

# **Molekulare Effekte der Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

( Dr. rer. nat. )

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biologin Brit Kieselbach

13.12.1970 in Dessau

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:       1. Prof. Dr. Richard Lucius  
                      2. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Uckert  
                      3. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Mechanismen der Transplantatabstoßung</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 T-Zellaktivierung und Effektormechanismen .....	9
<b>1.2 Signaltransduktion der T-Zellaktivierung</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Herkömmliche Immunsuppressiva</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Induktion einer Transplantat-Toleranz</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5 Mögliche Wirkungsweisen nicht-depletierender anti-CD4 monoklonaler Antikörper</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 Wirkungsweise des Toleranz-induzierenden anti-CD4 monoklonalen Ak RIB5/2</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 Analyse unterschiedlicher Genexpression in anti-CD4-behandelten und unbehandelten mononukleären Zellen</b> .....	<b>23</b>
<b>1.8 Chaperone: Hsp90 und p23</b> .....	<b>24</b>
1.8.1 Rolle der Chaperone in Signaltransduktion und Zellzyklus-Regulation.....	25
<b>2 ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>28</b>
3.1.1 Chemikalien .....	28
3.1.2 Biochemikalien und Kits.....	29
3.1.3 Radiochemikalien.....	29

3.1.4	Verbrauchsmaterial .....	30
3.1.5	Geräte .....	30
3.1.6	Verwendete Oligonukleotide .....	31
3.1.7	Vektoren .....	31
3.1.8	Antikörper .....	32
3.1.9	Inhibitoren .....	32
3.1.10	Bakterienstämme .....	32
3.1.11	Rattenstämme .....	32
3.1.12	Zelllinien .....	32
3.1.13	Puffer und Medien .....	33
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Isolierung, Modifizierung und Analyse von Nukleinsäuren .....	35
3.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	35
3.2.1.2	RNA-Quantifizierung .....	35
3.2.1.3	cDNA-Synthese .....	35
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
3.2.2.1	konventionelle PCR .....	36
3.2.2.2	“Real Time“ TaqMan-PCR .....	37
3.2.3	Detektion und Analyse von Proteinen .....	39
3.2.3.1	Zell-Lysis und Gesamtproteinbestimmung .....	39
3.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese + Western-Blot .....	39
3.2.3.3	Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand .....	40
3.2.4	Gemischte Lymphozytenkultur (MLC) .....	40
3.2.4.1	Isolierung lymphatischen Gewebes .....	41
3.2.4.2	Kultivierung der Zellen .....	41
3.2.4.3	Intrazelluläre IFN $\gamma$ Expression .....	41
3.2.4.4	Proliferationsassay .....	42
3.2.4.5	Inkubation mit „Antisense“-Oligonukleotiden .....	42
3.2.5	Generierung von p23 Antisense-transgenen Zellen .....	42
3.2.5.1	Klonierung von p23 in den pLXSN-Vektor .....	42
3.2.5.2	Transfektion .....	43
3.2.5.3	Generierung stabiler GP+E-p23 Klone („limited dilution“).....	44
3.2.5.4	Retrovirale Transduktion von T-Zellen .....	45
3.2.5.5	Analyse der p23 transgenen T-Zellen .....	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Auswirkung der anti-CD4-Antikörper Behandlung auf die Proliferation und die Expression Zellzyklus-assoziierter Proteine alloreaktiver T-Zellen.....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Proliferationskontrolle .....	46
4.1.2	Expression des Kochaperons p23 während der Gemischten Lymphozytenkultur .....	47
4.1.3	Einfluss von Zellzyklus (ZZ)-Inhibitoren auf die Regulation der p23mRNA Expression / Transkription .....	50
4.1.4	p23-Regulation in verschiedenen Stimulationsmodellen .....	52
4.1.5	Einfluß von rekombinantem IL-2 und einer IL-2 Rezeptor Blockade auf die p23 Expression .....	55

4.1.6	Analyse der Signalwege zur p23 Transkriptions-Induktion.....	59
4.1.7	Vergleich der p23 Expressionsanalyse mit Kinaseaktivitäten .....	61
4.1.8	Assoziative Funktionsanalyse des Kochaperons p23: Generierung und Analyse p23 Antisense-transgener Zellen.....	65
4.1.8.1	Klonierung von pLXSN-IRES-GFP-p23 ( Sense + Antisense ).....	65
4.1.8.2	Transfektion und Generierung stabiler GP+E p23 Klone.....	66
4.1.8.3	Transiente Transfektion und Transduktion mittels Virusüberstandes .....	68
<b>4.2</b>	<b>Auswirkung der anti-CD4-Behandlung auf die Effektor-Zytokinexpression während der Gemischten Lymphozytenkultur.....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Transkriptionelle und translationelle Regulation von IFN $\gamma$ .....	71
4.2.2	Einfluss von rekombinantem IL-2 und neutralisierenden anti-CD25 Antikörpern auf die IFN $\gamma$ Expression .....	73
4.2.3	Analyse des Signalweges der IFN $\gamma$ Translationskontrolle.....	75
4.2.3.1	Analyse der IFN $\gamma$ Translationskontrolle mittels Kinase-Inhibitoren.....	75
4.2.3.2	Analyse der IFN $\gamma$ Translationskontrolle mittels Aktivitätsnachweis involvierter Kinasen.....	78
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der Regulation der Proliferation und der p23 Expression in der Gemischten Lymphozytenkultur .....</b>	<b>81</b>
5.1.1	Hemmung der Proliferation und der Expression des Kochaperons p23 unter anti-CD4-Behandlung .....	81
5.1.2	Ist die p23 Regulation proliferationsabhängig ? .....	83
5.1.3	Bedeutung von IL-2 für die p23 Expression allo-aktivierter T-Zellen .....	84
5.1.4	Signalwegsanalyse der p23 Transkriptionsinduktion.....	87
5.1.5	Funktionsanalyse: Ist die Proliferation der T-Zellen abhängig von der p23 Expression oder ist p23 essentiell für die T-Zell-Proliferation? .....	89
<b>5.2</b>	<b>Analyse der Auswirkung der anti-CD4-Behandlung auf die Expression von Effektorzytokinen .....</b>	<b>93</b>
<b>5.3</b>	<b>Zusammenfassende Schlussbemerkung zu den molekularen Effekten der anti-CD4-Behandlung .....</b>	<b>96</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN UND PRÄSENTATIONEN .....</b>	<b>113</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

4E-BP1	,eIF4E-binding protein 1'
5'-TOP	,5'-terminal oligopyrimidine tract'
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP-1	,activation protein 1'
APC	,antigen presenting cell'
ATP	Adenosintriphosphat
B7-1 (CD80)	Ligand für CD28/CTLA4 auf APC
B7-2 (CD86)	Ligand für CD28/CTLA4 auf APC
bp	Basenpaar
CD	,cluster of differentiation'
CD2	Adhäsionsmolekül auf T- und NK-Zellen
CD25	IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette
CD28	kostimulatorisches Molekül auf T-Zellen
CD3	TCR-assoziiertes Molekül
CD4	Adhäsionsmolekül auf MHC-Klasse-II-Molekül restringierten T-Zellen, bindet das MHC-Klasse-II-Molekül
CD40	Molekül auf APC
CD40L	Ligand für CD40 auf T-Zelle
CD8	Adhäsionsmolekül auf MHC-Klasse-I-Molekül restringierten T-Zellen, bindet das MHC-Klasse-I-Molekül
CDK	,cyclin dependent kinase'
cDNA	,complementary DNA'
CKI	,cyclin dependent kinase inhibitor'
CMV	Cytomegalievirus
cpm	,counts per minute'
CTL	,cytotoxic lymphocyte'
CTLA4	regulatorisches Oberflächenmolekül auf T-Zellen
CTLA4-Ig	lösliches CTLA4-Fusionsprotein mit IgG-Teil
CyA	Cyclosporin A
DC	,dendritic cells'
DNA	,deoxyribonucleic acid'
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsRNAs	,double stranded RNA'
DTH	,delayed-type-hypersensitivity'
eEF2	,eucaryotic elongation factor 2'
eIF-2 $\alpha$	,eucaryotic initiation factor 2 alpha'
eIF4E	,eucaryotic initiation factor 4E'
ERK	,extracellular signal regulated kinase'
FACS	,fluorescent activated cell sorter'
FKBP	FK506 binding protein
GIC	,graft infiltrating cells'
GR	Glukokortikoid-Rezeptor

GVD	,graft versus host disease'
h	Stunde
HLA	,human leukocyte antigens'
HRI	,heme regulated eIF2a kinase'
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IR	Intrazellulärer Rezeptor
JNK	,c-Jun NH(2)-terminal kinase'
KD	kilo-Dalton
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
M	Mitose
MAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase
MEK	MAPK-ERK-Kinase
MHC	,major histocompatibility complex'
MLC	,mixed lymphocyte culture'
mRNA	,messenger-RNA'
NFAT	,nuclear factor of activated T cells'
NF $\kappa$ B	,nuclear factor kappa B'
NK	natürliche Killerzelle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
ORF	,open reading frame'
PCR	,polymerase chain reaction'
PDK	,3-phosphoinositide-dependent protein kinase'
PI3K	,phosphoinositide 3 kinase'
PKC	Protein-Kinase-C
PKR	,dsRNA-dependent kinase (eIF-2a kinase)'
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
RNA	,ribonucleic acid'
rpm	,rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reversetranskriptase-PCR
S	Synthese
siRNAs	,short interfering RNAs'
S6K	,p70 ribosomal S6 kinase'
STAT	,signal transduction factor of activated T cells'
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	,transformation growth factor $\beta$ '
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
ZAP-70	,zeta chain associated protein 70 kDa'
ZZ	Zellzyklus

## ZUSAMMENFASSUNG

Das grundlegende Problem in der Transplantationsimmunologie ist es, die Langzeitakzeptanz eines fremden (allogenen) Organs zu erreichen, ohne die sonstige Immunkompetenz des Empfängers zu beeinträchtigen. Die Induktion einer solchen spenderspezifischen Toleranz würde eine Alternative zum Langzeiteinsatz von Immunsuppressiva darstellen. Deswegen versucht man, während der Transplantation die Aktivierung der für die Abstoßung entscheidenden T-Helferzellen zu unterdrücken, bis eine Akzeptanz des Spenderorgans etabliert ist. Wichtig für eine Aktivierung der T-Zellen ist das für alle T-Helferzellen typische Zelloberflächenmolekül CD4. Antikörper gegen CD4 können in Tiermodellen eine Transplantattoleranz induzieren. Ein besonderes Interesse gilt der Charakterisierung der genauen Mechanismen dieser induzierten Transplantatakzeptanz, da diese noch wenig verstanden sind.

Der von uns verwendete nicht-depletierende Maus-anti-Ratten-CD4mAk (RIB5/2) besitzt im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte eine hohe toleranzinduzierende Wirkung und erzielt eine permanente Transplantatakzeptanz bei >80% der Empfängertiere. In dieser Arbeit wurde versucht, die Effekte dieses monoklonalen Antikörpers auf die T-Zellaktivierung näher zu untersuchen. Ausdruck der blockierten T-Zellaktivierung ist eine verminderte T-Zell-Proliferation und die Reduzierung der Synthese von TH-1-Effektorzytokinen, welche eine zelluläre Immunantwort fördern. Zu diesen für die Abstoßung gefährlichen Th-1-Effektorzytokinen gehören Interleukin 2 (=IL-2, Hauptwachstumsfaktor aktivierter T-Zellen) und Interferon  $\gamma$  (=IFN $\gamma$ , ein wichtiger Aktivator von APC's). Während die IL-2 Produktion vollständig verhindert wird, ist die Alloantigen-induzierte IFN $\gamma$  mRNA Expression nicht reduziert. Allerdings kommt es unter dem Einfluss des Antikörpers nicht zur IFN $\gamma$  Proteinsekretion. Wird jedoch das fehlende IL-2 ersetzt, kann sowohl die defekte Proliferation als auch die posttranskriptionelle Blockade der IFN $\gamma$  Produktion wieder aufgehoben werden. Das spiegelt sich auch *in vivo* wieder, da rekombinantes IL-2 auch hier den Toleranzstatus brechen kann. In dieser Arbeit konnte ein Kandidat dieser IFN $\gamma$  Translationskontrolle ermittelt werden.

Zusätzlich wurde das Kochaperon p23, Teil eines Hsp90-Komplexes, in unsere Untersuchungen miteinbezogen, da es als ein differentiell reguliertes Gen in allogenen und anti-CD4mAk-behandelten T-Zellen identifiziert wurde. Das Hitzeschockprotein Hsp90 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Vorgänge. Dazu gehört z.B. die

Stabilisierung von Kinasen, die wichtige Mediatoren der Signaltransduktion entweder des T-Zellrezeptors oder des Wachstumsfaktors IL-2 sind. p23 könnte aufgrund seiner Funktion als Kofaktor von Hsp90 an der Regulierung dieser Kinasen beteiligt sein, ist jedoch bisher kaum im Zusammenhang mit T-Zellaktivierung analysiert worden. Meine Untersuchungen ergaben, dass die Expression von p23, das in verschiedenen T-Zellaktivierungsmodellen proliferationsabhängig hochreguliert wird, ebenfalls durch den anti-CD4mAk in seiner Expression reduziert wird. Da die Proliferation (=p23) und IFN $\gamma$ -Synthese IL-2-abhängig reguliert werden, wurden IL-2-induzierte Signalwege auf ihre Relevanz für Proliferation und IFN $\gamma$  Regulation hin untersucht.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der anti-CD4mAk-Behandlung auf die T-Zellaktivierung soll mit dazu beitragen, Grundlagen für ein besseres Verständnis des Abstoßungsprozesses und damit Transplantatfunktions-Monitoring (mRNA-Expression und Proteinsekretion) zu schaffen.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 MECHANISMEN DER TRANSPLANTATABSTOßUNG

Seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Transplantation als Therapie irreversibler Organschäden allmählich in der Klinik Wirklichkeit. Nach der ersten erfolgreichen Nierenverpflanzung 1954 konnte die Transplantatüberlebenszeit in den letzten zwei Jahrzehnten durch ein größeres Verständnis der zellulären und molekularbiologischen Grundlagen des Immunsystems verbessert werden. Mit dem umfangreicheren Wissen konnten optimierte Immunsuppressiva entwickelt werden, wie z.B. Cyclosporin A, das wesentlich zur Verbesserung der Transplantatsituation beitrug. Problematisch bleiben die toxischen Nebenwirkungen dieser Medikamente und deren chronische Anwendung, da diese die Patienten zu opportunistischen Infektionsanfälligkeiten und Tumorentwicklungen predisponiert. Die vielversprechendste Alternative zur lebenslangen systemischen Immunsuppression stellt die Induktion einer spenderspezifischen Toleranz dar, bei der trotz ausbleibender Immunantwort gegen das Transplantat die normale Immunkompetenz erhalten bleibt (1, 2).

Die Immunantwort gegen Transplantate setzt sich aus vielen Prozessen zusammen, zu denen die lokale Entzündung und die Antigenerkennung gehören. Die Abstoßungsart und -intensität hängt von dem Zustand des Transplantates und der Empfängerreaktion auf das spezifische Spendergewebe ab. Als fremd erkannt werden dabei vor allem die „human leukocyte antigens“ (HLA)-Antigene, die auf den allogenen Spenderzellen exprimiert werden. Diese HLA-Proteine werden von einer Gengruppe auf dem Chromosom 6 codiert, dem Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) mit getrennten Regionen der MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Genen (3). Ihre normale Funktion ist die Präsentation von Fremdpeptiden, die aus Erregern prozessiert werden. Daher ist ein ausgeprägter alleler Polymorphismus günstig, da so Peptide aus einem weiten Spektrum von Erregern erkannt und präsentiert werden können und das Immunsystem der verschiedenen Spezies befähigt, auf eine Vielzahl von unterschiedlichen und sich schnell weiterentwickelnden Pathogenen antworten zu können. Der allele Polymorphismus sorgt aber dafür, dass die MHC-Moleküle des Spenders vom Empfänger als fremd erkannt werden.

Die Rejektionsmechanismen lassen sich in 4 verschiedene Gruppen einteilen, in die **hyperakute, akzelerierte, akute und chronische Abstoßung** (4).

Die **hyperakute Transplantatabstoßung** beruht auf einer Antikörperreaktion, die mitunter innerhalb von Minuten ablaufen kann. Dabei bewirken präformierte Alloantikörper, die Blutgruppenantigene und polymorphe MHC-Antigene erkennen, eine Abstoßung des Transplantats. Die Bildung dieser präformierten Antikörper erfolgte durch eine frühere Sensibilisierung z.B. durch vorangegangene Transplantationen, Bluttransfusionen oder Schwangerschaften (5). Präoperative Tests zum Nachweis kreuzreagierender Antikörper können heutzutage diese schnellen Abstoßungsreaktionen vermeiden.

Die **akzelerierte Abstoßung** ist innerhalb der ersten 1-2 Wochen zu beobachten. Auch hier erfolgte eine frühere Sensibilisierung des Empfängers, wobei die Aktivierung der T- und B-Zellen schon länger zurückliegt und keine reaktiven Antikörper zum Zeitpunkt der Transplantation mehr nachweisbar sein müssen.

Die **akute Abstoßung** beginnt zwischen den ersten Tagen bis Wochen nach Transplantation und wird vor allem von alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten verursacht. Solche akuten Rejektionskrisen sind aber auch noch nach Jahren zu beobachten. Beteiligt sind neben den T-Lymphozyten auch Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und B-Zellen. Hierbei erfolgt eine starke Infiltration von diesen Empfängerzellen in das Fremdgewebe, die schließlich zu einer Endothelschädigung des Organs führen.

Die **chronische Abstoßung** tritt Monate bis Jahre nach Transplantation auf und stellt inzwischen das Hauptproblem für Langzeiterfolge dar (6). Die chronische Rejektion und der Funktionsverlust des Organs ist pathomorphologisch durch Fibrose und Sklerose (Gewebevernarbung) gekennzeichnet. Ursache hierfür sind hauptsächlich Entzündungsreaktionen, z.B. „Delayed-Type-Hypersensitivity“ (DTH), die durch T-Helferzellen (CD4-positive), B-Zellen und aktivierten Makrophagen hervorgerufen werden (7).

### 1.1.1 T-Zellaktivierung und Effektormechanismen

Die **Antigenerkennung** der T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zell Rezeptor (TCR), der einen Komplex aus antigenem Peptid und MHC-Molekül erkennt. Nur wenn der TCR spezifisch sowohl für das Peptid als auch das Proteinprodukt des individuellen MHC-Allels ist, wird ein spezifisches TCR-Signal ausgelöst [(8, 9)]. Die **MHC-Proteine** sind in 2 Subklassen unterteilt, die MHC-Klasse I- und II-Antigene. Die MHC-Klasse I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren den CD8-positiven, zytotoxischen T-Lymphozyten Peptide, die vor allem im Zytosol aus endogen produzierten Antigenen

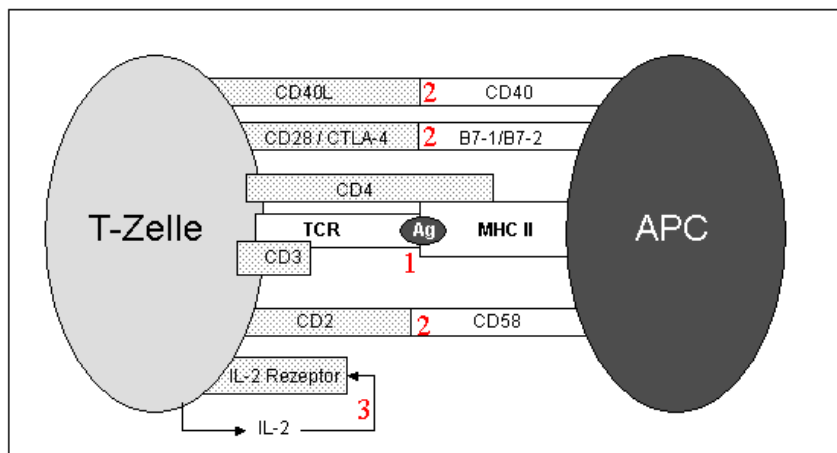
abgespalten wurden. Die Klasse II-Moleküle sind gewebs- und zellspezifisch hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen (APC's) exprimiert und präsentieren den CD4-T-Zellen Peptide vor allem exogen aufgenommener Antigene, die in zellulären Vesikeln abgebaut wurden. Zu den APC's zählen dendritische Zellen (DC), Makrophagen, B-Zellen und epitheliale Thymuszellen. Sie liefern die akzessorischen Zytokine und kostimulatorischen Moleküle, die für die vollständige Aktivierung und die Sensibilisierung der T-Zellen benötigt werden.

Bei einer Transplantation sind es die Alloantigene (Antigene eines nichtverwandten Spenders der selben Spezies) oder Xenoantigene (Antigene des Spenders einer anderen Spezies), die als fremd erkannt werden. Die Antigenpräsentation erfolgt entweder über den direkten oder indirekten Weg. Beim **direkten Weg** erkennen die Empfänger-T-Zellen die körperfremden MHC-Moleküle direkt auf den Spender-APC's als fremd. Hierbei findet eine Kreuzreaktivität von TCR's statt, d.h. entweder erfolgt die Aktivierung der T-Zelle nach Bindung des TCR's an Nicht-Selbst-MHC-Moleküle über das stark interagierende Peptid oder über die starke Bindung an bestimmte Bereiche des Nicht-Selbst-MHC-Moleküls, unabhängig vom gebundenen Peptid. Beim **indirekten Weg** erfolgt die Präsentation von Peptiden abgebauter Spender-MHC-Moleküle über körpereigene APC's. Der direkte Weg spielt wahrscheinlich in der Frühphase nach Allotransplantation und damit für die frühen Rejektionsformen eine dominanter Rolle, was eine starke Immunsuppression während dieser Zeit erfordert (10). Mit Absterben der Spender-APC's und Infiltration des Transplantates mit Empfänger-APC's wird der indirekte Weg wichtiger, der jedoch weniger immunogen ist. Daher kann die Immunsuppression reduziert werden.

Die Antigenerkennung durch die T-Zelle führt zu deren Aktivierung mit anschließender Proliferation. Zusätzlich werden nach Aktivierung Effektormechanismen angeschaltet, wie die Sekretion von regulativen Proteinen (z.B. Zytokine) und Oberflächenmolekülen (z.B. FasL).

Für eine volle T-Zellaktivierung sind **zwei synergistische Signale** erforderlich, zum einen das antigenspezifische TCR-Signal (Signal 1) und zum anderen kostimulatorische antigenunspezifische Signale (Signal 2) über Oberflächenmoleküle der APC (z.B. B7-1/B7-2). Die T-Zell-Moleküle, die als Rezeptoren dieses Signals 2 dienen sind z.B. CD28 (11). Zum besseren Verständnis sind in Abb.1 die Wechselwirkungen zwischen APC und T-Zelle schematisch dargestellt. Die kostimulatorischen Moleküle können auch inhibitorisch in den T-Zellaktivierungsprozeß eingreifen und auf diese Weise sogar chronische T-

Zellstimulationen verhindern (CTLA-4) (12, 13). Die auto- bzw. parakrine Wirkung von Proliferationsfördernden Zytokinen (IL-2, IL-15) werden häufig als Signal 3 dargestellt.



**Abb.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Interaktionen zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle über spezifische Oberflächenmoleküle, die für eine vollständige T-Zellaktivierung erforderlich sind (Signal 1-3).**

Die Interaktion zwischen T-Zelle und APC bewirkt entweder über den direkten Zell-Zell-Kontakt die Freisetzung zytotoxischer Moleküle oder die Rejektion wird über indirekte Mechanismen, wie die zytokininduzierte Zerstörung vermittelt. Beide Mechanismen involvieren eine Vielzahl verschiedener Komponenten (14).

Die **CD4-T-Zellen** sind die wichtigsten Zellen in der Initiierung einer **Effektorantwort**, indem sie Zytokine produzieren (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4), die T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen aktivieren können (15). Je nach Zytokinmuster und daraus resultierender Effektorfunktion unterscheidet man zwei T-Zell-Populationen der T-Helferzellen, die Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren vor allem IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\beta$  (=Lymphotoxin), die eine zelluläre, proinflammatorische Immunantwort bewirken. Dagegen kommt es bei Th2-Zellen eher zur Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, welche die Entwicklung einer humoralen Immunantwort induzieren. Den Th2-Zytokinen wird ein immunsuppressiver Effekt auf die zelluläre Immunantwort nachgesagt.

Zytotoxische **CD8-T-Zellen** als wichtige Effektoren der akuten Abstoßung wirken nach Antigenerkennung durch direkten Zell-Zell-Kontakt lytisch auf ihre Zielzelle und bewirken so die Induktion der Apoptose. Man unterscheidet dabei zwei Mechanismen. Einer erfolgt über die Interaktion des Fas-Liganden, der auf aktivierten CD8-Zellen exprimiert wird, mit dem Rezeptor Fas auf den Zielzellen. Der andere Weg beinhaltet die Sekretion zytotoxischer

Proteine, z.B. Perforin, das Granzym-durchlässige Kanäle in der Membran der Zielzelle bildet oder Granzyme (Proteasen). Aber auch sekretierte Zytokine, wie z.B.  $\text{IFN}\gamma$  können die zytotoxischen Effektorreaktionen verursachen (16).

Zwei wichtige Effektorzytokine sind **IL-2 und  $\text{IFN}\gamma$** . IL-2 ist ein von aktivierten T-Zellen gebildetes Zytokin, welches autokrin als T-Zellwachstumsfaktor wirkt, indem IL-2 die Expression von Zellzyklus-Proteinen induziert (17). Notwendig für dessen effektivere Bindung und Wirkung ist die gleichzeitige Expression der IL-2 Rezeptor alpha-Kette (CD25), die in Verbindung mit der beta –und gamma-Kette erst den hochaffinen IL-2 Rezeptor bildet. Anschliessend können die T-Zellen den Zellzyklus vollständig durchlaufen, nachdem sie durch den ersten Antigenkontakt in die G1-Phase des Zellzyklus eingetreten sind. So entstehen durch Proliferation tausende Nachkommen mit dem selben Antigenrezeptor (klonale Expansion), um daraufhin zu bewaffneten Effektorzellen zu differenzieren (Th1-, Th2-Zellen aus naiven CD4-Zellen oder zytotoxische Zellen aus naiven CD8-Zellen). Außerdem ist bekannt, dass IL-2 die Expression bestimmter Zytokine, wie z.B.  $\text{IFN}\gamma$  in T-Zellen und NK-Zellen verstärken kann (18-20). Es wurde auch kürzlich nachgewiesen, dass das IL-2 Rezeptor-Signaling notwendig für die Differenzierung von  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Effektor-T-Zellen (CD8- und Th1-Zellen) und die Induktion der CTL-Aktivität ist (21).

$\text{IFN}\gamma$ , das von Effektor-T-Zellen und NK-Zellen gebildet werden kann, beeinflusst wesentlich zahlreiche Immunantworten. Von CD8-Effektorzellen freigesetzt, hemmt es die virale Replikation und von Th1-Effektorzellen freigesetzt wirkt es makrophagenaktivierend über die Hochregulierung der MHC I- und II- Moleküle (22).  $\text{IFN}\gamma$  beeinflusst auch die Proliferation und Differenzierung von Lymphozytenpopulationen (23, 24) und die Induktion von immunmodulatorischen Proteinen, wie  $\text{TNF}\alpha$  (Tumor Nekrosis Faktor) (25, 26). Diese Prozesse führen zu einer anhaltenden inflammatorischen Immunantwort, die im Fall der Transplantation die Gewebszerstörung und den Organverlust bewirkt. Die chronische Rejektion scheint wesentlich durch  $\text{IFN}\gamma$  beeinflusst und manifestiert zu werden (27).

## 1.2 SIGNALTRANSDUKTION DER T-ZELLAKTIVIERUNG

Fast alle Prozesse des zellulären Lebens werden durch reversible Protein-Phosphorylierungen kontrolliert, wie immunologische, aber auch neuronale und hormonelle Zellaktivitäten (28). Ungefähr 1/3 aller Säugerproteine sind kovalent mit Phosphaten verbunden und es existieren an die 2000 Proteinkinasen und 500 Proteinphosphatasen. Damit wird verständlich, welche wichtige Rolle sie spielen und warum abnormale Phosphorylierungen vielerlei Krankheiten

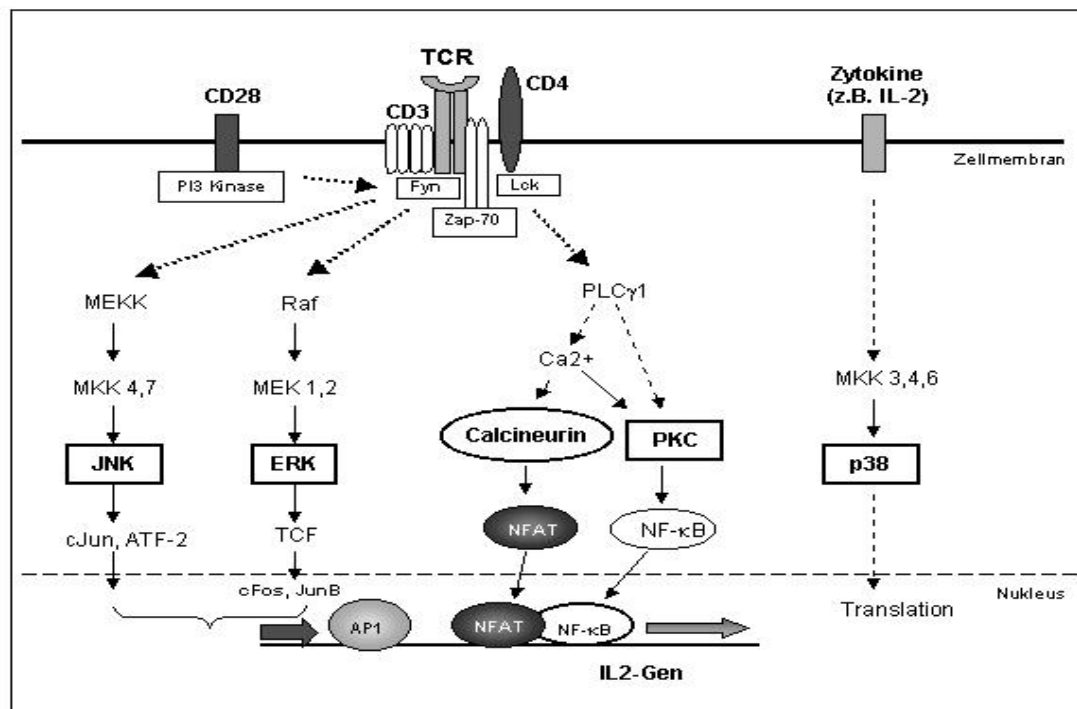
hervorrufen können. Mittels spezifischer Inhibitoren gegen Kinasen und Phosphatasen bieten diese ein großes Potential, Krankheiten zu behandeln. Dazu zählt auch Cyclosporin A, ein weit verbreitetes Immunosuppressiva bei Organtransplantationen (29, 30). Kinasen und Phosphatasen sind Enzyme, die eine Übertragungsreaktion von Phosphorylgruppen zwischen energiereichen Phosphoryl-Donoren und energiearmen Phosphoryl-Akzeptoren kontrollieren und somit lebensnotwendige zelluläre Abläufe ermöglichen. Durch die Phosphorylierungsreaktion kann eine Aktivierung, manchmal auch eine Deaktivierung des betroffenen Zielproteins bewirkt werden. Dadurch werden diese hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität, ihrer zellulären Lokalisation, der Halbwertszeit und ihres Bindevermögens an andere Proteine verändert.

Auch T-Zellen werden über Signalkaskaden vieler verschiedener Kinasen (z.B. MAPK, wie Raf-1) aktiviert. Diese aktivieren sich sequentiell und können in diesem Zustand in den Nukleus eintreten. Dort stimulieren sie über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF's) die Transkription zahlreicher Gene, die u.a. den Zellzyklus und die Proliferation der T-Zellen induzieren.

Auch bei einer allogenen Transplantatabstoßung kontrollieren Signalwege die zelluläre Proliferation, Differenzierung, Anergie oder Apoptose. Hierbei spielen ganz offensichtlich die T-Zellen die entscheidende Rolle, da sie die Fremdantigene des Transplantats über ihren TCR erkennen und spezifische Signalkaskaden auslösen. Der Eingriff in diese Signalwege der T-Zellaktivierung stellt eine Möglichkeit zur Induktion einer Transplantattoleranz dar. Im folgenden Abschnitt werden die notwendigen Signalkaskaden, die zu einer vollständigen T-Zellaktivierung führen zusammenfassend dargestellt.

Der systematische Ablauf multipler Ereignisse beginnt nach dem Zusammentreffen des TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex (Signal 1) und dem Auslösen des Signals 2 durch die kostimulatorischen Proteine auf APC und T-Zelle, was zur Produktion von IL-2 und dem Eintritt in den Zellzyklus führt (Signal 3). Signal 1 und 2 bewirken intrazelluläre Veränderungen im TCR/CD3-Komplex und die damit verbundene Aktivierung von Protein-Thyrosin-Kinasen (PTK) Lck, Fyn und der 70 kD zeta-assoziierten Protein-Kinase (Zap-70). Es folgt die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden, die in 3 Hauptwege untergliedert werden (Abb.2):

1. dem Kalzium-Calcineurin-Weg,
2. den Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Wegen und
3. dem Protein-Kinase C (PKC)-Weg.



**Abb.2: Signaltransduktion in T-Zellen.** Vereinfachte schematische Darstellung der 3 Hauptwege der T-Zellaktivierung, die gemeinsam eine Expression früher Gene induzieren. Dazu gehört der Kalzium-Calcineurin-Weg, die MAP-Kinase-Wege über JNK, ERK, p38 und der Protein-Kinase C (PKC)-Weg.

Der **Kalzium-Calcineurin-Weg** wird ausschließlich über den TCR ausgelöst, weder das kostimulatorische Molekül CD28 noch Zytokine wirken über diese Signalkaskade. Hierbei wird über Calcineurin (Phosphatase) der Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen (NFAT) aktiviert, der anschließend in den Zellkern wandern kann und dort erst in Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor Aktivatorprotein 1 (AP-1) aktiv wird (31). NFAT kommt nur in T-Zellen vor und induziert über die Bindung an den IL-2 Promoter die Expression früher Gene der T-Zellaktivierung.

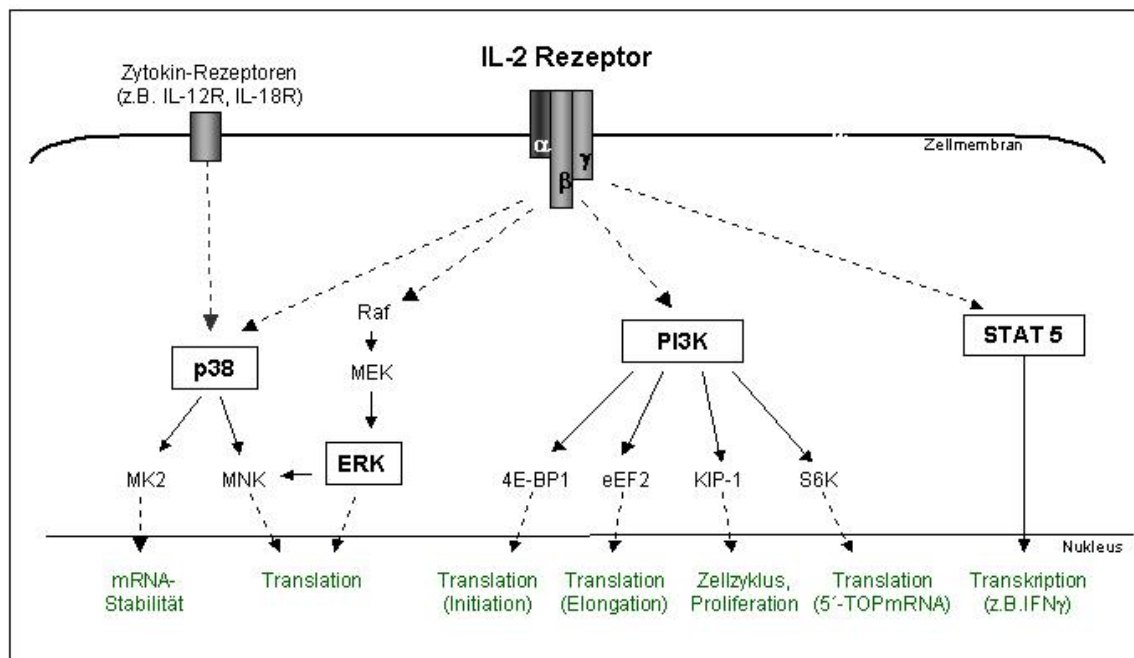
Die **Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Wege** schließen 3 Hauptgruppen von MAP-Kinasen ein: ERK (32), p38 (33) und JNK (34, 35). Die Kinase ERK mit ihren 2 Isoformen, auch p44/p42 genannt, spielt eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung, weil es über die IL-2 Induktion für die Proliferation mitverantwortlich ist (36). Für die Kinase JNK wurde nachgewiesen, dass ihre Expression und Aktivität nach T-Zellaktivierung signifikant erhöht ist und ihr Maximum nach 36-60 Stunden erreicht wird (37). Obwohl die CD28-Kostimulation den Effekt verstärkt, ist dieses Signal offenbar für die vermehrte JNK mRNA-Expression nicht essentiell (38, 39). Die p38-Kinase dagegen scheint nicht TCR-induziert für IL-2 Produktion und CD4-T-Zell-Proliferation erforderlich zu sein. p38 spielt offenbar erst

für die Th1-Differenzierung und weitere Zytokinexpressionen (z.B.  $\text{IFN}\gamma$ ) (40) eine wesentliche Rolle. Über JNK und ERK erfolgt die Transkription und Aktivierung zweier genregulatorischer Gene (Fos und Jun), die sich zu dem Transkriptionsfaktor AP-1 zusammenlagern. AP-1 assoziiert mit NFAT, wodurch der aktive NFAT-TF entsteht.

Der **Protein-Kinase C (PKC)-Weg** wird durch z.B. Kalzium, Membran-Phospholipide und der PI3-Kinase aktiviert. Die PKC Kinase wiederum aktiviert zahlreiche Enzyme und ermöglicht den Transport des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) in den Nukleus durch Phosphorylierung und damit Deaktivierung inhibitorischer Proteine. Bisher sind 7 verschiedene T-Zell-exprimierte PKC Isoformen bekannt. Diese Isoformen funktionieren zelltypspezifisch, wovon die PKC $\theta$  in der T-Zellaktivierung eine große Rolle spielt. Sie ist für die IL-2 Expression essentiell, da sie letztendlich zur Aktivierung der DNA-gebundenen regulatorischen Proteinen (NF-AT, AP-1 und NF- $\kappa$ B) führt (41, 42).

Alle drei Signalwege induzieren zusammen durch die Aktivierung der präformierten TF's AP-1, NF-AT und NF- $\kappa$ B die Transkription früher Gene, die für weitere TF's und Zytokine kodieren. Die Bindung der gebildeten Zytokine an ihre jeweiligen Rezeptoren setzt wieder neue Signale frei, die verantwortlich sind für die Zellteilung (z.B. IL-2), Zytokinexpression, Apoptose und Aktivierung bzw. Unterdrückung von spezifischen T-Zell-Differenzierungsgenen.

Die IL-2 Transkription ist der Prototyp für die Aktivierung vieler Zytokine in T-Zellen. Nach der Bindung der TF's an die IL-2 Promotorsequenz wird IL-2 transkribiert, gefolgt von dessen Translation und Proteinsynthese. In diesem Stadium wird unter anderem auch die IL-2 $\alpha$ -Kette (CD25) transkribiert, welche zusammen mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette den hochaffinen Rezeptor auf aktivierten T-Zellen für IL-2 Protein bildet. Daraus folgt, dass bevorzugt aktivierte T-Zellen auf IL-2 reagieren können und in die Synthesephase des Zellzyklus übergehen, um klonal zu expandieren und zu differenzieren. Zu den **IL-2 Rezeptor- ausgelösten Signalkaskaden** zählen neben der Aktivierung von zytoplasmatischen TF's (STAT's) (43, 44) die Aktivierung der MAP-Kinase ERK (45) und p38 und die Phosphorylierung der PI3-Kinase (Abb.3). Die PI3-Kinase katalysiert als Mediator der Translationskontrolle verschiedene Substrate. Dazu zählt unter anderem die Translation-Initiation (4E-BP1), die 5' TOP mRNA-Translation (S6Kinase), die Translation-Elongation (eEF2) oder die Proliferation (Kip-1).



