvesting“-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	1,7 ml/ 50 ml
1 M MES	2,5 ml/ 50 ml
Triton X-100	50 µl/ 50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von 50 µl DTT-Stammlösung (1 M)

„Assay“-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	4,17 ml/ 50 ml
1 M MES	6,25 ml/ 50 ml
1 M Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ • 4H ₂ O	1,25 ml/ 50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von ATP (Spatelspitze)

Luziferin-Lösung für Luziferase-Assay

Luziferin	28 mg/ 100 ml
1 M KHPO ₄ (pH 7,8)	0,5 ml/ 100 ml

Aliquots bei -20 °C lagern

p-ONPG-Lösung

p-ONPG	40 mg/ 10 ml
0,2 M Natriumphosphat-Puffer	5 ml/ 10 ml

Puffer Z für β-Galaktosidase-Assay

0,2 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0)	50 ml
1 M KCl	0,5 ml
1 M MgSO ₄	50 µl

vor Verwendung Zugabe von 50 µl DTT (1 M) pro 1 ml

Stopp-Lösung für β-Galaktosidase-Assay (1 M Natriumkarbonat)

Na ₂ CO ₃	106 g/ l
---------------------------------	----------

Ak-Beschichtungspuffer für Gewebekulturgefäße

1,5 M Tris/HCl (pH 8,5)	33,3 ml/ l
-------------------------	------------

Fixierungspuffer für SubG₁-Technik

Ethanol	70 %
PBS (pH 7,4)	20 %
ddH ₂ O	10 %

Extraktionspuffer für SubG₁-Technik (pH 7,8)

Na ₂ HPO ₄	9 Teile	50 mM
Zitronensäure	1 Teil	25 mM
Triton X-100		0,10 %
NaN ₃		0,01 %

Färbepuffer für Apoptosemessung (SubG₁-Technik) (pH 6,8)

PIPES	10 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2 mM
Triton X-100	0,10 %
NaN ₃	0,02 %

Annexin V-Bindepuffer (pH 7,4)

1 M Hepes (pH 7,4)	10 ml/ l
5 M NaCl	28 ml/ l
1 M KCl	5 ml/ l
1 M MgCl ₂	1 ml/ l
1 M CaCl ₂	2,5 ml/ l

FACS-Waschpuffer (pH 7,4)

PBS (1x, pH 7,4)	500 ml
BSA FraktionV	0,5 g
FKS	25 ml
NaN ₃ (10 %)	1 ml

Einfriermedium

DMSO	10 %
------	------

in RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS

10 x Puffer für Restriktionsendonukleasen (MBI-Fermentas)

Puffer	Zusammensetzung
B ⁺	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 mg/ ml BSA
G ⁺	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 0,5 M NaCl; 1 mg/ ml BSA
O ⁺	0,5 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M NaCl; 1 mg/ ml BSA
R ⁺	0,1 M Tris/HCl (pH 8,5); 0,1 M MgCl ₂ ; 1 M KCl; 1 mg/ ml BSA
Y ⁺	0,33 M Tris/Azetat (pH 7,9); 0,1 M Mg-azetat; 0,66 M K-azetat; 1 mg/ ml BSA

2.3. Enzyme

Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden, meist 10-fach konzentrierten Reaktionspuffern bei den angegebenen Herstellern bezogen und wenn nicht anders angegeben, nach den Hersteller-Protokollen verwendet.

– Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, NEB
– DNA-Polymerase I	MBI-Fermentas
– Klenow-Fragment	MBI-Fermentas
– T4 und T7 DNA-Polymerase	MBI-Fermentas
– T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
– T4 Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI-Fermentas
– CIAP („Calf Intestine Alkaline Phosphatase“)	MBI-Fermentas
– SAWADY Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab
– Proteinase K	Sigma-Aldrich
– RNase (Ribonuklease) Typ I-A	Sigma-Aldrich

2.4. Antikörper und Peptide

Für FACS-Färbungen mit Biotin-konjugierten primären Antikörpern wurde Phycoerythrin (PE)-gekoppeltes Streptavidin der Firma BD PharMingen als Sekundärreagenz genutzt. Zum Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin während der Apoptose kam AnnexinV-PE derselben Firma zum Einsatz.

2.4.1. Primäre monoklonale Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft
mouse CD3 ϵ (145-2C11)	Armen. Hamster	BD PharMingen
mouse CD28 (37.51)	Syrian Hamster	BD PharMingen
mouse CD95 (Fas, Jo2)	Armen. Hamster	BD PharMingen
NFATc1 (7A6)	Maus	Alexis Biochemicals
NFATc2 (4G6-G5)	Maus	Santa Cruz (sc-7296)
HA-Epitop (HA.11)	Maus	BAbCO
FLAG-Epitop (M2)	Maus	Sigma-Aldrich
β -Aktin (AC-15)	Maus	Sigma-Aldrich
phospho-Tyr (p-Y99)	Maus	Santa Cruz (sc-7020)
p-JNK1 (G7)	Maus	Santa Cruz (sc-6254)

Außerdem wurden uns gereinigte monoklonale Antikörper gegen murines CD3 ϵ und CD28 von Frau Prof. Anneliese Schimpl (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt, die von den gleichen Klonen stammten, wie die von der Firma BD PharMingen benutzten. Antikörper gegen murines Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN γ) erhielten wir freundlicherweise von Dr. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz).

2.4.2. Primäre polyklonale Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft
HPK1 (N-19)	Ziege	Santa Cruz (sc-6231)
ERK1 (K23)	Kaninchen	Santa Cruz (sc-94)
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
JNK1 (C-17)	Kaninchen	Santa Cruz (sc-474)
p38 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz (sc-535)
p-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	Cell Signaling Technology

2.4.3. Primäre gekoppelte Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft	gekoppelt an
mCD95 (Fas) Ligand (Klon H11)	Ratte	Alexis Biochemicals	Biotin

2.4.4. Sekundäre polyklonale Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft
Armenischer Hamster IgG	Ziege	Dianova

2.4.5. Sekundäre gekoppelte Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft	gekoppelt an
Maus IgG	Schaf	Amersham Pharmacia	HRP
Ziege IgG	Esel	Santa Cruz (sc-2056)	HRP
Kaninchen IgG	Esel	Amersham Pharmacia	HRP

2.4.6. Peptide

Für die Aktivierung der aus den Lymphknoten von DO11.10 TZR-transgenen (tg) Balb/c-Mäusen [Murphy *et al.*, 1990] isolierten CD4⁺ T-Zellen wurde das Hühnerei-Albuminpeptid 323-339 (OVA) der Firma Jerini AG verwendet. Die Proteinsequenz dieses antigenen Epitops ist: ISQAVHAAHAEINEAGR.

2.5. *Eingesetzte Oligonukleotide und Primer*

Alle verwendeten Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und lyophilisiert zugesandt. Die Aufnahme erfolgte in ddH₂O, in der Regel in einer Stock-Konzentration von 100 pmol/μl. Für die Sequenzierung wurde eine Lösung mit 10 pmol/μl eingesetzt. Die Lagerung der Primer erfolgte bei -20 °C.

Für EMSA's wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name des Oligo's	Sequenz
TCE _{dA>C} sense	5' -AGCTTGACCAAGAGGGATTCCCCCTAAATC-3'
TCE _{dA>C} antisense	3' -ACTGGTTCTCCCTAAAGGGGATTTAGTTCGA-5'
NFκB _{NFAT} sense	5' -GTAATTTAGCGGGATGGGAATTTCTTACTCCCG-3'
NFκB _{NFAT} antisense	3' -AAATCGCCCTACCCTTAAAGGAATGAGGGCGGAC-5'

Für die Einfügung einer HA-tag-Sequenz und multiplen Klonierungsstelle sowie von Terminationssequenzen in den retroviralen Expressionsvektor pEGZ-MCS wurden folgende Oligo's eingesetzt:

Name	Sequenz
HA-tag1 upper	5' -AATTGCACCATGGCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCC-3'
HA-tag1 lower	5' -CGATGGAGGCGTAGTCAGGCACGTCGTATGGGTAGGCCATGGTGC-3'
HA-tag2 upper	5' -TACGCCTCCATCGATGGCGCGCCCGTACGCGGACCGGTTAACCCGCGG-3'
HA-tag2 lower	5' -AATTCCGCGGGTTAACCGGTCCGCGTACGGGCGCGCCAT-3'
Term. upper	5' -GATCCTAAGTAAGTAAA-3'
Term. lower	5' -GATCTTTACTTACTTAG-3'

Für die PCR's zur Klonierung der entsprechenden retroviralen Expressionsvektoren kamen folgende Primer zur Anwendung:

Produkt	Primer	Sequenz
ER TM	ER ClaI upper	5' -GCGCTGCTATCGATCGAAATGAAATGGGTGCTTC-3'
	ER ClaI lower	5' -GCGCTAGCATCGATGATCGTGTGGGAAGCC-3'
h NFATc/A	hNFATcA ClaI U	5' -GCCGCCGCCATCGATATGCCAAGCACCAG-3'
	hNFATcA SmaI L	5' -CGTCGTTTCTCCCGGGTTAGAAAAAGCACCCAC-3'
h NFATc/C	hNFATcC ClaI U	5' -CAGCGCATCGATCCAAGCACCAGCTTTCCAG-3'
	hNFATcC BamHI L	5' -AGCACGAGCACCCACTCCTTGGATCCATAGTT-3'
HPK1	HPK1 ClaI U	5' -GCGCTGCAGCGCTGCACATCGATGACGTCGTGGACCCTGAC-3'
	HPK1 HpaI L	5' -GCATAGTTAACCTATGGATCCTTCAGGCCTGTAATCCCAGCT-3'
HPK1-N	HPK1 ClaI U	5' -GCGCTGCAGCGCTGCACATCGATGACGTCGTGGACCCTGAC-3'
	HPK1 N HpaI L	5' -GCATAGTTAACCTATGGATCCTTGTCCACGTCGTCA-3'
HPK1-C	HPK1 C ClaI U	5' -GCGCTGCAGCGCTGCACATCGATATCCCCACCCCTG-3'
	HPK1 HpaI L	5' -GCATAGTTAACCTATGGATCCTTCAGGCCTGTAATCCCAGCT-3'
HPK1 AS	HPK1 AS ClaI U	5' -GCGCTGCAGCGCTGCACATCGATGGATGTCCACGTCGTCAT-3'
	HPK1 AS HpaI L	5' -GCATAGTTAACCTATGGATCCTTGACGTCGTGGACCCTGAC-3'

Für die Sequenzierungsreaktionen wurden folgende Primer eingesetzt:

Name des Primers	Sequenz
pEGZ forward	5' -CACGTGAAGGCTGCCGAC-3'
pEGZ revers	5' -CTTCGGCCAGTAACGTTAGG-3'
HPK1 out	5' -GGTCTCTATTGAAAATGTCAGG-3'
HPK1 AA46	5' -CACTATGACCTGCTACAGCG-3'

Name des Primers	Sequenz
HPK1 Seq. 1	5´-GAGCTCCAGATTAGCTATGTC-3´
HPK1 Seq. 2	5´-GTCTGGTCTCCATTCCTCG-3´
HPK1 Seq. 3	5´-CAGCCAACACCGCTCGCCTAC-3´
HPK1 Seq. 4	5´-CCATCCACCAGCAGCCC-3´
HPK1 Seq. 5	5´-GACGCCTCTGTCCGTGTTTC-3´
HPK1 Seq. 6	5´-CTCACGCCGATGCACACAG-3´
ER start out	5´-AGTGTGCTTAATCACAAAGAGG-3´
ER end out	5´-CAGCACATTCCTTACAAACCT-3´
T3 promoter	5´-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3´
T7 promoter	5´-AAGGCTAGAGTACTTAATACGA-3´
pUC forward	5´-CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3´
pUC revers	5´-CACACAGGAAACAGCTATGAC-3´
T7 promoter	5´-AAGGCTAGAGTACTTAATACGA-3´
KRSPA F	5´-GTATTTAAGTGCCTAGCTCGATA-3´

2.6. Größenstandards

2.6.1. DNA-Fragmentlängenstandards

Es wurden die GeneRuler™ 100 bp sowie 1 kb DNA-Größenmarker der Firma MBI-Fermentas mit folgenden Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) verwendet:

100 bp Marker	1.031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100 / 80
1 kb Marker	10.000 / 8.000 / 6.000 / 5.000 / 4.000 / 3.500 / 3.000 / 2.500 / 2.000 / 1.500 / 1.000 / 750 / 500 / 250

2.6.2. Protein-Größenstandards

Es wurde der Protein-Größenmarker BenchMark™ von Gibco BRL verwendet, dessen Fragmentgrößen zwischen den einzelnen Chargen leicht variierten (10 Banden zwischen 10-200 Kilodalton). Exemplarisch sind die Bandengrößen in Kilodalton (kDa) der Charge 1.068.669 angegeben: 173, 111, 80, 61*, 49, 36, 25, 19, 13 sowie 9. Die mit * gekennzeichnete, pinkfarbige Bande dient dabei zur Orientierung auf dem SDS-PAA-Gel bzw. dem Immunoblot, da alle anderen Banden blau sind.

2.7. *Verwendete Plasmide und Konstruierte Vektoren*

2.7.1. Retrovirale Verpackungs- und Genexpressions-Vektoren

Die retroviralen Verpackungs- und Genexpressions-Vektoren pHIT 60, pHIT 123, pHIT 456 sowie pEGZ/MCS und pEGZ-cEBP β -ERTM wurden freundlicherweise von Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Derivate des Murinen Leukämie Virus (MLV) konstruiert [Soneoka *et al.*, 1995], wobei die cDNA's unter der Kontrolle des Zytomegalievirus-(CMV) Promotors transkribiert werden. Außerdem enthalten die Plasmide einen SV40-“Origin of Replication”, eine PolyA-Anfügestelle und ein Ampicillin-Resistenzgen.

pHIT 60

Dieses retrovirale Verpackungsplasmid kodiert für interne retrovirale Strukturproteine (gag) sowie für die reverse Transkriptase und Integrase (pol). Ihm fehlt eine retrovirale Verpackungssequenz ψ +

pHIT 123

Dieses retrovirale Verpackungsplasmid kodiert für das ecotrophe Hüllprotein (env) und erlaubt die Transduktion von Zellen der Ratte und der Maus. Ihm fehlt eine retrovirale Verpackungssequenz ψ +

pHIT 456

Dieses retrovirale Verpackungsplasmid kodiert für das amphotrophe Hüllprotein (env) und erlaubt die Transduktion von Zellen verschiedener Spezies (Maus, Hund, Katze, Huhn, Mensch). Ihm fehlt eine retrovirale Verpackungssequenz ψ +

pEGZ/MCS

Dieses von Dr. Dirk Lindemann (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) konstruierte retrovirale Expressionsplasmid ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pczCFG2 hCD8 EGZ [Lindemann *et al.*, 1997]. Es erlaubt über eine interne ribosomale Bindestelle (IRES) aus dem Enzephalo-Myokarditis-Virus die koordinierte Expression einer gewünschten cDNA mit einem Grünfluoreszenzprotein (EGFP). Die multiple Klonierungsstelle (MCS) setzt sich aus folgenden Restriktionsschnittstellen zusammen: EcoRI, SmaI und BamHI. Der Vektor enthält außerdem ein Zeocin-Resistenzgen sowie die retrovirale Verpackungssequenz ψ + [Knodel *et al.*, 1999].

pEGZ-HA

Dieses retrovirale Expressionsplasmid ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pEGZ/MCS. In dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle wurde ein Oligonukleotid kloniert, das für ein Transkriptions-Startkodon (ATG) sowie eine kurze Erkennungssequenz aus *Haemophilus aureus* (HA-tag) gefolgt von folgenden Restriktionsschnittstellen: ClaI, BsiWI, RsrII, HpaI, SacII sowie EcoRI kodiert. Die 5'-liegende EcoRI-Schnittstelle wurde dabei nicht rekonstituiert. Durch die Insertion einer cDNA im korrekten Leserahmen in diese multiple Klonierungsstelle (MCS) kann ein HA-Fusionsprotein und das EGF-Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors transkribiert werden.

Die folgenden retroviralen Expressionsplasmide sind Derivate des bicistronischen Vektors pEGZ-HA. Dabei wurden die PCR-Produkte („proofreading Polymerase“) der jeweiligen cDNA's zwischen der ClaI- und HpaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors im korrekten Leserahmen eingefügt, so dass ein HA-tag markiertes Fusionsprotein exprimiert wird.

pHA-HPK1 wt

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die wildtypische humane HPK1 (aa 2-833). In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(wt) als DNA-Matrize („template“); die eingesetzten Primer waren HPK1 ClaI U sowie HPK1 HpaI L.

pHA-HPK1 M(46)

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die Kinase-inaktive Form der humanen HPK1 (aa 2-833), die eine Mutation der Aminosäure Lysin 46 zu Methionin enthält. In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(M46) als DNA-Matrize („template“); die eingesetzten Primer waren HPK1 ClaI U sowie HPK1 HpaI L.

pHA-HPK1 wt N-term.

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für den N-terminalen Teil der wildtypischen humanen HPK1 (aa 2-385). In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(wt) als DNA-Matrize („template“); die eingesetzten Primer waren HPK1 ClaI U sowie HPK1 N HpaI L.

pHA-HPK1 M(46) N-term.

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für den N-terminalen Teil der Kinase-inaktiven Form der humanen HPK1 (aa 2-385). In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(M46) als DNA-Matrize; die eingesetzten Primer waren HPK1 ClaI U sowie HPK1 N HpaI L.

pHA-HPK1 wt C-term.

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für den C-terminalen Teil der wildtypischen humanen HPK1 (aa 386-833). In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(wt) als DNA-Matrize (“template”); die eingesetzten Primer waren HPK1 C ClaI U sowie HPK1 HpaI L.

pHA-HPK1 AS

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für ein “antisense” (AS)-Konstrukt der humanen HPK1, wozu die N-terminale Aminosäure-Sequenz in Gegensinn-Orientierung (aa 386-2) zwischen die ClaI/HpaI-Restriktionsschnittstellen des pEGZ-HA kloniert wurde. In der PCR diente der Vektor pCl-neo-HPK1(wt) als DNA-Matrize (“template”); die eingesetzten Primer waren HPK1 AS ClaI U sowie HPK1 AS HpaI L.

pEGZ-HA-Term.

Dieses retrovirale Expressionsplasmid ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pEGZ-HA. Kurz nach der multiplen Klonierungsstelle wurde in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle ein Oligonukleotid kloniert, das für Stopkodons (TAA) in allen drei möglichen Leserahmen kodiert. Es existieren zwei verschiedene Varianten mit folgenden Anordnungen des Oligo’s: T12 ($\rightarrow \rightarrow$) und T8 ($\leftarrow \rightarrow$).

Die folgenden retroviralen Expressionsplasmide sind Derivate des bicistronischen Vektors pEGZ-HA-Term. T12.

pHA-h NFATc/A

Dieses von Dr. Sergej Chuvpilo (dieses Labor) konstruierte und zur Verfügung gestellte retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die humane NFATc-Isoform A (aa 1-716). In der PCR diente der Vektor pRSV-NFATc/A [Chuvpilo *et al.*, 1999a] als DNA-Matrize (“template”); die eingesetzten Primer waren hNFATcA ClaI U sowie hNFATcA SmaI L. Das ClaI/SmaI-PCR-Produkt wurde dabei zwischen die ClaI/HpaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors im korrekten Leserahmen eingefügt.

pHA-h NFATc/C

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die humane Isoform C des NFATc (aa 2-942). In der PCR diente der Vektor pRSV-NFATc/C [Chuvpilo *et al.*, 1999a] als DNA-Matrize (“template”); die eingesetzten Primer waren hNFATcC ClaI U sowie hNFATcC BamHI L. Das ClaI/BamHI-PCR-Produkt wurde zwischen die ClaI/BamHI-Restriktionsschnittstelle des Vektors im korrekten Leserahmen eingefügt.

pHA-NFATp

Dieses von Corinne Stibbe (dieses Labor) konstruierte und zur Verfügung gestellte retrovirale Expressionsplasmid kodiert für das murine NFATp (aa 6-922). Es wurde als XbaI/SalI-Fragment aus dem Vektor pUC57-NFATp gewonnen, die Enden wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, und die cDNA wurde in die HpaI-Restriktionsschnittstelle des pEGZ-HA-Term. T12 eingefügt. Der korrekte Leserahmen wurde mittels Sequenzierung überprüft.

In die folgenden retroviralen Expressionsplasmide wurde die modifizierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ERTM, aa 281-599) kloniert, wodurch ein Fusionsprotein aus HA-tag, cDNA und ERTM exprimiert wird [Littlewood *et al.*, 1995]. Dabei wurde die ERTM-DNA entweder als BamHI-Fragment aus dem von Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) konstruierten und freundlicherweise zur Verfügung gestellten Vektor pEGZ-cEBP β -ERTM isoliert [Berberich-Siebelt *et al.*, 2000] oder aber, wie im Fall des N-terminalen ERTM, ein ClaI-PCR-Fragment mit diesem Plasmid als DNA-Matrize ("template") und den Primern ER ClaI upper sowie ER ClaI lower in die ClaI-Restriktionsschnittstelle des jeweiligen retroviralen Expressionsvektors kloniert.

pEGZ-HA-ERTM-Term.

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pEGZ-HA-Term. T12, in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle das BamHI-ERTM-Fragment eingeführt wurde.

pHA-HPK1 wt ERTM

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 wt, in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle an Position 4810 nach partiellem Restriktionsverdau das BamHI-ERTM-Fragment kloniert wurde.

pHA-HPK1 M(46) ERTM

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 M(46), in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle an Position 4810 nach partiellem Restriktionsverdau das BamHI-ERTM-Fragment kloniert wurde.

pHA-ERTM HPK1 wt

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 wt, in dessen ClaI-Restriktionsschnittstelle das ClaI-PCR-Fragment des ERTM kloniert wurde.

pHA-ER™ HPK1 M(46)

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 M(46), in dessen ClaI-Restriktionsschnittstelle das ClaI-PCR-Fragment des ER™ kloniert wurde.

pHA-ER™ HPK1 wt ER™

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 wt ER™, in dessen ClaI-Restriktionsschnittstelle das ClaI-PCR-Fragment des ER™ kloniert wurde.

pHA-ER™ HPK1 M(46) ER™

Dieses Konstrukt ist ein Derivat des bicistronischen Vektors pHA-HPK1 M(46) ER™, in dessen ClaI-Restriktionsschnittstelle das ClaI-PCR-Fragment des ER™ kloniert wurde.

2.7.2. Eukaryontische Expressionsplasmide

pBS KRSPA

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid ist ein Derivat des Vektors Bluescript-KS⁺ von Stratagene, in dessen distalem Ende der MCS der Promotor des Rous-Sarkoma-Virus (RSV-LTR) und eine SV40-Polyadenylierungssequenz kloniert wurden [Dorn *et al.*, 1990; Hoffmeyer *et al.*, 1998].

In die folgenden Derivate des Vektors pBS KRSPA wurden die XbaI/SacII-Fragmente des jeweiligen retroviralen Expressionsplasmides in den mit den gleichen Restriktions-Endonukleasen gespaltenen Vektor kloniert.

pKRSPA-HA

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid wurde aus dem retroviralen Vektor pEGZ-HA subkloniert.

pKRSPA-HPK1 wt

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid kodiert für die HA-markierte, wildtypische (wt) humane HPK1 (aa 2-833) und wurde aus dem retroviralen Vektor pHA-HPK1 wt subkloniert.

pKRSPA-HPK1 M(46)

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid kodiert für die HA-markierte, Kinase-inaktive Form der humanen HPK1 (aa 2-833), die eine Mutation der Aminosäure Lysin 46 zu Methionin enthält. Es wurde aus dem retroviralen Expressionsvektor pHA-HPK1 M(46) subkloniert.

pKRSPA-HPK1 wt N-term.

Dieses Expressionsplasmid kodiert für den HA-markierten, N-terminalen Teil der humanen HPK1 (aa 2-385) und wurde aus dem retroviralen Vektor pHA-HPK1 wt N-term. subkloniert.

pKRSPA-HPK1 M(46) N-term.

Dieses Expressionsplasmid kodiert für den HA-markierten, N-terminalen Teil der Kinase-inaktiven Form der humanen HPK1 (aa 2-385) und wurde aus dem retroviralen Vektor pHA-HPK1 M(46) N-term. subkloniert.

pKRSPA-HPK1 wt C-term.

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid kodiert für den HA-markierten, C-terminalen Teil der wildtypischen humanen HPK1 (aa 386-833) und wurde aus dem retroviralen Vektor pHA-HPK1 wt C-term. subkloniert.

pKRSPA-HPK1 AS

Dieses eukaryontische Expressionsplasmid kodiert für einen "antisense" (AS)-Vektor der humanen HPK1 (aa 386-2) und wurde aus dem retroviralen Konstrukt pHA-HPK1 AS subkloniert.

pUC57-NFATp

Dieser eukaryontische Expressionsvektor kodiert für das murine NFATp (aa 6-922), das in die Eco321-Restriktionsschnittstelle des pUC57 (MBI-Fermentas) kloniert wurde.

Die **pCl-neo (Promega)** basierenden Expressionsplasmide für die FLAG-markierten cDNA's der wildtypischen HPK1 (**pCl-neo-HPK1(wt)**) und der Kinase-inaktiven Form mit einer Mutation der Aminosäure 46 Lysin zu Methionin (**pCl-neo-HPK1(M46)**) wurden uns freundlicherweise von Dr. Stephan M. Feller (Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Nähere Informationen zur Klonierung der cDNA's (aa 1-834) und Mutagenese sind unter Hu *et al.* (1996) zu finden.

2.7.3. Expressionsvektoren für bakterielle GST-Fusionsproteine

pGEX GST c-Jun₅₋₈₉

Dieses prokaryontische Expressionsplasmid ist ein Derivat des pGEX (Amersham Pharmacia Biotech) und kodiert für das wildtypische murine c-Jun (aa 5-89), das als GST-gekoppeltes Protein exprimiert wird und aufgereinigt werden kann [Smith und Johnson, 1988]. Es wurde uns freundlicherweise von Dr. Jim Woodgett (Amgen Research Institute, Toronto, Kanada), in dessen Labor dieses Plasmid konstruiert wurde, zur Verfügung gestellt [Kyriakis *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1994].

2.7.4. Reporterplasmide für Luziferase-Assays

p c-myb/ κ B-TATA luc

Dieses Reporterplasmid für Luziferase-Assays ist ein pTATA luc⁺-Derivat [Altschmied und Duschl, 1997]. Es entstand durch Insertion von 3 Kopien einer NF κ B-Erkennungssequenz aus dem murinen intronischen Enhancer des c-myb-Gens [Suhasini *et al.*, 1997] in die Sall-Restriktionsschnittstelle des pTATA luc⁺-Plasmids.

4xPu-b_B-TATA luc

Dieses Reporterplasmid für Luziferase-Assays ist ein pTATA luc⁺-Derivat [Altschmied und Duschl, 1997]. Es entstand durch Insertion von 4 Kopien der P1/Pu-b_B, einer komplexen NFAT/AP-1-Erkennungssequenz aus dem murinen IL-4-Promotor [Chuvpilo *et al.*, 1993], in die Sall-Restriktionsschnittstelle des pTATA luc⁺-Plasmids. Neben NFAT/AP-1 können auch Oktamer-Faktoren und C/EBP an die P1/Pu-b_B binden.

2.8. Nährmedien

2.8.1. Flüssigmedien und Agarplatten für die Bakterienkultur

2xYT-Medium

2-YT Broth (GibcoBRL)	31 g
-----------------------	------

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

oder

2xYT-Medium

Bacto-Trypton	16 g
Hefe-Extrakt	10 g
NaCl	10 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 μ l) auf 7,0 einstellen

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

2xYT-Agarplatten

2-YT Broth (GibcoBRL)	31 g
Agar-Agar	12 g

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

oder2xYT-Agarplatten

Bacto-Trypton	16 g
Hefe-Extrakt	10 g
NaCl	10 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 µl) auf 7,0 einstellen

auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

LB-Agarplatten

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	12 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 200 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf ca. 60°C eventuelle Zugabe von Antibiotika.

SOB-Medium

Bacto-Trypton	20 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 100 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl ₂ (1 M)	10 ml
MgSO ₄ • 7H ₂ O (1 M)	10 ml

SOB-Agarplatten

Bacto-Trypton	20 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
Agar-Agar	12 g

pH-Wert mit 10 M NaOH (~ 100 µl) auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, nach dem Autoklavieren und vor Verwendung Zugabe von:

MgCl ₂ (1 M)	10 ml
MgSO ₄ • 7H ₂ O (1 M)	10 ml

2.8.2. Zellzucht-Kulturmedien

Suspensions-Zelllinien (Jurkat, U-937, EL-4, WEHI-231)

RPMI 1640 Fertigmedium	1 l
FCS (für Jurkat, EL-4)	5 %
FCS (für U-937, WEHI-231)	10 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	6 ml

bei EL-4, WEHI-231

β-Mercaptoethanol (50 mM)	1 ml
---------------------------	------

adhärente Zelllinie (293T)

D-MEM Fertigmedium (Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium)	500 ml
FCS	10 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	3 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	500 µl
Natrium-Pyruvat (100 mM)	5 ml
Hepes (1 M)	5 ml

primäre murine T-Zellen (CD4⁺)

X-VIVO 15	500 ml
FCS	10 %
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	3 ml
β-Mercaptoethanol (50 mM)	500 µl
Natrium-Pyruvat (100 mM)	5 ml
Hepes (1 M)	5 ml
MEM (Non-essential amino acids, 100x)	5 ml

primäre murine dendritische Zellen der Milz

RPMI 1640 DUTCH modifiziert (20 mM Hepes, 1 g/ l Na-Bicarbonat)	1 l
FCS	10 %
L-Glutamin (200 mM)	10 ml
Penicillin (10.000 IU/ ml), Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	6 ml

2.9. Antibiotika

– Ampicillin (Stock: 100 mg/ ml), Endkonz. 100 µg/ ml	Hoechst
– Stock: Penicillin (10.000 IU/ ml)/ Streptomycinsulfat (10 mg/ ml)	Hoechst
– Zeocin (Stock: 100 mg/ ml), Endkonz. 200 µg/ ml bis 400 µg/ ml	InvitroGen

2.10. Bakterien

Die Bakterien wurden von Stratogene bezogen und wie unter 2.16.1. und 2.16.2. beschrieben weiterbehandelt. In allen hier verwendeten Stämmen von *Escherichia coli* (*E.coli*) wird die genetische Rekombination aufgrund einer Mutation im recA-Gen unterdrückt.

Zur Vermehrung der retroviralen Expressionsvektoren und von Plasmiden mit einer Größe ab 9 Kilobasenpaare (kB) und größer wurde der hochkompetente Stamm **XL10-Gold™** verwendet. In diesen Zellen wird eine höhere Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA durch eine Deletion des EndA-Gens erreicht. Außerdem erlaubt die Deletion aller bekannten K12-Restriktionssysteme das Klonieren methylierter DNA. Zur Vermehrung von kleineren Plasmiden (3-9 kB) wurde der Stamm **DH5 α** mit den entsprechenden Vektoren transformiert.

Zur Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine wurde der Stamm **BL21** verwendet, da in diesem die Proteine relativ stabil sind (deletierte Proteasen OmpT, Lon) und hoch exprimiert werden.

2.11. Gewebekulturzellen

Alle Gewebekulturzellen wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), die Europäische Sammlung von Zellkulturen (ECACC) oder die „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen.

Jurkat T-Zellen wurden von einem Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie isoliert. Es ist eine pseudodiploide Zelllinie, die nach Stimulation mit Phorbol ester und anderen Lektinen (Adhäsionsmoleküle) oder monoklonalen Antikörpern gegen den T3-T-Zell-Rezeptor (TZR) große Mengen an Interleukin-2 (IL-2) synthetisiert [Weiss *et al.*, 1984]. Die Produktion von humanem Interferon γ (IFN γ) kann ebenfalls induziert werden (DSMZ Nr. ACC 282).

U-937-Zellen sind eine in Einzelzellen wachsende Suspensionskultur und wurden aus einem humanen histiozytären Lymphom gewonnen. Aufgrund verschiedener Marker, wie Fc ϵ -Rezeptoren (FcR), Rezeptoren für den Komplementfaktor 3 (CR3) und ihrer Fähigkeit zur Phagozytose von Latexpartikeln sowie Antikörper (Ak)-beschichteten Erythrozyten wurden diese Zellen als eine Linie von Vorläuferzellen monozytärer Phagozyten charakterisiert [Sundstrom und Nilsson, 1976]. Sie haben eine hohe Vermehrungsrate und heterogene Gestalt (DSMZ Nr. ACC 5).

293-Zellen wurden aus primären humanen embryonalen Nierenzellen nach einer Transformation durch einen Adenovirus des Types 5 (Ad 5) etabliert [Graham *et al.*, 1977]. Diese Zelllinie, die sowohl adhärent als auch in bewegten Suspensionskulturen wächst, ist auch unter den Bezeichnungen HEK 293 oder nach Einfügung des SV40-T-Antigens als 293T bekannt (DSMZ Nr. ACC 305).

EL-4 T-Zellen wurden aus einem murinen, mittels 9,10-dimethyl-1,2-benzanthrazen induzierten T-Zell-Lymphom etabliert. Nach einer Phorbol ester-Stimulation sekretiert diese Zelllinie Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 und IL-10 sowie den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (ATCC Nr. TIB-39).

WEHI-231-Zellen wurden aus einem murinen, durch Mineralöl induziertem B-Zell-Lymphom in einer (BALB/cxNZB) F1-Maus etabliert. Diese lymphoblastische Zelllinie exprimiert IgM auf der Zelloberfläche. Die Sekretion von IgM kann über LPS-Stimulation induziert werden (ATCC Nr. CRL 1702; ECACC 85022107).

Primäre murine CD4-positive (CD4⁺) T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von DO11.10 TZR-transgenen (tg) Balb/c Mäusen [Murphy *et al.*, 1990], C57 Black 6 Mäusen oder C57 Black 6 Mäusen, die defizient für NFATp [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998b] bzw. NFATp und NFAT 4 [Ranger *et al.*, 1998a] sind, nach der unter 2.15.5. beschriebenen Methode isoliert.

2.12. Verbrauchsmaterialien

– 1,5 ml Reagiergefäße	Sarstedt, Eppendorf
– 2 ml Reagiergefäße	Eppendorf
– 6-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one
– 12-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one
– 24-well Gewebekulturplatten	Greiner bio-one, Falcon
– 15 ml/ 50 ml Polypropylenröhrchen	Greiner bio-one, Nunc
– 2 ml Kryotubes	Greiner bio-one
– Einmalkanülen (26G _{3/8} ; 0,45 x 10 mm)	Hartenstein
– Einmalküvetten	Hartenstein
– Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Hartenstein
– FACS-Röhrchen	Hartenstein
– Gewebekulturflaschen (50, 250, 500 ml))	Greiner bio-one

– Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)	Falcon, Greiner bio-one
– Glaswaren	Schott
– Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schuell
– Parafilm	Hartenstein
– Pipettenspitzen	Eppendorf
– Röntgenfilme (13x18 cm, BioMax)	Kodak
– Serologische Pipetten	Sarstedt
– Sterilfilter (0,2 µM/ 0,45 µM)	Schleicher & Schuell
– Whatman Papier	Hartenstein
– Zellsiebe (70 µM)	Falcon/ Laborbedarf Schubert

2.13. Geräte

– Autoklav	Stiefenhofer
– Blotgerät TransphorLid	Hofer
– Brutschränke	Nunc, Heraeus
– DNA-Sequenzierer 373A	Perkin Elmer
– Eismaschine	Genheimer
– Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20)	Leica
– Gefrierschränke (-20°C; -70°C)	Privileg, Bosch, Liebherr; Heraeus
– Geldokumentationssystem	Herolab
– Gelkammern	Stratagene, Hofer
– Geltrockner	BioRad, Hartenstein
– Heizblöcke	Hartenstein
– Kühlzentrifugen	Heraeus
– Lichtmikroskope	Olympus, Leica
– Luminometer	Berthold
– Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Brand
– Mikrozentrifugen	Eppendorf
– PCR-Maschinen	Perkin Elmer, MWG
– pH-Meter	Ingold, Hartenstein
– Phospho-Imager	Molecular Dynamics
– Quarzküvetten	Hellma
– Röntgen-Verstärkerfolie	DuPont

– Rotoren (JA-10, JA-14)	Beckman
– Schüttelinkubator	Hartenstein, New Brunswick
– Scintillations-Meßgerät	Canberra Packard
– Spannungsquelle	Amersham Pharmacia Biotech
– Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech
– Sterilbank	Heraeus, Gelaire
– Stickstoff-Tanks	tec-lab
– Ultrazentrifuge	Beckman
– UV-Stimulationsgerät UVT-20M	Herolab
– Vortexer	Hartenstein
– Waage Precisa 300 MC	Sartorius, Hartenstein
– Wasserbäder	Hartenstein
– Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus)	Millipore
– Westernblot-Apparatur	Hoefer
– Zählkammer (Neubauer improved)	Brand

2.14. Angaben zu den Herstellern

Alexis Biochemicals Deutschland GmbH, Grünberg, BRDeutschland

American Type Culture Collection (**ATCC**), Manassas, VA, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRDeutschland

AppliChem GmbH, Darmstadt, BRDeutschland

BAbCO (Berkeley Antibody Company), Richmond, CA, USA

BD PharMingen (BD Biosciences), Heidelberg, BRDeutschland; San Diego, CA, USA

Beckman, Palo Alto, CA, USA

Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, BRDeutschland

Bio Rad Laboratories, München, BRDeutschland

Bio Whittaker Inc., Verviers, Belgien

Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, BRDeutschland

Bosch, Robert Bosch GmbH, Stuttgart, BRDeutschland

Brand GmbH + Co. KG, Wertheim a.M., BRDeutschland

Calbiochem-Novabiochem AG, Bad Soden, BRDeutschland

Canberra Packard, Frankfurt a.M., BRDeutschland

Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, BRDeutschland

CEDARLANE[®], Hornby, Ontario, Kanada

Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (**DSMZ**),
Braunschweig, BRDeutschland

Dianova, Hamburg, BRDeutschland

DuPont Performance Coatings Herberts GmbH & Co. KG, Wuppertal, BRDeutschland

ECACC (CAMR Centre for Applied Microbiology & Research), Salisbury, Wiltshire,
England

Eppendorf, Hamburg, BRDeutschland

Falcon™ (BD Biosciences), Heidelberg, BRDeutschland; Boston, Massachusetts, USA

Fluka, Neu-Ulm, BRDeutschland

Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien

Genheimer GmbH, Hettstadt, BRDeutschland

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen, BRDeutschland

GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe / Eggenstein, BRDeutschland

Greiner bio-one, Frickenhausen, BRDeutschland

Hartenstein, Würzburg, BRDeutschland

Hellma, Mühlheim/ Baden, BRDeutschland

Heraeus, Hanau, BRDeutschland

Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, BRDeutschland

Hoechst AG (Aventis), Frankfurt a.M., BRDeutschland

Hofer (Amersham Pharmacia Biotech), Freiburg, BRDeutschland

Ingold (Merck Eurolab), Darmstadt, BRDeutschland

Invitrogen, Groningen, Niederland

Jerini AG, Berlin, BRDeutschland

Kodak, Stuttgart, BRDeutschland

Laborbedarf Schubert, Wackersdorf, BRDeutschland

Leica Microsystems AG, Wetzlar, BRDeutschland

Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, BRDeutschland

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, BRDeutschland

MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRDeutschland

Merck Eurolab (VWR International Inc.), Darmstadt, BRDeutschland

Millipore GmbH, Eschborn, BRDeutschland

Molecular Dynamics (Amersham Pharmacia Biotech); Freiburg, BRDeutschland;
Buckinghamshire, England

MWG-Biotech, Ebersberg, BRDeutschland

NEB (New England Biolabs) GmbH, Frankfurt, BRDeutschland

New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ, USA
Novartis Pharma GmbH (Sandoz), Nürnberg, BRDeutschland
Nunc, Wiesbaden-Biebrich, BRDeutschland
Olympus Optical GmbH, Hamburg, BRDeutschland
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRDeutschland
Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH (ABI), Weiterstadt, BRDeutschland
Privileg, Quelle AG, Fürth, BRDeutschland
Quiagen GmbH, Hilden, BRDeutschland
Roche Applied Science, Mannheim, BRDeutschland
Saliter, J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG - Milchwerk, Obergünzburg, BRDeutschland
Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA
Sarstedt, Nürnbergrecht, BRDeutschland
Sartorius, Göttingen, BRDeutschland
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, BRDeutschland
Schott-Glas, Mainz, BRDeutschland
Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg, BRDeutschland
Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRDeutschland
Stiefenhofer C. GmbH, Peiting, BRDeutschland
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland
tec-lab, Königstein/ Ts., BRDeutschland

2.15. Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.15.1. Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten und Stimulationen wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die in 2 ml-Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ($6,0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ Einfriermedium) wurden in 37 °C warmen Wasser aufgetaut und die Zellsuspension in ein mit 10 ml Komplettmedium gefülltes 15 ml Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (200 g, 8 min, RT) wurden die Zellen in Komplettmedium resuspendiert, gezählt (Neubauer-Zählkammer, Trypanblau-Ausschlussmethode) und in Gewebekulturgefäße überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Das komplette Zellkulturmedium wurde wachstumsabhängig alle 2 bis 4 Tage erneuert. Die adhärenen 293T-Zellen wurden nach Waschen mit PBS durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA pro 90 mm Gewebekulturschale und 3-minütigem Einwirken von den Kultur-

gefäßen gelöst und nach einmaligem Waschen mit Kompletmedium (200 g, 8 min, 10 °C) in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 neu ausgesät.

2.15.2. Induktion der Zellen

Im folgenden Abschnitt werden die Konzentrationen für die optimale Stimulation bzw. Suppression von Gewebekulturzellen und primären Zellen mit unterschiedlichen Stimuli angegeben:

TPA: 20 ng/ ml zur Stimulation von Zellen der Zelllinien EL-4 und 293T,
10 ng/ ml für primäre Zellen und Zellen der Zelllinie Jurkat

Ionomycin: 1 mM/ ml zur Stimulation von Zellen der Zelllinien EL-4 und 293T,
0,5 mM für primäre Zellen und Zellen der Zelllinie Jurkat

Cyclosporin A: 100 ng/ ml zur Behandlung von Zelllinien und primären Zellen

Die Zellen wurden zwischen 2-24 h mit den angegebenen Induktoren inkubiert.

