



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7202

**Das Chemokin SDF-1 α
interferiert mit der
IL-2-induzierten
T-Zell-Proliferation –
Beschreibung eines neuen
regulatorischen Mechanismus**

M. J. Cramer

Institut für Toxikologie und Genetik

Februar 2006

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7202

**Das Chemokin SDF-1 α interferiert mit der
IL-2-induzierten T-Zell-Proliferation –
Beschreibung eines neuen
regulatorischen Mechanismus**

Manuela J. Cramer

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2006

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072028

Das Chemokin SDF-1 α interferiert mit der IL-2-induzierten T-Zell-Proliferation – Beschreibung eines neuen regulatorischen Mechanismus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Manuela J. Cramer
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta
Referent: Prof. Dr. Andrew Cato
Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller
Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2005

Zusammenfassung

Die Homöostase der Lymphozyten ist für eine effektive Immunantwort sehr wichtig. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Überleben und Apoptose wird durch verschiedene extrazelluläre Signale wie Cytokine und Chemokine sichergestellt. In dieser Doktorarbeit wird ein neuer Mechanismus beschrieben, der die T-Zell-Proliferation reguliert. Dieser Mechanismus wird durch das ubiquitär exprimierte Chemokin SDF-1 α induziert, dem zirkulierende T-Zellen permanent ausgesetzt sind. Ich konnte zeigen, dass die Vorbehandlung primärer humaner T-Zellen mit SDF-1 α die IL-2-induzierte T-Zell-Proliferation sowie die Aktivierung von ERK und MEK reduziert. Das Ziel der weiteren Experimente war die Charakterisierung des zugrunde liegenden Mechanismus. Durch Verwendung RhoA-spezifischer siRNA habe ich gezeigt, dass die kleine GTPase RhoA die SDF-1 α -induzierte Reduktion der Proliferation vermittelt. Dementsprechend führt die Aktivierung des endogenen RhoA ebenso wie die transiente Transfektion einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante zur Inhibierung der IL-2- und TPA-induzierten ERK- und MEK-Aktivierung. In weiterführenden Experimenten wurde die Ras-induzierte Raf-Aktivierung als die direkt durch RhoA betroffene Signalkomponente des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs identifiziert. Aktives RhoA interferiert mit der Phosphorylierung des Raf-S338 durch Hemmung des Rac-PAK Signalwegs, der diese Phosphorylierung vermittelt. Die Expression einer konstitutiv aktiven Rac-Mutante verhindert sowohl die RhoA- als auch die SDF-1 α -vermittelte Hemmung der TPA-induzierten MEK-Aktivierung. Diese Ergebnisse belegen, dass SDF-1 α durch die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA mit der Rac-PAK Signaltransduktion, und dadurch mit der Raf-S338 Phosphorylierung, interferiert und auf diese Weise die Aktivierungsschwelle der Proliferation-induzierenden Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade erhöht. Weiterhin konnte ich zeigen, dass die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation unter den gleichen experimentellen Bedingungen nicht durch SDF-1 α gehemmt wird. Dies lässt vermuten, dass die Signaltransduktion durch den T-Zell-Rezeptor einen Mechanismus induziert, der das inhibitorische Signal von SDF-1 α ausschaltet. Außerdem interferiert der pathologische CXCR4-Ligand, das HIV-Glykoprotein gp120, mit der TPA-induzierten MEK-Aktivierung, wie zuvor für SDF-1 α gezeigt. Die weitere Untersuchung dieser Beobachtung könnte zum Verständnis der Funktion von gp120 bei der Pathogenese von HIV beitragen.

Abstract

The chemokine SDF-1 α interferes with IL-2-induced T cell proliferation – Characterization of a novel regulatory mechanism