**Abb.3: Vereinfachte schematische Darstellung der IL-2 Rezeptor-induzierten Signalwege**

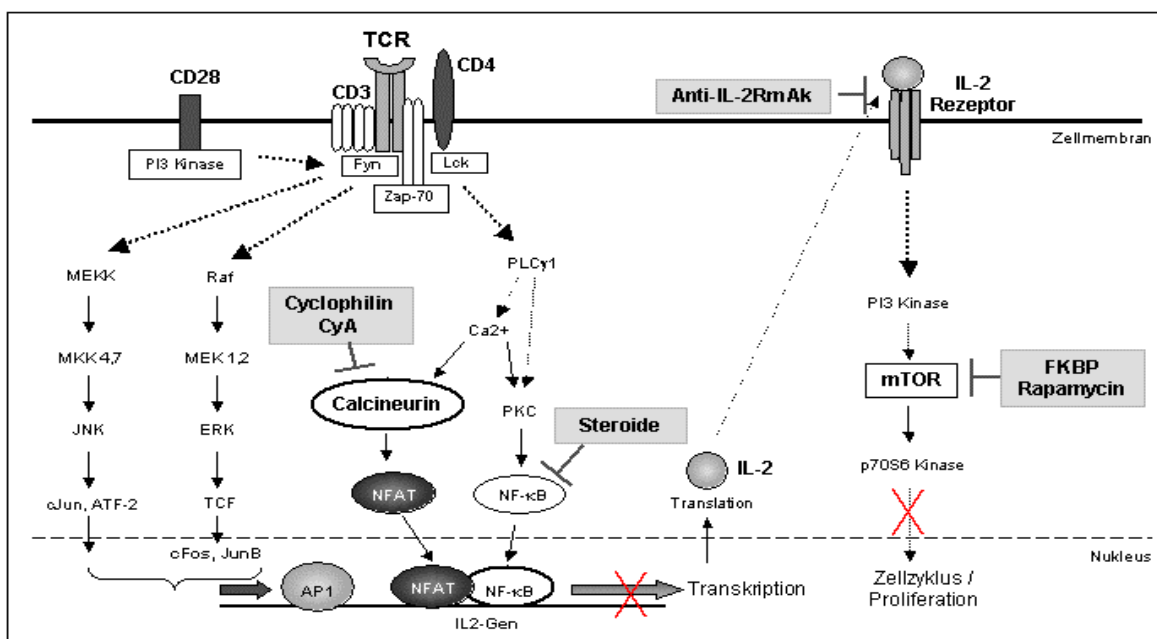
### 1.3 HERKÖMMLICHE IMMUNSUPPRESSIVA

Obwohl eine Vielzahl von Immunsuppressiva zur Verfügung stehen, fehlt es an Medikamenten, die absolut sicher wirken und keine toxischen Nebenwirkungen aufweisen. Bisher gibt es aber kaum Alternativen, dem Organversagen nach Transplantation spezifisch entgegenzuwirken, ohne dabei das gesamte Immunsystem zu unterdrücken.

Trotz großer Unterschiede in der Therapiegestaltung basieren die meisten immunsuppressiven Systeme auf einem der **Calcineurin- Inhibitoren** (FK506 und Cyclosporin A [CyA]) und **Steroiden**. Steroide wirken nach Bindung an spezifische Rezeptoren über die Anlagerung an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion zahlreicher Gene und beeinflussen deren Transkription. Der Effekt ist besonders entzündungshemmend, unter anderem durch die verringerte Produktion von Entzündungsmediatoren und entsprechenden Adhäsionsmolekülen und durch die Apoptoseinduktion von Lymphozyten. Aber leider rufen Steroidtherapien auch viele Nebenwirkungen hervor. Die nachfolgenden Immunsuppressiva werden etwas näher erklärt, da diese in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Wirkung von CyA (ebenso von FK506) beruht auf einer Blockierung der Phosphatase Calcineurin, welche die mRNA-Produktion von Interleukin 2 steuert. Initialer Schritt ist die Bindung an deren zytoplasmatischen Bindungspartner Cyclophilin im Fall von CyA bzw. FK-bindendes Protein (FKBP) im Fall von FK506 (Abb.4). Die Hemmung von Calcineurin führt zu einer Reduktion

der IL-2 Produktion und damit zur Inhibierung der T-Zellaktivierung und –proliferation. Potentielle Nebenwirkungen sind z.B. Nephrotoxizität, Diabetes mellitus oder Infektionen. Mit dem Ziel, Immunsuppressiva-bedingte Nebenwirkungen zu reduzieren, steht derzeit die Entwicklung vergleichbarer oder sogar potenterer immunsuppressiver Protokolle mit jedoch spezifischerer Wirkung im Vordergrund. In klinischer Prüfung bzw. Evaluierung befinden sich u.a. folgende Immunsuppressiva: **Rapamycin** und die monoklonalen anti-Interleukin-2 Rezeptorantagonisten (**anti-IL-2RmAk**) (Abb.4). Rapamycin geht ebenfalls einen Komplex mit dem FKBP ein, inhibiert aber die Signalgebung über Zytokinrezeptoren (z.B. IL-2R) durch die Interaktion mit dem Zielprotein TOR („target of rapamycin“). Außerdem stabilisiert Rapamycin KIP-1, den Inhibitor der Zyklin-abhängigen Zyklase-2, welche den Zellzyklus in der frühen G1-Phase blockt (46). Es kommt zu einer Inhibierung der Wachstumsfaktor-abhängigen Effekte, z.B. der Proliferation von T-Zellen nach Aktivierung. Im Gegensatz zu Calcineurin-Inhibitoren hat Rapamycin kaum nephrotoxische Nebenwirkungen (<http://www.charite.de/avt/klinik/ltx/entwicklimmun.html>).

Gewöhnlicherweise werden in der Praxis mehrere Medikamente miteinander kombiniert, um so eine Senkung der Nebenwirkungen bei maximaler Effektivität zu erreichen.



**Abb.4: Intrazelluläre Wirkungsweise der herkömmlichen Immunsuppressiva CyA, Rapamycin, Steroide und anti-IL-2R monoklonaler Antikörper**

## 1.4 INDUKTION EINER TRANSPLANTAT-TOLERANZ

Die vielversprechendste Alternative zur lebenslangen systemischen Immunsuppression stellt jedoch die Induktion einer spenderspezifischen Toleranz dar. Transplantationstoleranz bedeutet eine Langzeitakzeptanz von Allo-/Xenogewebe mit physiologischer Gewebefunktion und intaktem Immunsystem ohne kontinuierliche Immunsuppression. Medawar definierte den Begriff „Toleranz“ als fehlende Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen (Ag) bei normaler Immunkompetenz, wobei zwischen zentraler Toleranz (Induktion im Thymus) und peripherer Toleranz unterschieden wird (47). Bei der zentralen Toleranz werden alle antigenerkennenden Thymozyten deletiert, was für die Toleranzinduktion gegenüber Autoantigenen entscheidend ist. Allerdings ist die Deletion reaktiver T-Zellen im Thymus oft unvollständig, so dass periphere Mechanismen zur Toleranzinduktion auch bedeutsam sind (48, 49). Im Gegensatz dazu ist der Thymus für die Entstehung einer Transplantattoleranz nicht zwingend notwendig, was die Bedeutung der peripheren Toleranz für diesen Prozess unterstreicht. Sicher ist, dass T-Zellen die zentrale Rolle in der Immunantwort gegen Alloantigene spielen, da Tiere ohne T-Zellen ein Transplantat nicht abstoßen (50). Es existieren 5 grundsätzliche Mechanismen, die zur Induktion einer peripheren Transplantattoleranz führen: Deletion, Induktion eines Chimerismus, Ignoranz, Suppression/Regulation und Anergie.

Die **Deletion** peripherer T-Zellen führt entweder zu einer klonalen Erschöpfung der T-Zellen oder bewirkt über die Fas/Fas-Ligand Wechselbeziehung deren Apoptose. Außerdem konnte auch eine Deletion von T-Zellen oder Leukozyten nach Gabe von Antikörpern beobachtet werden (anti-CD3-Immunotoxin, CAMPATH-1) (51-53). Deletion spielt eine dominante Rolle bei der Induktion von Toleranz durch Makrochimerismus.

**Ignoranz** von Antigenen kann z.B. durch niedrig affine Wechselwirkungen zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex oder fehlende kostimulatorische Signale ausgelöst werden. Folge ist das Ausbleiben einer Immunreaktion trotz antigenspezifischer T-Zellen. Ignoranz ist jedoch ein labiler Zustand.

Ein aktiver Mechanismus der Toleranzinduktion ist die **Suppression/Regulation** reaktiver T-Zellen durch regulative T-Zellen mit der gleichen Antigenespezifität. Sie exprimieren die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 und verhindern effektiv die T-Zellaktivierung (54-56). Evidenzen für das Vorhandensein suppressiver Mechanismen erhielt man aus adoptiven Zelltransferexperimenten, bei denen T-Zellen von tolerisierten Tieren diese antigenspezifische

Toleranz auf naive Empfängertiere übertragen konnten („Infektiöse Toleranz“) (57-59). Hauptmechanismus scheint die Inhibierung der Transkription von IL-2 in den Empfängerzellen zu sein, aber der genaue Vorgang bleibt noch ungeklärt. Obwohl der Zellkontakt zwischen suppressiver (regulativer) T-Zelle und reaktiver T-Zelle erforderlich ist (55, 56), ist unbekannt, ob CD25-negative T-Zellen oder APC's die Zielzellen sind. Denkbar ist auch, dass manches suppressive Phänomen auf dem Mechanismus der „**Immune Deviation**“ beruht, eine Verschiebung der Art der Immunantwort. Dabei kommt es zu einem Wechsel von einer transplantatschädigenden Th1-Antwort zu einer immunmodulatorischen, humoralen Th2-Antwort (60-64).

**Anergie** wird erzeugt, wenn T-Zellen auf ihren MHC-Peptid-Komplex treffen ohne adäquate akzessorische oder kostimulatorische Signale zu erhalten (65). Die anerg gemachte Zelle kann dann nicht mehr auf die nächste das spezifische Antigen exprimierende APC reagieren. Im Falle von T-Zellen geht die Anergie mit fehlender IL-2 Produktion einher und kann durch exogene Zugabe von IL-2 gebrochen werden (66). T-Zell-typische Anergie kann auch durch niedrigaffine Wechselwirkungen zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex hervorgerufen werden (67) und ist das Resultat fehlender IL-2-induzierter Proliferation (68). Ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung liegt in der Suche nach spezifischen anergieinduzierenden Faktoren, z.B. dem Zellzyklus-Inhibitor KIP-1 (69).

Obwohl verschiedene Strategien zur Toleranzinduktion in der Transplantation im Tiermodell etabliert sind, müssen diese für die klinische Anwendung erst noch adaptiert werden, da die meisten nur im Tiermodell untersucht wurden. Die meisten Strategien basieren auf der Induktion von Chimerismus (70) oder der Anwendung von Antikörpern (Ak) und löslichen Liganden, die gegen spezifische Oberflächenmoleküle der T-Zellen oder APC's gerichtet sind. Diese können eine Immunreaktion auf spezifischere, nichttoxische Weise beeinflussen. Man unterscheidet 2 Wirkungsweisen monoklonaler Antikörper. Es gibt depletierende Ak's, die eine Zerstörung der Lymphozyten verursachen und nicht-depletierende Ak's, die über die Blockade der Funktion ihrer Zielproteine wirken. Depletierende Ak's gegen T-Zellen können zwar eine Abstoßungsreaktion verhindern und toleranzinduzierend sein, reduzieren aber den CD4-Pool im Erwachsenen aufgrund der Thymusinvolution. Deshalb wird die Toleranzinduktion mittels nicht-depletierender Antikörper angestrebt.

Eine alloantigen-spezifische Toleranzinduktion im Tiermodell konnte erstmals Mitte der 80er Jahre mit nicht-depletierenden monoklonalen **anti-CD4 Antikörpern** (anti-CD4mAk), die

gegen das CD4-Molekül auf T-Zellen gerichtet sind, erreicht werden (71-74). CD4 ist der Korezeptor auf CD4-T-Zellen, der direkt an konstante Bereiche des MHC II-Moleküls auf der APC bindet und somit vor allem für die Erkennung exogener Pathogene durch den TCR zuständig ist. Über das CD4-Molekül wird die Antigenbindung durch den TCR stabilisiert und somit eine vollständige Signalgebung über den TCR ermöglicht. Unabhängig vom Wirkmechanismus wurde gezeigt, dass der anti-CD4mAk eine stabile Transplantattoleranz in vielen Tiermodellen induzieren kann (75-79).

Wie schon erwähnt, führt eine Blockade der kostimulatorischen Signale zur Induktion einer Anergie in T-Zellen, weshalb Manipulationen dieser Signalgebung als potentielle Strategie erschienen, um Toleranz zu erlangen. **CTLA4-Ig** ist ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Bereich des T-Zellmoleküls CTLA-4 und dem konstanten Bereich eines humanen Antikörpers. Es kann die spezifische T-Zell-Antwort verhindern, indem es mit höherer Affinität als CD28 an das B7-1/2-Molekül auf APC bindet. Damit verhindert CTLA4-Ig den Kostimulus durch CD28. Somit wirkt es effektiv bei der Verlängerung der Überlebenszeiten von Transplantaten (80-83). In manchen Modellen erzielt es eine dauerhafte donorspezifische Toleranz, verlangsamt Autoimmunerkrankungen und wirkt immunmodulatorisch. Mittlerweile steht CTLA4-Ig in der klinischen Erprobungsphase I für Behandlungen von Psoriasis oder der GvH-Reaktion in der allogenen Knochenmarktransplantation (84).

Auch die Kostimulation über CD40/CD40L ist ein Ansatzpunkt für die Toleranzinduktion. Nur aktivierte T-Zellen exprimieren CD40L, so dass bei dessen Blockade aktivierte T-Zellen und damit auch transplantatreaktive T-Zellen inhibiert werden. Es wurde berichtet, dass die Blockade dieses Signals mit **anti-CD40L** (anti-CD40-Ligand Antikörper) ebenfalls die Rejektion von Allotransplantaten im Tiermodell verzögert (85-87) und sogar in einigen Fällen eine Toleranz induziert. Neben der Induktion einer Anergie in den allo-reaktiven T-Zellen, kann eine Blockade der CD40-CD40L-Wechselwirkung auch die Apoptose der aktivierten T-Zellen und die Entstehung regulatoriver T-Zellen bewirken (88).

Weitere Antikörper, die für den Einsatz zur spezifischen Immunsuppression entwickelt wurden, sind **anti-CD25 Antikörper**, die spezifisch gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors gerichtet sind. Die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors wird erst nach Aktivierung der T-Zellen exprimiert und ist zur Bildung des hochaffinen IL-2 Rezeptor bestehend aus allen 3 Ketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) nötig. Durch die Blockade des IL-2 Rezeptors unter Verwendung von anti-CD25 Antikörpern wird somit die IL-2 vermittelte Aktivierung von T-Zellen verhindert.

## 1.5 MÖGLICHE WIRKUNGSWEISEN NICHT-DEPLETIERENDER ANTI-CD4 MONOKLONALER ANTIKÖRPER

CD4 als Korezeptor auf CD4-T-Zellen, der direkt an konstante Bereiche des MHC II-Moleküls auf der APC bindet, sorgt für die stabile und korrekte Antigenbindung durch den TCR, um eine vollständige T-Zellaktivierung zu ermöglichen. Die Interferenz mit nicht-depletierenden Antikörpern verhindert diese Funktion und kann verschiedene Folgen haben. Genaue Funktionsweisen werden noch diskutiert. Dabei sind folgende Mechanismen vorstellbar:

Es könnte eine **komplette Blockade** durch sterische Behinderung des Rezeptors erfolgen, die eine TCR-Signalkaskade völlig unterbindet. Andererseits wäre eine inhibitorische Wirkung durch die **verkürzte Dauer des Zellkontaktes** zwischen APC und T-Zelle denkbar, da die stabilisierende Wirkung des CD4-Moleküls entfällt und die Zeit für eine optimale Signalgebung nicht mehr ausreicht (89). Anti-CD4 Ak's könnten auch durch **negative Signale** mit der positiven TCR-vermittelte Signaltransduktion direkt intervenieren, indem sie Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen inhibieren (90).

Möglicherweise werden die TCR-ausgelösten Signale durch anti-CD4mAk's **modifiziert (anergisiert)**. Nach Kreuzvernetzung der CD4-Moleküle wird eventuell erst ein anti-CD4 Antikörper-induziertes Signal ausgelöst, das wie eine unvollständige T-Zellaktivierung wirkt (1 von 2 notwendigen Signalen) und somit eine Anergisierung hervorruft. Anergisierung ist das fehlende Reaktionsvermögen von T-Zellen, die keine komplette Inaktivierung einschließt, da noch die Bildung von Zytokinen beobachtet wurde und die proliferative Antwort auf Antigenkontakt durch exogene IL-2-Gabe revertiert werden kann (66, 91). Offenbar werden ganz bestimmte Signalwege angeschaltet und Proteine synthetisiert, die für die Aufrechterhaltung des anergen Zustands zuständig sind, wie das negative IL-2 Regulatorprotein Nil-2a (92) oder Rap1, das Wachstums-inhibitorische Signale transduziert (93). Charakteristisch für Anergie ist auch eine fehlende Aktivierung verschiedener Kinasen (94-97) und TF's (98, 99). Andere Proteine wiederum werden spezifisch aktiviert, zu denen auch der CDK-Inhibitor KIP-1 gehört, der den Eintritt der T-Zelle vom G1-Restriktionspunkt in den Zellzyklus verhindert. KIP-1, als Zielprotein von Rap1, wurde als Anergie-induzierender Faktor entdeckt, der die IL-2 Transkription und klonale Expansion von alloreaktiven T-Helferzellen in Mensch- und Mausmodell inhibiert (100). Untersuchungen mit dem CD4-Molekül als Rezeptor für das humane Immunschwäche-Virus (HIV) erbrachten in entsprechenden Experimenten den Nachweis, dass eine CD4-Vernetzung zwar eine

Aktivierung der Ras-Raf-ERK Signalkaskade hervorruft, nicht aber den JNK-Signalweg anschaltet (101-103). Das führte zu einer verminderten Aktivierung der TF's AP-1 und NF-AT, die jedoch für die IL-2 Synthese notwendig sind. Auch hier wurde T-Zellenergie beobachtet.

Weitere Aufklärungen der biochemischen und molekularen Mechanismen der durch anti-CD4mAk-hervorgerufenen T-Zellenergie sind für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zur Toleranzinduktion und Rejektionsvermeidung in der Transplantation notwendig. Solche neuen Ansätze wären der Reduzierung nichtspezifischer Immunsuppressionen dienlich.

#### 1.6 WIRKUNGSWEISE DES TOLERANZ-INDUZIERENDEN ANTI-CD4 MONOKLONALEN AK RIB5/2

RIB5/2 ist ein nichtdepletierender monoklonaler Maus-anti-Ratten-CD4 Antikörper (anti-CD4mAk), der im allogenen Nierentransplantationsmodell mit maximaler MHC-Inkompatibilität eine hohe immunsuppressive Effizienz besitzt und eine permanente Transplantatakzeptanz in >80% der Empfängertiere induziert (104). Dabei wirkt der anti-CD4mAk modulierend (veränderte Signalgebung) und blockierend auf das CD4-Molekül von Ratten-T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Die anti-CD4mAk-Behandlung geht mit einer Reduzierung von gewebeinfiltrierenden Zellen (GIC's) einher (30-50%), obwohl diese auch noch nach 300 Tagen im Transplantat detektierbar sind. Die induzierte Toleranz ist spenderspezifisch, gewebeunspezifisch und stabil. So wurde gezeigt, dass Herz- und Inselzelltransplantate vom selben MHC-inkompatiblen Spender akzeptiert wurden, Fremd- („third party“) Transplantate mit anderer MHC-Inkompatibilität jedoch sofort abgestoßen werden (75, 77). Die RIB5/2-induzierte Anergie konnte durch die Applikation rekombinanten IL-2's (100.000 U) während der Induktionsphase der Toleranz verhindert werden (105). Nach frühestens 4 Wochen kann man regulative T-Zellen aus der Milz und bereits nach 2 Wochen aus dem Transplantat isolieren, die als Träger der donorspezifischen und organunspezifischen Toleranz diese adoptiv auf syngene transplantierte Tiere übertragen. Die übertragene Toleranz ist wie die primär induzierte Toleranz allospezifisch, da nur Organe des gleichen Donors akzeptiert werden (58). Dieses Phänomen wurde, wie schon erwähnt, erstmals von Qin et al. als „Infektiöse Toleranz“ beschrieben (57). Sie hängt von den CD4-positiven T-Zellen und von der Präsenz des tolerierten Ag ab (106). Dabei ist die Induktion toleranzvermittelnder, regulativer T-Zellen thymusabhängig, d.h. naive T-Zellen aus dem Thymus sind für die

Toleranzinduktion notwendig, während periphere T-Zellen für die Aufrechterhaltung und Weitergabe der Toleranz verantwortlich sind (58).

#### 1.7 ANALYSE UNTERSCHIEDLICHER GENEXPRESSION IN ANTI-CD4-BEHANDELTEN UND UNBEHANDELTEN MONONUKLEÄREN ZELLEN

Für die Optimierung der Behandlungsstrategien bei allogenen Organtransplantationen wäre die Einführung von sogenannten „Toleranzmarkern“ eine Erleichterung, um das postoperative Monitoring von Patienten zielgerichteter durchführen zu können. Um solche „Toleranzmarker“ festlegen zu können, wurde versucht, die durch den anti-CD4mAk RIB5/2 veränderte Genexpression von T-Zellen zu analysieren und so toleranzassoziierte Gene zu identifizieren.

Mit dieser Zielstellung führte Dr. B. Sawitzki in ihrer Dissertationsarbeit eine vergleichende Analyse der Genexpression von unbehandelten und mit dem anti-CD4-Antikörper RIB5/2 behandelten allo-aktivierten mononukleären Zellen durch. Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden gelang es ihr, eine Vielzahl von differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten zu isolieren. Zum einen wurde die „differential display“ RT-PCR verwendet, um die Genexpression von GIC's unbehandelter und anti-CD4mAk-behandelter Tiere am Tag 5 nach einer Nierentransplantation (Wistar Furth nach BDIX) zu vergleichen (107, 108). Zum anderen diente die PCR-Select-Methode für den Vergleich von unbehandelten und anti-CD4mAk-behandelten allogenen gemischten Lymphozytenkulturen (DA nach Lewis) am Tag 5.

Ein PCR-Select-Fragment, das verstärkt in anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen am Tag 5 der gemischten Lymphozytenkultur exprimiert wurde, wies vorerst keine Homologie zu bisher bekannten Proteinen auf. Versuche, die cDNA zu vervollständigen, erbrachten eine 91%ige Homologie zu dem 3'-Ende des codierenden Bereiches eines humanen Chaperon-assoziierten Gens „p23“. In Bezug auf T-Zellaktivierung und darin involvierte Signalwege ist allerdings nur wenig über die Bedeutung und Regulation Chaperon-assoziiierter Proteine, wie z.B. p23 bekannt.

## 1.8 CHAPERONE: HSP90 UND P23

Chaperone/ Hitzeschockproteine (Hsp's) sind Proteine, die als Folge von Stress wie z.B. Temperaturerhöhung vermehrt gebildet werden. Sie sind in der Zelle hauptsächlich für Faltungsprozesse bei Proteinen verantwortlich, indem sie unkorrekt gefaltete Zustände von Proteinen vermeiden, diese während und nach der ribosomalen Synthese falten, den Membrandurchtritt gewährleisten und das korrekte Zusammenlagern und Stabilisieren großer Proteine ermöglichen (109). Ab 1987 wurden immer wieder Hsp's in Zusammenhang mit Steroidhormonrezeptoren untersucht. Zu diesen Hsp's gehört auch das Hsp90, das dimerisiert mit inaktiven Rezeptoren im Zytosol einen Heterokomplex eingeht. Dieser setzt sich noch aus weiteren Chaperonen (Hsp70, Hsp56, Hsp40), Kochaperonen (p23) und Immunophilinen zusammen (110). Auf diese Weise wird der Rezeptor in einer entsprechenden Konformation fixiert, die eine Bindung des Hormons erlaubt, somit den Rezeptor aktiviert und die Translokation in den Zellkern auslöst. Im Kern dissoziiert der Hsp-Komplex ab und der Hormon-Rezeptor-Komplex kann über die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen die Transkription aktivieren.

Hsp90 spielt aber auch eine wesentliche Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle und für Signalkaskaden, indem es mit verschiedenen Kinasen und TF's assoziiert ist (siehe Pkt. 4.8.1).

Das humane p23 als Kochaperon ist wie Hsp90 evolutionär stark konserviert und in fast allen Geweben, außer in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert. Es wurde ursprünglich als Bestandteil des Heterokomplexes mit Steroidhormon-Rezeptoren detektiert (111, 112). Abgesehen von der stabilisierenden Wirkung von p23 auf die Hormon-Rezeptor-Komplexe (112-114) und seiner ATP-abhängigen Assoziation an den Hsp90-Komplex (113, 115, 116) wird eine direkte chaperone Wirkung von p23 auf entsprechende Substrate diskutiert (117, 118). Während die genetische Mutation des Hsp90 (Hsp82) im Hefemodell zu deutlichen Defekten der Glukokortikoidrezeptor (GR)-Aktivität führt, hat die Mutation des p23-Hefehomologes SBA1 nur milde Effekte auf die Aktivität der Tyrosin-Kinase v-Src und auf Steroidhormonrezeptoren (119, 120), die aber bei niedrigen Konzentrationen von Rezeptor und Ligand deutlicher werden (121). p23 beeinträchtigt so durch seine Bindung letztendlich die Wirksamkeit der Liganden von intrazelluläre Rezeptoren (IR), wie z.B. die transkriptionelle Aktivierungsaktivität der entsprechenden Hormone (114). Funktionell konnte nachgewiesen werden, dass p23 die ATP-abhängige Freigabe der Hsp90-Substrate

(„Klienten“-Proteine, wie Kinasen) beschleunigt. 2002 wurde dann erstmals gezeigt, dass humanes Hsp90 *in vitro* selbst ATPase-Aktivitäten besitzt und p23 als Kochaperon deren basales, aber auch „Klienten“-stimuliertes Level inhibiert. Offenbar ist die Regulierung der ATPase-Aktivität von Hsp90 durch p23 wichtig und erlaubt damit die Bindung von z.B. Kinasen an Hsp90 so lange, wie es für eine ausreichende Aktivierung erforderlich ist (122). Neueste *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen erbrachten Beweise, dass p23 auch den Abbau von transkriptionellen regulatorischen Komplexen, wie NF- $\kappa$ B oder AP-1 fördert und auf diese Weise der regulatorischen Maschinerie erlaubt, auf Veränderungen von Signalgebungen zu reagieren (123). Interessant sind auch Daten über die Beteiligung von Hsp's, insbesondere Hsp90 und p23, an der Regulation der Telomeraseaktivität. Beide sind mit der aktiven Telomerase assoziiert (124) und erhöhen ihre Expression z.B. im Verlauf einer Tumorentstehung, was mit einer höheren Telomeraseaktivität einhergeht (125). Eine erhöhte Telomeraseaktivität ist für eine verlängerte Lebensdauer proliferierender Zellen notwendig, da sich die Telomerlänge je Zellteilung verkürzt und damit die Lebensdauer von Zellen einschränkt. Ein erhöhte Telomeraseaktivität wurde auch in aktivierten T-Zellen nachgewiesen (126).

Während es bemerkenswerte Daten zum regulativen Einfluss von Hsp90 auf die T-Zellaktivierung gibt, existieren keine näheren Untersuchungen über p23 in seiner Expressionsregulation und seiner Bedeutung in diesem Zusammenhang.

### **1.8.1 Rolle der Chaperone in Signaltransduktion und Zellzyklus-Regulation**

Eine Vielzahl von TF's und Proteinkinasen, die in der **mitogenen Signaltransduktion** involviert sind, wurden in Assoziation mit Hsp90-Komplexen nachgewiesen (127, 128). Auch hier übernimmt Hsp90 offenbar eine entscheidende Rolle des Faltens, Zusammenlagerns, Stabilisierens und Transportierens von Signalmolekülen. So existieren auch 3 Komponenten des MAPK-Signalsystems (Ick, Raf, MEK) (129-131), in Komplexen mit Hsp90, ebenfalls Proteine der Zellzyklus-Regulation (CDKs, KIP-1, p53) (132) und andere Proteinkinasen, die auch während der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielen (PKR, HRI, PDK, PKB) (133-136).

Die Kinasen Ick, Raf und MEK übernehmen Schlüsselpositionen in einem der 3 MAPK-Kaskaden während der T-Zellaktivierung, dem der Mitogen-stimulierten MAP Kinase ERK, deren Aktivierung hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren induziert wird. Es ist bekannt, dass dieser Weg vor allem den Zellzyklusverlauf kontrolliert im Gegensatz zu den anderen

MAPK-Kaskaden (p38, JNK) (137). Die Aktivierung von Raf ist mit der Translokation des Raf/Hsp90-Komplexes zur Zellmembran verbunden (138). Die Dissoziation dieses Heterokomplexes durch das antiproliferative Antibiotika Geldanamycin führt zur Destabilisierung von Raf, damit zum Block des MAPK-Signalweges und verhindert den Transport neusynthetisierten Raf's an die Membran (130, 138-140). Geldanamycin bindet spezifisch an die ATP/ADP-Bindungsstelle von Hsp90, wirkt somit als kompetitiver Inhibitor und führt durch Konformationsveränderung zur Substratablösung (141). Es inhibiert damit nicht komplett die Hsp90-Funktion, sondern beeinflusst eher dessen substratbindende Fähigkeit. Geldanamycin hemmt die Aktivierung von T-Zellen (142) und beeinträchtigt über Kinase-Destabilisierung die T-Zellfunktion (143, 144). Obwohl von indirekten Assoziationen von p23 über Hsp90 an andere Kinasen berichtet wurde (124, 133, 145) gibt es noch keine Nachweise in dem Zusammenhang mit Raf, Ick oder MEK.

**Der Zellzyklus** besteht aus einer zyklischen Aufeinanderfolge von 4 Phasen: G1, S, G2 und M. G1-, S- und G2-Phase bilden die Interphase, während der die Zelle kontinuierlich wächst. Die Zellteilung erfolgt in der M-Phase. Die Neusynthese ist auf die S-Phase beschränkt. An bestimmten Punkten unterliegt der Zellzyklus sowohl externen als auch intrinsischen Kontrollmechanismen, welche die Zellteilung mit der Gesamtentwicklung des Organismus und mit den externen Wachstumsbedingungen abstimmen, wozu z.B. ungünstige Nährstoffversorgung oder mitogene bzw. amitogene Signale gehören. Zu den Schlüsselementen des ZZ gehören Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDK's), Cycline und die Inhibitoren der CDK's (CKI's) (146, 147), wovon ebenfalls einige mit Hsp90 assoziiert aufgefunden worden sind, so z.B. die CDK4 (148), die inhibitorische Kinase Wee1 (149, 150) oder das mutante p53 als Tumorsuppressorprotein (151, 152). CDK's werden erst nach ihrer Assoziation mit dem dazugehörigen Cyclin aktiv und können durch die zugeordneten Inhibitoren kontrolliert werden. Auch der Übergang zwischen inaktivem und aktivem Zustand der CDK's ist vielfältig durch Phosphorylierungen kontrolliert. Zwei Signale der T-Zellstimulation sind für den Zellzyklusdurchlauf notwendig. Zum einen induziert das TCR-Signal erforderliche Cycline und CDK's für die G1-Phase, die aber ohne zweites Signal insuffizient für die Bildung von G1-Komplexen (z.B. CDK + CyclinD) sind. Grund dafür ist die Inhibierung durch spezifische CDK-Inhibitoren (z.B. KIP-1), die eine Aktivierung verhindern. Erst das zweite Signal (z.B. IL-2) inhibiert den Inhibitor und erlaubt somit die CDK-Aktivierung und den Eintritt in die S-Phase des ZZ's (153, 154).

## 2 ZIELSTELLUNG

Immer noch besteht das Problem unzureichender Langzeittoleranzergebnisse in der Transplantationssituation, obwohl die Ein-Jahresüberlebensrate mittlerweile auf 90% erhöht worden ist. Neben der Optimierung der Therapien mit neuen verbesserten Immunsuppressiva wird nach weiteren Möglichkeiten gesucht, eine Toleranz mit möglichst therapiefreier Langzeit-Transplantatakzeptanz zu erreichen. Dabei sollte die normale Organfunktion und eine generelle Immunkompetenz erhalten bleiben. Eine Monotherapie mit dem anti-CD4mAk RIB5/2 induziert eine permanente Akzeptanz des Transplantates im Nierentransplantationsmodell der Ratte. In der vorliegenden Doktorarbeit sollten molekulare Effekte dieser anti-CD4mAk-Behandlung auf die Proliferation Alloantigen-aktivierter T-Zellen und die Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine und Effektorzytokine untersucht werden.

Detailliertere Kenntnisse über das Expressionsverhalten rejektions- bzw. toleranzassoziierter Gene könnten für die Entwicklung neuer Medikamente, die spezifisch diese Gene beeinflussen, nützlich sein. Andererseits wären sie als diagnostische Marker geeignet, die Induktion und den Erhalt eines toleranten Status besser beurteilen zu können.

Im Detail sollten folgende Teilfragen beantwortet werden:

Wie wirkt sich eine anti-CD4mAk-Behandlung auf die Proliferation und die Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine alloreaktiver T-Zellen aus?

Wie wird das Effektorzytokin IFN $\gamma$  unter anti-CD4mAk-Behandlung reguliert?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30 und 40%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Agarose	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Ammoniumsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia (ddH <sub>2</sub> O)	Delta Pharma, Pfullingen
Baktotrypton	DIFCO, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Promega GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Seromed, Berlin
Ethanol	Baker Analyzed, Deventer, N
Ethidiumbromid	Stratagene, Heidelberg
Ethylendiamin-tetraessigsäure-Na-Salz (EDTA)	Sigma, Saint Louis, USA
Ethylenglycol-bis-aminoethyl Ether (EGTA)	Sigma, Saint Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Seromed, Berlin
Geneticin (G-418 Sulfat)	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Hepes-Puffersubstanz	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Baker Analyzed, Deventer, N
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Lipofectamin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Methanol	Baker Analyzed, Deventer
Microcystin-LR	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
3-Morpholinopropansulfonsäure	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Steinheim
2-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma, Steinheim
Natriumpyruvat	Seromed, Berlin
Natrium-β-glycerophosphat	Sigma, Steinheim
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Ponceau S	Sigma, Steinheim

RPMI 1640 Medium	Seromed, Berlin
Saccharose	Merck, Darmstadt,
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Skim Milk Powder	Becton Dickenson, San Jose, USA
Small Fragment Agarose	Appligene Oncor
Tris-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypan Blue	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 Biochemikalien und Kits

AmpliTaq DNA-Polymerase, Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Coomassie Protein Assay Reagent-Kit	PIERCE, Rockford, IL., USA
ConcanvalinA (ConA)	Sigma, München
DNA-Marker 1kb	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
DNA-T4-Ligase	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
ECL-Kit™	Amersham Buchler, Braunschweig
Gel-Extraktions-Kit Jetsorb	GENOMED, Bad Oeynhausen
Geneticin (G-418 Sulfat)	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
MMLV-Reverse Transkriptase, First strand buffer, DTT	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
dNTP's	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Oligonukleotide	metabion, Martinsried
p123T-Vektor Cloning Kit	Mo Bi Tec, Göttingen
Pancoll	Pan Biotech, Aidenbach
Plasmid-Präparations-Kit Jet Star	Genomed, Bad Oeynhausen
Precision Protein Marker (broad range)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Proteasen Inhibitoren Cocktail	Roche, Mannheim
Qiagen Plasmid Kit 2.0 Maxi	Qiagen, Hilden
Ratten IFN $\gamma$ ELISA	Biosource, Solingen
Ratten IL-2 ELISA	Biosource, Solingen
Re-Blot Plus Stripping solution	Chemicon, Temecula, USA
Rekombinantes humanes Interleukin-2	Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA
Rekombinantes murines Interleukin-15	PeproTech, London, UK
Restriktionsendonukleasen, Puffer	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
RNA 6000 Reagents & Supplies	Agilent Technologies, Waldbronn
RNA-Marker 0,24-9,5 kb ladder	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNAsin	Promega, Madison, USA
Strata Prep Total RNA Mini Kit	Statagene, La Jolla, CA, USA
SYBR-PCR Core Reagents+ Mastermix	Applied Biosystems PE, Rodgau-Jügesheim
TA-Kloning-Kit	Invitrogen, Leek, N
Taq-Polymerase, Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer, Branchburg, USA

### 3.1.3 Radiochemikalien

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham Buchler, Braunschweig
----------------------------	--------------------------------

### 3.1.4 Verbrauchsmaterial

3MM-Whatman-Papier  
 Eppendorfggefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)  
 Filterpapier, Rotrand  
 Gewebekulturröhrchen  
 Nylon-Membran Hybond N  
 Gewebekulturröhrchen (15 ml, 50 ml)  
 Röntgenfilm Hybond MP  
 Röntgenfilmentwickler, -fixierer  
 Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)  
 Einmal-Injektions-Kanülen (Gr.16)  
 96, 24, 6 well Flachbodenplatten  
 96-well Rundbodenplatten  
 Einfrierröhrchen  
 Kulturflaschen (50ml)  
 Zellsiebe, 40 und 100µm Porengröße  
 Pasteurpipetten

Schleicher & Schöell, Dassel, D  
 Eppendorf, Hamburg, D  
 Schleicher & Schöell, Dassel, D  
 Greiner, Nürtingen, D  
 Amersham Buchler, Braunschweig, D  
 Falcon, Oxnard, USA  
 Amersham Buchler, Braunschweig, D  
 Kodak, Chalon, F  
 Greiner, Nürtingen  
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
 Nunc, Roskilde, Dänemark  
 Nunc, Roskilde, Dänemark  
 Nunc, Roskilde, Dänemark  
 Falcon, Oxnard, USA  
 Falcon, Oxnard, USA  
 Roth, Karlsruhe

### 3.1.5 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyser  
 Autoklav  
 Autoradiographiekassette  
 Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40  
 ELISA-reader Anthos 2001  
 Elektrophoresekammer  
 Durchflußzytometer FACSort  
 Feinpipetten Research  
 Gel Imager & E.A.S.Y. Enhanced Analyses System  
 Gelkammer  
 Heizblock  
 Lasermikroskop  
 Lichtmikroskop  
 Microwellengerät  
 Minigel für SDS-PAGE  
 pH-Meter  
 RNA/DNA-Kalkulator Gene Quant II  
 Schüttelinkubator Thermostat 5320  
 Schüttler, Vortex MS2 Minishaker  
 Semidry-Blotter (Fastblot)  
 Stromversorgungsgerät Consort 835  
 System für Zell-Harvesting und Filtermessung  
 Thermocycler 9600  
 Thermocycler 9700  
 Vakuum Blotter Biometra  
 Waagen  
 Wasserbad  
 Zentrifugen:  
 Biofuge Fresco  
 CentriconT-324  
 Centrifuge 5410 eppendorf  
 Megafuge 1.0  
 Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301

Agilent Technologies, Waldbronn  
 Gössner, Hamburg  
 Amersham Buchler, Braunschweig  
 Atomic Energy, Mississauga, Canada  
 Anthos Mikrosysteme GmbH, Köln  
 Renner GmbH, Dannstadt  
 Becton Dickinson, San Jose, USA  
 Eppendorf, Hamburg  
 Herolab, Wiesloch  
 Renner GMB, Dannstadt  
 Kleinfeld Labortechnik, Berlin  
 Zeiss, Jena  
 Leica, Braunschweig  
 Bosch, Stuttgart  
 Biometra, Göttingen  
 wiss.-techn. Werkstätte, Weilheim  
 Pharmacia, Uppsala, S  
 Eppendorf, Hamburg  
 IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen  
 Biometra, Göttingen  
 AGS, Heidelberg  
 INOTECH AG, Doltikon, Schweiz  
 Perkin Elmer, Branchburg, USA  
 Perkin Elmer, Branchburg, USA  
 biomed. Analytik, Göttingen  
 Sartorius, Göttingen  
 GFL, Burgwedel  
 Heraeus, Berlin  
 Kontron, Neufahrn  
 Eppendorf, Hamburg  
 Heraeus, Osterode  
 Eppendorf, Hamburg

### 3.1.6 Verwendete Oligonukleotide

<u>NAME</u>	<u>SEQUENZ</u>	<u>QUELLE</u>
<i>a) Primer für die cDNA Synthese:</i>		
Oligo-dT	keine Angabe	Pharmacia
<i>b) Primer zum Sequenzieren:</i>		
M13 universal	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	MediGenomix
M13 reverse	5'-GGATAACAATTCACACAGGA-3'	MediGenomix
pLXSN-Primer	5'-CTT TAT CCA GCC CTC A - 3'	
IRES- Primer	5'-TAT TCC AAG CGG CTT CGGG CC - 3'	
<i>c) Oligonukleotide für die „Real-Time“ TaqMan PCR:</i>		
rat p23 universal	5'-AGC ATA AAA GAA CGG ACA GAT CGA - 3'	
rat p23 reverse	5'-CCT TTG TTA ACC TAG GCC AGG ATT - 3'	
human p23 universal	5'-TTT ACG AAA AGG AGA ATC TGG CC - 3'	
human p23 reverse	5'-TCT TCC CAG TCT TTC CAA TTA TTG AA - 3'	
rat IL-2 universal	5'-CTC CCC ATG ATG CTC ACG TT-3'	
rat IL-2 reverse	5'-TCA TTT TCC AGG CAC TGA AGA TG-3'	
rat IL-2 Sonde	5'-CAA TTC TGT GGC CTG CTTGGG CAA-3'	
rat IFN $\gamma$ universal	5'-AAC AGT AAA GCA AAA AAG GAT GCA TT - 3'	
rat IFN $\gamma$ reverse	5'-TTC ATT GAC AGC TTT GTG CTG G - 3'	
rat IFN $\gamma$ Sonde	5'-CGC CAA GTT CGA GGT GAA CAA CCC-3'	
rat CD3 universal	5'-CAA AGA AAC TAA CAT GGA GCA GGG-3'	
rat CD3 reverse	5'-CTT TTT GCT GGG CCA TGG T-3'	
rat CD3 Sonde	5'-AGG TTT GGC TGG CCT CTT CCT GGT G-3'	
<i>d) Primer für p23 Antisense-Klonierung:</i>		
p23 (Eco) sense	5'-CCG GAA TTC CTG GCC CTC TGC CCC - 3'	
p23 (Eco) antisense	5'-CCG GAA TTC GAT ACC ACT CTT TAC - 3'	
p23-5'-universal	5'-AGA GGA GTC GAC TCG CCA G - 3'	
p23-5'-reverse	5'-TTC TCA AGC AAC AAT GTA CAG C - 3'	