2.15.3. Transiente Transfektionen

Zur transienten Transfektion eukaryontischer Zellen wurden die Transfektionsreagenzien SuperFect™ bei Suspensionszellen (Jurkat, EL-4) und PolyFect™ bei adhären Zellen (293T) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Zwei Stunden vor der Transfektion wurden in eine 6-well Gewebekulturplatte pro Kavität 2,5 ml in Suspension wachsende Zellen ($5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$) pipettiert. Die 293T-Zellen wurden einen Tag zuvor gesplittet, wobei pro Kavität einer 6-well Gewebekulturplatte $7,5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt wurden. Der Transfektionsansatz setzte sich aus bis zu 4 µg Plasmid-DNA in 75 µl FKS-freiem Zellkulturmedium und 6 µl Transfektionsreagenz zusammen. Nach kurzem Vortexen des Ansatzes und 5-10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz entweder direkt zu den Zellen (Suspensionskultur) gegeben oder das Medium vor Zugabe des Transfektionsansatzes verworfen und der Ansatz vorsichtig in 2,5 ml neuem Medium den Zellen zugegeben (adhärente Zellen). Nach 24-48 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) konnten die Zellen nach Bedarf stimuliert werden (s. 2.15.2. und 2.15.7.1.).

2.15.4. Beschichtung von Gewebekulturplatten mit α CD3- oder α CD95-Antikörpern

Es wurden 24-well Gewebekulturplatten nach folgendem Schema mit jeweils 1 ml pro Kavität der entsprechenden Antikörperlösungen (Ak-Lsg.) in 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) beschichtet:

Erster Ak	Ziege-anti-Armenischer Hamster IgG (30 μ g/ ml)
	Ak-Lsg. entfernen, zweimal mit komplettem Medium waschen
Zweiter Ak	Armenischer Hamster-anti-Maus CD3 ϵ (5 μ g/ ml)
oder	Armenischer Hamster-anti-Maus CD95 (5 μ g/ ml)
	Ak-Lsg. entfernen, zweimal mit komplettem Medium waschen

Die Beschichtung erfolgte durch jeweils 24 h-ige Inkubation bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Die Gewebekulturplatten wurden entweder sofort für die Stimulation verwendet oder bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

2.15.5. Präparation und Stimulation von CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Isolation und Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen der DO11.10 TZR-transgenen (tg) Balb/c-Mäuse erfolgte in Zusammenarbeit und mit Hilfe von Frau Brigitte Santner-Nanan (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) [Santner-Nanan *et al.*, 1998] und Mithilesh Kumar Jha (dieses Labor). Alle Schritte erfolgten dabei unter sterilen Bedingungen.

2.15.5.1. Isolation von Lymphknotenzellen

Die 6-8 Wochen alten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, mit 70 %-igem Ethanol benetzt und die Lymphknoten entnommen. Diese wurden in sterile 6-well-Gewebekulturschalen mit komplettem RPMI 1640 (4 °C, auf Eis) überführt. Anschließend wurden die Lymphknoten durch ein Zellsieb (70 μ M) gerieben und dreimal mit 50 ml PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ (2 % FKS) gewaschen (200 g, 8 min, 4 °C).

2.15.5.2. Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen

Zu diesem Zweck wurde ein Aufreinigungs-kit für murine CD4⁺ T-Zellen verwendet. Die Methode basiert auf der Negativselektion unerwünschter Zellpopulationen (CD8⁺ Zellen, B-Zellen) über eine Säule. Auf diese können ca. 1 x 10⁸ Zellen geladen werden, was in etwa den Lymphknotenzellen dreier Mäuse entspricht.

2.15.5.3. Anreicherung dendritischer Zellen der Milz

Die Milzen wurden nach Entnahme zunächst in eine mit komplettem DUTCH-modifiziertem RPMI 1640 gefüllte Gewebekulturschale (60 mm) gegeben, mit einer chirurgischen Pinzette in Stücke zerteilt, suspendiert und mit 50 ml Medium gewaschen (200 g, 8 min, 4 °C). Anschließend wurde das in 8 ml Medium (2 Milzen) aufgenommene Zellsediment für 10-14 h in 50 ml Gewebekulturflaschen inkubiert (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit). Die nicht-adhären Zellen wurden danach in einem 15 ml Polypropylenröhrchen vorsichtig über 2 ml Metrizamid-Lösung (14,5 % Metrizamid in komplettem DUTCH-modifiziertem RPMI 1640) geschichtet und zentrifugiert (250 g, 10 min, RT, ohne Bremse). Die Interphasen-Zellen wurden in 50 ml Medium gewaschen (200 g, 8 min, RT), das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und mit 2000 rad bestrahlt. Anschließend wurden die dendritischen Zellen (DZ's) wie zuvor gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Zelldichte eingestellt.

2.15.5.4. T-Helferzell-Aktivierung und -Differenzierung

2.15.5.4.1. T-Zell-Stimulation mit α CD3- und α CD28-Antikörpern

CD4⁺ T-Zellen ($3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) wurden auf Eis mit löslichem α CD28-spezifischem Ak (10 $\mu\text{g/ml}$ in komplettem X-VIVO 15 mit Zusatz von 100 pg rekombinantem IL-2) 10 min leicht schüttelnd inkubiert. In die Kavität einer mit α CD3-spezifischem Ak beschichteten 24-well Gewebekulturplatte (s. 2.15.4.) wurden anschließend 300 μl dieser Zellsuspension pipetiert und die T-Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit), bevor die so „geprimten“ Zellen mit retroviralen Überständen infiziert werden konnten.

2.15.5.4.2. T-Zell-Stimulation mit OVA-Peptid

Für diese Form der Aktivierung wurden die angereicherten CD4⁺ T-Zellen von DO11.10 TZR-tg Balb/c-Mäusen verwendet, welche in komplettem X-VIVO 15 kultiviert wurden. Die T-Zellen wurden bei einer Zellkonzentration von $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ gemeinsam mit teilungsinaktivierten antigenpräsentierenden DZ's ($5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) in 24-well Gewebekulturplatten in einem Totalvolumen von 2 ml je Kavität kultiviert. Dabei wurden jeweils 4 μg OVA-Peptid und 200 pg rekombinantes IL-2 zugegeben. Nach 24 h-iger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) konnten die so „geprimten“ Zellen mit retroviralen Überständen infiziert werden.

2.15.5.4.3. T-Zell-Differenzierung

Die angereicherten CD4⁺ T-Zellen von DO11.10 TZR-tg Balb/c-Mäusen wurden bei einer Zellkonzentration von $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ gemeinsam mit teilungsinaktivierten antigenpräsentierenden DZ's ($5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) in 24-well Gewebekulturplatten in komplettem X-VIVO 15 in einem Totalvolumen von 2 ml je Kavität kultiviert. Dabei wurden jeweils 4 µg OVA-Peptid und die folgenden Zytokine bzw. Antikörper zugegeben:

Differenzierung zu		
T _H 0-Zellen	T _H 1-Zellen	T _H 2-Zellen
rIL-2 (200 pg)	rIL-2 (200 pg)	rIL-4 (12 ng)
anti IL-4 (20 µg)	rIL-12 (20 ng)	anti IFN γ (20 µg)
anti IFN γ (20 µg)	anti IL-4 (20 µg)	

Die Zellen wurden zur Differenzierung im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) 5-7 Tage kultiviert, wobei je nach Proliferation das Medium mit den Zytokinen bzw. Antikörpern - aber ohne OVA-Peptid - teilweise (30-50 %) erneuert wurde. Eine Infektion mit retroviralen Überständen war nach 24 h-iger Inkubation möglich.

2.15.6. Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion der Zielzellen

Die Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion von Zielzellen [Kuss *et al.*, 1999] erfolgte in Zusammenarbeit und mit Hilfe von Frau Christa Kraus und Dr. Ingolf Berberich (beide Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg). Alle Schritte erfolgten dabei unter sterilen Bedingungen.

2.15.6.1. Kotransfektion in 293T-Zellen

Am Vortag gesplittete (12-18 h) und zu 50-60 % konfluente 293T-Zellen wurden in 90 mm Gewebekulturschalen mit SuperFect™ oder PolyFect™ nach einem leicht modifiziertem Herstellerprotokoll transfiziert. Dazu wurden pro Schale in einem 15 ml Polypropylenröhrchen folgende Volumina pipettiert:

9 µg pHIT 60 (retrovirales Verpackungsplasmid; kodiert für gag, pol)
und 9 µg pHIT 123 (retrovirales Verpackungsplasmid; kodiert für env;
 Infektion von primären murinen CD4⁺ T-Zellen, WEHI-231)

oder **9 µg pHIT 456** (retrovirales Verpackungsplasmid; kodiert für env;
Infektion von Jurkat, EL-4, U-937, WEHI-231)

und **15 µg retroviraler Expressionsvektor** (z.B. pHA-HPK1 wt)

mit RPMI 1640 (ohne FKS!) auf 700 µl auffüllen und resuspendieren,

Zugabe von **55 µl SuperFect™ oder PolyFect™**, kurz vortexen,

zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubieren, Zugabe von 4 ml komplettem DMEM.

Anschließend wurde das komplette DMEM vorsichtig aus den 293T-Gewebekulturschalen entfernt und die Zellen mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Nach einer Inkubation von 6 bis 12 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit) wurde der Transfektionsansatz verworfen und 6 ml komplettes Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben.

2.15.6.2. Ernte und Lagerung der retroviralen Überstände

Jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion mit den zwei retroviralen Verpackungs- und dem retroviralen Expressionsplasmid konnten die Retroviren-enthaltenden Zellkulturüberstände abgenommen werden. Dazu wurde der Zellkulturüberstand mit einer 10 ml Einmalspritze entfernt und durch einen Sterilfilter (0,45 µm) passiert, um Kontaminationen mit 293T-Zellen zu vermeiden. Den filtrierten Überständen wurde Polybren (Stock: 10 µg/ µl) in einer Endkonzentration von 10 µg/ ml zugegeben und vorsichtig gemischt. Aliquote der Retroviren-enthaltenden Überstände wurden in 2 ml Reagiergefäßen bei -70 °C gelagert. Den Zellen wurde vor der weiteren Inkubation im Brutschrank 6 ml neues, komplettes DMEM zugegeben. Die Transfektionseffizienz konnte 48 h nach der Triple-Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Expression des EGFP (Verstärktes Grünfluoreszenzprotein) überprüft werden. Sie sollte mindestens 60 % der 293T-Zellen betragen.

2.15.6.3. Infektion von WEHI-231 zur Kontrolle der retroviralen Überstände

Zur Überprüfung der Qualität der retroviralen Überstände wurden WEHI-231 B-Zellen mit kurz zuvor aufgetauten Aliquoten in 15 ml Polypropylenröhrchen infiziert. Dazu wurden jeweils 2×10^5 Zellen mit 100 µl bzw. 1 ml der Retroviren-enthaltenden Überstände in einem Totalvolumen von 2 ml nach 10-minütiger Inkubation bei RT zentrifugiert (1100 g, 150 min, 32 °C). Anschließend wurde das Zellsediment in 2 ml komplettem RPMI 1640 resuspendiert, in Kavitäten einer 12-well Gewebekulturschale überführt und 2 d im Brutschrank inkubiert. Eine nachfolgende FACS-Analyse der EGFP-Expression gab Aufschluss über die Anzahl

infizierter WEHI-231-Zellen. Dabei wurden Überstände als gut bewertet, die eine Infektionsrate von $\geq 20\%$ (100 μl Überstand) bzw. $\geq 85\%$ (1 ml Überstand) der infizierten Zellen aufwiesen. Diese wurden für die Infektion der Zielzellen eingesetzt.

2.15.6.4. Infektion von Zielzellen

Die Zielzellen wurden in 50 ml Polypropylenröhrchen mit kurz zuvor aufgetauten Aliquoten der retroviralen Überstände (2-8 ml je Ansatz, Zielzell- und Virusbedingt) infiziert. Dazu wurden 2×10^5 Zellen (Jurkat, EL-4, U-937) bzw. 1×10^6 Zellen (24 h zuvor stimulierte, primäre murine CD4^+ T-Zellen, s. 2.15.5.) in einem Volumen von 0,5 ml mit den getesteten, retroviralen Überständen nach 10-minütiger Inkubation bei RT zentrifugiert (1100 g, 4 h, 32°C). Anschließend wurde das Zellsediment in 2 ml komplettem Zellkulturmedium (für CD4^+ T-Zellen: X-VIVO 15 mit Zusatz von 100 pg/ml rIL-2) resuspendiert, in die Kavität einer 12-well- (Jurkat, EL-4, U-937) bzw. 24-well Gewebekulturplatte (CD4^+ T-Zellen) überführt und im Brutschrank inkubiert. Eine nach 36 h folgende FACS-Analyse der EGFP-Expression (FL1-Height) gab Aufschluss über die Anzahl infizierter Zielzellen.

2.15.6.5. Zeocin-Selektion transduzierter Zelllinien

Die Expression des Zeocin-Resistenzgens durch die retroviralen Expressionsplasmide vermittelt infizierten Zellen Resistenz gegenüber Zeocin, während nicht-infizierte Zellen durch dieses Antibiotikum abgetötet werden. Es verbleibt eine transduzierte Zelllinie, die das rekombinante Protein exprimiert.

Zwei Tage nach der Infektion wurden 2×10^5 Zellen in 2 ml komplettem Zellkulturmedium suspendiert, dem 4 μl (Jurkat) bzw. 6 μl (EL-4, U-937) Zeocin-Stocklösung (100 mg/ml) zugesetzt war. Jeden zweiten Tag wurde ca. 75 % des Zeocin-enthaltenden Mediums erneuert, die Anreicherung der transduzierten Zellen im FACS (EGFP-Expression) kontrolliert. Nach ca. 7-12 Tagen wurde eine Reinheit von 98 % infizierter Zellen erreicht. Aliquote der Zellen wurden eingefroren (Lagerung in flüssigem Stickstoff) und die Zellen ohne Zeocin weiter kultiviert.

2.15.7. Induktion und Nachweis des apoptotischen Zelltodes

2.15.7.1. Apoptose-Induktion

Die Zellsuspension wurde den Gewebekulturgefäßen im exponentiellen Wachstum (mikroskopische Kontrolle der Kulturen) entnommen, die Zellen abzentrifugiert und mit RPMI 1640 gewaschen (200 g, 8 min, 10°C). Anschließend wurden die Zellen in komplettem Zell-

kulturmedium aufgenommen, die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in einer Endkonzentration von $0,5-1,0 \times 10^6$ je Milliliter eingesetzt. Als Kulturgefäße für die Apoptose-Induktion dienten je nach benötigter Zellzahl 6-well, 12-well oder 24-well Gewebekulturplatten bzw. Gewebekulturflaschen. Nach der Zugabe des Apoptose-auslösenden Agens oder der Stimulation mit α CD3 bzw. α CD95 (α Fas) wurden die Kulturgefäße bei 37°C , 5 % CO_2 -Atmosphäre, 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und die Zellen nach den angegebenen Zeitpunkten zur weiteren Analyse entnommen.

2.15.7.1.1. Apoptose-Induktion durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

In das Zellkulturmedium wurden unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen (1,5 mM bis $150 \mu\text{M}$ Endkonzentration im Ansatz) pipettiert. Die Wasserstoffperoxid-Verdünnungen wurden frisch aus 30%-igem H_2O_2 (12,875 M) in komplettem Zellkulturmedium hergestellt. Einer Kontrolle wurde die gleiche Menge an Medium ohne Wasserstoffperoxid zugesetzt.

2.15.7.1.2. Apoptose-Induktion primärer CD4^+ T-Lymphozyten mit α CD3-Antikörpern

Hierzu wurden primäre murine T-Zellen auf zuvor mit Ziege-anti-armsenischer Hamster IgG (primärer Ak) und armsenischer Hamster-anti-Maus CD3 ϵ (sekundärer Ak) beschichteten 24-well Gewebekulturplatten ausgesät. Die Zellen waren 3-5 d zuvor mit α CD3/ α CD28-Antikörpern (s. 2.15.5.4.1.) oder mit OVA-Peptid (s. 2.15.5.4.2.) primär stimuliert worden.

2.15.7.1.3. Apoptose-Induktion primärer CD4^+ T-Lymphozyten mit α CD95-Antikörpern

Hierzu wurden primäre murine T-Zellen auf zuvor mit Ziege-anti-armsenischer Hamster IgG (primärer Ak) und armsenischer Hamster-anti-Maus CD95 (sekundärer Ak) beschichteten 24-well Gewebekulturplatten ausgesät. Die Zellen waren 3-5 d zuvor mit α CD3/ α CD28-Antikörpern (s. 2.15.5.4.1.) primär stimuliert worden.

2.15.7.2. Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG₁-Technik

Es wurde eine nach Hotz et al. (1994) modifizierte Methode, die sogenannte SubG₁-Technik, angewandt. Dabei wurden über Permeabilisierung der Membran leichtmolekulare DNA-Fragmente extrahiert und die in den fixierten Zellen verbliebene DNA mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenz-Intensität der Zellen ist ein Rückschluss auf den DNA-Gehalt möglich. Im DNA-Histogramm bilden apoptotische Zellen vor dem Zellzyklus (G₀/G₁, S, G₂/M) einen Peak mit vermindertem DNA-Gehalt, den sogenannten SubG₁-Peak.

Die zu untersuchenden Zellen (ca. 5×10^5) wurden in 500 μ l eiskaltem PBS aufgenommen. Auf einem Vortexer wurde tropfenweise 3,0 ml des -20°C kalten Fixierungspuffers zugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Fixierpuffer wurde nach Zentrifugation (200 g, 8 min, RT) abgesaugt, die Pellets in je 1,0 ml Extraktionspuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Zellen sedimentiert (200 g, 8 min, RT) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in je 400 μ l Färbepuffer, 25 μ l RNase-Lösung (10 mg/ml) und 20 μ l Propidiumjodid-Stammlösung (1,0 mg/ml) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT erfolgte die Messung im FACScan (s. 2.15.9.). Von jeweils 10.000 Zellen wurden Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht sowie die Rotfluoreszenz (FL3-Area, -Width, -Height) aufgenommen und im DNA-Histogramm (FL3-Height) der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

2.15.7.3. Bestimmung der Apoptoserate durch Markierung mit Annexin V-PE

Der vaskuläre Gerinnungshemmer Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide bindendes Protein mit höchster Affinität für Phosphatidylserin [Andree *et al.*, 1990], das während des apoptotischen Zelltodes aktiv von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran translokalisiert wird [Fadok *et al.*, 1992; Koopman *et al.*, 1994].

Die Zellen (ca. 1×10^5) wurden je einmal mit PBS und Annexin V-Bindepuffer gewaschen (200 g, 8 min, 4°C). Die Pellets wurden in 100 μ l Annexin V-Bindepuffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Proben mit 3 μ l Annexin V-PE inkubiert (20 min, RT, im Dunkeln). Nach Zugabe von 200 μ l Bindepuffer wurde im FACScan gemessen (s. 2.15.9.). Von 5.000 Zellen wurden logarithmisch die Grün- und Orange-fluoreszenz (FL1-Height, FL2-Height, kompensiert) aufgenommen und im Dot Plot der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

2.15.8. FACS-Färbung des zellulären CD95 (Fas)-Liganden

Um die quantitative Expression des zellgebundenen CD95-Liganden (CD95L) auf infizierten, primären murinen CD4^+ T-Lymphozyten während des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) zu ermitteln, wurden diese Zellen 3 d nach der Infektion auf αCD3 -beschichteten 24-well Gewebekulturplatten restimuliert (s. 2.15.4. und 2.15.7.1.2.). Zu den angegebenen Zeitpunkten (0-4 h) wurden die Zellen geerntet, 3×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 4 ml FACS-Waschpuffer gewaschen (250 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 50 μ l des Biotin-konjugierten αFas -Liganden (1 μg) in FACS-Waschpuffer resus-

pendiert und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde, wie zuvor, zweimal mit 4 ml FACS-Waschpuffer gewaschen, das Sediment in 50 µl Streptavidin-PE-Lösung (1:250 mit Waschpuffer verdünnt) resuspendiert und 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde im FACS der Anteil CD95L-exprimierender Zellen (FL2-Height) bestimmt.

2.15.9. Auswertung am FACScan

Die Proben wurden in einem FACScan™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) gemessen und mit Hilfe der Software Cellquest™ ausgewertet. Zum Gerätesystem gehört ein 15 mW Argon-Ionenlaser, der die Proben mit 488 nM anregt.

Abhängig von der angewandten Methode wurden folgende Parameter aufgenommen:

Vorwärts-Streulicht (FSC), Seitwärts-Streulicht (SSC) sowie die drei Fluoreszenzen FL1 (grün, BP 530/30 nm), FL2 (orange, BP 585/42 nm) und FL3 (rot, LP 650 nm), wobei jeweils die Signalhöhe (z. B. FSC-Height) bestimmt wurde. Bei der SuG₁-Technik wurden zusätzlich das Signalintegral (FL3-Area) und die Signalbreite (FL3-Width) analysiert, um in der zweiparametrischen Darstellung (Dot Plot) Zellaggregate auszuschließen und die korrekte DNA-Menge zu bestimmen.

2.16. Molekularbiologische Methoden

2.16.1. Bakterienkulturen

2.16.1.1. Übernachtskulturen

Bei den Übernachtskulturen wurden Bakterien in Flüssigkulturen vermehrt, die als Vorkultur zur Plasmid-Maxipräparation oder auch direkt für die Plasmid-Minipräparation genutzt wurden. Hierzu wurden 3 ml Flüssigmedium (LB, 2YT oder SOB) mit einem geeigneten Antibiotikum (Selektion transformierter Klone) in einem Reagenzglas entweder mit einer Einzelkolonie oder mit 5-10 µl einer Erhaltungskultur (s.u.) angeimpft. Danach wurde die Kultur 8-16 h bei 37 °C und 220 U/ min in einem Schüttler inkubiert.

2.16.1.2. Erhaltungskulturen

Die Erhaltungskultur diente zur dauerhaften Verwahrung von Bakterienstämmen bzw. -klonen. Dafür wurden in einem 2 ml Kryotube 800 µl einer dichtgewachsenen Übernachtskultur (s.o.) mit 200 µl steriler 75 %-iger Glycerinlösung gut vermischt, eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.16.2. Herstellung kompetenter Bakterien

Auf einer SOB-Agarplatte (ohne Antibiotika) wurden Bakterien (*E.coli* XL10-Gold™ oder DH5 α) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Impföse wurde ein Teil der gewachsenen Bakterien in 500 ml SOB-Medium überführt. Diese Flüssigkultur wurde bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,55 bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden sedimentiert (250 g, 10 min, 4 °C), vorsichtig in 40 ml RF1-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (250 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden danach vorsichtig in 7 ml RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 220 μ l Aliquote in 1,5 ml Reagiergefäßen in einem Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren. Die Aufbewahrung der nun kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

2.16.3. Transformation kompetenter Bakterien

Zur DNA-Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien mit Vektoren transformiert. Dazu wurden 100 μ l kompetente Bakterien in einem 1,5 ml Reagiergefäß auf Eis mit der einzubringenden DNA (Ligationsansatz oder vorhandenes Plasmid) vermischt und 30-45 min inkubiert. Durch Hitzeschock (90 s bei 42 °C im Wasserbad) und nachfolgender Inkubation auf Eis (2 min) wurde die DNA in die kompetenten Zellen aufgenommen. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 μ l LB-Medium auf einem Schüttler 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte entweder ein Ausplattieren dieser Bakterienkultur auf Agarplatten oder das Animpfen einer weiteren Flüssigkultur. In beiden Fällen wurde ein geeignetes Antibiotikum (z.B. Ampicillin) zur Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien verwendet.

2.16.4. Plasmidisolierung aus *E.coli* durch alkalische Lyse

2.16.4.1. Plasmidisolierung in analytischen Mengen (Mini-Präparation)

Die Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA ($\leq 12 \mu$ g) vieler verschiedener bakterieller Klone dient meist zur Analyse unbekannter Plasmide (neuer Konstrukte). Dazu wurde die Plasmid-DNA aus 1-3 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Minipräparations-Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien sowie anschließender Reinigung und Fällung der Plasmid-DNA (s.a. 2.16.4.2.). Diese kann in EB-Puffer (oder TE-Puffer) gelöst weiter analysiert werden (z.B. Restriktionshydrolyse, Sequenzierung).

2.16.4.2. Plasmidisolierung in präparativen Mengen (Maxi-Präparation)

Auch bei der Maxi-Präparation von bekannter Plasmid-DNA (100 µg bis 1 mg) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Dazu wurden 500 µl Übernachts- oder Erhaltungskultur in 100-500 ml Antibiotika-haltigem Medium (LB oder 2YT) 12-16 h bei 37 °C und 220 U/ min in einem Schüttler inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurden Protokolle und Reaktionssysteme der Firmen Quiagen und Macharey-Nagel verwendet. Die Bakterien wurden sedimentiert (250 g, 10 min, 4 °C) und in 11 ml einer RNase-enthaltenden Lösung (S1) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien (Denaturierung der DNA-Moleküle) erfolgte durch Zugabe von 11 ml einer stark alkalischen Lösung (S2), vorsichtigem Mischen und 5-minütiger Inkubation bei RT. Anschließend erfolgte die Neutralisation (Renaturierung der DNA) durch Zugabe von 11 ml saurer Lösung (S3). Die bakterielle DNA fiel dabei aus und wurde von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1200 g, 45 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben (DEAE-Kügelchen), an die die Plasmid-DNA unter Hochsalz-Bedingungen bindet. Verunreinigungen wurden mit 2 x 16 ml Waschpuffer entfernt und die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen (16 ml M2) von der Säule eluiert. Durch Zugabe von 11 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt (1200 g, 45 min, 18 °C), das Pellet mit 20 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (1200 g, 20 min, 18 °C) und anschließend für 10 min bei 37 °C getrocknet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 200 µl bis 1 ml EB-Puffer (oder TE-Puffer) gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.16.5. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe optimal in 0,7-2,5 %-igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. So ist es möglich, konstruierte Vektoren und amplifizierte Plasmid-DNA nach der Spaltung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen sowie PCR-Produkte zu überprüfen. Dazu wurde die Agarose in Laufpuffer (1 x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) durch kurzes Aufkochen gelöst, wobei 0,75 %-ige Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,5 bis 12 kB und 2 %-ige Agarose-Gele zur Auftrennung von kleineren Fragmenten (50 bp bis 2 kB) verwendet wurden. Nach dem Erhitzen in einer entsprechenden Form bzw. auf einer Glasplatte wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in einer Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA wurde mit 1/6 Vol. „Gel loading“ - Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V (20-80 mA) parallel zu DNA-Markern bekannter Größe. Präparative Gele wurden wegen der besseren Separation der einzelnen DNA-

Fragmente bei 20 mA aufgetrennt. Unter UV-Bestrahlung kann die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA anschließend dargestellt und fotografiert werden.

2.16.6. Reinigung von DNA aus Agarose

Nachdem DNA-Fragmente, die zur Konstruktion neuer Plasmide vorgesehen sind, in einem Agarose-Gel separiert wurden, müssen sie aus dem Agarose-Gel isoliert werden. Hierzu wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA unter UV-Licht einer Handlampe visualisiert und die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die DNA-Isolation aus der Agarose erfolgte mit dem Gelextraktionskit „jetsorb“ der Firma Genomed nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses wurde für DNA-Fragmente ≥ 8 kB wie nachfolgend beschrieben modifiziert. Das Schmelzen der Agarose und die Bindung der DNA an DEAE-Kügelchen erfolgte im 1,5 ml Reagiergefäß durch 30-minütige Inkubation bei 60 °C im Puffer A1 (alle 4 min mischen). Das durch Zentrifugation entstehende Pellet wurde jeweils vorsichtig gelöst (nicht vortexen!). Die DEAE-Kügelchen wurden durch 5-minütige Inkubation bei 50 °C getrocknet und die DNA anschließend in 30 μ l EB-Puffer je 100 ng Gel durch 20-minütige Inkubation bei 60 °C eluiert (alle 3 min mischen). Nach Sedimentation der DEAE-Kügelchen wurde die DNA-Lösung in ein neues Reagiergefäß überführt. Die DNA-Konzentration konnte gemessen oder über eine Agarose-Gelelektrophorese im Vergleich mit einer Kontroll-DNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.16.7. Enzymatische Manipulationen an DNA

2.16.7.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen wurde bei der Charakterisierung von Plasmid-DNA sowie bei der Konstruktion neuer Plasmide angewandt. Die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Art des Restriktionspuffers (Salzkonzentration) sowie Zeitdauer der Reaktion, variieren dabei für das jeweilige Restriktionsenzym und bezüglich dessen, ob das Plasmid teilweise oder vollständig mit diesem Enzym geschnitten werden soll. Die Reaktionsbedingungen wurden den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer angepasst, wobei ein typischer Reaktionsansatz mit kleinem Volumen (15 μ l) folgendermaßen aussah:

1,5 μ l	10-fach Reaktionspuffer
1-7 μ l	in EB gelöste Plasmid-DNA (300 ng bis 1,5 μ g)

1 µl	Restriktionsenzym (5-10 U/ µl) mit ddH ₂ O auf 15 µl auffüllen.
------	-------------------------------------------------------------------------------

Dieser Ansatz wurde 1 bis 2 h bei 37 °C bzw. der vom Hersteller empfohlenen Reaktionstemperatur inkubiert. Für eine präparative Spaltung von über 10 µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz proportional erhöht, wobei 2 U der Restriktionsendonuklease pro 1 µg der DNA eingesetzt wurden und die Reaktionszeit auf 3-12 h verlängert wurde. Für einen partiellen Verdau wurde zum einen weniger Enzym zugegeben und zum anderen die Reaktionszeit verkürzt sowie eine niedrigere Temperatur (z.B. RT statt 37 °C) gewählt. Nach der Spaltung wurde dem Ansatz 6-fach „Gel loading“-Probenpuffer zugegeben und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel getrennt.

2.16.7.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation eines gespaltenen Vektors (intramolekulare Ligation) zu verhindern, werden die Phosphatgruppen der freien 5'-Enden mit Hilfe einer Phosphatase entfernt. Dies geschah durch eine 1 h-ige Inkubation der gespaltenen Plasmid-DNA mit einer intestinalen alkalischen Phosphatase aus dem Kalb (CIAP, eingesetzte Konzentration: 2 U/ 5 µg DNA) im Restriktions-Reaktionspuffer bei 37 °C. Durch anschließende Inkubation (15 min bei 85 °C) wurde die Phosphatase inaktiviert, und die Vektor-DNA konnte nach der Aufreinigung aus einem Agarose-Gel mit einem anderen DNA-Fragment (Insert) ligiert werden.

2.16.7.3. Erzeugung glatter DNA-Enden durch die Klenow-Polymerase

Nicht-kompatible, überhängende DNA-Enden, die miteinander ligiert werden sollen, können durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt werden. Die Klenow-Untereinheit der bakteriellen DNA-Polymerase I besitzt eine 3'-Exonuklease- und eine Polymeraseaktivität. Ein typischer 25 µl Reaktionsansatz zur Auffüllung überhängender DNA-Enden sah folgendermaßen aus:

1-5 µg	gespaltene DNA
2,5 µl	10-fach Klenow-Puffer
0,5-1 µl	Klenow-Polymerase (2 U/ µl)
1,5 µl	dNTP-Mix (10 mM) mit ddH ₂ O auf 25 µl auffüllen.

Dieser Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und danach zur Inaktivierung der Polymerase 10 min auf 70 °C erhitzt. Es ist in den meisten Fällen auch möglich, vorher gespaltene, überhängende DNA-Fragmente im Restriktionspuffer selbst aufzufüllen. Die Reinigung der DNA kann optional auch durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Isolation aus dem Gel erfolgen.

2.16.7.4. Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle

In einer Ligation wird in der Regel ein gewünschtes DNA-Fragment (Insert) mit einem gespaltenen DNA-Trägerplasmid (Vektor) verbunden, das die Vermehrung, stabile Aufbewahrung und Expression oder auch eine Reporter-gen-Analyse ermöglicht. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 aus *E.coli* verbindet nicht nur DNA-Fragmente mit überhängenden (kohäsiven) Enden, sondern auch solche mit glatten Enden miteinander. Um eine intermolekulare Reaktion bei größeren Inserts (1-4 kB) zu begünstigen, sollte das molare Verhältnis zwischen dem Insert und dem Vektor zwischen 2:1 bis 6:1 liegen. Ein typischer 30 µl Reaktionsansatz zur Ligation war:

	100 ng	Vektor-DNA
	10-300 ng	Insert-DNA (entsprechend der Insert-Größe)
	3 µl	10 x Ligase-Puffer
	1 µl	10 mM ATP
(bei glatten Enden	3 µl	50 % PEG 4000)
	2 µl	T4-DNA-Ligase (5 U/ µl)
		mit ddH ₂ O auf 30 µl auffüllen.

Nach einer 12-16 h-igen Inkubation bei 18 °C (kohäsive Enden) oder RT (glatte Enden) wurde die Ligase durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert, bevor der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet wurde.

2.16.8. DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine häufig eingesetzte Standardmethode, die z.B. zur Sequenzierung (s. 2.16.9.) oder zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei der Konstruktion neuer Plasmide eingesetzt wurde. Sie basiert auf einer hitzestabilen bakteriellen DNA-Polymerase, wobei durch eine geregelte Abfolge von Schmelz-, Hybridisierungs- und Amplifizierungs-Reaktionen - ausgehend von kurzen DNA-Oligonukleotiden, den Primern - die dazwischenliegenden DNA-Sequenzen eines „templates“ amplifiziert werden. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Konstruktion neuer Plasmide wurde die Pwo-Polymerase eingesetzt, die neben der 5'→3'-Polymerase- eine zusätzliche 3'→5'-Exonuklease-Aktivität („proofreading“-Aktivität) aufweist. Dabei wurde die DNA-Matrize (200 ng/ µl) unmittelbar vorher 5 min bei 100 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Ein typischer 50 µl Reaktionsansatz auf Eis war:

120 ng	zu amplifizierendes DNA-Template (Plasmid ~ 9 Kb)
jeweils 0,7 µl	Primer „Upper“ und „Lower“ (100 pmol/ µl)
6-7 µl	MgSO ₄ (25 mM, Endkonz. 3 bis 3,5 mM)
5 µl	10 x Puffer ohne Magnesiumsulfat
4,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)
4 µl	Pwo-Polymerase (1 U/ µl)
	mit ddH ₂ O auf 50 µl auffüllen.

Die DNA wurde in einem PCR-Gerät mit folgendem Programm amplifiziert, wobei die Reaktionszeiten und -temperaturen je nach Länge und GC-Gehalt der verwendeten Primer und der DNA-Matrize variierten:

	2 min	95 °C	
7 Zyklen:	15 s	94 °C	(Schmelzen)
	30 s	55 °C	(Hybridisieren)
	6 min	72 °C	(Amplifizieren)
28 Zyklen:	20 s	94 °C	
	40 s	65 °C	
	6 min	72 °C	
	7 min	72 °C	
	„unendlich“	4 °C	

Die Pwo-Polymerase amplifiziert dabei bei 72 °C pro Minute 500 bp DNA.

2.16.9. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen erfolgte nach der Methode von Sanger. Die verwendeten desoxy-NTP's sind je nach Nukleotid mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Mit einem spezifischen PCR-Protokoll erfolgte die Sequenzierungsreaktion, die auf einer unvollständigen Reaktion mit nur einem Primer basiert. Die Bedingungen für die auf Eis angesetzte Sequenzierungsreaktion waren:

Reaktionsansatz: 5 µl Plasmid-DNA (aus einer Minipräparation, ca. 1-2 µg),
2 µl Primer (Stock: 10 mM),
7 µl Sequenzierungs-Mix.

PCR-Programm: 30 Zyklen mit 96 °C/ 15 s; 52 °C (oder 55 °C)/ 15 s; 60 °C/ 4 min.

Die Sequenzierungsreaktion wurde danach auf eine G50-Sepharosesäule („spin-column“) geladen und durch Zentrifugation (1.200 g, 4 min, RT) von freien Nukleotiden gereinigt. Die

DNA wurde durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert und 5 min bei 50 °C getrocknet. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden in einem PAA-Gel (6% PAA mit 8 M Harnstoff) aufgetrennt. Dabei werden die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe eines Argonlasers angeregt und durch die Detektionseinheit des 373 DNA-Sequenzers in einen Rechner eingelesen. Mit Hilfe spezifischer Software (z.B. Sequence Navigator und DNAsis) konnten die erhaltenen Daten analysiert werden.

2.16.10. DNA/Protein-Bindungsstudien mittels EMSA

DNA/Protein-Bindungsstudien dienen u.a. zur Analyse von Transkriptionsfaktoren. Hierbei wird nicht nur die Konzentration der Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Nukleus) untersucht, sondern auch deren Fähigkeit, spezifisch an DNA zu binden und die Transkription zu beeinflussen. Das Prinzip dieser *in vitro* Analyse ist die Inkubation von radioaktiv markierten DNA-Sonden mit daran bindenden Kernproteinen, die dann auf einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden (EMSA = „electrophoretic-mobility-shift-assay“). In der autoradiografischen Auswertung ist es im Vergleich mit Kompetitoren (unmarkierten Sonden) und dem Supershift mit spezifischen Antikörpern möglich, spezifische Komplexe zu identifizieren.

2.16.10.1. Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden einzelsträngig synthetisiert, so dass Sinn- und Gegensinn-Strang vor der radioaktiven Markierung hybridisiert werden mussten. Im Hybridisierungsansatz wurden dazu im 1,5 ml Reagiergefäß jeweils 80 µl der DNA-Oligonukleotide (100 pmol/ µl) mit 20 µl ddH₂O und 20 µl 10 x O⁺-Puffer für 5 min auf 95 °C erhitzt und danach langsam wieder auf RT abgekühlt (≤ 1 °C pro Minute). Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Sonden konnten anschließend radioaktiv markiert werden.

2.16.10.2. Radioaktive Markierung der DNA-Sonde mit ³²P-γATP

Zur Markierung der doppelsträngigen DNA-Sonden wurde die Polynukleotidkinase (PNK) des Bakteriophagen T4 verwendet. Dieses Enzym markiert Einzel- oder Doppelstrang-DNA an endständigen 5'-Hydroxy-Gruppen, wobei überhängende 5'-Enden leichter phosphoryliert werden als zurückgesetzte oder glatte Enden. Zur radioaktiven Markierung wurde ³²P-γATP verwendet, so dass am Ende des Protokolls eine an beiden Enden markierte, doppelsträngige DNA-Sonde vorlag. Für die Kinase-Reaktion (30-60 min, 37 °C) wurde folgendes Reaktionsgemisch in einem 1,5 ml Reagiergefäß angesetzt:

1 μ l	doppelsträngige DNA-Sonde (100 ng/ μ l)
5 μ l	10 x PNK-Puffer
8 μ l	32 P- γ ATP (10 μ Ci/ μ l)
34 μ l	ddH ₂ O
2 μ l	T4-PNK (10 U/ μ l)

Der Ansatz wurde nach der Reaktion wie unten beschrieben aufgereinigt.

2.16.10.3. Aufreinigung von 32 P-markierten DNA-Sonden

Zur Abtrennung der freien Radionukleotide und der markierten Einzelstränge wurden die PNK-Ansätze nach der Markierung mit 6 x „Gel loading“-Probenpuffer versetzt und auf ein 12 %-iges natives Gel geladen, welches mit 0,4 x TBE-Puffer eine Stunde bei 220 V vorgelaufen war. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch (3 h bei 220 V), wobei die Bromphenolblau-Bande nicht über das erste Drittel der Gellänge hinaus laufen sollte. Anschließend wurde die obere Glasplatte vom Gel entfernt und dieses - mit einer Lage Haushaltsfolie bedeckt - auf einem Röntgenfilm exponiert. So konnte die identifizierte Bande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel isoliert und in ein 1,5 ml Reagiergefäße überführt werden. Zur Elution der markierten, doppelsträngigen DNA-Sonde wurden die Gelstücke mit 200 μ l Hochsalz-Elutionspuffer über Nacht (12-16 h) auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der markierten Probe im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktive Sonde wurde in einem Bleigefäß bei -20 °C aufbewahrt und innerhalb von 3-4 Wochen im EMSA verwendet.

2.16.10.4. Der Gelshift-Assay (EMSA)

Für EMSA („electrophoretic-mobility-shift-assay“)-Studien werden üblicherweise Kernproteine aus unterschiedlich behandelten Zellen verwendet. Dazu wurden auf Eis folgende Komponenten gemischt und 15-30 min inkubiert:

2-5 μ g	Kernprotein in Puffer C
4 μ l	3 x Bindungspuffer
1 μ l	poly dI/dC (1 μ g/ μ l)
ca. 5.000 cpm	radioaktiv markierte DNA-Sonde mit ddH ₂ O auf 12 μ l auffüllen.

Dabei kann die Menge des verwendeten unspezifischen Kompetitors (poly dI/dC) variieren. Bei sehr unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ist außerdem darauf zu achten, dass die verwendeten Volumina mit entsprechenden Mengen Puffer C ausgeglichen werden, um identische Ionenkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen zu erreichen. Im Falle der spezifi-

schen Kompetition wurde ein 10-100-facher molarer Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde im Reaktionsansatz hergestellt. Für „Supershift-Assays“ wurde 1 µl gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichtete Antikörperlösung (1 µg/ µl) zugegeben.

Zur Auftrennung wurde ein 6 %-iges natives PAA-Gel verwendet. Die benutzte Stromstärke sollte bei bzw. unter 11 mA am Gel liegen. Deshalb lief das Gel in 0,4 x TBE-Laufpuffer ca. 2,5 h bei 200 V vor. Danach wurden die Geltaschen erneut gespült und 6-10 µl der vorinkubierten Ansätze sowie - zur Kontrolle der Laufstrecke - auf einer separaten Spur 8 µl 6 x „Gel loading“-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V ca. 3 h. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier gebracht und mit Haushaltsfolie überzogen unter Vakuum getrocknet. Es folgte die Exponierung auf einem Röntgenfilm (1-14 d, -70 °C) und gegebenenfalls die quantitative Auswertung mit Hilfe des Phospho-Imagers.

2.16.11. RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Dieses Protokoll beruht auf der Guanidinium-Thiozyanat / sauren Phenol-Methode [Chomczynski und Sacchi, 1987]. Zur Isolation von RNA aus primären Zellen und Gewebekulturzellen (ca. 1×10^7) wurden diese mit eiskaltem PBS $-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$ gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C), in 1 ml Trizol-Reagenz durch mehrfaches Pipettieren lysiert und in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, kurz gevortext und der Ansatz für weitere 3 min inkubiert. Im Anschluß an die Zentrifugation (16.000 g, 5 min, RT) wurde die wässrige Oberphase in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die RNA daraus durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt (16.000 g, 10 min, RT). Das Pellet wurde nach dem Waschen (16.000 g, 10 min, RT) mit 1 ml 75 %-igem Ethanol 5 min bei RT getrocknet und in 10-12 µl DEPC-behandeltem ddH₂O (5 min, 60 °C) gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Reinheit wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die RNA bei -70 °C gelagert.