Maintenance of lymphocyte homeostasis is essential for an effective immune response. The balance between cellular proliferation, cellular survival and apoptosis is ensured by a diversity of extracellular signals including cytokines and chemokines. In this PhD thesis, a novel regulatory mechanism for T cell proliferation is described, that is mediated by the ubiquitously expressed chemokine SDF-1 α , to which circulating T cells are permanently exposed. I observed that pretreatment of primary human T cells with SDF-1 α reduces T cell proliferation as well as ERK and MEK activation in response to IL-2. Further experiments were conducted to characterize the underlying mechanism of the SDF-1 α effect in T cell proliferation. Using RhoA-specific siRNA I showed that the small GTPase RhoA is required for the SDF-1 α mediated reduction of proliferation. Accordingly, activation of endogenous RhoA as well as transient transfection of a constitutive active RhoA results in downregulation of IL-2- and TPA-induced activation of ERK and MEK. Ras-induced Raf activation was identified as the signaling component of the Ras-Raf-MEK-ERK cascade which is directly targeted by active RhoA. Active RhoA interferes with phosphorylation of Raf-S338 by downregulating Rac-PAK signaling, which mediates this phosphorylation. Constitutive active Rac prevents RhoA- as well as SDF-1 α -mediated inhibition of TPA-induced MEK activation. These results show that SDF-1 α , via activation of the small GTPase RhoA, interferes with Rac-PAK signaling preventing phosphorylation of Raf-S338 and in this way elevates the threshold for activation of the Ras-Raf-MEK-ERK cascade and consequently for proliferation in T cells. In addition, I showed that under the same experimental conditions, T cell receptor induced proliferation is not inhibited by SDF-1 α suggesting that T cell receptor signaling involves a mechanism to switch off the inhibitory signal mediated by SDF-1 α and RhoA. Moreover the pathological ligand for CXCR4, the HIV-glycoprotein gp120, interferes with TPA-induced MEK activation as shown for SDF-1 α . Further examination of this finding could help understand the function of gp120 in the pathophysiology of HIV.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung der T-Lymphozyten.....	2
1.1.1 Im Thymus reifen hämatopoetische Stammzellen zu einer Armee kampfbereiter naiver T-Lymphozyten	2
1.1.2 Bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen differenzieren naive T- Lymphozyten zu Effektor- und Gedächtniszellen	5
1.2 Cytokin- und Chemokin-induzierte Signalwege regulieren Prozesse, welche die T-Zell-Homöostase aufrechterhalten	9
1.3 Das Cytokin IL-2 aktiviert Signalwege, die zur T-Zell-Proliferation führen	10
1.3.1 Das Cytokin IL-2 – Allgemeine Informationen	10
1.3.2 Die Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade ist ein hoch konservierter Signalweg, dessen Aktivierung streng kontrolliert wird	12
1.4 Das Chemokin SDF-1α – mehr als nur ein chemotaktisches Protein..	15
1.4.1 Das Chemokin SDF-1 α – Allgemeine Informationen.....	15
1.4.2 RhoA – ein Schlüsselprotein bei SDF-1 α -induzierten Signal- ereignissen.....	17
1.4.3 SDF-1 α kooperiert mit anderen extrazellulären Signalen.....	20
1.5 Fragestellung.....	21
2 Material.....	22
2.1 Chemikalien	22
2.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	22
2.1.2 Zellkulturchemikalien.....	23
2.1.3 Kits und sonstige Reagenzien.....	24
2.2 Plasmidkonstrukte	24
2.3 Antikörper und Proteine	25
2.3.1 Antikörper.....	25
2.3.2 Enzyme	25
2.3.3 Rekombinante Proteine.....	26
2.4 siRNA	26
2.5 Geräte und Verbrauchsmaterial	26
2.6 Bakterien und eukaryotische Zellen	28
2.6.1 Bakterien.....	28
2.6.2 Eukaryotische Zellen.....	28
2.7 Zellkultur-Medien.....	28
2.7.1 Medien zur Kultur von Bakterien	28
2.7.2 Medien zur Kultur von eukaryotischen Zellen.....	29
2.8 Puffer und Lösungen	29
3 Methoden	32