### 3.1.7 Vektoren

pLXSN-IRES-GFP	<i>Amp<sup>R</sup>, Neo<sup>R</sup>, pBR322ori, <math>\psi^+</math>, P<sub>SV40</sub>, 5'/3'-LTR-Promoter</i>	Dr.A. Flügel, MPI, München
p123T	<i>Ap<sup>R</sup>, lacI, lacZ<math>\alpha</math>, M13ori, ColE1ori, T3/T7-Promoter</i>	Mo Bi Tec

### 3.1.8 Antikörper

anti-Aktin-IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
anti-eIF4E	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-human-CD28	Becton Dickinson, San Jose, USA
anti-human-CD3 (OKT3)	Janssen-Cilag, Neuss
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
anti-Maus-IgG-HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
anti-p23-IgG	Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
anti-phospho-4EBP1	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-Akt	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-ERK, anti-ERK	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-GSK3	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-Mnk1	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-p38, anti-p38	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-p70S6	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-phospho-S6	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-Ratten-CD25	Serotec GmbH, Düsseldorf
anti-Ratten-CD28	Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-Ratten-CD3	Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-Ratten-CD4 (RIB5/2)	Dr. Lehmann, Rostock

### 3.1.9 Inhibitoren

2-Aminopurin (PKR-Inhibitor)	Sigma, Deisenhofen
Aphidicolin (Zellzyklus-Inhibitor)	AG Radbruch, DRFZ Berlin
Bisindolylmaleimide-1 (PKC-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
Cyclosporin A (Sandimmun)	Sandoz AG, Nürnberg
L-Mimosine (Zellzyklus-Inhibitor)	AG Radbruch, DRFZ Berlin
Ly294002 (PI3 Kinase Inhibitor)	Cell Signaling, Beverly, USA
Mycophenolic acid (Zellzyklus-Inhibitor)	AG Radbruch, DRFZ Berlin
Nocodazole (Zellzyklus-Inhibitor)	AG Radbruch, DRFZ Berlin
PD184352 (MEK-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
Rapamycin (mTOR-Inhibitor)	Sigma, Deisenhofen
SB203580 (p38-Inhibitor)	Sigma, Deisenhofen

### 3.1.10 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$  *supE44,  $\Delta$  lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15), *hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1**

### 3.1.11 Rattenstämme

Dark Agouti (DA), Haplotyp: RT-1 <sup>avl</sup>	Moellegard, Dänemark
Lewis (LE), Haplotyp: RT-1 <sup>l</sup>	Moellegard, Dänemark

### 3.1.12 Zelllinien

GP+E 86 Verpackungszelllinie	Dr. A. Flügel, MPI f. Neurobiologie, Abteilung Neuroimmunologie, München
Phoenix Verpackungszelllinie	AG A. Radbruch, DRFZ, Berlin

## 3.1.13 Puffer und Medien

DEPC-H <sub>2</sub> O:	1 ml	Diethyl Pyrocarbonate add 1l ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
DMEM-Medium:	1 mM 2 mM 100 U/ml 100 µg/ml 10 % (v/v)	Natriumpyruvat L-Glutamin Penicillin Streptomycin FKS (56°C hitze-inaktiviert)
DNA-Marker:	50 µl 100 µl 350 µl	1kb-Marker (1µg/µl) Ladepuffer TAE-Puffer (1x)
Elektrodenlaufpuffer :	15,1 g 72 g 5 g	Tris-Base Glycin SDS add 5 l ddH <sub>2</sub> O
Erylysispuffer:	8,3 g 10 mM 0,1 mM	NH <sub>4</sub> Cl NaHCO <sub>3</sub> EDTA
FACS-Puffer:	2 % (v/v) 0,1 % (w/v)	FKS NaN <sub>3</sub> in PBS
2 x HBSP-Puffer:	50 mM 10 mM 12 mM 280 mM 1,5 mM	Hepes KCl Dextrose (Glucose) NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O pH 7,05
LB-Agarplatte:	zum LB-Medium wurde 1.5 % (w/v) Agar gegeben und aufgeköcht	
LB-Medium:	10 g 5 g 10 g	Baktotrypton Hefeextrakt NaCl add 1 l ddH <sub>2</sub> O
Lösung D:	3,676 g 236,32 g 2,5 g	(tri)-Nacitrat-Dihydrat Guanidine-Isothiocyanate N-Lauroylsarcosin ad 500 ml DEPC-H <sub>2</sub> O, pH 7,0
PBS:	8 g 0,2 g 1,15 g 0,2 g	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1l ddH <sub>2</sub> O
Probenpuffer DNA:	50 % (v/v) 0.2 % (w/v) 0.05 % (v/v) 10 mM	Glycerin SDS Bromphenolblau EDTA in 1x TAE

Probenpuffer Protein:	2 ml 0,2 g 5 ml 0,5 ml 0,1 ml 2,4 ml	0,625 M   1 % (w/v)	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau (in Ethanol) ddH <sub>2</sub> O
Protein-Lysispuffer	50 mM 1 mM 1 mM 1% (w/v) 1 mM 50 mM 5 mM 10 mM 0.27 M 1 μM 0.1% (w/v) 1 tablet/ 50 ml		Tris-HCl pH7.5 EGTA EDTA Triton-X 100 Natriumorthovanadat Natriumfluorid Natriumpyrophosphat Natrium-β-glycerophosphat Saccharose Microcystin-LR β-Mercaptoethanol 'complete' Proteasen Inhibitor Cocktail
RPMI-Medium:	1 mM 2 mM 100 U/ml 100 μg/ml 10 % (v/v)		Natriumpyruvat L-Glutamin Penicillin Streptomycin FKS
Sammelgel:	0,33 ml 0,4 ml 0,4 ml 0,87 ml 2 μl 10 μl	30 %/ 0,8% 0,625 M 0,5 % (w/v)  10 % (w/v)	Acrylamidstammlösung Tris-HCl (pH 6,8) SDS ddH <sub>2</sub> O TEMED APS
TAE:	40 mM 20 mM 2 mM		Tris-Base Essigsäure EDTA (pH 8,0)
TBE:	450 mM 20 mM 10 mM		Tris-Base Borsäure EDTA (pH 8,0)
TBST-Waschpuffer:	10 mM 150 mM 0,05 % (v/v)		Tris-Base NaCl Tween 20
Transferpuffer:	25 mM 150 mM 10 % (v/v)		Tris-Base Glycin Methanol
Trenngel 15 %-ig:	3 ml 1,2 ml 1,2 ml 0,6 ml 5 μl 30 μl	30 %/ 0,8 % 1,88 M 0,5 % (w/v)  10 % (w/v)	Acrylamidstammlösung Tris-HCl (pH 8,8) SDS ddH <sub>2</sub> O TEMED APS
T-Zell-Medium (TCM):	5 mM 2 % (v/v)		β-Mercaptoethanol autologes Serum in DMEM-Medium

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 Isolierung, Modifizierung und Analyse von Nukleinsäuren

Folgende Methoden wurden nach Standardprotokollen [Sambrook et al.] oder Herstellerprotokollen (von kommerziell erhältlichen Kits) durchgeführt:

- *Agarosegelelektrophorese*
- *Mini-Präparation von Plasmid-DNA (Jetstar, Genomed)*
- *Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Maxi Plasmid Kit, Qiagen)*
- *Präparation und CaCl<sub>2</sub>-Transformation<sup>1</sup> von kompetenten Bakterien*
- *DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Jetstar, Genomed)*
- *Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen*
- *Ligation von DNA-Fragmenten*

#### 3.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Da die quantitative Aussagekraft der PCR-Methode wesentlich durch die Qualität und Quantität der umzuschreibenden RNA abhängt, wurde für die Präparierung der RNA der Kit „Absolutely RNA Miniprep Kit“ (Stratgene) verwendet. Er beinhaltet den sorgfältigen Probenaufschluss über einen Prefilter und einen DNase-Verdau von 15 Minuten bei 37°C, um eine hohe Reinheit der RNA zu gewährleisten.

#### 3.2.1.2 RNA-Quantifizierung

Die Verwendung eines RNA-Chips und des dazugehörigen Kits „RNA 6000 Nano Assay Reagents & Supplies“ (Stratagene) ermöglichte die präzise und schnelle Quantifizierung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

#### 3.2.1.3 cDNA-Synthese

Eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA während der RNA-Präparation wurden durch einen zusätzlichen DNase-Verdau vor der cDNA-Synthese beseitigt. Trotzdem wurden als Qualitätskontrolle von jeder Probe sogenannte „-RT“ (Reverse Transkriptase) - Proben mitgeführt.

---

<sup>1</sup> Transformation = Einführung nackter DNA in eine Bakterienzelle

Zur Auffaltung der Sekundärstrukturen (intramolekulare H<sub>2</sub>-Brückenbindungen) wurde 1 µg RNA mit 1 µl der Oligo-dT-Primer 10 min bei 70°C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gegeben. Hinzugegeben wurde folgender Mix pro Probe:

4 µl	FSB (5x)
2 µl	DTT
2 µl	dNTP's
0,25 µl	Rnase-Inhibitor (40U/µl) (RI)
1 µl	DNase (2U/µl)

Jetzt erfolgte der zusätzliche DNase-Verdau für 30 min bei 37°C mit anschließender 5 minütiger DNase-Inaktivierung bei 75°C. Nach 2 minütiger Eis-Inkubation wurde zu den cDNA-Proben jeweils 0,5 µl RT und RI gegeben. Bei den –RT-Proben wurde die Reverse Transkriptase durch 0,5 µl ddH<sub>2</sub>O ersetzt. Nun folgte die eigentliche cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min, die zum Schluss für 5 min bei 94°C gestoppt wurde.

### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.2.2.1 konventionelle PCR

Die PCR ist eine Methode, um ein bestimmtes DNA-Segment *in vitro* exponentiell zu amplifizieren.. Mittels zweier Oligonukleotide („Primer“), die an bekannte Sequenzbereiche des „sense“- und „antisense“- Stranges des DNA-Segmentes binden, findet eine Vervielfältigungsreaktion statt, die von einer hitzestabilen DNA-abhängigen Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) katalysiert wird. Die DNA wird bei Temperaturen von 94°C in einzelsträngige Moleküle denaturiert, gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die spezifische Region der Matrize bei einer dafür kalkulierten Annaelingtemperatur (gewöhnlich zwischen 40-60°C) und einer anschließenden DNA-Synthese bei 72°C durch die hitzestabile Taq-Polymerase (Elongation). Der 25 µl Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

17,9 µl	ddH <sub>2</sub> O
2,5 µl	PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (5mM)
1,0 µl	dNTPs (2,5mM)
0,5 µl	Forward Primer (10pmol/µl)
0,5 µl	Reverse Primer (10pmol/µl)
0,1 µl	Taq-DNA Polymerase (5U/µl)

Nach einer initialen Denaturierungsphase von 5 min bei 94°C folgten 30 bis 35 Zyklen, die jeweils die 3 Inkubationen für die Denaturierung (20 s), die Anlagerung (30 s) und die Verlängerung der Matrize (30 s) beinhalteten. Für eine vollständige Elongation schloss sich eine abschließende Inkubation für 5 min bei 72°C an.

### 3.2.2.2 „Real Time“ TaqMan-PCR

Diese quantitative PCR-Methode ermöglicht die Visualisierung der Amplifikation der Proben in Echtzeit. Unter Verwendung eines Farbstoffes, SYBR® Green, erhält man „Real Time“ PCR-Informationen, die pro Zyklus gemessen und über eine exponentielle Kurve verfolgt werden können. Aus dieser exponentiellen Probenanalyse wird bei der Real Time-PCR der sogenannte  $C_T$ -Wert („Theshold Cycle“) ermittelt, der die Zyklenzahl angibt, bei der zum ersten Mal ein statistisch signifikantes Reportersignal über dem Grundrauschen detektiert wird. SYBR® Green interkaliert während der Amplifikation in die Doppelstrang-DNA und lässt somit die Signalintensität proportional zur Produktmenge ansteigen. Das Problem hierbei sind unspezifische Signale, die von Primerdimeren stammen, die aber über eine Anzeige von Dissoziationskurven spezifischer Schmelztemperaturen detektiert werden können. Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgt für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM™ 5700 Sequence Detectors.

Neben dem Einsatz des SYBR® Green-Farbstoffes, gibt es die Möglichkeit, eine spezielle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonde zu verwenden, die zur Erhöhung der Spezifität beiträgt. Diese ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert und trägt am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat), der zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist. Bei Anregung der intakten Sonde bei einer spezifische Wellenlänge (488 nm) wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer gleichermaßen an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wobei die räumliche Nähe und somit auch der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Emission des Reporters als Signal gemessen werden kann. Freie, nicht-gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an. Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgt für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detectors.

Die Etablierung eines TaqMan-Primerpaares erfolgte nach den Regeln der SOP (erstellt am Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin, Fr. Vogt). Dazu gehören das Heraussuchen der Primer und Sonden mit der entsprechenden Software „Primer Express“, die Testung des Primerpaares und die Primertitration mit anschließender Effizienzbestimmung.

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

	Sonde	SYBR-Green
TM-Mastermix	12,5µl TM-Mastermix	12,5µl SYBR-Green-Mastermix
Steriles Wasser ddH <sub>2</sub> O	4,5µl	5,5µl
Primermix	6µl	6µl
Sonde	1µl	-----
Template	1µl	1µl

#### Zykler:

1 Zyklus    50°C   2 min  
 1 Zyklus    95°C   10 min  
 40 Zyklen   95°C   15 sec  
               60°C   1 min

Der TM-Mastermix enthält die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTP's mit dUTP, MgCl<sub>2</sub> (5mM Endkonzentration), ROX (passiver Referenzfarbstoff) und eine Uracil-N-Glycosylase. Der SYBR-Green- Mastermix enthält zusätzlich den Farbstoff SYBR-Green, dafür nicht die Glycosylase, die aber separat dazupipettiert werden kann (AmpErase).

Durch die Verwendung von dUTP's statt dTTP's werden eventuelle Kontaminationen mit bereits amplifizierten PCR-Produkten verhindert. Die Zugabe von dem Enzym Uracil-N-Glycosylase bewirkt während der 2-minütigen Inkubation bei 50°C die Hydrolyse Uracilhaltiger PCR-Produkte. Die anschließende 10-minütige Inkubation dient der Inaktivierung des Enzyms, der Denaturierung der verdauten DNA-Proben und der gleichzeitigen Aktivierung der Polymerase.

Die relative Quantifizierung der Expressionshöhe erfolgt unter Nutzung des ermittelten C<sub>T</sub>-Wertes. Generell gilt, umso höher die Startkopienzahl der Probe, desto geringer der C<sub>T</sub>-Wert. Arbeitet z.B. ein System mit 100 % Effizienz, nimmt der C<sub>T</sub>-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um genau einen Zyklus ab. Außerdem benötigt man für die quantitative Aussage zur Expression der zu untersuchenden Gene die gleichzeitige Amplifikation eines konstitutiv exprimierten Gens („house-keeping“-Gen z.B. CD3 bei T-Zellen). Ein dimensionsloses Ergebniss ermittelt man, wenn beide Primerpaare mit annähernd gleicher Effizienz arbeiten, über folgende Formel:

$$\text{Ergebnis} = (1 + \text{Effizienz})^{-(C_{T}^{\text{Genx}} - C_{T}^{\text{CD3}})}$$

### 3.2.3 Detektion und Analyse von Proteinen

#### 3.2.3.1 Zell-Lysis und Gesamtproteinbestimmung

Suspensionszellen wurden geerntet, indem sie nach dem Resuspendieren zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C) und anschließend kurz mit kaltem PBS gewaschen wurden. Der Überstand wurde so sauber wie möglich abgezogen und das Pellet schnellmöglichst in dem vorgekühlten Protein-Lysispuffer durch wiederholtes Scheren mit einer Kanüle (0,60 x 25 mm) resuspendiert. Dabei ist streng darauf zu achten, dass alle Arbeitsschritte bei 0°C - 4°C ablaufen. Die Lysate wurden zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand überführt und in flüssigen Stickstoff sofort weggefroren. Bis zur Proteinanalyse mittels Western-Blot wurden die Proben bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode mit dem kommerziell erhältlichen Kit von PIERCE ("Coomassie Protein Assay Reagent").

#### 3.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese + Western-Blot

Die Proben wurden für jeden Versuch mit einer Gesamtmenge an Protein von 30-50µg/20µl eingestellt, anschließend in einem Verhältnis von 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Vorschrift „Minigel und Minigel-Twin“ (Biometra, Göttingen) auf 15%-igen SDS-Gelen, die anschließend mit Hilfe des semi-trockenen Fastblot-System (Biometra) auf Nitrocellulosemembranen geblottet wurden. Der Transfer (48 cm<sup>2</sup> Gel) erfolgte für 1 Stunde bei 250 mA. Um den erfolgreichen Transfer einschätzen zu können, wurden die geblotteten Proteine auf der Membran durch eine kurze Färbung in Ponceaulösung sichtbar gemacht. Je nach verwendeten Antikörper wurden die Membranen entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 Stunde bei RT (Antikörper von Cell Signaling) in 5% Milchpulver / TBST (Blockmilch) inkubiert, um nichtspezifische Bindungen abzudecken. Die Antikörper wurden wie folgt inkubiert:

	<b>Antikörper von Cell Signaling</b>	<b>Sonstige Antikörper</b>
<b>Primärantikörper</b>	über Nacht, 4°C in 3%-ig BSA / TBST	1 h, RT in 5%-iger Blockmilch/ TBST
<b>Waschen</b>	3 x 5 min, RT mit TBST	5 x 5 min, RT mit TBST
<b>Sekundärantikörper</b>	1 h, RT in 5%-iger Blockmilch/ TBST	1 h, RT in 5%-iger Blockmilch/ TBST
<b>Waschen</b>	3 x 5 min, RT mit TBST	5 x 5 min, RT mit TBST

Die Detektion des gebundenen POD-markierten Sekundärantikörpers erfolgte mit dem ECL-Kit (Amersham). Reagenz A und B wurden dafür in einem Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 Minute darin inkubiert. Anschließend konnte der Substratumsatz autoradiographisch nach entsprechenden Zeitpunkten sichtbar gemacht werden.

### 3.2.3.3 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand

Zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden kommerzielle ELISA-Kits eingesetzt. Es wurde bei allen Proteinbestimmungen gemäß den Herstellervorgaben verfahren. Die Messung wurde für folgende Zytokine durchgeführt: Ratten IFN- $\gamma$  und Ratten IL-2. Die Auswertung fand *am ELISA-Reader Anthos 2001* statt.

### 3.2.4 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Die MLC ist ein *in vitro*-Modell der T-Zell-Antwort, die im Laufe einer allogenen Transplantat-Abstoßungsreaktion ausgelöst wird. Hierfür wurden Lymphozyten der zwei verschiedenen Rattenstämme Lewis, als Empfänger, und DA, als Stimulator isoliert und gemeinsam kultiviert. Da Lewis und DA komplett in ihren MHC I- und MHC II- Molekülen differieren, ist dieses Rattenmodell besonders gut für die Analyse einer starken T-Zell-Antwort geeignet. Für die Gewährleistung der einseitigen Reaktion wurden die DA-Lymphozyten vorher bestrahlt (30Gray).

### 3.2.4.1 Isolierung lymphatischen Gewebes

Die Tötung der Tiere erfolgte durch ein Carbogen-Kohlendioxid-Gasgemisch mit einem Narkose- und Tötungsgerät. Im Anschluss wurden die Körper mit einer 70%-igen Ethanolspülung grob desinfiziert und sofort thorakal zur kardialen Blutabnahme geöffnet. Nach Entnahme des Thymus wurden mesenterial und subkutan die Lymphknoten sauber aus Bindegewebe und Fett herausgelöst und in steriles DMEM-Medium überführt. Die Aufarbeitung wurde möglichst sofort durchgeführt.

### 3.2.4.2 Kultivierung der Zellen

Die folgende Verarbeitung der lymphatischen Gewebe fand unter sterilen Bedingungen statt. Zur Gewinnung der Einzelzellsuspension wurden die Organe erst durch ein 100 µm Nylonsieb gedrückt, in T-Zell-Medium (TCM) aufgenommen und anschließend durch ein 40 µm Nylonsieb gespült. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer mittels Vitalfärbung mit Trypan-Blau bestimmt. Je nach Tieralter und Präparation ergaben die Lymphknoten  $1-2 \times 10^8$  lebende Zellen. Währenddessen wurde das kardial gewonnene Blut zur Serumgewinnung bei 4500 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert und der so entstandene Serumüberstand abgenommen und bis zur Anwendung bei 4°C gelagert.

Die für die MLC dienenden Stimulator-Zellen (DA) wurden vor der Kultivierung mit 30 Gray bestrahlt. Von den Stimulator-Zellen wurden  $3 \times 10^5$  mit  $3 \times 10^5$  „Responder“-Zellen pro well einer 96 well Flachbodenplatte in 200 µl TCM/ well bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Je nach Fragestellung wurden zu den Reaktionsansätzen noch Antikörper, Inhibitoren oder Zytokine in entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte in einer 5 Tage-Kinetik, indem pro Tag und Ansatz die Zellen geerntet und die Überstände, sowie die Zellpellets nach einmaligen Waschen mit PBS für weitere Analysen bei -70°C weggefroren wurden.

### 3.2.4.3 Intrazelluläre IFN $\gamma$ Expression

Die Zellsuspensionen der MLC wurden geerntet und mit PBS (2% FKS, 0,02% Azid) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C mit 4µg/ml FITC-markierten anti-Ratten- $\alpha,\beta$ -TCR Antikörper und/ oder PerCp-markierten anti-Ratten-CD8 Antikörper. Die Proben wurden danach mit einer Lysislösung von Becton Dickenson für 15 min bei RT fixiert und mittels 0,2% Saponin/ PBS permeabilisiert. Nach einem erneuten

Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mit 4µg/ml PE-markierten anti-Ratten-IFN $\gamma$  Antikörper gefärbt und die IFN $\gamma$  Expression in T-Zellen mittels 3-Farben-Durchflußzytometrie am FACScort (BD) bestimmt.

#### 3.2.4.4 Proliferationsassay

Zur Bestimmung des Proliferationspotentials der Zellen wurden am Tag 3 einer MLC 18,5 kBq  $^3\text{H}$ -Thymidin / well dazupipettiert und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden entweder sofort geerntet oder bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Detektion des Thymidineinbaus wurde das System von INOTECH verwendet.

#### 3.2.4.5 Inkubation mit „Antisense“-Oligonukleotiden

Zur Inhibierung der p23 Proteinexpression in den allogenen Kulturen wurden von der Firma *Biognostik* aufgrund der ermittelten Ratten-cDNA-Sequenz zwei verschiedene „Antisense“-Oligonukleotide mit den dazugehörigen „Nonsense“-Oligonukleotiden (Basensequenz der „Antisense“-Oligonukleotide zufällig angeordnet) synthetisiert.  $4 \times 10^6$  „Responder“-Zellen wurden dabei vor der MLC mit 10 µM Oligonukleotiden für 30-45 min bei  $37^\circ\text{C}$  in PBS mit oder ohne Lipofektaminzusatz (10 µg/ml) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TCM gewaschen und gemeinsam mit Stimulator-Zellen ausplattiert. Als Kontrolle diente der gleiche allogene Ansatz ohne Oligonukleotidbehandlung. Die Proteinanalyse der p23-Expression und die Proliferationskontrolle mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin Essay erfolgte am Tag 4 der Kultur.

### 3.2.5 Generierung von p23 Antisense-transgenen Zellen

#### 3.2.5.1 Klonierung von p23 in den pLXSN-Vektor

Für die Klonierung von p23 in das retrovirale Expressionsplasmid pLXSN-IRES-GFP erfolgte zunächst eine Zwischenklonierung in den p123T-Vektor. Mit den p23-spezifischen Primern p23-5'-universal und p23-3'-reverse wurde aus cDNA (aCD4-behandelte Ratten-LK-MLC) ein ca. 1800 bp großes p23-Fragment amplifiziert. In diesem Fragment war der komplette ORF enthalten. Aufgrund der Größe des Fragments wurde das *Expand High Fidelity PCR-Systems* von Boehringer Mannheim eingesetzt, da dieses System eine Polymerase mit „proofreading activity“ enthält. Von dem PCR-Ansatz wurden 20 ng direkt für die Ligation in den p123T genutzt. Nach der Transformation kompetenter DH5 $\alpha$ -

Bakterien und einer anschließenden Plasmid-Präparation zeigten Sequenzierungen die Richtigkeit der p23-Basefolge. Der pLXSN-IRES-GFP stellte nur eine univale Schnittstelle (EcoRI) zur Verfügung, die nicht in dem zu klonierendem p23-Fragment vorkam. Deshalb musste diese erst mit Hilfe der Primer p23(Eco)sense und p23(Eco)antisense in die p23-Sequenz mittels PCR eingefügt werden. Damit die Primer mit der Basensequenz für die EcoRI-Schnittstelle trotzdem an die Matrize anlagern konnten, waren vor den 30 Zyklen mit der spezifischen Annealingtemperatur von 61°C 5 Zyklen bei 45°C eingefügt. Nach Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Konzentration mit dem RNA / DNA Kalkulator Gene Quant II bestimmt. Anschließend wurden die p23-DNA und der pLXSN-Vektor mit EcoRI geschnitten, extrahiert und ligiert. Um Rezirkulationen und Religationen der linearisierten Vektor's zu vermeiden, wurde dieser vor der Ligation einer Phosphatase-Behandlung (CIP, Promega) unterzogen. Der folgenden Transformation schloss sich die Isolation der Plasmid-DNA an, die mit einer Restriktionskontrolle auf das Vorhandensein des p23-Inserts und dessen Orientierung analysiert wurde. Durch anschließende Sequenzierung mittels spezifischer pLXSN- und IRES-Sequenzierprimer sollten die Ergebnisse bestätigt werden.

### 3.2.5.2 *Transfektion*<sup>2</sup>

#### a) Kalzium-Phosphat Transfektion:

GP+E 86 Zellen bzw. Phoenix-Zellen wurden in DMEM-Medium in T75-Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Bei Erreichen einer ca. 90%-igen Konfluenz wurden die Zellen je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:10 aufgeteilt. Einen Tag vor Transfektion wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen je 6 cm-Schale ausplattiert, so dass bis zum folgenden Tag möglichst 60% - 70% Konfluenz erreicht wurde. Circa 4 Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Transfektion erfolgte nach dem Standardprotokoll für Kalzium-Phosphat-Präzipitation adhärenter Zellen [ Sambrook et al.] mit 10µg DNA. Die Vorbereitung zur Transduktion verlief für die Zelllinien auf zwei verschiedenen Wegen:

1) GP+E-Zellen: Nach maximal 18 Stunden Inkubation wurde das Medium gewechselt unter Zugabe von Gentamycin (G-418, 1mg/ml) zur Selektionierung der positiven Zellen. Von diesem Zeitpunkt an wurde allen Passagen der GP+E-p23 Zellen (Sense bzw. Antisense) G-418 dem Medium zugesetzt. Die positiven GP+E-p23 Zellen wurden so expandiert und in

---

<sup>2</sup> Transfektion = Einbringen fremder DNA in eukaryontische Zellen

Einfriermedium (FKS, 10% DMSO) zur Lagerung in Flüssigstickstoff weggefroren für die Generierung stabiler GP+E-p23-Klone.

2) Phoenix: Ungefähr 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel, wobei ab diesem Zeitpunkt RPMI-Medium verwendet wurde. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand gesammelt und sofort bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Transduktion<sup>3</sup> mittels Virusüberstandes zwischengelagert.

#### b) Lipofektamin-Transfektion:

Die Transfektion mit Lipofektamin erfolgte an Phoenix-Zellen, die 1 Tag vorher mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro well in einer 6-well-Platte in 2,5 ml DMEM ausplattiert wurden. Bei einer Zelldichte von 90% wurde das Gemisch aus 5  $\mu\text{g}$  DNA und 15  $\mu\text{l}$  Lipofektamin2000 (GibcoBRL) jeweils in 250  $\mu\text{l}$  FKS-freiem DMEM-Medium kombiniert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser DNA-Lipofektamin-Komplex wurde vorsichtig zu den Phoenix-Zellen pipettiert und im Inkubator kultiviert. Ungefähr 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel, wobei ab diesem Zeitpunkt RPMI-Medium verwendet wurde. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand gesammelt und sofort bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Transduktion mittels Virusüberstandes zwischengelagert.

#### 3.2.5.3 Generierung stabiler GP+E-p23 Klone („limited dilution“)

Die polyklonale Verpackungszelllinie GP+E-p23Sense bzw. p23Antisense wurde zur Klonierung einer monoklonalen Verpackungszelllinie einer Verdünnungsreihe nach folgendem Schemata unter G-418 (1 mg/ml)-Selektion unterzogen:

2 x 96 well Platte mit 3 Zellen / well  
2 x 96 well Platte mit 0,3 Zellen / well

In den nächsten 4-6 Wochen der negativen Selektion konnten 2 GP+E-Klone mit p23 Sense und 4 Klone mit p23 Antisense expandiert werden. Zur Bestimmung der Höhe der p23 Expression wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in entweder 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer für eine anschließende FACS-Analyse des Reportergen GFP oder in 100  $\mu\text{l}$  Proteinlysispuffer für einen p23-Proteinnachweis aufgenommen.

---

<sup>3</sup> Transduktion = Übertragung genetischen Materials von Zelle zu Zelle durch Retrovirus

#### 3.2.5.4 *Retrovirale Transduktion von T-Zellen*

Zur Durchführung der Transduktion wurde 1 Tag vorher eine Milz-T-Zellkultur (Maus) angesetzt. Dafür wurde die entnommene Milz in PBS durch ein 70 µm Nylon-Sieb gedrückt und die Erythrozyten durch Lyse entfernt. Dazu wurde das Zellpellet in PBS in einem Verhältnis von 1:4 in Ery-Lysispuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mittels zweifacher Menge an 0,5 % BSA in PBS gestoppt und anschließend bei 1200 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach einem Waschschrift mit PBS in RPMI-Medium aufgenommen und mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper (jeweils 3 µg/ml) versetzt. Die Aussaat erfolgte in einer Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen /well. Am folgenden Tag wurde  $\frac{3}{4}$  des Mediums vorsichtig abgenommen, aber nicht verworfen. Die aufgetauten Virusüberstände wurden zusammen mit Polybren (8 µg/ml) auf die Zellen verteilt und dann für 1 Stunde bei 1800 rpm und 25°C zentrifugiert. Nach der Transduktion konnte der retrovirale Mediumüberstand von den wells gegen das aufbewahrte Medium ausgetauscht werden. Die Zellen wurden 24 Stunden später aufgrund starker Proliferation im Verhältnis 1:2 aufgeteilt und konnten dann für die folgenden 48 Stunden bei 37°C kultiviert werden.

#### 3.2.5.5 *Analyse der p23 transgenen<sup>4</sup> T-Zellen*

Die Zellen konnten im Anschluss auf positive GP+E-p23Sense bzw. p23Antisense Zellen gesortet werden. Dafür wurden die Pellets bei 1200 rpm, 10 Minuten, 4°C zentrifugiert, in 750 µl 0,5 % BSA haltigem PBS resuspendiert und durch einen 40 µm Nylon-Filter aufgereinigt. Nach Zugabe von 3 µM Propidiumjodid zu den transduzierten Zellen, um die toten Zellen ausschließen zu können, wurden diese sofort im Anschluss am Durchflußzytometer „FACSort“ gesortet. Auch hier erfolgte die Detektion der positiven Zellen über das Reporter gen GFP. Diese positiv gesorteten Zellen wurden für spätere Analysen verwendet.

---

<sup>4</sup> Transgen = eingeschleustes und stabil in das Genom integriertes Fremdgen

## 4 ERGEBNISSE

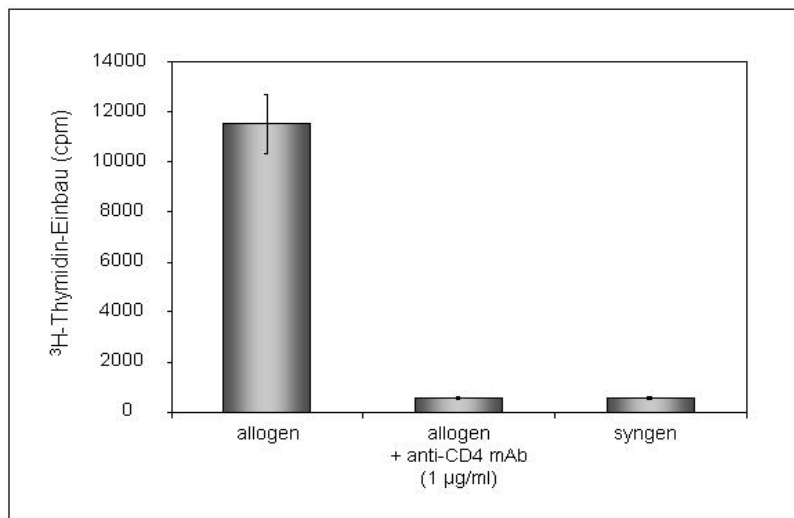
### 4.1 AUSWIRKUNG DER ANTI-CD4-ANTIKÖRPER BEHANDLUNG AUF DIE PROLIFERATION UND DIE EXPRESSION ZELLZYKLUS-ASSOZIIERTER PROTEINE ALLOREAKTIVER T-ZELLEN

#### 4.1.1 Proliferationskontrolle

Mit Hilfe der Gemischten Lymphozytenkultur (MLC) kann man *in vitro* die direkte Antigenerkennung eines Transplantats durch allo-spezifische T-Zellen des Empfängers simulieren (siehe auch 6.2.4). Sie ermöglicht damit die Analyse der Auswirkung einer anti-CD4-Antikörper Behandlung auf die Aktivierung allo-spezifischer T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen äußert sich unter anderem in deren Proliferation. Die proliferative Antwort wurde zwischen Tag 3 und Tag 4 der 5-Tage-MLC über den Einbau des radioaktiven Nukleotids  $^3\text{H}$ -Thymidin in die neusynthetisierte DNA sich teilender Empfänger-Zellen gemessen (Abb.5). Die Stimulator-Zellen waren durch die Bestrahlung vor der Kultur nicht mehr fähig zu proliferieren. Für die Analyse wurden folgende Kulturansätze miteinander verglichen:

1. allogene MLC (Stimulator- und „Responder“-Zellen von verschiedenen Rattenstämmen, DA nach Lewis)
2. allogene MLC + anti-CD4-Antikörper (RIB5/2, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), (aCD4mAk)
3. syngene MLC (Stimulator- und „Responder“-Zellen vom gleichen Rattenstamm, Lewis nach Lewis)

Die syngene MLC diente als Negativ-Kontrolle, da bei fehlender Fremd-Antigenerkennung im Falle genetisch identischer Individuen keine T-Zellaktivierung und damit -proliferation erfolgen sollte.



**Abb.5: Anti-CD4mAk hemmt die T-Zellproliferation in der Gemischten Lymphozytenkultur.** Die allogene, allogene anti-CD4mAk-behandelte und syngene T-Zellantwort wurde zwischen Tag 3 und 4 über den Einbau von radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin gemessen. Die geernteten Zellen wurden mittels Proliferationsassay analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardabweichung von jeweils 5 untersuchten Kulturansätzen.

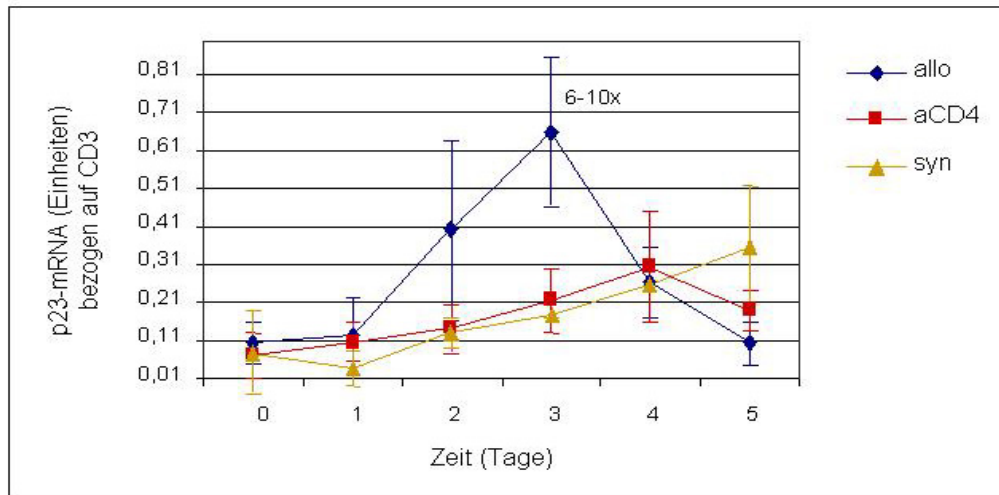
Im Gegensatz zu unbehandelten allogen stimulierten T-Zellen lässt sich die T-Zellproliferationsantwort unter Gabe des anti-CD4mAk's verringern. Unter anti-CD4-Behandlung nur noch ca. 10% der Proliferation, vergleichbar mit der syngenen Kontrolle, detektierbar. Der anti-CD4mAk ist also in der Lage, eine allogen-induzierte TCR-vermittelte Proliferation von T-Zellen nahezu komplett zu verhindern.

#### 4.1.2 Expression des Kochaperons p23 während der Gemischten

##### Lymphozytenkultur

Es ist bekannt, dass das Chaperon Hsp90 in proliferierenden Säugerzellen hochreguliert wird und eine Zellzyklus-abhängige Expression aufweist. Außerdem assoziiert Hsp90 transient mit Schlüsselproteinen des Zellzyklus und der Mitogen-aktivierten Signalkaskade (siehe 4.8). p23 als Kochaperon von Hsp90 wurde mittels PCR-Select als ein differentiell exprimiertes Gen in anti-CD4mAk-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen einer MLC am Tag 5 identifiziert (siehe 4.7). Da wenig über dessen Bedeutung oder sogar Regulation während der T-Zellaktivierung bekannt ist, sollte die Expressionskinetik von p23 in allo-aktivierten T-Zellen untersucht werden. Dafür wurde eine MLC mit den Kulturansätzen 1-3 (siehe 7.1.1) für 5 Tage angesetzt und die RNA täglich mit Hilfe der Real Time TaqMan-PCR quantifiziert (Abb.6). Die p23-Werte wurden auf CD3 bezogen, weil dieses Molekül mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) aller T-Zellen assoziiert ist und so als „house-keeping gene“ zur Normung

der T-Zellanzahl genutzt werden konnte. Das „house-keeping gene“ dient als interner Bezugswert für die Effizienz der cDNA-Synthese, damit Proben verschiedener zellulärer Ansätze vergleichbar sind.



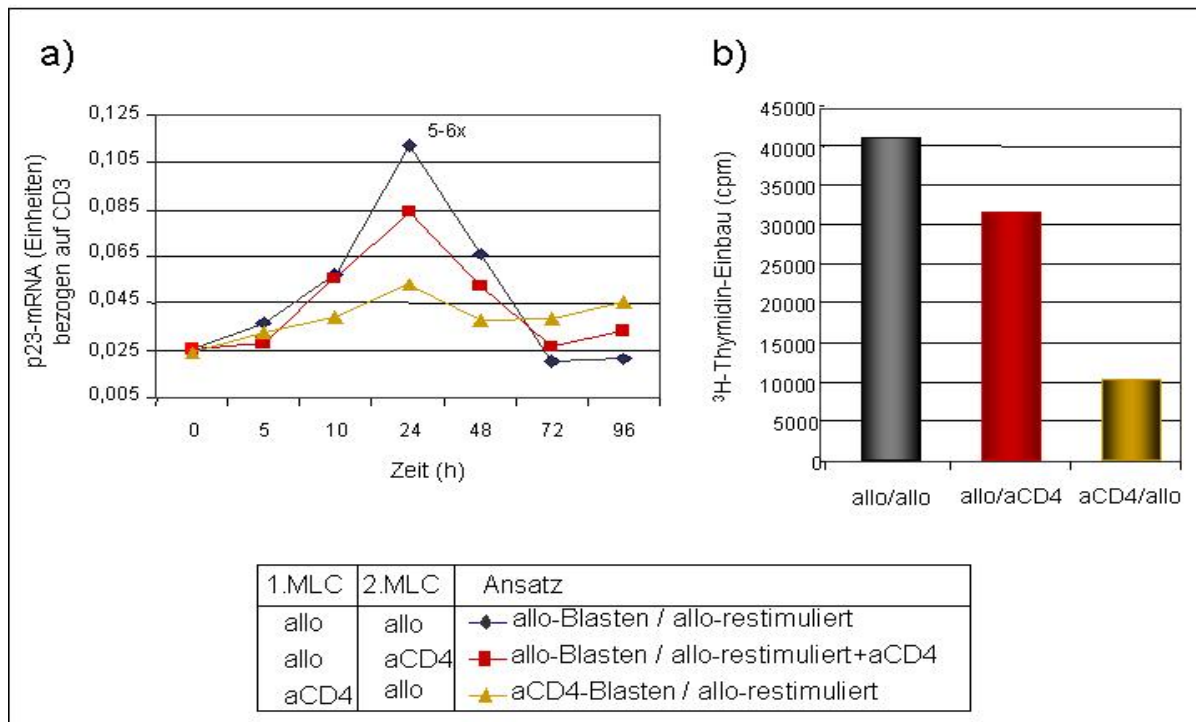
**Abb.6: Einfluss der anti-CD4mAk-Behandlung auf das p23 Expressionsmuster allo-aktivierter T-Zellen.** Unbehandelte allo-aktivierte (◆), anti-CD4mAk-behandelte allo-aktivierte (■) und syngene T-Zellen (▲) wurden von Tag 0 bis 5 der MLC gerettet. Die RNA wurde isoliert und die p23 mRNA Expression mittels Real Time PCR analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse fünf unabhängiger Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung.