2.16.12. Die Ribonuklease-Protektions-Analyse

Diese Methode ermöglicht die quantitative Analyse spezifischer RNA-Transkripte. Dabei ist doppelsträngige RNA, die aus der Hybridisierung der isolierten Gesamt-RNA mit spezifischer radioaktiv markierter, komplementärer mRNA hervorgeht, vor einem Abbau durch Einzelstrang-spezifische RNasen geschützt. Nach Auftrennung der Ansätze auf einem 5%-igen denaturierendem PAA-Gel kann die geschützte RNA mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert werden. Für die RNase-Protektions-Analyse wurden das Reaktionssystem „RiboQuant“

sowie das Protokoll der Firma BD PharMingen verwendet. Dabei befanden sich in sog. „template sets“ mehrere unterschiedlich lange und spezifische cDNA-Fragmente, die als Matrizen für eine *in vitro* Transkription von komplementären mRNA's mit radioaktivem ^{32}P - α UTP dienten. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 5-10 μg der zu untersuchenden Gesamt-RNA mit der entsprechend verdünnten radioaktiven Probe nach Denaturierung (5 min, 95 °C) über Nacht bei 56 °C inkubiert. Die nicht hybridisierte RNA wurde anschließend durch RNase-Behandlung (45 min, 30 °C) verdaut, mit Proteinase K (20 min, 37 °C) die RNase abgebaut sowie die verbleibende RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ammoniumazetat gefällt. Nach der Denaturierung im Probenpuffer (5 min, 95 °C) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 5 %-igen harnstoffhaltigen PAA-Gel bei ca. 30 W. Dieses Gel wurde zwischen zwei 30 cm langen Glasplatten in einem Abstand von 0,5 mm gegossen. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter Vakuum getrocknet, auf einem Röntgenfilm exponiert und gegebenenfalls die Transkription der RNA mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert.

2.17. Proteinbiochemische Methoden

2.17.1. Präparation von rekombinantem GST-cJun₅₋₈₉-Protein

Bakteriell expremierte GST-Fusionsproteine werden durch pGEX-Plasmide kodiert. Die Amplifikation des pGEX GST c-Jun₅₋₈₉ sowie die Proteingewinnung erfolgt in *Escherichia coli* des Stammes BL21. Dazu wurden 10 ml LB-Medium mit 0,1 % Glukose und Ampicillin mit den transformierten Kolonien angeimpft und diese Kultur über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler bei 220 U/ min inkubiert. Anschließend wurde die dicht gewachsene Bakterienkultur 1:50 in frischem Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₆₀ von 1,2 weiter inkubiert, bevor durch Zugabe von 1,5 ml einer 0,1 M IPTG-Lösung die Expression des rekombinanten cJun induziert wurde. Nach weiterer 60-minütiger Inkubation bei 30 °C und 220 U/ min wurden die Zellen sedimentiert (1.500 g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 20 ml eiskaltem PBS MM (mit Protease-Inhibitoren) in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch 5-minütige Beschallung in einem Ultraschall-Gerät. Danach wurde dem Lysat 1 ml 20 %-iges Triton X-100 zugegeben und das Polypropylenröhrchen 30 min auf einem Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation (4.000 g, 30 min, 4 °C) geklärt und der Überstand in einem neuen 50 ml Polypropylenröhrchen mit 500 μl 50 %-iger Glutathion-Sepharose gemischt. Die Isolation des

GST c-Jun₅₋₈₉-Proteins durch Bindung an das immobilisierte Glutathion erfolgte während einer 2 h-igen Inkubation bei 4 °C auf einem Rotor. Danach wurde die Sepharose je zweimal mit 20 ml PBS MM und 20 ml KLBM-Puffer (jeweils mit Protease-Inhibitoren) gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C). Durch Zugabe von 5 ml Glutathion-Elutionspuffer zum Sepharose-Sediment und 15-minütiger Inkubation auf einem Rotor wurde das rekombinante Protein von der Glutathion-Sepharose eluiert und der Überstand (250 g, 5 min, 4 °C) nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei -70 °C gelagert.

2.17.2. Präparation von Proteinextrakten

2.17.2.1. Präparation von Gesamtproteinextrakten aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakten aus primären Zellen sowie aus Gewebekulturzellen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ gewaschen (250 g, 5 min, 4 °C), das Pellet in 1 ml PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und erneut zentrifugiert (1.600 g, 1 min, RT). Das Sediment wurde in einem geeigneten Volumen (100 µl pro 1 x 10⁷ Zellen) eiskalten KLBM-Puffer mit Protease- sowie eventuell Phosphatase-Inhibitoren (KLBM+) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch 30-minütige Inkubation auf Eis in diesem Puffer. Anschließend wurden die Lysate durch eine 30-minütige Zentrifugation (16.000 g, 4 °C) geklärt, der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und bei -70 °C gelagert.

2.17.2.2. Isolierung von Kernprotein- und Zytoplasmaextrakten eukaryontischer Zellen

Nach der Zellernte (250 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis im Kühlraum, und die verwendeten Materialien wurden auf 4 °C vorgekühlt. Die Zellen wurden sedimentiert (5.200 g, 1 min), das Pellet in Puffer A resuspendiert (100 µl pro 1 x 10⁷ Zellen) und 20 min inkubiert. In dieser Zeit schwollen die Zellen im hypotonischen Puffer. Zur Zellyse wurde die Suspension 8-10 mal mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze durch eine feine Kanüle (26G₃₈; 0,45 x 10 mm) gezogen. Die Abtrennung des Zytoplasmas erfolgte durch anschließende Zentrifugation (5.200 g, 2 min). Der Überstand (Zytoplasma) wurde in ein weiteres 1,5 ml Reagiergefäß überführt, das Sediment zweimal vorsichtig (nicht resuspendieren) mit 800 µl Puffer A gewaschen (12.000 g, 30 s) und das Pellet anschließend im einfachen Volumen des Puffers C gelöst. Zur Extraktion der Kernproteine wurden die Reagiergefäße 45-60 min auf einem Schüttler (2.000 U/min) inkubiert. Die Kernproteine sowie der ungereinigte Zytoplasmaextrakt wurden durch Zentrifugation (16.000 g, 30 min)

geklärt und die jeweiligen Überstände in neue 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Die Protein-konzentrationen des Kernprotein- bzw. Zytoplasmaextraktes wurden mittels Bradford-Reagenz photometrisch bestimmt. Zur Langzeitlagerung wurden die Extrakte nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (N₂) bei -70 °C aufbewahrt.

2.17.3. Immunpräzipitation (IP)

Als Immunpräzipitation bezeichnet man eine Methode, durch die aus Zellextrakten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Ak) Proteine bzw. Proteinkomplexe isoliert und angereichert werden können. Dazu wurden 300-500 µg Protein (Ganzzellprotein-, Kernprotein- oder Zytoplasmaextrakte) in 500 µl Lysispuffer (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) mit 2-5 µl des Antikörpers (Endkonzentration 0,1-0,5 µg/µl) und 20 µl Protein-A/G Sepharose in einem 1,5 ml Reagiergefäß vermischt und 4-12 h auf einem rotierenden Rad bei 4 °C inkubiert. So bildeten sich Protein-Antikörper-Protein-A/G Komplexe. Anschließend wurden diese an Sepharose gekoppelten Komplexe zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine je dreimal mit eiskaltem Lysispuffer sowie Lithiumchlorid-Waschpuffer gewaschen (16.000 g, 20 s, 4 °C) und der Überstand vorsichtig verworfen. Es schloss sich ein *in vitro* Kinase-Assay oder eine SDS-PAA-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse an. Bevor die elektrophoretische Auftrennung für Westernblots erfolgte, wurde das Pellet zum Lösen und Denaturieren der präzipitierten Proteine in 25 µl 4 x Lämmli-Puffer 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

2.17.4. *In vitro* Kinase-Assay

Diese Methode dient zur Identifizierung und Quantifizierung von Phosphorylierungen spezifischer Substrate durch Proteinkinasen. Aus Proteinextrakten werden dazu mittels IP Kinasen präzipitiert und dann in einer *in vitro* Phosphorylierungs-Reaktion mit in Lösung befindlichen, als Substrat dienenden GST-Fusionsproteinen eingesetzt. Die präzipitierten Komplexe (s.o.) wurden dreimal mit je 1 ml Kinase-Assay-Puffer gewaschen (16.000 g, 20 s, 4 °C) und der Überstand mit einer 1 ml Einmalspritze und dünner Kanüle (26G_{3/8}; 0,45 x 10 mm) vorsichtig entfernt. In jedes 1,5 ml Reagiergefäß wurden zu den Sepharose-Pellets auf Eis 20 µg Substratprotein (z.B. GST-cJun_{5,89}) in 20 µl Kinase-Assay-Puffer, 15 µl ATP-Mix und 1-5 µCi ³²P-γATP pipettiert. Die Phosphorylierungs-Reaktion erfolgte während der 20 bis 30 minütigen Inkubation bei 30 °C, wobei die Ansätze in den 1,5 ml Reagiergefäßen alle 2 bis 3 min vorsichtig geschüttelt wurden. Anschließend wurde die Reaktion durch Resuspendieren in 20 µl 4 x Lämmli-Puffer und Erhitzen (10 min, 95 °C) gestoppt. Die Proteine (10-20 µl der Ansätze) wurden danach in einer SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es folgten zwei

mögliche Auswertungsmethoden: (1.) der Transfer auf eine NC-Membran oder (2.) die Färbung des Gels mit Coomassie-Blau mit anschließendem Trocknen unter Vakuum. Beides konnte auf einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolien bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ exponiert (1 h bis mehrere Tage) und bei Bedarf mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert werden.

2.17.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Westernblot-Analyse

2.17.5.1. SDS-PAGE

Denaturierende Polyacrylamidgele erlauben die Auftrennung von Proteinen oder Polypeptiden entsprechend ihrem Molekulargewicht. Sie bestehen aus einem Trenngel, das nach dem Gießen mit wassergesättigtem Iso-Butanol überschichtet wurde, um eine homogene Polymerisation sowie eine gerade Trennfläche zu erreichen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Butanol verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in das sofort ein für die zu ladenden Proben geeigneter Kamm eingeführt wurde. Die jeweiligen Proben wurden mit 4 x Lämmli-Puffer gemischt, denaturiert ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min) und in die vorher mit Laufpuffer ausgewaschenen Taschen des Gels pipettiert, wobei ein nicht denaturierter Größenstandard bekannter Proteine mit geladen wurde. Der Gellauf erfolgte bei 25 mA/ Gel in einer mit Laufpuffer gefüllten SDS-Gelapparatur für ca. 2-4 h.

2.17.5.2. Transfer auf eine Nitrozellulose- (NC-) Membran (Westernblot)

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das separierte Trenngel vorsichtig mit Transferpuffer gewaschen. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine NC-Membran wurden in einer Transferkassette von Katode zu Anode folgende in Transferpuffer getränkte Komponenten übereinander geschichtet: 3 Lagen Whatman-Papier, das Gel, die NC-Membran und wieder 3 Lagen Whatman-Papier. Dabei müssen Luftblasen vermieden bzw. entfernt werden. Der 16 h-ige Transfer erfolgte bei 400 mA und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Transferkammer. Durch eine Inkubation der Membran in Ponceaurot-Lösung (5 min) und teilweiser Entfärbung mit ddH₂O kann der Transfer und die gleichmäßige Beladung des SDS-PAA-Gels überprüft werden, bevor die Membran mit TBS/Tween vollständig entfärbt wird.

2.17.5.3. Immundetektion

Nach dem Transferieren der Proteine auf die Membran wurde diese mit 5 % Milchpulver (MPT) oder im Fall der phospho-spezifischen Ak (p-Ak) mit 5 % BSA in TBS/Tween geblockt (1 h, RT, leicht schüttelnd). Die Membran wurde anschließend mit dem ersten (primären), im jeweiligen Blocking-Puffer verdünnten, Ak inkubiert (1 h bei RT bzw. 16 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

für p-AK, leicht schüttelnd). Nach dem Waschen mit TBS/Tween (2 x 5 min und 3 x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten Ak (sekundärer Ak), der an HRP-gekoppelt und in MPT verdünnt war, inkubiert (1 h, RT, leicht schüttelnd). Anschließend wurde die Membran wie zuvor beschrieben mit TBS/Tween gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Ak erfolgte mit dem ECL-System nach Angaben des Herstellers, wobei die Antikörperbindung mittels Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm abgebildet wurde.

2.17.5.4. Entfernung gebundener Ak von NC-Membranen (Strippen)

Um eine bereits mit einem Ak dekorierte Membran mit einem anderen Ak zu markieren, der ein Protein mit ähnlichem Molekulargewicht erkennt wie der erste, wurde der erste Ak durch „Strippen“ der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran mit „Stripping“-Puffer im Schüttel-Wasserbad (30 min, 60 °C) inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit ddH₂O und dreimal mit TBS/Tween für je 5 min gewaschen und danach wie unter 2.17.5.3. beschrieben inkubiert.

2.17.6. Reportergen-Analysen

2.17.6.1. Luziferase-Reportergen-Assays

Das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) dient häufig zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Typischerweise wird eine zu untersuchende „Promotorsequenz“ vor das Luziferase-Gen in ein Plasmid konstruiert. Nach der transienten Kofransfektion von Zellen mit diesem Luziferase-Plasmid und Plasmiden, die für zu untersuchende Faktoren kodieren, kann durch den Luziferase-Reportergen-Assay der transkriptionelle Einfluss dieser Faktoren auf die Promotor-Sequenz quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen 48-72 h nach der Transfektion geerntet, in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Nach der Zentrifugation (5.200 g, 1 min, RT) wurden die Zellen durch kurzes Vortexen in 100 µl „Harvesting“-Puffer lysiert und anschließend die Zellfragmente sedimentiert (12.000 g, 4 min, RT). In einer Mikrotiterplatte wurden pro Kavität zu 50 µl „Assay“-Puffer jeweils 50 µl der geklärten Zelllysate pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit den beiden Puffern ohne Zelllysate. Die Messung der Luziferase-Werte erfolgte in einem Luminometer, wobei die Ansätze jeweils mit 100 µl 5 mM Luziferin, dem spezifischen Substrat der Luziferase, versetzt wurden. Die gemessenen Werte wurden mit den Proteinkonzentrationen bzw. mit den Werten des β-Galaktosidase-Assays abgeglichen.

2.17.6.2. β -Galaktosidase-Assays

Der β -Galaktosidase-Assay ist ein weiteres Reporter-Gen-Testsystem, durch das die transkriptionelle Aktivität in eukaryontischen Zellen quantitativ nachgewiesen werden kann. Verwendet wird diese Methode auch zum Abgleichen unterschiedlicher Transfektionseffizienzen bei der Auswertung des Luziferase-Assays. In diesem Fall werden β -Galaktosidase-Konstrukte mit konstitutiven Promotoren (z.B. RSV) verwendet. Die Methode basiert auf der Katalyse des spezifischen Substrates p-ONPG durch die gebildete β -Galaktosidase in einem *in vitro* Reaktionsansatz in 1,5 ml Reagiergefäßen, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

500 μ l	Puffer Z
100 μ l	p-ONPG-Lösung (4 mg/ ml)
10-20 μ l	Zelllysate

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und bei 37 °C für 2-16 h inkubiert, wobei die Reaktion einen gelben Farbumschlag bewirkt. Durch Zugabe von 250 μ l einer 1 M Na₂CO₃-Lösung wird die Reaktion gestoppt, und der Substratumsatz wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 420 nm innerhalb von 30 min gemessen.

2.17.6.3. Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität

Da in unterschiedlichen Transfektionsansätzen die Effizienz der Transfektion variieren kann und die zur exogenen Expression verwendeten Promotoren nicht immer von den verwendeten Stimulatoren unbeeinflusst bleiben, wurden die im Luziferase-Assay ermittelten Werte mit denen des β -Galaktosidase-Assays abgeglichen. Dies erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{rel.Luziferasewert} = \text{Luziferasewert} \times \frac{\beta - \text{Galaktosidasewert}}{\text{niedrigster } \beta - \text{Galaktosidasewert}}$$

3. Ergebnisse

Die Hämatopoetische Progenitor Kinase (HPK) 1, ein Mitglied der Familie der „Germinal Centre“ Kinasen (GCK's), wurde als ein Regulator der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) und des NFκB-Signalweges beschrieben [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1999]. Folgende Aspekte lassen eine wichtige physiologische Rolle dieses Ste20-Homologs in Zellen des Immunsystems vermuten: **(1.)** Obwohl die HPK1 während der Embryogenese in verschiedenen Geweben exprimiert wird, ist ihr Vorkommen im erwachsenen Organismus auf die Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt [Kiefer *et al.*, 1996]. **(2.)** Während der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen wird die HPK1-Expression signifikant verringert, was auf einen strikten, entwicklungsbedingten Kontrollmechanismus schließen lässt. **(3.)** Es wurde nachgewiesen, dass die HPK1-Kinase-Aktivität nach T- und B-Zell-Rezeptorstimulation induziert wird [Liou *et al.*, 2000; Tsuji *et al.*, 2001].

Obwohl mehrere Signalmoleküle entdeckt wurden, die die HPK1 beeinflussen bzw. von dieser beeinflusst werden, ist bisher nur wenig über die HPK1-Signalkaskaden und besonders die biologische Funktion der HPK1 bekannt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte deshalb nach Zielgenen der HPK1 gesucht werden, um somit zu helfen, die physiologische Rolle dieser Kinase aufzuklären.

3.1. *Die Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 unterstützt die Apoptose primärer T-Lymphozyten*

Die Beobachtung, dass eine zum Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) führende T-Zell-Rezeptor (TZR)/CD3-Stimulation von Jurkat T-Zellen die HPK1 aktiviert, während eine CD28-Stimulation, die ein Überlebens- und Proliferationssignal für T-Zellen darstellt, keinen Effekt auf die HPK1-Kinase-Aktivität zeigt [Liou *et al.*, 2000], veranlasste uns, die Rolle der HPK1 bei der T-Zell-Apoptose zu untersuchen.

3.1.1. Die endogene HPK1-Expression und Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) werden während des AICD von CD4⁺ T-Zellen verstärkt

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden in Gegenwart von teilungsinaktivierten dendritischen Zellen (DZ's) mit einem OVA-Peptid stimuliert und anschließend für weitere 4 d expandiert, bevor ein Teil der Zellen auf αCD3ε beschichteten

Gewebekulturschalen 3 h restimuliert wurde. Aus den Westernblots der isolierten Ganzzell-extrakte in Abbildung 3.1 geht hervor, dass bei dieser den AICD induzierenden Stimulation die endogene HPK1-Proteinexpression um den Faktor 3,3 erhöht wurde (3.1 A). Es ist bekannt, dass nach TZR-Stimulation der MAP-Kinasen-Signalweg aktiviert wird. Da die HPK1 zudem ein Aktivator der SAPK/JNK ist, wurde die JNK1-Phosphorylierung und -Expression dieser CD4⁺ T-Zellen im Westernblot untersucht. Bei der den AICD induzierenden Stimulation kam es dabei zu einer 2,8-fachen Steigerung der JNK1-Phosphorylierung, während sich die JNK1-Expression von unbehandelten und restimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten dagegen nicht veränderte (3.1 B). Somit scheint die HPK1 eine mit der T-Zell-aktivierung assoziierte Serin-Threonin-Proteinkinase zu sein.

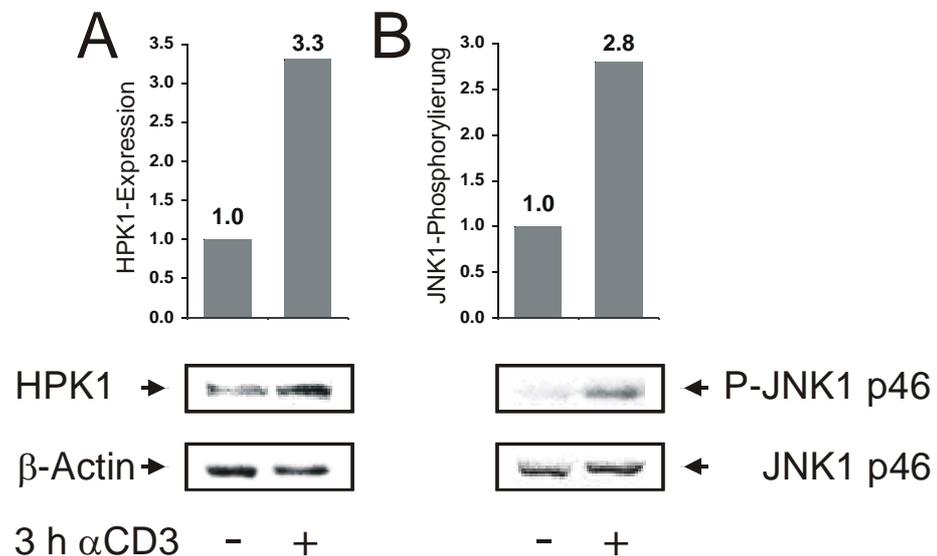


Abb. 3.1: Die Restimulation primärer CD4⁺ T-Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 ϵ führt zum Anstieg der endogenen HPK1-Expression und JNK-Phosphorylierung.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden für 24 h in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit einem OVA-Peptid (323-339) stimuliert und für weitere 4 d in IL-2 haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden die Gesamtproteinextrakte von unbehandelten (-) und von 3 h mit an Gewebekulturschale gebundenen Antikörpern gegen CD3 ϵ restimulierten Zellen (+) isoliert. Jeweils 80 μ g Protein wurden in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine NC-Membran mit spezifischen Antikörpern gegen (A) HPK1 bzw. β -Aktin als Ladekontrolle und (B) phospho-JNK1 sowie nach dem Strippen JNK1 detektiert. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2. Retroviral überexprimierte HPK1-Konstrukte sind funktional aktiv, doch nicht über eine modifizierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors regulierbar

Zur Analyse der biologischen Funktion der HPK1 wurden zunächst verschiedene retrovirale Expressionsplasmide konstruiert. Mit diesen war es möglich, die Auswirkung der HPK1-Überexpression auf unterschiedlichste Signalwege in primären Lymphozyten im Vergleich zu Kontrollzellen zu untersuchen.

In Abbildung 3.2 sind die Struktur der humanen HPK1 und des retroviralen Vektors sowie die klonierten Fragmente der HPK1 zusammengefasst. Die HPK1, ein 97 kDa Protein, besteht aus einer N-terminalen Kinase-Domäne, an die sich der lange C-terminale regulatorische Teil mit den 4 Prolin-reichen Regionen (PR) und der Citron-Homologie-Domäne anschließt. Die Prolin-reichen Regionen ermöglichen die Bindung mit zahlreichen SH2/SH3-Adaptormolekülen, wie Crk, CrkL, Grb2, Nck und Gads. Außerdem ist eine Caspase-Erkennungssequenz DDVD hervorgehoben, die zwischen dem 1. und 2. Prolin-reichen Motiv liegt. Es wurden verschiedene, mittels PCR generierte HPK1-Peptide zwischen die ClaI/HpaI-Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des retroviralen Expressionsvektors pEGZ-HA konstruiert. Dieser Vektor ist ein Derivat des murinen Leukämie-Virus (MLV) und ermöglicht unter der Kontrolle des Zytomegalievirus-Promotors (CMV) über eine interne ribosomale Bindestelle (IRES) die koordinierte Expression eines HA-konjugierten HPK1-Proteins mit einem Grünfluoreszenzprotein (EGFP) und dem Zeocin-Resistenzgen (Zeo).

Die folgenden rekombinanten HPK1-Konstrukte wurden retroviral überexprimiert: die wildtypische humane HPK1 (aa 2-833) von **pHA-HPK1 wt**; eine Kinase-inaktive Form der HPK1 mit einer Mutation der Aminosäure (aa) Lysin (K) an Position 46 zu Methionin (M) von **pHA-HPK1 M(46)**; der N-terminale Teil der HPK1 mit der Kinase-Domäne bis zur Caspase-Spaltstelle (aa 2-385) von **pHA-HPK1 wt N-term.** bzw. **pHA-HPK1 M(46) N-term.** sowie das verbleibende C-terminale Peptid (aa 386-833) von **pHA-HPK1 wt C-term.** Außerdem wurde ein "antisense"-Plasmid (aa 386-2) **pHA-HPK1 AS** konstruiert, von dem eine HPK1-"antisense" (AS)-RNA transkribiert wird.

Um die Kinase-Aktivität der HPK1-exprimierenden retroviralen Vektoren zu überprüfen, wurden 293T-Zellen transient transfiziert. Aus den daraus isolierten Ganzzellextrakten wurden die rekombinanten HA-Fusionsproteine mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay mit GST-cJun_{5,89} als exogenes Substrat die Aktivität der HPK1 ermittelt. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, ist die retroviral exprimierte wildtypische

HPK1 funktional aktiv, während die mutierte HPK1 keine Kinase-Aktivität zeigte. Aus dem Westernblot der mit α HA präzipitierten Proteine geht hervor, dass beide rekombinanten Konstrukte exprimiert wurden.

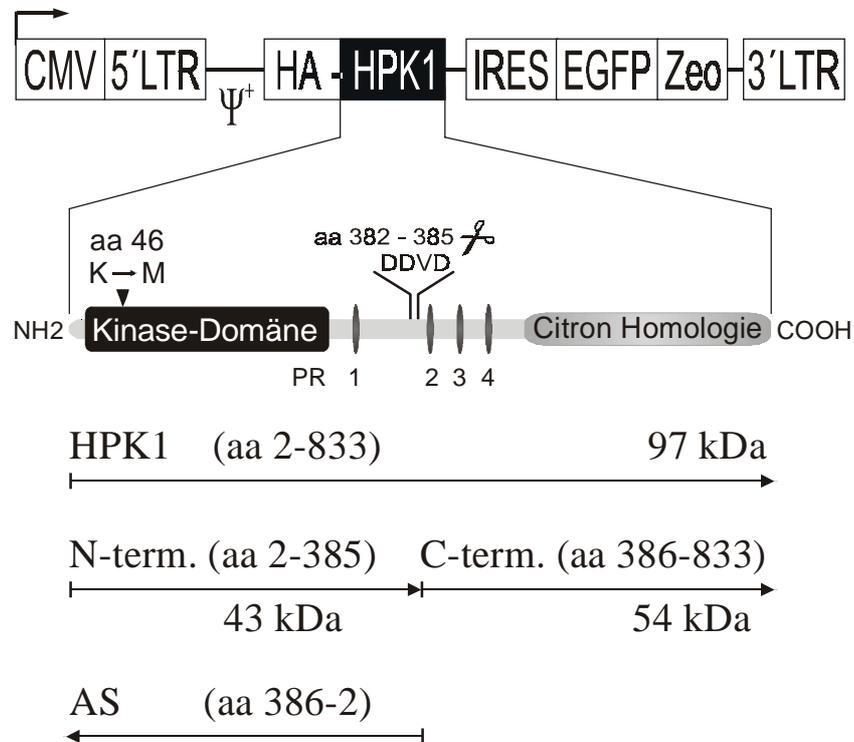


Abb. 3.2: Schematische Struktur der HPK1 sowie der retroviralen HPK1-Konstrukte.

Die humane Serin-Threonin-Proteinkinase HPK1, ein Ste20 Homolog, hat ein Molekulargewicht von ca. 97 kDa und besteht aus der N-terminalen **Kinase-Domäne** und einer langen C-terminalen regulatorischen Region mit einer **Citron-Homologie**-Domäne. Hervorgehoben sind die Prolin-reichen Regionen (**PR 1-4**) mit potentiellen SH3-Bindestellen, eine Caspase-Erkennungssequenz (**DDVD**) sowie die Position der Mutation von Lysin zu Methionin der Aminosäure 46 (**aa 46 K \rightarrow M**), die zu einer Kinase-inaktiven Form der HPK1 führt. In den bicistronischen retroviralen Vektor pEGZ-HA wurden die dargestellten, mittels PCR generierten Fragmente der HPK1 zwischen die ClaI- und HpaI-Restriktionsschnittstelle kloniert. Im Schema des retroviralen Plasmides sind der vor dem Promotorbereich des Maus Leukämie Virus (**5'LTR**) gelegene CMV Enhancer (**CMV**), das Verpackungssignal (Ψ^+), das Zeocin-Resistenzgen (**Zeo**) sowie die PolyA-Region (**3'LTR**) angegeben. Eine N-terminal mit einer kurzen Aminosäuresequenz aus *Haemophilus aureus* (**HA**) markierte DNA wird über eine interne ribosomale Bindestelle (**IRES**) mit einem Grünfluoreszenzprotein (**EGFP**) koordiniert exprimiert und kodiert für ein Epitop, dessen Expression sich mittels eines α HA-spezifischen Antikörpers (Ak) leicht nachweisen lässt.

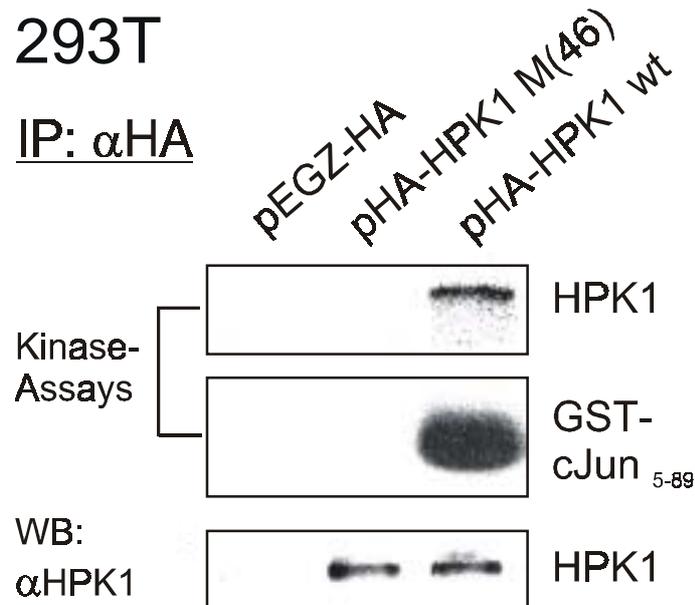


Abb. 3.3: Die retroviral exprimierte HPK1 ist funktionell aktiv.

Die angegebenen retroviralen Konstrukte wurden in humane embryonale Nierenzellen der Linie 293T transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die mit einem spezifischen Ak gegen das HA-Tag präzipitierten Proteine (IP) in einem *in vitro* Kinase-Assay auf ihre Fähigkeit untersucht, das exogene Substrat GST-cJun₅₋₈₉ zu phosphorylieren. Dargestellt sind exemplarisch Auto- und Substratphosphorylierung (**Kinase-Assays**) sowie die Expression der präzipitierten HPK1-Proteine im Westernblot (**WB**) aus vier unabhängigen Experimenten.

Im *in vitro* Kinase-Assay stellte sich heraus, dass die überexprimierte wildtypische HPK1 konstitutiv aktiv ist. Da dies die Untersuchung der HPK1-involvierten Signaltransduktionswege erschwert, sollte versucht werden, die Aktivität der rekombinanten HPK1 zu kontrollieren. Dazu wurden retrovirale Expressionsvektoren konstruiert, die die HA-markierte HPK1 als Fusionsprotein mit einer modifizierten Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ERTM, aa 281-599) exprimieren. In diesem ERTM ist die Aminosäure Glyzin an Position 525 zu Arginin mutiert. Die ERTM Fusionsproteine sind ohne Bindung des Liganden inaktiv, da sie im Komplex mit einer Vielzahl daran gebundener, intrazellulärer Polypeptide vorliegen. Durch Bindung des synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (TM) werden diese inhibitorischen Komplexe, die u.a. aus Hitzeschockproteinen bestehen, aufgelöst, und das Protein ist aktivierbar bzw. aktiv. Es wurden retrovirale HPK1-Expressionsvektoren mit N-terminalen, C-terminalen sowie N- und C-terminalen ERTM Fragmenten konstruiert. In transient transfizierten 293T-Zellen wurden die rekombinanten Fusionsproteine exprimiert (Abb. 3.4 A), während in stabil transduzierten EL-4 Zellen die anfänglich schwache Expression der Fusionsproteine mit 2 ERTM Fragmenten im Laufe der Zeocin-Selektion verloren ging

(Abb. 3.4 B, Spuren 7 und 12). Aus dem *in vitro* Kinase-Assay in Abbildung 3.4 C geht hervor, dass die HPK1-Kinase-Aktivität durch die modifizierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors nicht regulierbar ist.

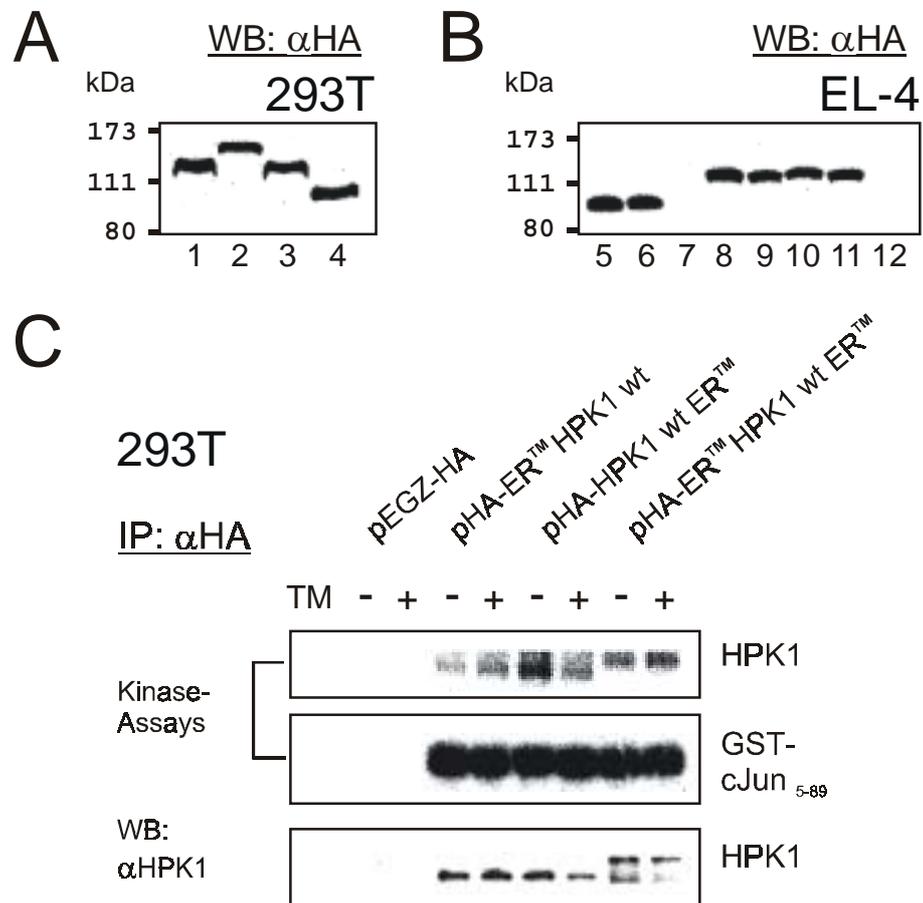


Abb. 3.4: Die Kinaseaktivität der retroviral exprimierten HPK1 ist nicht über eine modifizierte Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ERTM) regulierbar.

(A) *Retrovirale Fusionsproteine werden in 293T-Zellen exprimiert.* 293T-Zellen wurden mit retroviralen Konstrukten transfiziert und die Expression der rekombinanten Proteine von jeweils 50 μ g der nach 48 h isolierten Ganzzellextrakte im Immunoblot mit spezifischen monoklonalen Ak gegen das HA-Tag nachgewiesen. Dabei wurden folgende transfizierte Konstrukte in den entsprechenden Spuren geladen: 1 - pHA-ERTM HPK1 wt, 2 - pHA-ERTM HPK1 wt ERTM, 3 - pHA-HPK1 wt ERTM, 4 - pHA-HPK1 wt. (B) *Transduzierte EL-4 T-Zellen exprimieren nicht alle retroviralen HPK1-Konstrukte.* EL-4 T-Zellen wurden mit retroviralen Plasmiden stabil transduziert und mit Zeocin (300 μ g/ml) selektiert. Im Westernblot wurde die Proteinexpression von jeweils 50 μ g Ganzzellextrakten mit mAk gegen das HA-Tag bestimmt. Auffallend ist der Verlust der Expression der retroviralen HPK1-Konstrukte mit jeweils zwei ERTM-Fragmenten. Es wurden folgende stabil transduzierte Konstrukte in den entsprechenden Spuren geladen: 5 - pHA-HPK1 wt, 6 - pHA-HPK1 M(46), 7 - pHA-ERTM HPK1 wt ERTM, 8 - pHA-ERTM HPK1 wt, 9 - pHA-HPK1 wt ERTM, 10 - pHA-ERTM HPK1 M(46), 11 - pHA-HPK1 M(46) ERTM, 12 - pHA-ERTM HPK1 M(46) ERTM. (C) *Die HPK1-Kinaseaktivität ist nicht durch 4-Hydroxytamoxifen (TM) regulierbar.* Die angegebenen retroviralen Konstrukte wurden in 293T-Zellen transfiziert und nach 48 h ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor 6 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 4-Hydroxytamoxifen (TM + o. -) inkubiert. In A-C sind repräsentative Blots von jeweils drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

So ist die Substratphosphorylierung des GST-cJun₅₋₈₉ ohne oder mit 4-Hydroxytamoxifen nahezu konstant und im Vergleich mit Konstrukten ohne die Hormonbindungsdomäne gleich stark. Wurden die Zellen über Nacht (ca. 18 h) mit TM inkubiert, so konnte im Kinase-Assay eine minimale Steigerung der HPK1-Autophosphorylierung um den Faktor 1,15 am Phospho-Imager detektiert werden. Jedoch gab es auch hier keinen Unterschied in der Substratphosphorylierung. Es war also leider nicht möglich, die HPK1-Kinase-Aktivität zu regulieren, so dass mit den konstitutiv aktiven HPK1-Konstrukten gearbeitet werden musste.

3.1.3. Die HPK1 fördert die spontane und unterstützt die α CD3-vermittelte Apoptose primärer CD4⁺ T-Lymphozyten

Aus der erhöhten endogenen HPK1-Expression in apoptotischen CD4⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 3.1) wurde eine mit der T-Zellaktivierung und Apoptose assoziierte biologische Rolle dieser Serin-Threonin-Proteinkinase vermutet. Um diese Arbeitsthese zu überprüfen, wurden naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit einem OVA-Peptid stimuliert und 24 h später mit Retroviren infiziert, die entweder ein Kontrollkonstrukt (pEGZ-HA), die wildtypische HPK1 (pHA-HPK1 wt) oder eine Kinase-inaktive HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) exprimierten. Anschließend wurden die Zellen weitere 4 d expandiert, bevor ein Teil der Zellen auf α CD3 ϵ beschichteten Gewebekulturschalen 8 h restimuliert wurde. Durch eine Markierung des während der Apoptose translokalisierten Phosphatidylserins mit Phycoerythrin (PE) konjugiertem AnnexinV und der Auswertung in der zweiparametrischen Darstellung am FACS konnte der Anteil der apoptotischen (AnnexinV-PE pos.), infizierten (EGFP-pos.) Zellen bestimmt werden. Die uninfizierten und mit dem Leervektor infizierten Zellen dienten dabei jeweils als Kontrolle.

In Abbildung 3.5 sind repräsentative FACS-Daten aus einem von drei Experimenten dargestellt. Während die uninfizierten Zellen ohne und mit α CD3-Restimulation eine nahezu identische Apoptoserate aufweisen, sind klare Unterschiede zwischen den infizierten CD4⁺ T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom exprimierten Konstrukt zu erkennen. Bereits die Infektion mit dem Kontrollvektor verursachte dabei einen Anstieg der spontanen Apoptose um 45 % nach 4 d im Vergleich zu den uninfizierten Zellen. Die wildtypische HPK1 führte zu einer 3-fachen Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen und die Kinase-inaktive HPK1 zu einer 2-fachen Steigerung der durch die Überexpression induzierten Apoptose im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollpopulationen. Besonders der Anteil der HPK1-exprimierenden apoptotischen Zellen war mit 81,6 % bereits vor der Restimulation sehr hoch. Wurde durch

die α CD3-Restimulation eine spezielle Form der Apoptose, der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) induziert, trug die HPK1-Überexpression zu einer schnelleren Kinetik und einer höheren Apoptoserate bei. Sowohl die wildtypische HPK1 als auch in geringerem Maße die Kinase-inaktive HPK1 förderten die spontane und unterstützten die α CD3-vermittelte Apoptose primärer CD4⁺ T-Lymphozyten.

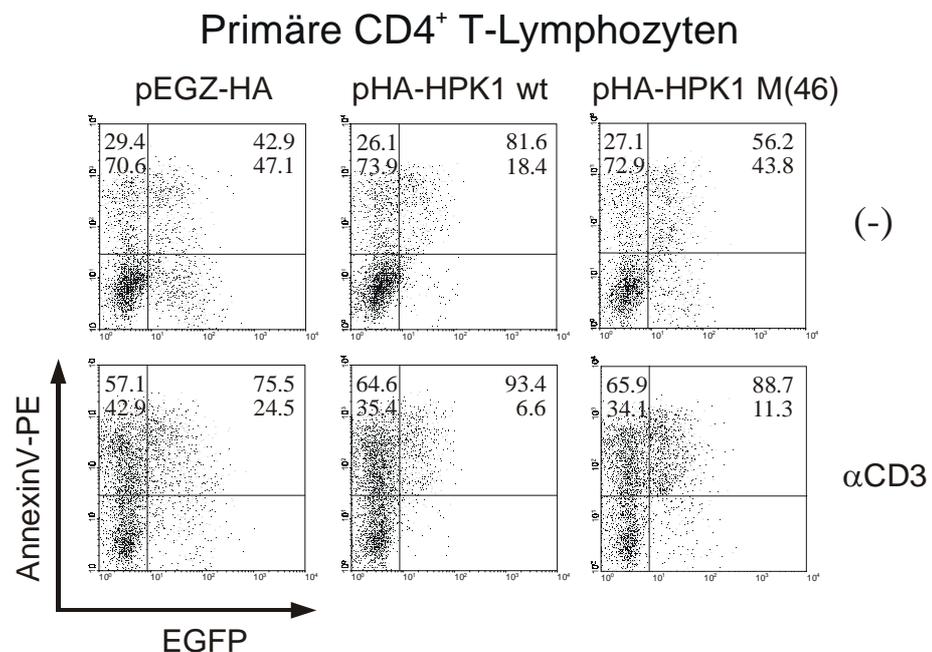


Abb. 3.5: Die HPK1 verstärkt die spontane Apoptose und den AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden 24 h in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit einem OVA-Peptid (323-339) stimuliert, mit den angegebenen retroviralen Konstrukten infiziert und für weitere 4 d in IL-2 haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden unbehandelte (-) sowie für 8 h mit Plattengebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimierte Zellen (α CD3) mit AnnexinV-PE gefärbt und im FACS der Anteil der apoptotischen Zellen (AnnexinV-positiv) bestimmt. Als interne Kontrolle dienten dabei die jeweiligen uninfizierten, EGFP-negativen Zellen. Abgebildet sind Dot Plots eines repräsentativen Experiments, das aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählt wurde.