3.1	Methoden zur Modifikation und Analyse von DNA	32
3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA (Kleinmaßstab)	32
3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA (Großmaßstab).....	32
3.1.3	DNA-Konzentrationsmessung	33
3.1.4	Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung	33
3.1.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
3.1.6	Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	34
3.2	Methoden zur Analyse von Proteinen	35
3.2.1	Bradford-Methode	35
3.2.2	SDS-PAGE.....	35
3.2.3	Coomassie-Färbung.....	36
3.2.4	Western Blot.....	37
3.2.5	Luziferase-Reporter-Test	39
3.2.6	Detektion von Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer (CD3-/CXCR4-Doppelfärbung)	39
3.2.7	Herstellung eines GST-Fusionsproteins.....	40
3.2.8	Bestimmung der Ras-Aktivität (RasGTP-Affinitätspräzipitation).....	41
3.2.9	Raf-Kinase-Test	41
3.3	Bakterien	42
3.3.1	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i>	42
3.3.2	Einfrieren transformierter Bakterien	43
3.4	Eukaryotische Zellen	43
3.4.1	Kultur der humanen T-Lymphom-Zell-Linie Jurkat	43
3.4.2	Isolierung und Kultur primärer humaner T-Zellen.....	43
3.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	45
3.4.4	Einfrieren von Zellen	45
3.4.5	Auftauen von Zellen	46
3.4.6	Transfektion von Jurkat Zellen durch Elektroporation	46
3.4.7	Transfektion von Jurkat Zellen durch Lipofektion	47
3.4.8	Transfektion primärer humaner T-Zellen mit Amaxa	47
3.5	Zellbiologische Methoden	48
3.5.1	Messung der Proliferation durch BrdU-Inkorporation	48
3.5.2	Apoptose-Test.....	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Effekt von SDF-1α auf die IL-2-induzierte Proliferation und Signaltransduktion	51
4.1.1	SDF-1 α interferiert in primären humanen T-Zellen mit IL-2-induzierter Proliferation	51
4.1.2	SDF-1 α interferiert mit der Signaltransduktion der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade in primären humanen T-Zellen	54
4.1.3	Auch in der humanen T-Lymphom Zell-Linie Jurkat hemmt SDF-1 α die Ras-Raf-MEK-ERK Aktivierung durch TPA	55
4.2	Charakterisierung der kleinen GTPase RhoA als Teil des SDF-1α induzierten inhibitorischen Mechanismus	56
4.2.1	Die kleine GTPase RhoA wird durch SDF-1 α aktiviert und hemmt die Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung.....	56
4.2.2	RhoA vermittelt die SDF-1 α -induzierte Hemmung der Proliferation	59
4.2.3	Charakterisierung des beteiligten RhoA-induzierten Signalwegs mit Hilfe von RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten.....	60

4.3	Die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion – Aufklärung des Mechanismus.....	64
4.3.1	Das direkte Ziel der RhoA-vermittelten Hemmung ist Raf.....	64
4.3.2	RhoA interferiert mit dem Rac-PAK Signalweg und verhindert die Phosphorylierung von Raf-S338	67
4.3.3	Konstitutiv aktives Rac verhindert sowohl die RhoA- als auch die SDF-1 α -induzierte Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signal- transduktion.....	69
4.4	Überprüfung der Allgemeingültigkeit des beschriebenen Mechanismus.....	72
4.4.1	SDF-1 α interferiert nicht mit der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation	72
4.4.2	Auch der pathologische CXCR4-Ligand, das HIV-Glycoprotein gp120, interferiert mit der Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade	73
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
5	Diskussion	77
5.1	Regulation der T-Zell-Proliferation durch SDF-1α.....	77
5.2	SDF-1α interferiert mit der IL-2-induzierten Proliferation – Aufklärung des Mechanismus.....	80
5.2.1	Die kleine GTPase RhoA als zentraler Bestandteil des inhibitorischen Mechanismus	80
5.2.2	Potentielle Mechanismen für die Regulation der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch RhoA-Effektoren.....	82
5.2.3	Die Integration der SDF-1 α - und IL-2-induzierten Signale – Ein Modell	84
5.2.4	RhoA und Rac – Die gegenseitige Beeinflussung kleiner GTPasen ...	86
5.3	Effekt von SDF-1α auf die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation – Spezifität des beschriebenen Mechanismus	88
5.4	Effekt des pathologischen CXCR4-Liganden gp120 auf die Ras- Raf-MEK-ERK Signaltransduktion	89
5.5	Ausblick	90
6	Literaturverzeichnis	93
	Danksagung	105
	LEBENS LAUF	107