Wie aus Abbildung 6 deutlich wird, führt eine Alloaktivierung von T-Zellen zur Hochregulation der p23 mRNA Expression zwischen Tag 2 und 3. Im Vergleich zur syngenen Kontrolle und unstimulierten Responder-Zellen war ein 6-10facher Expressionsanstieg zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Vergleich zu einem nicht T-Zell-spezifischen house-keeping Gen ( $\beta$ -Aktin) erzielt (Daten nicht dargestellt). Die anti-CD4-Behandlung allogenen-stimulierter Zellen führte zu einer Reduzierung dieser Hochregulation auf das Niveau der syngenen Kontroll-MLC. Es ist zu erkennen, dass in der p23 Expressionskinetik zum Tag 5 hin eine Veränderung erfolgt. Im Gegensatz zur allogenen MLC, in der die p23 Expression wieder rapide abfällt, ist ein leichter Anstieg der Expression von p23 in der syngenen und anti-CD4-behandelten MLC zu beobachten. Damit lässt sich erklären, warum p23 ursprünglich am Tag 5 als ein selektiv exprimiertes DNA-Fragment in anti-CD4-behandelten Kulturen und nicht in der unbehandelten allogenen Kultur identifiziert wurde. Es zeigt auch, wie wichtig Kinetikuntersuchungen sind, um funktionell differentielle Genexpressionsmuster richtig zu interpretieren.

In Bezug auf diese Daten wollten wir zusätzlich untersuchen, ob die p23 Expression von restimulierten Memory-T-Zellen ebenfalls hochreguliert wird. Zuerst wurde eine allogene MLC und eine anti-CD4mAk-behandelte allogene MLC für 5 Tage durchgeführt. Am Tag 5 erfolgte die Aufreinigung der allo-spezifisch aktivierten T-Zell-Blasten (Lewis) über einen Ficoll-Gradienten und ein anschließendes „Hungern“ (Starven) über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Dafür wurden die Blasten in einer 24-well-Platte mit  $2 \times 10^6$  Zellen/well aufgeteilt und in 1% FCS-haltigem Medium inkubiert. Die gestarvten T-Zellen lagen 24 Stunden später in einem deaktivierten Zustand vor, der sich mikroskopisch über deren reduzierte Zellgröße feststellen ließ. Die allogene Restimulation wurde mit den aufgereinigten T-Zellen ( $5 \times 10^4$ /well), bestrahlten DA-Thymozyten ( $2,5 \times 10^5$ /well) und bestrahlten Lewis-Thymozyten ( $1,5 \times 10^5$ /well) angesetzt. In Abbildung 3 ist die Auswertung von 3 unterschiedlichen Ansätzen dargestellt:

1. allogene Blasten / allogen restimuliert
2. allogene Blasten / allogen restimuliert + anti-CD4mAk (1µg/ml)
3. aCD4-behandelte Blasten / allogen restimuliert

Allogen-voraktivierte T-Zell-Blasten regulierten nach wiederholter Stimulation durch allogene Antigene die p23 mRNA Expression wieder um ein 5-6faches hoch, allerdings diesmal schon nach 24 Stunden (Abb.7a). Im Gegensatz zur Primärstimulation hatte der anti-CD4mAk kaum noch einen inhibitorischen Einfluss auf die p23 mRNA Expression restimulierter allogener Blasten. Interessanterweise blieben anti-CD4mAk-behandelte Blasten auch nach allo-spezifischer Reaktivierung anerg. Ähnliche Daten hinsichtlich der Aktivierung restimulierter T-Zellen waren im Proliferationsassay (Abb.7b) erkennbar, was einen Zusammenhang zwischen T-Zell-Vermehrung und p23mRNA-Regulation vermuten ließ.

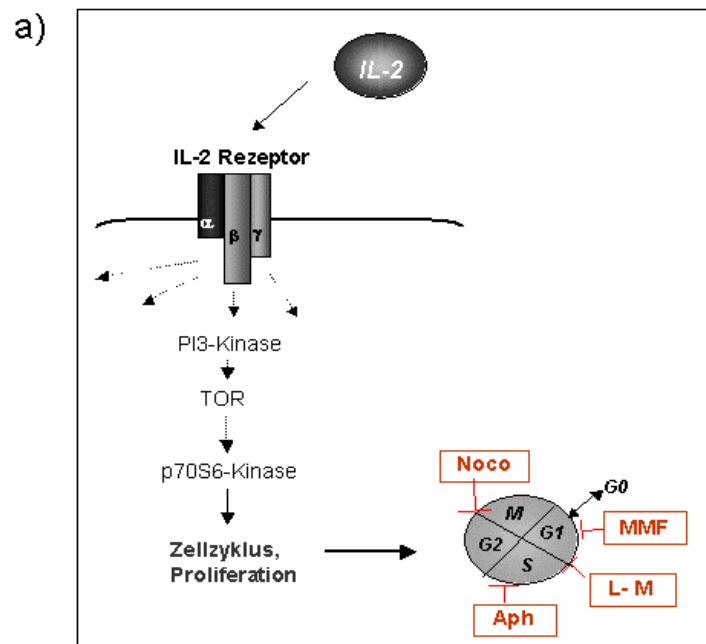


**Abb.7: p23 mRNA-Expression und Proliferation restimulierter T-Zellen.** Aus einer primären 5 Tage-MLC wurden allo-aktivierte T-Zellblasten und anti-CD4mAk-behandelte T-Zellblasten aufgereinigt und über Nacht gestarvt. Die allo-Blasten ( $5 \times 10^4$ /well) wurden mit bestrahlten DA-Thymozyten ( $2,5 \times 10^5$ /well) und bestrahlten Lewis-Thymozyten ( $1,5 \times 10^5$ /well) allo-restimuliert (◆) und anti-CD4mAk-behandelt (■). Anti-CD4mAk-behandelte T-Zellblasten ( $5 \times 10^4$ /well) wurden mit bestrahlten DA-Thymozyten ( $2,5 \times 10^5$ /well) und bestrahlten Lewis-Thymozyten ( $1,5 \times 10^5$ /well) allo-restimuliert (▲). a) TaqMan-PCR-Analyse der p23 mRNA b) Proliferationsanalyse mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau zwischen Tag 1 und 2 für 16 Stunden. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von jeweils einer aus drei untersuchten Kulturen.

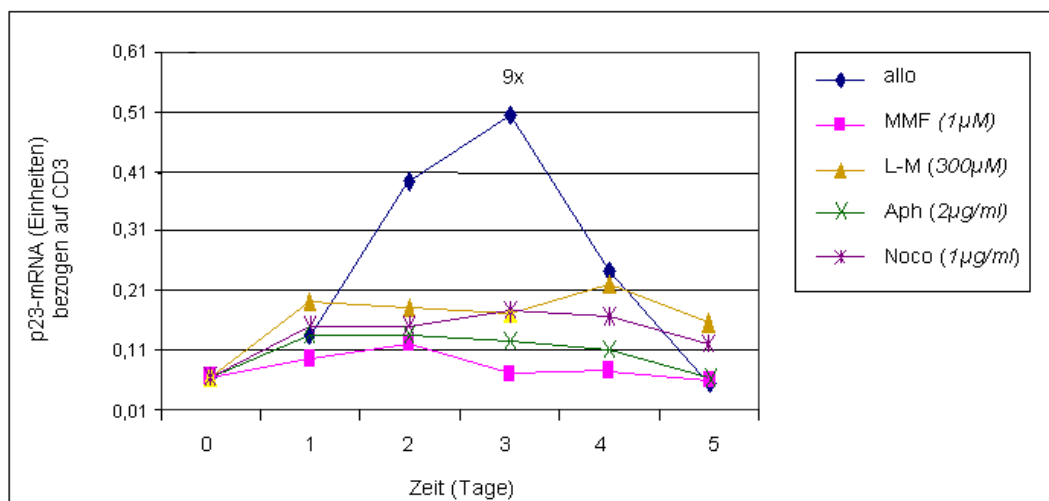
#### 4.1.3 Einfluss von Zellzyklus (ZZ)-Inhibitoren auf die Regulation der p23mRNA Expression / Transkription

Aufgrund der vermuteten Korrelation zwischen der p23mRNA-Expressionskinetik und der Proliferation allospezifischer T-Zellen sollte untersucht werden, ob p23 proliferationsabhängig transkribiert wird und welche Phase des Zellzyklus (ZZ) für die p23-Regulation eine Rolle spielen könnte. Dafür wurden folgende ZZ-Inhibitoren separat der allogenen MLC am Tag 0 zugesetzt und die p23 mRNA Expression täglich für 5 Tage mittels Real Time-PCR quantifiziert. Die eingesetzten Inhibitoren blockten den Zellzyklus in unterschiedlichen Phasen (siehe Abb.8a):

1. Mycophenolate Mofetyl (MMF) inhibiert in der G1-Phase (de novo GTP-Synthese)
2. L-Mimosine (L-M) inhibiert in der G1/S-Phase (DNA-Replikation)
3. Aphidicoline (Aph) inhibiert die S-Phase (DNA-Polymerase  $\alpha$ -Aktivität)
4. Nocodazole (Noco) inhibiert die G2/M-Phase (Microtubuli-Bildung)



b)



**Abb.8: Einfluss von Zellzyklus-Inhibitoren auf die T-Zellaktivierung.** a) schematische Abbildung der Wirkungsweise der ZZ-Inhibitoren. b) Allo-aktivierte T-Zellen wurden am Tag 0 einer 5 Tage-MLC mit ZZ-Inhibitoren behandelt und täglich geerntet. Aus der isolierten RNA wurde die Regulation der p23 mRNA Expression mittels TaqMan PCR ermittelt. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

Alle ZZ-Inhibitoren übten vergleichbar mit dem anti-CD4mAk wie erwartet einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation allo-aktivierter T-Zellen aus (Daten nicht dargestellt). Wie in Abbildung 8b erkennbar ist, hemmten diese aber auch die p23 mRNA-Hochregulation. Diese Ergebnisse deuten auf eine Proliferations-abhängige Transkription von p23 in T-Zellen hin, die aber nicht spezifisch innerhalb einer der ZZ-Phasen erfolgt. Es könnte daher sein, dass die p23 Expression mindestens eine Proliferationsrunde benötigt, da z.B. erst bei DNA-Replikation eine Demythelierung und damit aktive Transkribierung erfolgen könnte.

#### 4.1.4 p23-Regulation in verschiedenen Stimulationsmodellen

Die bisherigen Untersuchungen wurden ausschließlich an allogenen-stimulierten Ratten T-Zellen durchgeführt. Um einen generellen Eindruck über die Regulation der p23 Transkription zu erhalten, wurde dessen Expression auch unter anderen Stimulationsbedingungen analysiert. Dafür wurden folgende Ansätze ausgewählt:

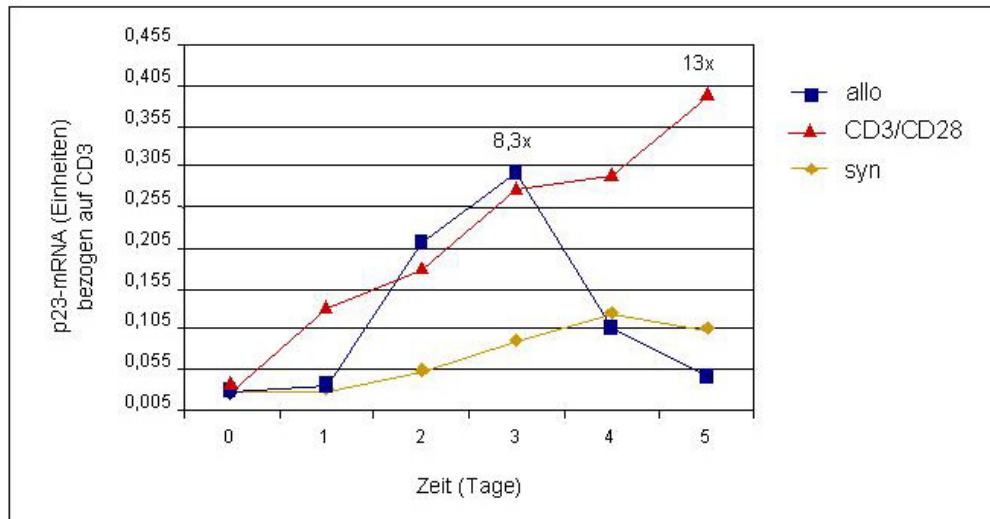
a) andere T-Zellstimulationen

- *Lewis-Lymphknotenzellen + anti-CD3mAk/anti-CD28mAk (je 10µg/ml)*
- *Lewis-Lymphknotenzellen + ConA (1µg/ml)*

b) andere Spezies

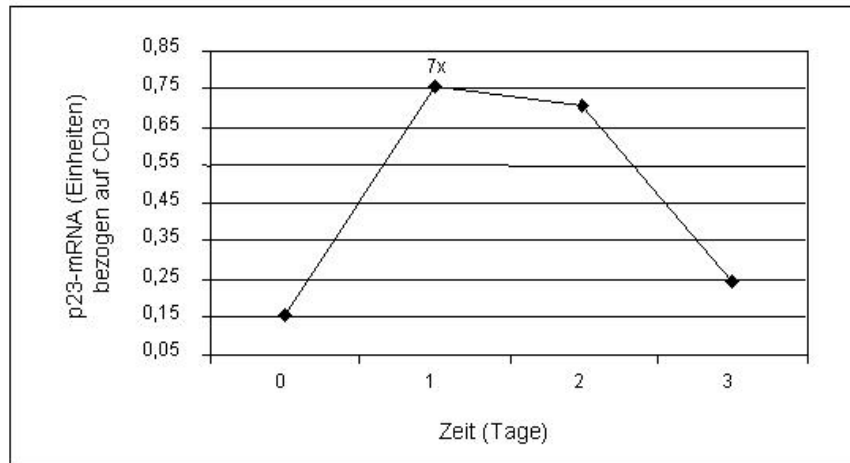
- *Humane PBMC's (peripheral blood mononuclear cells) + OKT3 (anti-CD3mAk) / anti-CD28mAk (je 1µg/ml)*

Lewis Lymphknotenzellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern für 5 Tage kultiviert. Die Antikörper wurden vorher für 1 Stunde auf der Flachbodenplatte gebunden und diese anschließend einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden wie üblich mit einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  pro well ausgesät und täglich für die p23 mRNA-Quantifizierung geerntet und aufgearbeitet. In diesem Fall liefern statt der Stimulator-Zellen (DA) die Antikörper die notwendigen T-Zell-Aktivierungssignale 1 (anti-CD3mAk) und 2 (anti-CD28mAk), wobei die Aktivierung und Proliferation antigenunabhängig von allen T-Zellen erfolgt. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, führte die Stimulation der Lewis-T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern zu einem früheren Anstieg der p23 mRNA Expression, schon nach 1 Tag, der außerdem noch länger anhielt als bei einer allogenen Stimulation der T-Zellen.



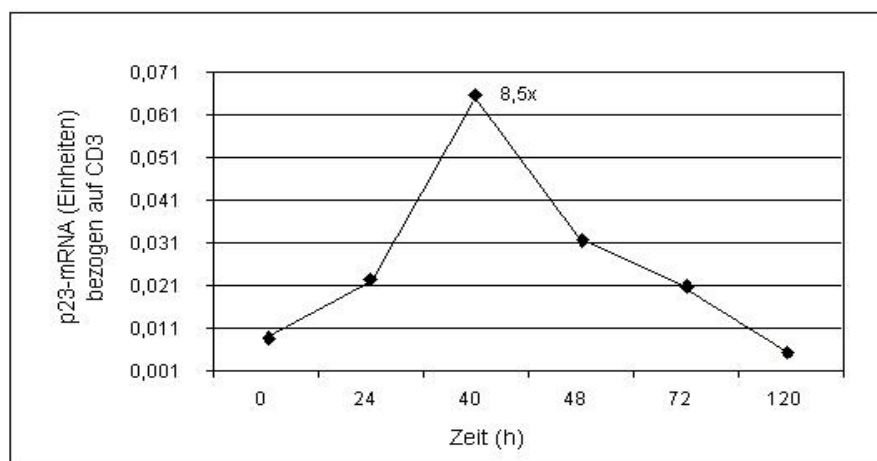
**Abb.9: TaqMan PCR-Analyse der p23 mRNA Expression in aCD3/aCD28-stimulierten Lewis-T-Zellen.** Während einer 5 Tage-MLC wurden aCD3/aCD28 (je 10µg/ml) -stimulierte (▲) T-Zellen ( $3 \times 10^5$  pro 96er well) mit einer allogenen (■) und syngenen (◆) MLC verglichen. Tag 0 entspricht der Expression in unstimulierten T-Zellen. Nach Zellernte und RNA-Isolation wurde die p23 Transkription mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

Für die ConA-Stimulation wurde die 3fache Zellkonzentration an Lewis-Lymphozyten eingesetzt, um den notwendigen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten. Die Zugabe des Mitogens erfolgte löslich am Tag 0. Auch ConA induziert eine antigenunabhängige Aktivierung aller Lymphozyten über eine Vernetzung von Oberflächenmolekülen, zu denen unter anderem das Lektin CD2 auf T-Zellen gehört, wirkt aber nach ungefähr 48 Stunden toxisch auf die Zellen. Diese starke Stimulation induzierte schon am Tag 1 eine 7fache p23 mRNA Hochregulation, die am Tag 3 wieder abfiel (siehe Abb.10).



**Abb.10: TaqMan PCR-Analyse der p23 mRNA Expression in ConA-stimulierten Lewis-T-Zellen.**  $1,5 \times 10^5$  Lewis-Lymphozyten wurden pro 96er well mit ConA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und von Tag 0 bis 3 geerntet. Die RNA wurde isoliert und die p23 Transkription mittels RT-PCR analysiert. Tag 0 entspricht der Expression in unstimulierten T-Zellen. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

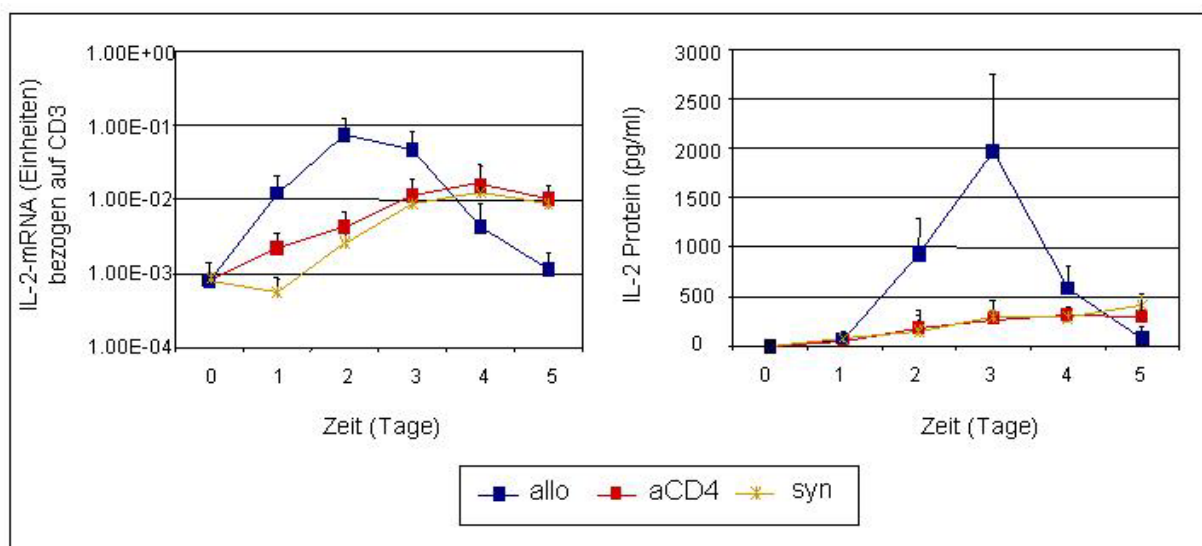
Die humanen PBMC's, die vorher über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt wurden, um die Erythrozyten und Granulozyten abzutrennen, wurden ebenso über CD3/CD28 mit den entsprechenden Antikörpern stimuliert. Die Abbildung 11 macht deutlich, dass auch die Stimulation humaner T-Zellen eine verstärkte Transkription von p23 nach ca. 40 Stunden bewirkt. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Tag 0) war ungefähr ein 8facher Unterschied nachweisbar.



**Abb.11: TaqMan PCR-Analyse der p23 mRNA Expression in humanen aCD3/aCD28-stimulierten T-Zellen.**  $2 \times 10^5$  humane Lymphozyten wurden pro 96er well mit aCD3/aCD28-Antikörpern (je  $1 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und nach 0, 24, 40, 48, 72 und 120 Stunden mittels RT-PCR analysiert. Tag 0 entspricht der Expression in unstimulierten T-Zellen. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

#### 4.1.5 Einfluß von rekombinantem IL-2 und einer IL-2 Rezeptor Blockade auf die p23 Expression

IL-2 wirkt als T-Zell-Wachstumsfaktor und wird als erstes Zytokin von aktivierten T-Zellen gebildet, das wiederum autokrin deren Proliferation stimuliert. Bekannt ist, dass rekombinantes IL-2 die Induktion einer anti-CD4-induzierten Toleranz im Nierentransplantationsmodell der Ratte verhindern kann, wenn auch mit einer extrem hohen Dosis von 200.000 U. In der anti-CD4-behandelten allogenen MLC mit nur noch 10% der T-Zell-Antwort könnte ein mögliches Fehlen der IL-2 Produktion die Ursache für die Proliferationshemmung sein. Tatsächlich ergaben mRNA- und Proteinexpressionsanalysen von IL-2 eine gehemmte Produktion von IL-2 unter anti-CD4mAk-Behandlung (siehe Abb.12).



**Abb.12: Einfluss des anti-CD4mAk's auf die IL-2 Transkription und IL-2 Sekretion allo-reaktiver T-Zellen.** Verglichen wurde eine allo-aktivierte (■) MLC mit einer anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten (■) und einer syngenem (✱) MLC. Die T-Zellen wurden täglich von Tag 0 bis 5 geerntet und nach der RNA-Isolation für die IL-2 mRNA-Analyse mittels RT-PCR verwendet. Aus dem Überstand der T-Zellkultur wurde die Menge des IL-2 Proteins mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten.

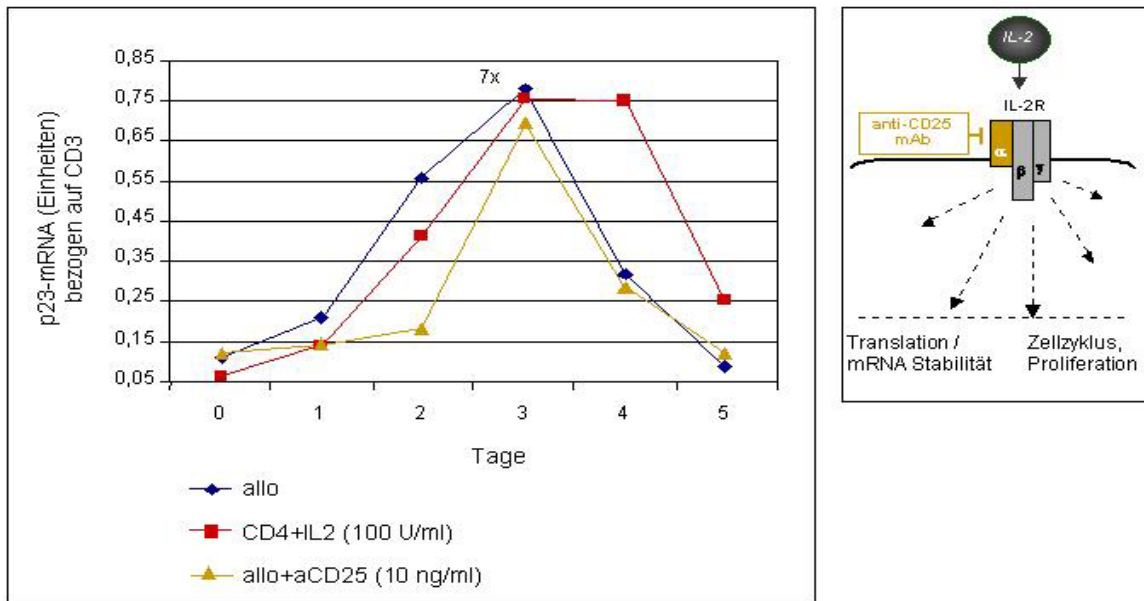
In unbehandelten allogenen Kulturen sieht man eine Hochregulation der IL-2 mRNA am Tag 2 der MLC. Um 1 Tag verzögert ist dann die Protein-Produktion detektierbar. Unter Zugabe des anti-CD4mAk's zum allogenen Kulturansatz wurde die IL-2 Synthese komplett geblockt, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, da das Level an IL-2 mRNA und

Zytokinsynthese ähnlich war dem der syngenen Kontrolle.

Deswegen sollte untersucht werden, ob sich durch Zugabe von rekombinantem IL-2 zu anti-CD4-behandelten Zellkulturen die Proliferation und damit die p23 mRNA-Expression wieder revertieren läßt. Außerdem stellte sich auch die umgekehrte Frage, ob die Blockade der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) in der allogenen MLC einen inhibitorischen Effekt auf die p23 Hochregulation ausübt. Diese Kette des IL-2 Rezeptors wird von T-Zellen erst nach deren Aktivierung exprimiert und ist für die Formierung des hochaffinen IL-2 Rezeptors essentiell. Dafür wurden folgende MLC-Kulturen angesetzt und die Zellen wieder von Tag 1-5 geerntet und deren p23 Transkription mittels Real Time RT-PCR analysiert:

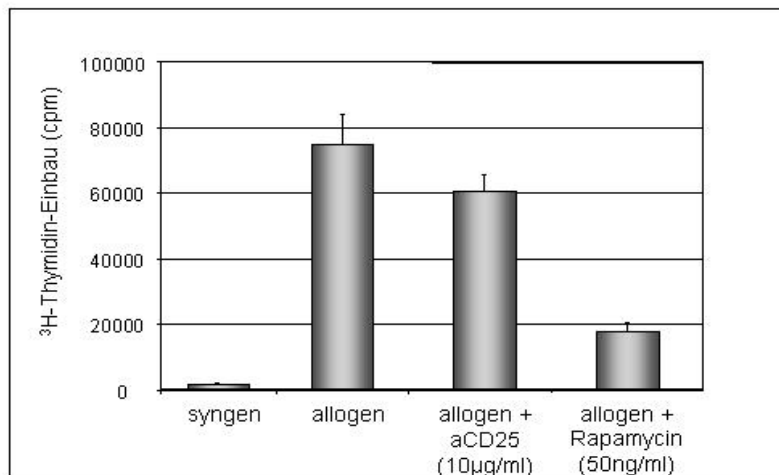
1. allogene MLC
2. allogene MLC + anti-CD4mAk (1 $\mu$ g/ml) + rek.IL-2 (100U/ml)
3. allogene MLC + anti-CD25mAk (10 $\mu$ g/ml)

In Abbildung 13 wird deutlich, dass die reduzierte p23 mRNA-Expression in anti-CD4mAk-Kulturen nach IL-2 Zusatz wieder auf das Niveau der unbehandelten allogenen Kulturen angehoben werden konnte. Wegen der Bedeutung von IL-2 für die p23-Regulation vermuteten wir, dass die spezifische Blockade der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors durch den anti-CD25-Antikörper bei allo-aktivierten T-Zellen die Hochregulation der p23 mRNA-Expression verhindern würde. Interessanterweise hatte der neutralisierende anti-CD25mAk jedoch keinen inhibitorischen Einfluss auf die Hochregulation der p23 Expression in allo-aktivierten T-Zellen.



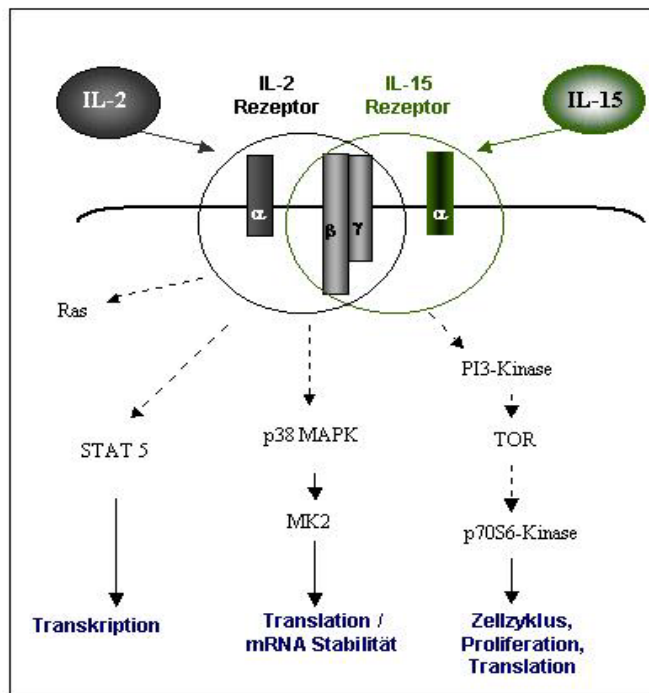
**Abb.13: Bedeutung von IL-2 für die p23 Expression allo-aktivierter T-Zellen.** Allo-aktivierte T-Zellen wurden mit einem IL-2 Rezeptor-hemmenden anti-CD25mAk (10ng/ml) (▲) versetzt und anti-CD4mAk-behandelte T-Zellen mit rekombinatem IL-2 (100U/ml) (■) inkubiert. Für den Vergleich mit allogenen stimulierten T-Zellen (◆) wurden die Zellen täglich von Tag 0 bis 5 geerntet und die RNA isoliert. Die Analyse der p23 mRNA Regulation erfolgte mittels TaqMan PCR. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

Zusätzlich wurden diese T-Zellen mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau zwischen Tag 3 und 4 auf ihr Proliferationsverhalten untersucht (Abb.14). Mit einer Zugabe von 100U/ml rekombinantes IL-2 zu anti-CD4-behandelten allogenen T-Zellen konnte deren Proliferationsvermögen wieder vollständig wiederhergestellt werden (Daten nicht dargestellt). Überraschenderweise sieht man, dass die Proliferation in anti-CD25-behandelten Kulturen nicht gehemmt ist und sich wie bei unbehandelten allogenen Kulturen verhält (Abb.14). Diese Ergebnisse zeigen, dass der anti-CD25mAk weder die p23 Expression noch die Proliferation allo-aktivierter T-Zellen hemmen kann. Innerhalb der Signaltransduktion des IL-2 Rezeptors spielt die Kinase mTOR eine essentielle Rolle für die Initiierung des Zellzyklus, was eindrucksvoll durch den Effekt des mTOR Inhibitors Rapamycin demonstriert werden kann. Deshalb sollte untersucht werden, inwieweit eine Inhibierung der Kinase durch Zugabe des Inhibitors Rapamycin die Proliferation allo-aktivierter T-Zellen beeinflusst. Aus Abb.14 geht hervor, dass eine Behandlung allo-aktivierter T-Zellen mit Rapamycin deren Proliferation zu ca. 80% inhibiert.



**Abb.14: Vergleich der Proliferation in einer syngenen, unbehandelten alloenen, anti-CD25-behandelten alloenen und Rapamycin-behandelten alloenen MLC.** Gemessen wurde die T-Zellantwort durch den <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau zwischen Tag 3 und 4 der MLC für 16 Stunden. Die geernteten Zellen wurden mittels Proliferationsassay analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert von jeweils 5 untersuchten Kulturansätzen mit Standardabweichung.

Für die unterschiedlichen Wirkungen von anti-CD25 und Rapamycin auf die Proliferation alloaktivierter T-Zellen könnten verschiedene Ursachen eine Rolle spielen. Zum Beispiel teilt das Zytokin IL-15 mit IL-2 viele gemeinsame Aktivitäten und ist ebenso ein T-Zell-Wachstumsfaktor. Damit könnte IL-15 auch die notwendigen Signale zur Proliferation liefern. Beide benutzen die gleiche  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Rezeptors, die  $\alpha$ -Kette ist jedoch für jedes Zytokin spezifisch (Abb.15). Die Wirkung von endogen produziertem IL-15 in der MLC würde daher nicht durch den anti-CD25-Antikörper blockiert werden. Die mTOR Kinase ist jedoch Zytokin-unspezifisch an den Zytokinrezeptor-Signalwegen beider Zytokine beteiligt.

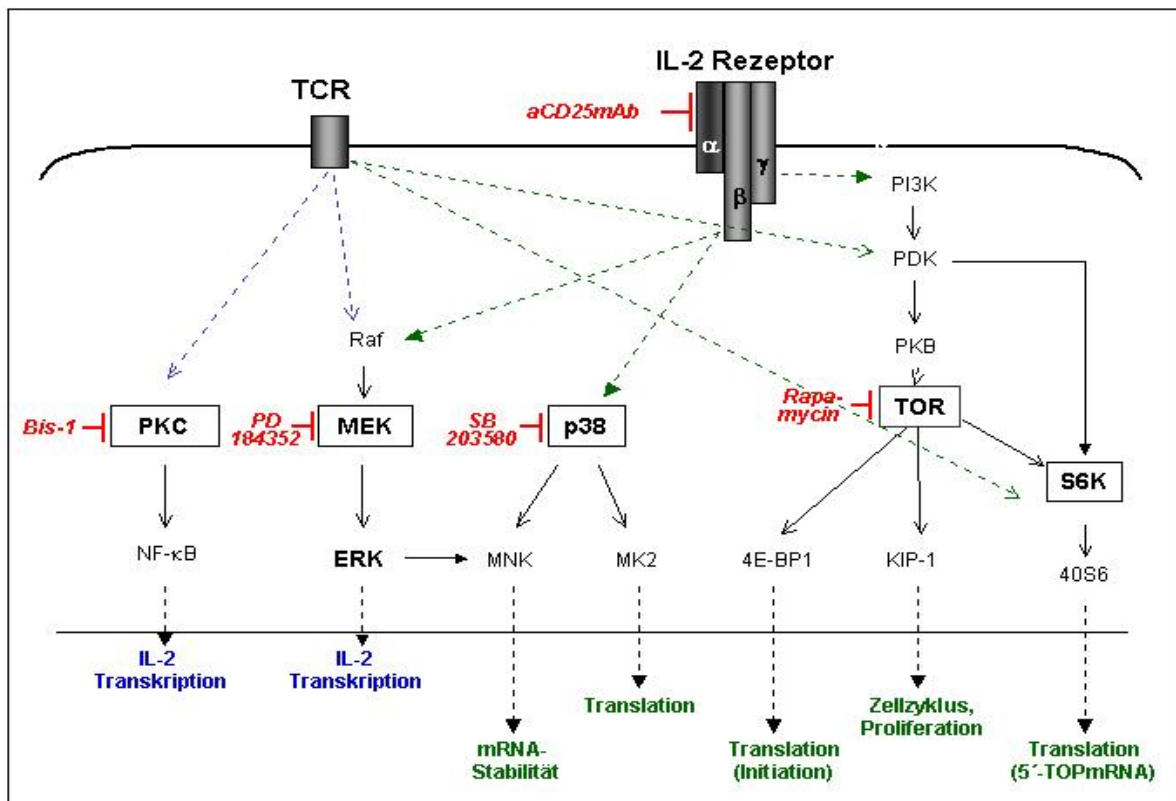


**Abb.15: Vereinfachte Darstellung der Gemeinsamkeiten des IL-2 und IL-15 Rezeptors**

Versuche mit einem blockierenden Antikörper gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-15 Rezeptors (rekombinantes Maus-IL-15R $\alpha$ /Fc-Fusionsprotein) in der allogenen MLC zeigten jedoch auch keine inhibitorischen Auswirkungen auf die Proliferation bzw. die p23 Expression (Daten nicht dargestellt). Fraglich ist hier, ob der Antikörper im Rattenmodell überhaupt wirksam ist und entsprechende Rattenantikörper stehen leider zur Zeit noch nicht zur Verfügung.

#### 4.1.6 Analyse der Signalwege zur p23 Transkriptions-Induktion

Aufgrund der stimulierenden Wirkung von IL-2 auf die T-Zell-Proliferation und dessen Bedeutung für die Hochregulation der p23 Expression, sollten die TCR-induzierten und IL-2 Rezeptor-induzierten Signaltransduktionswege und deren Bedeutung für die p23 Expression näher analysiert werden. Mittels spezifischer Inhibitoren gegen Kinasen, die hierbei eine Rolle spielen, konnten gezielt einzelne Wege der Signaltransduktion geblockt werden (siehe Abb.16).

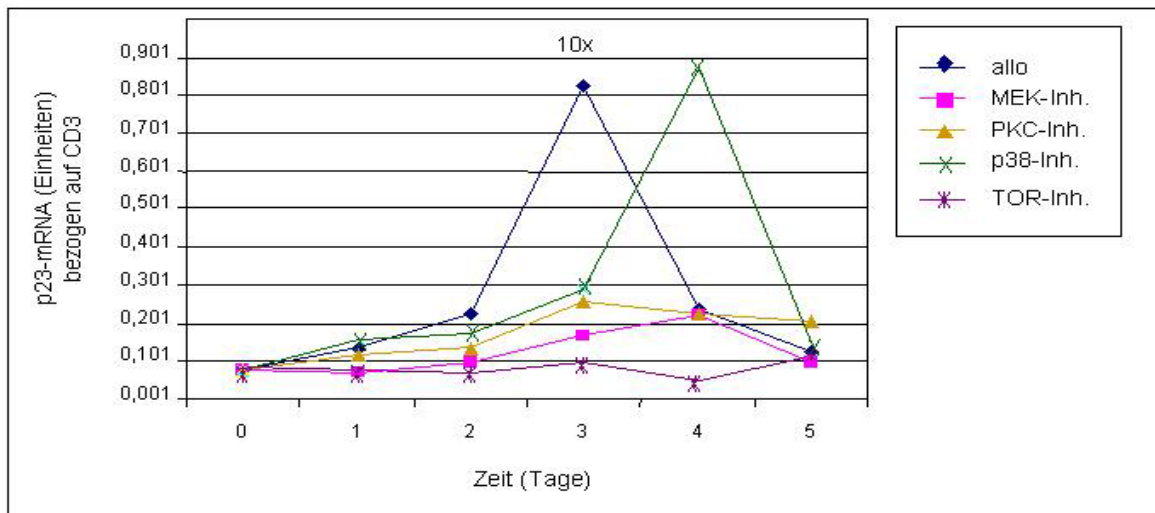


**Abb.16: Schematische Übersicht der TCR- und IL-2R-induzierten Signaltransduktionswege während der T-Zellaktivierung.** In der Darstellung sind die im folgenden Experiment verwendeten Kinase-Inhibitoren rot markiert. Diese hemmen gezielt spezifische Signalkaskaden, welche die **Transkription**, **Translation** und/oder **Proliferation** induzieren.

Dafür wurden die Inhibitoren am Tag 0 zu allogenen MLC-Ansätzen gegeben und deren p23 Expression täglich für 5 Tage auf mRNA-Ebene mittels Real Time RT-PCR analysiert (Abb.17). In der folgenden Tabelle sind die eingesetzten Hemmstoffe, die spezifische Kinasen der oben aufgeführten Signalwege blocken, zusammenfassend dargestellt:

Inhibitor	gehemmte Kinase	Signalweg angeschaltet durch:	
		TCR	IL-2
PD 184352 (10µM)	MEK	+	+
Bisindolylmaleimide-1(1µM)	PKC	+	-
SB 203580 (10µM)	p38	-	+
Rapamycin (50ng/ml)	mTOR	-	+

**Tabelle 1: spezifische Kinase-Inhibitoren, die auf TCR- und/ oder IL-2-induzierte Signalkaskaden hemmend einwirken**



**Abb.17: Einfluss verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die p23 Transkription während der allo genen MLC.** Allo-aktivierte T-Zellen wurden am Tag 0 einer 5 Tage-MLC mit den Inhibitoren der Kinasen unterschiedlicher Signalkaskaden behandelt und täglich geerntet. Aus der isolierten RNA wurde die Regulation der p23 mRNA Expression mittels TaqMan PCR ermittelt. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

Unter Zugabe der spezifischen Inhibitoren für die Kinasen MEK, PKC und mTOR zum allo genen Kulturansatz wurde nicht nur die Proliferation der aktivierten T-Zellen gehemmt, sondern auch die Hochregulation der p23 Transkription komplett verhindert (Abb.17). Da die Kinase MEK TCR- und IL-2-induziert jeweils die Transkription und Translation beeinflusst, wurde der MEK-Inhibitor zusätzlich erst am Tag 2 dazugegeben, um ausschließlich den Effekt auf die IL-2-induzierte Translation analysieren zu können. Eine spätere Zugabe des MEK Inhibitors PD184352 am Tag 2 der MLC führte jedoch weder zur Hemmung der Proliferation der T-Zellen noch zu deren Hochregulation der p23 Transkription (Daten nicht dargestellt). Eine Inkubation der T-Zellen mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 konnte die Hochregulation der p23 Expression nicht verhindern, wenngleich die T-Zellen mit einer verzögerten Kinetik reagierten.