Somit sind für die regulatorische Funktion der HPK1 während des T-Zelltodes neben der Kinase-Aktivität auch andere Faktoren von Bedeutung, die wahrscheinlich über die Prolinreichen Regionen und Adaptormolekülbindungen mehrere unterschiedliche Signaltransduktionswege beeinflussen.

3.1.4. Sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide sind an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt

Um den proapoptotischen Effekt der HPK1 auf bestimmte Regionen und Funktionen dieser Proteinkinase eingrenzen zu können, wurden verschiedene retrovirale Expressionsvektoren konstruiert (Abbildung 3.2). Die HPK1-Proteine wurden von diesen Konstrukten nach der transienten Transfektion in 293T-Zellen exprimiert. Dies geht aus dem in Abbildung 3.6 gezeigten Westernblot mit spezifischen Ak gegen das HA-Tag hervor. Die Größe der HPK1 beträgt 97 kDa, das N-terminale Peptid ist 43 kDa und das C-terminale Peptid 54 kDa groß.

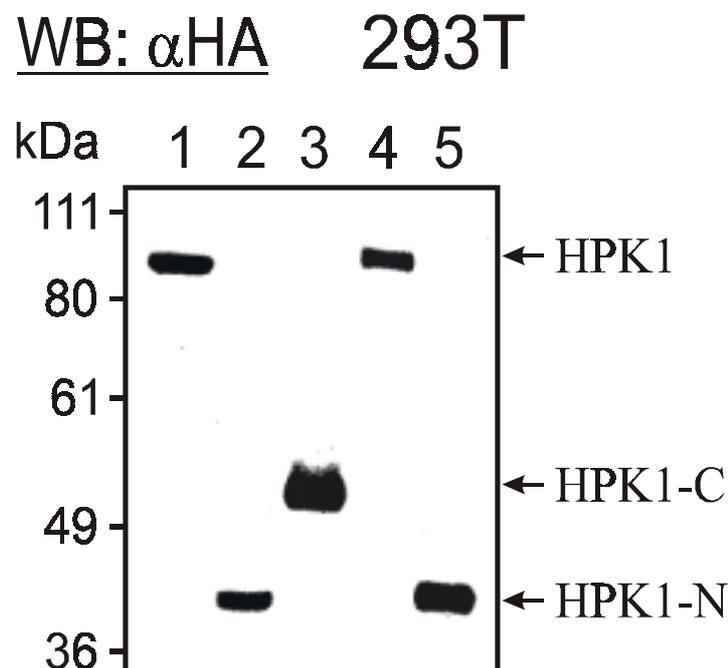


Abb. 3.6: N- und C-terminale HPK1-Peptide werden von den konstruierten retroviralen Vektoren exprimiert.

293T-Zellen wurden mit verschiedenen retroviralen HPK1-Plasmiden transient transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression dieser Konstrukte durch einen Immunoblot von jeweils 40 μ g der isolierten Ganzzellproteinextrakte mit mAk gegen das HA-Tag untersucht. Dabei wurden die Proteine von mit folgenden Vektoren transfizierten 293T-Zellen in den entsprechenden Spuren geladen: **1** - pHA-HPK1 wt, **2** - pHA-HPK1 wt N-term., **3** - pHA-HPK1 wt C-term., **4** - pHA-HPK1 M(46), **5** - pHA-HPK1 M(46) N-term. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten.

Die retrovirale Überexpression einer gegen die humane HPK1 gerichteten „antisense“-RNA (pHA-HPK1 AS) sollte die endogene HPK1-Expression unterdrücken und somit weitere Rückschlüsse auf die biologische Rolle der HPK1 bei der T-Zell-Apoptose ermöglichen. In der transienten Koftransfektion von 293T-Zellen (Abbildung 3.7) inhibierte das AS-Konstrukt dosisabhängig die HPK1-Expression. Eine geringe HPK1-Expression konnte allerdings selbst

nach einem 4-fachen Überschuss des „antisense“-Vektors noch detektiert werden, so dass man auch in primären T-Zellen nach der Infektion mit diesem Konstrukt keine vollständige Hemmung der HPK1 Expression erwarten konnte.

Vektoren	µg pro 60 mm Gewebekulturschale						
pHA-HPK1 wt	0.5	1	2	1	1	1	1
pHA-HPK1 AS	-	-	-	1	2	3	4
pEGZ-HA	4.5	4	3	3	2	1	-

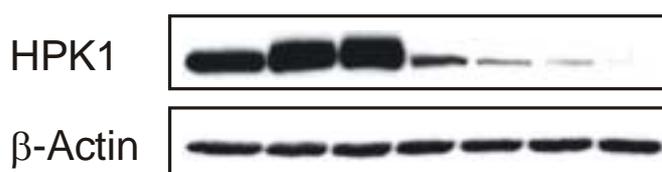


Abb. 3.7: Die HPK1 „antisense“-RNA inhibiert die HPK1-Expression.

293T-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen der retroviralen Plasmide transient kotransfiziert. Nach 48 h wurde die Expression der HPK1 (oberer Blot) und von β -Actin als Ladekontrolle (unterer Blot) in jeweils 50 μ g der isolierten Ganzzellproteinextrakte mit spezifischen Ak im Immunoblot detektiert. Die abgebildeten Immunoblots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Primäre $CD4^+$ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden wie zuvor beschrieben retroviral infiziert, expandiert und der Anteil der apoptotischen Zellen mit der AnnexinV-PE-Färbung im FACS ermittelt. Eine generelle Reduktion der spontanen Apoptose wurde durch eine um einen Tag reduzierte, 3-tägige Expansionszeit erreicht. Daten aus 5 unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 1 zusammengefasst, wobei die uninfizierten Kontrollzellen (-) wiederum nahezu identische Anteile apoptotischer Zellen zeigten. Sie dienten als Marker der allgemeinen Zellkulturbedingungen der mit den verschiedenen retroviralen HPK1-Konstrukten transduzierten T-Lymphozyten. Sowohl die spontane als auch die α CD3-induzierte Apoptose wurden durch die wildtypische HPK1 (pHA-HPK1 wt) bei einer Steigerung von 75 % bzw. 60 % im Vergleich mit Kontrollvektor (pEGZ-HA) transduzierten $CD4^+$ T-Zellen am deutlichsten beeinflusst. Die Kinase-inaktive HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) konnte den Zelltod jeweils um 40 % erhöhen. Wurden die Zellen mit einem N-terminalen HPK1-Peptid (pHA-HPK1 wt N-term.) infiziert, das die Kinase-Domäne enthält, war der Anteil der apoptotischen Zellen um 65 % bzw. 50 % höher. Aber auch der C-terminale regulatorische Teil der HPK1 (pHA-HPK1 wt C-term.) steigerte die Apoptoserate um 50 % bzw. 40 % im Vergleich mit Kontrollvektor transduzierten Zellen.

Tab. 3.1: Sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide verstärken die spontane Apoptose und den AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden 24 h in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit einem OVA-Peptid stimuliert, mit den aufgelisteten retroviralen HPK1-Konstrukten bzw. dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) infiziert oder uninfiziert belassen (-) und weitere 3 d in IL-2-haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden unbehandelte (**keine Restimulation**) sowie 8 h mit Platten-gebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimierte Zellen (**8 h α CD3**) mit AnnexinV-PE gefärbt und im FACS der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (AnnexinV positiv) bestimmt. Zusammengefasst sind Daten aus 5 voneinander unabhängigen Experimenten.

CD4 ⁺ T-Zellen der DO11.10 TZR tg Mäuse, 3 d nach Infektion		
apoptotische Zellen [% AnnexinV pos.]		
infiziert mit	keine Restimulation	8 h α CD3
—	10,3 \pm 0,7	40,9 \pm 0,8
pEGZ-HA	20,1 \pm 0,7	50,5 \pm 0,9
pHA-HPK1 wt	35,0 \pm 4,1	79,1 \pm 6,1
pHA-HPK1 M(46)	27,9 \pm 1,1	68,8 \pm 4,6
pHA-HPK1 AS	17,6 \pm 1,0	47,2 \pm 1,6
pHA-HPK1 wt N-term.	32,8 \pm 3,6	74,6 \pm 4,1
pHA-HPK1 wt C-term.	30,2 \pm 1,8	70,4 \pm 2,7
pHA-HPK1 M(46) N-term.	20,9 \pm 2,1	54,4 \pm 3,1

Bemerkenswert ist zudem, dass ein N-terminales HPK1 Peptid mit mutierter Kinase-Domäne (pHA-HPK1 M(46) N-term.) nicht in der Lage ist, die spontane oder α CD3-vermittelte Apoptose der primären CD4⁺ T-Lymphozyten zu beeinflussen. Die retrovirale Überexpression einer gegen die humane HPK1 gerichteten AS-RNA (pHA-HPK1 AS) konnte die Apoptose der murinen Lymphozyten nur geringfügig inhibieren. Daraus folgte, dass sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt sind.

3.1.5. Die Expression des Fas-Liganden (CD95L) auf T-Lymphozyten wird durch die HPK1 gesteigert

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg zur Induktion des programmierten Zelltodes führt über die Aktivierung des CD95/Fas-Rezeptors durch seinen Liganden. Deshalb sollte der Einfluss der HPK1 auf die Expression des Fas-Liganden (FasL) von T-Zellen untersucht werden.

Dazu wurden mit einem OVA-Peptid aktivierte primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen mit retroviralen HPK1-Konstrukten infiziert, 3 d expandiert und anschließend ein Teil der Zellen auf α CD3 ϵ -beschichteten Gewebekulturschalen 3 h restimuliert. Die Zellen wurden mit Biotin-konjugierten Ak gegen den CD95L und Streptavidin-PE gefärbt und im FACS der Anteil der FasL-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen bestimmt.

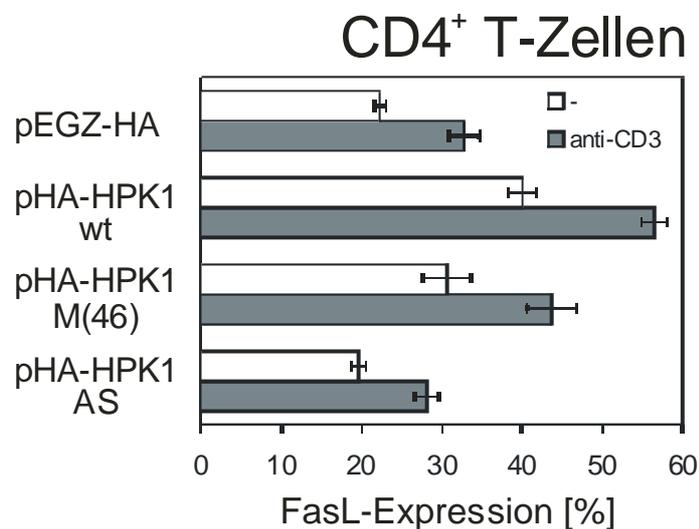


Abb. 3.8: Die HPK1 verstärkt die Expression des Fas-Liganden (CD95L) auf primären CD4⁺ T-Zellen.

CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden nach der primären Aktivierung mit OVA-Peptid (323-339) und retroviraler Infektion mit den angegebenen Plasmiden weitere 3 d in IL-2-haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden unbehandelte (-) sowie 3 h mit Plattengebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimulierte Zellen (**anti-CD3**) mit einem Biotin-konjugierten Ak gegen den CD95L sowie Streptavidin-PE gefärbt und im FACS der Anteil der FasL-exprimierenden, infizierten (EGFP-pos.) Zellen bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die Ergebnisse 5 unabhängiger Experimente sind im Balkendiagramm der Abbildung 3.8 dargestellt. Sie zeigen, dass die Expression des CD95L nach der Restimulation der T-Zellen durch α CD3 hochreguliert wird. Die HPK1-exprimierenden CD4⁺ T-Lymphozyten zeigten eine um den Faktor 2 gesteigerte basale FasL-Expression, und auch die α CD3-vermittelte

Induktion der FasL-Expression war im Vergleich mit Kontrollvektor-transduzierten Lymphozyten erhöht. Einen geringeren Effekt als die wildtypische HPK1 auf die Induktion der CD95L-Expression bewirkte die Kinase-inaktive Form der HPK1. Die retrovirale Überexpression einer gegen die humane HPK1 gerichteten AS-RNA konnte die Expression des Fas-Liganden nur minimal hemmen. Somit ist die gesteigerte Expression des FasL (CD95L) auf T-Lymphozyten durch HPK1 ein Signaltransduktionsweg, der bei der durch HPK1 modulierten Apoptose von T-Lymphozyten involviert ist.

3.2. Die HPK1 verstärkt die ROS-vermittelte Apoptose über eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und die Inhibierung des NFκB Signalweges

Um die molekularen Mechanismen des durch die HPK1 geförderten programmierten Zelltodes und die daran beteiligten Signaltransduktionskaskaden an einem Modellsystem untersuchen zu können, wurden EL-4 T-Zellen mit den zuvor beschriebenen retroviralen Expressionsvektoren stabil transduziert. Da in diesen Zelllinien selbst nach Serumdepletion keine Apoptose durch α CD3 induziert werden konnte, wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Zelltod-auslösendes Agens verwendet. Durch H_2O_2 wird die intrazelluläre Konzentration der freien reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) erhöht, die wichtige Mediatoren der T-Zell-Apoptose sind. Außerdem werden durch H_2O_2 Signaltransduktionswege beeinflusst, die auch bei T-Zell-Rezeptor (TZR)-Aktivierung induziert werden [Griffith *et al.*, 1998; Hildeman *et al.*, 1999].

3.2.1. Die endogene Expression und Spaltung der HPK1 wird durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) induziert

EL-4 T-Zellen wurden in einer Kinetik (0-120 min) mit einer Apoptose-induzierenden Wasserstoffperoxid-Konzentration stimuliert und die endogene HPK1-Expression nach Isolation der Ganzzellextrakte im Westernblot bestimmt. Aus den Immunoblots in Abbildung 3.9 ist die Induktion der endogenen HPK1-Expression durch die H_2O_2 -Behandlung ersichtlich. Gleichzeitig konnte nach 10 min ein N-terminales Spaltprodukt der HPK1 (**HPK1-N**) von etwa 43 kDa detektiert werden. Sowohl die HPK1-Expression als auch die Menge des Spaltproduktes waren nach 90 min nahezu verdoppelt und stiegen bis 120 min weiter leicht an. Somit könnte die HPK1 eine in der ROS-vermittelten Apoptose-Induktion involvierte Kinase sein.

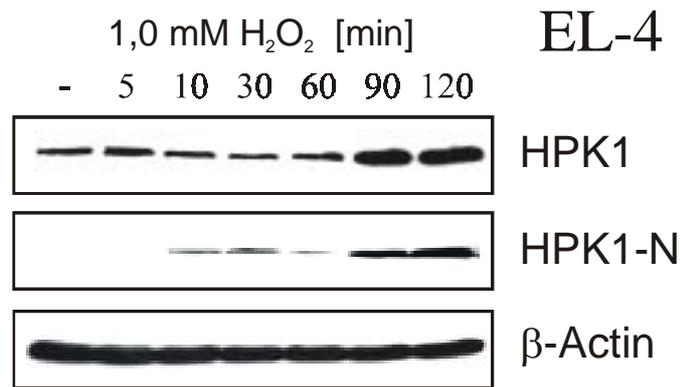


Abb. 3.9: Wasserstoffperoxid führt zum Anstieg der endogenen HPK1-Expression und Spaltung des Proteins in EL-4 Thymoma-Zellen.

EL-4 Zellen wurden 0-120 min mit 1,0 mM H₂O₂ stimuliert und anschließend Ganzzellproteinextrakte isoliert. Jeweils 100 µg Protein pro Zeitpunkt wurden mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese getrennt, auf eine NC-Membran transferiert und mit Ak gegen HPK1 (obere beiden Blots) sowie β-Actin als Ladekontrolle detektiert. Bemerkenswert ist das entstehende HPK1-Spaltprodukt (HPK1-N) von ungefähr 43 kDa. Ein repräsentativer Blots von 3 unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

3.2.2. Die Überexpression der HPK1 verstärkt die H₂O₂-induzierte Apoptose, während ein RNA-“antisense“ Konstrukt den apoptotischen Zelltod inhibiert

Um den Einfluss der HPK1 auf die durch ROS induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden mit HPK1-Konstrukten und einem Kontrollvektor stabil transduzierte EL-4 T-Zellen 6 h mit 1,0 mM H₂O₂ inkubiert. Diese Konzentration war in Vorversuchen mit EL-4 Zellen als optimal für die Apoptose-Induktion nach 6 h-iger Inkubationszeit ermittelt worden, ohne dass ein signifikant erhöhter Anteil nekrotischer Zellen entstand (nicht dargestellt). Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde anschließend mit der SubG₁-Technik bestimmt [Hotz *et al.*, 1994]. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass in apoptotischen Zellen die DNA durch eine induzierte Endonuklease gespalten wird. Die dadurch entstehenden DNA-Fragmente (von ca. 200 bp) werden nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Membran extrahiert und der verminderte DNA-Gehalt nach Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) im FACScan nachgewiesen (s. 2.15.7.2. und 2.15.9.).

Aus den Daten in Abbildung 3.10 geht hervor, dass die HPK1-Überexpression in stabil transduzierten EL-4 T-Zellen keine spontane Induktion des programmierten Zelltodes hervorruft. Die H₂O₂-induzierte Apoptose wird jedoch durch die wt und zu einem geringeren Anteil durch die Kinase-inaktive HPK1 verstärkt. Der Anteil apoptotischer Zellen nach 6 h-iger Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂ beträgt für die Kontrollzellen (pEGZ-HA) 16,2 ± 1,5 %. Dieser wird durch die Überexpression der wildtypischen HPK1 (pHA-HPK1 wt) auf 50 ± 3,4 % und durch die Kinase-inaktive HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) auf 31,9 ± 2,9 % erhöht. Somit sind für

den verstärkenden Effekt der HPK1 auf die H_2O_2 -induzierte Apoptose sowohl die Kinase-Aktivität als auch andere, vom HPK1-Protein vermittelte Funktionen von Bedeutung.

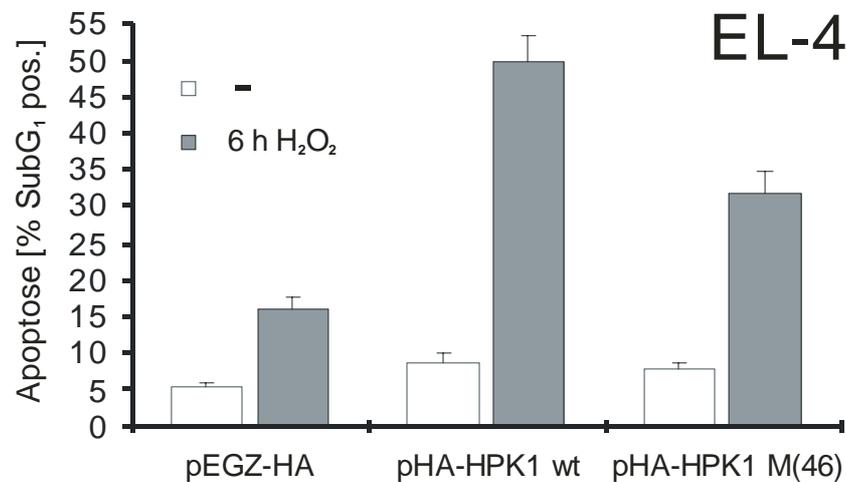


Abb. 3.10: Die wildtypische und Kinase-inaktive HPK1 verstärken die ROS-vermittelte Apoptose.

Stabil mit einem Kontrollvektor (pEGZ-HA), wildtypischer HPK1 (pHA-HPK1 wt) oder einer mutierten, Kinase-inaktiven HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) transduzierte EL-4 T-Zelllinien wurden 6 h mit 1,0 mM H_2O_2 stimuliert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt von unstimulierten und von mit H_2O_2 inkubierten Zellen nach Färbung mit Propidiumjodid im FACS gemessen. Die Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt (SubG₁), die im DNA-Histogramm vor dem G₁-Phasen Peak lagen, wurden als apoptotisch bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anzahl der apoptotischen Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten dargestellt.

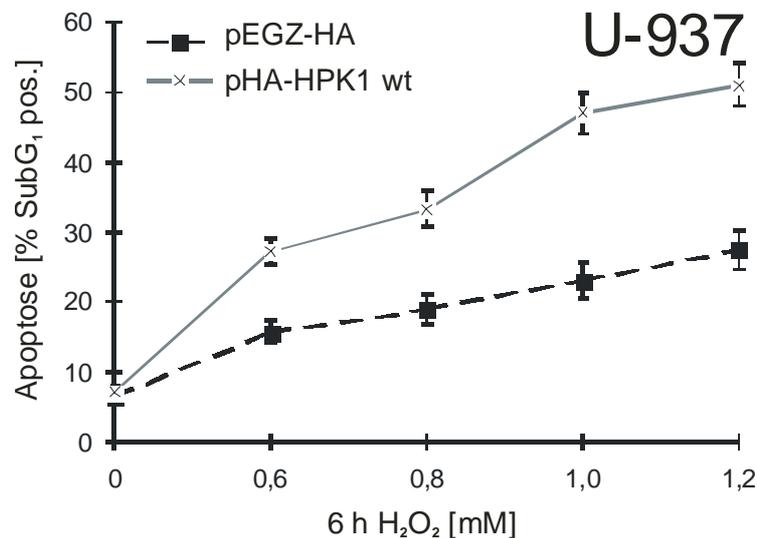


Abb. 3.11: Die Überexpression der HPK1 bewirkt eine Steigerung der H_2O_2 -induzierten Apoptose in der transduzierten Zelllinie U-937.

Die Kontroll-RNA- (pEGZ-HA) oder wt HPK1- (pHA-HPK1 wt) exprimierenden U-937-Zellen wurden 6 h mit den angegebenen H_2O_2 -Konzentrationen (0-1,2 mM) inkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen Zellen mit Hilfe der SubG₁-Technik im FACS bestimmt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Um zu überprüfen, ob diese durch die HPK1 bedingte Verstärkung der H₂O₂-induzierten Apoptose auf EL-4 T-Zellen beschränkt ist, wurden U-937-Zellen mit dem Kontrollvektor und dem HPK1-exprimierenden Konstrukt stabil transduziert. Nach 6 h-iger Inkubation mit den in Abbildung 3.11 angegebenen H₂O₂-Konzentrationen wurde die Apoptoserate mit der SubG₁-Technik ermittelt. Bei H₂O₂-Konzentrationen größer als 1,2 mM kam es dabei zu einer erhöhten Nekrose-Induktion (nicht dargestellt). Auch in den U-937-Zellen förderte die Überexpression der HPK1 die durch H₂O₂ induzierte Apoptose.

Tab. 3.2: Sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide sind an der Regulation der ROS-vermittelten Apoptose beteiligt.

Stabil mit einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) oder den angegebenen retroviralen HPK1-Konstrukten transduzierte EL-4 T-Zelllinien wurden 8 h mit 1,0 mM H₂O₂ stimuliert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt von unstimulierten und von mit H₂O₂ inkubierten Zellen nach Färbung mit Propidiumjodid im FACS gemessen. Die Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt, die im DNA-Histogramm vor dem G₁-Phasen Peak lagen (SubG₁), wurden als apoptotisch bestimmt. Aufgelistet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Prozentsatzes apoptotischer Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten.

transduziert mit	apoptotische Zellen [% SubG ₁ pos.]	
	keine Stimulation	8 h H ₂ O ₂
pEGZ-HA	5,3 ± 0,4	20,1 ± 2,1
pHA-HPK1 wt	8,6 ± 1,3	55,1 ± 4,3
pHA-HPK1 M(46)	7,9 ± 0,9	30,8 ± 3,2
pHA-HPK1 wt N-term.	7,4 ± 1,8	46,7 ± 3,8
pHA-HPK1 wt C-term.	6,8 ± 1,2	40,2 ± 2,9
pHA-HPK1 M(46) N-term.	6,1 ± 0,7	22,3 ± 3,5

Da bei der Regulation des AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide beteiligt sind (s. 3.1.4.) und die endogene HPK1 in H₂O₂-induzierten EL-4 T-Zellen gespalten wird (s. 3.2.1.), sollte untersucht werden, ob die Spaltprodukte der HPK1 auch die ROS-vermittelte Apoptose beeinflussen. Dazu wurden EL-4 T-Zellen stabil mit den verschiedenen retroviralen HPK1-Expressionsvektoren transduziert

und 8 h mit 1,0 mM H₂O₂ inkubiert, bevor der Anteil apoptotischer Zellen mit der SubG₁-Technik bestimmt wurde. In Tabelle 3.2 sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei transduzierten Zelllinien pro Konstrukt zusammengefasst.

Die HPK1-Konstrukte haben keinen Einfluss auf die Vitalität der transduzierten EL-4 Zellen, jedoch fördern sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide die H₂O₂-vermittelte Apoptose dieser Zellen. Während die wt HPK1 zu einer 2,7-fachen Steigerung der Apoptose-rate gegenüber den mit Kontrollvektor transduzierten Zellen nach 8 h-iger Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂ führt, werden durch das N-terminale, die Kinase-Domäne enthaltende HPK1-Peptid 85 % und durch das C-terminale Peptid 73 % dieses pro-apoptotischen Effekts erreicht. Im Vergleich dazu liegt der Apoptose-fördernde Effekt der mutierten, Kinase-inaktiven HPK1 bei 56 % der durch die Überexpression der wt HPK1 erreichten Apoptose-Zunahme. Die Expression eines Kinase-inaktiven N-terminalen HPK1-Peptids zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die H₂O₂-induzierte Apoptose.

Um die Bedeutung der HPK1 bei der ROS-vermittelten Apoptose zu bestimmen, wurden EL-4 T-Zellen stabil mit einem retroviralen Konstrukt transduziert, das für eine gegen die humane HPK1 gerichtete „antisense“-RNA (pHA-HPK1 AS) kodiert. So sollte die endogene HPK1-Expression unterdrückt und dadurch Rückschlüsse auf die biologische Rolle der HPK1 bei der H₂O₂-vermittelten Apoptose ermöglicht werden. Im Westernblot der isolierten Ganzzellextrakte der transduzierten Zelllinien mit HPK1-spezifischen Ak (Abbildung 3.12) ist zu sehen, dass die endogene HPK1-Expression (pEGZ-HA) nicht vollständig, aber größtenteils durch das RNA-AS-Konstrukt inhibiert wurde. Die HPK1-Expression in den EL-4 T-Zellen, die mit pHA-HPK1 wt transduziert wurden, ist im Vergleich mit der endogenen Expression etwa 3-fach bis 4-fach erhöht.

Die mit dem Kontrollvektor, mit HPK1 oder mit dem HPK1-AS-Konstrukt stabil transduzierten EL-4 T-Zellen wurden 0-8 h mit 1,0 mM H₂O₂ inkubiert, und anschließend wurde der Anteil der apoptotischen Zellen wiederum mit der SubG₁-Technik bestimmt. Aus der Kinetik in Abbildung 3.13 geht hervor, dass die Überexpression einer AS-RNA der humanen HPK1 die durch H₂O₂-induzierte Apoptose inhibiert, während die Überexpression der wt HPK1 den H₂O₂-vermittelten Zelltod verstärkt. Dargestellt ist jeweils die relative Apoptoserate im Vergleich zum Anteil der apoptotischen, Kontrollvektor-transduzierten Zellen nach 8 h Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂. Bereits nach 2 h sind schwache Unterschiede in der H₂O₂-induzierten Apoptose der einzelnen EL-4 Zelllinien detektierbar, die bis zum 8 h-Wert

deutlich ansteigen. Nach 8 h ist die Apoptoserate durch die Überexpression der HPK1 um 42 % erhöht, während das HPK1-AS-Konstrukt die Apoptoserate um 25 % reduziert.

Abb. 3.12: Die retroviral-überexprimierte HPK1 „antisense“-RNA hemmt die endogene HPK1 Expression in transduzierten EL-4 T-Zellen.

Jeweils 80 µg der isolierten Ganzzellproteinextrakte aus den mit den angegebenen retroviralen Konstrukten transduzierten EL-4 T-Zellen wurden im Westernblot mit HPK1 und als Ladekontrolle mit β -Actin spezifischen Ak detektiert. Die mit dem Leervektor transduzierten Zellen dienen dabei als Kontrolle für die endogene HPK1-Expression. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

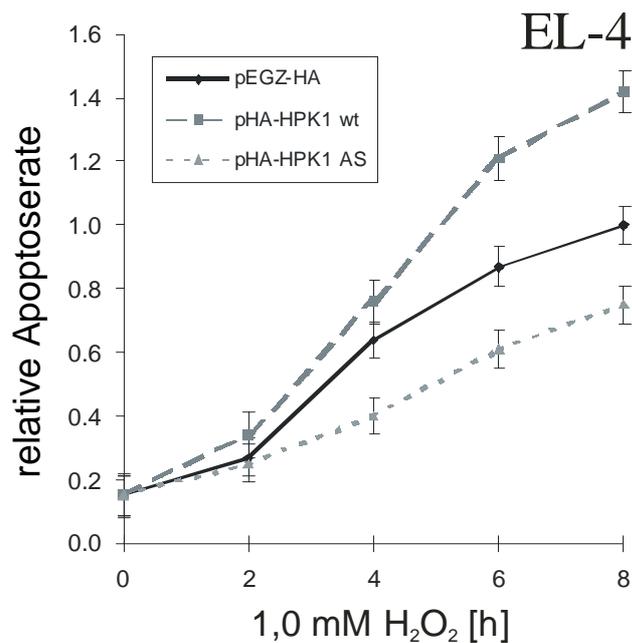


Abb. 3.13: Die HPK1-Expression verstärkt die H₂O₂-induzierte Apoptose von EL-4 T-Zellen, während eine HPK1 „antisense“-RNA diese inhibiert.

Stabil mit pEGZ-HA, pHA-HPK1 wt oder einem „antisense“-RNA Konstrukt (pHA-HPK1 AS) transduzierte EL-4 T-Zelllinien wurden 0-8 h mit 1,0 mM H₂O₂ stimuliert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der fixierten, mit Propidiumjodid gefärbten Zellen im FACS gemessen. Die Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt, die im DNA-Histogramm vor den in der G₁-Phase befindlichen Zellen lagen (SubG₁), wurden als apoptotisch bestimmt. Im Graph sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Apoptoseraten im Vergleich zu den mit dem Leervektor pEGZ-HA transduzierten und 8 h mit H₂O₂ induzierten EL-4 T-Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Aus den durch die Überexpression und Hemmung der HPK1-Expression erzielten Ergebnissen kann auf eine regulative, verstärkende Rolle der HPK1 bei der H_2O_2 -vermittelten Apoptose geschlossen werden. Dieser proapoptotische Effekt ist jedoch nicht nur durch die Kinase-Aktivität bedingt, da sowohl N-terminale als auch C-terminale HPK1-Peptide an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt sind.

3.2.3. Die ROS-vermittelte und durch HPK1 geförderte Apoptose in EL-4 T-Zellen ist nicht auf mRNA-Ebene reguliert

Um Zielgene der HPK1 zu identifizieren, die beim ROS-vermittelten Zelltod eine Rolle spielen könnten, wurde die RNA von mit HPK1-Konstrukten stabil transduzierten, H_2O_2 -induzierten EL-4 T-Zellen isoliert und die Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine mit Hilfe der RNA-Protektions-Analyse quantitativ bestimmt. Wie in Abbildung 3.14 exemplarisch dargestellt ist, konnte dabei kein Unterschied in den mRNA-Konzentrationen verschiedener Caspasen zwischen den Kontrollvektor-transduzierten (HA) und den mit wildtypischer (wt) oder Kinase-inaktiver (M46) HPK1 transduzierten EL-4 T-Zellen detektiert werden.

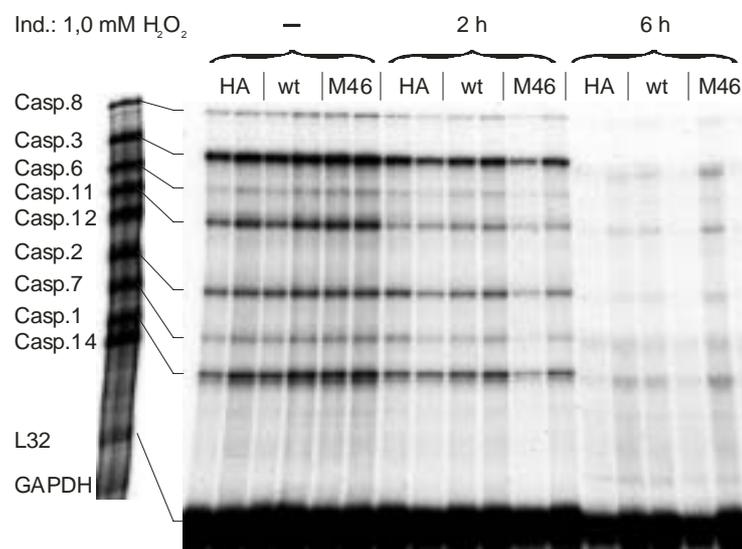


Abb. 3.14: Die HPK1-Überexpression lässt die Konzentration vieler Caspasen-RNA's in H_2O_2 -induzierten EL-4 T-Zellen unbeeinflusst.

EL-4 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (HA), wildtypischer HPK1 (wt) oder einer Kinase-inaktiven HPK1 (M46) transduziert und mit Zeocin selektioniert. Sie wurden im FACS auf Grünfluoreszenz und im Westernblot auf die Proteinexpression überprüft. Ein Teil der Zellen wurde unbehandelt belassen, die anderen 2 h und 6 h mit 1,0 mM H_2O_2 induziert. Anschließend wurden jeweils 5 μ g der extrahierten Gesamt-RNA im RNA-Protektions-Assay (Riboquant von BD PharMingen) analysiert. Auf dem Gel sind Proben von je 2 unabhängigen transduzierten Zelllinien aufgetragen worden.

Der reduzierte RNA-Gehalt nach 6 h-iger Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂ erklärt sich durch den Prozess des fortschreitenden Zelltodes. In anderen, nicht dargestellten, RNA-Protektions-Analysen wurden u.a. die mRNA's von bcl-2, bcl-x, CD95 sowie des CD95L untersucht. Obwohl exprimiert, gab es auch hier keinen Unterschied in den mRNA-Konzentrationen zwischen den transduzierten Zelllinien. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die pro-apoptische Wirkung der HPK1 auf den ROS-induzierten Zelltod nicht auf eine „Hochregulierung“ Apoptose-fördernder Gene oder eine Hemmung bekannter anti-apoptotischer Gene zurückzuführen ist. Allerdings könnten andere aktivierende Signaltransduktionswege verstärkt sein wie z.B. die Spaltung und damit die Aktivierung der Caspasen.

3.2.4. Durch H₂O₂-Induktion ist eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung in HPK1-exprimierenden EL-4 T-Zellen zu beobachten

Aus der Literatur war bekannt, dass die HPK1 nach α CD3-Stimulation aktiviert wird. Ein frühes Ereignis nach der T-Zell Aktivierung ist die Protein-Tyrosinphosphorylierung. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch nach H₂O₂-Stimulation eine Protein-Tyrosinphosphorylierung induziert wird und ob die HPK1 diese Phosphorylierung beeinflusst.

Dazu wurden mit HPK1-Konstrukten bzw. mit einem Kontrollvektor stabil transduzierte EL-4 T-Zellen 0-120 min mit 1,0 mM H₂O₂ inkubiert und das Protein-Phosphorylierungsmuster der isolierten Ganzzellextrakte im Westernblot mit spezifischen mAk gegen Phospho-Tyrosin detektiert. Aus Abbildung 3.15 ist ersichtlich, dass die H₂O₂-Stimulation der mit dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) transduzierten EL-4 T-Zellen zu einer Inhibierung der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen führt, die größer als 50 kDa sind. Dagegen bleibt in diesen Zellen die Tyrosinphosphorylierung der Proteine unter 50 kDa von der Induktion mit H₂O₂ unbeeinflusst.

Die Überexpression der wildtypischen HPK1 (pHA-HPK1 wt) führt nach H₂O₂-Stimulation zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine. Während die HPK1 in diesen transduzierten Zellen zu einer starken und anhaltenden konstitutiven Phosphorylierung der Proteine zwischen 12-30 kDa führt, kommt es durch H₂O₂ zu einer Induktion der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen, die größer als 45 kDa sind. Die Überexpression einer mutierten Kinase-inaktiven HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) hat dagegen einen deutlich geringeren, wenn auch signifikanten Einfluss auf die Protein-Tyrosinphosphorylierung nach H₂O₂-Stimulation. Die HPK1 fördert also die Protein-Tyrosinphosphorylierung in H₂O₂-induzierten EL-4 T-Zellen.

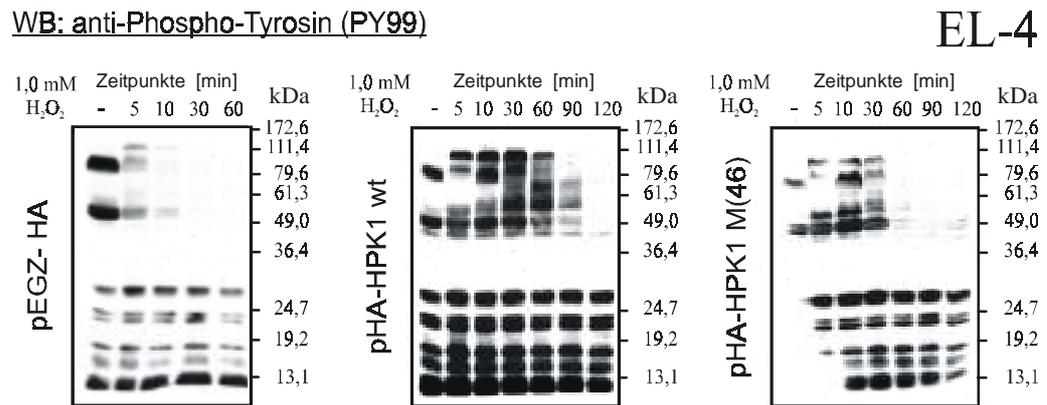


Abb. 3.15: Die HPK1 verstärkt die Protein-Tyrosinphosphorylierung in H₂O₂-stimulierten EL-4 T-Zellen.

Im Westernblot mit einem spezifischen mAk gegen Phospho-Tyrosin wurde das Protein-Phosphorylierungsmuster von mit unterschiedlichen retroviralen Konstrukten stabil transduzierten und 0-120 min mit 1,0 mM H₂O₂ induzierten EL-4 T-Zelllinien detektiert, wobei 50 µg der Ganzzellproteinextrakte je Zeitpunkt aufgetragen wurden. Die abgebildeten Immunoblots zeigen repräsentative Autoradiogramme von 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.5. Die HPK1 verstärkt die JNK- und, in geringerem Maße, die ERK- und p38 MAP-Kinase-Aktivierung in H₂O₂-induzierten EL-4 T-Zellen

Da die HPK1 als ein Aktivator der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) beschrieben wurde [Hegner *et al.*, 2000a; Ma *et al.*, 2001] und die Aktivierung von JNK den apoptotischen Zelltod fördert [Behrens *et al.*, 2001; Sabapathy *et al.*, 2001], sollte der Einfluss der HPK1 während der H₂O₂-vermittelten Apoptose auf die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) untersucht werden.

Dazu wurden EL-4 T-Zellen mit einem Kontrollvektor und verschiedenen HPK1-Konstrukten stabil transduziert. Die Zellen wurden 0-120 min mit 1,0 mM H₂O₂ inkubiert und die isolierten Ganzzellextrakte im Westernblot mit den Phospho-spezifischen Ak (jeweiliger oberer Blot) bzw. für die Expression der MAPK mit den gegen das Protein gerichteten Ak (jeweiliger unterer Blot) detektiert. Wie der Abbildung 3.16 zu entnehmen ist, führte die Stimulation mit H₂O₂ zu einer schwachen, doch detektierbaren Aktivierung aller drei untersuchten MAP-Kinasen JNK1, p38 sowie ERK1/ERK2 bei den mit dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) transduzierten EL-4 Zellen. Die Überexpression der wt HPK1 (pHA-HPK1 wt) bewirkte - wie vermutet - eine verstärkte JNK-Phosphorylierung. Obwohl die Expression der mutierten, Kinase-inaktiven Form der HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) ebenfalls die Aktivität der JNK im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkte, war dieser aktivitätssteigernde Effekt im Falle der wt HPK1 stärker und vor allem länger anhaltend. Dies deutet darauf hin, dass ein

wesentlicher Teil der JNK-Aktivierung auf die HPK1-Kinase-Aktivität und nicht auf die durch die Prolin-reichen Motive vermittelte Adaptor-Funktion zurückzuführen ist. Im Vergleich zur deutlichen Steigerung der JNK1 Aktivierung führte die HPK1-Expression nur zu einer schwachen Aktivitätssteigerung von p38 sowie ERK1/ERK2. Außerdem war dieser induzierende Effekt nahezu gleich stark in EL-4 T-Zellen, die eine Kinase-inaktive HPK1 exprimierten. Die ERK1/ERK2-Phosphorylierung war in den letztgenannten Zellen sogar stärker. So scheint die HPK1-Kinase-Aktivität nicht verantwortlich für die Aktivierung von p38 sowie ERK1/ERK2 zu sein. Eine gegen die humane HPK1 gerichtete AS-RNA (pHA-HPK1 AS) unterdrückte die Aktivitätssteigerung aller drei MAP-Kinasen, jedoch nicht deren Expression.

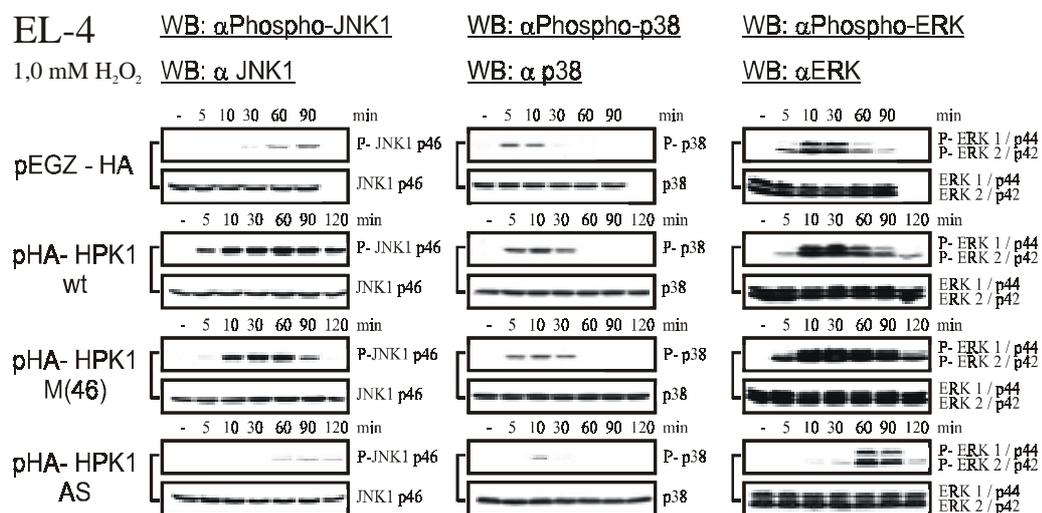


Abb. 3.16: Die HPK1 verstärkt die JNK- und - in schwächerem Maße - auch die ERK- und p38 MAP-Kinase-Aktivierung in H_2O_2 -stimulierten EL-4 T-Zellen.