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Die Entwicklungsstadien der T-Zellen in verschiedenen Bereichen des Thymus sowie die Expression relevanter Chemokine.	3
Abb.1.2	IL-2-induzierte Signalwege.	11
Abb.1.3	Die Regulation der Raf-Aktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung.	13
Abb.1.4	SDF-1 α -induzierte Signalwege.	17
Abb.3.1	Kontrolle der Reinheit und CXCR4-Expression der primären humanen T-Zellen.	44
Abb.4.1	SDF-1 α verringert die IL-2 induzierte Proliferation in primären humanen T-Zellen, während die Apoptose nicht beeinflusst wird.	53
Abb.4.2	SDF-1 α interferiert in primären T-Zellen mit dem Ras-ERK Signalweg.	54
Abb.4.3	SDF-1 α interferiert auch in Jurkat-Zellen mit dem Ras-ERK Signalweg.	56
Abb.4.4	Konstitutiv aktives RhoA hemmt Ras-ERK Signalübertragung in Jurkat-Zellen.	57
Abb.4.5	Aktivierung von endogenem RhoA durch CNF γ interferiert mit der TPA-induzierten MEK-Aktivierung in Jurkat-Zellen.	59
Abb.4.6	RhoA ist an der SDF-1 α -vermittelten Herunterregulierung der IL-2 induzierten Proliferation in primären humanen T-Zellen beteiligt.	60
Abb.4.7	SRF-Aktivierung durch RhoAL63 und RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten.	61
Abb.4.8	Inhibierung der HaRasL61-induzierten MEK-Phosphorylierung durch RhoAL63 und RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten.	63
Abb.4.9	RhoAL63 hemmt die Raf-Aktivierung, während die Ras-Aktivität nicht beeinflusst wird.	65
Abb.4.10	Die Raf-MEK-ERK Signalübertragung wird durch RhoAL63 nicht gestört.	66
Abb.4.11	Hemmung der Raf-S338 Phosphorylierung durch RhoAL63.	68
Abb.4.12	RhoAL63 inhibiert die HaRasL61-induzierte PAK-Phosphorylierung.	68
Abb.4.13	Schema: RhoA interferiert mit dem Rac-PAK Signalweg und stört so die Raf-Aktivierung.	69
Abb.4.14	Konstitutiv aktives Rac verhindert die RhoA-vermittelte Hemmung der MEK-Aktivierung.	71
Abb.4.15	Konstitutiv aktives Rac verhindert die SDF-1 α -vermittelte Hemmung der MEK-Aktivierung.	72
Abb.4.16	Die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation wird nicht durch SDF-1 α gehemmt.	73
Abb.4.17	Das HIV-Glykoprotein gp120 interferiert mit MEK-Aktivierung in primären humanen T-Zellen.	74
Abb.5.1	Modell: SDF-1 α interferiert mit der Cytokin-induzierten Proliferation durch Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion.	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle.1.1 Übersicht über die Effekte einiger (A) Cytokine und (B) Chemokine auf T-Zellen.	9
Tabelle 2.1 Allgemeine Chemikalien	23
Tabelle 2.2 Zellkulturchemikalien	23
Tabelle 2.3 Kits und sonstige Reagenzien.....	24
Tabelle 2.4 Plasmidkonstrukte.....	24
Tabelle 2.5 Antikörper	25
Tabelle 2.6 Rekombinante Proteine	26
Tabelle 2.7 siRNA.....	26
Tabelle 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial	27
Tabelle 3.1 Primärantikörper im Western Blot	38

Abkürzungen

AIDS	<i>engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AP-1	<i>engl. activator protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CAPRI	<i>engl. Ca²⁺ promoted Ras inactivator</i>
CD	<i>engl. clusters of differentiation</i>
Cdc42	<i>engl. cell division cycle gene 42</i>
CNF γ	<i>engl. cytotoxic necrotizing factor γ</i>
ConA	Concanavalin A
DAG	Diacylglycerol
Dia	<i>engl. Diaphanous-related formin protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	(in Bezug auf CD4 und CD8) doppelt negative Thymozyten
DP	(in Bezug auf CD4 und CD8) doppelt positive Thymozyten
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELC	<i>engl. Epstein Barr virus-induced receptor ligand chemokine</i>
Elk	<i>engl. Ets-like transcription factor</i>
ERK	<i>engl. extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>engl. fluorescence-activated cell sorter</i>
F-Actin	filamentöses Actin
Fak	<i>engl. focal adhesion kinase</i>
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
G-Actin	monomeres Actin
GAP	<i>engl. GTPase activating protein</i>
GDI	<i>engl. guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>engl. guanine nucleotide exchange factor</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
gp120	Glykoprotein 120
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>engl. Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Jak	Janus Kinase
KSR	<i>engl. kinase suppressor of Ras</i>
LARG	<i>engl. leukemia associated RhoGEF</i>
LAT	<i>engl. linker for activation of T cells</i>