#### 4.1.7 Vergleich der p23 Expressionsanalyse mit Kinaseaktivitäten

Die mit den Kinase-Inhibitoren erzielten Ergebnisse deuten auf einen Einfluss PKC-, mTOR- und MEK-abhängiger Signaltransduktionswege auf die p23 Transkription und Proliferation während der T-Zellaktivierung hin. Deshalb wollten wir als nächstes Korrelationen zwischen den bisherigen Daten der p23 Expression und dem Aktivierungsstatus verschiedener Kinasen während der T-Zell-Aktivierung aufdecken. Die Aktivierung von Kinasen erfolgt durch andere, in der Signaltransduktionskette höher geschaltete Kinasen und ist daher oft mit einer

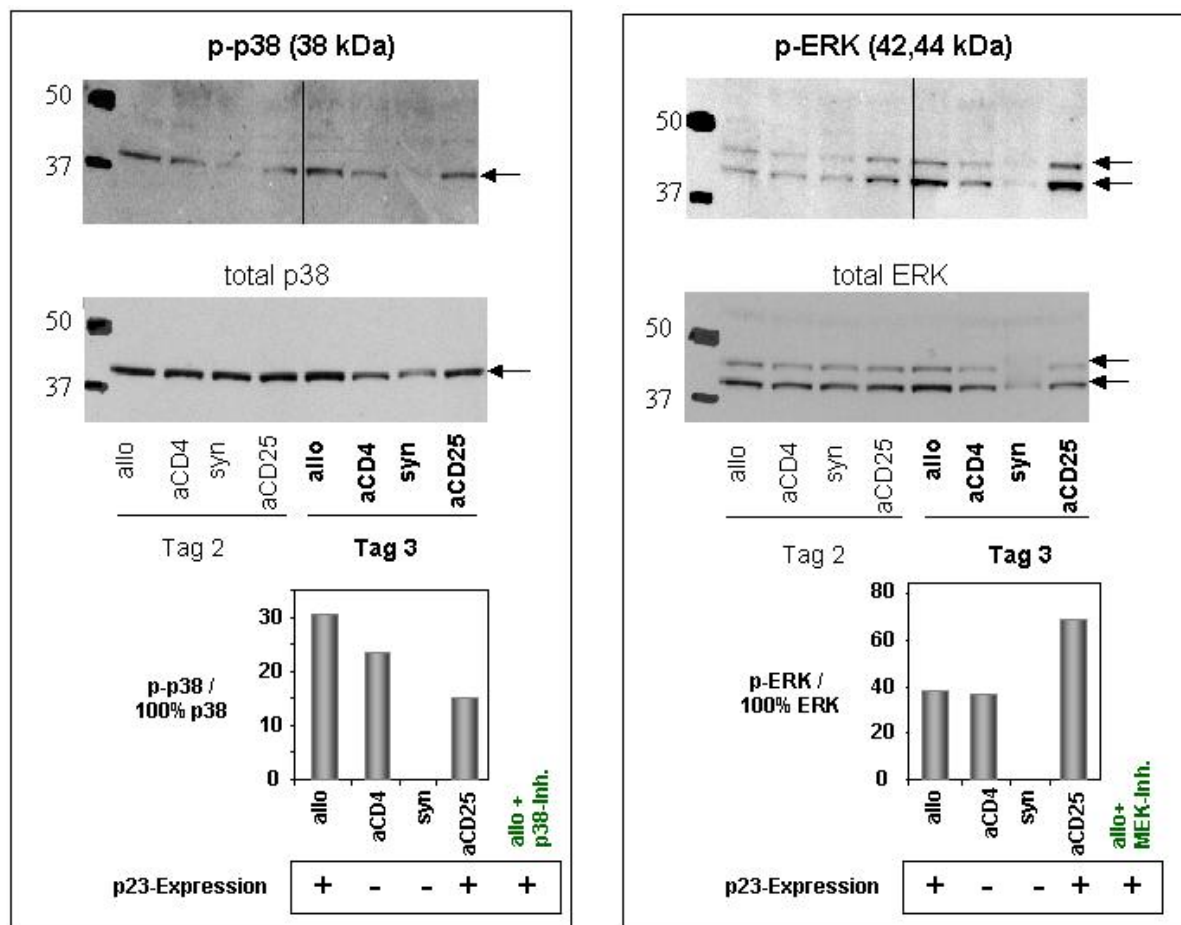
Veränderung ihres Phosphorylierungsmusters verbunden. Da p23 mRNA zwischen Tag 2 und 3 nach allo-spezifischer Aktivierung von T-Zellen am stärksten exprimiert wird, wurden die Kinaseaktivitäten verschiedener Kulturansätze am Tag 2 und 3 miteinander verglichen. Kinasen der Mitogen-aktivierten Signaltransduktionswege und des durch TOR kontrollierten Signalweges wurden hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Ihre Aktivität wurde in folgenden Kulturansätzen miteinander verglichen:

	p23-Expression:
1. allogene MLC	+++
2. allogene MLC + anti-CD4-Antikörper (RIB5/2, 1µg/ml)	-
3. syngene MLC	-
4. allogene MLC + anti-CD25-Antikörper (10µg/ml)	+++

Am Tag 2 und 3 wurden die einzelnen Zellkulturen gesammelt und die Pellets in eiskaltem Protein-Lysispuffer aufgenommen. Das Hauptproblem der MLC-Proben ist die variable Zellmenge an aktivierten T-Zellen in den verschiedenen Zellkulturansätzen. Deshalb erfolgte vorher eine Gesamtproteinbestimmung, um die Proben mengenmäßig aufeinander abzustimmen und eine gleichmäßige Beladung der Western-Blots zu gewährleisten. Außerdem dienten der zusätzlichen Kontrolle der Einsatz von Antikörpern, die gegen das unphosphorylierte, nicht aktive Protein gerichtet sind. Für eine möglichst hohe Anreicherung aktivierter T-Zellen wurden pro Probe mit ca.  $3 \times 10^6$  Lewis-Zellen nur 20 µl Lysepuffer verwendet. Mittels mehrerer Membranen konnten die verschiedensten Kinasen hinsichtlich ihres Phosphorylierungszustandes untersucht werden.

Beim Vergleich der Kulturansätze ließen sich kaum Unterschiede am Tag 2 hinsichtlich der p38 MAPK Aktivierung feststellen (Abb.18). Auffällig war nur deren verminderte Aktivierung in syngenen Kulturansätzen. Das gleiche Ergebnis wurde für die ERK1/2-Kaskade beobachtet. Am Tag 3 mit der stärksten p23 Hochregulation waren p38 und ERK1/2 etwas mehr phosphoryliert in unbehandelten allo-aktivierten T-Zellen als in anti-CD4-behandelten Zellen, wobei aber die schwachen Abweichungen von leichten Beladungsunterschieden auf den Gelen stammen könnten. Außerdem erbrachte ein Vergleich zwischen anti-CD4-behandelten und syngenen Kulturen keine korrelierenden Ergebnisse mit der p23- Hochregulation. D.h. man erwartete eigentlich in beiden Ansätzen ähnliche Kinaseaktivitäten, da die p23 mRNA Expressionsdaten auch keine Differenzen aufweisen.

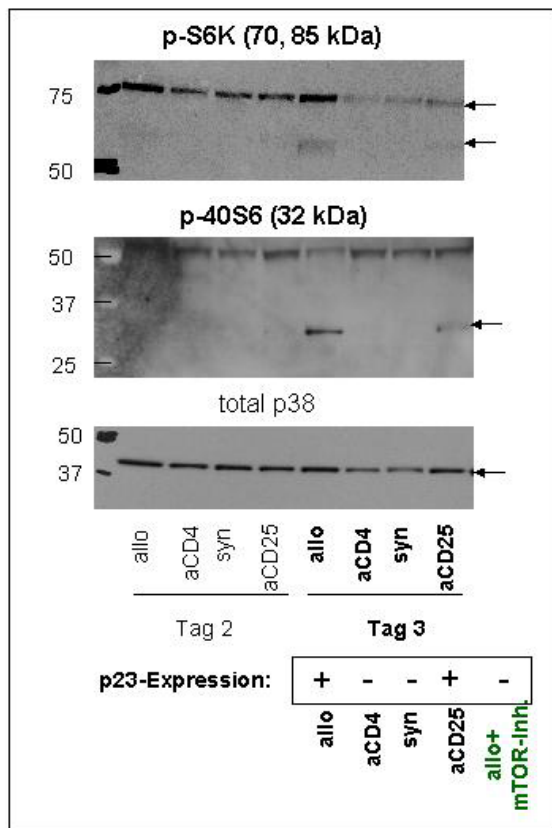
Der anti-CD25mAk Ansatz verhielt sich wie der allogene und entsprach damit den bisherigen p23 Expressionsdaten.



**Abb.18: Vergleich zwischen dem Aktivierungszustand von Kinasen der Mitogen-aktivierten Signaltransduktionswege (p38 und ERK) mit der p23 Expression.** Proben unterschiedlicher MLC-Kulturansätze (allogen, allogen + anti-CD4mAk, syngen, allogen + anti-CD25mAk) wurden jeweils am Tag 2 und 3 in Lysepuffer aufgenommen und ihre Konzentration an Gesamtprotein mittels Bradford-Methode bestimmt. Nach der SDS-PAGE (30µg Protein/Bahn) wurden die Proben geblottet und die Phosphorylierungszustände der Kinasen p38 und ERK mittels spezifischer Phospho-Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei kompletten Westernblot-Analysen.

In Übereinstimmung mit der p23 Regulation detektierten wir interessanterweise Phosphorylierungen von Kinasen, die im IL-2-induzierten Akt/TOR-Signaling involviert sind. Eine Schlüsselkinase hierbei ist die p70S6 Kinase, die die Translation von mRNA's des Translationsapparates kontrolliert und 2 Isoformen aufweist (70 und 85 kDa). Sie wiederum aktiviert über die Phosphorylierung ihr ribosomales Substrat 40S6. Aus Abbildung 19 ist zu erkennen, dass bei Zugabe von anti-CD4mAk's zum allogenen Kulturansatz die Phosphorylierung der Kinase p70S6 und des ribosomalen Proteins 40S6 verhindert wurde.

Die anti-CD25-Behandlung allogener Zellen dagegen ergab ähnliche Proteinaktivierungsmuster wie die unbehandelten allo-aktivierten Zellen.



**Abb.19: Vergleich zwischen dem Aktivierungszustand von Kinasen und Substraten des mTOR-kontrollierten Signalweges (S6K und 40S6) mit der p23 Expression.** Proben unterschiedlicher MLC-Kulturansätze (allogen, allogen + anti-CD4mAk, syngen, allogen + anti-CD25mAk) wurden jeweils am Tag 2 und 3 in Lysepuffer aufgenommen und ihre Konzentration an Gesamtprotein mittels Bradford-Methode bestimmt. Nach der SDS-PAGE (30µg Protein/Bahn) wurden die Proben geblottet und die Phosphorylierungszustände der Kinase p70S6 (S6K) und des Substrates 40S6 mittels spezifischer Phospho-Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei kompletten Westernblot-Analysen.

In der Tabelle 2 wurden die p23 Expressions- und Proliferationsdaten mit den Kinaseaktivierungen zusammenfassend dargestellt. Wie man sieht, besteht nur zwischen der p23 Aktivierung und dem Akt/TOR-Signalweg eine genaue Übereinstimmung, was zu der Annahme führt, dass dieser mTOR Kinase-Weg verantwortlich für die Hochregulierung der Expression des Kochaperons p23 sein könnte. Dies steht in Übereinstimmung mit den p23 Expressionsdaten von Kinaseinhibitor-behandelten MLC Ansätzen. Eine Behandlung allo-stimulierter T-Zellen mit dem mTOR Kinase-Inhibitor Rapamycin verhinderte den p23 Expressionsanstieg.

Expressionsdaten:			Kinaseaktivitäten:			
	p23	Prolif.		p38	ERK	p70S6K
allo	+	+	allo	++	++	++
allo+aCD4	-	-	allo+aCD4	++	++	-
syn	-	-	syn	-	-	-
allo+aCD25	+	+	allo+aCD25	++	++	+

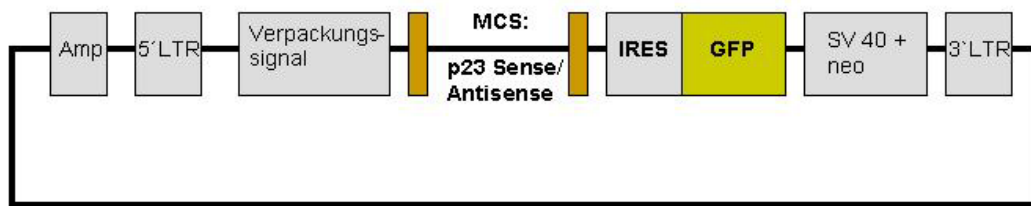
**Tabelle 2: Vergleich der p23 Expressions- und Proliferationsdaten mit den Kinaseaktivierungsdaten.** Die grau markierten Spalten zeigen eine Übereinstimmung zwischen der p23-Expression, der Proliferation und dem Akt/TOR-Signalweg (p70S6K).

#### 4.1.8 Assoziative Funktionsanalyse des Kochaperons p23: Generierung und Analyse p23 Antisense-transgener Zellen

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von p23 proliferationsabhängig ist und über den mTOR-abhängigen Signalweg hochreguliert wird. Aber damit konnten keine reversen Schlussfolgerungen gezogen werden. Da Hsp90/p23-Komplexe eine große Rolle in der Stabilisierung von Kinasen spielt, stellte sich die Frage, ob die Proliferation allogentaktivierter T-Zellen auch abhängig von der p23-Expression ist oder für welche anderen Funktionen die Hochregulation von p23 notwendig ist. Dafür war der Einsatz transgener Zellen, die antisense- bzw. sense-p23 mRNA exprimieren, in der Gemischten Lymphozytenkultur geplant.

##### 4.1.8.1 Klonierung von pLXSN-IRES-GFP-p23 (Sense + Antisense)

Für die Konstruktion eines p23-pLXSN Expressionsplasmides wurde das p23-Fragment (ca. 1800bp) vorher in den p123T-Vektor zwischenkloniert. Anschließend erfolgte die Klonierung des p23 ORF in die multiple cloning site des retroviralen pLXSN Plasmides (siehe Abb.20). Mit enzymatischen Restriktionsanalysen ließ sich die Orientierung des p23 Fragmentes testen. Zusätzlich wurde die Orientierung und die Sequenzidentität des p23 ORF's über Sequenzierungsanalysen der DNA geprüft.



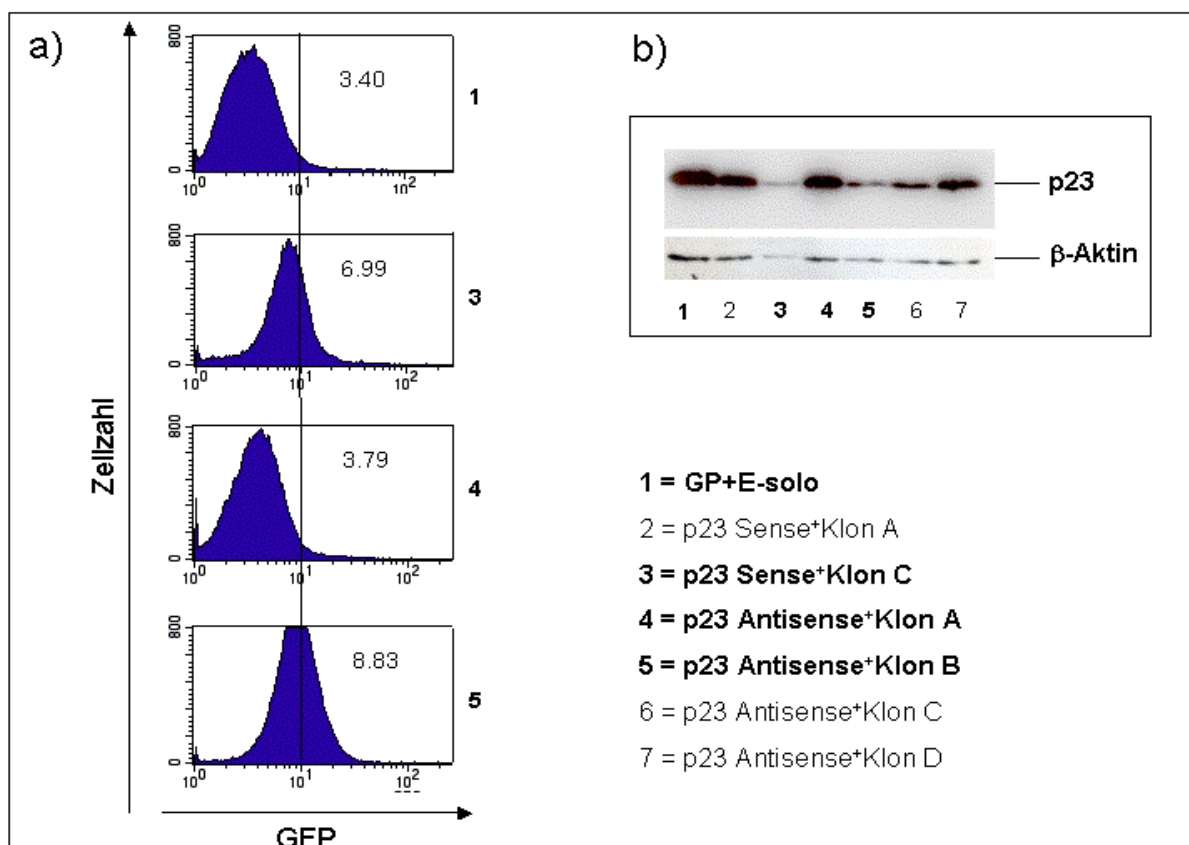
**Abb.20: Retroviraler Expressionsvektor p23-pLXSN.** Amp: Ampicillin-Resistenzen; LTR: „long terminal repeat“, Integrationsstelle des retroviralen Plasmides in die Zielzelle mit intrinsischer Promoteraktivität; MCS: „multiple cloning site“; IRES: „internal ribosome entry site“; GFP: „green fluorescent protein“; SV40: Polyadenylierungssignal, Promoter des neo-Gens; neo: Neomycin-Resistenzen

#### 4.1.8.2 Transfektion und Generierung stabiler GP+E p23 Klone

Eine effektive retrovirale Transduktion kann nur in sich teilenden Zielzellen stattfinden (155). Dafür stehen zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen kann simultan eine MLC für die alloantigen-spezifische T-Zellaktivierung und eine Transduktion mittels stabiler Klone der Verpackungszelllinie durchgeführt werden. Zum anderen kann ohne Ko-Kultivierung der Virusüberstand polyklonaler Verpackungszellen direkt zu den proliferierenden T-Zellen gegeben werden. Die Arbeit mit stabilen Klonen erfordert mehr Aufwand als die üblichere transiente Transfektion und Transduktion mittels viralen Überstandes. Die AG Dr. Ritter in unserem Institut konnte jedoch zeigen, dass sich Ratten-T-Zellen mit retroviralem Überstand nur schlecht transduzieren ließen. Aufgrund dieser Erfahrungen, bevorzugten wir zuerst die aufwendigere Methode der Generierung von stabilen Virus-produzierenden Klonen, die sich für die Ratten-T-Zelltransduktion bewährt hatten.

Die pLXSN-IRES-GFP-p23 Plasmide (Sense und Antisense) wurden mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation in die Verpackungszelllinie GP+E transfiziert. Da das Plasmid auch ein Neomycin-Resistenzgen ( $neo^r$ ) trug, erlaubte es eine positive Selektion transfizierter Zellen. Unter Selektionsdruck mit dem synthetischen Neomycin-Äquivalent G-418 konnte nach 48 Stunden eine Plasmid-tragende und Virus-produzierende polyklonale Verpackungszelllinie hochgezogen und expandiert werden. Da das Fluoreszenz-Protein GFP als Marker positiver Zellen dient, konnte die Transfektion mit Fluoreszenz-Mikroskopie kontrolliert werden. Für die Generierung eines stabilen p23<sup>+</sup> Klones (Sense und Antisense) wurde die Methode der „limited dilution“ unter ständiger Anwendung von G-418 angewandt. Die entstandenen monoklonalen p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>- Verpackungszelllinien wurden mit einer FACS-Analyse (GFP) und auf Proteinebene (p23) überprüft. Als Kontrolle dienten GP+E Zellen ohne transfiziertes Plasmid, die somit kein GFP und p23 nur unverändert exprimierten und deshalb weder ein

Fluoreszenz-Signal auslösen noch die p23 Expression beeinflussen konnten. Verglichen mit der Kontrolle detektierten wir nur eine Verdopplung der Intensitätsverstärkung des mittleren Fluoreszenz-Signals [FL1=GFP] bei den p23 Sense<sup>+</sup> Klonen (z.B. Klon C) und maximal eine Verdreifachung bei den p23 Antisense<sup>+</sup> Klonen (z.B. Klon B) im Gegensatz zu dem negativen p23 Antisense<sup>+</sup> Klon A (Abb.21a). Durch die IRES-Kopplung ist die Expression des Fluoreszenzproteins (GFP) proportional zur Expression der antisense-bzw. sense-p23 mRNA. Ein Teil der Zellen wurde in Protein-Lysispuffer aufgenommen und für eine anschließende Kontrolle der p23 Proteinexpression mittels Western-Blot eingesetzt (Abb.21b).



**Abb.21: Analyse der p23 Expression in monoklonalen p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Verpackungszelllinien (GP+E).** Für a) wurden nichttransfizierte GP+E-Zellen (1) und p23 Sense<sup>+</sup> bzw. Antisense<sup>+</sup> Klone (3-5) geerntet und in FACS-Puffer aufgenommen (1x10<sup>6</sup>Zellen/200μl). Die FACS-Analyse stellt die Intensität des mittleren Fluoreszenz-Signals (GFP) im Histogramm der einzelnen stabilen Klone dar. b) Zellen nichttransfizierter GP+E-Zellen (1) und p23 Sense<sup>+</sup> bzw. Antisense<sup>+</sup> Klone (2-7) wurden geerntet, in Lysepuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet. Dargestellt ist die p23 Proteinmenge bezogen auf das Kontrollprotein β-Aktin.

Es wird deutlich, dass p23 schon in der Kontrolle, den nicht-transfizierten GP+E Zellen, sehr stark exprimiert wird. Trotzdem müsste die Antisense-p23 mRNA eine Verminderung der p23 Proteinexpression in den Zellen erzielen. Entsprechend der FACS-Daten konnte auch auf dem Westernblot detektiert werden, dass der p23 Antisense<sup>+</sup> Klon B im Gegensatz zur Kontrolle

und zum p23 Antisense<sup>+</sup> Klon A, der nur schwach exprimiert (siehe GFP Expression), zwar keine vollständige Inhibierung, aber eine deutliche Reduzierung in der p23 Expression aufweist. Die p23 Sense<sup>+</sup> Klone dagegen zeigten im Vergleich zu den untransfizierten GP+E Zellen kaum sichtbare Unterschiede in der p23-Expression.

Für eine erfolgreiche retrovirale Transduktion jedoch war eine Verpackungszelllinie notwendig, die kontinuierlich viel Virus produziert, der durch seine Integration ins Wirtsgenom eine starke p23 Antisense- bzw. Sense-mRNA Expression bewirkt. Deshalb wurde hinsichtlich unserer Ergebnisse vorerst auf eine Virustiterbestimmung und die Transduktion von T-Lymphozyten verzichtet. Dennoch wurden die stabilen p23 Sense<sup>+</sup> bzw. Antisense<sup>+</sup> Klone in Flüssigstickstoff weggefroren, um diese im Rahmen anschließender Projekte noch funktionell in der MLC zu untersuchen.

#### *4.1.8.3 Transiente Transfektion und Transduktion mittels Virusüberstandes*

Diese Methode ist eigentlich die Standardmethode, da ein höherer Probendurchsatz ermöglicht wird. Aufgrund unserer geringen Expression in den selektionierten stabilen Klonen, wiederholten wir den Versuch der Transfektion und Transduktion in Zusammenarbeit mit dem DRFZ Berlin (AG Radbruch). Das dort verwendete System arbeitete mit der Verpackungszelllinie Phoenix für die transiente Transduktion von Maus-Milzlymphozyten. Wegen der starken Homologie zwischen Maus- und Rattensequenz gab es keine Bedenken, unsere p23-Rattensequenz im Mausmodell (Balb/c) anzuwenden.

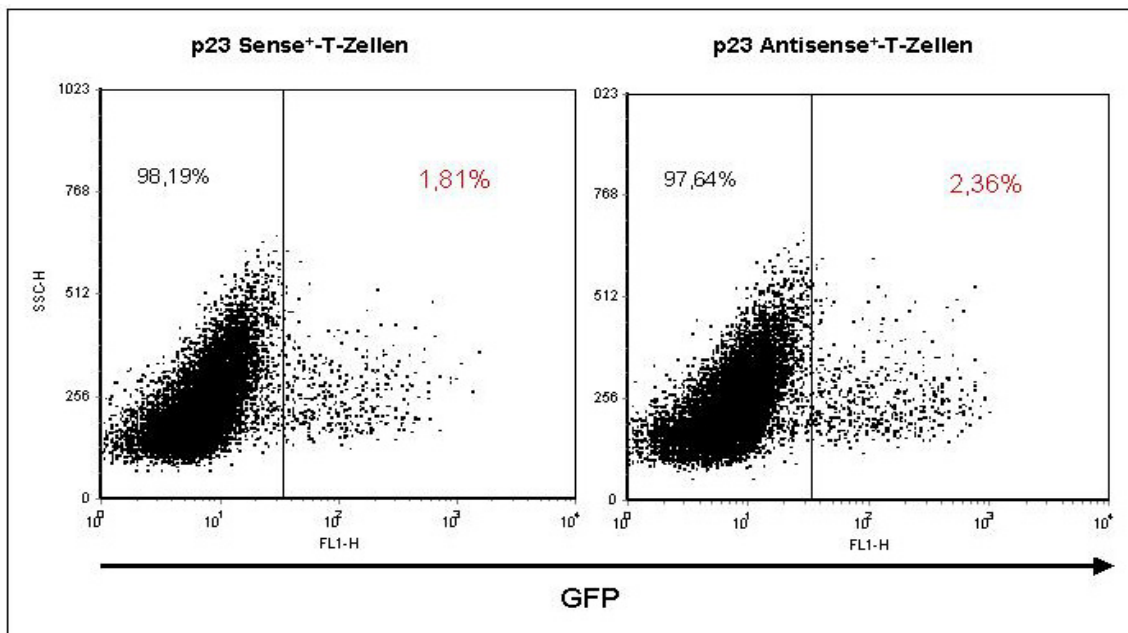
Da die AG Radbruch erfolgreich mit der Methode der Virusüberstandgabe arbeitete, verwendeten wir diese auch für unseren Wiederholungsversuch.

Die Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix mit den pLXSN-IRES-GFP-p23 Plasmiden (Sense und Antisense) erfolgte zum einen mittels Kalzium-Phosphat Präzipitation und zum anderen mittels Lipofektamin. Nach 2 Tagen konnte der Virusüberstand weggefroren werden. Eine FACS-Analyse der Fluoreszenz-Intensität von GFP der p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Transfektanten ergab als Transfektionskontrolle folgende Werte (Tabelle 3):

Transfektions-Methode	p23-Tranfektant	GFP (in % Zellen)
1. Ca <sup>2+</sup> -Phosphat	a) Sense	<b>54,4</b>
	b) Antisense	<b>54,2</b>
2. Lipofektamin	a) Sense	33,6
	b) Antisense	42,7

**Tabelle 3: Transfektionskontrolle polyklonaler p23+/GFP+-Verpackungszelllinien (Phoenix).** 2 Tage nach Transfektion der Phoenix mit p23 Sense bzw. p23 Antisense Plasmiden erfolgte eine FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenzintensität

Die Überstände der polyklonalen Phoenix-Zellen mit der höchsten Transfektionsrate 1.a) und 1.b) wurden für die anschließende retrovirale Transduktion von Milz-T-Zellen der Maus verwendet. Dafür wurden die Milz-Lymphozyten vorher isoliert und nach der Erythrozytenbeseitigung für 24 Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert, um eine vollständige, aber antigen-unabhängige T-Zellaktivierung zu erreichen. Für die Transduktion wurde der Virusüberstand auf die Mauszellen gegeben und für 48 Stunden kultiviert. Nach den ersten 24 Stunden erfolgte eine FACS-Analyse der GFP-positiven Zellen im ersten Fluoreszenzkanal des Durchflußzytometers. Ein Teil der Suspensionszellen wurde entnommen und mit Propidiumjodid gefärbt, um bei der Messung tote Zellen auszuschließen (Autofluoreszenz). Propidiumjodid ist ein Farbstoff, der sich in tote Zellen einlagert und somit eine Differenzierung zwischen den toten und den Plasmid-tragenden lebenden Lymphozyten erlaubt. In Abbildung 22 ist die Effizienz der T-Zell Transduktion nach 24 Stunden dargestellt:



**Abb.22: Effizienz der T-Zelltransduktion.** Nach anti-CD3/anti-CD28 Antikörperstimulation (je 3 µg/ml) von Mauslymphozyten ( $3 \times 10^6$  Zellen/well) erfolgte die Transduktion mit Virusüberstand polyklonaler p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Phoenix-Zelllinien für insgesamt 48 Stunden. Rot dargestellt sind die prozentualen Transduktionsraten nach 24 Stunden von jeweils p23 Sense<sup>+</sup>- und Antisense<sup>+</sup>-T-Zellen.

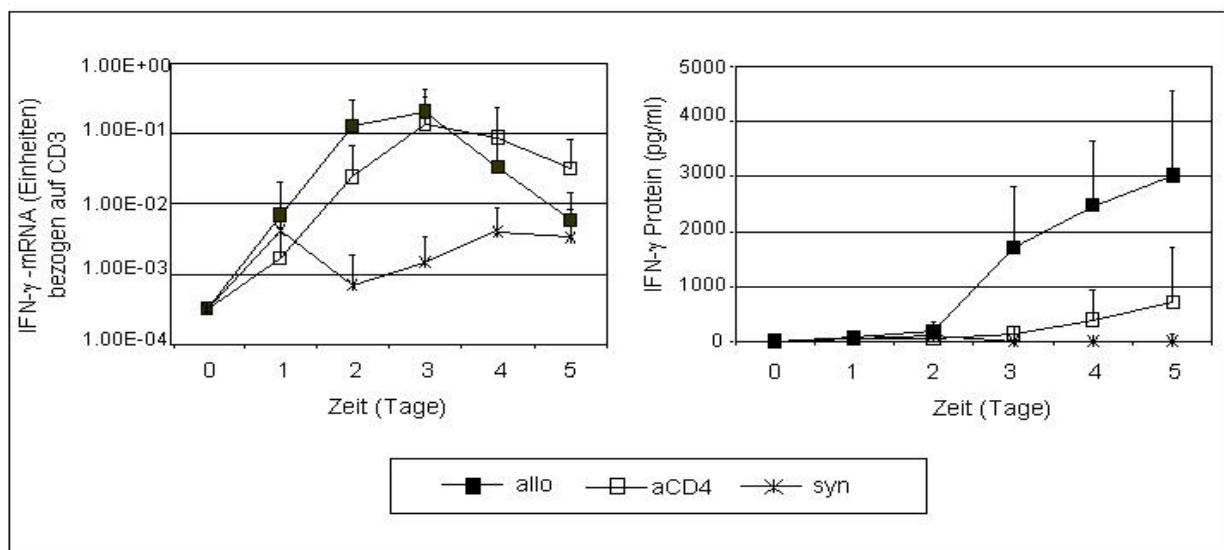
Der Durchschnittswert der Transduktionseffizienz in der AG Radbruch liegt bei ca. 10% bis maximal 20%. Trotz der relativ schlechten Transduktionsrate von 1,81% - 2,36%, entschieden wir uns dafür, die p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Zellen mittels eines FACS-Sorts zu isolieren und zu restimulieren. Es sollte untersucht werden, ob die T-Zellen, in denen p23 inhibiert (p23 Antisense-mRNA) bzw. überexprimiert (p23 Sense-mRNA) wurde, nach allogener Aktivierung ein verändertes Proliferationsverhalten aufweisen. Das Sorten der p23<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>-Zellen ergab leider nur eine geringe Zellmenge von  $8 \times 10^4$  der p23 Sense<sup>+</sup>-T-Zellen und  $1 \times 10^5$  der p23 Antisense<sup>+</sup>-T-Zellen, was jedoch bei der geringen Transduktionsrate nicht anders zu erwarten war.

Die gesorteten Zellen wurden gewaschen und für 24 Stunden ruhen gelassen, damit die erneute Stimulation nicht vorzeitig die Apoptose der Zellen induziert. Erst danach wurden die Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28- Antikörpern restimuliert. Die selektionierten Lymphozyten ließen sich nicht restimulieren, auch nicht nach Zugabe von 1U Maus-IL2. Ein Wiederholungsversuch ergab ein ähnliches Ergebnis. Die T-Zellen reagierten nicht mehr auf den Stimulus, weil sie schon apoptotisch waren und nicht weil der p23 Einfluss diesen Effekt hervorrief.

## 4.2 AUSWIRKUNG DER ANTI-CD4-BEHANDLUNG AUF DIE EFFEKTOR-ZYTOKINEXPRESSION WÄHREND DER GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUR

### 4.2.1 Transkriptionelle und translationelle Regulation von IFN $\gamma$

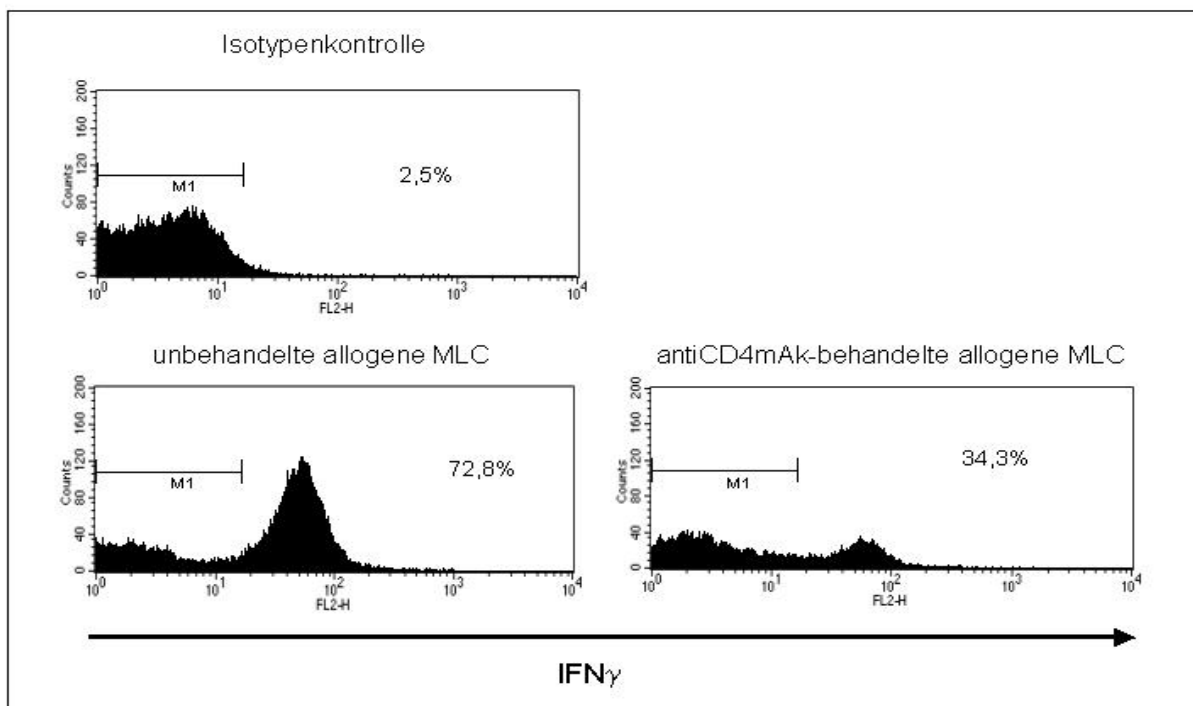
Bei einer Aktivierung von naiven T-Zellen treten diese in den Zellzyklus, um sich vermehren (klonale Expansion) und zu Effektorzellen differenzieren zu können. Dabei setzt eine neue RNA- und Proteinsynthese ein. Das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), von aktivierten T-Zellen selbst gebildet, steuert die Proliferation und Differenzierung. Außerdem verstärkt es die Produktion anderer Zytokine, wie z. B. Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). IL-2 und IFN $\gamma$ , als wichtige Marker allogener Abstoßungsprozesse nach Transplantation, spielen eine entscheidende Rolle während der T-Zellaktivierung. Neben den analysierten IL-2 Daten sollte deshalb noch die Expression von IFN $\gamma$  in der MLC sowohl auf mRNA-Ebene (TaqMan) als auch auf Proteinebene (ELISA) täglich für 5 Tage analysiert (Abb.23) werden.



**Abb.23: Einfluss des anti-CD4mAk's auf die IFN $\gamma$  Transkription und Sekretion allo-aktivierter T-Zellen.** Unbehandelte allo-aktivierte (■), anti-CD4mAk-behandelte allo-aktivierte (□) und syngene T-Zellen (✱) wurden von Tag 0 bis 5 einer MLC geerntet. Die RNA wurde isoliert und die IFN $\gamma$  mRNA Expression mittels TaqMan PCR bestimmt (links). Der Kulturüberstand wurde für die Analyse der IFN $\gamma$  Proteinsekretion mittels ELISA verwendet (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse fünf unabhängiger Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung.

In unbehandelten allogenen Kulturen sieht man eine Hochregulation der IFN $\gamma$  mRNA Expression am Tag 2 der MLC, gefolgt von der Protein-Translation am Tag 3. Im Gegensatz zu der vollständig geblockten IL-2 Synthese unter Zugabe des anti-CD4mAk's zum allogenen

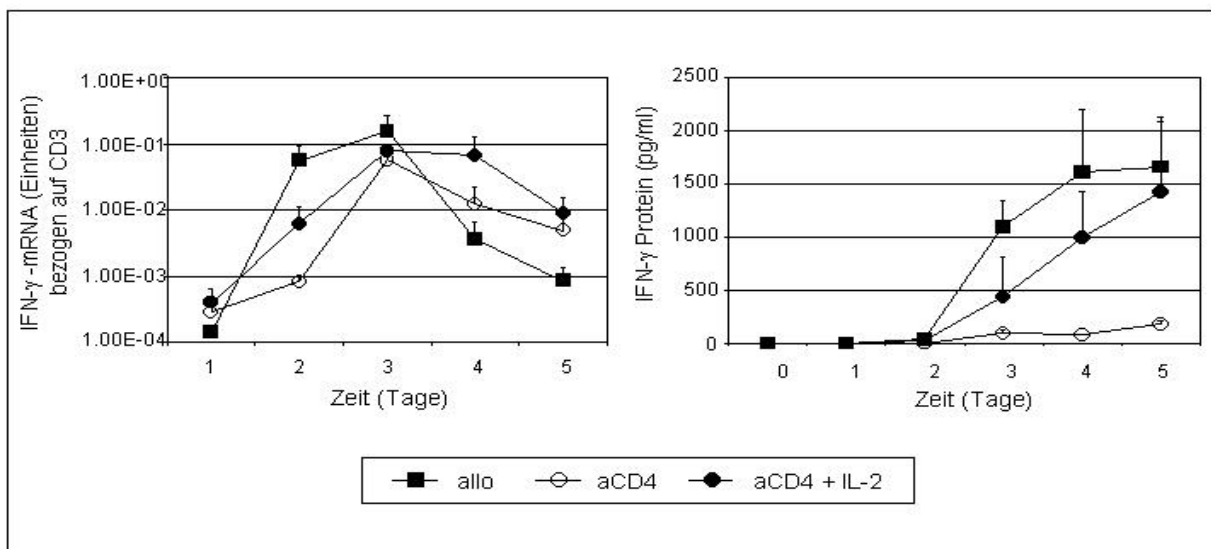
Kulturansatz (siehe Pkt. 7.1.5. und Abb.12) konnte keine Inhibierung der  $\text{IFN}\gamma$ -Transkription festgestellt werden. Anti-CD4-behandelte T-Zellen zeigten zwar eine verzögerte Kinetik der  $\text{IFN}\gamma$  mRNA-Expression, erreichten aber ebenso die Maximalwerte wie die unbehandelten allogenen Kulturen. Trotz ähnlicher  $\text{IFN}\gamma$  mRNA-Expression war nur eine geringe  $\text{IFN}\gamma$  Proteinmenge detektierbar. Entweder ist die  $\text{IFN}\gamma$  Translation inhibiert oder die Sekretion des Proteins verhindert. Deshalb wurde in anti-CD4mAk-behandelten allo-reaktiven T-Zellen untersucht, ob die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion durch eine verhinderte Proteinsekretion verursacht wurde. Dafür wurde die intrazelluläre  $\text{IFN}\gamma$  Färbung am Tag 4 der MLC durchgeführt. In Abb.24 ist dargestellt, dass ungefähr 70% der  $\text{CD4}^+$ -Zellen in unbehandelten allogenen Kulturen  $\text{IFN}\gamma$  exprimieren, während nur 30% der anti-CD4mAk-behandelten Zellen  $\text{IFN}\gamma$ -positiv sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse von  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen erhalten. Infolgedessen kann man sagen, dass die reduzierte  $\text{IFN}\gamma$  Produktion nur teilweise auf einen Sekretionsblock zurückzuführen ist, sondern mehr auf einen Translationsblock beruht. Hierbei können aber mögliche posttranskriptionelle Kontrollprozesse (splicing, mRNA Export) nicht ausgeschlossen werden.