Stabil transduzierte EL-4 Zelllinien, die entweder wt HPK1 (pHA-HPK1 wt), eine Kinase-inaktive K46M HPK1 (pHA-HPK1 M(46)), die HPK1-AS-RNA (pHA-HPK1 AS) oder Kontrollvektor-RNA (pEGZ-HA) exprimieren, wurden 0-120 min mit 1,0 mM H_2O_2 stimuliert. Jeweils 100 μ g isolierter Ganzzellproteinextrakte wurden pro Zeitpunkt mittels einer SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert und mit den angegebenen phospho-spezifischen Ak's (obere Blots) und nach dem „Strippen“ der Membran mit den MAPK-spezifischen Ak's (untere Blots) detektiert. Die dargestellten Immunoblots sind repräsentativ aus 3 unabhängigen Experimenten.

Aus den Phosphorylierungs-Experimenten folgt, dass die HPK1 in H_2O_2 -induzierten EL-4 T-Zellen die JNK1-Aktivierung sowie - in geringerem Maße - auch die Aktivierung von ERK1/ERK2- und p38-MAP-Kinasen verstärkt. Besonders die langanhaltende JNK1-Phosphorylierung könnte ein Signaltransduktionsweg sein, der für den positiven Effekt der HPK1 auf die Apoptose mitverantwortlich ist.

3.2.6. Das Gesamt-HPK1-Protein stimuliert, das C-terminale HPK1-Peptid hemmt die Aktivierung von NFκB

In der Literatur wird über die Induktion von NFκB durch die HPK1 in verschiedenen Zelltypen berichtet [Hu *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Deshalb sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die HPK1 den NFκB-Signaltransduktionsweg auch in ROS-stimulierten EL-4 T-Zellen moduliert.

Da NFκB ein Transkriptionsfaktor ist, der im Zellkern an spezifische, nur wenige Nukleotide umfassende DNA-Sequenzen der Promotor/Enhancerbereiche induzierbarer Gene bindet, sollte im EMSA („Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit verschiedenen transduzierten EL-4 Zelllinien untersucht werden, ob sich nach H₂O₂-Induktion κB-spezifische Komplexe bilden. Außerdem sollte geklärt werden, ob sich diese Komplexe in HPK1-exprimierenden Zellen gegenüber Kontrollvektor-transduzierten Zellen unterscheiden. Dazu wurden mit einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) und verschiedenen HPK1-Konstrukten stabil transduzierte EL-4 Zellen 0-6 h mit 1,0 mM H₂O₂ induziert und die Kernproteinextrakte isoliert. Diese wurden mit markierten Oligonukleotiden (als radioaktive Probe) inkubiert, die sich bildenden Protein/Oligonukleotid (DNA)-Komplexe in einem nicht-denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und anschließend autoradiografisch dargestellt. Die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung wurde durch die Zugabe eines 100-fachen molaren Überschusses der nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotid-Probe untersucht, wobei nur solche Komplexe als spezifisch galten, die nach Zugabe des Kompetitors (Komp.) verschwanden. Es wurden zwei NFκB-spezifische Oligonukleotide verwendet: NFκB_{NFAT} aus dem P1 Promotor von NFATc (Abbildung 3.17 A) sowie TCE_{dA>C} aus der Enhancersequenz des Interleukin-2 Promotors (Abbildung 3.17 B). Im EMSA konnten jeweils drei unterschiedliche κB-spezifische Komplexe nachgewiesen werden. Aus den Bandshifts in Abbildung 3.17 geht hervor, dass NFκB durch die Inkubation der Zellen mit H₂O₂ in den Zellkern translokalisiert wird und an die Oligo-nukleotide bindet. Bereits nach 5-minütiger Inkubation mit H₂O₂ konnte eine starke Induktion des Komplexes * in Abbildung 3.17 A detektiert werden, dessen Induktion mit zunehmender Zeitdauer abnimmt. Die Komplexe ** und *** waren ebenfalls nach 5-30 min verstärkt und bei 1 h-iger Induktion auf das Ausgangsniveau gefallen. Mit der Probe aus dem IL-2 Promotor (in Abbildung 3.17 B) wurde der Komplex ** am stärksten aktiviert, wenngleich auch hier alle drei Komplexe nach 5-30 min Induktion verstärkt auftraten. Die Komplexe * und ** blieben bis zum 3 h-Wert gegenüber unstimulierten Zellen verstärkt.

Beim 6 h-Wert waren keine spezifischen Komplexe mehr detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt befand sich bereits ein Großteil der EL-4 T-Zellen im aktiven Prozess der Apoptose.

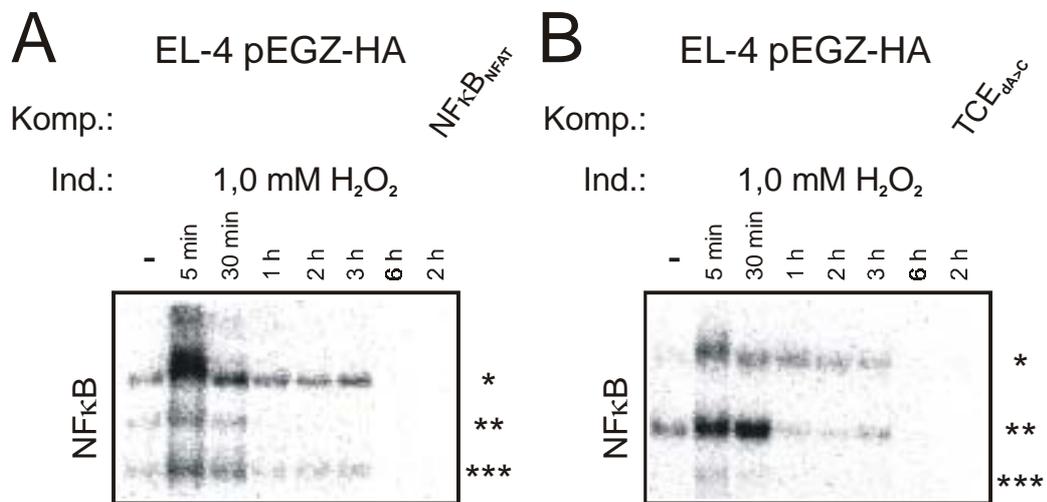


Abb. 3.17: Die Induktion von EL-4 Zellen mit H₂O₂ führt zur Aktivierung von NFκB.

Mit einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) stabil transduzierte EL-4 T-Zellen wurden 0-6 h mit 1,0 mM H₂O₂ induziert. Im EMSA wurden 4 µg der aus diesen Zellen isolierten Kernproteinextrakte pro Reaktion eingesetzt. Die Extrakte wurden vor der Gel-Elektrophorese auf Eis mit κB-spezifischen markierten Oligonukleotiden (Proben) inkubiert: **A** - NFκB_{NFAT} aus dem P1 Promotor von NFATc sowie **B** - TCE_{dA>C}, eine ideale κB-Konsensussequenz aus dem Enhancer des IL-2 Gens. Jeweils in der letzten Spur des Gels wurde ein Kontrollansatz der 2 h induzierten Zellen geladen, bei dem zusätzlich 100 ng der unmarkierten Probe als spezifischer Kompetitor eingesetzt wurde.

Aus den Ergebnissen der EMSA's mit Kontrollvektor-transduzierten Zellen lässt sich eine Induktion der NFκB-Aktivität nach ROS-Stimulation ableiten. Allerdings wurden in EL-4 T-Zellen, die wt HPK1, eine Kinase-inaktive HPK1 oder N-terminale bzw. C-terminale HPK1-Peptide exprimierten, keine quantitativen Veränderungen der NFκB-spezifischen Komplexe im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet (nicht dargestellt). Das heißt, es wurde mit Hilfe der DNA/Protein-Bindungsstudien im EMSA keine veränderte NFκB-Aktivierung in den HPK1-exprimierenden EL-4 T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden der Effekt der wildtypischen HPK1 und des C-terminalen HPK1-Peptids im Luziferase-Reportergen-Assay auf die Induktion einer 3-fachen Kopie der NFκB-Erkennungssequenz aus dem intronischen c-myb Enhancer der Maus (p c-myb/κB-TATA luc) untersucht. Da die retroviralen Expressionsplasmide bereits eine hohe Eigenaktivität aufwiesen (nicht dargestellt), wurden die HA-Fusionsproteine für die HPK1-Expression in den Vektor pBS KRSPA umklontiert und so unter der Kontrolle des

Rous- Sarkoma-Virus (RSV)-Promotors exprimiert. Ein Teil der transfizierten EL-4 Zellen wurde 6 h mit 500 μM H_2O_2 stimuliert. Die niedrigere Konzentration des H_2O_2 im Vergleich zu den vorherigen Experimenten sollte die Apoptose-Induktion verzögern. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, führt allein die Transfektion der wildtypischen HPK1 (HPK1 wt) zu einer 4,7-fachen Erhöhung der NF κ B-Aktivität, während das C-terminale HPK1-Peptid (HPK1 C-term.) die Aktivierung von NF κ B im Vergleich zum transfizierten Kontrollvektor (HA) um mehr als die Hälfte inhibiert. Auch nach H_2O_2 -Stimulation fördert die HPK1 die NF κ B-Aktivierung (2-fach), und das C-terminale HPK1-Peptid hemmt die NF κ B-Aktivität um 70 % im Vergleich zur Kontrolltransfektion.

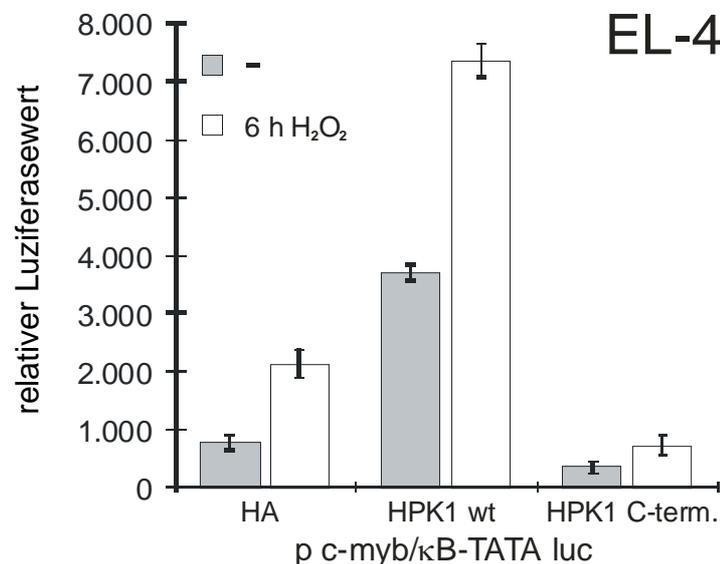


Abb. 3.18: **Das Gesamt-HPK1-Protein aktiviert, das C-terminale HPK1-Peptid inhibiert die NF κ B-Induktion.**

1×10^6 EL-4 T-Zellen wurden transient mit 4 μg eines Kontrollkonstrukts (HA) oder Expressionsvektoren für HPK1 (HPK1 wt) bzw. ein C-terminales HPK1-Peptid (HPK1 C-term.) und mit 2 μg eines NF κ B-abhängigen Luziferase-Reportergen-Konstrukts (p c-myb/ κ B-TATA luc) kotransfiziert. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder 6 h mit 500 μM H_2O_2 induziert oder unbehandelt belassen, bevor die Luziferase-Aktivität im Luminometer bestimmt wurde. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Luziferaseaktivität unter Berücksichtigung des jeweiligen Proteingehalts (gemessen mit dem Bradford-Reagenz) aus 2 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen zusammengefasst.

Neben der verstärkten JNK1-Phosphorylierung könnte somit auch die Hemmung des NF κ B-Signalweges durch das C-terminale Spaltprodukt der HPK1 für die pro-apoptotische Wirkung der HPK1 beim ROS-vermittelten Zelltod von Bedeutung sein.

3.2.7. Die HPK1 hemmt die AP-1/ NFAT-vermittelte Gentranskription

In der Literatur wurde vielfach die Induktion der durch den Transkriptionsfaktorenkomplex AP-1 vermittelten Gentranskription nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation über eine Aktivierung der MAP-Kinasen beschrieben [Hegner *et al.*, 2000a; Liou *et al.*, 2000]. Da die HPK1 ein starker Aktivator des JNK-Signalweges ist, war es von besonderem Interesse, den Einfluss dieser Serin-Threonin-Proteinkinase auf die AP-1/ NFAT-vermittelte Gentranskription zu untersuchen.

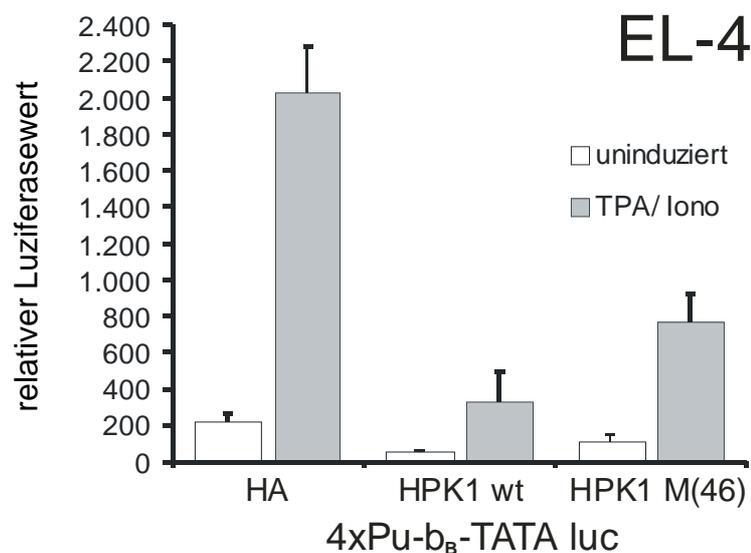


Abb. 3.19: Die HPK1 hemmt die AP-1/ NFAT-vermittelte Gentranskription des IL-4.

1×10^6 EL-4 T-Zellen wurden mit $4 \mu\text{g}$ eines Kontrollkonstrukts (HA) oder Expressionsvektoren für HPK1 (HPK1 wt) bzw. eine Kinase-inaktive HPK1 (HPK1 M(46)) und mit $2 \mu\text{g}$ eines AP-1/ NFAT-abhängigen Luziferase-Reportergen-Konstrukts (4xPu-b_B-TATA luc aus dem IL-4 Promotor) kotransfiziert. Ein Teil der Zellen wurde 32 h nach der transienten Transfektion 16 h mit TPA/ Ionomycin (TPA/Iono) induziert, bevor die Luziferase-Aktivität im Luminometer bestimmt wurde. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Luziferaseaktivität unter Berücksichtigung des jeweiligen Proteingehalts (gemessen mit dem Bradford-Reagenz) aus 2 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen zusammengefasst.

Dazu wurden EL-4 T-Zellen mit einem AP-1/ NFAT-spezifischen Luziferase-Konstrukt, einer 4-fachen Kopie der Purinbox B aus dem murinen IL-4 Promotor (4xPu-b_B-TATA luc), und wildtypischer (HPK1 wt) sowie Kinase-inaktiver HPK1 (HPK1 M(46)) kotransfiziert. Ein Teil der Zellen wurde 16 h mit TPA/ Ionomycin (T/I) induziert und die Luziferase-Aktivität 48 h nach der Transfektion gemessen. Der Abbildung 3.19 ist zu entnehmen, dass die Induktion mit T/I in den mit dem Kontrollvektor (HA) kotransfizierten EL-4 Zellen eine 10-fach gesteigerte Luziferase-Aktivität im Vergleich zu den unstimulierten Zellen bewirkt. Sowohl die wildtypische als auch die Kinase-inaktive HPK1 führen überraschenderweise zu einer 6-

fachen bzw. 2,7-fachen Inhibierung der AP-1/ NFAT-vermittelten Luziferase-Aktivität. Dabei muss die inhibierende Wirkung von der Kinase-Aktivität und über die Prolin-reichen Motive vermittelt werden. Die Kotransfektion der HPK1-Plasmide mit einem IL-2-Luziferase-Konstrukt zeigte ebenfalls eine hemmende Wirkung der HPK1 auf die Luziferase-Aktivität (nicht dargestellt). Eine Hemmung der AP-1/NFAT-vermittelten Zytokin-Synthese durch die HPK1 könnte zum Apoptose-fördernden Effekt dieser Kinase in T-Zellen beitragen.

3.3. Auch in primären T-Lymphozyten aktiviert die HPK1 den JNK- und inhibiert den NFκB-Signalweg

Die HPK1 verstärkt den ROS-vermittelten Zelltod durch die Aktivierung des JNK- (s. 3.2.5.) und die Inhibierung des NFκB-Signalweges (s. 3.2.6.). Deshalb sollte geklärt werden, ob die HPK1 auch in primären T-Lymphozyten die Apoptose über diese Signaltransduktionswege unterstützt.

Dazu wurden naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit einem OVA-Peptid stimuliert und 24 h später mit Retroviren infiziert, die entweder ein Kontrollkonstrukt (EGZ-HA), die wildtypische HPK1 (HPK1 wt) oder ein C-terminales HPK1-Peptid (HPK1 wt C-term.) exprimierten. Zwei Tage nach der Infektion wurden die infizierten, EGFP-positiven Zellen im FACS sortiert. Am Folgetag wurden von diesen Zellen Ganzzellproteinextrakte isoliert, wobei ein Teil der T-Zellen zuvor 30 min mit αCD3ε-spezifischen mAk restimuliert wurde.

Aus den Westernblots in Abbildung 3.20 geht hervor, dass alle drei MAP-Kinasen - JNK1, p38 sowie ERK1/ERK2 - nach der Restimulation mit αCD3 (+) phosphoryliert und damit aktiviert wurden. Die JNK war in HPK1-überexprimierenden CD4⁺ T-Lymphozyten bereits ohne Restimulation (-) stark phosphoryliert und nach der Restimulation stärker aktiviert als die JNK der mit dem Kontrollvektor infizierten Zellen. Die JNK-Phosphorylierung muss über die Kinase-Aktivität der HPK1 vermittelt werden, da in den Zellen, die ein C-terminales HPK1-Peptid ohne Kinase-Domäne exprimierten, keine erhöhte JNK-Phosphorylierung detektiert wurde. Die Aktivierung der p38-MAPK wird in αCD3-restimulierten primären T-Lymphozyten, im Gegensatz zu den mit H₂O₂-induzierten EL-4 Zellen (s. 3.2.5.), nicht von der HPK1 beeinflusst. Die Überexpression des C-terminalen HPK1-Peptids inhibiert geringfügig die Phosphorylierung von ERK1/ERK2, während die wildtypische HPK1 keinen Einfluss auf die Aktivierung dieser MAPK zeigt. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die

HPK1 den JNK-Signalweg positiv reguliert und die verstärkte JNK-Phosphorylierung eine Ursache der durch die HPK1 geförderten T-Zell-Apoptose sein könnte.

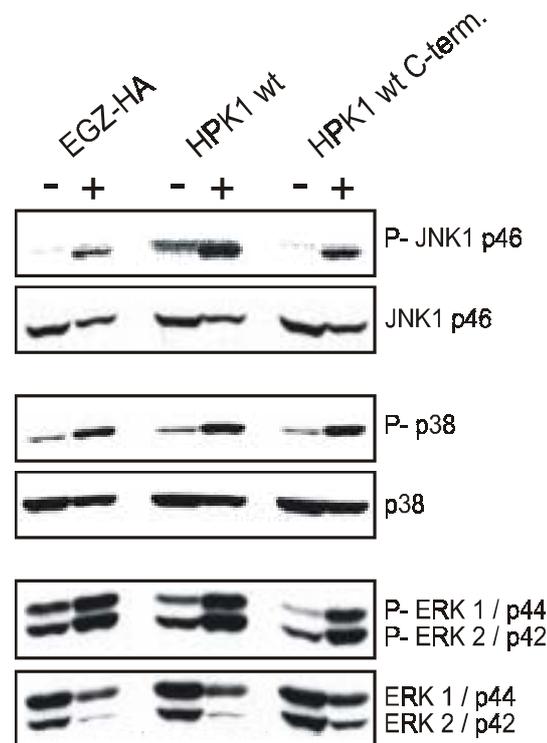


Abb. 3.20: Die HPK1 verstärkt die JNK-Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen, während ein C-terminales HPK1-Peptid die ERK-Aktivierung inhibiert.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden wie bereits zuvor beschrieben mit dem OVA-Peptid aktiviert und einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) oder den angegebenen retroviralen HPK1-Konstrukten infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die EGFP-positiven Zellen sortiert und 1 d später Ganzzellproteinextrakte von den unbehandelten (-) und 30 min mit α CD3 ϵ restimulierten (+) Lymphozyten isoliert. Pro Spur wurden die Ganzzellproteinextrakte von 3×10^5 T-Zellen im Westernblot geladen. In diesen sind jeweils die phosphorylierten MAP-Kinasen (obere Blots) und - nach dem „Strippen“ der Membran - die MAPK-Expression (untere Blots) detektiert. Letztere dienten gleichzeitig als Ladekontrolle.

Mit dem gleichen methodischen Ansatz wie für die Phosphorylierung der MAPK wurde die Aktivierung des NF κ B-Signalweges untersucht. NF κ B-Transkriptionsfaktoren sind im Zytoplasma mit inhibitorischen Proteinen, den I κ B's assoziiert. Werden diese nach Stimulation der Zelle degradiert, wird NF κ B in den Zellkern translokalisiert und reguliert dort die Transkription zahlreicher Gene, die unter anderem das Überleben und die Proliferation der Zelle fördern. In T-Zellen ist I κ B α das prominenteste inhibitorische Protein des NF κ B-Signalweges. Deshalb wurde, wie im Westernblot in Abbildung 3.21 dargestellt, die Degradation von I κ B α in primären CD4⁺ T-Lymphozyten nach Restimulation mit mAk gegen CD3 ϵ untersucht. Dabei kam es zu einer Degradation des I κ B α nach 30 min Restimulation in den

CD4⁺ T-Lymphozyten, die mit einem Kontrollkonstrukt (EGZ-HA) oder der wt HPK1 (HPK1 wt) infiziert waren. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, die das C-terminale HPK1-Peptid (HPK1 wt C-term.) exprimierten, keine IκBα-Degradation nach 30 minütiger Aktivierung mit Platten-gebundenen Ak gegen CD3ε im Westernblot detektiert. Sowohl die HPK1 als auch das C-terminale HPK1-Peptid wurden in den CD4⁺ T-Lymphozyten nach der Infektion exprimiert, wie aus dem Westernblot mit mAk gegen das HA-Tag (HA) ersichtlich ist. Aus diesen Daten folgt, dass das C-terminale HPK1-Peptid den NFκB-Signaltransduktionsweg in primären T-Lymphozyten durch eine Hemmung der IκBα-Degradation inhibiert. In der Literatur wurde eine Spaltung der endogenen HPK1 durch Caspasen beschrieben [Chen *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001], so dass die Inhibierung von NFκB durch das C-terminale HPK1-Spaltprodukt für die Unterstützung der T-Zell-Apoptose von physiologischer Bedeutung sein könnte.

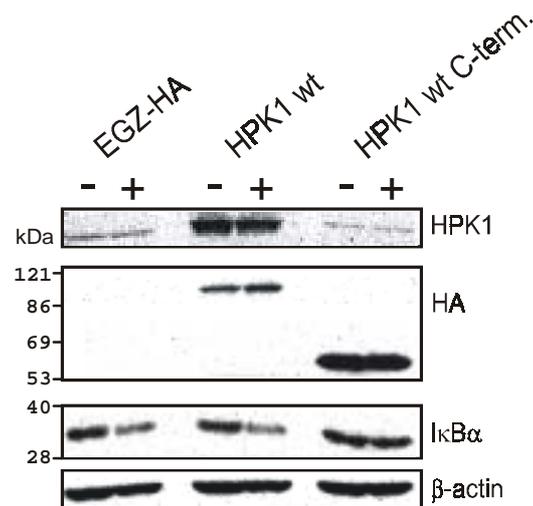


Abb. 3.21: Das C-terminale HPK1-Peptid inhibiert die Degradation des IκBα in T-Zellen.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden mit dem OVA-Peptid aktiviert und einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) oder den angegebenen retroviralen HPK1-Konstrukten infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die EGFP-positiven Zellen sortiert und 1 d später Ganzzellproteinextrakte von den unbehandelten (-) und 30 min mit αCD3ε restimulierten (+) Lymphozyten isoliert. Pro Spur wurden die Ganzzellproteinextrakte von 3 x 10⁵ T-Zellen im Westernblot geladen. Der obere Westernblot zeigt die endogene HPK1-Expression (EGZ-HA) sowie die Überexpression der HPK1 in den infizierten T-Zellen (HPK1 wt) mit einem HPK1-spezifischen Ak (αHPK1 N19). Der HA-Blot dient als Nachweis der Expression der rekombinanten HPK1 und des C-terminalen Peptids. Die aktivierungsbedingte Degradation des IκBα, eine wichtige Voraussetzung zur Aktivierung von NFκB, wird durch die Überexpression des C-terminalen HPK1-Peptids deutlich gehemmt. Der untere β-Actin-Blot reflektiert die auf das Gel geladene Proteinmenge.

3.4. Im Gegensatz zu NFATp und NFATc/C fördert NFATc/A nicht die Apoptose primärer T-Lymphozyten

Die wissenschaftlichen Arbeiten in unserem Labor haben seit mehreren Jahren die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten zum Inhalt. Prominente Vertreter sind die Mitglieder der NFAT's (Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen). NFAT-Faktoren [Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Serfling *et al.*, 2000] sind in die Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten involviert und regulieren die Expression vieler Lymphokine sowie die Expression des Fas-Liganden (CD95L). Jedoch nicht nur das: sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Lymphozyten-Proliferation und -Apoptose. Letzteres wurde bisher nur für NFATp gezeigt [Ranger *et al.*, 1998a; Rengarajan *et al.*, 2000; Youn *et al.*, 2000]. Deshalb sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit der Einfluss von NFATp sowie der zwei NFATc-Isoformen A und C auf den AICD von T-Lymphozyten untersucht werden.

3.4.1. Während des AICD primärer CD4⁺ T-Helferzellen kommt es zu einer veränderten endogenen Expression der NFATc-Isoformen und der HPK1

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit dem OVA-Peptid aktiviert. Durch Zugabe der entsprechenden Zytokine und Ak (s. 2.15.5.4.3.) während der Aktivierung und anschließenden 5-tägigen Expansion differenzierten die T-Zellen *in vitro* zu den T-Helferzell-Subpopulationen T_{H0}, T_{H1} oder T_{H2}. Anschließend wurde ein Teil der Zellen auf α CD3 ϵ -beschichteten Gewebekulturschalen 3 h restimuliert und Ganzzellproteinextrakte isoliert. Aus den Westernblots der isolierten Gesamtproteinextrakte in Abbildung 3.22 geht hervor, dass nach Restimulation mit Ak gegen CD3 ϵ in den T_{H0}- und T_{H1}-Zellen die Expression von NFATc/A induziert wurde. NFATp wurde dagegen durch die Restimulation in den getesteten T-Helferzellen nicht induziert. Bemerkenswert ist die fehlende „Hochregulierung“ der NFATc/A-Isoform nach Restimulation der T_{H2}-Zellen, während die NFATp-Expression in diesen im Vergleich zu T_{H0}- und T_{H1}-Zellen erhöht war. Die NFATc/B-Expression wurde ebenfalls, allerdings schwächer als NFATc/A, in allen drei T-Helferzell-Subtypen durch α CD3 ϵ induziert. Die endogene HPK1-Expression wurde in den T_{H0}- und T_{H2}-Zellen nach Restimulation induziert, während die Expression der HPK1 in den unbehandelten T_{H1}-Zellen bereits erhöht war und durch Restimulation nicht weiter anstieg.

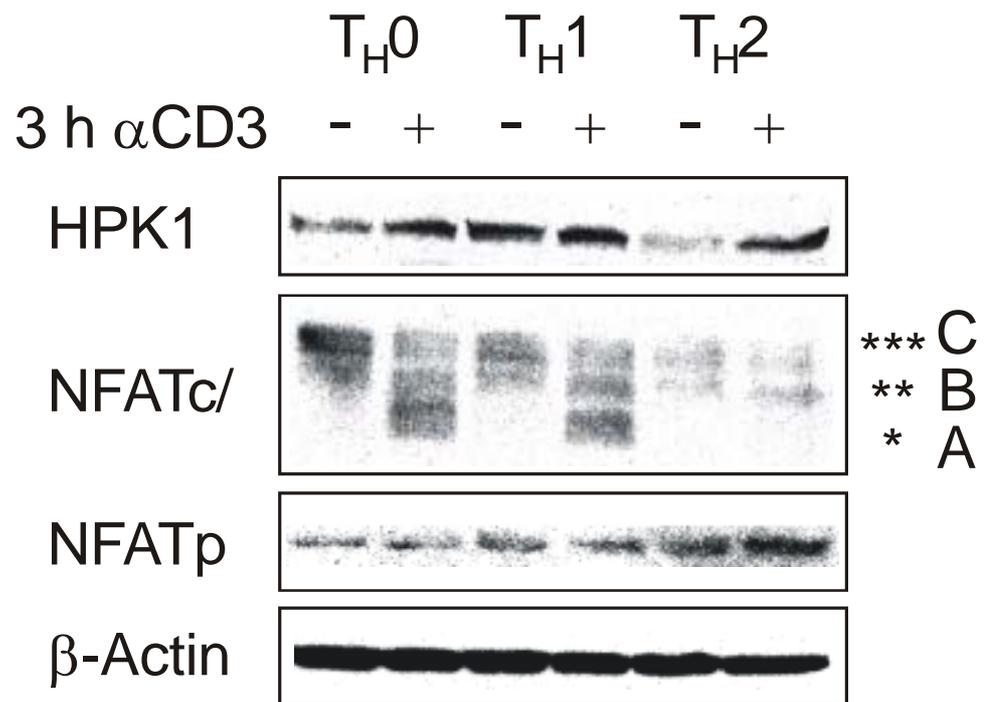


Abb. 3.22: Die CD3-vermittelte Restimulation primärer CD4⁺ T-Helferzellen führt im Gegensatz zu NFATp zu einer veränderten endogenen Expression von NFATc und HPK1.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden 24 h in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit dem OVA-Peptid (323-339) aktiviert. Durch Zugabe von Zytokinen und Antikörpern während der Aktivierung und anschließenden Expansion für weitere 5 d differenzierten die Zellen *in vitro* zu T_H0- (IL-2, anti IL-4, anti IFN γ), T_H1- (IL-2, IL-12, anti IL-4) oder T_H2- (IL-4, anti IFN γ) CD4⁺ T-Lymphozyten. 60 μ g der isolierten Gesamtproteinextrakte von unbehandelten (-) und von 3 h mit an Gewebekulturschale gebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimulierten Zellen (+) wurden in einem 10 %-igen SDS-PAA-Gel getrennt und nach dem Transfer auf eine NC-Membran mit spezifischen Ak gegen die angegebenen Proteine detektiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots von 3 unabhängigen Experimenten.

3.4.2. NFATp^{-/-} T-Zellen haben einen Defekt in der α CD3-vermittelten Apoptose

Bei NFATp-defizienten Mäusen [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1997] wurde eine 5-fache bis 6-fache Zunahme der absoluten Zellzahl in den peripheren lymphatischen Organen im Vergleich mit wildtypischen Mäusen beobachtet, die u.a. auf eine verminderte klonale Deletion der aktivierten T-Zellen zurückgeführt wurde. Deshalb sollte untersucht werden, ob das fehlende NFATp einen Effekt auf den α CD3-vermittelten AICD von CD4⁺ T-Lymphozyten hat.

Dazu wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten von wildtypischen Kontrollmäusen oder NFATp-defizienten Mäusen (NFATp^{-/-}) 5 d nach der primären Aktivierung durch α CD3 ϵ und α CD28 mit an die Gewebekulturschale gebundenen CD3 ϵ - oder CD95-spezifischen Antikörpern

restimuliert. Nach 6 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen mit Annexin V-PE gefärbt und der Anteil apoptotischer (Annexin V-positiver) Zellen im FACS bestimmt. Aus der Kinetik in Abbildung 3.23 ist ersichtlich, dass die NFATp-defizienten T-Lymphozyten einen gestörten, stark verzögerten α CD3-vermittelten AICD im Vergleich mit den Kontrollzellen aufweisen. Dagegen war die α CD95-vermittelte Apoptose in den NFATp^{-/-} T-Zellen nicht gestört.

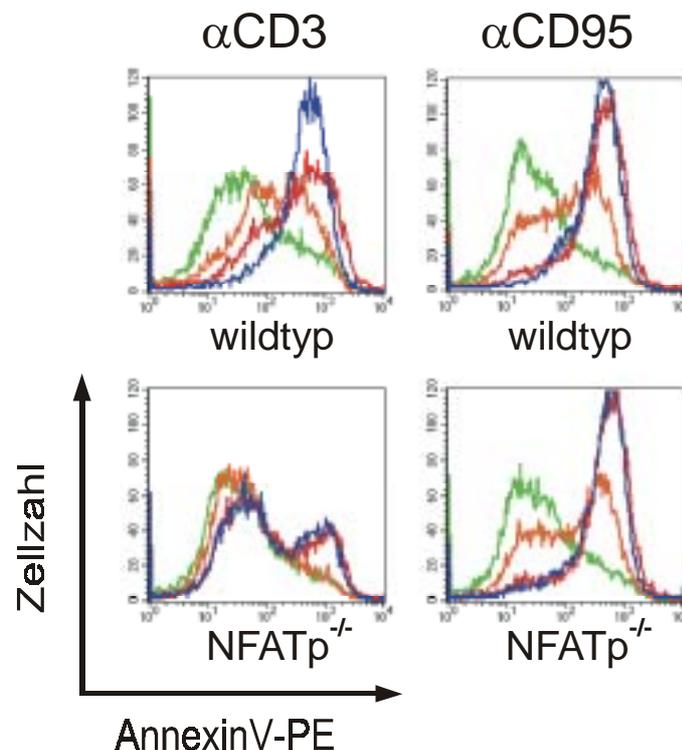


Abb. 3.23: NFATp defiziente T-Zellen zeigen einen gestörten α CD3-vermittelten AICD.

CD4⁺ T-Lymphozyten von Kontrollmäusen (wildtyp) oder NFATp-defizienten Mäusen (NFATp^{-/-}) wurden 5 d nach primärer Aktivierung durch α CD3 ϵ und α CD28 mit an die Gewebekulturschale gebundenen Ak gegen CD3 ϵ oder CD95 restimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Annexin V-PE gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen (AnnexinV-positiv) im FACS bestimmt. In den exemplarischen Histogrammen aus 3 unabhängigen Experimenten ist die AnnexinV-Färbung der Zellen nach 6 h (grün), 12 h (orange), 24 h (blau) sowie 48 h (rot) dargestellt. Im Vergleich mit den Kontrollzellen ist eine stark verzögerte Apoptose der NFATp^{-/-} T-Zellen nach α CD3-Restimulation ersichtlich, während die durch α CD95 vermittelte Apoptose ungestört ist.

3.4.3. NFATc/A übt im Gegensatz zu NFATp keinen proapoptotischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen aus

Aus der erhöhten endogenen NFATc/A-Expression in α CD3-restimulierten CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten (Abb. 3.22) und dem gestörten α CD3-vermittelten AICD in NFATp-defizienten T-Zellen (Abb. 3.23) wurde eine mit der T-Zellaktivierung und Apoptose assoziierte biologische Funktion dieser NFAT's angenommen. Um diese Hypothese zu überprüfen,

wurden naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit dem OVA-Peptid stimuliert und 24 h später mit Retroviren infiziert, die entweder ein Kontrollkonstrukt (EGZ-HA), humanes NFATc/A (hNFATc/A) oder murines NFATp (NFATp) exprimierten. Anschließend wurden die Zellen weitere 3 d expandiert, bevor ein Teil der Zellen auf α CD3 ϵ -beschichteten Gewebekulturschalen 8 h restimuliert wurde. Durch eine Markierung des während der Apoptose translokalisierten Phosphatidylserins mit Phycoerythrin (PE)-konjugiertem AnnexinV und der Auswertung in der zweiparametrischen Darstellung im FACS konnte der Anteil der apoptotischen (AnnexinV-PE-pos.), infizierten (EGFP-pos.) Zellen bestimmt werden. Die uninfizierten und die mit dem Leervektor infizierten Zellen dienen dabei jeweils als Kontrolle.

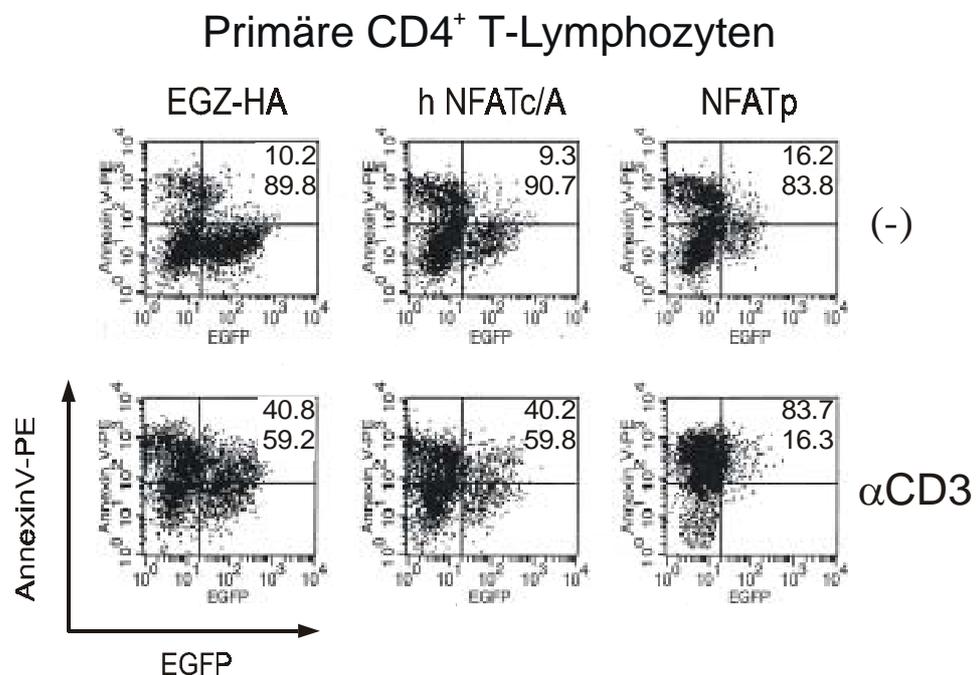


Abb. 3.24: NFATp fördert - im Gegensatz zu NFATc/A - den AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden 24 h in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit dem OVA-Peptid (323-339) stimuliert, mit den angegebenen retroviralen Konstrukten infiziert und weitere 3 d in IL-2 haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden unbehandelte (-) sowie 8 h mit an die Gewebekulturplatte gebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimulierte Zellen (α CD3) mit AnnexinV-PE gefärbt und im FACS der Anteil der apoptotischen Zellen (AnnexinV-positiv) bestimmt. Als interne Kontrolle dienen dabei die jeweiligen uninfizierten, EGFP-negativen Zellen. Abgebildet sind Dot Plots von einem repräsentativen Versuch 4 unabhängiger Experimente.

In Abbildung 3.24 sind repräsentative FACS-Daten aus einem von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Während die uninfizierten Zellen ohne und mit α CD3-Restimulation eine nahezu identische Apoptoserate aufwiesen, waren signifikante Unterschiede

zwischen den infizierten CD4⁺ T-Lymphozyten, in Abhängigkeit vom exprimierten Konstrukt zu erkennen. Während die retrovirale Überexpression des NFATc/A im Vergleich mit dem Kontrollkonstrukt weder einen fördernden noch hemmenden Einfluss auf die spontane Apoptose und den AICD der CD4⁺ T-Lymphozyten ausübte, führte die NFATp-Expression zu einer Steigerung der spontanen Apoptose auf 160 % sowie des α CD3-vermittelten AICD auf 200 % im Vergleich zu den mit Kontrollvektor infizierten T-Zellen. Somit fördert NFATp in Übereinstimmung mit den Daten, die mit NFATp^{-/-} T-Zellen erhalten wurden den AICD der CD4⁺ T-Lymphozyten, während NFATc/A keinen Einfluss auf die Apoptose dieser T-Zellen hat.

3.4.4. NFATc/C fördert wie NFATp die spontane und α CD3-vermittelte Apoptose von T-Lymphozyten

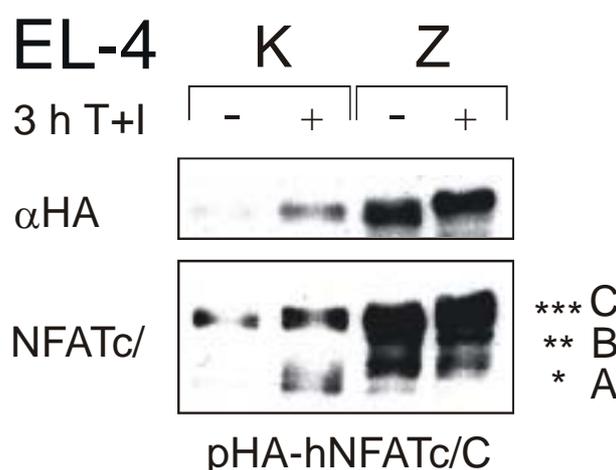


Abb. 3.25: Retroviral überexprimiertes NFATc/C wird in TPA/Ionomycin-stimulierten EL-4 T-Zellen in den Zellkern translokalisiert.

Mit humanem NFATc/C stabil transduzierte EL-4 T-Zellen wurden 3 h mit TPA und Ionomycin (T+I) stimuliert und anschließend Kernprotein- (K) sowie Zytoplasmaextrakte (Z) isoliert. Jeweils 15 μ g der Kernprotein- und 60 μ g der Zytoplasmaextrakte wurden im Westernblot mit spezifischen Ak gegen das HA-Tag und - nach dem „Strippen“ der Membran - mit Ak gegen NFATc detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot 3-er unabhängiger Experimente mit transduzierten Zelllinien.