Abkürzungen

Lck	<i>engl. lymphoid cell protein tyrosine kinase</i>
LIMK	LIM-Kinase
LMW-PTP	<i>engl. low molecular weight protein tyrosine phosphatase</i>
LPA	<i>engl. lysophosphatidic acid</i>
Luc	Luziferase
MAPK	<i>engl. mitogen activated protein kinase</i>
MBS	<i>engl. myosin-binding subunit</i>
MCP	<i>engl. monocyte chemoattractant protein</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-1 α	<i>engl. macrophage inflammatory protein 1α</i>
MIP-1 β	<i>engl. macrophage inflammatory protein 1β</i>
MKP	MAPK-Phosphatase
MLC	<i>engl. myosin light chain</i>
MP1	MEK-Partner 1
NFAT	<i>engl. nuclear factor of activated T cells</i>
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphatase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKN	Proteinkinase N
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	<i>engl. Ras-related C3-Botulinum-toxin substrate</i>
Raf-RBD	Raf - Ras-Bindedomäne
RANTES	<i>engl. regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
Rho	Ras-homolog
ROCK	<i>engl. Rho-associated coiled-coil containing kinase</i>
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>engl. stem cell factor</i>
SDF-1 α	<i>engl. stromal cell-derived factor 1α</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHP	<i>engl. SH2-containing protein tyrosine phosphatase</i>
siRNA	<i>engl. small interfering RNA</i>
SLC	<i>engl. secondary lymphoid tissue chemokine</i>
SLF	Steel-Faktor
SLP-76	<i>engl. SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa</i>
SP	(in Bezug auf CD4 und CD8) einfach positive Thymozyten
SRE	<i>engl. serum response element</i>
SRF	<i>engl. serum response factor</i>
Stat	<i>engl. signal transducer and activator of transcription</i>

Abkürzungen

TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TECK	<i>engl. thymus-expressed chemokine</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>engl. transforming growth factor</i>
TH1-Zelle	T-Helferzelle Typ1
TH2-Zelle	T-Helferzelle Typ2
Tiam1	<i>engl. T-lymphoma invasion and metastasis</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPO	Thrombopoietin
Trail	<i>engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Unser Organismus ist täglich einer Vielzahl von Erregern wie Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt, die zum Teil lebensgefährliche Infektionen hervorrufen können. Nur ein komplexes Abwehrsystem ermöglicht uns das Überleben in dieser Umgebung: Unser Immunsystem. Das Immunsystem verfügt über spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen, die sich durch ihre unterschiedlichen Funktionsweisen gut ergänzen. Durch die angeborene (naive) Immunität erfolgt die unspezifische Erkennung und Bekämpfung eines Antigens innerhalb weniger Minuten. Diese „Sofortmaßnahmen“ werden hauptsächlich durch phagozytierende Zellen vermittelt und bieten keinen andauernden Schutz. Die Zellen der naiven Immunität beeinflussen jedoch auch die Zellen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort, beispielsweise durch Sekretion von Cytokinen. Die adaptive Immunität erlaubt unserem Körper das gezielte Erkennen und Bekämpfen eines spezifischen Antigens. Eine Besonderheit der adaptiven Immunabwehr ist die Bildung langlebiger Gedächtniszellen, die bereits bekannte Antigene wieder erkennen und eine schnelle Reaktion ermöglichen. Die adaptive Immunantwort wird hauptsächlich von Lymphozyten vermittelt, die aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen und nach dem Ort ihrer Reifung in zwei Klassen, B-Lymphozyten (Reifung im Knochenmark, *engl. bone marrow*) und T-Lymphozyten (Reifung im Thymus), unterteilt werden. B-Zellen vermitteln eine humorale Immunantwort; nach Aktivierung reifen sie zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Immunglobuline, die Pathogene beseitigen bzw. Toxine neutralisieren. Der erste Schritt einer Immunreaktion ist jedoch die Aktivierung von T-Zellen, welche die zelluläre Immunantwort vermitteln. Ihre Aufgabe ist die Antigenerkennung und -bekämpfung, sowie die Regulation anderer Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel B-Zellen. Damit nehmen sie einen zentralen Platz bei der Regulation der Immunantwort ein. Für ein intaktes Immunsystem ist es essentiell, dass die Anzahl und die Funktionen der Lymphozyten streng überwacht werden. Dies geschieht durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher extrazellulärer Faktoren wie Cytokine und Chemokine. Sie überwachen die Aktivierung und Inaktivierung zellulärer Programme, die die Homöostase der Lymphozyten, beispielsweise durch Proliferation oder Apoptose, und die Migration, aber auch die Effektorfunktionen der Lymphozyten steuern. Auf diese Weise wird erreicht, dass die Lymphozyten zur richtigen Zeit und am richtigen