**Abb.24: Intrazelluläre  $\text{IFN}\gamma$  Expression in unbehandelten allo-aktivierten und anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen.** Die Zellen einer 5 Tage-MLC wurden am Tag 4 geerntet und für die FACS-Analyse vorbereitet. Die integrierten Zahlen repräsentieren den prozentualen Anteil der  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen. Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

#### 4.2.2 Einfluss von rekombinantem IL-2 und neutralisierenden anti-CD25 Antikörpern auf die IFN $\gamma$ Expression

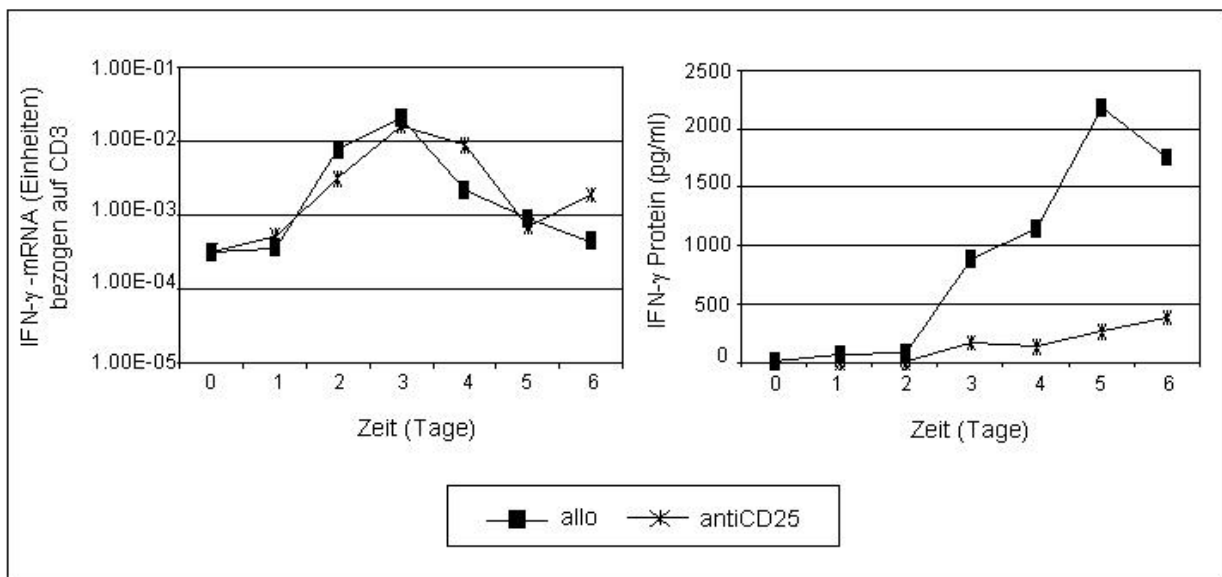
Da IL-2 eine verstärkende Wirkung auf die Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen ausübt und in seiner Expression in anti-CD4-behandelten MLC-Kulturen verhindert ist, wurde versucht, die fehlende IFN $\gamma$  Produktion durch den Zusatz von rekombinantem IL-2 wiederherzustellen. Es wurde eine Konzentration von 1U/ml verwendet, die sich nicht stimulierend auf die Proliferation auswirkte (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe erfolgte erst am Tag 2 der MLC, da ab diesem Zeitpunkt die IFN $\gamma$  Transkription schon nachweisbar war. Wie in Abbildung 25 erkennbar ist, übte rekombinantes IL-2 in anti-CD4-behandelten Kulturen keinen zusätzlichen Stimulus auf die IFN $\gamma$  mRNA Expression aus, bewirkte aber die Wiederherstellung der IFN $\gamma$  Zytokinproduktion.



**Abb.25: Einfluss von rekombinantem IL-2 (1U/ml) auf die gehemmte IFN $\gamma$  Proteinproduktion in anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen.** Unbehandelte allo-aktivierte T-Zellen (■) wurden mit anti-CD4mAk versetzt (○) und anti-CD4mAk-behandelte T-Zellen zeitgleich mit rekombinanten IL-2 (1U/ml) inkubiert (●). Die Ernte der Zellen erfolgte von Tag 0 bis 5 der MLC. Die isolierte RNA wurde für die Analyse der IFN $\gamma$  mRNA Expression mittels TaqMan PCR verwendet (links) und aus dem Kulturüberstand wurde die Menge der IFN $\gamma$  Proteinsekretion mittels ELISA bestimmt (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse fünf unabhängiger Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung.

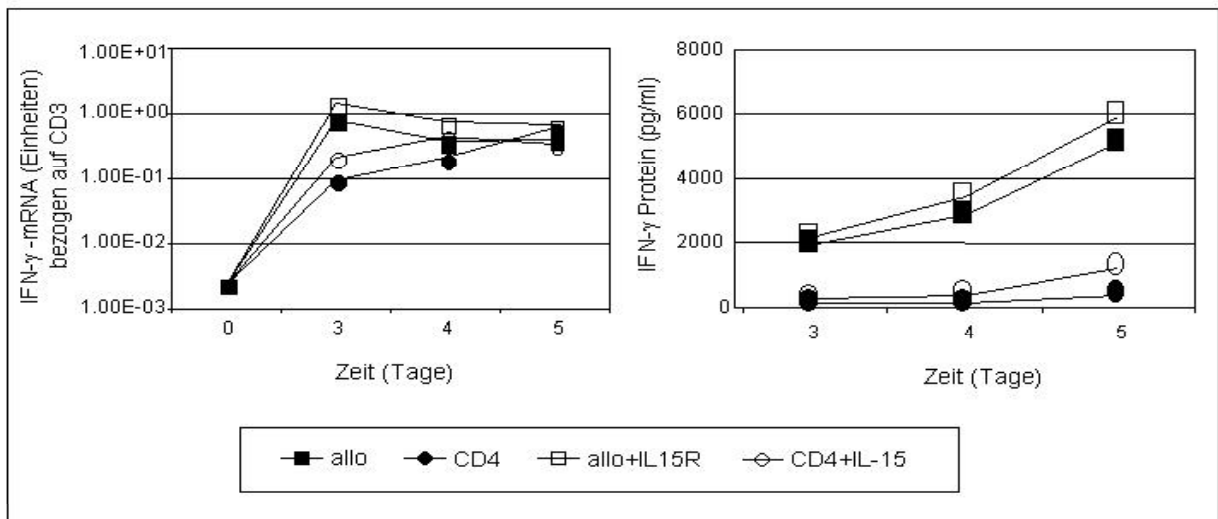
Mit der Verwendung des neutralisierenden anti-CD25 Antikörper's wurde die Bedeutung von IL-2 für die Translationskontrolle von IFN $\gamma$  noch deutlicher. Wie in Abbildung 14 dargestellt, verhinderte der anti-CD25mAk zwar nicht die Proliferation allo-aktivierter T-Zellen, aber

inhibierte ähnlich wie der anti-CD4mAk die IFN $\gamma$  Translation, ohne dabei die Transkription zu beeinflussen (Abb.26).



**Abb.26: IFN $\gamma$  Expression anti-CD25mAk-behandelter allo-aktivierter T-Zellen (10 $\mu$ g/ml).** Verglichen wurden unbehandelte allo-aktivierte T-Zellen (■) mit anti-CD25mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen (\*) in einer MLC. Die Ernte der Zellen erfolgte täglich von Tag 0 bis 6. Die isolierte RNA wurde für die Analyse der IFN $\gamma$  mRNA Expression mittels TaqMan PCR verwendet (links) und aus dem Kulturüberstand wurde die Menge der IFN $\gamma$  Proteinsekretion mittels ELISA bestimmt (rechts). Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

IL-15 als T-Zell Wachstumsfaktor weist etliche Gemeinsamkeiten mit IL-2 auf, wie z.B. die Nutzung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette des Rezeptors. Deshalb untersuchten wir, ob auch IL-15 für die IFN $\gamma$  Translationskontrolle in allo-aktivierten T-Zellen bedeutend ist. Überraschenderweise hatte die Zugabe eines rekombinanten IL-15 Rezeptor-Antagonisten (mrIL-15Ra/Fc Chimäre) zu sonst unbehandelten allogenen Kulturen keine inhibitorische Wirkung auf die IFN $\gamma$  Proteinproduktion. Auch die Zugabe von exogenem murinen IL-15 (mrIL-15) zu anti-CD4mAk-behandelten Kulturen vermochte nicht, wie IL-2, die IFN $\gamma$  Proteinhermung aufzuheben (Abb.27).



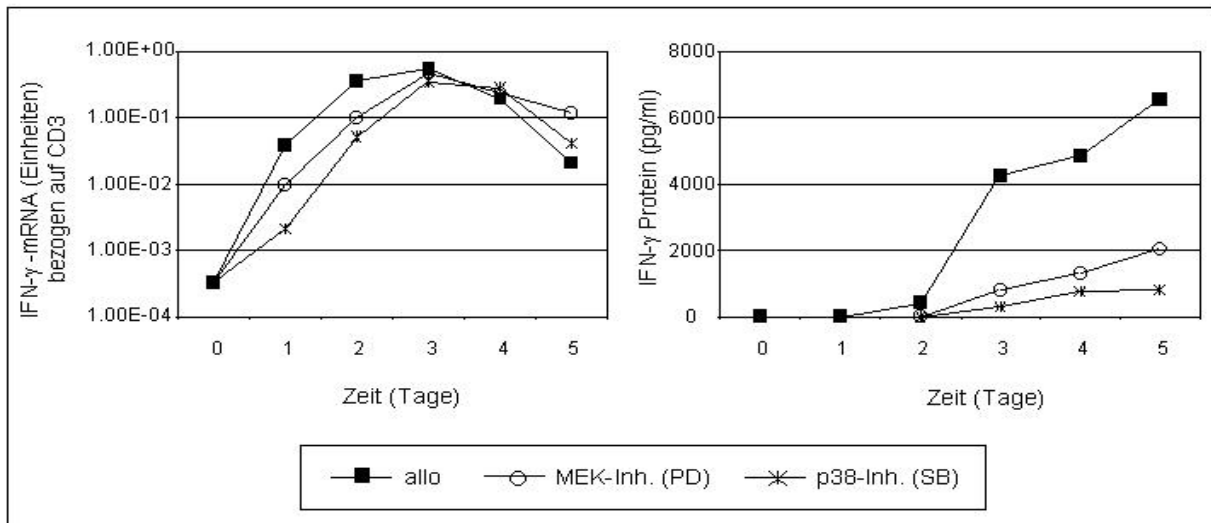
**Abb.27: Bedeutung von IL-15 für die IFN $\gamma$  Expression.** Während einer 5 Tage-MLC wurden allo-aktivierte (■) und anti-CD4mAk-behandelte allo-aktivierte T-Zellen (●) verglichen. Dabei wurde zusätzlich die Auswirkung der IL-15 Rezeptorinhibierung (1 $\mu$ g/ml mrlL-15R) allogener T-Zellen (□) und die IL-15 Gabe (1U/ml) zu anti-CD4mAk-behandelten T-Zellen (○) untersucht. Tag 0 entspricht der Expression in unstimulierten T-Zellen. Nach Zellernte und RNA-Isolation wurde die IFN $\gamma$  Transkription mittels TaqMan PCR analysiert (links) und aus dem Kulturüberstand wurde die Menge der IFN $\gamma$  Proteinsekretion mittels ELISA bestimmt (rechts). Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

### 4.2.3 Analyse des Signalweges der IFN $\gamma$ Translationskontrolle

#### 4.2.3.1 Analyse der IFN $\gamma$ Translationskontrolle mittels Kinase-Inhibitoren

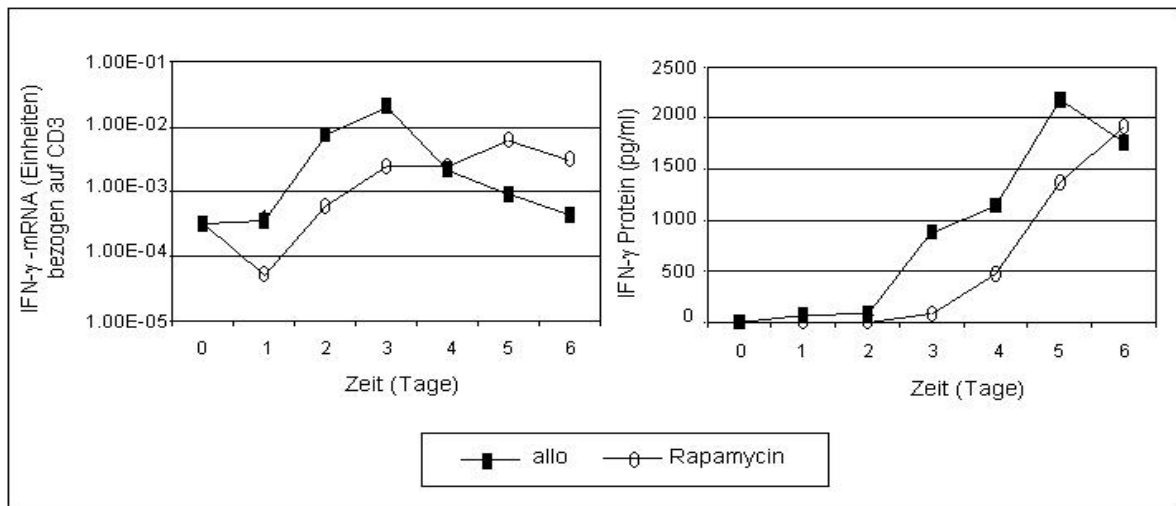
Wie schon erwähnt, induziert IL-2 mehrere Signalwege, die unter anderem die Transkription (z.B. IFN $\gamma$ ) und Translation verschiedener Proteine regulieren und den Zellzyklus und die Proliferation beeinflussen. Auch die MAP Kinase p38 und ERK1/2 spielen eine wichtige Rolle in der mRNA Translations-Regulation. Deshalb sollte ihr Einfluss auf die Translationskontrolle von IFN $\gamma$  in allo-aktivierten T-Zellen untersucht werden. Dafür wurden einer MLC am Tag 2 der spezifische MEK Kinase-Inhibitor PD184352 und p38 Kinase-Inhibitor SB203580 separat dazugegeben, um deren Aktivität zu blocken. Damit wurde gezielt nur in die Regulation der Translation eingegriffen, da bis Tag 2 die IFN $\gamma$  Transkription schon nachweisbar war. In Abbildung 28 wird sichtbar, dass die Inhibierung der p38 und ERK1/2 Kinase am Tag 2 der MLC keine Auswirkung mehr auf die IFN $\gamma$  Transkription hatte, aber ähnlich wie der anti-CD4mAk die IFN $\gamma$  Translation verhinderte. Die Zugabe der Inhibitoren am Tag 0 der MLC verhinderte auch die IFN $\gamma$  Transkription, was darauf hindeutet, dass die p38 und ERK1/2 Kinase sowohl in der frühen (Transkription), als auch in

der späten Phase (Translation) der  $\text{IFN}\gamma$  Expression aktiviert werden. Wie schon in Abb.18 dargestellt wurde, zeigten anti-CD4mAk-behandelte T-Zellen keine Verringerung der p38 und ERK Kinaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten allo-reaktiven T-Zellen. Auch wenn die Inhibierung der beiden MAPKs p38 und ERK die  $\text{IFN}\gamma$  Proteinexpression verhinderte, beruht der  $\text{IFN}\gamma$  Translationsblock in anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen wahrscheinlich doch nicht auf deren reduzierter Kinaseaktivität.



**Abb.28: Auswirkungen spezifischer Inhibitoren der p38- und MEK-Kinase (jeweils  $10\mu\text{M}$ ) auf die  $\text{IFN}\gamma$  Expression allo-aktivierter T-Zellen.** Allo-aktivierte T-Zellen (■) wurden entweder mit dem MEK-Inhibitor PD184352 (○) oder dem p38-Inhibitor SB203580 (✕) versetzt. Nach der Zellernte erfolgte die Analyse der  $\text{IFN}\gamma$  Transkription mittels TaqMan-PCR aus der isolierten RNA (links) und die  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion wurde mittels ELISA aus dem Kulturüberstand bestimmt (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse von einem der drei repräsentativen Experimente.

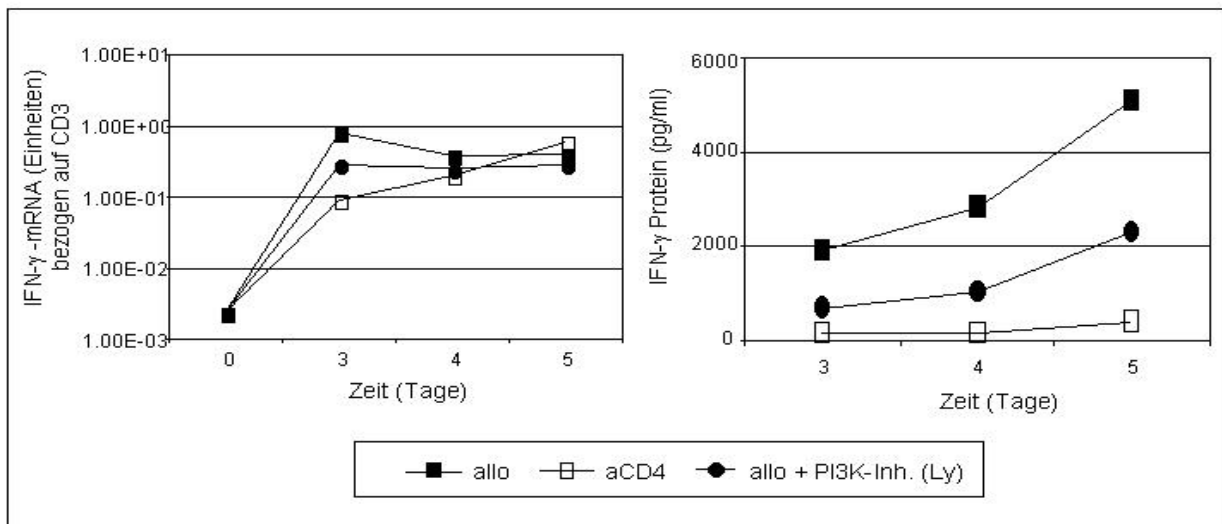
Ein anderer IL-2-induzierter Signaltransduktionsweg während der T-Zellaktivierung wird von der mTOR Kinase (Target of Rapamycin) kontrolliert. Diese reguliert mehrere Prozesse, so auch die Proliferation und die Translationinitiation über die Deaktivierung des Translationsrepressors 4E-BP. Ob die mTOR-abhängige Deaktivierung von 4E-BP für die Aufhebung der  $\text{IFN}\gamma$  Translationshemmung durch IL-2 verantwortlich ist, sollte durch den Einsatz des mTOR-spezifischen Inhibitors Rapamycin getestet werden. Wir benutzten wieder eine Konzentration von  $50\text{ ng/ml}$ , die eine vergleichbare Hemmung der T-Zellaktivierung (Proliferation) wie der anti-CD4mAk erreichte. Trotz des antiproliferativen Effekts, verhinderte Rapamycin weder die Transkription noch die Translation von  $\text{IFN}\gamma$  (Abb.29). Auch wenn eine leicht verzögerte Kinetik zu beobachten ist, erreichten die  $\text{IFN}\gamma$  Werte auf mRNA- und Proteinebene die Maximalwerte der unbehandelten allogenen Kultur.



**Abb.29: Einfluss von Rapamycin (50ng/ml) auf die IFN $\gamma$  Regulation allo-aktivierter T-Zellen.** In einer MLC wurden allo-aktivierte T-Zellen ( $\square$ ) mit dem mTOR-spezifischen Inhibitor Rapamycin (o) inkubiert. Die Zellen wurden täglich von Tag 0 bis 6 geerntet und die RNA isoliert. Die Analyse der IFN $\gamma$  Transkription erfolgte mittels TaqMan PCR (links) und die Menge der IFN $\gamma$  Proteinsekretion wurde mittels ELISA aus dem Kulturüberstand bestimmt (rechts). Dargestellt ist eins von drei repräsentativen Ergebnissen.

Es scheint, dass IL-2 zwar die IFN $\gamma$  Translationshemmung kontrolliert, diese Hemmung aber über einen mTOR-unabhängigen Signalweg vermittelt wird.

Zwischen dem IL-2 Rezeptor und mTOR ist die PI3 Kinase zwischengeschaltet, die für die IL-2-induzierte Genexpression eine entscheidende Rolle spielt. Inwiefern PI3K in der IFN $\gamma$  Translationhemmung involviert ist, wollten wir mit der Blockierung der Kinase untersuchen. Der PI3K Inhibitor Ly294002 wurde am Tag 2 zu allo-aktivierten T-Zellen gegeben. Abbildung 30 zeigt, dass die Inhibierung der PI3 Kinase während der allogenen T-Zell-Aktivierung die Translation von IFN $\gamma$  blocken konnte, die Transkription aber unbeeinflusst ließ.



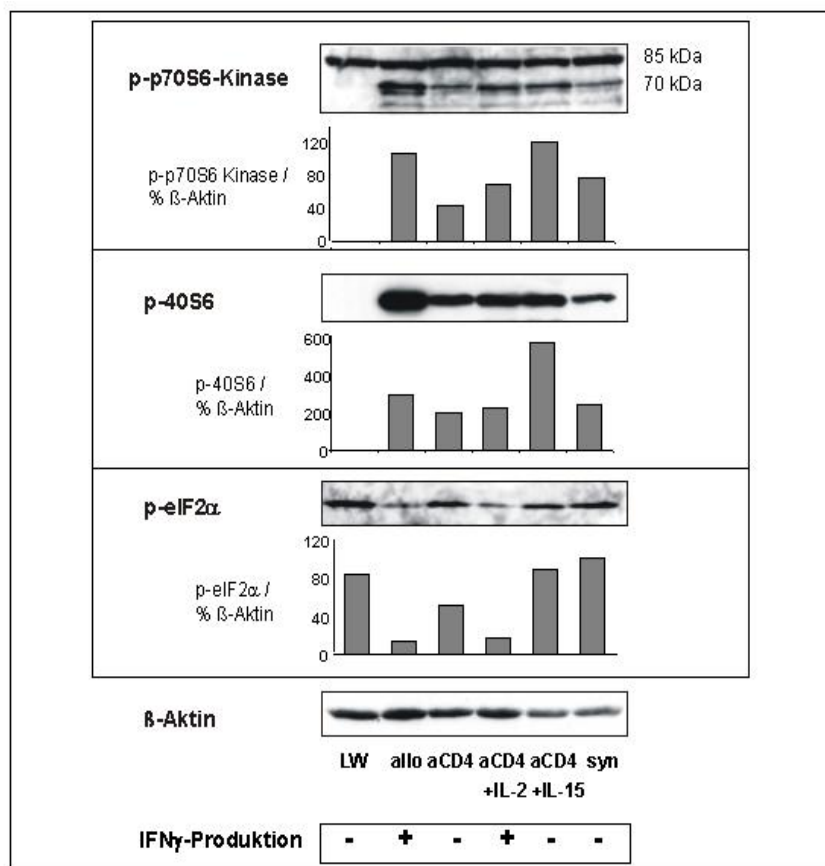
**Abb.30: Effekte des PI3 Kinase-Inhibitors Ly294002 (10 $\mu$ M) auf die IFN $\gamma$  Translation während der Alloaktivierung von T-Zellen.** Unbehandelte allo-aktivierte (■), anti-CD4mAk-behandelte allo-aktivierte (□) und Ly-behandelte allo-aktivierte T-Zellen (●) wurden von Tag 3 bis 5 der MLC geerntet. Tag 0 entspricht der Expression in unstimulierten T-Zellen. Aus der isolierten RNA wurde die IFN $\gamma$  Transkription mittels TaqMan PCR bestimmt (links) und aus dem Kulturüberstand die IFN $\gamma$  Proteinsekretion mittels ELISA (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse von einem der drei repräsentativen Experimente.

#### 4.2.3.2 Analyse der IFN $\gamma$ Translationskontrolle mittels Aktivitätsnachweis

##### *involvierter Kinasen*

Aktivitätsnachweise verschiedener Kinasen, die die Proteinsynthese kontrollieren, sollten weitere Beweise der Bedeutung des IL-2-induzierten Signalweges für die IFN $\gamma$  Translation in allo-aktivierten T-Zellen liefern. Die oben genannte PI3 Kinase reguliert die Akt (PKB) Kinase, die wiederum über mTOR für die Aktivierung der p70S6 Kinase verantwortlich ist. Die Bedeutung der Akt-abhängigen Aktivierung der p70S6 Kinase mit ihrer Kontrollfunktion der Translation ribosomaler Protein-mRNA's (z.B. Elongationsfaktoren) sollte mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Ihre Aufgabe besteht neben der Regulation der Proteinsynthese über die Phosphorylierung ihres Zielproteins 40S6, in der Translation von 5'-TOPmRNA's und in der Kontrolle des Zellwachstums (156) über die Regulation von E2F Transkriptionsfaktoren in T-Zellen (157, 158), die für den kontrollierten Durchlauf des Zellzyklus mitverantwortlich sind. Die Translationseffizienz während der T-Zellstimulation wird hauptsächlich durch die Stärke der Translationsinitiation bestimmt. Der Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$  als Schlüsselprotein der Translationsinitiation vermittelt die Bindung der Initiator-tRNA an die Ribosomen und wird durch Dephosphorylierung aktiviert.

Die Aktivität der p70S6 Kinase und des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  wurde in unbehandelten und anti-CD4mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen am Tag 3 einer MLC analysiert. Auch der Phosphorylierungszustand nach Zugabe von rekombinantem IL-2 oder IL-15 zu anti-CD4mAk-behandelten Kulturen wurde untersucht. Mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließenden Western-Blots konnten die Phosphorylierungen von p70S6, 40S6 und eIF2 $\alpha$  mit Phospho-spezifischen Antikörpern detektiert werden (Abb.31). Auch hier wurde die Kontroll-Inkubation mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin durchgeführt, um zu zeigen, dass eine gleichmäßige Beladung mit den Zellysaten vorliegt.



**Abb.31: Vergleich zwischen dem Aktivierungszustand IL-2-induzierter mTOR-kontrollierte Kinasen und Substrate mit der IFN $\gamma$  Expression.** Proben unterschiedlicher MLC-Kulturansätze (allogen, allogen + anti-CD4mAk, allogen + anti-CD4mAk + IL-2, allogen + anti-CD4mAk + IL-15, syngen) wurden jeweils am Tag 3 in Lysepuffer aufgenommen und ihre Konzentration an Gesamtprotein mittels Bradford-Methode bestimmt. Nach der SDS-PAGE (30 $\mu$ g Protein/Bahn) wurden die Proben geblottet und die Phosphorylierungszustände der Kinase p70S6 (S6K), des Substrates 40S6 und des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  mittels spezifischer Phospho-Antikörper analysiert. Die Bandenintensität wurde am Imager vermessen und prozentual im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin demonstriert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei kompletten Westernblot-Analysen. LW=unbehandelte allo-aktivierte T-Zellen.

In Abbildung 31 ist dargestellt, dass die Behandlung allo-gen-aktivierter T-Zellen mit dem anti-CD4mAk zu einer reduzierten Phosphorylierung der p70S6 Kinase, vor allem der 70 kDA Isoform, und deren Substrat 40S6 führt, wie auch schon in Abb.19 gezeigt wurde. Unter Gabe von IL-2 und IL-15 konnte die p70S6-Phosphorylierung wieder revertiert werden. Da IL-15 aber für die IFN $\gamma$  Translation während der allo-genen T-Zellaktivierung keine Rolle spielte (Abb.27) scheint die verringerte Aktivierung der p70S6 Kinase in anti-CD4mAk-behandelten Kulturen nicht verantwortlich für den IFN $\gamma$  Translationsblock zu sein. Auch die Daten der Rapamycin-Hemmung sprechen dagegen, da Rapamycin als Inhibitor von mTOR, worüber die p70S6 Kinase aktiviert wird, keinen Einfluss auf die IFN $\gamma$  Translation (Abb.29) hatte. Ausserdem zeigte die p70S6 Kinase unter dem anti-CD25mAk, der auch zum IFN $\gamma$  Translationsblock führte (Abb.26), ein ähnliches Proteinaktivierungsmuster wie unbehandelte allo-aktivierte Zellen (Abb.19).

Dagegen kann man in allo-genen Kulturen eine verringerte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  beobachten, was für einen aktiven Zustand des Initiationsfaktors spricht. Die Zugabe des anti-CD4 Antikörpers zu allo-aktivierten T-Zellen verhinderte jedoch diese Dephosphorylierung. Die Zugabe von rekombinantem IL-2 zu anti-CD4-behandelten allo-genen Kulturen führte zu einer Dephosphorylierung und damit Aktivierung des Translationsinitiations-Faktors, rekombinantes IL-15 hatte jedoch keinen Einfluss auf dessen Phosphorylierung.

## 5 DISKUSSION

Der nicht-depletierende anti-CD4mAk (RIB5/2) induziert im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte eine permanente Transplantattoleranz. In dieser Arbeit wurde zum einen die Wirkung der anti-CD4mAk-Behandlung auf die Proliferation und Expression Zellzyklus-assoziiertes Proteins alloreaktiver T-Zellen untersucht und zum anderen die Regulierung des Effektorzytokins IFN $\gamma$  analysiert.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Expression des Kochaperons p23 in verschiedenen T-Zellaktivierungsmodellen proliferationsabhängig hochreguliert wird und ebenso wie die Proliferation unter anti-CD4mAk reduziert wird. Für diese p23 Expressionsregulation in allogenen-aktivierten T-Zellen wurde die verantwortliche Signalkaskade ermittelt. Auch die Synthese von zwei für den Abstoßungsprozess gefährlichen Effektorzytokinen (IL-2 und IFN $\gamma$ ) wird verhindert, wobei interessanterweise die IFN $\gamma$  mRNA Expression nicht inhibiert wird. Es könnte ein Kandidat dieser IFN $\gamma$  Translationskontrolle erforscht werden.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der molekularen Analyse der anti-CD4mAk Wirkung im Detail diskutiert.

### 5.1 ANALYSE DER REGULATION DER PROLIFERATION UND DER P23 EXPRESSION IN DER GEMISCHTEN LYMPHOZYTENKULTUR

#### 5.1.1 Hemmung der Proliferation und der Expression des Kochaperons p23 unter anti-CD4-Behandlung

Unsere Expressionsanalysen während der allogenen T-Zellaktivierung im Rattenmodell ergaben, dass das Chaperon p23 kinetisch betrachtet einen Höhepunkt seiner Transkriptionregulation erreicht, wenn sich die Zellen in ihrer Proliferationsphase befinden. Bekanntermaßen ist p23 ein Kochaperon des Hitzeschockproteins Hsp90, für das wiederum schon 1988 nachgewiesen wurde, dass es nach Mitogen- bzw. Lymphokin-Stimulation in humanen T-Zellen hochreguliert wird (159). In älteren Patienten (75 Jahre) mit verringerter IL-2- und IL-2 Rezeptor-Produktion wurde eine reduzierte T-Zellproliferation beobachtet. Diese Prozesse gingen mit einer reduzierter Hsp90-Induktion einher (160). Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass das Expressionslevel an Chaperonen/Hsp's in proliferierenden Zellen verglichen mit ruhenden Zellen hochreguliert wird (161-163). Hansen et al. wiesen nach, dass die Hsp90 Synthese wirklich auf einer verstärkten Transkription beruht und nicht

nur der Effekt einer gesteigerten Translation präformierter mRNA ist (164). Korrelationen zwischen Hsp-Expressionen und Proliferation speziell im Rattenmodell wurden schon von anderen Arbeitsgruppen aufgedeckt (163, 165).

Hsp90 ist für die Stabilisierung und Translokation neu synthetisierter Proteine verantwortlich und hilft bei der Eliminierung denaturierter Proteine durch Degradierung (166, 167). Hsp's spielen aber auch eine Rolle während der Zellzyklusregulation und in Signalkaskaden über Kinaseaktivierungen. Vorstellbar ist, dass nach T-Zellaktivierung die vermehrten Kinaseaktivierungen (auch Zellzyklus-Komponenten) ein höheres Potential an stabilisierenden Chaperonen/Hsp's benötigen. Die Erkenntnisse, dass p23 für die Stabilisierung der Hsp90/Substrat-Komplexe und die langsame Dissoziation der Substrate (z.B. Kinasen) von Hsp90 erforderlich ist (168), könnten eine gute Erklärung für die Notwendigkeit der p23 Regulation sein. Schon in Bezug auf die nötige Dauer des TCR-APC-Kontaktes für eine vollständige T-Zelltransduktion (169) wird die Dringlichkeit der Signallänge durch stabile Ligandeninteraktionen deutlich. Über den regulativen Einfluss von p23 auf die T-Zellaktivierung ist im Gegensatz zu Hsp90 nichts bekannt. Vielleicht wirkt die p23 mRNA Hochregulation in unserem Modell der T-Zellantwort (MLC) auch regulativ auf die Hsp90 Funktion als Kinaseaktivator ein und moduliert somit Signalkaskaden der T-Zellaktivierung.

Der inhibitorische Einfluss des von uns verwendeten anti-CD4mAk's RIB5/2 sowohl auf die Proliferation als auch auf die p23 Transkription allo-aktivierter T-Zellen lässt auf eine Korrelation zwischen Proliferation und Expression des Kochaperons p23 schließen.

Um den Zusammenhang zwischen p23 Expressionsregulation, Proliferation und die Auswirkung des anti-CD4mAk's darauf weiter zu untersuchen, haben wir in einer Primär-MLC allogene-stimulierte T-Zellblasten einer weiteren allogenen Stimulation in einer Sekundär-MLC ausgesetzt.

1.) Restimulierte unbehandelte T-Zellen reagieren mit einer erneuten p23 Hochregulation, die im Vergleich zur Primär-MLC beschleunigt abläuft (Peak bei 24 Stunden statt Tag 3). Gefolgt wird diese auch von einer beschleunigten Proliferation (Tag 1-2 statt Tag 3-4). In der Primär-MLC differenzieren die naiven T-Zellen nach Aktivierung und IL-2-induzierter klonaler Expansion zu bewaffneten T-Effektorzellen/ Gedächtniszellen, die bei dem späteren Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen (Sekundär-MLC) beschleunigt reagieren

konnten. Auch die Th1- (IL-2, IFN $\gamma$ ) und Th2-Zytokine (IL-10) wurden ebenfalls schneller hochreguliert (Daten nicht gezeigt).

2.) Die anti-CD4mAk-Behandlung konnte allerdings allo-vorstimulierte T-Zellen in der Sekundär-MLC nicht mehr inhibieren, was sich interessanterweise in einem kaum gehemmten p23 Expressionsanstieg widerspiegelt. Auch IL-2 und IFN $\gamma$  sind normal hochreguliert. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen scheinen bei den Gedächtnis CD4<sup>+</sup>-T-Zellen einige unmittelbare TCR-vermittelte Signalgebungen auszufallen, wie z.B. die Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Zap-70 über die CD4-assoziierte Src-Tyrosin-Kinase Lck (170). Beeinträchtigungen des CD4-Moleküls durch anti-CD4mAk's würden somit kaum noch Auswirkungen auf das TCR-Signal ausüben und eine T-Zellaktivierung nicht behindern.

3.) Dagegen sind die in der Primär-MLC anti-CD4mAk-vorbehandelten Blasten stabil anerg, also nicht durch einen erneuten allogenen Stimulus in der Sekundär-MLC wieder aktivierbar. Mit diesem Befund geht die geringe p23 (als auch IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10) Expression konform.

### 5.1.2 Ist die p23 Regulation proliferationsabhängig ?

Aufgrund der bisherigen Daten stellte sich die Frage, ob die p23 Regulation nicht nur mit der Proliferation korreliert, sondern womöglich von ihr abhängig ist. Dafür wurden verschiedene Proliferationshemmer in der allogenen MLC eingesetzt und die p23 Expressionskinetik untersucht. Es zeigte sich, dass p23 durch alle Zellzyklus-Inhibitoren in seiner Hochregulation unterdrückt wird, was für eine Proliferations-abhängige Regulation der p23 Transkription spricht. Allerdings ist damit nicht ersichtlich, in welcher Zellzyklus-Phase p23 hochreguliert wird, da alle Inhibitoren den gleichen blockierenden Effekt ausüben. Möglicherweise wird die p23 Transkription erst während der späten Phase des Zellzyklus (G2/M oder M) initiiert. Dies konnte allerdings mangels spezifischer Proliferationshemmer nicht näher untersucht werden. Andererseits bleibt offen, ob die T-Zellen erst eine Runde der Zellteilung durchgeführt haben müssen, ehe die Expression ermöglicht wird, so wie es z.B. für einige Zytokine beschrieben ist (171). Der Zellzyklus kann hierbei die Expression verschiedenster Zytokine kontrollieren, die zeitunabhängig erst nach ein paar ZZ-Runden gestartet wird (172). Da es aber eine Grundexpression an p23 gibt und die Hochregulation in der MLC zum Tag 5 hin wieder fällt, ist es eher anzunehmen, dass die p23 mRNA Expression nach jedem Zyklus neu hochreguliert wird. Hinzu kommt ein kritischer Punkt in Bezug auf die Methode, da die T-Zellen in einem Gemischten Lymphozytenansatz unterschiedlich schnell aktiviert werden und damit auch ungleichmäßig in den Zellzyklus eintreten. Eine vorherige Synchronisation der T-Zellen hätte

eventuell ein eindeutigeres Ergebnis liefern können. Für einige Hsp's wurde eine Zellzyklus-abhängige Expression schon nachgewiesen, wie z.B. für Hsp90, dessen mRNA während der G1/S-Phase angereichert wird (173).

Der Versuch, einen generellen Eindruck über die p23-Regulation zu gewinnen, zeigte in allen Modellen der unterschiedlichen T-Zellstimulationen eine Hochregulation der p23 Expression. Das entsprach unseren Erwartungen, da auch in diesen Modellen eine Proliferation beobachtet wurde. Die T-Zellaktivierung nach **ConA-Stimulation**, die zu einer Vernetzung der CD2-Moleküle auf den T-Zellen führt, erfolgt beschleunigt durch den direkten Zell-Zell-Kontakt und dem unspezifischen Mitogenkontakt. Unspezifisch deshalb, weil die T-Zellaktivierung in diesem Modell zwar APC-abhängig, aber TCR/Ag-unabhängig abläuft. Das Plateau der p23 Hochregulierung (7fach) erreicht das der allogenen T-Zellstimulation, wieder konform gehend mit der parallel ablaufenden Proliferation der Zellen.

Bei der **aCD3/aCD28mAk-Stimulation** erfolgt die Aktivierung und Proliferation sowohl APC- als auch Ag-unabhängig. Deshalb ist in diesem Modell eine etwas beschleunigte T-Zellantwort und p23 Expression zu beobachten. Außerdem ist ein Kontakt wahrscheinlicher zwischen den Zellen und dem Stimulus, da jede T-Zelle und nicht nur allogen-spezifische T-Zellen reagieren. Entscheidend ist dabei auch die Stimuluskonzentration. Fraglich bleibt die anhaltende Hochregulierung von p23 bis zum Tag 5 der Stimulation, da sonst regelmäßig ein Höchstwert mit anschließendem Abfall beobachtet wurde. Andererseits war aber auch ein Anstieg der IFN $\gamma$  mRNA Expression bis zum Tag 5 hin zu verzeichnen, der ebenfalls in der Regel nach dem Expressionsmaximum wieder abfiel.

Interessanterweise erreicht die T-Zellaktivierung und p23 Expression in **humanen PBMC's** im Gegensatz zu Ratten-T-Zellen (72 h) ihr Maximum schon nach 40 Stunden. Die Ursache könnte der ständige Pathogenkontakt des Menschen nach Infektionen und Vakzinierungen sein, die zur Bildung von Gedächtniszellen führen, die wiederum dementsprechend schneller auf Ag-Kontakt reagieren und proliferieren würden. Generell demonstrieren diese Daten, dass die Hochregulation von p23 ein allgemeines Prinzip bei der T-Zellaktivierung über Speziesgrenzen hinweg darstellt.

### 5.1.3 Bedeutung von IL-2 für die p23 Expression allo-aktivierter T-Zellen

Wie bereits erwähnt, hemmt der anti-CD4 Antikörper RIB5/2 sowohl die Proliferation als auch die Hochregulation der p23 Transkription. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Proliferation der Zellen und einer erhöhten p23 Expression aufgedeckt werden.

Da IL-2 bekanntermaßen der Hauptwachstumsfaktor für aktivierte T-Zellen darstellt und dessen Bedeutung in der Toleranzverhinderung bzw. Toleranzbrechung (105) schon nachgewiesen wurde, wurde die Bedeutung von IL-2 auch in unserem *in vitro*-Modell MLC untersucht. Es wird deutlich, dass unter anti-CD4mAk-Behandlung sowohl die IL-2 Transkription als auch Translation gehemmt ist und letztendlich die inhibierte Proliferation durch exogene IL-2 Gabe konzentrationsabhängig wieder revertierbar ist. Die naheliegende Vermutung, dass sich die anti-CD4mAk-gehemmte p23 Expression ebenfalls durch IL-2 Gabe rekonstituieren lässt, ließ sich mit unseren p23 mRNA Analysen bestätigen. Der p23-inhibierende Effekt des anti-CD4mAk's wirkt vermutlich indirekt über eine Hemmung der TCR-induzierten IL-2 Produktion. Untersucht wurde die Annahme durch die Verwendung von Substanzen in der allogenen MLC, die mit der IL-2 Wirkung interferieren, aber die TCR-Stimulation unbeeinflusst lassen sollten. Das ist zum einen ein anti-CD25mAk, der den hochaffinen IL-2 Rezeptor blockiert und zum anderen Rapamycin, welches über die Inhibierung von mTOR den IL-2 Signalweg beeinflusst. Rapamycin hemmte wie erwartet die Proliferation der allo-aktivierten T-Zellen und die Hochregulation von p23, was eine Abhängigkeit vom IL-2 Weg demonstriert. Überraschenderweise war allerdings die Blockade von CD25 wirkungslos sowohl für die p23 Expression als auch für die Proliferation. Die Vermutung, dass der anti-CD25mAk funktionell nicht aktiv ist, konnte durch die inhibitorische Wirkung dieses Antikörpers auf die IFN $\gamma$  Translation widerlegt werden (siehe Abb.23). Möglicherweise können andere Zytokine, deren Signaltransduktion auch über die gleiche gamma-Kette erfolgt wie IL-2 (IL-4, IL-7, IL-9 oder IL-15), die Funktion von IL-2 ersetzen, werden aber in ihrer Wirkung auch von Rapamycin gehemmt. Von diesen Zytokinen ist IL-7 allerdings unwahrscheinlich, da es von Knochenmarkstromazellen produziert wird (174, 175), die jedoch nicht in unserem Stimulationsansatz vorhanden sind. Auch IL-9 wurde zwar ursprünglich als muriner T-Zellwachstumsfaktor beschrieben (176), wird aber im Vergleich zu IL-2 von aktivierten T-Zellen erst verzögert produziert. IL-4 wird wie IL-2 unter anderem von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen produziert (177) und kann ebenfalls als T-Zellwachstumsfaktor fungieren, der die Proliferation humaner und Maus-T-Zellen induziert. Beschränkt ist diese dabei auf bestimmte T-Zellpopulationen, wie z.B. Th2-Zellen, die aber kein IFN $\gamma$  produzieren, welches in unserem MLC-Modell eine große Rolle spielt. Wahrscheinlicher erscheint eine stimulatorische Wirkung durch IL-15. Die Rolle von IL-15 wurde erst später identifiziert (178, 179), da seine Proteinproduktion relativ schwierig zu detektieren ist (180). Interessanterweise enthält der IL-15 Rezeptor nicht nur die  $\gamma$ -Kette,

sondern auch die IL-2 $\beta$ -Kette (181, 182). IL-15 und IL-2 spielen in der Homeostasis der adaptiven Immunantwort ganz unterschiedliche Rollen. IL-2 induziert dabei eher den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD), der für die periphere Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen erforderlich ist, während IL-15 inhibitorisch in diesen Prozess eingreift und zusätzlich im Gegensatz zu IL-2 das Überleben von Gedächtniszellen unterstützt (183). Andererseits teilen IL-2 und IL-15 eine Vielzahl biologischer Aktivitäten. So ist IL-15 ebenso ein starker Wachstumsfaktor für T-Zellen (184). Damit rückte IL-15 näher in unser Interesse, aber Untersuchungen mit einem blockierenden spezifischen Antikörper gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-15 Rezeptors (anti-IL15R $\alpha$ ) zeigten auch in Kombination mit anti-CD25mAk keine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation der allo-aktivierten T-Zellen. Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, ist dabei unklar, ob der Maus-Antikörper gegen die IL-15R $\alpha$ -Kette überhaupt einen Effekt auf Ratten-Zellen ausüben kann. Spezifische Anti-Ratten-Antikörper stehen aber zur Zeit leider noch nicht zur Verfügung.