Die Isoform C von NFATc unterscheidet sich vom kürzeren NFATc/A durch ein wesentlich längeres C-terminales Peptid. Diese beiden Isoformen von NFATc wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Apoptose verglichen. Dazu wurden retrovirale Vektoren konstruiert, die HA-markierte humane NFATc-Proteine exprimieren. Um die Funktionalität der retroviral exprimierten NFAT-Proteine zu überprüfen, wurden EL-4 T-Zellen stabil mit den Retroviren transduziert. Diese wurden 3 h mit TPA/Ionomycin (T/I) stimuliert und anschlie-

ßend Kern- und Zytoplasmaextrakte isoliert. Durch die Stimulation mit T/I wird der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht und die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Letztere dephosphoryliert das zytoplasmatische NFAT, das dann in den Zellkern wandert und dort die Transkription der Zielgene beeinflusst. Im Westernblot in Abbildung 3.25 erkennt man die Translokation des überexprimierten NFATc/C nach Stimulation mit T/I in den Zellkern (α HA, Spur K/+). Mit Ak gegen NFATc konnte zudem die Translokation des endogenen NFATc/A detektiert werden, was als Nachweis der T/I Stimulation diene.

Tab. 3.3: NFATc/C fördert wie NFATp die Apoptose von Effektor T-Zellen.

Nach 24 h-iger Stimulation mit dem OVA-Peptid wurden primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen mit den aufgelisteten retroviralen NFAT-Konstrukten bzw. dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) infiziert oder uninfiziert belassen (-) und weitere 3 d in IL-2-haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden unbehandelte (**keine Restimulation**) sowie 8 h mit Platten-gebundenen Ak gegen CD3 ϵ restimierte Zellen (**8 h α CD3**) mit AnnexinV-PE gefärbt, und im FACS wurde der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (AnnexinV-positiv) bestimmt. Zusammengefasst sind die Daten aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten.

CD4 ⁺ T-Zellen der DO11.10 TZR tg Mäuse, 3 d nach Infektion		
apoptotische Zellen [% AnnexinV pos.]		
infiziert mit	keine Restimulation	8 h α CD3
—	10,3 \pm 0,7	40,9 \pm 0,8
pEGZ-HA	10,9 \pm 0,9	41,5 \pm 1,3
pHA-hNFATc/A	10,1 \pm 0,3	39,9 \pm 1,1
pHA-hNFATc/C	14,9 \pm 1,0	69,1 \pm 5,6
pHA-NFATp	15,6 \pm 0,5	78,2 \pm 4,2

Um den Effekt der verschiedenen NFAT's auf den AICD zu untersuchen, wurden primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen (s. 3.4.3. und Abb. 3.24) mit dem OVA-Peptid aktiviert, den retroviralen Konstrukten infiziert und nach 3 d Expansion 8 h mit α CD3 ϵ stimuliert. Anschließend wurde die Apoptoserate nach AnnexinV-PE-Färbung im FACS bestimmt. Die Daten aus vier unabhängigen Infektionen sind in Tabelle 3 zusammen-

gefasst. Dabei gab es keinen Unterschied in der spontanen und α CD3-vermittelten Apoptose zwischen den uninfizierten Zellen (-), den mit Kontrollkonstrukt infizierten Zellen (pEGZ-HA) sowie den NFATc/A-exprimierenden Zellen. Die Überexpression von NFATp und NFATc/C dagegen führte zu einer Steigerung der spontanen Apoptose auf 160 % bzw. 150 %, während der durch α CD3 vermittelte AICD im Vergleich mit den Kontrollzellen 200 % bzw. 175 % betrug.

Aus dem Westernblot der Gesamtproteinextrakte primärer Zellen, der mit α HA-spezifischen Ak's entwickelt wurde (Abbildung 3.26), geht hervor, dass alle rekombinanten NFAT-Proteine in $CD4^+$ T-Lymphozyten exprimiert wurden. Außerdem ist zu erkennen, dass eine 3 h-ige Restimulation mit an die Gewebekulturschale gebundenen Ak gegen CD3 ϵ zu einer Erhöhung der intrazellulären, HA-markierten NFATc-Proteine führt.

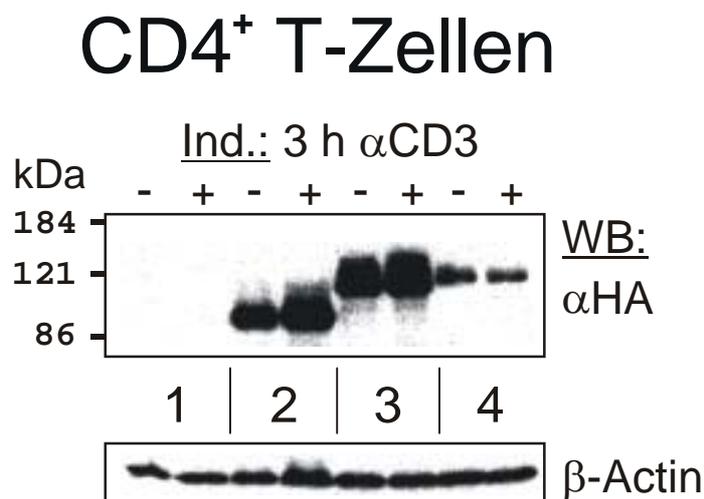


Abb. 3.26: Expression retroviraler NFAT-Konstrukte nach Infektion von $CD4^+$ T-Zellen.

Primäre $CD4^+$ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden nach Aktivierung mit dem OVA-Peptid und Infektion mit einem Kontrollvektor (pEGZ-HA) oder NFAT-exprimierenden Plasmiden 3 d in IL-2-haltigem Medium expandiert. Anschließend wurden Ganzzellproteinextrakte von unbehandelten (-) und von mit Platten-gebundenem α CD3 ϵ 3 h restimulierten (+) Lymphozyten isoliert. Im FACS wurde zudem der Anteil der infizierten Zellen (EGFP-pos.) bestimmt, und die Proben wurden untereinander mit Proteinextrakten uninfizierter $CD4^+$ T-Lymphozyten auf den gleichen Protein-Gehalt und gleichen Anteil infizierter Zellen abgeglichen. Im Westernblot wurde die Expression der retroviral exprimierten Proteine mit mAk gegen das HA-Tag detektiert (oberer Blot), während β -Actin (unterer Blot) als Ladekontrolle diente. In den Spuren sind die Extrakte von mit folgenden Konstrukten infizierten $CD4^+$ T-Zellen aufgetragen: (1) pEGZ-HA; (2) pHA-hNFATc/A; (3) pHA-hNFATc/C; (4) pHA-NFATp. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

Somit lassen die erzielten Ergebnisse den Schluss zu, dass sowohl NFATp als auch NFATc/C im Gegensatz zu NFATc/A die Apoptose und den α CD3-vermittelten AICD peripherer CD4⁺ T-Lymphozyten fördern. NFATc/A übt dagegen keine pro-apoptotische Wirkung aus, obwohl es in unseren Experimenten gleich oder stärker als NFATc/C bzw. NFATp exprimiert wurde.

Teile der Ergebnisse meiner Doktorarbeit sind in zwei Manuskripte eingeflossen, die beide zur Publikation angenommen wurden und im Druck sind. Die experimentellen Daten über die HPK1 werden in der Publikation „Hematopoietic Progenitor Kinase 1 supports Apoptosis of T Lymphocytes“ in Blood im August 2002 dargestellt. Resultate zu den NFAT-Faktoren erscheinen in der Juni-Ausgabe 2002 von Immunity unter dem Titel „Autoregulation of NFATc1/A Expression Facilitates Effector T Cells to Escape from Rapid Apoptosis“.

4. Diskussion

Die Hämatopoetische Progenitor Kinase (HPK) 1, ein Mitglied der Familie der „Germinal centre“ Kinasen (GCK's), wurde als ein Regulator der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und des NFκB-Signalweges beschrieben [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1999]. Folgende Aspekte lassen eine wichtige physiologische Rolle dieses Ste20-Homologs in T-Zellen vermuten: (1.) Obwohl die HPK1 während der Embryogenese in verschiedenen Geweben exprimiert wird, ist ihr Vorkommen im erwachsenen Organismus auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt [Kiefer *et al.*, 1996]. (2.) Während der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen wird die HPK1-Expression signifikant verringert, was auf einen strikten, entwicklungsbedingten Kontrollmechanismus schließen lässt. (3.) Außerdem wurde nachgewiesen, dass die HPK1-Kinase-Aktivität nach T- und B-Zell-Rezeptorstimulation induziert wird [Liou *et al.*, 2000; Tsuji *et al.*, 2001]. Es scheint also, dass die HPK1 eine Funktion in der Immunrezeptor-Signalübertragung ausüben könnte.

4.1. *Die HPK1 unterstützt die Apoptose primärer CD4⁺ T-Lymphozyten durch verstärkte FasL-Expression*

Die Beobachtung, dass zum Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) führende T-Zell-Rezeptor (TZR)/CD3-Stimulation von Jurkat T-Zellen die HPK1 aktiviert, während CD28-Stimulation, die ein Überlebens- und Proliferationssignal für T-Zellen darstellt, keinen Effekt auf die HPK1-Kinase-Aktivität zeigt [Liou *et al.*, 2000], veranlasste uns, die Rolle der HPK1 bei der T-Zell-Apoptose zu untersuchen.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden in Gegenwart von teilungsinaktivierten dendritischen Zellen (DZ's) mit dem OVA-Peptid stimuliert und anschließend für weitere 4 d expandiert, bevor der AICD durch Restimulation mit αCD3ε-spezifischen Ak induziert wurde. In Übereinstimmung mit publizierten Daten [Su *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1998; Rincon *et al.*, 2000] kam es nach 3 h-iger Induktion zu einer erhöhten JNK1-Phosphorylierung, während die JNK1-Proteinexpression unbeeinflusst blieb (Abb. 3.1 B). Gleichzeitig kam es zu einer um den Faktor 3 erhöhten Expression der endogenen HPK1 (Abb. 3.1 A), die bereits früher als ein Aktivator des JNK-Signalweges beschrieben wurde [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996]. Zusammen mit der beobachteten transienten HPK1-Aktivierung nach TZR-Stimulation [Liou *et al.*, 2000] war dies ein weiterer Hinweis auf eine physiologische Rolle der HPK1 in der T-Zell-Apoptose.

Zur Analyse der biologischen Funktion der HPK1 im AICD wurden zunächst retrovirale HPK1-Expressionsvektoren konstruiert (Abb. 3.2), um verschiedene HPK1-Proteine, -Peptide sowie eine „antisense“ (AS)-RNA in primären T-Zellen sowie Zelllinien zu exprimieren. Im Vergleich mit Kontrollzellen war es so möglich, die Auswirkungen der HPK1-Überexpression auf unterschiedliche Signalwege in primären Lymphozyten zu untersuchen.

In einem *in vitro* Kinase-Assay mit Ganzzellproteinextrakten transfizierter 293T-Zellen und GST-cJun₅₋₈₉ als exogenem Substrat konnte gezeigt werden, dass die retroviral exprimierte wildtypische (wt) HPK1 konstitutiv aktiv ist, während die Kinase-inaktive HPK1 (HPK1 M46) keine Kinase-Aktivität zeigte. Da die konstitutive Kinase-Aktivität die Untersuchung der HPK1-vermittelten Signaltransduktionswege erschwert, wurde versucht, die Aktivität der rekombinanten HPK1 durch die Konstruktion als Fusionsprotein mit einer modifizierten Hormonbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ERTM) zu kontrollieren. Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, konnte die Kinase-Aktivität weder durch eine N- noch eine C-terminale Fusion mit dem ERTM-Fragment reguliert werden. Bemerkenswert ist der Expressionsverlust der HPK1-Fusionsproteine mit N- und C-terminalen ERTM-Fragmenten in stabil transduzierten EL-4 Zelllinien (Abb. 3.4 B). Dieser ist wahrscheinlich auf „Splice“-Vorgänge nach der Integration zurückzuführen. Die Zellen exprimieren weiterhin das über die IRES koordiniert exprimierte Grünfluoreszenzprotein (EGFP). In einem hier nicht dargestellten Experiment konnten in 293T-Zellen transfizierte Flag- und HA-markierte HPK1-Proteine koprizipitiert werden. Dies spricht für das von F. Kiefer vorgeschlagene Modell der HPK1-Aktivierung nach TZR-Stimulation (Abb. 1.4) [Liou *et al.*, 2000]. So ist durch die Auto-phosphorylierung entscheidender Serin- und Threoninreste in der Aktivierungsschleife der HPK1-Kinasedomäne von in trans benachbarten HPK1-Molekülen auch die HPK1-Phosphorylierung im *in vitro* Kinase-Assay erklärbar (Abb. 3.4 C). Gleichmaßen erklärt das vorgestellte Modell auch die konstitutiv hohe Aktivität bei Überexpression von HPK1. Durch den in diesem Fall vorliegenden hohen HPK1-Proteinspiegel könnte eine Auto-Phosphorylierung von HPK1 unabhängig von einer Rekrutierung durch Adaptorproteine zur Plasmamembran stattfinden.

Die HPK1 fördert die spontane und unterstützt die α CD3-vermittelte Apoptose primärer CD4⁺ T-Lymphozyten. Dies wurde durch retrovirale Infektion in T-Zellen von DO 11.10 tg Mäusen nach 24 h-iger primärer Stimulation mit OVA-Peptid und DZ's, anschließender 4-tägiger Expansion in IL-2 haltigem Medium und Restimulation mit Platten-gebundenen Ak gegen CD3 im FACS nach Färbung mit AnnexinV-PE nachgewiesen (Abb. 3.5). Dabei be-

wirkte bereits die Infektion mit dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) einen Anstieg der spontanen Apoptose im Vergleich mit uninfizierten Zellen. Dies ist wahrscheinlich auf allgemeinen Stress oder aber auf einen in der Literatur beschriebenen toxischen Effekt des Grünfluoreszenzproteins zurückzuführen [Liu *et al.*, 1999a]. Neben der wt HPK1 förderte auch eine Kinase-inaktive Version der HPK1, HPK1 M46, die T-Zell-Apoptose. Dies spricht dafür, dass zusätzlich zur Kinase-Aktivität auch andere, über die Prolin-reichen Motive und Adaptorproteine vermittelte Signalwege für den pro-apoptotischen Effekt der HPK1 verantwortlich sind [Liou *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Die hohe spontane Apoptoserate in den HPK1-infizierten primären T-Zellen ist auf die Überexpression und damit verbundene konstitutive Aktivität zurückzuführen. Da der hohe Anteil spontan-apoptotischer Zellen die Aussagen über den α CD3-vermittelten AICD beeinträchtigen, wurde in weiteren Experimenten die Expansionszeit auf 3 d reduziert.

In der Literatur wurde die Existenz der Caspase-Spaltsequenz DDVD zwischen den Aminosäuren 382-385 der HPK1 beschrieben [Chen *et al.*, 1999]. Zudem wurde nachgewiesen, dass die HPK1 durch die Caspase 3 in ein N-terminales Peptid mit funktioneller Kinase-Domäne und ein C-terminales Peptid gespalten werden kann [Chen *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001]. Um den beobachteten pro-apoptotischen Effekt der HPK1 auf bestimmte Regionen und Funktionen eingrenzen zu können, wurden deshalb retrovirale Konstrukte mit den N- und C-terminalen HPK1-Peptiden kloniert (Abb. 3.6). Beide HPK1-Peptide förderten wie das Gesamtprotein sowohl die spontane als auch die α CD3-vermittelte Apoptose in retroviral infizierten primären CD4⁺ T-Lymphozyten (Tab. 3.1). Daraus folgte, dass neben der Kinase-Aktivität andere, vom C-Terminus der HPK1 ausgehende und wahrscheinlich über Adaptoren vermittelte Signalübertragungswege für die Regulation des apoptotischen Zelltodes mitverantwortlich sind.

Außerdem sollte die Unterdrückung der HPK1-Expression durch eine „antisense“ (AS)-RNA weitere Rückschlüsse auf die biologische Rolle der HPK1 bei der T-Zell-Apoptose ermöglichen. Das AS-Konstrukt erlaubt jedoch nur die Inhibierung der HPK1-Neusynthese durch Blockierung der Translation. In transienten Kotransfektionen von 293T-Zellen war eine klare Inhibierung der HPK1-Expression durch die gegen humane HPK1 gerichtete AS-RNA zu beobachten (Abb. 3.7), woraus folgte, dass das AS-Konstrukt funktionell ist. Trotzdem konnte die spontane und α CD3-vermittelte Apoptose in retroviral infizierten primären murinen CD4⁺ T-Lymphozyten nur schwach mit der HPK1-AS-RNA unterdrückt werden (Tab. 3.1). Gründe hierfür könnten redundante Funktionen durch andere Mitglieder der

Familie der GCK's [Kyriakis, 1999], die mögliche Langlebigkeit des vorhandenen HPK1-Proteins, aber auch eine unvollständige Blockierung der endogenen murinen HPK1 durch das gegen die humane HPK1 gerichtete AS-Konstrukt sein. Letzteres ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die humane und murine HPK1 einen hohen Grad von Sequenzhomologie aufweisen.

Der CD95-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Apoptose von Immunzellen. Während der CD95-Rezeptor fast auf allen Zellen exprimiert wird, muss die komplex regulierte Expression des CD95L (auch FasL) induziert werden [Krammer, 2000; Zhang *et al.*, 2000]. Der AICD wird durch wiederholte TZR-Stimulation hervorgerufen und ist abhängig von der Interaktion des CD95 mit seinem Liganden, CD95L [Dhein *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 2000]. Deshalb sollte der Einfluss der HPK1 auf die FasL-Expression von T-Zellen untersucht werden. Dazu wurde eine FACS-Färbung des exprimierten CD95L infizierter und 3 h α CD3-restimulierter CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen durchgeführt. Aus den Daten, die in Abbildung 3.8 gezeigt werden, geht hervor, dass die Überexpression der wt HPK1 in primären T-Lymphozyten zu einer im Vergleich mit Kontrollvektor-infizierten Zellen gesteigerten FasL-Expression führt. Allerdings wurde auch durch die Kinase-inaktive HPK1 die CD95L-Expression erhöht. Die HPK1-AS-RNA inhibiert im Vergleich zum Kontrollvektor pEGZ-HA nur geringfügig die FasL-Expression. Es besteht somit eine gewisse Korrelation zwischen dem Anteil apoptotischer Zellen und der FasL-Expression [Suda *et al.*, 1995]. Die gesteigerte FasL-Expression auf T-Lymphozyten durch HPK1 ist deshalb ein Signaltransduktionsweg, der beim HPK1-vermittelten AICD eine Rolle spielt.

Der genaue Mechanismus der transkriptionalen Kontrolle des FasL-Promoters über HPK1-vermittelte Signalübertragungswege ist bisher kaum bekannt. Ein möglicher Weg nach Stress-induzierenden Signalen könnte über die relativ Cyclosporin A (CsA)-unabhängigen Transkriptionsfaktoren AP-1, NF κ B und einem MEKK1-regulierten Faktor zur Expression des FasL führen [Faris *et al.*, 1998; Kasibhatla *et al.*, 1999; Kuhnel *et al.*, 2000]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die HPK1 sowohl die AP-1-vermittelte IL-2 Transkription beeinflusst als auch den NF κ B-Signalweg aktiviert [Hu *et al.*, 1996; Liou *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001]. Weitere wichtige CsA-abhängige Transkriptionsfaktoren, die als Hauptregulatoren der FasL-Expression diskutiert werden, sind die NFAT's [Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 2000; Rengarajan *et al.*, 2000]. Durch Kotransfektionen und Reporter-gen-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die HPK1 in T-Zellen nach Bindung mit SLP-76 die AP-1/ NFAT-vermittelte Transkription inhi-

biert [Sauer *et al.*, 2001], während sie in Verbindung mit dem Adaptorprotein Clnk die AP-1/ NFAT-vermittelte Transkription fördert [Yu *et al.*, 2001]. Somit kann es - in Abhängigkeit vom Zelltyp, dem Stimulus und den Kulturbedingungen - durch verschiedene Adaptorproteine zu unterschiedlichen HPK1-vermittelten Zellantworten kommen. Die Aufklärung des genauen Mechanismus der HPK1-NFAT-Interaktion wird sicherlich zum weiteren Verständnis der T-Zell-Physiologie beitragen. Interessant war auch, dass der HPK1-vermittelte AICD nur teilweise durch CsA unterdrückt werden konnte (unpubl. Daten, die hier nicht dargestellt wurden).

4.2. Die HPK1 verstärkt die ROS-vermittelte Apoptose durch erhöhte JNK-Aktivierung und Inhibierung des NF κ B-Signalweges

Um die molekularen Mechanismen des durch die HPK1 geförderten programmierten Zelltodes und die daran beteiligten Signaltransduktionskaskaden an einem Modellsystem untersuchen zu können, wurden EL-4 Thymoma-Zellen mit verschiedenen retroviralen HPK1-Expressionsvektoren stabil transduziert (Abb. 3.2). Außerdem können zahlreiche Experimente wie z.B. DNA-Transfektionen und Reportergen-Analysen nicht mit primären Zellen durchgeführt werden. Allerdings kam es nur zu einer geringen spontanen Apoptose durch die HPK1-Überexpression in EL-4 T-Zellen (Abb. 3.10, Tab. 3.2). Da in EL-4 T-Zellen selbst nach Serumdepletion keine Apoptose durch α CD3 induziert werden konnte, wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Zelltod-auslösendes Agens verwendet. Durch H_2O_2 wird die intrazelluläre Konzentration der freien reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) erhöht, die wichtige Mediatoren der T-Zell-Apoptose sind [Williams und Henkart, 1996; Kamata und Hirata, 1999]. Außerdem werden durch H_2O_2 Signaltransduktionswege beeinflusst, die auch bei T-Zell-Rezeptor (TZR)-Aktivierung induziert werden [Griffith *et al.*, 1998; Hildeman *et al.*, 1999]. In der Literatur wird eine wichtige Rolle der ROS als Signalüberträgermoleküle in verschiedenen physiologischen Signalwegen beschrieben [Hildeman *et al.*, 1999; Kamata und Hirata, 1999; Tatla *et al.*, 1999; Devadas *et al.*, 2002]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass EL-4 T-Zellen durch die konstitutive Expression des Caspase 8-Inhibitors c-FLIP_L resistent gegen den FasL-induzierten Zelltod sind [Kataoka *et al.*, 2002]. Nach Behandlung der EL-4 T-Zellen mit DNA-schädigenden Substanzen wie z.B. Doxorubicin oder Mitomycin C wird die Fas-Expression erhöht, und die Zellen werden sensitiv für die FasL-induzierte Apoptose [Kataoka *et al.*, 2002]. Dies erklärt, warum durch eine α CD3-Stimulation keine Apoptose in EL-4 T-Zellen induziert werden konnte, da diese von der Interaktion des CD95 mit seinem Liganden abhängig ist.

In Vorversuchen mit EL-4 T-Zellen wurden unterschiedliche H₂O₂-Konzentrationen auf ihren Apoptose-induzierenden Effekt nach 6 h-iger Inkubation der Zellen getestet, um den Anteil nekrotischer Zellen auf ein Minimum zu reduzieren. Eine Konzentration von 1,0 mM H₂O₂ erwies sich dabei als optimal. Diese - im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Konzentrationen von 100-500 µM - höhere Menge, lässt sich durch die Zelltyp-spezifische Sensitivität sowie durch die im Medium als Antioxidantien wirkenden Serum- und β-Mercaptoethanol-Konzentrationen erklären [Griffith *et al.*, 1998; Lee und Esselman, 2001].

Durch H₂O₂-Stimulation der EL-4 T-Zellen kam es zu einer schnellen Steigerung der endogenen HPK1-Expression (nach 90 min) und Spaltung dieser Kinase (Abb. 3.9). Dies lässt eine Rolle der HPK1 in der ROS-vermittelten Apoptose vermuten. Da durch H₂O₂ die Caspase 3 aktiviert wird [Dumont *et al.*, 1999], ist es sehr wahrscheinlich, dass die HPK1 durch diese Caspase am beschriebenen DDVD-Motiv (aa 381-385) gespalten wird [Chen *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001].

In HPK1-transduzierten EL-4 T-Zellen verstärkte sowohl die wt HPK1 als auch in geringem Maß die Kinase-inaktive HPK1 die ROS-vermittelte Apoptose nach H₂O₂-Stimulation (Abb. 3.10). Um auszuschließen, dass dieser Apoptose-verstärkende Effekt durch die HPK1 auf EL-4 T-Zellen beschränkt ist, wurden U-937-Zellen mit HPK1 transduziert. Auch in diesen Zellen förderte die HPK1 den ROS-vermittelten programmierten Zelltod (Abb. 3.11). Ähnlich den gewonnenen Ergebnissen des HPK1-verstärkten AICD αCD3-stimulierter primärer CD4⁺ T-Lymphozyten (Tab. 3.1) förderten sowohl N- als auch C-terminale HPK1-Peptide die ROS-vermittelte Apoptose transduzierter EL-4 T-Zellen (Tab. 3.2). Dabei war der Apoptose-fördernde Effekt des die Kinase-Domäne enthaltenden N-terminalen HPK1-Peptids stärker als der des C-terminalen Peptids. Durch Transduktion mit der HPK1-AS-RNA konnte die endogene HPK1-Expression in EL-4 T-Zellen zwar nicht vollständig aber doch größtenteils gehemmt werden (Abb. 3.12). Dadurch wurde auch die H₂O₂-induzierte Apoptose deutlich und im Vergleich mit den primären Zellen (Tab. 3.1) stärker inhibiert (Abb. 3.13). Aus den durch die Überexpression und Hemmung der HPK1-Expression erzielten Ergebnissen kann auf eine regulative, verstärkende Rolle der HPK1 bei der ROS-vermittelten Apoptose geschlossen werden. Dieser proapoptische Effekt ist jedoch nicht nur durch die Kinase-Aktivität bedingt, da sowohl N- als auch C-terminale HPK1-Peptide an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt sind.

Um Zielgene der HPK1 zu identifizieren, die beim ROS-vermittelten Zelltod eine Rolle spielen könnten, wurde die RNA von mit HPK1-Konstrukten stabil transduzierten, H₂O₂-

induzierten EL-4 Zellen isoliert und die Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Proteine mit Hilfe der RNA-Protektions-Analyse quantitativ bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied in den mRNA-Konzentrationen verschiedener Caspasen zwischen den Kontrollvektor-transduzierten und den mit wt oder Kinase-inaktiver HPK1 transduzierten EL-4 Zellen detektiert werden (Abb. 3.14). Ein genereller, durch fortschreitende Apoptose bedingter reduzierter RNA-Gehalt wurde nach 6 h-iger Inkubation mit 1,0 mM H₂O₂ beobachtet [Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Green, 2000; Strasser *et al.*, 2000]. Unter den experimentellen Bedingungen wurde desweiteren kein Unterschied der mRNA-Konzentrationen von bcl-2, bcl-x, CD95 sowie des CD95L zwischen den transduzierten Zelllinien festgestellt. Somit darf man schlussfolgern, dass die pro-apoptotische HPK1-Wirkung auf den ROS-induzierten Zelltod unter diesen Bedingungen nicht auf die „Hochregulierung“ Apoptose-fördernder Gene oder eine Hemmung der Expression bekannter anti-apoptotischer Gene zurückzuführen ist. Allerdings könnten andere Apoptose-aktivierende Signaltransduktionswege verstärkt sein wie z.B. die Spaltung und damit Aktivierung von Caspasen [Budihardjo *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 1999]. Auch könnte die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie des Tumorsuppressor-Gens p53 für die HPK1-verstärkte, ROS-vermittelte Apoptose von Bedeutung sein [Huang *et al.*, 2000]. In Jurkat T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression der CD95L-mRNA abhängig von der H₂O₂-Konzentration induziert wird [Bauer *et al.*, 1998]. So könnte es sein, dass die von uns eingesetzte H₂O₂-Konzentration suboptimal für den Nachweis des Einflusses der HPK1 auf die mRNA-Expression Apoptose-relevanter Gene war. Mit der Etablierung der cDNA-Mikroarray-Technik in unserem Labor und nachfolgender Untersuchung der RNA-Expression infizierter, α CD3-stimulierter CD4⁺ T-Lymphozyten erhoffen wir uns weiterführende Erkenntnisse über die von der HPK1 beeinflussten Gene während des AICD.

Aus der Literatur war bekannt, dass die HPK1 nach α CD3-Stimulation aktiviert wird [Liou *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2001]. Ein frühes Ereignis nach der T-Zell Aktivierung ist die Protein-Tyrosinphosphorylierung [Musci *et al.*, 1997; van Leeuwen und Samelson, 1999; Kane *et al.*, 2000; Zhang und Samelson, 2000]. Deshalb sollte untersucht werden, ob auch nach H₂O₂-Stimulation eine Protein-Tyrosinphosphorylierung induziert wird und ob die HPK1 diese Phosphorylierung beeinflusst. Aus Abbildung 3.15 ist ersichtlich, dass die H₂O₂-Stimulation der mit dem Kontrollvektor (pEGZ-HA) transduzierten EL-4 T-Zellen zu einer Inhibierung der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen führt, die größer als 50 kDa sind. Dagegen bleibt in diesen Zellen die Tyrosinphosphorylierung der Proteine unter 50 kDa von der Induktion

mit H₂O₂ unbeeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen der Protein-Tyrosinphosphorylierung in H₂O₂-stimulierten Jurkat T-Zellen [Griffith *et al.*, 1998], in denen es durch H₂O₂ zu einer generellen Verstärkung der Tyrosinphosphorylierung kam. Die Überexpression der wildtypischen HPK1 (pHA-HPK1 wt) führt nach H₂O₂-Stimulation zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine. Während die HPK1 in diesen transduzierten Zellen zu einer starken und anhaltenden konstitutiven Phosphorylierung der Proteine zwischen 12-30 kDa führt, kommt es durch H₂O₂ auch zu einer Induktion der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen, die größer als 45 kDa sind. Die Überexpression einer Kinase-inaktiven HPK1 (pHA-HPK1 M(46)) hat dagegen einen deutlich geringeren, wenn auch signifikant positiven Einfluss auf die Protein-Tyrosinphosphorylierung nach H₂O₂-Stimulation. Die HPK1 fördert also die Protein-Tyrosinphosphorylierung in H₂O₂-induzierten EL-4 T-Zellen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Tyrosinphosphorylierung der HPK1 durch ZAP-70 und Lck nach TZR-Stimulation einen wichtigen Schritt zur vollen Aktivierung der HPK1 darstellt [Liu *et al.*, 2000a; Ling *et al.*, 2001]. Die HPK1 ist dabei durch - über die Prolin-reichen Motive vermittelte - Bindung an die Adaptoren Gads/Grp2, SLP-76 und LAT in einem Multi-Protein-Komplex der Lipid-Rafts lokalisiert [Sauer *et al.*, 2001]. Nach genotoxischem Stress (ionisierende Strahlung) konnte in Jurkat T-Zellen eine zytoplasmatische Interaktion von HPK1 mit der Protein-Tyrosinkinase c-Abl beobachtet werden, die zur Aktivierung der HPK1 führt [Ito *et al.*, 2001]. Eine Aktivierung von c-Abl wurde auch nach oxidativem Stress beschrieben [Sun *et al.*, 2000a], und c-Abl wirkt in der Zelle durch die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) pro-apoptotisch [Kharbanda *et al.*, 1995; Kharbanda *et al.*, 1996; Kharbanda *et al.*, 1998]. Somit könnte die Interaktion der HPK1 mit c-Abl in EL-4 T-Zellen nach H₂O₂-Stimulation ein Signalweg sein, der zur Verstärkung der Apoptose in diesen Zellen durch die HPK1-Überexpression führt.

Da die HPK1 als ein Aktivator der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) JNK beschrieben wurde [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Ensenat *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001] und die Aktivierung von JNK den apoptotischen Zelltod fördern kann [Behrens *et al.*, 2001; Sabapathy *et al.*, 2001], wurde der Einfluss der HPK1 während der H₂O₂-vermittelten Apoptose in EL-4 T-Zellen auf die Aktivierung der MAPK's hin untersucht. Dazu wurden mit HPK1-Konstrukten retroviral stabil transduzierte EL-4 T-Zellen mit H₂O₂ induziert und die nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0-120 min) isolierten Ganzzellextrakte im Westernblot mit Phospho-spezifischen Ak gegen JNK1, p38 und ERK1/ERK2 detektiert (Abb. 3.16). Wie in der Literatur beschrieben, führte die H₂O₂-Stimulation zur Aktivierung aller drei unter-

suchten MAPK's [Wang *et al.*, 1998; Adler *et al.*, 1999]. Durch Überexpression der wt HPK1 kam es zu einer verstärkten, langanhaltenden JNK1-Phosphorylierung nach H₂O₂-Behandlung. Dies war erwartet worden und stimmt mit publizierten Daten überein, in denen eine starke JNK-Aktivierung durch die HPK1-Kinase-Aktivität nachgewiesen wurde [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Ensenat *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Hehner *et al.*, 2000a]. Jedoch bewirkte auch die Kinase-inaktive HPK1 einen Anstieg der JNK-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Ursache hierfür könnte in der Assoziation von endogener, aktiver HPK1 mit der Kinase-inaktiven Form und daraus resultierender Aktivierung der HPK1-vermittelten Signalwege liegen. Oder aber ein Teil der HPK1-vermittelten JNK-Aktivierung erfolgt über die Adaptorprotein-Funktion der Prolinreichen Motive, die in der mutierten HPK1 intakt sind. In der Literatur werden als direkte Zielmoleküle der HPK1 die MLK3 und MEKK1 beschrieben, die über SEK1 die JNK aktivieren [Tibbles *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Leung und Lassam, 2001]. Im Vergleich mit der langanhaltenden, verstärkten JNK1-Phosphorylierung in HPK1-exprimierenden EL-4 T-Zellen kam es nur zu einer moderaten Verstärkung der ERK1/ERK2 und p38 MAPK-Aktivität nach H₂O₂-Stimulation. Außerdem wurde ERK1/ERK2 stärker in den Zellen phosphoryliert, die die Kinase-inaktive HPK1 exprimierten. Dies deutet darauf hin, dass für die Aktivitätssteigerung dieser MAPK's hauptsächlich die Adaptorprotein-Funktion der HPK1 verantwortlich ist. Die Proteinkonzentrationen der MAPK's wurden durch die HPK1-Expression sowie eine HPK1-AS-RNA nicht beeinflusst, und das HPK1-AS-Konstrukt hemmte die Phosphorylierung aller drei untersuchten MAPK's. Daraus folgt, dass die HPK1-Überexpression in EL-4 T-Zellen die H₂O₂-vermittelte Aktivierung der MAPK's JNK1, ERK1/ERK2 und p38 beeinflusst, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß und wahrscheinlich über verschiedene Signaltransduktionswege.

JNK1 und JNK2 sind als starke Apoptose-Induktoren in peripheren T-Zellen und Thymozyten bekannt [Sabapathy *et al.*, 1999; Behrens *et al.*, 2001; Sabapathy *et al.*, 2001]. So ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Hauptteil des pro-apoptotischen Effekts der HPK1 durch die verstärkte JNK-Aktivierung vermittelt wird. In primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF's), die defizient für JNK1 und JNK2 sind, konnte ein Defekt im mitochondrialen apoptotischen Zelltod beobachtet werden [Tournier *et al.*, 2000]. So könnte man vermuten, dass anti-apoptotische Moleküle, wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, die im intrinsischen Signalweg eine entscheidende Rolle spielen, Zielmoleküle der verstärkten JNK-Aktivität in EL-4 T-Zellen sind. In der Literatur wurde tatsächlich die Phosphorylierung und Inaktivierung dieser Moleküle durch JNK's *in vivo* beschrieben [Maundrell *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1999]. Wenn

auch kontrovers diskutiert, so scheinen die JNK's eine wichtige Rolle in der Regulation der mitochondrial-vermittelten Apoptose zu spielen [Alizadeh *et al.*, 2000].

Es wurde nachgewiesen, dass die HPK1 unabhängig vom Einfluss auf die JNK-Aktivierung den NFκB-Signalübertragungsweg in verschiedenen hämatopoetischen Zellen fördert [Hu *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Deshalb sollte untersucht werden, ob die HPK1 den NFκB-Signaltransduktionsweg auch in ROS-stimulierten EL-4 T-Zellen moduliert. Im EMSA mit NFκB-spezifischen Oligonukleotiden wie z.B. NFκB_{NFAT} aus dem P1 Promotor von NFATc (Abb. 3.17 A) und TCE_{dA>c} aus dem Interleukin-2 Promotor (Abb. 3.17 B) konnte nach H₂O₂-Stimulation die Induktion κB-spezifischer Komplexe in EL-4 T-Zellen beobachtet werden. Dies stimmt mit publizierten Daten der ROS-induzierten NFκB-Aktivierung überein, obwohl diese Zelltyp- und Stimuli-abhängig variieren kann [Quillet-Mary *et al.*, 1997; Dumont *et al.*, 1999; Kamata und Hirata, 1999; Bowie und O'Neill, 2000]. Unter den angewandten experimentellen Bedingungen gab es allerdings keinen Unterschied in der Ausbildung κB-spezifischer Komplexe zwischen den mit verschiedenen HPK1-Konstrukten stabil transduzierten EL-4 T-Zellen nach H₂O₂-Stimulation, wie sie nach HPK1-Überexpression in der retroviral transduzierten myeloiden Vorläuferzelllinie FDC-P1 festgestellt wurde [Arnold *et al.*, 2001]. Dies könnte zum einen an den experimentellen Bedingungen wie z.B. suboptimaler H₂O₂-Konzentration oder der verwendeten Zelllinie und zum anderen an der schnell einsetzenden HPK1-Spaltung (Abb. 3.9) liegen. In der Literatur wurde nachgewiesen, dass für die Aktivierung von NFκB durch HPK1 das HPK1-Gesamtprotein notwendig ist [Arnold *et al.*, 2001]. Allerdings wurde auch beschrieben, dass MLK3 NFκB über eine direkte Phosphorylierung der IκB-Kinasen (IKK) aktivieren kann [Hehner *et al.*, 2000b]. MLK3 wiederum kann durch HPK1 phosphoryliert und damit aktiviert werden [Leung und Lassam, 2001]. In Luziferase-Reportergen-Assays kotransfizierter COS-1-Zellen und 293T-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Signalweg der HPK1-vermittelten Aktivierung von NFκB nicht über MLK3, sondern über MEKK1 zu IKKα/β führt [Hu *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001]. Für diesen Signalweg soll neben der Kinase-Aktivität die Bindung weiterer, bisher nicht charakterisierter Moleküle an die SH3-Motive der C-terminalen regulatorischen Region der HPK1 von Bedeutung sein [Arnold *et al.*, 2001].

Um zu überprüfen, ob die HPK1 wirklich – wie die im EMSA gewonnenen Daten vermuten lassen – die NFκB-Aktivität in H₂O₂-induzierten EL-4 T-Zellen unbeeinflusst lässt, wurde die Luziferase-Aktivität eines NFκB-abhängigen Reportergen-Konstrukts in kotransfizierten EL-4 T-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die retroviralen Expressions-

plasmide eine hohe Eigenaktivität aufwiesen, die wahrscheinlich auf den durch NF κ B selbst stark induzierbaren CMV-Promotor zurückzuführen ist [Yurochko *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1996]. Deshalb wurden die HA-Fusionsproteine für die HPK1-Expression in den Vektor pBS KRSPA umklontiert und so unter der Kontrolle des konstitutiven Rous-Sarkoma-Virus (RSV)-Promotors exprimiert. Die Expression der retroviralen HPK1-Konstrukte in den stabil transduzierten EL-4 T-Zellen unter Kontrolle des CMV-Promotors könnte ein weiterer Grund für die zur Literatur gegensätzlichen Ergebnisse der EMSA's sein [Arnold *et al.*, 2001]. Da nach 6-stündiger Induktion mit 1,0 mM H₂O₂ ein Großteil der Zellen bereits apoptotisch und so auch die Luziferasewerte sehr gering waren, wurden die Zellen mit 500 μ M H₂O₂ induziert. Es zeigte sich, dass bereits die Transfektion der wt HPK1 zu einer gesteigerten NF κ B-Luziferase-Aktivität führte, während das C-terminale HPK1-Peptid im Vergleich mit Kontrollzellen die NF κ B-Aktivität inhibierte (Abb. 3.18). Durch H₂O₂-Induktion wurde NF κ B aktiviert. Die wt HPK1 verstärkte und das C-terminale HPK1-Peptid hemmte die H₂O₂-vermittelte NF κ B-Luziferase-Aktivität. Dies stimmt mit publizierten Ergebnissen der HPK1-vermittelten Aktivierung des NF κ B-Signaltransduktionsweges überein [Hu *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Neben der verstärkten JNK1-Phosphorylierung könnte somit auch die Hemmung des anti-apoptotischen NF κ B-Signalweges [Ghosh *et al.*, 1998] durch das C-terminale Spaltprodukt der HPK1 für die proapoptotische Wirkung der HPK1 beim ROS-vermittelten Zelltod von Bedeutung sein.

Zielmoleküle der JNK wie c-Jun und ATF2 sind Komponenten des Transkriptionsfaktor-Komplexes AP-1 [Karin, 1996; Yao *et al.*, 1999]. Da gezeigt werden konnte, dass die HPK1 die JNK-Aktivierung in T-Zellen verstärkt (Abb. 3.16) [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996], war es von besonderem Interesse, den Einfluss der HPK1 auf die AP-1/NFAT-vermittelte Gentranskription zu untersuchen. In früheren Arbeiten wurde zudem ein positiver Einfluss der HPK1-vermittelten JNK-Aktivierung auf die AP-1-abhängige Gentranskription angenommen [Ling *et al.*, 1999]. EL-4 T-Zellen wurden mit einem Luziferase-Konstrukt, dessen Expression von multiplen AP-1/NFAT-Bindestellen aus dem murinen IL-4 Promotor kontrolliert wird und wt HPK1 sowie Kinase-inaktiver HPK1 kotransfiziert und mit TPA/Ionomycin (T/I) induziert. Im Luziferase-Assay (Abb. 3.19) konnten wir überraschenderweise feststellen, dass nach Transfektion sowohl die wt HPK1 als auch in geringerem Maße die Kinase-inaktive HPK1 zu einer Hemmung der AP-1/NFAT-vermittelten Luziferase-Aktivität führten. Dieser inhibierende Effekt war nach T/I-Stimulation noch stärker ausgeprägt und wird wahrscheinlich von der Kinase-Aktivität und über die Prolin-reichen Motive der HPK1 vermittelt. Eine

mögliche Erklärung dieses inhibierenden Effektes könnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus der AP-1/NFAT-Aktivität durch die permanente JNK-Aktivierung sein, wofür es allerdings bisher keine Hinweise gibt [Liou *et al.*, 2000].

