

**Mechanismen der TZR-abhängigen und
-unabhängigen Aktivierung
primärer T-Zellen der Ratte durch CD28**

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

vorgelegt von
Astrid Bischof
aus Fulda

Würzburg 1999

eingereicht am: 23. NOV. 1999

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Göbel

Gutachter: Prof. Dr. T. Hünig

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

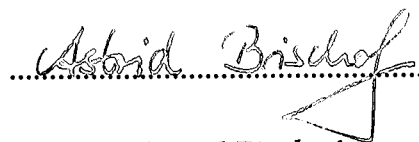
Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in anderer Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Würzburg, den 17. Nov. 1999

A handwritten signature in cursive script, reading "Astrid Bischof", written over a horizontal dotted line. The signature is written in black ink and is positioned above the printed name.

Astrid Bischof

Danke

Ganz herzlich möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. T. Hünig danken für die außergewöhnlich gute Betreuung der Arbeit. Seine wissenschaftliche Kompetenz und stetige Diskussionsbereitschaft haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Durchaus vorhandene Durststrecken wurden durch seinen Humor und seine Geduld erträglicher. Geschätzt habe ich die Bereitschaft, sich gemeinsam durch das Dickicht der Signaltransduktion zu schlagen, wozu wohl auch die täglichen Laborbesuche nötig waren (Originalton: „Na, wie geht`s?“).

Herrn Prof. Dr. E. Buchner danke ich für die Vertretung vor der Biologischen Fakultät.

A very warm “Baie dankie” goes to my second “Doktorvater” in South Africa, Prof. Dr. A. D. Beyers for his guidance in the complex field of signal transduction. He followed the progress of the project with encouraging enthusiasm and was always willing to help with good ideas and advice – also from a distance. I would like to thank him and his wife Louise for the warm welcome and their hospitality in South Africa.

All members of the 1996-Beyers-Lab I would like to thank for sharing their signal transduction knowledge and know-how, their willingness to help and a pleasant working environment.

Hier in Würzburg möchte ich Prof. Dr. Schimpl und Drs. Ingolf Berberich, Andris Avots, Sergey Chuvpilo und Klaus-Dieter Fischer danken, die immer für Fragen offen waren und auch bereitwillig mit Reagentien ausgeholfen haben.

Ein besonderer Dank gebührt schließlich auch meinen Doktoranden-Mitstreitern Frank Straube, Marta Rodriguez-Palmero, Bea Mehling, Matthias Knödel und Andreas Kuss sowie Nora Torres-Nagel für praktische Ratschläge, zahlreiche Diskussionen (nicht nur über wissenschaftliche Sachverhalte) und Offenheit bezüglich eigener „versuchstechnischer“ Rückschläge. Kathrin Hofmann hat mit viel Verständnis manches Mal als „Blitzableiter“ gedient. - Danke!

Danken möchte ich auch den Mitgliedern der Immunologie-Abteilung, die zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Unerwähnt möchte ich nicht Tertia lassen, die als Nicht-Immunologin zahlreiche Vorträge über Kostimulation, T-Zellen usw. über sich ergehen lassen mußte, aber immer wieder mit wissenschaftlichen wie nicht-wissenschaftlichen Ratschlägen und Ermunterungen weiterhalf.

Last, aber ganz sicher nicht *least* möchte ich meinen Eltern danken, die mir das zur Doktorarbeit führende Studium überhaupt erst ermöglichten. Während der Doktorarbeit, wie auch in meinen anderen Ausbildungsabschnitten, haben sie mich mit dem gleichen großen Interesse begleitet und waren immer ein großer Rückhalt!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 B- und T-Zellen, Antigenpräsentation	1
1.2 T-Zellaktivierung, Kostimulation	2
1.3 Membranumlagerungen und Mikrodomänen	5
1.4 Signaltransduktionskaskaden	7
1.4.1 Motive, Domänen: ITAM, SH2, SH3, PH	7
1.4.2 Struktur/ Aufbau von Signalkaskaden	9
1.4.3 TZR-Signaltransduktion	11
1.4.4 CD28-Signaltransduktion	16
1.4.5 Serin/ Threonin-Kinase-Kaskaden	21
1.5 Transkriptionsfaktoren	22
1.6 Ziel der Arbeit	23
2. Materialien	25
2.1 Versuchstiere	25
2.2 Antikörper und Seren	25
2.3 Inhibitoren	26
2.4 Chemikalien	27
2.5 Puffer und Medien	27
2.6 Standards und Kits	28
2.7 Fusionsproteine	28
3. Methoden	29
3.1 Zellzahlbestimmung	29
3.2 Gewinnung von Lymphknotenzellen	29
3.3 T-Zellaufreinigung durch Nylonwollsäule	29
3.4 <i>In vitro</i> -Zellstimulation	30
3.5 Proliferationsassay	30
3.6 Herstellung von Pervanadat und Pervanadat-Stimulation	31
3.7 Herstellung einer Natrium-Orthovanadat-Lösung	31
3.8 Zellyse	31
3.9 Immunpräzipitation	32
3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.11 Western Blot	34
3.12 „Stripping“ von Membranen	35
3.13 <i>In vitro</i> -Kinase-Assay	35
3.14 Enolase-Denaturierung	36
3.15 IL-2-ELISA	37

3.16	Aufreinigung von GST-Fusionsprotein	37
3.17	Proteingelfärbung mit Coomassie Blue	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Proliferation und IL-2-Produktion	39
4.2	Effekte pharmakologischer Inhibitoren auf die Proliferation	41
4.3	Membranproximale Signalereignisse	47
4.3.1	lck-Aktivität	47
4.3.2	TZR ζ -Kette	48
4.3.3	ZAP-70	50
4.3.4	LAT und SLP-76	51
4.4	Membrandistale Signalereignisse (MAPK)	53
4.4.1	ERK	53
4.4.2	p38	54
4.4.3	JNK	55
4.4.4	Einfluß verschiedener Inhibitoren auf JNK-Aktivität	55
5.	Diskussion	63
5.1	Eingesetzte Methoden	63
5.2	MAPK in TZR-, Ko- und direkter CD28-Stimulation	64
5.3	Viele Wege führen zu MAPK	65
5.3.1	p56 lck als „frühe“ Kinase	65
5.3.2	Bedeutung des Zytoskeletts	66
5.3.3	Analyse der lck-Substrate TZR ζ und ZAP-70	66
5.3.4	Untersuchung der ZAP-70-Substrate LAT und SLP-76	67
5.4	Aktivierung des Signalintegrators JNK durch direkte CD28-Stimulation	71
5.5	CD28 als autonomer Signalgenerator	73
5.6	Zwei-Schritt-Modell der Kostimulation	74
5.7	Bedeutung mitogener Signale für Th1-/Th2-Polarisierung	76
5.8	Ausblick	76
6.	Zusammenfassung	78
7.	Abstract	80
8.	Literatur	82
9.	Abkürzungen	94
10.	Lebenslauf	96
11.	Publikationen	97