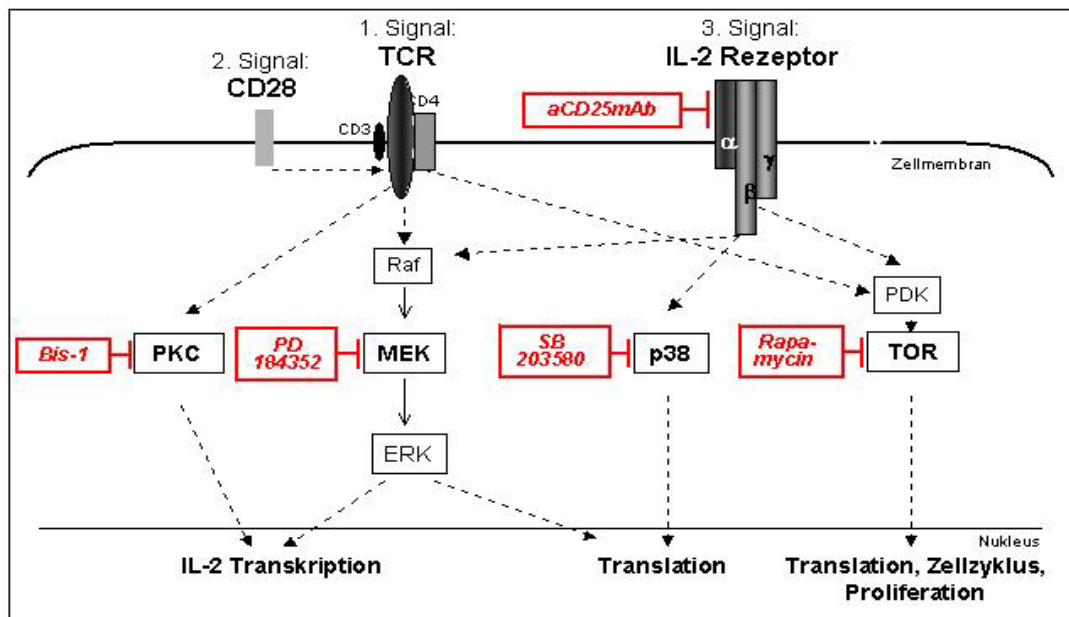
Hinzu kommt, dass die blockierende Wirkung des anti-CD25mAk diskutiert werden muss, da bekanntermaßen die IL2R $\beta$ - und IL2R $\gamma$ -Kette verantwortlich sind für die Signaltransduktionsfunktion des Rezeptors (185, 186). Die alpha-Kette des IL-2 bzw. IL-15 Rezeptors ist hauptsächlich für die Steigerung der Bindungsaffinität des Rezeptors verantwortlich und kann in Abwesenheit der anderen beiden Ketten keine Signale auslösen (187-190). Kürzlich wurde jedoch in einer murinen Zelllinie gezeigt, dass auch die IL-15R $\alpha$ -Kette eine Signaltransduktion induzieren kann (191). Es bleibt die Frage offen, welche Signalwege und welche Unterschiede zwischen den Signalkaskaden der IL-2R $\alpha$ - und IL-15R $\alpha$ -Kette bestehen.

Weshalb die blockierenden Antikörper keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation ausüben, könnte weitere Ursachen haben. Für die T-Zell-Proliferation reicht vielleicht auch schon der Rezeptor aus beta-Kette und gamma-Kette aus. Dieser kann trotz geringerer Affinität IL-2 in sehr hohen Konzentrationen binden und ruhende T-Zellen aktivieren. Da die IL-2 Expression durch den anti-CD25mAk nicht beeinflusst wird, ließe sich damit die ungestörte Proliferation und p23 Hochregulation erklären.

Außerdem wurde beschrieben, dass eine T-Zell-Proliferation auch IL-2-unabhängig allein durch den Stimulus des T-Zell-Rezeptors und kostimulatorischer Moleküle (CD28) induziert werden kann (21, 192, 193). Allerdings reicht dieses Signal nur für ein paar Zellzyklen. Inwiefern dieser Mechanismus in unserem Modell entscheidend ist, müsste weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

### 5.1.4 Signalwegsanalyse der p23 Transkriptionsinduktion

Die Erforschung der Signalwege, die zu einer Induktion der p23 Transkription führen könnten, wurde mit dem Einsatz spezifischer Kinase-Inhibitoren in der allogenen MLC erweitert. Die Zugabe der Inhibitoren am Tag 0 der MLC sollte zu einer allgemeinen Hemmung der p23 Transkription führen, da alle Signalwege (TCR-, CD28- und IL-2R-induziert) von Anfang an geblockt waren (Abb.32).



**Abb.32: Inhibitorische Einflüsse der Kinase-Hemmstoffe auf die T-Zellaktivierung**

Da der p38-Inhibitor keinen Einfluss auf die Regulation der p23 Expression hatte, kann die MAPK/p38-Kaskade als Weg der p23 Kontrolle ausgeschlossen werden. Ansonsten bewirkten alle anderen Kinase-Inhibitoren eine Hemmung der p23 Hochregulation. Offenbar sind die Signalwege entscheidend für unsere beobachtete p23 Hochregulation, welche die IL-2 Transkription induzieren oder zum Zellzyklus führen. Dazu gehört der PKC-Weg (Kalzium-abhängige NFκB-Aktivierung), die MAPK/ERK-Kaskade und die mTOR-abhängige PI3/PKB-Kaskade. Interessant wäre zu untersuchen, ob unter PKC-Hemmung eine Zugabe von exogenem IL-2 die p23 Inhibierung wieder revertieren kann, da die PKC-Kinase als einzige nicht in der IL-2 Signaltransduktionskaskade involviert ist und nur durch das TCR-Signal aktiviert wird. Alternativ könnte die Zugabe des PKC-Inhibitors erst am Tag 2 stattfinden, wenn das TCR-Signal schon erfolgt ist. Diese Experimente würden zukünftig noch für eine weitere Aufklärung sorgen.

Mit den bisherigen Daten der Signalweg-Inhibitoren und der IL-2 Rekonstitution der anti-CD4mAk-induzierten p23 Expressionshemmung könnte man schlussfolgern, dass die Kontrolle der p23 Regulation über die IL-2 Wirkung erfolgt.

Um den Einfluss der untersuchten Signalkaskaden auf die Regulation von p23 weiter zu belegen, versuchten wir, die Kinaseaktivitäten der relevanten Kinasen zu analysieren.

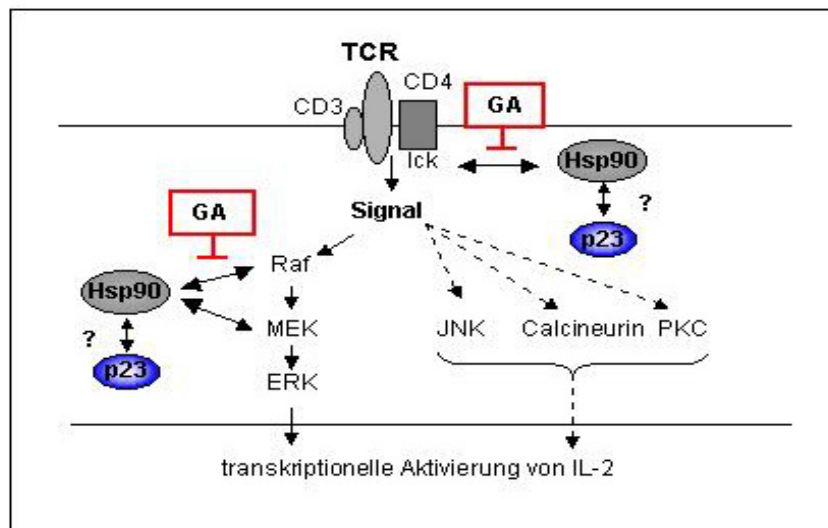
In Bezug auf den Aktivierungszustand der p38 Kinase- und der ERK1/2 Kinase liessen sich am Tag 2 in den verschiedenen Kulturansätzen kaum Unterschiede feststellen. Am Tag 3 mit der stärksten p23 Hochregulation waren p38 und ERK1/2 etwas mehr phosphoryliert in unbehandelten und anti-CD25mAk-behandelten allo-aktivierten T-Zellen als in anti-CD4-behandelten Zellen. Schwache Unterschiede rühren aber von leichten Beladungsunterschieden her. Außerdem könnte man erwarten, dass bei der syngen MLC ein ähnliches Kinaseaktivierungsmuster wie in der anti-CD4mAk-behandelten MLC zu beobachten sein sollte, da die p23 Regulation und Proliferation in beiden Fällen unterdrückt ist. Das ist aber nicht der Fall. Die syngene MLC, die weder eine aktivierte p38 Kinase oder ERK1/2 Kinase aufweist, verhält sich damit anders als die anti-CD4mAk-behandelte allogene MLC. Allerdings könnte bei der syngen MLC jedoch das fehlende TCR-Signal die Ursache sein. Wie schon diskutiert, verursacht der anti-CD4mAk anscheinend keine vollständige Blockade der T-Zell-Oberflächenmoleküle, sondern wirkt eher modifizierend auf die Signalgebung ein. So kann eine partielle Aktivierung von Kinasen (z.B. ERK) nach TCR-MHC-Wechselwirkung durchaus noch erfolgen. Im syngen Ansatz der MLC treffen Zellen des selben Rattenstammes aufeinander, die bei fehlendem Fremd-Ag Kontakt dementsprechend auch keine T-Zellaktivierung starten und keine ERK-Aktivität aufweisen müssen. Die untersuchten Phosphorylierungszustände der MAPK p38 und ERK lassen darauf schließen, dass deren induzierte Signalwege offenbar nicht im Zusammenhang mit der Hochregulierung von p23 stehen.

Interessanterweise gibt es aber eine gute Übereinstimmung der p23 Expression mit dem Aktivierungsmuster des IL-2-induzierten Signalweges, der die Kinasen PI3, PDK, PKB, mTOR und p70S6 einschließt. Diese Daten entsprechen der Beobachtung, dass die p23 Hochregulation von der mTOR-Aktivität abhängig ist, was durch die p23-hemmende Rapamycin-Behandlung schon erwartet wurde. Diese Signalkaskade führt letztendlich auch zur Proliferation, die das Zellwachstum (Zellgröße) und die Zellteilung beinhaltet. Zellwachstum ist durch eine erhöhte Produktion von Proteinen des Translationsapparates gekennzeichnet, der notwendig ist, um mit dem steigenden Bedarf an Proteinsynthese fertig

zu werden (194). Erst wenn die Zelle eine bestimmte Mindestgröße erreicht hat, kann sie in den Zellzyklus treten und ihre zellulären Ressourcen an die Tochterzelle weitergeben, um deren Überleben zu sichern. Die Synthese vieler Translations-assoziiierter Proteine (5'-TOPmRNA's) wird wachstumsabhängig auf der Translationsebene durch den oben genannten IL-2-induzierten p70S6 Kinase-Signalweg reguliert (195). 5'-TOPmRNA's kodieren Gene für Proteine, die entweder für den Zellzyklusverlauf notwendig sind oder ein Teil des Translationsapparates sind. Rapamycin inhibiert die Translation dieser Proteine, die für den Übergang der Zellzyklusphase G1 in die S-Phase erforderlich sind und führt somit zu einem Arrest in der G1-Phase (196). Man könnte vermuten, dass p23 Zellzyklus-abhängig in seiner Expression kontrolliert wird, um eventuell die schon nachgewiesenen Assoziationen von Hsp's mit verschiedenen Komponenten des Zellzyklus-Kontrollsystems zu stabilisieren. Zu diesen Komponenten gehören Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK's) und Cyclin-abhängige Kinasen-Inhibitoren (CKI's) (150, 197, 198). Unter normalen Wachstumsbedingungen wurde schon im Hefemodell das p23 Homolog Wos2 als ein Regulator von Schlüsselproteinen des Zellzyklus identifiziert (199).

### **5.1.5 Funktionsanalyse: Ist die Proliferation der T-Zellen abhängig von der p23 Expression oder ist p23 essentiell für die T-Zell-Proliferation?**

Da p23 in unserem T-Zellaktivierungsmodell proliferationsabhängig hochreguliert wird, stellt sich die umgekehrte Frage, ob die Proliferation allogene-aktivierter T-Zellen auch p23 Expression-abhängig ist oder ob es womöglich auch für andere Prozesse der T-Zellaktivierung notwendig ist. 1998 wurde Hsp90 als ein wichtiger Faktor in der CD28-vermittelten T-Zellaktivierung identifiziert. Als Beweis diente das antiproliferative Antibiotikum Geldanamycin, das neben der Proliferation die IL-2 Sekretion und die IL-2 Rezeptor Expression inhibiert (142). Geldanamycin ist für die Dissoziation des Hsp90's von ihren Klienten verantwortlich. Dazu gehören Kinasen, die in der T-Zellaktivierung involviert sind, verantwortlich. Es reduziert die Menge und Phosphorylierung von z.B. Lck, Raf-1 und Mek, verhindert die Aktivierung der ERK Kinase und unterbricht die TCR-vermittelte Aktivierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NF-AT) (143, 144). Das alles führt zu einer beeinträchtigten T-Zellantwort, da keine adäquate Reaktion mehr auf den TCR-Stimulus stattfinden kann. Interessanterweise wurde zwar eine indirekte Assoziation von p23 über Hsp90 mit anderen Kinasen beschrieben (133, 134, 200), aber bisher gibt es keine Daten in diesem Zusammenhang mit Lck, Raf-1 und Mek (Abb.33).



**Abb.33: Hsp90-Kinase-Komplexe während der T-Zellaktivierung.** Grau dargestellt sind die Hitzeschockproteine Hsp90, die nach Stabilisierung durch das Kochaperon p23 (blau markiert) einen Komplex mit Kinasen der T-Zellaktivierung eingehen und diese somit in eine funktionelle Konformation bringen. Rot wird die Inhibierung der Hsp90-Kinase-Komplexe durch den Hemmstoff Geldanamycin demonstriert.

Darum wollten wir untersuchen, inwieweit sich eine Inhibierung der p23 Expression auf die Aktivierung von T-Zellen auswirkt. Dafür war der Einsatz von p23-Antisense-Oligonukleotiden geplant. Die Versuche mit kommerziell bestellten Antisense-Oligonukleotiden in der allogenen MLC verliefen jedoch erfolglos, was in der unbeeinflussten Regulation der p23 Proteinmenge in einer Proteinanalyse (Westernblot) sichtbar wurde. Die Methode an sich ist in unserem Institut für das Protein Bag-1 etabliert gewesen und hat bisher gut funktioniert (107). Allerdings ist unklar, ob das Problem womöglich im Design der entworfenen p23- Oligonukleotide lag oder aber in der Halbwertszeit von p23.

Da die Oligonukleotide nur eine Länge von 14-25 Basen aufweisen (Optimum), wurde als nächstes versucht, mit der Überexpression einer Antisense-mRNA gerichtet gegen den kompletten ORF die p23-Expression zu verhindern. Mit Hilfe transgener Zellen sollte die Antisense- bzw. Sense-p23 mRNA stabil exprimiert und in der Gemischten Lymphozytenkultur eingesetzt werden, um herauszufinden, ob die Expressionsregulation von p23 funktionelle Konsequenzen für die T-Zellaktivierung hat. Die retrovirale Transduktion des p23 ORF's sollte zu einer stabilen Expression der Antisense/Sense-p23mRNA führen, damit diese mit anhaltendem Effekt auf neuproduziertes p23 auch längere Halbwertszeiten des p23 Proteins überbrücken könnte. Unter dem Einfluss inhibierter p23 Expression würden wir eine Hemmung der T-Zellaktivierbarkeit erwarten, die indirekt durch die verhinderte

Proliferation hervorgerufen würde. Andererseits vermuteten wir, dass die Überexpression von p23 zu einer stärkeren Aktivierbarkeit der T-Zelle bzw. zu einer unkontrollierten Proliferation von T-Zellen führen könnte. In Bezug auf Hsp90 existieren z.B. Berichte über dessen Antisense-Inhibierung, die zu einer Reduzierung der Zellteilungsrate der humanen Tumorzelllinie U937 führt bzw. über dessen Überexpression, unter der die Zellen verstärkt in die S-Phase des Zellzyklus übergetreten sind (201). Auch in einem anderen Zusammenhang mit Tumorzellen wurde eine verstärkte Expression von sowohl Hsp90 als auch p23 nachgewiesen (125).

Der von uns verwendete retrovirale Vektor (s.Abb.20) enthält neben dem p23-ORF (Sense/Antisense), unter Kontrolle des retroviralen 5'LTR-Promotors, eine GFP-Reporter cassette, die über eine IRES gekoppelt ist. Da GFP nach seiner Translation nicht sezerniert wird, sondern im Zytosol verbleibt, spiegelt sich angesammeltes GFP in einer stärkeren Emission wider, die man als Fluoreszenzintensität im FACS quantifizieren kann. Auch die einfache Handhabbarkeit des Reportergens ist von Vorteil, da weder chemische noch enzymatische Modifikationen notwendig sind, um das fluoreszierende Protein sichtbar zu machen. Da GFP nicht als Fusionsprotein, sondern über eine IRES bicistronisch gekoppelt ist, sollte die Funktion des p23 Proteins des Sense-Konstruktes unbeeinflusst bleiben. Zusätzlich wird die mRNA des Antisense-Konstruktes stabilisiert und nicht vorzeitig abgebaut, da zelluläre Kontrollmechanismen einen „sinnvollen“ ORF durch die abgelesene Sequenz des GFP's vorfinden.

In der FACS-Analyse unserer stabilen p23-Antisense<sup>+</sup>/Sense<sup>+</sup>-Klone wurde nur eine Verdopplung bzw. Verdreifachung der Intensitätsverstärkung des mittleren Fluoreszenz-Signals (GFP) detektiert. Schwache GFP-Signale sind allerdings nicht außergewöhnlich, da schon oft berichtet wurde, dass GFP hinter einer IRES geschaltet nur schwach exprimiert und dementsprechend auch nur schwach leuchtend detektiert werden kann. Der Unterschied zwischen dem p23 Antisense<sup>+</sup>-Klon A und B hinsichtlich ihrer GFP- und p23- Expression ließe sich mit einer ungleichen Kopienzahl an integrierten Plasmiden erklären. Im Fall Klon A würde das bedeuten, dass eine sehr geringe Kopienzahl zwar die Resistenz gegenüber dem Selektionsmarker G-418 gewährt, aber nicht für eine ausreichende Transkription der Transgene p23 und GFP sorgt. Offenbar trägt der p23 Antisense<sup>+</sup>-Klon B genügend Plasmide in einer Zelle, um sogar eine Reduzierung der starken basalen p23 Produktion zu bewirken.

In einer Protein-Analyse der p23-Expression in den transgenen Zellen wurde deutlich, dass p23 schon in der Kontrolle, den nicht-transfizierten Zellen der Verpackungszelllinie GP+E,

sehr stark exprimiert wird. Ein p23 Antisense<sup>+</sup>-Klon zeigte zwar im Gegensatz zur Kontrolle keine vollständige Inhibierung, aber eine deutliche Reduzierung in der p23 Expression. Die p23 Sense<sup>+</sup>-Klone dagegen zeigten im Vergleich zu der untransfizierten Verpackungszelllinie kaum sichtbare Unterschiede in der p23-Expression. Dass die nicht-transfizierte Verpackungszelllinie p23 schon sehr stark exprimiert ist nicht sonderlich verwunderlich, da Zelllinien permanent proliferieren. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten von einem sehr hohen endogenen Expressionsniveau von p23, das somit bestimmte *in vivo* Studien erschwert (123).

Auch wenn die p23 Sense<sup>+</sup>-Klone dieser artifiziellen Zelllinie nicht offensichtlich p23 Protein überexprimieren können, ist keine generelle Aussage über die Fähigkeit der stabilen Klone, die p23 Expression doch zu beeinflussen, möglich. Der von den Klonen produzierte Virus wäre vielleicht effektiv genug, um in unseren allogenen T-Zellen trotzdem einen Einfluss auszuüben, denn die zu untersuchenden allo-aktivierten T-Zell-Blasten sind vor der Restimulation gestarvt worden (siehe 7.1.2. und Abb.7) und hatten bewiesenermaßen ihre p23 Expression wieder reduziert. Für die Aufklärung dieser Fragestellung sind weiterführende Untersuchungen angestrebt.

Im Zusammenhang mit den schwachen Unterschieden in der p23-Proteinexpression auf dem Westernblot ist zu beachten, dass es innerhalb des ORF-Bereiches zwischen unserer klonierten Rattensequenz und der Mausequenz (GP+E = Maus-Fibroblastenzelllinie) Differenzen von 9 Basenpaaren gab. Es muss in Betracht gezogen werden, dass dieser Sequenzunterschied von 1,8 % ausreicht, um die relativ geringe p23-inhibitorische Wirkung der p23 Antisense<sup>+</sup>-Klone zu verursachen.

Es sind für die Zukunft fortführende Arbeiten in der Funktionsanalyse beabsichtigt, wobei zur Optimierung zusätzlich die Klonierung der p23 Mausequenz des ORF-Bereiches in den retroviralen Vektor geplant ist. Falls die Verwendung des retroviralen Antisense-Konstruktes keine Reduktion der p23 Translation bewirkt, gibt es inzwischen die Alternative der Verwendung von siRNAs/dsRNAs (short interfering RNAs/ double stranded RNA). Hierbei wird das System prozessierter oder synthetisierter dsRNA von ca. 20-30 Nukleotiden (siRNA's) genutzt, die mit verschiedenen Proteinen und Faktoren einen Komplex bilden, der die sequenzspezifische Degradierung der Zieltranskripte vermittelt (202). Außerdem sollen mit den am besten p23-inhibierten Klonen (z.B. p23 Antisense<sup>+</sup>-Klon B) funktionelle Studien durchgeführt werden. Dies soll helfen, die Bedeutung von p23 für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen aufzuklären. Falls die p23 Expression essentiell für die

Aktivierung von T-Zellen ist, wäre es als Zielprotein für eine immunmodulatorische Therapie denkbar.

## 5.2 ANALYSE DER AUSWIRKUNG DER ANTI-CD4-BEHANDLUNG AUF DIE EXPRESSION VON EFFEKTORZYTOKINEN

Die Ergebnisse ergaben, dass der von uns verwendete Antikörper gegen das T-Zell-Oberflächenmolekül CD4 die Proliferation und sowohl die IL-2 Transkription als auch Translation allo-aktivierter T-Zellen verhindert. Diese Beobachtungen stimmen mit den bisher beschriebenen Ergebnissen überein (103, 203). Überraschenderweise bewirkte jedoch in unserer Studie die anti-CD4mAk-Behandlung keine Hemmung der IFN $\gamma$ -Transkription allo-aktivierter T-Zellen, was im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten steht, die von einer kompletten Hemmung der IFN $\gamma$  Produktion berichten (103, 203, 204). In diesen Studien wurde jedoch nicht zwischen Transkription und Translation unterschieden. Außerdem können diese gegensätzlichen Ergebnisse auch auf unterschiedliche Wirkmechanismen der verwendeten anti-CD4 Ak's beruhen. Es gibt neben den depletierenden anti-CD4 Antikörpern auch solche, die ausschließlich modulierend, also signalverändernd, auf die CD4+-positiven T-Zellen einwirken. Zusätzlich unterscheiden sich anti-CD4 Antikörper in ihrer heterogenen Fähigkeit, den reaktionslosen Zustand einer T-Zelle zu induzieren (76). Der von uns verwendete nicht-depletierende anti-CD4mAk RIB5/2 induziert sehr effektiv Toleranz gegenüber Alloantigenen.

Es existieren Erkenntnisse über die Bedeutung von IL-2 für die IFN $\gamma$  Produktion von allo-aktivierten T-Zellen und NK-Zellen (18, 20). Wir konnten diese bestätigen, indem wir mit dem Zusatz von rekombinantem IL-2 zu anti-CD4mAk-behandelten T-Zellen die fehlende IFN $\gamma$  Produktion wiederherstellen konnten. Auch die Verhinderung der IL-2 Bindung an seinen hochaffinen IL-2 Rezeptor durch den neutralisierenden anti-CD25 Antikörper führte zum Block der IFN $\gamma$  Translation ohne Beeinflussung der Transkription. Zusätzlich wollten wir austesten, ob auch andere Zytokine, deren Rezeptor die gleiche gamma-Kette enthält, ebenso in der Lage sind, die IFN $\gamma$  Produktion wiederherzustellen. Unsere Beobachtung, dass rekombinantes IL-15 im Gegensatz zu rekombinantem IL-2 unfähig war, den IFN $\gamma$  Translationsblock zu revertieren und die Inhibierung des IL-15 Rezeptors keine Auswirkung auf die IFN $\gamma$  Translation zeigte, schob die Bedeutung von IL-2 stärker in den Mittelpunkt. Es muss erwähnt werden, dass kürzlich die Arbeitsgruppe Liew herausfand, dass IL-15 zwar Proliferation induziert, aber keine Zytokinproduktion in Abwesenheit einer TCR-Aktivierung

antreiben kann (205).

Die Signalwege, die nach einer IL-2 Stimulation von T-Zellen und NK-Zellen aktiviert werden, schließen die MAPK p38 und ERK1/2 ein (18, 20, 40). Auch das Zytokin IL-12 kann IFN $\gamma$  in T-Zellen und NK-Zellen induzieren und aktiviert dabei eine Signalkaskade über die p38 MAP Kinase (206). So ist beschrieben worden, dass der p38-Inhibitor SB203580 die IFN $\gamma$  Sekretion aktivierter T-Zellen hemmt (durch IL-12/IL-18 induziert), was mit einer Reduzierung in der IFN $\gamma$  Transkription einherging (40). Die MAPK Signalwege über die p38 und ERK1/2 aktivieren durch Phosphorylierung den Initiationsfaktor eIF4E und führen damit zur Verstärkung der Translationsinitiation bei (207, 208). Auch wenn die Translationskontrolle auf 3 Ebenen stattfindet (Initiation, Elongation, Termination), spielt die Kontrolle der Initiation eine besondere Rolle. Hierbei wird die mRNA zum Ribosom rekrutiert und am Initiationskodon positioniert. Die Initiationsphase der Translation spielt auch während der T-Zellaktivierung eine wesentliche Rolle, um die Proteinsynthese anzuschieben (209). Dennoch konnten wir keine Reduzierung in der Aktivität der MAPK p38 und ERK1/2 in den anti-CD4mAk-behandelten Kulturansätzen detektieren, obwohl die spezifischen MAPK Inhibitoren in allo-aktivierten T-Zellen einen IFN $\gamma$  Translationsblock hervorriefen.

Ein weiterer Signalweg, der durch IL-2 induziert wird, involviert die PI3 Kinase. Wir konnten mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 den direkten Einfluss von PI3K auf die IFN $\gamma$  Translation zeigen. Die PI3K reguliert elementare zelluläre Prozesse, wie die der Proliferation, der Induktion des Zelltodes, Zellaktivität und Adhäsion (210). Sasaki et al konnten zeigen, dass PI3K-defekte T-Zellen *in vitro* eine gestörte Zytokinproduktion aufweisen und *in vivo* hinsichtlich ihrer Immunantwort beeinträchtigt sind. Dabei werden unter anderem verschiedene Kinasen aktiviert, so auch die PKB, p70S6 Kinase und ERK1/2 (211). Die PKB wiederum phosphoryliert und aktiviert mTOR (212, 213), welche für die Translationskontrolle verantwortlich ist, was durch zahlreiche Versuche mit dem spezifischen TOR-Inhibitor Rapamycin bewiesen wurde (214-217). Für die IFN $\gamma$  Translation in unseren allo-aktivierten T-Zellen spielt die mTOR Kinase offenbar keine Rolle, da Rapamycin keine hemmenden Effekte auf die IFN $\gamma$  Translation ausübte. Andererseits wurde kürzlich davon berichtet, dass unter Rapamycinbehandlung zwar ein Zellzyklus-Arrest erfolgte, aber nur relativ geringfügig die Proteinsynthese (ca.15%-20%) gehemmt war (218). Zusätzlich zeigten unsere Daten eine verringerte Kinaseaktivität der p70S6 Kinase, die durch die Zugabe von IL-2 oder IL-15 revertiert werden konnte. Da aber in den anti-CD4mAk-behandelten T-Zellen

die inhibierte IFN $\gamma$  Produktion durch IL-15 Gabe nicht aufgehoben wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die reduzierte p70S6 Kinaseaktivität als Ursache für den Translationsblock eine Rolle spielt.

Ein weiterer Kandidat für die Translationskontrolle von IFN $\gamma$  ist der Translations-Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$ . Die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des eIF2 führt zu dessen Deaktivierung und ist der Schlüsselmechanismus einer umfassenden Inhibierung der Translationsinitiation. Ausgeführt wird die Deaktivierung durch eIF2a Kinasen, zu denen 4 Gruppen gehören, die gewebspezifisch exprimiert und induziert werden. Eine bekannte eIF2a Kinase ist die PKR, eine IFN $\gamma$ -induzierbare Proteinkinase, die neben der Translationskontrolle auch in der Transkriptionsregulation und beim mRNA-Splicing eine Rolle spielt. Sie ist für Prozesse der Signaltransduktion, Apoptosis, Differenzierung und des Zellwachstums bedeutend (219-222). Die Aktivierung des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  wiederum erfolgt nach Dephosphorylierung durch die Phosphatasen 1 und 2A, welche nach Stimulierung von Zellen, z.B. durch Insulin aktiviert werden (223). Unsere Untersuchungen ergaben in allo-aktivierten T-Zellen eine Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$ . Unter anti-CD4mAk-Behandlung mit RIB5/2 wird die Dephosphorylierung verhindert und kann nach Zugabe von IL-2 wieder induziert werden, im Gegensatz zu IL-15, das nicht diese Wirkung aufweist. Die Übereinstimmung der Phosphorylierungsmuster von eIF2 $\alpha$  mit der IFN $\gamma$  Produktion in den verschiedenen MLC-Modellen, macht ihn zu einem guten Kandidaten für eine Vermittlung der IFN $\gamma$  -Kontrolle in unserem Experiment. Dazu gibt es Literaturhinweise, die diese These unterstützen. Es wurde gezeigt, dass IL-2 über die Phosphatase 1- und 2A-Aktivierung die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Adhäsion humaner T-Zellen vermittelt (224). Die Arbeitsgruppe um Ben-Asouli konnte weiterhin zeigen, dass phosphoryliertes und somit deaktiviertes eIF2 $\alpha$  die Translation von IFN $\gamma$  mRNA in humanen T-Zellen verhindert (225). Somit ist denkbar, dass der IL-2-induzierte Signalweg über die PI3 Kinase zu einer Aktivierung der Phosphatasen 1 und 2A führt und diese wiederum den Translations-Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$  dephosphorylieren und damit aktivieren. Für die Translation der TCR-induzierten IFN $\gamma$  mRNA ist aktives eIF2 $\alpha$  erforderlich. Eine Inhibierung der IL-2 Produktion würde damit die Dephosphorylierung und Aktivierung von eIF2 $\alpha$  verhindern, welcher für die Translation der TCR-induzierten IFN $\gamma$  mRNA notwendig ist.

IFN $\gamma$  als wichtiges Zytokin während der adaptiven Immunantwort, kann in Überschuss nach Transplantation zu einer Gewebeerstörung und zum Verlust des Transplantates führen. Die

Fähigkeit der anti-CD4 Antikörper allo-spezifische Toleranz *in vivo* zu induzieren, könnte unter anderem auf dem Translationsblock der IFN $\gamma$  mRNA beruhen, der auf einem Mangel an IL-2 zurückzuführen ist. Dies würde auch den Zusammenbruch der Toleranz (*in vivo*) nach Zugabe von exogenem IL-2 erklären.

### 5.3 ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSBEMERKUNG ZU DEN MOLEKULAREN EFFEKTEN DER ANTI-CD4-BEHANDLUNG

Das Zelloberflächenmolekül CD4, das auf allen T-Helferzellen vorkommt, ist bei der Wechselwirkung mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC's) wichtig für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen. Daher ist eine Möglichkeit zur Induktion einer Transplantattoleranz gegenüber einem allogenen Spenderorgan die Verhinderung einer vollständigen T-Zellaktivierung durch nicht-depletierende, blockierende anti-CD4 monoklonale Antikörper (mAK). Der in dieser Arbeit untersuchte anti-CD4mAk RIB5/2 kann im Rattentransplantationsmodell eine stabile Transplantattoleranz erzeugen.

Untersuchungen in einem *in vitro* Modell der allogenen T-Zellaktivierung (Gemischte Lymphozytenkultur = MLC) zeigten, dass es durch diesen anti-CD4mAk zu einer blockierten T-Zellaktivierung kommt. Ausdruck dieser defekten T-Zellaktivierung sind:

- *eine verminderte T-Zell-Proliferation*
- *eine Reduzierung der Synthese der Th1-Effektorzytokine IL-2 und IFN $\gamma$*

Th1-Zytokine fördern eine zelluläre Immunantwort, die zu einer Abstoßung des Spenderorgans führen kann. Interleukin IL-2 (IL-2) ist ein wichtiger autokriner Wachstumsfaktor aktivierter T-Zellen, während Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ein wichtiger Aktivator von APC's ist. Im Gegensatz zu IL-2, das unter der anti-CD4mAk Behandlung schon auf Ebene der Transkription inhibiert wurde, erfolgte die Hemmung der IFN $\gamma$  Produktion interessanterweise posttranskriptionell, da die Transkription bei verminderter Zytokinproduktion unbeeinflusst blieb.

Wird das fehlende IL-2 ersetzt, kann die defekte Proliferation als auch die posttranskriptionelle Blockade der IFN $\gamma$  Produktion aufgehoben werden. Dies spiegelt sich ebenso *in vivo* wieder, da rekombinantes IL-2 auch hier den anti-CD4mAk-induzierten Toleranzstatus brechen kann. Es erschien daher, dass der Proliferations- und IFN $\gamma$ -

inhibierende Effekt des anti-CD4mAk's indirekt über eine Hemmung der TCR-induzierten IL-2 Produktion erzeugt wird. Die Vermutung wurde bekräftigt, indem Substanzen in der MLC verwendet wurden, die mit der IL-2 Wirkung interferieren. Naheliegend war die Hemmung der IL-2 Bindung an seinen hochaffinen IL-2 Rezeptor durch einen neutralisierenden anti-CD25mAk in der allogenen MLC. Aufgrund der Wirkung von rekombinanten IL-2 würde man hier eine Inhibierung der Proliferation und der IFN $\gamma$  Translation erwarten. Erstaunlicherweise wirkte der anti-CD25 Antikörper jedoch nur blockierend auf die IFN $\gamma$  Zytokinsynthese, während die Proliferation nicht beeinträchtigt wurde. Möglicherweise werden die proliferativen Effekte durch andere Zytokine hervorgerufen. Es gibt Zytokine, deren Rezeptoren die gamma-Kette des IL-2 Rezeptors teilen und somit fehlende biologische Aktivitäten von IL-2 kompensieren könnten. Ein wichtiger Kandidat war IL-15, da es ebenso wie IL-2 ein starker T-Zell-Wachstumsfaktor ist. Der Einsatz von rekombinantem IL-15 in einer anti-CD4mAk-behandelten allogenen MLC führte nicht, wie IL-2, zu einer Aufhebung der IFN $\gamma$  Proteinhemmung, aber zur Revertierung der Proliferation. Daraus schlussfolgerten wir, dass IL-15 zwar die T-Zellproliferation beeinflussen kann, IL-2 jedoch neben der Proliferation noch die IFN $\gamma$  Translation reguliert. Die Regulation erfolgt über verschiedene Signalkaskaden, die über den IL-2 Rezeptor angeschaltet werden. Wir wollten herausfinden, welche Signaltransduktionswege zu den einzelnen Effekten der Proliferation und der IFN $\gamma$  Translation führen und welche dieser Wege durch die anti-CD4mAk Behandlung beeinflusst werden. IL-2 induziert über seinen Rezeptor drei wichtige Signalkaskaden über die MAP Kinasen p38, ERK und TOR, die für die Kontrolle der Transkription, Translation und Proliferation eine große Rolle spielen. Zusätzlich wurde in diese Analyse das Kochaperon p23 einbezogen, welches in vorherigen Untersuchungen als differentiell exprimiertes Gen zwischen allogener und anti-CD4mAk-behandelter MLC identifiziert wurde. Da dieses p23 als Kofaktor von Hsp90 die Stabilität und Verfügbarkeit einiger dieser Kinasen regulieren könnte, war es wichtig zu wissen, mit welchem zellulären Effekt und welcher Kinaseaktivität die Regulation der Expression von p23 korreliert. In der folgenden Tabelle sind die Nachweise der zellulären Effekte, der Kinaseaktivitäten der Signalwege und die Hemmversuche der einzelnen MLC Kulturansätze zusammenfassend dargestellt:

Ansätze:	Zelluläre Effekte:			Kinaseaktivitäten:		
	IFN $\gamma$ (Transl.)	Prolif.	p23	p38	ERK	TOR
allo	+	+	+	+++	+++	+++
allo+anti-CD4	-	-	-	++	++	-
syn	-	-	-	-	-	-
allo+anti-CD25	-	+	+	+++	+++	++
allo+anti-CD4 +IL-2	+	+	+	n.d.	n.d.	+++
allo + SB	-	+	+			
allo + PD	-	+	+			
allo + Rapam.	+	-	-			

**Tabelle 3: Zusammenfassende Darstellung der zellulären Effekte (IFN $\gamma$  Translation, Proliferation, p23 Expression), der Kinaseaktivitäten drei wichtiger Signaltransduktionswege und der Hemmversuche in verschiedenen MLC-Ansätzen.** (Blau=Hemmung der Kinase p38 durch den Inhibitor SB, Braun=Hemmung der Kinase ERK durch den Inhibitor PD, Grün=Hemmung der Kinase TOR durch den Inhibitor Rapamycin)

Aus der Tabelle wird ersichtlich., dass die p23 Expression nicht induziert wird, wenn eine Inhibierung der T-Zellproliferation vorliegt. Da unterschiedliche Modelle der T-Zellstimulation eine Korrelation zwischen Proliferation und p23 Regulation demonstrieren und zusätzlich Proliferationshemmer in der allogenen MLC die Hochregulation der p23 Expression inhibieren, schlussfolgern wir, dass p23 proliferationsabhängig aktiviert wird. Die Tabelle zeigt auch deutlich, dass die MAPK-Signalwege (p38 und ERK) zum Zeitpunkt der IL-2 Wirkung nicht für die Kontrolle der Proliferation (und damit der p23 Expressionsregulation) verantwortlich sind, da ihre Hemmung die Proliferation nicht beeinflusst und die Aktivität der Kinasen zu diesem Zeitpunkt nur schwach inhibiert ist. Dagegen zeigen die Experimente deutlich, dass der IL-2-induzierte TOR-Signalweg für die Proliferationskontrolle (und damit der p23 Expressionsregulation) essentiell ist, da sowohl die Hemmung von TOR durch Rapamycin die Proliferation verhindert als auch die komplett unterdrückte Aktivität der Kinasen im TOR-Signalweg in den zellulären Modellen mit inhibierter Proliferation diese These unterstützen.

Es kann auch ausgeschlossen werden, dass der TOR-Signalweg für die Regulation der IFN $\gamma$  Produktion verantwortlich ist, da die Hemmung über Rapamycin zwar die Proliferation beeinflusst, aber nicht die IFN $\gamma$  Produktion. Die Blockade der IFN $\gamma$  Produktion scheint auch nicht über die MAP Kinase-Signalwege (p38 und ERK) zu erfolgen, da die beobachtete Hemmung der Kinaseaktivitäten unter anti-CD4mAk Behandlung vergleichsweise mild

ausfällt, auch wenn eine Inhibierung der Kinasen zu einer Inhibierung der IFN $\gamma$  Produktion führt. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um den Einfluss dieser Kinasen auf die IFN $\gamma$  Produktion zu klären. Dafür hat diese Arbeit aber einen zusätzlichen Kandidaten für die Kontrolle dieses interessanten zellulären Effekt identifiziert. Es handelt sich hierbei um einen Translations-Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$ , der ebenfalls durch IL-2 induziert wird und für die Translationskontrolle eine entscheidende Rolle spielt.