Unsere Daten mit EL-4 T-Zellen stehen im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen mit Jurkat T-Zellen, in denen kein Einfluss der HPK1 auf die AP-1/NFAT-abhängige IL-2 Gentranskription nach T/I-Stimulation beobachtet werden konnte [Liou *et al.*, 2000]. In Jurkat T-Zellen inhibierte die wt HPK1 die TZR-vermittelte AP-1-Aktivität, während die Kinase-inaktive HPK1 einen leicht fördernden Effekt zeigte. Der inhibierende Effekt der wt HPK1 auf die TZR-vermittelte Aktivierung von AP-1 wurde als abhängig von der HPK1-Tyrosinphosphorylierung und Interaktion der Prolin-reichen Motive dieser Kinase mit dem Adaptorprotein SLP-76 interpretiert [Sauer *et al.*, 2001]. Im Gegensatz dazu wurde in Zytokin-stimulierten Jurkat T-Zellen nach Interaktion der tyrosinphosphorylierten HPK1 mit Clnk - einem anderen Adaptor aus der SLP-76-Familie - eine Aktivierung von AP-1 nachgewiesen [Yu *et al.*, 2001]. Die Kotransfektion von HPK1 mit dem Adaptor Grap2/Gads förderte in Jurkat T-Zellen sowohl die JNK-Phosphorylierung als auch die AP-1-vermittelte Gentranskription [Ma *et al.*, 2001]. Außerdem wurde eine Hemmung der ERK2-Phosphorylierung durch die wt HPK1 nach TZR-Stimulation beobachtet, während diese in Kinase-inaktiven HPK1-exprimierenden Zellen verstärkt war [Liou *et al.*, 2000]. Daraus wurde geschlossen, dass der inhibierende Effekt der HPK1 auf die AP-1-Aktivität über den ERK-Signalweg vermittelt werden könnte. Wir beobachteten in HPK1-transduzierten EL-4 T-Zellen nach H₂O₂-Stimulation dagegen eine verstärkte ERK1/ERK2-Phosphorylierung (Abb. 3.16), weshalb diese Schlussfolgerung für uns fraglich ist. Da der AP-1-Signalweg in anergischen T-Zellen spezifisch blockiert ist [Kang *et al.*, 1992] und die HPK1 nach TZR-Stimulation die transkriptionelle Transaktivierung von AP-1 inhibiert [Liou *et al.*, 2000], könnte die HPK1 auch eine physiologische Funktion bei der Induktion von T-Zell-Anergie ausüben. Eine Hemmung der AP-1/NFAT-vermittelten Zytokin-Synthese durch die HPK1 könnte so einerseits zum Apoptose-fördernden Effekt dieser Kinase in T-Zellen beitragen und andererseits ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung der T-Zell-Anergie sein.

4.3. Während des AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten aktiviert die HPK1 den JNK- und inhibiert den NFκB-Signalweg

Die HPK1 verstärkt die ROS-vermittelte Apoptose durch die Aktivierung des JNK- (s. 3.2.5.) und die Inhibierung des NFκB-Signalweges (s. 3.2.6.). Da die Aktivierung der MAPK's und

des NF κ B-Signalweges abhängig vom Zelltyp und der Art der Stimulierung unterschiedlich reguliert werden können, sollte geklärt werden, ob die HPK1 auch den AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten über diese Signaltransduktionswege fördert.

Naive primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen wurden dazu mit dem OVA-Peptid stimuliert und 24 h später mit Retroviren infiziert, die entweder ein Kontrollkonstrukt, die wildtypische HPK1 oder ein C-terminales HPK1-Peptid exprimierten. Zwei Tage nach der Infektion wurden die infizierten, EGFP-positiven Zellen im FACS sortiert und am Folgetag von diesen Zellen Ganzzellproteinextrakte isoliert, wobei ein Teil der T-Zellen zuvor 30 min mit α CD3 ϵ -spezifischen mAk's restimuliert wurde. Nach TZR-Stimulierung wurde eine Aktivierung der JNK1-, ERK1/ERK2- und p38-Kinasen beobachtet (Abb. 3.20). Die Überexpression der wt HPK1 führte sowohl zu einer verstärkten konstitutiven als auch α CD3-induzierten JNK1-Phosphorylierung. Während die Aktivierung der p38-MAPK von der Expression der HPK1-Konstrukte in den CD4⁺ T-Lymphozyten nicht beeinflusst wurde, hemmte das C-terminale HPK1-Peptid geringfügig die ERK1/ ERK2-Phosphorylierung (Abb. 3.20). In Jurkat T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die HPK1 die TZR-vermittelte ERK2-Phosphorylierung inhibiert, während die Kinase-inaktive HPK1 die ERK2-Aktivierung verstärkt [Liou *et al.*, 2000]. Es könnte sein, dass auch in unseren HPK1-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen die ERK-Phosphorylierung zu früheren Zeitpunkten inhibiert wird. Dies könnte mittels einer Kinetik überprüft werden. Eine Aktivierung von ERK über die mutierte HPK1 könnte durch Adaptorproteinbindungen an das Gesamtprotein erfolgen, die durch die katalytische Aktivität der wt HPK1 unterbunden werden. Somit könnte der hemmende Effekt des C-terminalen HPK1-Peptids auf die ERK1/ERK2-Phosphorylierung durch eine Konkurrenz mit der endogenen HPK1 um Adaptorproteine bzw. andere Zielmoleküle erklärt werden und die Kinase-Funktion der HPK1 für die ERK-Aktivierung wichtig sein. Dies würde allerdings im Gegensatz zu publizierten Daten stehen, die anhand der Untersuchungen mit Jurkat T-Zellen erhalten wurden [Liou *et al.*, 2000]. Die verstärkte JNK-Aktivierung in TZR-stimulierten, HPK1-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen könnte u.a. für die gesteigerte FasL-Expression verantwortlich sein [Faris *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000]. Wahrscheinlich wird ein Hauptteil des proapoptischen Effekts der HPK1 durch die verstärkte, anhaltende JNK-Aktivierung vermittelt [Chen und Tan, 2000]. JNK bewirkt u.a. die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien durch Phosphorylierung anti-apoptischer Mitglieder der Bcl-2-Familie und fördert so auch den Fas/FasL-unabhängigen apoptotischen Zelltod [Gross *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1999; Davis, 2000; Tournier *et al.*, 2000]. Die Hemmung der JNK-Phosphorylierung durch

den spezifischen Inhibitor SP 600125 (Calbiochem) [Bennett *et al.*, 2001] führte jedoch in unseren Experimenten nicht zur kompletten Reduktion des HPK1-verstärkten AICD in primären CD4⁺ T-Lymphozyten (Daten nicht dargestellt). Außerdem war auch das C-terminale HPK1-Peptid, das keinen Einfluss auf die JNK-Aktivierung ausübte (Abb. 3.20), in der Lage, den AICD der T-Zellen zu verstärken (Tab. 3.1). Somit müssen weitere HPK1-vermittelte Signalwege zur Förderung des apoptotischen T-Zelltodes beitragen.

Es wurde beschrieben, dass die HPK1 unabhängig von der Aktivierung der JNK den NFκB-Signalübertragungsweg fördern kann [Hu *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Die meist anti-apoptotisch wirkenden NFκB-Transkriptionsfaktoren liegen im Zytoplasma in der Form von Dimeren vor, die durch Assoziation mit inhibitorischen IκB-Proteinen inaktiviert sind [Karin, 1999]. Nach Phosphorylierung durch den IκB-Kinasen (IKK)-Komplex werden die IκB's ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut. Die nun freien NFκB-Dimere können in den Zellkern einwandern und die Transkription NFκB-sensitiver Gene anschalten [Karin, 1999; Hatada *et al.*, 2000; Karin und Lin, 2002]. Der genaue molekulare Mechanismus der HPK1-vermittelten NFκB-Aktivierung ist bisher nur in Ansätzen bekannt. Es wird angenommen, dass HPK1 die MEKK1 phosphoryliert. MEKK1 aktiviert die IKKα und IKKβ, die wiederum die IκB's phosphorylieren [Hu *et al.*, 1999]. Außerdem könnten MLK3, TAK1 und NIK an der HPK1-regulierten NFκB-Aktivierung beteiligt sein [Su *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Hehner *et al.*, 2000b; Arnold *et al.*, 2001; Leung und Lassam, 2001]. In Übereinstimmung mit publizierten Daten konnten wir eine Inhibierung von NFκB in primären CD4⁺ T-Lymphozyten, die das C-terminale HPK1-Peptid exprimierten, nach TZR-Stimulation nachweisen [Arnold *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Im Westernblot der Ganzzellproteinextrakte von C-terminalen HPK1-Peptid-exprimierenden T-Zellen kam es zu keiner Degradation von IκBα, wie sie bei HPK1 wt-exprimierenden Zellen nach 30-minütiger αCD3-Induktion beobachtet werden konnte (Abb. 3.21). Aus diesen Daten folgt, dass das C-terminale HPK1-Peptid den NFκB-Signaltransduktionsweg in primären T-Lymphozyten durch eine Hemmung der IκBα-Degradation inhibiert. In humanen T-Lymphozyten führt die NFκB-Inhibierung sowohl zum Caspase-abhängigen als auch Caspase-unabhängigen apoptotischen Zelltod [Kolenko *et al.*, 1999; Uzzo *et al.*, 2001]. Eine Spaltung der endogenen HPK1 durch Caspasen (Abb. 3.9) und damit Akkumulation des C-terminalen HPK1-Peptids [Chen *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001] könnte durch die Inhibierung von NFκB für die Unterstützung der T-Zell-Apoptose von physiologischer Bedeutung sein. Dadurch erklärt sich auch

der beobachtete AICD-fördernde Effekt des C-terminalen HPK1-Peptides sowie der Kinase-inaktiven HPK1 (Tab. 3.1, 3.2).

Aufgrund seiner Fähigkeit, gleichzeitig zwei Signalübertragungswege zu aktivieren (d.h. JNK- und NFκB-Signalwege), kann die HPK1 in Leukozyten als Signal-Multiplikator fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass die HPK1 unter verschiedenen Bedingungen ein unterschiedliches Muster an Signalwegen aktiviert [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999; Hehner *et al.*, 2000a; Liou *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Leung und Lassam, 2001; Sauer *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2001]. Dies macht die HPK1 zu einem Schalter zwischen verschiedenen biologischen Effekten. Eine Funktion der HPK1 im Rahmen der Immunrezeptor-Signalübertragung ist die in dieser Arbeit beschriebene Verstärkung des AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten. Dafür haben wir folgende Hypothese aufgestellt: in der Initiationsphase der T-Zell-Stimulierung werden nach schneller, transients HPK1-Aktivierung pro- und anti-apoptotische Signale durch den JNK- und NFκB-Signal-übertragungsweg vermittelt. Später kommt es durch die Akkumulation des C-terminalen HPK1-Spaltproduktes zur Inhibierung der NFκB-Aktivität und damit einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Überlebens- und Apoptose-stimulierenden Signalen zugunsten des AICD. So trägt die HPK1 zur Homöostase des Immunsystems und der Termination der Immunantwort bei.

Die Funktion von Adaptor-Molekülen beim Aufbau von Signalkomplexen und bei der kombinatorischen Aktivierung von Signalübertragungswegen soll nochmals hervorgehoben werden [Wonerow und Watson, 2001; Burack *et al.*, 2002]. Adaptoren werden oft Zelltyp-spezifisch exprimiert und tragen zur Bildung und Akkumulation von Signalkomplexen bei, die der Kopplung Zelltyp-spezifischer Rezeptoren mit ubiquitären Signalübertragungswegen dienen. Sie erlauben außerdem ein hohes Maß an Regulierbarkeit. Es ist zu erwarten, dass die HPK1 neben dem pro-apoptotischen Effekt weitere Funktionen in hämatopoetischen Zellen erfüllt, die durch spezifische Interaktionen von verschiedenen Adaptoren mit den Prolin-reichen Motiven der HPK1 vermittelt werden. So konnte gezeigt werden, dass die HPK1 durch Erythropoietin (Epo) aktiviert wird und zur Regulation des Epo-abhängigen Zellwachstums sowie zur Differenzierung erythroider Zellen beiträgt [Nagata *et al.*, 1999]. Gads/Grp2, ein wichtiges Adaptor-Protein für die T-Zell-Entwicklung im Thymus [Liu *et al.*, 2001; Yoder *et al.*, 2001], wurde als Bindepartner der TZR-vermittelten HPK1-Aktivierung identifiziert [Liu *et al.*, 2000a; Ma *et al.*, 2001]. Zusammen mit dem Adaptor Clnk verstärkt HPK1 die TZR-induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors in Jurkat T-Zellen [Yu *et al.*, 2001]. Da die HPK1

ein Aktivator des JNK-Signalweges ist, könnte sie auch eine Rolle bei der T-Zell-Differenzierung, der Kontrolle von T-Zell-Effektorfunktionen und bei der negativen Selektion doppelt-positiver Thymozyten spielen [Dong *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2000; Rincon *et al.*, 2001; Sabapathy *et al.*, 2001].

Wir erwarten durch die weitere Untersuchung der molekularen Funktion von HPK1 wichtige Hinweise auf Mechanismen der Leukozyten-Differenzierung und -Regulation. Erste Ergebnisse mit Hämatopoetischen Stammzellen lassen eine Rolle der HPK1 bei der Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen vermuten (Dr. A. Avots, pers. Mitteilung). Weiterhin soll in Zusammenarbeit mit Dr. F. Kiefer (MPI für Physiologische und Klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim) der Einfluss der HPK1 auf die B-Zell-Apoptose untersucht werden. Dabei sollen u.a. Experimente mit HPK1-defizienten Mäusen (Suzuki, Kiefer, Mak; nicht publiziert) durchgeführt werden. Da die HPK1 in Zellen des angeborenen (nativen) und adaptiven Immunsystems aktiv ist, könnte die Aufklärung der biologischen Funktionen dieser GCK zum weiteren Verständnis des immunologischen Systems beitragen. Zudem könnte die HPK1 ein mögliches Zielmolekül zur Modulation des Immunsystems darstellen.

4.4. *NFATc/A fördert im Gegensatz zu NFATc/C und NFATp nicht den AICD primärer CD4⁺ T-Lymphozyten*

Mitglieder der Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren wurden als wichtige Regulatoren der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von T-Zellen beschrieben [Rao *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b; Ranger *et al.*, 1998c; Serfling *et al.*, 2000; Behrens *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2001]. NFATp und NFATc reagieren in vielen funktionellen Untersuchungen ähnlich und sind an der Kontrolle von T-Zell-Effektorfunktionen, u.a. durch die regulierte Transkription der Lymphokin-Gene IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ und TNF α , beteiligt [Rooney *et al.*, 1995b; Serfling *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1996a; Tsai *et al.*, 1996b; Duncliffe *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1997; Kel *et al.*, 1999]. Trotzdem zeigen NFATp- und NFATc-defiziente Mäuse stark unterschiedliche Phänotypen [Serfling *et al.*, 2000]. NFATc-defiziente Mäuse sterben aufgrund von Fehlbildungen des Herzens bereits im Uterus, während NFATp-defiziente Embryos sich normal entwickeln [de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998a; Schuh *et al.*, 1998a]. Lymphozyten von NFATp-defizienten Mäusen, die älter als 3 Monate sind, entwickeln ein hyperproliferatives Syndrom, das sich in

einer moderaten Größenzunahme der peripheren lymphatischen Organe (Thymus, Milz und Lymphknoten) widerspiegelt [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998a]. Die Daten aus den Untersuchungen NFAT-defizienter Mäuse bzw. Zellen zeigen sowohl individuelle aber auch sich überlappende Funktionen für NFATc und NFATp. So liegt die Vermutung nahe, dass sowohl die Menge der gesamten NFAT's in einer Zelle als auch das Verhältnis zwischen den einzelnen Familien-Mitgliedern und Isoformen bestimmend dafür sind, welches Genmuster exprimiert wird und welche biologischen Funktionen erfüllt werden. Für NFATc wurden drei verschiedene Isoformen (A, B und C) mit unterschiedlich langem C-Terminus nachgewiesen [Chuvpilo *et al.*, 1999b]. Die längste Isoform, NFATc/C, enthält eine zusätzliche, wenn auch schwache C-terminale transaktivierende Domäne, die eine 30 %-ige Sequenzhomologie zum transaktivierenden C-Terminus von NFATp aufweist [Luo *et al.*, 1996b; Avots *et al.*, 1999]. Trotzdem sind die unterschiedlichen physiologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder der NFAT-Familie und deren Isoformen bisher nur unvollständig aufgeklärt worden.

Der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) der Lymphozyten dient der Homöostase und Toleranz des Immunsystems [Lenardo, 1991]. Er ist abhängig von der Interaktion des ubiquitär-exprimierten CD95 (Fas) mit seinem kontrolliert induzierbar-exprimierten Liganden CD95L (FasL) [Janssen *et al.*, 2000; Krammer, 2000; Schmitz *et al.*, 2000]. Das FasL-Gen enthält in seinem Promotor/Enhancer mehrere NFAT-Bindestellen, so dass eine wichtige Funktion der NFAT's bei der Regulation des AICD's vermutet wird [Latinis *et al.*, 1997; Li-Weber *et al.*, 1999; Rengarajan *et al.*, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Fragestellung nachgegangen werden, ob NFATp und/oder die Isoformen A und C des NFATc den AICD in T-Lymphozyten beeinflussen.

Zuerst sollte die endogene Expression von NFATc und NFATp in T-Helferzell-Subpopulationen nach Induktion des AICD untersucht werden. Dazu wurden naive CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen mit dem OVA-Peptid aktiviert und durch Zugabe der entsprechenden Zytokine und Ak's (s. 2.15.5.4.3.) während der 5-tägigen Expansion *in vitro* zu den T-Helferzell-Subpopulationen T_H0, T_H1 oder T_H2 differenziert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen auf α CD3 ϵ -beschichteten Gewebekulturschalen 3 h restimuliert. Im Westernblot der Ganzzellproteinextrakte wurde die endogene Expression der NFAT's und von HPK1 mit spezifischen Ak detektiert (Abb. 3.22). In den T_H0- und T_H1-Zellen kam es wie erwartet nach α CD3-Stimulation zu einer starken Induktion der NFATc/A-Expression [Chuvpilo *et al.*, 1999a; Chuvpilo *et al.*, 1999b]. Im Gegensatz zu Ergebnissen mit Balb/c-

Mäusen [Chuvpilo *et al.*, 1999b], wurde die NFATc/A-Expression in T_H2-Zellen von DO 11.10 tg Mäusen nach TZR-Stimulation nicht induziert. Außerdem konnte in diesen Zellen eine im Vergleich zu den T_H0- und T_H1-Zellen reduzierte NFATc-Expression, aber gesteigerte NFATp-Expression beobachtet werden. Dies zeigt deutlich, dass gewonnene Ergebnisse aus einem Zellsystem nicht ohne weiteres auf ein anderes übertragen werden können und unterstreicht die Bedeutung Zelltyp- und Entwicklungs-spezifischer Signaltransduktionswege. Die von uns beobachtete verstärkte NFATp-Expression in T_H2-Zellen stimmt mit der beschriebenen wichtigen Rolle bei der transkriptionellen Induktion von T_H2-Zytokinen überein [Rincon und Flavell, 1997; Schuh *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2001]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass T_H1-Zellen sensitiver für die Fas/FasL-vermittelte Apoptose sind als T_H2-Zellen [Ramsdell *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997]. Dies wurde u.a. auf die Egr/ NFAT-vermittelte FasL-Expression in T_H1-Zellen zurückgeführt, während T_H2-Zellen keinen oder nur geringe Mengen des FasL exprimierten [Suda *et al.*, 1995; Dzialo-Hatton *et al.*, 2001]. So könnte das von uns beobachtete unterschiedliche Muster der NFAT-Expression in den T-Helferzell-Subpopulationen ein weiterer Grund der unterschiedlichen Sensitivität von T_H1- und T_H2-Zellen für den AICD sein. Die endogene HPK1-Expression, die nach TZR-Stimulation ebenfalls induziert wurde, war in T_H1-Zellen am Stärksten (Abb. 3.22). Diese unterschiedliche HPK1-Expression in den T-Helferzell-Subpopulationen sowie die wichtige Rolle des JNK-Signalweges bei der T_H1-Helferzell-Differenzierung und bei Effektorfunktionen sind ein Ansatzpunkt für weitere Experimente zur Aufklärung der biologischen Funktionen der HPK1 [Dong *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001].

Bei NFATp-defizienten Mäusen wurde eine 5- bis 6-fache Zunahme der absoluten Lymphozytenzahl in den peripheren lymphatischen Organen im Vergleich mit wildtypischen Mäusen beobachtet, die u.a. auf eine verminderte klonale Deletion der aktivierten T-Zellen zurückgeführt wurde [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1998a]. Deshalb sollte untersucht werden, ob fehlendes NFATp einen Effekt auf den AICD der T-Zellen hat. Dazu wurden CD4⁺ T-Lymphozyten von wildtypischen Kontrollmäusen oder NFATp-defizienten Mäusen (NFATp^{-/-}) 5 d nach der primären Aktivierung durch α CD3 ϵ und α CD28 mit an die Gewebekulturschale gebundenen α CD3 ϵ - oder α CD95-spezifischen Antikörpern restimuliert. Die Apoptoserate wurde in einer Kinetik nach AnnexinV-PE-Färbung im FACS bestimmt. Da bereits geringe Unterschiede im genetischen Hintergrund NFATp-defizienter Mäuse einen großen Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps haben können, wurden in der vorliegenden Arbeit für vergleichende Versuche Geschwi-

stertiere aus Verpaarungen heterozygoter Elterntiere verwendet [Schuh *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1998a]. Die NFATp-defizienten T-Lymphozyten zeigten im Vergleich mit den wild-typischen Kontrollzellen einen gestörten, stark verzögerten α CD3-vermittelten AICD, während die α CD95-vermittelte Apoptose unverändert verlief. Dies stimmt mit den publizierten Daten überein, in denen der inhibierte AICD auf eine reduzierte CD95L-Expression zurückgeführt wurde [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996]. Somit muss eine gehemmte CD95L-Expression der Grund für den beobachteten Defekt im α CD3-vermittelten AICD sein. Ein Defekt der DISC-Bildung [Scaffidi *et al.*, 1999a; Kirchhoff *et al.*, 2000] scheidet aus, da NFATp-defiziente T-Zellen eine normale α CD95-vermittelte Apoptose zeigten. Neuere Daten aus unserem Labor belegen, dass der α CD3-vermittelte AICD in NFATp/NFAT4-doppelt-defizienten T-Zellen [Ranger *et al.*, 1998c] noch stärker als bei NFATp-defizienten T-Zellen inhibiert ist (T. König, unpubl.). Dies lässt vermuten, dass neben unterschiedlichen Funktionen einzelner Mitglieder der NFAT's auch die Menge der NFAT's in der Zelle für Effektorfunktionen von Bedeutung ist (Dosis-Effekt). NFATp und NFAT4 sind somit entscheidend an der Regulation des TZR-vermittelten AICD beteiligt [Ranger *et al.*, 1998c; Glimcher und Singh, 1999; Serfling *et al.*, 2000].

Durch retrovirale Infektion von NFATc/A-, NFATc/C- und NFATp-exprimierenden Konstrukten in NFATp-defiziente T-Lymphozyten sollte versucht werden, den Defekt im AICD zu „heilen“. Außerdem könnte so geklärt werden, ob NFATc die Funktion von NFATp im AICD ersetzen kann. Leider war es bisher nicht möglich, NFATp-defiziente T-Zellen nach α CD3/ α CD28-Stimulation zu infizieren. Dies könnte an unterschiedlich-gestörten TZR-vermittelten Signaltransduktionswegen liegen. Deshalb wurden die NFATp-defizienten Mäuse mit DO 11.10 tg Mäusen gekreuzt, um diese mit dem Ova-Peptid stimulieren zu können. Erste durchgeführte Experimente zeigen, dass die T-Zellen dieser Mäuse retroviral infizierbar sind.

Daten unseres Labors zeigten, dass die T-Zell-Aktivierung zu einer massiven Induktion von NFATc/A innerhalb von 3-4 h führt [Chuvpilo *et al.*, 1999a; Chuvpilo *et al.*, 1999b], noch bevor Merkmale des AICD beobachtet werden konnten. Dies ließ vermuten, dass sich die biologische Funktion des NFATc/A von anderen NFAT's durch das Fehlen des C-terminalen Peptids mit einer weiteren Transaktivierenden Domäne, TAD-B, die in allen anderen NFAT-Proteinen einschließlich der längeren Isoform NFATc/C vorhanden ist, unterscheidet [Luo *et al.*, 1996a; Chuvpilo *et al.*, 1999b]. Um die Hypothese zu überprüfen, dass möglicherweise auch NFATc-Proteine eine wichtige Rolle beim AICD von T-Zellen spielen, wurden naive

primäre CD4⁺ T-Lymphozyten von DO 11.10 tg Mäusen in Gegenwart von teilungsinaktivierten DZ's mit dem OVA-Peptid stimuliert und mit Retroviren infiziert, die entweder ein Kontrollkonstrukt oder NFATc/A, NFATc/C bzw. NFATp exprimierten. Nach 3-tägiger Expansion wurde ein Teil der Zellen 8 h mit α CD3 ϵ restimuliert und die Apoptose nach AnnexinV-PE-Färbung im FACS bestimmt. Schon die Überexpression von NFATp oder NFATc/C bewirkte einen, wenn auch schwachen Anstieg der spontanen Apoptose. Der TZR-vermittelte AICD wurde durch beide NFAT-Proteine signifikant verstärkt (Abb. 3.24, Tab. 3.3). Diese Daten stimmen mit dem Phänotyp NFATp-defizienter Mäuse und dem reduzierten AICD in T-Zellen (Abb. 3.23) überein [Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1997; Schuh *et al.*, 1998b; Behrens *et al.*, 2001]. NFATc/A zeigte dagegen keinen pro-apoptotischen Effekt, obwohl es in den primären T-Zellen gleichstark oder stärker als die anderen NFAT's exprimiert wurde (Tab. 3.3, Abb. 3.26). Eine Verfälschung der Daten durch unterschiedliche Kulturbedingungen kann durch die jeweiligen uninfizierten Zellen als interne Kontrolle ausgeschlossen werden, deren Apoptoserate sich nur minimal unterschied. Die Funktionalität der retroviralen Konstrukte, d.h. die Expression und induzierbare nukleäre Translokation der HA-markierten NFAT's, wurde zudem in transduzierten EL-4 T-Zellen kontrolliert, wie es für NFATc/C dargestellt ist (Abb. 3.25). Unsere Daten deuten darauf hin, dass es durch die massive, autoregulierte NFATc/A-Synthese nach Effektor-T-Zell-Aktivierung zur Induktion der Effektor-Funktionen kommt, ohne dass dabei die T-Zell-Apoptose beschleunigt wird [Chuvpilo *et al.*, 2002]. Die im Vergleich zu NFATc/A längeren C-terminalen Peptide von NFATc/C und NFATp sind wahrscheinlich für die pro-apoptotische Funktion verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass NFATp über sein C-terminales Peptid mit der N-terminalen Region von MEF2D interagiert [Youn *et al.*, 2000]. MEF2D kontrolliert durch Bindung an zwei Orte des Nur77-Promotors dessen Aktivität [Woronicz *et al.*, 1995]. Nur77 wiederum ist ein nach TZR-Stimulation sofort induziertes Gen, welches als Mediator der Thymozyten-Apoptose fungiert [Kuang *et al.*, 1999]. So könnte die NFAT/MEF2D-vermittelte Aktivierung von Nur77 zum AICD peripherer T-Zellen beitragen. Dies soll in weiteren Experimenten untersucht werden. Andererseits wurde bereits die NFAT-kontrollierte Expression des CD95L als ein wichtiger Faktor im AICD beschrieben [Li-Weber *et al.*, 1999; Rengarajan *et al.*, 2000; Dzialo-Hatton *et al.*, 2001]. Zusätzlich zur Regulation pro-apoptotischer Gene können die NFAT's wahrscheinlich aber auch die Expression anti-apoptotischer Gene beeinflussen [Rao *et al.*, 1997; Serfling *et al.*, 2000]. So konnten wir in RNA-Protektionsanalysen mit retroviral transduzierten, TPA/Ionomycin-stimulierten EL-4 T-Zellen nachweisen, dass NFATc/A die Expression des A1-Gens fördert, während NFATp und

NFATc/C die A1-Expression inhibieren (Dr. F. Berberich-Siebelt, unpubl. Daten). NFATp hemmte in diesen Versuchen zudem die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x, was mit publizierten Daten übereinstimmt [Kel *et al.*, 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass A1/Bcl-1 in B-Zellen nach TNF α -Rezeptor- und BZR-Stimulation stark anti-apoptotisch wirkt [Grumont *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 1999].

Unsere experimentellen Daten und die anderer Laboratorien zeigen, dass die Apoptose-Regulation durch Mitglieder der Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren bzw. deren Isoformen auf die Fähigkeit zurückzuführen ist, die Expression sowohl anti- als auch proapoptotischer Gene zu spezifischen Zeitpunkten der T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung zu kontrollieren. Offenbar ist dabei sowohl die Menge der gesamten NFAT's als auch das Verhältnis zwischen den einzelnen Familien-Mitgliedern und Isoformen in einer Zelle für die Entscheidung wichtig, welches Genmuster exprimiert wird [Chuvpilo *et al.*, 2002]. Weitere Versuche sind zum Verständnis spezifischer Funktionen einzelner NFAT's und besonders deren Isoformen in der Biologie einer Zelle notwendig. Da mit großer Wahrscheinlichkeit die Aktivierung eines einzelnen Signalübertragungsweges in der Zelle praktisch nicht vorkommt, erscheint die isolierte Betrachtung von Signalübertragungswegen wenig sinnvoll. Vielmehr sollte man dazu übergehen, die Kombination aller zu einer gegebenen Zeit in einer Zelle aktiven, sich gegenseitig beeinflussenden Signalübertragungswege („Cross-Talks“) zu untersuchen [Noselli und Perrimon, 2000]. Ein gutes Werkzeug dafür ist die Mikro-Array-Technologie, die in unserem Labor zur Zeit etabliert wird.

5. Zusammenfassung

Die Expression der **Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 (HPK1)**, einem Mitglied der Familie der „Germinal Centre“ Kinasen, ist im adulten Organismus auf die Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt. Die HPK1 wurde ursprünglich als ein Aktivator des JNK-Signalübertragungsweges beschrieben [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996], und kürzlich wurde eine transiente Aktivierung der HPK1 nach TZR-Stimulation nachgewiesen. Auch wurde eine Assoziation der HPK1 mit dem Linker aktivierter T-Zellen (LAT) und den Adaptorproteinen Nck, Crk, Gads, Grb2, Grap, CrkL sowie SLP-76 gezeigt. Für die Aktivierung der nach TZR-Stimulation in den Lipid-Rafts lokalisierten HPK1 sind sowohl Lck als auch ZAP-70 notwendig [Liou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000a; Ling *et al.*, 2001]. Diese Daten legen eine mögliche Funktion von HPK1 bei der TZR-vermittelten Signalübertragung nahe. Trotzdem konnte bisher eine physiologische Rolle der HPK1 im Rahmen der Immunrezeptor-Signalübertragung nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird dargestellt, dass eine wichtige Funktion der HPK1 in T-Zellen nach TZR-Stimulation, die durch die Förderung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) vermittelt wird, in der Kontrolle der Termination der Immunantwort und damit Homöostase des Immunsystems besteht. Dies wurde durch retrovirale Überexpression der wildtypischen (wt) HPK1 in murinen CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen, in denen die HPK1 zu einem Anstieg der spontanen und α CD3-vermittelten Apoptose sowie zu einer gesteigerten Expression des Fas-Liganden (FasL oder auch CD95L) führte. Die Expression einer HPK1-„antisense“ (AS)-RNA in CD4⁺ T-Zellen bewirkte dagegen eine schwache, jedoch signifikant nachweisbare Hemmung der Apoptose und FasL-Expression. Die Apoptose-Hemmung durch die HPK1-AS-RNA war besonders stark in H₂O₂-stimulierten EL-4 T-Zellen ausgeprägt, in denen die Überexpression der wt HPK1 den durch reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS) induzierten Zelltod verstärkte. Aus diesen Daten folgt, dass die HPK1 die T-Zell-Apoptose reguliert. In H₂O₂-stimulierten EL-4 T-Zellen führt die HPK1-Expression zu einer verstärkten und anhaltenden Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), die wahrscheinlich an der HPK1-vermittelten Apoptoseinduktion beteiligt ist. Unter den gleichen Bedingungen konnte eine schnelle Spaltung der HPK1 beobachtet werden. Die Überexpression der N- oder C-terminalen Spaltprodukte in CD4⁺ T-Zellen führte - wie die der Gesamt-HPK1 - zu einem Anstieg des AICD. In

Übereinstimmung mit publizierten Daten konnten wir eine Hemmung der NF κ B-Aktivität durch das C-terminale HPK1-Peptid nachweisen, das die I κ B α -Degradation inhibiert.

Die erzielten Ergebnisse führten uns in ihrer Gesamtheit zu folgendem Modell: während der Initiationsphase der T-Zell-Stimulierung werden nach schneller, transients HPK1-Aktivierung pro- und anti-apoptotische Signale durch den JNK- und NF κ B-Signalübertragungsweg vermittelt. Durch die Akkumulation der C-terminalen HPK1-Spaltprodukte kommt es später zur Inhibierung der NF κ B-Aktivität und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Überlebens- und Apoptose-stimulierenden Signalen zugunsten des AICD. Allerdings gibt es sicherlich weitere Faktoren und Signalwege, die an der HPK1-vermittelten Kontrolle der T-Zell-Apoptose beteiligt sind und von deren Untersuchung ein detaillierteres Verständnis der HPK1-Physiologie erwartet wird.

Die **Nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen (NFAT's)** gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, denen eine konservierte, ca. 300 Aminosäuren (aa) große DNA-Bindedomäne und eine Calcineurin-Bindedomäne gemeinsam ist.

NFATc (auch NFATc1 oder NFAT2 genannt) und NFATp (NFATc2 oder NFAT1) werden in peripheren T-Zellen stark exprimiert und kontrollieren deren Effektorfunktionen u.a. über die Expression von IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ und weiterer Lymphokine. Weitere von den NFAT's kontrollierte Gene sind p21^{WAF1}, der CD40L und der CD95L. Somit scheinen die NFAT's bei der Zellzyklus-Kontrolle und beim AICD von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle zu spielen.

Daten unseres Labors zeigten, dass die T-Zell-Aktivierung zu einer massiven Induktion der kurzen Isoform A von NFATc innerhalb von 3-4 h führt [Chuvpilo *et al.*, 1999b], noch vor dem Start des AICD. Dies ließ vermuten, dass sich die biologische Funktion von NFATc/A durch das Fehlen des C-terminalen Peptids von ca. 245 aa, das in allen anderen NFAT-Proteinen einschließlich der längeren Isoform NFATc/C vorhanden ist, unterscheidet. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Induktion und Funktion von NFATc/A in murinen T-Lymphozyten untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion primärer CD4⁺ T-Lymphozyten mit NFATc/A-exprimierenden rekombinanten Retroviren, im Gegensatz zu der mit NFATc/C- oder NFATp-exprimierenden Retroviren, den AICD unbeeinflusst lässt. Dies deutet darauf hin, dass es durch die massive NFATc/A-Synthese nach Effektor-T-Zell-Aktivierung zur Induktion von Effektor-Funktionen kommt, ohne dass dabei die T-Zell-Apoptose beschleunigt wird. Im Gegensatz dazu üben die langen NFAT-Faktoren wie NFATc/C und NFATp eine pro-apoptotische Wirkung aus.

6. Summary

Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is a member of germinal center kinases that is predominantly expressed in hematopoietic cells. The HPK1 has originally been described as an upstream Ser/Thr protein kinase of the JNK signaling cascade [Hu *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 1996]. Recently, it was shown that T cell receptor (TCR) stimulation leads to a rapid but transient activation of HPK1 and its binding to the linker of activated T cells (LAT) and the adaptor proteins Nck, Crk and Gads. HPK1 which also binds to the signaling molecules SLP-76, Grb2, Grap and CrkL is localized in lipid rafts and needs Ick and ZAP70 for its activation [Liou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000a; Ling *et al.*, 2001]. These data suggested an involvement of HPK1 in the signaling transfer from the TCR to downstream signaling cascades. However, a role for HPK1 in T cell physiology remained to be shown.

We show here that one of the functions of HPK1 activation upon T cell stimulation is to control the termination of immune response and, therefore, homeostasis of the immune system by supporting the 'Activation Induced Cell Death' (AICD) of T cells. This is demonstrated by overexpressing wild type (wt) HPK1 which led to a substantial increase in spontaneous and α CD3-mediated apoptosis as well as in Fas ligand (FasL or also CD95L) expression on murine CD4⁺ T cells. In contrast, expression of HPK1 antisense (AS)-RNA exerted a slight, albeit measurable suppressive effect on both apoptosis and FasL expression. Apoptosis suppression by overexpressing HPK1 AS-RNA was much more pronounced in H₂O₂-treated EL-4 T cells in which HPK1 overexpression stimulated cell death induced by reactive oxygen species (ROS) indicating that HPK1 indeed controls apoptosis in T cells. HPK1 expression also led to a sustained increase in c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity suggesting that JNK activation contributes to the HPK1-mediated apoptosis in H₂O₂-treated EL-4 cells. Under the same conditions a rapid cleavage of HPK1 was observed, and overexpression of N- and C-terminal cleavage products in CD4⁺ T cells resulted, similar to full-length HPK1, in an increase in AICD. In agreement with published data we show that the C-terminal portion of HPK1 suppresses I κ B α degradation thereby inhibiting NF κ B activation.

Taken together, these results led to a model in which, during the initial phase of T cell activation, the rapid and transient HPK1 induction provides both pro- and anti-

apoptotic signals by activating JNK and NF κ B signaling pathways, respectively. At a later stage, due to the accumulation of the C-terminal HPK1 cleavage product, NF κ B activation is suppressed and the balance between survival and apoptotic signals is shifted favoring apoptosis. However, signalling events in addition to the stimulation of JNK and inhibition of NF κ B signalling cascades might also be involved in the HPK1-mediated control of T cell apoptosis. The nature of these events remains to be elucidated.

Nuclear Factor of activated T cells (NFAT) proteins belong to a family of transcription factors which share a common DNA binding domain of approximately 300 amino acids (aa) and a calcineurin binding domain.

NFATc (also designated as NFATc1 or NFAT2) and NFATp (also designated as NFATc2 or NFAT1) are highly expressed in peripheral T cells and control their effector function, in particular the expression of lymphokines, such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 and IFN γ . Further target promoters for NFATs are the p21^{Waf1}, the CD40 ligand and CD95 ligand promoters indicating that in addition to effector function NFATs are also involved in the control of the cell cycle and, in particular, AICD of T lymphocytes.

We have shown previously that T cell activation leads to the massive induction of the short isoform A of NFATc within 3-4 h [Chuvpilo *et al.*, 1999b], i.e. before the onset of AICD. This observation suggested that due to the lack of the C-terminal extension of approximately 245 aa which is present in all other NFAT proteins, NFATc/A might differ in biological function from other NFAT proteins, including its longer isoform NFATc/C. This view prompted us to investigate the induction and function of NFATc/A in murine T lymphocytes.

Here we show that infection of primary CD4⁺ T lymphocytes with recombinant retroviruses expressing NFATc/A, in contrast to retroviruses expressing NFATc/C or NFATp, does not enhance AICD. These data suggest that the massive synthesis of NFATc/A upon activation of effector T cells ensures these cells to exert effector functions without inducing rapid apoptosis.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. (1996). Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 84, 655-657.
- Adams, J. M., und Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D., und Ronai, Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18, 6104-6111.
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., und Thompson, C. B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Rev Immunol* 1, 220-228.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Staudt, L. M., und et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Altman, A., Isakov, N., und Baier, G. (2000). Protein kinase Ctheta: a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol Today* 21, 567-573.
- Altschmied, J., und Duschl, J. (1997). Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* 23, 436-438.
- Anafi, M., Kiefer, F., Gish, G. D., Mbamalu, G., Iscove, N. N., und Pawson, T. (1997). SH2/SH3 adaptor proteins can link tyrosine kinases to a Ste20-related protein kinase, HPK1. *J Biol Chem* 272, 27804-27811.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., und Willems, G. M. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265, 4923-4928.
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. M., und Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* 24, 2469-2476.
- Arendt, C. W., Albrecht, B., Soos, T. J., und Littman, D. R. (2002). Protein kinase C-theta:: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 323-330.
- Arnold, R., Liou, J., Drexler, H. C., Weiss, A., und Kiefer, F. (2001). Caspase-mediated cleavage of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) converts an activator of NFkappaB into an inhibitor of NFkappaB. *J Biol Chem* 276, 14675-14684.
- Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., und Roifman, C. M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76, 947-958.

- Aruffo, A., und Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8573-8577.
- Avots, A., Buttman, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Smola, U., Bannister, A. J., Rapp, U. R., Kouzarides, T., und Serfling, E. (1999). CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* *10*, 515-524.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., und Zhang, X. F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* *56*, 127-155.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., und Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* *272*, 217-221.
- Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A., und Baier, G. (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* *16*, 1842-1850.
- Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., und Waldmann, T. A. (1994). The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4940-4944.
- Bar-Sagi, D., und Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* *103*, 227-238.
- Bauer, M. K., Vogt, M., Los, M., Siegel, J., Wesselborg, S., und Schulze-Osthoff, K. (1998). Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem* *273*, 8048-8055.
- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., und Crabtree, G. R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* *275*, 1930-1934.
- Behrens, A., Sabapathy, K., Graef, I., Cleary, M., Crabtree, G. R., und Wagner, E. F. (2001). Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1769-1774.
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., und Anderson, D. W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13681-13686.
- Berberich-Siebelt, F., Klein-Hessling, S., Hepping, N., Santner-Nanan, B., Lindemann, D., Schimpl, A., Berberich, I., und Serfling, E. (2000). C/EBPbeta enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN-gamma induction in T cells. *Eur J Immunol* *30*, 2576-2585.
- Bi, K., und Altman, A. (2001). Membrane lipid microdomains and the role of PKCtheta in T cell activation. *Semin Immunol* *13*, 139-146.

- Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M. J., und Altman, A. (2001). Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol* 2, 556-563.
- Boise, L. H., Noel, P. J., und Thompson, C. B. (1995). CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol* 7, 620-625.
- Bortul, R., Zweyer, M., Billi, A. M., Tabellini, G., Ochs, R. L., Bareggi, R., Cocco, L., und Martelli, A. M. (2001). Nuclear changes in necrotic HL-60 cells. *J Cell Biochem Suppl* 36, 19-31.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., und Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.
- Bowie, A., und O'Neill, L. A. (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 59, 13-23.
- Brabletz, T., Pietrowski, I., und Serfling, E. (1991). The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res* 19, 61-67.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., und Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
- Bretscher, P., und Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169, 1042-1049.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., und Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
- Burack, W. R., Cheng, A. M., und Shaw, A. S. (2002). Scaffolds, adaptors and linkers of TCR signaling: theory and practice. *Curr Opin Immunol* 14, 312-316.
- Buttke, T. M., und Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15, 7-10.
- Callard, R., George, A. J., und Stark, J. (1999). Cytokines, chaos, and complexity. *Immunity* 11, 507-513.
- Chalupny, N. J., Ledbetter, J. A., und Kavathas, P. (1991). Association of CD8 with p56lck is required for early T cell signalling events. *Embo J* 10, 1201-1207.
- Chambers, C. A., und Allison, J. P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 9, 396-404.
- Chambers, C. A. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22, 217-223.

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

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., und Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.

Chan, Y. J., Tseng, W. P., und Hayward, G. S. (1996). Two distinct upstream regulatory domains containing multicopy cellular transcription factor binding sites provide basal repression and inducible enhancer characteristics to the immediate-early IES (US3) promoter from human cytomegalovirus. *J Virol* 70, 5312-5328.

Chao, D. T., und Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H., und Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.

Chen, Y. R., Meyer, C. F., Ahmed, B., Yao, Z., und Tan, T. H. (1999). Caspase-mediated cleavage and functional changes of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1). *Oncogene* 18, 7370-7377.

Chen, Y. R., und Tan, T. H. (2000). The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol* 16, 651-662.

Chirmule, N., Avots, A., LakshmiTamma, S. M., Pahwa, S., und Serfling, E. (1999). CD4-mediated signals induce T cell dysfunction in vivo. *J Immunol* 163, 644-649.

Chomczynski, P., und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F., und Serfling, E. (1993). Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 21, 5694-5704.

Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glockner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T., und Serfling, E. (1999a). Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 162, 7294-7301.

Chuvpilo, S., Zimmer, M., Kerstan, A., Glockner, J., Avots, A., Escher, C., Fischer, C., Inashkina, I., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., Schmitt, E., und Serfling, E. (1999b). Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10, 261-269.

Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrsin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M. K., Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., König, T., Avots, A., Schmitt, E., Berberich-Siebelt, F., Schimpl, A., und Serfling, E. (2002). Autoregulation of NFATc1/A Expression Facilitates Effector T Cells to Escape from Rapid Apoptosis. *Immunity* 16, 881-895.

- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.
- Clipstone, N. A., und Crabtree, G. R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697.
- Cohen, G. M., Sun, X. M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D. G., Snowden, R. T., und Dinsdale, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 153, 507-516.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., und Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3, 339-345.
- Cooke, M. P., Abraham, K. M., Forbush, K. A., und Perlmutter, R. M. (1991). Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase (p59fyn). *Cell* 65, 281-291.
- Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N., und Altman, A. (2000). 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* 97, 3394-3399.
- Coyle, A. J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J. A., Gosselin, M., Owen, L. R., Rudd, C. E., und Gutierrez-Ramos, J. C. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95-105.
- Crabtree, G. R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96, 611-614.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., und Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., und Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1-20.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., und Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61, 1-31.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- de la Hera, A., Muller, U., Olsson, C., Isaaz, S., und Tunnacliffe, A. (1991). Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J Exp Med* 173, 7-17.
- de la Pompa, J. L., Timmerman, L. A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A. J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B. L., Crabtree, G. R., und Mak, T. W. (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392, 182-186.

- De Windt, L. J., Lim, H. W., Haq, S., Force, T., und Molkenin, J. D. (2000). Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH₂-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 13571-13579.
- Denu, J. M., und Tanner, K. G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37, 5633-5642.
- Desagher, S., und Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L., und Williams, M. S. (2002). Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med* 195, 59-70.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., und Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.
- Diener, K., Wang, X. S., Chen, C., Meyer, C. F., Keesler, G., Zukowski, M., Tan, T. H., und Yao, Z. (1997). Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9687-9692.
- Dong, C., Yang, D. D., Wysk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., und Flavell, R. A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Dong, C., Yang, D. D., Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Xu, J., Davis, R. J., und Flavell, R. A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 405, 91-94.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., und Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151, 1205-1213.
- Dorn, P., DaSilva, L., Martarano, L., und Derse, D. (1990). Equine infectious anemia virus tat: insights into the structure, function, and evolution of lentivirus trans-activator proteins. *J Virol* 64, 1616-1624.
- Dumont, A., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ueffing, M., Droge, W., und Schmitz, M. L. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18, 747-757.
- Duncliffe, K. N., Bert, A. G., Vadas, M. A., und Cockerill, P. N. (1997). A T cell-specific enhancer in the interleukin-3 locus is activated cooperatively by Oct and NFAT elements within a DNase I-hypersensitive site. *Immunity* 6, 175-185.
- Dustin, M. L., und Chan, A. C. (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* 103, 283-294.
- Dzialo-Hatton, R., Milbrandt, J., Hockett, R. D., Jr., und Weaver, C. T. (2001). Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J Immunol* 166, 4534-4542.

- Ellis, C. A., und Clark, G. (2000). The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 12, 425-434.
- Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., und Kapp, A. (1994). C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* 83, 3324-3331.
- Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W., und Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Ensenat, D., Yao, Z., Wang, X. S., Kori, R., Zhou, G., Lee, S. C., und Tan, T. H. (1999). A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem* 274, 33945-33950.
- Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J., und Terhorst, C. (1994). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 269, 15140-15146.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., und Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- Faris, M., Latinis, K. M., Kempiak, S. J., Koretzky, G. A., und Nel, A. (1998). Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol Cell Biol* 18, 5414-5424.
- Farrar, M. A., Alberol, I., und Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383, 178-181.
- Fields, P. E., Gajewski, T. F., und Fitch, F. W. (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1276-1278.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248-253.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., und Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J., und O'Neill, E. A. (1994). Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *Embo J* 13, 861-870.
- Frearson, J. A., und Alexander, D. R. (1996). Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today* 17, 385-391.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., und Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1

immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.

Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M., und Tschopp, J. (2001). Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 496, 121-127.

Ghosh, S., May, M. J., und Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.

Gillis, S., Mochizuki, D. Y., Conlon, P. J., Hefeneider, S. H., Ramthun, C. A., Gillis, A. E., Frank, M. B., Henney, C. S., und Watson, J. D. (1982). Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol Rev* 63, 167-209.

Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., und Anderson, D. M. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 14, 3654-3663.

Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R., und Turner, J. M. (1991). Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 64, 511-520.

Glimcher, L. H., und Singh, H. (1999). Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together. *Cell* 96, 13-23.

Gobel, T. W., und Bolliger, L. (2000). Evolution of the T cell receptor signal transduction units. *Curr Top Microbiol Immunol* 248, 303-320.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., und Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

Green, D. R., und Scott, D. W. (1994). Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 6, 476-487.

Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.

Greenspan, H. C., und Aruoma, O. I. (1994). Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol Today* 15, 209-213.

Griffith, C. E., Zhang, W., und Wange, R. L. (1998). ZAP-70-dependent and -independent activation of Erk in Jurkat T cells. Differences in signaling induced by H₂O₂ and Cd3 cross-linking. *J Biol Chem* 273, 10771-10776.

Gross, A., McDonnell, J. M., und Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., und Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J., und Gerondakis, S. (1999). Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 400-411.
- Guerder, S., Meyerhoff, J., und Flavell, R. (1994). The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* 1, 155-166.
- Hacker, J., und Heesemann, J. (2000). *Molekulare Infektionsbiologie: Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen*, 1. Aufl. (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
- Hagemann, C., und Rapp, U. R. (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253, 34-46.
- Hagemann, C., und Blank, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13, 863-875.
- Hallberg, B., Rayter, S. I., und Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* 269, 3913-3916.
- Han, J., und Ulevitch, R. J. (1999). Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat Cell Biol* 1, E39-40.
- Hatada, E. N., Krappmann, D., und Scheidereit, C. (2000). NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12, 52-58.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., und Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Dienz, O., Droge, W., und Schmitz, M. L. (2000a). Tyrosine-phosphorylated Vav1 as a point of integration for T-cell receptor- and CD28-mediated activation of JNK, p38, and interleukin-2 transcription. *J Biol Chem* 275, 18160-18171.
- Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ushmorov, A., Dienz, O., Wing-Lan Leung, I., Lassam, N., Scheidereit, C., Droge, W., und Schmitz, M. L. (2000b). Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 20, 2556-2568.
- Herman, A., Kappler, J. W., Marrack, P., und Pullen, A. M. (1991). Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 9, 745-772.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hetts, S. W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* 279, 300-307.

- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Teague, T. K., Henson, P., Day, B. J., Kappler, J., und Marrack, P. C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, 735-744.
- Hodge, M. R., Chun, H. J., Rengarajan, J., Alt, A., Lieberson, R., und Glimcher, L. H. (1996a). NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 274, 1903-1905.
- Hodge, M. R., Ranger, A. M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M. J., und Glimcher, L. H. (1996b). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4, 397-405.
- Hoey, T., Sun, Y. L., Williamson, K., und Xu, X. (1995). Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 2, 461-472.
- Hoffmeyer, A., Avots, A., Flory, E., Weber, C. K., Serfling, E., und Rapp, U. R. (1998). The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 10112-10119.
- Holcik, M., und Korneluk, R. G. (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 550-556.
- Holtz-Heppelmann, C. J., Algeciras, A., Badley, A. D., und Paya, C. V. (1998). Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem* 273, 4416-4423.
- Hotz, M. A., Gong, J., Traganos, F., und Darzynkiewicz, Z. (1994). Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry* 15, 237-244.
- Hu, M. C., Qiu, W. R., Wang, X., Meyer, C. F., und Tan, T. H. (1996). Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev* 10, 2251-2264.
- Hu, M. C., Wang, Y., Qiu, W. R., Mikhail, A., Meyer, C. F., und Tan, T. H. (1999). Hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1) stress response signaling pathway activates I κ B kinases (IKK-alpha/beta) and IKK-beta is a developmentally regulated protein kinase. *Oncogene* 18, 5514-5524.
- Huang, C., Zhang, Z., Ding, M., Li, J., Ye, J., Leonard, S. S., Shen, H. M., Butterworth, L., Lu, Y., Costa, M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Vallyathan, V., und Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem* 275, 32516-32522.
- Huang, D. C., und Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., und Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Ichijo, H. (1999). From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18, 6087-6093.

- Ihle, J. N., und Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.
- Imada, K., und Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37, 1-11.
- Inaba, M., Kurasawa, K., Mamura, M., Kumano, K., Saito, Y., und Iwamoto, I. (1999). Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol* 163, 1315-1320.
- Irving, B. A., Chan, A. C., und Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 177, 1093-1103.
- Ito, Y., Pandey, P., Sathyanarayana, P., Ling, P., Rana, A., Weichselbaum, R., Tan, T. H., Kufe, D., und Kharbanda, S. (2001). Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 and c-Abl tyrosine kinase in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 276, 18130-18138.
- Jain, J., Burgeon, E., Badalian, T. M., Hogan, P. G., und Rao, A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem* 270, 4138-4145.
- Jaken, S., und Parker, P. J. (2000). Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 245-254.
- Janeway, C. A., und Travers, P. (1997). *Immunologie*, 2. Aufl. (Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag).
- Janeway, C. A., Jr., und Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76, 275-285.
- Jankovic, D., Liu, Z., und Gause, W. C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 22, 450-457.
- Janssen, O., Wesselborg, S., Heckl-Ostreicher, B., Pechhold, K., Bender, A., Schondelmaier, S., Moldenhauer, G., und Kabelitz, D. (1991). T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells. *J Immunol* 146, 35-39.
- Janssen, O., Sanzenbacher, R., und Kabelitz, D. (2000). Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* 301, 85-99.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., und Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294.
- Judd, B. A., und Koretzky, G. A. (2001). The role of the adapter molecule SLP-76 in platelet function. *Oncogene* 20, 6291-6299.
- Kamata, H., und Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11, 1-14.
- Kane, L. P., Lin, J., und Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 12, 242-249.

- Kang, S. M., Beverly, B., Tran, A. C., Brorson, K., Schwartz, R. H., und Lenardo, M. J. (1992). Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257, 1134-1138.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., und Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.
- Karin, M. (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 127-134.
- Karin, M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874.
- Karin, M., und Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- Kasibhatla, S., Genestier, L., und Green, D. R. (1999). Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 274, 987-992.
- Kataoka, T., Ito, M., Budd, R. C., Tschopp, J., und Nagai, K. (2002). Expression level of c-FLIP versus Fas determines susceptibility to Fas ligand-induced cell death in murine thymoma EL-4 cells. *Exp Cell Res* 273, 256-264.
- Katz, P., Whalen, G., und Kehrl, J. H. (1994). Differential expression of a novel protein kinase in human B lymphocytes. Preferential localization in the germinal center. *J Biol Chem* 269, 16802-16809.
- Kel, A., Kel-Margoulis, O., Babenko, V., und Wingender, E. (1999). Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J Mol Biol* 288, 353-376.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., und Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T. D., Feller, S. M., Weichselbaum, R. R., und Kufe, D. W. (1995). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 376, 785-788.
- Kharbanda, S., Bharti, A., Pei, D., Wang, J., Pandey, P., Ren, R., Weichselbaum, R., Walsh, C. T., und Kufe, D. (1996). The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6898-6901.
- Kharbanda, S., Yuan, Z. M., Weichselbaum, R., und Kufe, D. (1998). Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* 17, 3309-3318.
- Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C. A., und Nel, A. E. (2000). The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165, 6933-6940.

- Kiefer, F., Tibbles, L. A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B. W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J. R., und Iscove, N. N. (1996). HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *Embo J* 15, 7013-7025.
- Kiefer, F., Tibbles, L. A., Lassam, N., Zanke, B., Iscove, N., und Woodgett, J. R. (1997). Novel components of mammalian stress-activated protein kinase cascades. *Biochem Soc Trans* 25, 491-498.
- Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I., und Krammer, P. H. (2000). TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165, 6293-6300.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S., und Schimpl, A. (1995). Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25, 2572-2577.
- Knodel, M., Kuss, A. W., Lindemann, D., Berberich, I., und Schimpl, A. (1999). Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur J Immunol* 29, 2988-2998.
- Kolenko, V., Bloom, T., Rayman, P., Bukowski, R., Hsi, E., und Finke, J. (1999). Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. *J Immunol* 163, 590-598.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., und van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., und Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 8247-8254.
- Kuang, A. A., Cado, D., und Winoto, A. (1999). Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo. *Eur J Immunol* 29, 3722-3728.
- Kuhnel, F., Zender, L., Paul, Y., Tietze, M. K., Trautwein, C., Manns, M., und Kubicka, S. (2000). NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275, 6421-6427.
- Kuss, A. W., Knodel, M., Berberich-Siebelt, F., Lindemann, D., Schimpl, A., und Berberich, I. (1999). A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol* 29, 3077-3088.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.

- Kyriakis, J. M. (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem* 274, 5259-5262.
- Lafferty, K. J., und Cunningham, A. J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53, 27-42.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G., und Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96, 1-4.
- Larsen, C. P., Ritchie, S. C., Pearson, T. C., Linsley, P. S., und Lowry, R. P. (1992). Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 176, 1215-1220.
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., und Koretzky, G. A. (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 272, 31427-31434.
- Lee, K., und Esselman, W. J. (2001). cAMP potentiates H₂O₂-induced ERK1/2 phosphorylation without the requirement for MEK1/2 phosphorylation. *Cell Signal* 13, 645-652.
- Leist, M., und Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Lenardo, M. J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., und Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Leung, I. W., und Lassam, N. (2001). The kinase activation loop is the key to mixed lineage kinase-3 activation via both autophosphorylation and hematopoietic progenitor kinase 1 phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 1961-1967.
- Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., Flavell, R., und Bottomly, K. (1993). Role of dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol* 151, 6742-6750.
- Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A. W., Williams, D. A., Davis, R. J., Ghosh, S., und Flavell, R. A. (2000). Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* 288, 2219-2222.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., und Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, W., Whaley, C. D., Mondino, A., und Mueller, D. L. (1996). Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* 271, 1272-1276.
- Lin, X., O'Mahony, A., Mu, Y., Geleziunas, R., und Greene, W. C. (2000). Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol Cell Biol* 20, 2933-2940.

- Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S., und Mulligan, R. C. (1997). Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol Med* 3, 466-476.
- Ling, P., Yao, Z., Meyer, C. F., Wang, X. S., Oehrl, W., Feller, S. M., und Tan, T. H. (1999). Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 with adapter proteins Crk and CrkL leads to synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 19, 1359-1368.
- Ling, P., Meyer, C. F., Redmond, L. P., Shui, J. W., Davis, B., Rich, R. R., Hu, M. C., Wange, R. L., und Tan, T. H. (2001). Involvement of hematopoietic progenitor kinase 1 in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 18908-18914.
- Liou, J., Kiefer, F., Dang, A., Hashimoto, A., Cobb, M. H., Kurosaki, T., und Weiss, A. (2000). HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1. *Immunity* 12, 399-408.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., und Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
- Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H., und Ke, N. J. (1999a). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 260, 712-717.
- Liu, S. K., Smith, C. A., Arnold, R., Kiefer, F., und McGlade, C. J. (2000a). The adaptor protein Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is implicated in coupling hemopoietic progenitor kinase-1 to the activated TCR. *J Immunol* 165, 1417-1426.
- Liu, S. K., Berry, D. M., und McGlade, C. J. (2001). The role of Gads in hematopoietic cell signalling. *Oncogene* 20, 6284-6290.
- Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K. M., Linsley, P. S., und Janeway, C. A., Jr. (1992). Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 175, 437-445.
- Liu, Y., Liu, Y. C., Meller, N., Giampa, L., Elly, C., Doyle, M., und Altman, A. (1999b). Protein kinase C activation inhibits tyrosine phosphorylation of Cbl and its recruitment of Src homology 2 domain-containing proteins. *J Immunol* 162, 7095-7101.
- Liu, Y., Witte, S., Liu, Y. C., Doyle, M., Elly, C., und Altman, A. (2000b). Regulation of protein kinase C θ function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 3603-3609.
- Li-Weber, M., Laur, O., und Krammer, P. H. (1999). Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur J Immunol* 29, 3017-3027.
- Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G., und Revillard, J. P. (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21, 275-283.
- Lockshin, R. A., und Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 545-550.

- Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A. S., und Rao, A. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7214-7219.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., und Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* *70*, 431-442.
- Lu, B., Yu, H., Chow, C., Li, B., Zheng, W., Davis, R. J., und Flavell, R. A. (2001). GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity* *14*, 583-590.
- Luo, C., Burgeon, E., Carew, J. A., McCaffrey, P. G., Badalian, T. M., Lane, W. S., Hogan, P. G., und Rao, A. (1996a). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol* *16*, 3955-3966.
- Luo, C., Shaw, K. T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B. A., Hogan, P. G., und Rao, A. (1996b). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8907-8912.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Ma, W., Xia, C., Ling, P., Qiu, M., Luo, Y., Tan, T. H., und Liu, M. (2001). Leukocyte-specific adaptor protein Grap2 interacts with hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) to activate JNK signaling pathway in T lymphocytes. *Oncogene* *20*, 1703-1714.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., und Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* *20*, 2476-2489.
- Majno, G., und Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* *146*, 3-15.
- Manolios, N., Letourneur, F., Bonifacio, J. S., und Klausner, R. D. (1991). Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *Embo J* *10*, 1643-1651.
- Marienfeld, R., Neumann, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Kneitz, B., Avots, A., Schimpl, A., und Serfling, E. (1997). Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF-kappa B inhibitors, but not with the processing of p105/NF-kappa B1 in T cells. *Eur J Immunol* *27*, 1601-1609.
- Marshall, C. J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* *4*, 82-89.
- Martin, S. J., Green, D. R., und Cotter, T. G. (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* *19*, 26-30.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., und Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general

- feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Martinou, J. C., und Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 63-67.
- Masuda, E. S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K., und Arai, N. (1995). NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* 15, 2697-2706.
- Mattila, P. S., Ullman, K. S., Fiering, S., Emmel, E. A., McCutcheon, M., Crabtree, G. R., und Herzenberg, L. A. (1990). The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *Embo J* 9, 4425-4433.
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., und Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9015-9019.
- Maundrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschart, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J. C., und Arkinstall, S. (1997). Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* 272, 25238-25242.
- McAdam, A. J., Schweitzer, A. N., und Sharpe, A. H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 165, 231-247.
- McCaffrey, P. G., Perrino, B. A., Soderling, T. R., und Rao, A. (1993). NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 268, 3747-3752.
- Meyer, M., Schreck, R., und Baeuerle, P. A. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* 12, 2005-2015.
- Miyakawa, H., Woo, S. K., Dahl, S. C., Handler, J. S., und Kwon, H. M. (1999). Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2538-2542.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., und Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., und Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385, 83-86.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., und Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190.

- Mosmann, T. R., und Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., und Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Musci, M. A., Latinis, K. M., und Koretzky, G. A. (1997). Signaling events in T lymphocytes leading to cellular activation or programmed cell death. *Clin Immunol Immunopathol* 83, 205-222.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata, Y., Kiefer, F., Watanabe, T., und Todokoro, K. (1999). Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin. *Blood* 93, 3347-3354.
- Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9, 161-167.
- Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T., und Honjo, T. (1998). Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10, 1563-1572.
- Northrop, J. P., Ho, S. N., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Nolan, G. P., Admon, A., und Crabtree, G. R. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.
- Noselli, S., und Perrimon, N. (2000). Signal transduction. Are there close encounters between signaling pathways? *Science* 290, 68-69.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., und Huang, D. C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17, 384-395.
- Oehrl, W., Kardinal, C., Ruf, S., Adermann, K., Groffen, J., Feng, G. S., Blenis, J., Tan, T. H., und Feller, S. M. (1998). The germinal center kinase (GCK)-related protein kinases HPK1 and KHS are candidates for highly selective signal transducers of Crk family adapter proteins. *Oncogene* 17, 1893-1901.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., und Pawson, T. (1993). A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 73, 179-191.
- O'Shea, J. J., Ma, A., und Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nature Rev Immunol* 2, 37-45.
- Papiernik, M., do Carmo Leite-de-Moraes, M., Pontoux, C., Joret, A. M., Rocha, B., Penit, C., und Dy, M. (1997). T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J Immunol* 158, 4642-4653.
- Papiernik, M., und Banz, A. (2001). Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25. *Microbes Infect* 3, 937-945.

- Parolini, I., Topa, S., Sorice, M., Pace, A., Ceddia, P., Montesoro, E., Pavan, A., Lisanti, M. P., Peschle, C., und Sargiacomo, M. (1999). Phorbol ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 274, 14176-14187.
- Pawson, T. (1994). Regulation of the Ras signalling pathway by protein-tyrosine kinases. *Biochem Soc Trans* 22, 455-460.
- Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M., und Glimcher, L. H. (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14, 13-20.
- Peters, R. T., Liao, S. M., und Maniatis, T. (2000). IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkkappaB kinase complex. *Mol Cell* 5, 513-522.
- Porter, C. M., Havens, M. A., und Clipstone, N. A. (2000). Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem* 275, 3543-3551.
- Quillet-Mary, A., Jaffrezou, J. P., Mansat, V., Bordier, C., Naval, J., und Laurent, G. (1997). Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 21388-21395.
- Raabe, T., Olivier, J. P., Dickson, B., Liu, X., Gish, G. D., Pawson, T., und Hafen, E. (1995). Biochemical and genetic analysis of the Drk SH2/SH3 adaptor protein of *Drosophila*. *Embo J* 14, 2509-2518.
- Ramsdell, F., Seaman, M. S., Miller, R. E., Picha, K. S., Kennedy, M. K., und Lynch, D. H. (1994). Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* 6, 1545-1553.
- Ranger, A. M., Grusby, M. J., Hodge, M. R., Gravallesse, E. M., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H. S., und Glimcher, L. H. (1998a). The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186-190.
- Ranger, A. M., Hodge, M. R., Gravallesse, E. M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F. W., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M., und Glimcher, L. H. (1998b). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 8, 125-134.
- Ranger, A. M., Oukka, M., Rengarajan, J., und Glimcher, L. H. (1998c). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9, 627-635.
- Ranger, A. M., Gerstenfeld, L. C., Wang, J., Kon, T., Bae, H., Gravallesse, E. M., Glimcher, M. J., und Glimcher, L. H. (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191, 9-22.
- Rao, A., Luo, C., und Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-747.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., und Abbas, A. K. (1999). Genetic models of abnormal apoptosis in lymphocytes. *Immunol Rev* 169, 273-282.

- Reiner, S. L. (2001). Helper T cell differentiation, inside and out. *Curr Opin Immunol* 13, 351-355.
- Remacle, J., Raes, M., Toussaint, O., Renard, P., and Rao, G. (1995). Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res* 316, 103-122.
- Rengarajan, J., Mittelstadt, P. R., Mages, H. W., Gerth, A. J., Kroczeck, R. A., Ashwell, J. D., and Glimcher, L. H. (2000). Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity* 12, 293-300.
- Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R., and Kwon, J. (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000, PE1.
- Rincon, M., and Flavell, R. A. (1997). Transcription mediated by NFAT is highly inducible in effector CD4+ T helper 2 (Th2) cells but not in Th1 cells. *Mol Cell Biol* 17, 1522-1534.
- Rincon, M., Conze, D., Weiss, L., Diehl, N. L., Fortner, K. A., Yang, D., Flavell, R. A., Enslin, H., Whitmarsh, A., and Davis, R. J. (2000). Conference highlight: do T cells care about the mitogen-activated protein kinase signalling pathways? *Immunol Cell Biol* 78, 166-175.
- Rincon, M., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2001). Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20, 2490-2497.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., and Downward, J. (1996). Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J* 15, 2442-2451.
- Ron, D., Napolitano, E. W., Voronova, A., Vasquez, N. J., Roberts, D. N., Calio, B. L., Caothien, R. H., Pettiford, S. M., Wellik, S., Mandac, J. B., and Kauvar, L. M. (1999). Direct interaction in T-cells between thetaPKC and the tyrosine kinase p59fyn. *J Biol Chem* 274, 19003-19010.
- Rooney, J. W., Hoey, T., and Glimcher, L. H. (1995a). Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* 2, 473-483.
- Rooney, J. W., Sun, Y. L., Glimcher, L. H., and Hoey, T. (1995b). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 15, 6299-6310.
- Roy, S., and Nicholson, D. W. (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192, 21-26.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., and Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85.
- Ruland, J., Duncan, G. S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D. G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P. S., and Mak, T. W. (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104, 33-42.
- Russell, J. H., White, C. L., Loh, D. Y., and Meleedy-Rey, P. (1991). Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2151-2155.

- Russell, J. H. (1995). Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 7, 382-388.
- Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R., und Vousden, K. H. (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404, 892-897.
- Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J. P., Jochum, W., Wagner, E. F., und Karin, M. (1999). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* 9, 116-125.
- Sabapathy, K., Kallunki, T., David, J. P., Graef, I., Karin, M., und Wagner, E. F. (2001). c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J Exp Med* 193, 317-328.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., und Toda, M. (1995). 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* 155, 1151-1164.
- Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., und Zon, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372, 794-798.
- Sant'Angelo, D. B., Waterbury, G., Preston-Hurlburt, P., Yoon, S. T., Medzhitov, R., Hong, S. C., und Janeway, C. A., Jr. (1996). The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. *Immunity* 4, 367-376.
- Santini, M. P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L., und Dotto, G. P. (2001). Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9575-9580.
- Santner-Nanan, B., Wagner, S., Wolf, M., Kneitz, B., Hunig, T., und Schimpl, A. (1998). In vitro skewing of TCR transgenic CD4+ T cells from interleukin-2 deficient mice towards Th1 and Th2 in the absence of exogenous interleukin-2. *Eur Cytokine Netw* 9, 17-25.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S., und Reed, J. C. (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268, 411-415.
- Sauer, K., Liou, J., Singh, S. B., Yablonski, D., Weiss, A., und Perlmutter, R. M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 45207-45216.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., und Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131-136.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1999a). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.

- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., und Peter, M. E. (1999b). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-22538.
- Schaeffer, H. J., und Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-2444.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., und Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 1123-1136.
- Schreiber, S. L. (1992). Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell* 70, 365-368.
- Schuh, K., Avots, A., Tony, H. P., Serfling, E., und Kneitz, C. (1996). Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk Lymphoma* 23, 583-592.
- Schuh, K., Kneitz, B., Heyer, J., Siebelt, F., Fischer, C., Jankevics, E., Rude, E., Schmitt, E., Schimpl, A., und Serfling, E. (1997). NF-ATp plays a prominent role in the transcriptional induction of Th2-type lymphokines. *Immunol Lett* 57, 171-175.
- Schuh, K., Kneitz, B., Heyer, J., Bomhardt, U., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., Pfeffer, K., Muller-Hermelink, H. K., Schimpl, A., und Serfling, E. (1998a). Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol* 28, 2456-2466.
- Schuh, K., Twardzik, T., Kneitz, B., Heyer, J., Schimpl, A., und Serfling, E. (1998b). The interleukin 2 receptor alpha chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 188, 1369-1373.
- Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M. K., Schimpl, A., Avots, A., und Serfling, E. (2002). Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood* 100, 954-960.
- Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W., und Krammer, P. H. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127, 15-20.
- Schulze-Osthoff, K., Los, M., und Baeuerle, P. A. (1995). Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50, 735-741.
- Schwartz, L. M., und Osborne, B. A. (1993). Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14, 582-590.
- Schwartz, R. H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184, 1-8.
- Sen, R., und Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.

- Serfling, E., Avots, A., und Neumann, M. (1995). The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1263, 181-200.
- Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T., und Avots, A. (2000). The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498, 1-18.
- Sha, W. C. (1998). Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *J Exp Med* 187, 143-146.
- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., und Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202-205.
- Shi, C. S., und Kehrl, J. H. (1997). Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, but not NF-kappaB, by the tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 through a TNF receptor-associated factor 2- and germinal center kinase related-dependent pathway. *J Biol Chem* 272, 32102-32107.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., und Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Simon, M. A., Dodson, G. S., und Rubin, G. M. (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* 73, 169-177.
- Smith, D. B., und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., und Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23, 628-633.
- Sorensen, A. B., Duch, M., Amtoft, H. W., Jorgensen, P., und Pedersen, F. S. (1996). Sequence tags of provirus integration sites in DNAs of tumors induced by the murine retrovirus SL3-3. *J Virol* 70, 4063-4070.
- Stancovski, I., und Baltimore, D. (1997). NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 91, 299-302.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., und Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 8359-8362.
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., und Griffiths, G. M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.
- Strasser, A., O'Connor, L., und Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., und Ben-Neriah, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77, 727-736.

- Su, Y. C., Han, J., Xu, S., Cobb, M., und Skolnik, E. Y. (1997). NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *Embo J* 16, 1279-1290.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., und Nagata, S. (1995). Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 154, 3806-3813.
- Suhasini, M., Reddy, C. D., Reddy, E. P., DiDonato, J. A., und Pilz, R. B. (1997). cAMP-induced NF-kappaB (p50/relB) binding to a c-myc intronic enhancer correlates with c-myc up-regulation and inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene* 15, 1859-1870.
- Sun, J., Leahy, D. J., und Kavathas, P. B. (1995). Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J Exp Med* 182, 1275-1280.
- Sun, X., Majumder, P., Shioya, H., Wu, F., Kumar, S., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., und Kufe, D. (2000a). Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275, 17237-17240.
- Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., und Littman, D. R. (2000b). PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404, 402-407.
- Sundstrom, C., und Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., und Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., und Takahashi, R. (2001a). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., und Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-8667.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., und Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., und Sugamura, K. (1992). Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257, 379-382.
- Taniguchi, T., und Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73, 5-8.

- Tatla, S., Woodhead, V., Foreman, J. C., und Chain, B. M. (1999). The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic Biol Med* 26, 14-24.
- Thornberry, N. A., und Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tibbles, L. A., Ing, Y. L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J. R., und Lassam, N. J. (1996). MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* 15, 7026-7035.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., und Davis, R. J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
- Tsai, E. Y., Jain, J., Pesavento, P. A., Rao, A., und Goldfeld, A. E. (1996a). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol Cell Biol* 16, 459-467.
- Tsai, E. Y., Yie, J., Thanos, D., und Goldfeld, A. E. (1996b). Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol* 16, 5232-5244.
- Tsuji, S., Okamoto, M., Yamada, K., Okamoto, N., Goitsuka, R., Arnold, R., Kiefer, F., und Kitamura, D. (2001). B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Exp Med* 194, 529-539.
- Tsytyskova, A. V., Tsitsikov, E. N., und Geha, R. S. (1996). The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J Biol Chem* 271, 3763-3770.
- Tung, R. M., und Blenis, J. (1997). A novel human SPS1/STE20 homologue, KHS, activates Jun N-terminal kinase. *Oncogene* 14, 653-659.
- Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L., und Crabtree, G. R. (1990). Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8, 421-452.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., und Griendling, K. K. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273, 15022-15029.
- Uzzo, R. G., Dulin, N., Bloom, T., Bukowski, R., Finke, J. H., und Kolenko, V. (2001). Inhibition of NFkappaB induces caspase-independent cell death in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 895-899.
- van der Geer, P., Hunter, T., und Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10, 251-337.
- van Leeuwen, J. E., und Samelson, L. E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11, 242-248.

- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J. D., Nelson, B. H., Abbas, A. K., und Baltimore, D. (1999). Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* *11*, 281-288.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., und Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* *102*, 43-53.
- Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P., und Altman, A. (2000). A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* *12*, 151-160.
- Villalba, M., Bushway, P., und Altman, A. (2001). Protein kinase C-theta mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of BAD. *J Immunol* *166*, 5955-5963.
- Villunger, A., O'Reilly, L. A., Holler, N., Adams, J., und Strasser, A. (2000). Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J Exp Med* *192*, 647-658.
- Voss, S. D., Leary, T. P., Sondel, P. M., und Robb, R. J. (1993). Identification of a direct interaction between interleukin 2 and the p64 interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 2428-2432.
- Wang, D., und Sul, H. S. (1998). Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* *273*, 25420-25426.
- Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C., Yao, Z., und Tan, T. H. (1997). Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem* *272*, 22771-22775.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., und Holbrook, N. J. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* *333* (Pt 2), 291-300.
- Watanabe, N., Arase, H., Kurasawa, K., Iwamoto, I., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Miyatake, S., und Saito, T. (1997). Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and - independent activation-induced cell death. *Eur J Immunol* *27*, 1858-1864.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., und Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.
- Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D., und Stobo, J. (1984). Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 4169-4173.
- Weiss, A., und Imboden, J. B. (1987). Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv Immunol* *41*, 1-38.

- Weiss, A., und Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Wennstrom, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M., Jackson, T., Claesson-Welsh, L., und Stephens, L. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol* 4, 385-393.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y., und Karin, M. (1998). Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J* 17, 3101-3111.
- Whitmarsh, A. J., und Davis, R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23, 481-485.
- Whitmarsh, A. J., und Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1172-1183.
- Wiese, A. G., Pacifici, R. E., und Davies, K. J. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 318, 231-240.
- Williams, M. S., und Henkart, P. A. (1996). Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas. *J Immunol* 157, 2395-2402.
- Willis, T. G., Jadayel, D. M., Du, M. Q., Peng, H., Perry, A. R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P. G., und Dyer, M. J. (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35-45.
- Wonerow, P., und Watson, S. P. (2001). The transmembrane adapter LAT plays a central role in immune receptor signalling. *Oncogene* 20, 6273-6283.
- Woronicz, J. D., Lina, A., Calnan, B. J., Szychowski, S., Cheng, L., und Winoto, A. (1995). Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 6364-6376.
- Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., und Goeddel, D. V. (1997). IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278, 866-869.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., und Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.
- Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk, D. C., Curran, T., und Rao, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272, 892-895.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., und Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

- Yamamoto, K., Ichijo, H., und Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478.
- Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincon, M., und Flavell, R. A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9, 575-585.
- Yao, Z., Zhou, G., Wang, X. S., Brown, A., Diener, K., Gan, H., und Tan, T. H. (1999). A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 2118-2125.
- Yoder, J., Pham, C., Iizuka, Y. M., Kanagawa, O., Liu, S. K., McGlade, J., und Cheng, A. M. (2001). Requirement for the SLP-76 adaptor GADS in T cell development. *Science* 291, 1987-1991.
- Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L. E., Wakeham, A. C., Bouchard, D., Kong, Y. Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., Ohashi, P. S., Penninger, J. M., Crabtree, G. R., und Mak, T. W. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8, 115-124.
- Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G. S., Hui, A., McCabe, S. M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C. L., Van, G., Mak, T. W., und et al. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.
- Youn, H. D., Chatila, T. A., und Liu, J. O. (2000). Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *Embo J* 19, 4323-4331.
- Yu, J., Riou, C., Davidson, D., Minhas, R., Robson, J. D., Julius, M., Arnold, R., Kiefer, F., und Veillette, A. (2001). Synergistic regulation of immunoreceptor signaling by SLP-76-related adaptor Clnk and serine/threonine protein kinase HPK-1. *Mol Cell Biol* 21, 6102-6112.
- Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J. H., und Kyriakis, J. M. (1998). Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem* 273, 22681-22692.
- Yujiri, T., Fanger, G. R., Garrington, T. P., Schlesinger, T. K., Gibson, S., und Johnson, G. L. (1999). MEK kinase 1 (MEKK1) transduces c-Jun NH2-terminal kinase activation in response to changes in the microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem* 274, 12605-12610.
- Yurochko, A. D., Kowalik, T. F., Huong, S. M., und Huang, E. S. (1995). Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol* 69, 5391-5400.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., und Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.

Zhang, J., Gao, J. X., Salojin, K., Shao, Q., Grattan, M., Meagher, C., Laird, D. W., und Delovitch, T. L. (2000). Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med* *191*, 1017-1030.

Zhang, W., und Samelson, L. E. (2000). The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* *12*, 35-41.

Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R. W., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J. C., Green, D., und Swain, S. L. (1997). Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* *185*, 1837-1849.

Zhou, G., Lee, S. C., Yao, Z., und Tan, T. H. (1999). Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade. *J Biol Chem* *274*, 13133-13138.

Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., und McKeon, F. (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* *93*, 851-861.

Zong, W. X., Edelstein, L. C., Chen, C., Bash, J., und Gelinas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* *13*, 382-387.

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., und Thompson, C. B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* *15*, 1481-1486.

8. Lebenslauf

Name:	Schulze-Lührmann	
Geburtsname:	Schulze	
Vorname:	Jan	
Geburtstag:	15.09.1972	
Geburtsort:	Schlema	
Familienstand:	verheiratet seit dem 25.05.2001	
Schulbildung:	1979-1982	Erich-Weinert-OS Schneeberg
	1982-1989	POS Artur Becker Aue-Eichert Abschluss: Mittlere Reife
	1989-1991	Erweiterte Oberschule Aue Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Hochschulstudium:	1991-1996	Universität Leipzig, Fachrichtung: Biologie (Diplom), Abschluss: Diplom-Biologe
Studienschwerpunkte:	Immunologie, Genetik, Tierphysiologie, Informatik	
Diplomarbeit:	„Untersuchungen zur Apoptose-Induktion durch Wasserstoffperoxid und deren Modulation durch Antioxidantien“ bei Prof. Dr. K. Drößler und Dr. M. Ladusch	
Berufspraxis:	01.10.-31.12.1996	wiss. Hilfskraft an der Universität Leipzig
	ab 01.02.1998	Promotion an der Universität Würzburg, Abt. Molekulare Pathologie bei Prof. Dr. E. Serfling
Grundwehrdienst:	01.01.-31.10.1997	Tautenhain / Dessau Material-, Fremdleistungs- und Personalbuchhalter in der KLV

Würzburg, am 19.05.2002

9. Eigene Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

Schulze-Lührmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., und Avots, A., Serfling, E. (2002). Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood* 100, 954-960.

Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrsin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M.K., Schulze-Lührmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., König, T., Avots, A., Schmitt, E., Berberich-Siebelt, F., Schimpl, A., und Serfling, E. (2002). Autoregulation of NFATc1/A Expression Facilitates Effector T Cells to Escape from Rapid Apoptosis. *Immunity* 16, 881-895.

Poster:

Twardzik, T., Avots, A., Bommhardt, U., Schulze, J., Marx, A., Erb, K. and Serfling, E. Effects of NF-AT Deficiency on the Lymphoid System. STS Meeting 1999, Berlin

Schulze, J., Serfling, E. and Avots, A. P23 – Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK-1) promotes Activation Induced Cell Death (AICD) of CD4⁺ T-cells. Millennium Meeting Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes 2.- 4.11.2000, Berlin-Müggelsee, pp. 118.

Schulze, J., Santner-Nanan, B., Schimpl, A., Serfling, E. and Avots, A. D33 – Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK-1) promotes Activation Induced Cell Death (AICD) of CD4⁺ T-cells. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies of Immunology 29.11.- 2.12.2000, Düsseldorf, pp.82.

Schulze-Lührmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., Avots, A. and Serfling, E. P21 – Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) supports Activation Induced Cell Death (AICD) of T Lymphocytes. 32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology 26.- 29.09.2001, Dresden, pp.62.

Vorträge:

Schulze, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., Avots, A. and Serfling, E. Hematopoietic Progenitor Kinase 1 (HPK1) and NF-AT transcription factors in the Activation Induced Cell Death of CD4⁺ T-cells. First Leipzig Meeting on Cellular Communication – New Aspects in Immunology and Virology 14.- 16.12.2000, Leipzig

Schulze-Lührmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., Avots, A. and Serfling, E. Workshop P – Apoptosis. P21 – Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) supports Activation Induced Cell Death (AICD) of T Lymphocytes. 32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology 27.09.2001, Dresden, pp.62.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Edgar Serfling danke ich ganz herzlich für das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die Möglichkeit, ein für unser Labor recht exotisches Thema zu erforschen und auf Kongressen vorzustellen. Ganz besonders hervorzuheben ist seine - gerade in der letzten Phase meiner Promotion - geleistete vorbehaltlose Unterstützung.

Meinem Betreuer Dr. Andris Avots danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie, die Vermittlung seines umfangreichen methodischen Erfahrungsschatzes und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich für seine Bereitschaft danken, diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Dr. Friedemann Kiefer danke ich herzlichst für seine Unterstützung, vor allem in einer schweren Phase des Projektes, als er mich bestärkte, den eingeschlagenen Weg fortzuführen.

Den Laborkollegen der Molekularen Pathologie spreche ich meinen Dank für die freundliche Aufnahme, die Hilfestellung bei der Lösung aller möglicher technischer Probleme und die fruchtbaren Diskussionen aus.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Brigitte Santner-Nanan, Mithilesh Kumar Jha, Christa Kraus, Dr. Ingolf Berberich, Thomas König, Olga Reimer, Ilona Pietrowski und Doris Michel für die Hilfe und Zusammenarbeit bei Luziferase-Reporter-Gen-Assays, der Isolierung sowie *in vitro* Differenzierung primärer CD4⁺ T-Lymphozyten und der Analyse des AICD NFATp-defizienter T-Zellen sowie für die Einführung in die Techniken des retroviralen Gentransfers.

Inge, Anne-Katrin und Jörg danke ich von ganzem Herzen für das kritische und geduldige Korrekturlesen dieser Promotions-Arbeit.

Ohne die Unterstützung, Freundschaft, Liebe aber auch kleine Stupsen durch meine Frau, die mir stets den Rücken stärkte, wäre die Promotionsarbeit nicht in diesem Umfang möglich gewesen. Anja, ich habe Dich dolle lieb!