Obwohl wir für die Regulation der p23 Expression in allogenen-aktivierten T-Zellen die verantwortliche Signaltransduktionskaskade ermittelt haben, konnte die genaue Funktion und Bedeutung von p23 für die T-Zellaktivierung leider nicht weiter geklärt werden. Dagegen konnten wir einen Kandidaten der IFN $\gamma$  Translationskontrolle ermitteln. Da IFN $\gamma$  wesentlich die proinflammatorische Immunantwort beeinflusst und somit im Fall der Transplantation Gewebszerstörung und Organverlust hervorrufen kann, ist die weitere Aufklärung der Regulationsmechanismen von IFN $\gamma$  für ein besseres Verständnis des Abstoßungsprozesses von großer Bedeutung.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Faustman, D. 1995. Strategies for circumventing transplant rejection: modification of cells, tissues and organs. *Trends Biotechnol* 13:100-105.
2. Trucco, M., and G. Stassi. 1996. Transplantation biology. Educating effector T cells. *Nature* 380:284-285.
3. Granja, C.B., M. Salazar, and E.J. Yunis. 1996. Population genetics and human leucocyte antigen polymorphism, in *Transplantation Biology*, N.L. Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 311-326 pp.
4. VanBuskirk, A.M., D.J. Pidwell, P.W. Adams, and C.G. Orosz. 1997. Transplantation immunology. *Jama* 278:1993-1999.
5. Kupiec-Weglinski, J.W., and W.W. Hancock. 1996. Hyperacute and accelerated allograft rejection, in *Transplantation Biology*, N.L. Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 541-556 pp.
6. Orloff, M.S., E.M. DeMara, M.L. Coppage, N. Leong, M.A. Fallon, J. Sickel, X.J. Zuo, J. Prehn, and S.C. Jordan. 1995. Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction. *Transplantation* 59:282-288.
7. Lowry, R.P. 1996. DTH-induced injury, in *Transplantation Biology*, N.L. Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 487-502 pp.
8. Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104-106.
9. Valitutti, S., S. Muller, M. Dessing, and A. Lanzavecchia. 1996. Signal extinction and T cell repolarization in T helper cell-antigen-presenting cell conjugates. *Eur J Immunol* 26:2012-2016.
10. Gould, D.S., and H. Auchincloss, Jr. 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 20:77-82.
11. Sayegh, M.H., and L.A. Turka. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338:1813-1821.
12. Perez, V.L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X.X. Zheng, T.B. Strom, and A.K. Abbas. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6:411-417.
13. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258.
14. Rosenberg, A.S., and A. Singer. 1992. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol* 10:333-358.
15. Krieger, N.R., D.P. Yin, and C.G. Fathman. 1996. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. *J Exp Med* 184:2013-2018.
16. Schachter, A.D., L. Vasconcellos, V. Ophascharoensuk, X.X. Zheng, J. Strehlau, and T.B. Strom. 1998. CTL effector mechanisms: diagnostic applications. *Transplant Proc* 30:2344-2346.
17. Moon, J.J., and B.H. Nelson. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase potentiates, but does not trigger, T cell proliferation mediated by the IL-2 receptor. *J Immunol* 167:2714-2723.
18. Gollob, J.A., C.P. Schnipper, E.A. Murphy, J. Ritz, and D.A. Frank. 1999. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation. *J Immunol* 162:4472-4481.
19. Hodge, D.L., A. Martinez, J.G. Julias, L.S. Taylor, and H.A. Young. 2002. Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Mol Cell Biol* 22:1742-1753.

20. Yu, T.K., E.G. Caudell, C. Smid, and E.A. Grimm. 2000. IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *J Immunol* 164:6244-6251.
21. Malek, T.R., A. Yu, P. Scibelli, M.G. Lichtenheld, and E.K. Codias. 2001. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol* 166:1675-1683.
22. Steimle, V., C.A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-109.
23. Wenner, C.A., M.L. Guler, S.E. Macatonia, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1996. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 156:1442-1447.
24. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft. 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 157:1350-1358.
25. Collart, M.A., D. Belin, J.D. Vassalli, S. de Kossodo, and P. Vassalli. 1986. Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 164:2113-2118.
26. Ucla, C., P. Roux-Lombard, S. Fey, J.M. Dayer, and B. Mach. 1990. Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. *J Clin Invest* 85:185-191.
27. Nagano, H., R.N. Mitchell, M.K. Taylor, S. Hasegawa, N.L. Tilney, and P. Libby. 1997. Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest* 100:550-557.
28. Cohen, P. 1982. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296:613-620.
29. Cohen, P. 1999. The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 3:459-465.
30. Cohen, P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25:596-601.
31. Campbell, P.M., and P.F. Halloran. 1996. T cell activation, in *Transplantation Biology*, N.L. Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. Lippincott-Raven, New York. 411-434 pp.
32. Schaeffer, H.J., and M.J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19:2435-2444.
33. Han, J., and R.J. Ulevitch. 1999. Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat Cell Biol* 1:E39-40.
34. Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-252.
35. Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
36. Whitehurst, C.E., and T.D. Geppert. 1996. MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J Immunol* 156:1020-1029.
37. Dong, C., D.D. Yang, M. Wusk, A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 1998. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282:2092-2095.
38. Weiss, L., A.J. Whitmarsh, D.D. Yang, M. Rincon, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 2000. Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. *J Exp Med* 191:139-146.
39. Rivas, F.V., S. O'Herrin, and T.F. Gajewski. 2001. CD28 is not required for c-Jun N-terminal kinase activation in T cells. *J Immunol* 167:3123-3128.

40. Rincon, M., H. Enslin, J. Raingeaud, M. Recht, T. Zapton, M.S. Su, L.A. Penix, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 1998. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* 17:2817-2829.
41. Bauer, B., N. Krumbock, N. Ghaffari-Tabrizi, S. Kampfer, A. Villunger, M. Wilda, H. Hameister, G. Utermann, M. Leitges, F. Uberall, and G. Baier. 2000. T cell expressed PKC $\theta$  demonstrates cell-type selective function. *Eur J Immunol* 30:3645-3654.
42. Arendt, C.W., B. Albrecht, T.J. Soos, and D.R. Littman. 2002. Protein kinase C- $\theta$ ; signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol* 14:323-330.
43. Gilmour, K.C., and N.C. Reich. 1994. Receptor to nucleus signaling by prolactin and interleukin 2 via activation of latent DNA-binding factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6850-6854.
44. Frank, D.A., M.J. Robertson, A. Bonni, J. Ritz, and M.E. Greenberg. 1995. Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7779-7783.
45. Ravichandran, K.S., and S.J. Burakoff. 1994. The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation. *J Biol Chem* 269:1599-1602.
46. Nourse, J., E. Firpo, W.M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M.H. Lee, J. Massague, G.R. Crabtree, and J.M. Roberts. 1994. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372:570-573.
47. Witzke, O., J.A. Barbara, and K.J. Wood. 1999. Induction of tolerance to alloantigen. *Rev Immunogenet* 1:374-386.
48. Wekerle, T., M.H. Sayegh, J. Hill, Y. Zhao, A. Chandraker, K.G. Swenson, G. Zhao, and M. Sykes. 1998. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J Exp Med* 187:2037-2044.
49. Wekerle, T., M.H. Sayegh, A. Chandraker, K.G. Swenson, Y. Zhao, and M. Sykes. 1999. Role of peripheral clonal deletion in tolerance induction with bone marrow transplantation and costimulatory blockade. *Transplant Proc* 31:680.
50. Gudmundsdottir, H., and L.A. Turka. 2000. Transplantation tolerance: mechanisms and strategies? *Semin Nephrol* 20:209-216.
51. Knechtle, S.J., M.M. Hamawy, H. Hu, J.H. Fechner, Jr., and C.S. Cho. 2001. Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol Rev* 183:205-213.
52. Hale, G., and H. Waldmann. 1994. Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 13:597-611.
53. Novitzky, N., V. Thomas, G. Hale, and H. Waldmann. 1999. Ex vivo depletion of T cells from bone marrow grafts with CAMPATH-1 in acute leukemia: graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Transplantation* 67:620-626.
54. Shevach, E.M., R.S. McHugh, C.A. Piccirillo, and A.M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol Rev* 182:58-67.
55. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
56. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
57. Qin, S., S.P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies, and H. Waldmann. 1993. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259:974-977.

58. Onodera, K., A. Chandraker, H.D. Volk, M. Lehmann, S. Korom, T.H. Stadlbauer, K. Kato, S. Kasai, M.H. Sayegh, and J.W. Kupiec-Weglinski. 1998. Role of regulatory T cells in the "infectious" tolerance pathway in transplant recipients. *Transplant Proc* 30:13-15.
59. Cobbold, S., and H. Waldmann. 1998. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 10:518-524.
60. Allen, J.E., and R.M. Maizels. 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 18:387-392.
61. Chen, N., Q. Gao, and E.H. Field. 1996. Prevention of Th1 response is critical for tolerance. *Transplantation* 61:1076-1083.
62. Onodera, K., W.W. Hancock, E. Graser, M. Lehmann, M.H. Sayegh, T.B. Strom, H.D. Volk, and J.W. Kupiec-Weglinski. 1997. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J Immunol* 158:1572-1581.
63. Maeda, H., M. Takata, S. Takahashi, S. Ogoshi, and S. Fujimoto. 1994. Adoptive transfer of a Th2-like cell line prolongs MHC class II antigen disparate skin allograft survival in the mouse. *Int Immunol* 6:855-862.
64. Sayegh, M.H., E. Akalin, W.W. Hancock, M.E. Russell, C.B. Carpenter, P.S. Linsley, and L.A. Turka. 1995. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 181:1869-1874.
65. Jenkins, M.K., C.A. Chen, G. Jung, D.L. Mueller, and R.H. Schwartz. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol* 144:16-22.
66. Schwartz, R.H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9:351-357.
67. Alam, S.M., P.J. Travers, J.L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S.C. Jameson, and N.R. Gascoigne. 1996. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381:616-620.
68. Jenkins, M.K. 1992. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol Today* 13:69-73.
69. Powell, J.D., D. Bruniquel, and R.H. Schwartz. 2001. TCR engagement in the absence of cell cycle progression leads to T cell anergy independent of p27(Kip1). *Eur J Immunol* 31:3737-3746.
70. Wekerle, T., J. Kurtz, H. Ito, J.V. Ronquillo, V. Dong, G. Zhao, J. Shaffer, M.H. Sayegh, and M. Sykes. 2000. Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 6:464-469.
71. Benjamin, R.J., and H. Waldmann. 1986. Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 320:449-451.
72. Gutstein, N.L., W.E. Seaman, J.H. Scott, and D. Wofsy. 1986. Induction of immune tolerance by administration of monoclonal antibody to L3T4. *J Immunol* 137:1127-1132.
73. Qin, S., S. Cobbold, H. Tighe, R. Benjamin, and H. Waldmann. 1987. CD4 monoclonal antibody pairs for immunosuppression and tolerance induction. *Eur J Immunol* 17:1159-1165.
74. Qin, S.X., M. Wise, S.P. Cobbold, L. Leong, Y.C. Kong, J.R. Parnes, and H. Waldmann. 1990. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 20:2737-2745.
75. Volk, H.D., A. Siegling, C. Platzer, J. Brock, F. Emmrich, and M. Lehmann. 1994. Tolerance induction by anti-CD4 MAb treatment in a rat kidney transplantation model. *Transplant Proc* 26:3155-3156.
76. Motoyama, K., T. Arima, M. Lehmann, and M.W. Flye. 1997. Tolerance to heart and kidney grafts induced by nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (RIB 5/2) versus

- depleting anti-CD4 monoclonal antibody (OX-38) with donor antigen administration. *Surgery* 122:213-219; discussion 219-220.
77. Lehmann, M., B. Kuttler, A. Siegling, A. Gordalla, H. Riedel, J. Lacha, H.J. Hahn, J. Brock, and H.D. Volk. 1993. Characterization of the anti-CD4-induced permanent acceptance of rat renal allografts. *Transplant Proc* 25:2859-2860.
  78. Chong, A.S., L. Ma, D. Yin, J. Shen, L. Blinder, X. XiuLong, J. Williams, G. Byrne, L. Diamond, and J. Logan. 2000. Nondepleting anti-CD4 but not anti-CD8 antibody induces long-term survival of xenogeneic and allogeneic hearts in alpha1, 3-galactosyl-transferase knock-out mice. *Transplant Proc* 32:1005.
  79. Guo, Z., T. Wu, N. Kirchhof, D. Mital, J.W. Williams, M. Azuma, D.E. Sutherland, and B.J. Hering. 2001. Immunotherapy with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies but not CD28 antagonists protects islet graft in spontaneously diabetic nod mice from autoimmune destruction and allogeneic and xenogeneic graft rejection. *Transplantation* 71:1656-1665.
  80. Perico, N., S. Amuchastegui, M. Bontempelli, and G. Remuzzi. 1996. CTLA4Ig alone or in combination with low-dose cyclosporine fails to reverse acute rejection of renal allograft in the rat. *Transplantation* 61:1320-1322.
  81. Kurlberg, G., E. Haglind, K. Schon, H. Tornqvist, and N. Lycke. 2000. Blockade of the B7-CD28 pathway by CTLA4-Ig counteracts rejection and prolongs survival in small bowel transplantation. *Scand J Immunol* 51:224-230.
  82. Pearson, T.C., D.Z. Alexander, K.J. Winn, P.S. Linsley, R.P. Lowry, and C.P. Larsen. 1994. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 57:1701-1706.
  83. Graser, E., K. Risch, P.S. Linsley, W.W. Hancock, A. Muller, J. Brock, P. Reinke, J.W. Kupiec-Weglinski, H.D. Volk, and M. Lehmann. 1997. Synergism of CTLA4-IG and anti-CD4 monoclonal antibody treatment in a rat kidney transplant model. *Transplant Proc* 29:1307-1309.
  84. Najafian, N., and M.H. Sayegh. 2000. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent. *Expert Opin Investig Drugs* 9:2147-2157.
  85. Li, Y., X.C. Li, X.X. Zheng, A.D. Wells, L.A. Turka, and T.B. Strom. 1999. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 5:1298-1302.
  86. Kirk, A.D., L.C. Burkly, D.S. Batty, R.E. Baumgartner, J.D. Berning, K. Buchanan, J.H. Fechner, Jr., R.L. Germond, R.L. Kampen, N.B. Patterson, S.J. Swanson, D.K. Tadaki, C.N. TenHoor, L. White, S.J. Knechtle, and D.M. Harlan. 1999. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 5:686-693.
  87. Elster, E.A., H. Xu, D.K. Tadaki, S. Montgomery, L.C. Burkly, J.D. Berning, R.E. Baumgartner, F. Cruzata, R. Marx, D.M. Harlan, and A.D. Kirk. 2001. Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 72:1473-1478.
  88. Yamada, and M.H. Sayegh. 2002. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. *Transplantation* 73:S36-39.
  89. Fehervari, Z., A. Cooke, S. Brett, and J. Turner. 2002. Perturbation of naive TCR transgenic T cell functional responses and upstream activation events by anti-CD4 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 32:333-340.
  90. Harding, S., P. Lipp, and D.R. Alexander. 2002. A therapeutic CD4 monoclonal antibody inhibits TCR-zeta chain phosphorylation, zeta-associated protein of 70-kDa Tyr319 phosphorylation, and TCR internalization in primary human T cells. *J Immunol* 169:230-238.
  91. Madrenas, J., R.H. Schwartz, and R.N. Germain. 1996. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls

- anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9736-9741.
92. Williams, T.M., D. Moolten, J. Burlein, J. Romano, R. Bhaerman, A. Godillot, M. Mellon, F.J. Rauscher, 3rd, and J.A. Kant. 1991. Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254:1791-1794.
  93. Kitayama, H., Y. Sugimoto, T. Matsuzaki, Y. Ikawa, and M. Noda. 1989. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84.
  94. Migita, K., K. Eguchi, Y. Kawabe, T. Tsukada, Y. Ichinose, S. Nagataki, and A. Ochi. 1995. Defective TCR-mediated signaling in anergic T cells. *J Immunol* 155:5083-5087.
  95. Sloan-Lancaster, J., A.S. Shaw, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913-922.
  96. Li, W., C.D. Whaley, A. Mondino, and D.L. Mueller. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271:1272-1276.
  97. Fields, P.E., T.F. Gajewski, and F.W. Fitch. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271:1276-1278.
  98. Kang, S.M., B. Beverly, A.C. Tran, K. Brorson, R.H. Schwartz, and M.J. Lenardo. 1992. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257:1134-1138.
  99. Mondino, A., C.D. Whaley, D.R. DeSilva, W. Li, M.K. Jenkins, and D.L. Mueller. 1996. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells. *J Immunol* 157:2048-2057.
  100. Boussiotis, V.A., G.J. Freeman, P.A. Taylor, A. Berezovskaya, I. Grass, B.R. Blazar, and L.M. Nadler. 2000. p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nat Med* 6:290-297.
  101. Tamma, S.M., N. Chirmule, T.W. McCloskey, N. Oyaizu, V.S. Kalyanaraman, and S. Pahwa. 1997. Signals transduced through the CD4 molecule interfere with TCR/CD3-mediated ras activation leading to T cell anergy/apoptosis. *Clin Immunol Immunopathol* 85:195-201.
  102. Tamma, S.M., N. Chirmule, H. Yagura, N. Oyaizu, V. Kalyanaraman, and S. Pahwa. 1997. CD4 cross-linking (CD4XL) induces RAS activation and tumor necrosis factor-alpha secretion in CD4+ T cells. *Blood* 90:1588-1593.
  103. Chirmule, N., A. Avots, S.M. LakshmiTamma, S. Pahwa, and E. Serfling. 1999. CD4-mediated signals induce T cell dysfunction in vivo. *J Immunol* 163:644-649.
  104. Lehmann, M., E. Graser, K. Risch, W.W. Hancock, A. Muller, B. Kuttler, H.J. Hahn, J.W. Kupiec-Weglinski, J. Brock, and H.D. Volk. 1997. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation* 64:1181-1187.
  105. Lehmann, M., K. Risch, H. Nizze, G. Brandenburg, T. Ritter, J. Brock, and H.D. Volk. 1999. Abolition of anti-CD4-induced allotransplantation tolerance by exogenous IL-2. *Transplant Proc* 31:1220-1221.
  106. Scully, R., S. Qin, S. Cobbold, and H. Waldmann. 1994. Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 24:2383-2392.
  107. Sawitzki, B., M. Lehmann, K. Vogt, K. Risch, J. Brock, J.W. Kupiec-Weglinski, and H.D. Volk. 2002. Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb treated allo-activated T cells confers resistance to apoptosis. *Eur J Immunol* 32:800-809.
  108. Sawitzki, B., M. Lehmann, K. Vogt, M. Seifert, K. Risch, J. Brock, J.W. Kupiec-Weglinski, and H.D. Volk. 2002. Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb-treated allo-activated T cell confers resistance to activation-induced cell death (AICD). *Transpl*

- Immunol* 9:83-91.
109. Beissinger, M., and J. Buchner. 1998. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 379:245-259.
  110. Pratt, W.B., and D.O. Toft. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
  111. Johnson, J.L., T.G. Beito, C.J. Krco, and D.O. Toft. 1994. Characterization of a novel 23-kilodalton protein of inactive progesterone receptor complexes. *Mol Cell Biol* 14:1956-1963.
  112. Hutchison, K.A., L.F. Stancato, J.K. Owens-Grillo, J.L. Johnson, P. Krishna, D.O. Toft, and W.B. Pratt. 1995. The 23-kDa acidic protein in reticulocyte lysate is the weakly bound component of the hsp foldosome that is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with hsp90. *J Biol Chem* 270:18841-18847.
  113. Dittmar, K.D., D.R. Demady, L.F. Stancato, P. Krishna, and W.B. Pratt. 1997. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem* 272:21213-21220.
  114. Freeman, B.C., S.J. Felts, D.O. Toft, and K.R. Yamamoto. 2000. The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev* 14:422-434.
  115. Kosano, H., B. Stensgard, M.C. Charlesworth, N. McMahon, and D. Toft. 1998. The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem* 273:32973-32979.
  116. Sullivan, W., B. Stensgard, G. Caucutt, B. Bartha, N. McMahon, E.S. Alnemri, G. Litwack, and D. Toft. 1997. Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem* 272:8007-8012.
  117. Freeman, B.C., D.O. Toft, and R.I. Morimoto. 1996. Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* 274:1718-1720.
  118. Bose, S., T. Weikl, H. Bugl, and J. Buchner. 1996. Chaperone function of Hsp90-associated proteins [see comments]. *Science* 274:1715-1717.
  119. Fang, Y., A.E. Fliss, J. Rao, and A.J. Caplan. 1998. SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol Cell Biol* 18:3727-3734.
  120. Bohen, S.P. 1998. Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamycin antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins. *Mol Cell Biol* 18:3330-3339.
  121. Knoblauch, R., and M.J. Garabedian. 1999. Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol* 19:3748-3759.
  122. McLaughlin, S.H., H.W. Smith, and S.E. Jackson. 2002. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J Mol Biol* 315:787-798.
  123. Freeman, B.C., and K.R. Yamamoto. 2002. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296:2232-2235.
  124. Forsythe, H.L., J.L. Jarvis, J.W. Turner, L.W. Elmore, and S.E. Holt. 2001. Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem* 276:15571-15574.
  125. Akalin, A., L.W. Elmore, H.L. Forsythe, B.A. Amaker, E.D. McCollum, P.S. Nelson, J.L. Ware, and S.E. Holt. 2001. A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression. *Cancer Res* 61:4791-4796.
  126. Weng, N., B.L. Levine, C.H. June, and R.J. Hodes. 1997. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol* 158:3215-3220.
  127. Pratt, W.B. 1997. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by

- nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:297-326.
128. Pratt, W.B. 1998. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:420-434.
  129. Hartson, S.D., D.J. Barrett, P. Burn, and R.L. Matts. 1996. Hsp90-mediated folding of the lymphoid cell kinase p56lck. *Biochemistry* 35:13451-13459.
  130. Schulte, T.W., M.V. Blagosklonny, C. Ingui, and L. Neckers. 1995. Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 270:24585-24588.
  131. Schulte, T.W., M.V. Blagosklonny, L. Romanova, J.F. Mushinski, B.P. Monia, J.F. Johnston, P. Nguyen, J. Trepel, and L.M. Neckers. 1996. Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Mol Cell Biol* 16:5839-5845.
  132. Helmbrecht, K., E. Zeise, and L. Rensing. 2000. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33:341-365.
  133. Donze, O., T. Abbas-Terki, and D. Picard. 2001. The Hsp90 chaperone complex is both a facilitator and a repressor of the dsRNA-dependent kinase PKR. *Embo J* 20:3771-3780.
  134. Xu, Z., J.K. Pal, V. Thulasiraman, H.P. Hahn, J.J. Chen, and R.L. Matts. 1997. The role of the 90-kDa heat-shock protein and its associated cohorts in stabilizing the heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase in reticulocyte lysates during heat stress. *Eur J Biochem* 246:461-470.
  135. Fujita, N., S. Sato, A. Ishida, and T. Tsuruo. 2002. Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem* 277:10346-10353.
  136. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo. 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10832-10837.
  137. Pelech, S.L., and D.L. Charest. 1995. MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1:33-52.
  138. Wartmann, M., and R.J. Davis. 1994. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* 269:6695-6701.
  139. Schulte, T.W., W.G. An, and L.M. Neckers. 1997. Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 239:655-659.
  140. Stancato, L.F., A.M. Silverstein, J.K. Owens-Grillo, Y.H. Chow, R. Jove, and W.B. Pratt. 1997. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* 272:4013-4020.
  141. Scheibel, T., T. Weikl, and J. Buchner. 1998. Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1495-1499.
  142. Schnaider, T., J. Somogyi, P. Csermely, and M. Szamel. 1998. The Hsp90-specific inhibitor, geldanamycin, blocks CD28-mediated activation of human T lymphocytes. *Life Sci* 63:949-954.
  143. Yorgin, P.D., S.D. Hartson, A.M. Fella, B.T. Scroggins, W. Huang, E. Katsanis, J.M. Couchman, R.L. Matts, and L. Whitesell. 2000. Effects of geldanamycin, a heat-shock protein 90-binding agent, on T cell function and T cell nonreceptor protein tyrosine kinases. *J Immunol* 164:2915-2923.
  144. Schnaider, T., J. Somogyi, P. Csermely, and M. Szamel. 2000. The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation. *Cell Stress Chaperones* 5:52-61.
  145. Holt, S.E., D.L. Aisner, J. Baur, V.M. Tesmer, M. Dy, M. Ouellette, J.B. Trager, G.B. Morin, D.O. Toft, J.W. Shay, W.E. Wright, and M.A. White. 1999. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 13:817-826.

146. Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
147. Pines, J. 1995. Cell cycle. Confirmational change. *Nature* 376:294-295.
148. Stepanova, L., X. Leng, S.B. Parker, and J.W. Harper. 1996. Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 10:1491-1502.
149. Aligue, R., H. Akhavan-Niak, and P. Russell. 1994. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *Embo J* 13:6099-6106.
150. Munoz, M.J., and J. Jimenez. 1999. Genetic interactions between Hsp90 and the Cdc2 mitotic machinery in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 261:242-250.
151. Blagosklonny, M.V., J. Toretsky, S. Bohen, and L. Neckers. 1996. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8379-8383.
152. Whitesell, L., P.D. Sutphin, E.J. Pulcini, J.D. Martinez, and P.H. Cook. 1998. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* 18:1517-1524.
153. Firpo, E.J., A. Koff, M.J. Solomon, and J.M. Roberts. 1994. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 14:4889-4901.
154. Kovalev, G.I., D.S. Franklin, V.M. Coffield, Y. Xiong, and L. Su. 2001. An important role of CDK inhibitor p18(INK4c) in modulating antigen receptor-mediated T cell proliferation. *J Immunol* 167:3285-3292.
155. Goff, S.P. 1992. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet* 26:527-544.
156. Montagne, J., M.J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S.C. Kozma, and G. Thomas. 1999. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285:2126-2129.
157. Brennan, P., J.W. Babbage, G. Thomas, and D. Cantrell. 1999. p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 19:4729-4738.
158. Lafont, V., E. Astoul, A. Laurence, J. Liautard, and D. Cantrell. 2000. The T cell antigen receptor activates phosphatidylinositol 3-kinase-regulated serine kinases protein kinase B and ribosomal S6 kinase 1. *FEBS Lett* 486:38-42.
159. Ferris, D.K., A. Harel-Bellan, R.I. Morimoto, W.J. Welch, and W.L. Farrar. 1988. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3850-3854.
160. Faassen, A.E., J.J. O'Leary, K.J. Rodysill, N. Bergh, and H.M. Hallgren. 1989. Diminished heat-shock protein synthesis following mitogen stimulation of lymphocytes from aged donors. *Exp Cell Res* 183:326-334.
161. Wu, B.J., and R.I. Morimoto. 1985. Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6070-6074.
162. Hensold, J.O., and D.E. Housman. 1988. Decreased expression of the stress protein HSP70 is an early event in murine erythroleukemic cell differentiation. *Mol Cell Biol* 8:2219-2223.
163. Helmbrecht, K., and L. Rensing. 1999. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochem Res* 24:1293-1299.
164. Hansen, L.K., J.P. Houchins, and J.J. O'Leary. 1991. Differential regulation of HSC70, HSP70, HSP90 alpha, and HSP90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp Cell Res* 192:587-596.
165. Pieper, M., H.D. Rupprecht, K.M. Bruch, E. De Heer, and H.O. Schocklmann. 2000. Requirement of heat shock protein 90 in mesangial cell mitogenesis. *Kidney Int* 58:2377-2389.

166. Becker, J., and E.A. Craig. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219:11-23.
167. Hartl, F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579.
168. Sullivan, W.P., B.A. Owen, and D.O. Toft. 2002. The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. *J Biol Chem* 24:24.
169. Valitutti, S., and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today* 18:299-304.
170. Hussain, S.F., C.F. Anderson, and D.L. Farber. 2002. Differential SLP-76 expression and TCR-mediated signaling in effector and memory CD4 T cells. *J Immunol* 168:1557-1565.
171. Richter, A., M. Lohning, and A. Radbruch. 1999. Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. *J Exp Med* 190:1439-1450.
172. Gett, A.V., and P.D. Hodgkin. 1998. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9488-9493.
173. Jerome, V., C. Vourc'h, E.E. Baulieu, and M.G. Catelli. 1993. Cell cycle regulation of the chicken hsp90 alpha expression. *Exp Cell Res* 205:44-51.
174. Namen, A.E., S. Lupton, K. Hjerrild, J. Wignall, D.Y. Mochizuki, A. Schmierer, B. Mosley, C.J. March, D. Urdal, and S. Gillis. 1988. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333:571-573.
175. Goodwin, R.G., D. Friend, S.F. Ziegler, R. Jerzy, B.A. Falk, S. Gimpel, D. Cosman, S.K. Dower, C.J. March, A.E. Namen, and et al. 1990. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60:941-951.
176. Van Snick, J., A. Goethals, J.C. Renaud, E. Van Roost, C. Uyttenhove, M.R. Rubira, R.L. Moritz, and R.J. Simpson. 1989. Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med* 169:363-368.
177. Paul, W.E. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77:1859-1870.
178. Grabstein, K.H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M.A. Schoenborn, M. Ahdieh, and et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965-968.
179. Burton, J.D., R.N. Bamford, C. Peters, A.J. Grant, G. Kurys, C.K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T.A. Waldmann. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4935-4939.
180. Tagaya, Y., R.N. Bamford, A.P. DeFilippis, and T.A. Waldmann. 1996. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 4:329-336.
181. Giri, J.G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L.S. Park, D. Cosman, and D. Anderson. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13:2822-2830.
182. Bamford, R.N., A.J. Grant, J.D. Burton, C. Peters, G. Kurys, C.K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T.A. Waldmann. 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.
183. Waldmann, T.A., S. Dubois, and Y. Tagaya. 2001. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 14:105-110.
184. Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma.

1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
185. Nakamura, Y., S.M. Russell, S.A. Mess, M. Friedmann, M. Erdos, C. Francois, Y. Jacques, S. Adelstein, and W.J. Leonard. 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 369:330-333.
186. Nelson, B.H., J.D. Lord, and P.D. Greenberg. 1994. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 369:333-336.
187. Anderson, D.M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, and et al. 1995. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 270:29862-29869.
188. Giri, J.G., D.M. Anderson, S. Kumaki, L.S. Park, K.H. Grabstein, and D. Cosman. 1995. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol* 57:763-766.
189. Lin, J.X., and W.J. Leonard. 1997. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:313-332.
190. Imada, K., and W.J. Leonard. 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37:1-11.
191. Bulanova, E., V. Budagian, T. Pohl, H. Krause, H. Durkop, R. Paus, and S. Bulfone-Paus. 2001. The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J Immunol* 167:6292-6302.
192. Razi-Wolf, Z., G.A. Hollander, and H. Reiser. 1996. Activation of CD4+ T lymphocytes from interleukin 2-deficient mice by costimulatory B7 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2903-2908.
193. Boulougouris, G., J.D. McLeod, Y.I. Patel, C.N. Ellwood, L.S. Walker, and D.M. Sansom. 1999. IL-2-independent activation and proliferation in human T cells induced by CD28. *J Immunol* 163:1809-1816.
194. Pardee, A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
195. Meyuhas, O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267:6321-6330.
196. Hidalgo, M., and E.K. Rowinsky. 2000. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 19:6680-6686.
197. Perdew, G.H., H. Wiegand, J.P. Vanden Heuvel, C. Mitchell, and S.S. Singh. 1997. A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* 36:3600-3607.
198. Peter, M. 1997. The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Prog Cell Cycle Res* 3:99-108.
199. Munoz, M.J., E.R. Bejarano, R.R. Daga, and J. Jimenez. 1999. The identification of Wos2, a p23 homologue that interacts with Wee1 and Cdc2 in the mitotic control of fission yeasts. *Genetics* 153:1561-1572.
200. Nair, S.C., E.J. Toran, R.A. Rimerman, S. Hjermstad, T.E. Smithgall, and D.F. Smith. 1996. A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones* 1:237-250.
201. Galea-Lauri, J., D.S. Latchman, and D.R. Katz. 1996. The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. *Exp Cell Res* 226:243-254.
202. Caplen, N.J. 2002. A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol* 20:49-51.
203. Portoles, P., G. de Ojeda, G. Criado, E. Fernandez-Centeno, and J.M. Rojo. 1999.

- Antibody-induced CD3-CD4 coligation inhibits TCR/CD3 activation in the absence of costimulatory signals in normal mouse CD4(+) T lymphocytes. *Cell Immunol* 195:96-109.
204. Stumbles, P., and D. Mason. 1995. Activation of CD4+ T cells in the presence of a nondepleting monoclonal antibody to CD4 induces a Th2-type response in vitro. *J Exp Med* 182:5-13.
205. Niedbala, W., X. Wei, and F.Y. Liew. 2002. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4+ and CD8+ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12 / IL-4 stimulation in vitro. *Eur J Immunol* 32:341-347.
206. Zhang, S., and M.H. Kaplan. 2000. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. PG - 1374-80. *J Immunol* 165:1374-1380.
207. Morley, S.J. 1997. Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells. *FEBS Lett* 418:327-332.
208. Wang, X., A. Flynn, A.J. Waskiewicz, B.L. Webb, R.G. Vries, I.A. Baines, J.A. Cooper, and C.G. Proud. 1998. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 273:9373-9377.
209. Miyamoto, S., S.R. Kimball, and B. Safer. 2000. Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation. *Biochim Biophys Acta* 1494:28-42.
210. Ward, S.G., and D.A. Cantrell. 2001. Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 13:332-338.
211. Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R.G. Jones, A.J. Oliveira-dos-Santos, W.L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T.W. Mak, P.S. Ohashi, A. Suzuki, and J.M. Penninger. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. PG - 1040-6. *Science* 287:1040-1046.
212. Edinger, A.L., and C.B. Thompson. 2002. Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake. PG - 2276-88. *Mol Biol Cell* 13:2276-2288.
213. Shioi, T., J.R. McMullen, P.M. Kang, P.S. Douglas, T. Obata, T.F. Franke, L.C. Cantley, and S. Izumo. 2002. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 22:2799-2809.
214. Jefferies, H.B., S. Fumagalli, P.B. Dennis, C. Reinhard, R.B. Pearson, and G. Thomas. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* 16:3693-3704.
215. Jefferies, H.B., C. Reinhard, S.C. Kozma, and G. Thomas. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. PG - 4441-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-4445.
216. Pedersen, S., J.E. Celis, J. Nielsen, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 1997. Distinct repression of translation by wortmannin and rapamycin. *Eur J Biochem* 247:449-456.
217. Wang, L., X. Wang, and C.G. Proud. 2000. Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps. PG - H1056-68. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1056-1068.
218. Dilling, M.B., G.S. Germain, L. Dudkin, A.L. Jayaraman, X. Zhang, F.C. Harwood, and P.J. Houghton. 2002. 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. PG - 13907-17. *J Biol Chem* 277:13907-13917.
219. Williams, B.R. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120.
220. Takizawa, T., C. Tatematsu, and Y. Nakanishi. 2002. Double-stranded RNA-activated

- protein kinase interacts with apoptosis signal-regulating kinase 1. Implications for apoptosis signaling pathways. *Eur J Biochem* 269:6126-6132.
221. Samuel, C.E., K.L. Kuhen, C.X. George, L.G. Ortega, R. Rende-Fournier, and H. Tanaka. 1997. The PKR protein kinase--an interferon-inducible regulator of cell growth and differentiation. *Int J Hematol* 65:227-237.
222. Gerlitz, G., R. Jagus, and O. Elroy-Stein. 2002. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* 269:2810-2819.
223. Munoz, F., M.E. Martin, J. Manso-Tomico, J. Berlanga, M. Salinas, and J.L. Fando. 2000. Ischemia-induced phosphorylation of initiation factor 2 in differentiated PC12 cells: role for initiation factor 2 phosphatase. PG - 2335-45. *J Neurochem* 75:2335-2345.
224. Brockdorff, J., M. Nielsen, A. Svejgaard, P. Dobson, C. Ropke, C. Geisler, and N. Odum. 1997. Protein phosphatase 2A plays a critical role in interleukin-2-induced beta 2-integrin dependent homotypic adhesion in human CD4+ T cell lines. PG. *Cytokine* 9:333-339.
225. Ben-Asouli, Y., Y. Banai, Y. Pel-Or, A. Shir, and R. Kaempfer. 2002. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. PG. *Cell* 108:221-232.

## VERÖFFENTLICHUNGEN UND PRÄSENTATIONEN

### Veröffentlichungen:

**Sawitzki, B. and Kieselbach, B.; Fisser, M.; Meisel, C.; Vogt, K.; Gaestel, M.; Lehmann, M.; Risch, K.; Grütz, G. and Volk, H.-D.**

Translational control of IFN-gamma in Anti-CD4 mAb induced T cell unresponsiveness.

Journal of the American Society of Nephrology (JASN), eingereicht am 01.06.2002

### Vorträge\* und Posterpräsentationen:

**Kieselbach, B.\*; Grütz, G.; Vogt, K.; Lehmann, M.; Volk, H.-D. and Sawitzki, B.**

Isolation and analysis of the tolerance associated gene x.

"30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie"

Hannover, 29. September – 2. Oktober 1999

**Kieselbach, B.; Grütz, G.; Vogt, K.; Fisser, M.; Volk, H.-D. and Sawitzki, B.**

Regulation of co-chaperones in T cell activation.

"31. Joint Annual Meeting of Immunology of the German and Dutch Societies"

Düsseldorf, 29. November – 2. Dezember 2000

**Kieselbach, B.; Fisser, M.; Vogt, K.; Grütz, G.; Volk, H.-D. and Sawitzki, B.**

IFN- $\gamma$  regulation in anti-CD4 mAb induced transplantation tolerance.

"11<sup>th</sup> European Students Conference at the Charité"

Berlin, November 2000

**Sawitzki, B.; Kieselbach, B.; Fisser, M.; Vogt, K. and H.-D. Volk**

Synergistic effects of neutralising anti-CD25 antibody and Rapamycin on activation of allo-reactive T cells.

"7<sup>th</sup> Basic Sciences Symposium of the Transplantation Society"

Thun, Schweiz, 21.- 26. August 2001

**Kieselbach, B.; Grütz, G.; Vogt, K.; Volk, H.-D. and Sawitzki, B.**

Regulation of the Hsp90-associated chaperone p23 during T cell activation.

"32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie"

Dresden, 26. September – 29. September 2001

**Kieselbach, B.; Fisser, M.; Vogt, K.; Grütz, G.; Volk, H.-D. and Sawitzki, B.**

IFN- $\gamma$  regulation in anti-CD4 mAb induced transplantation tolerance.

"32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie"

Dresden, 26. September – 29. September 2001

## LEBENS LAUF

Name: Kieselbach, Brit  
Geburtsdatum: 13.12.1970  
Geburtsort: Dessau  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Ochtumweg 6, 10407 Berlin  
Eltern: Edeltraud und Werner Kieselbach  
e-mail: brit.kieselbach@macnews.de

**Schul-, Berufs- und Hochschulausbildung:**

1976-1987 "Ernst-Wildangel" Oberschule, Berlin-Mitte  
1987-1989 Berufsausbildung zum FA für Datenverarbeitung  
1989-1994 angestellt bei der Deutschen Bundespost Telekom, Organisations- und Rechenzentrum (1992-1994 Sonderurlaub zwecks Studium)  
1990-1992 Allgemeine Hochschulreife an der VHS Friedrichshain  
1992-1994 Grundstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin  
1994-1998 Hauptstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Abschluss: Diplom-Biologin  
Diplomarbeit: Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité (Leitung: Prof. H.-D. Volk)  
Thema: "Isolierung und Sequenzierung eines neuen toleranz-assoziierten Gens X"

**Promotion:**

seit April 1999 Arbeiten zur Promotion am Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité  
Thema: "Molekulare Effekte der Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper"

**Stipendien:**

Okt. 1998-März 1999 Forschungsstipendium am Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité  
April 2000-März 2001 Promotionsstipendium der Nachwuchsförderung (NaFöG)  
Nov.2001-Jan. 2002 Reisestipendium von Boehringer Ingelheim Fonds  
Medical Research Center, Protein Phosphorylation Unit of the University Dundee, Scotland  
Institute of Biochemistry (Prof. Sir Philip Cohen)

## DANKSAGUNG

Prof. Dr. H.-D. Volk gilt mein großer Dank für die mir gegebene Möglichkeit, diese Dissertation hier am Institut für Medizinische Immunologie anfertigen zu dürfen und für seine Art, Wissenschaft mitreißend zu vermitteln und eine angenehme Institutsatmosphäre zu schaffen.

Meinen ganz besonderen Dank an Dr. Birgit Sawitzki für all die motivierenden und lehrreichen Momente ihrer wissenschaftlichen Betreuung, die immer wieder neue Anregungen gaben.

Auch bei Dr. Gerald Grütz möchte ich mich ganz herzlich bedanken, da er mit Geduld und vielen hilfreichen Diskussionen meine Betreuung mitübernahm, um diese Arbeit voranzutreiben.

Vielen, vielen Dank allen Mitarbeitern dieses Institutes für die freundliche, persönliche und vor allem immer hilfsbereite Art. Mein besonderes Dankeschön gilt Katrin Vogt für ihre hervorragende fachliche Unterstützung, ebenso Dr. Thomas Ritter und Markus Hammer und meinen Dank auch an Elke Effenberger, Heinz Tanzmann und Dr. Martina Seiffert für alles.

Christine möchte ich von ganzem Herzen für die lange schöne Zeit unseres gemeinsamen Studienweges danken und für ihre allseits hilfsbereite Art, nicht nur im Labor.

Vielen Dank Conny, Marion, Nina, Schütli, Martina und Melly für die schöne Zeit am Institut.

Meiner Familie danke ich für die jahrelange Unterstützung, die letztendlich zu dieser Arbeit führte.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation "Molekulare Effekte der Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper" selbständig und ohne unerlaubte Hilfe von mir angefertigt wurde und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin, November 2002

Brit Kieselbach