Ort die Bekämpfung eines Antigens durchführen. Ein Ungleichgewicht in der Regulation der Lymphozytenhomöostase und der Lymphozytenfunktionen kann eine Immunschwäche oder aber eine überschießende Immunreaktion zur Folge haben. Die für die Regulation notwendige Integration unterschiedlicher extrazellulärer Signale, die in einer bestimmten zellulären Reaktion resultiert, wird noch nicht vollständig verstanden. Eine Aufklärung dieser Prozesse ist sehr wichtig, wenn man gezielt in die Vorgänge eingreifen möchte, beispielsweise um Fehlfunktionen des Immunsystems zu therapieren.

1.1 Die Entwicklung der T-Lymphozyten

1.1.1 Im Thymus reifen hämatopoetische Stammzellen zu einer Armee kampfbereiter naiver T-Lymphozyten

Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Während die B-Lymphozyten im Knochenmark reifen, wandern einige lymphatische Vorläuferzellen in den Thymus und entwickeln sich dort über eine Reihe von Differenzierungs- und Selektionsschritten bis hin zu naiven T-Zellen (Petrie et al. 1990). Während lymphatische Vorläuferzellen zunächst noch die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Richtungen weiterzuentwickeln, erfolgt im Thymus dann die endgültige Festlegung in Richtung T-Zell-Differenzierung. Die Signale, die dabei eine Rolle spielen, sind noch nicht bekannt. Studien in transgenen Mäusen deuten jedoch darauf hin, dass Notch1 in diesen Prozess involviert ist. Den Mäusen, bei denen das Gen für Notch1 in frühen lymphatischen Vorläuferzellen ausgeschaltet wird, fehlen die auf die T-Zell-Richtung festgelegten Vorläuferzellen. Außerdem ist die Anzahl der B-Vorläuferzellen und der reifen B-Zellen erhöht (Wilson et al. 2001).

Nach der Festlegung für die T-Zell-Richtung durchlaufen die T-Vorläuferzellen bei ihrer Wanderung durch die verschiedenen Bereiche des Thymus mehrere Reifungsstadien, welche durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 charakterisiert sind (Abb.1.1). Im Cortex des Thymus entwickeln sich die in Bezug auf CD4 und CD8 „doppelt negativen“ (DN) Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark über mehrere Zwischenstufen (DN1-DN4), die wiederum durch die differentielle Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD44 unterschieden werden (DN1: CD44⁺CD25⁻, DN2: CD24⁺CD25⁺, DN3: CD44⁻CD25⁺, DN4: CD44⁻

CD25⁻), zu „doppelt positiven“ (DP) CD4- und CD8-exprimierenden Zellen (Singer et al. 1999). Während dieser Reifung zum DP-Stadium wandern die Zellen durch den Cortex in Richtung des subkapsulären Bereichs des Thymus (Abb.1.1). In dieser Phase erfolgen die Genrekombinationen der α - und der β -Kette, die den Antigenbindenden Teil des T-Zell-Rezeptors darstellen. Die Zellen des DN3-Stadiums exprimieren zunächst nur eine Prä-T-Zell-Rezeptor- α -Kette (von Boehmer and Fehling 1997). In diesem Stadium findet die Genrekombination der β -Kette statt, die dann zusammen mit der Prä- α -Kette den Prä-T-Zell-Rezeptor bildet. Dieser ist mit dem CD3/ ζ -Komplex assoziiert, der die proximale Signaltransduktion vermittelt, die wiederum Zellproliferation induziert und dadurch weitere Rekombinationen der β -Kette verhindert. Zu diesem Zeitpunkt findet die Rekombination der α -Kette statt und es entsteht die zweite Komponente eines reifen $\alpha\beta$ -Antigen-Rezeptors. Die Thymozyten beginnen außerdem mit der Expression der Co-Rezeptoren CD4 und CD8 (Robey and Fowlkes 1994). Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen entstehen auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, die allerdings nur einen kleinen Teil (1-5%) der zirkulierenden T-Zellen beim Menschen ausmachen und deren Entstehung und Funktion noch nicht so gut beschrieben sind. Die Ausführungen hier konzentrieren sich daher auf die $\alpha\beta$ -T-Zellen.

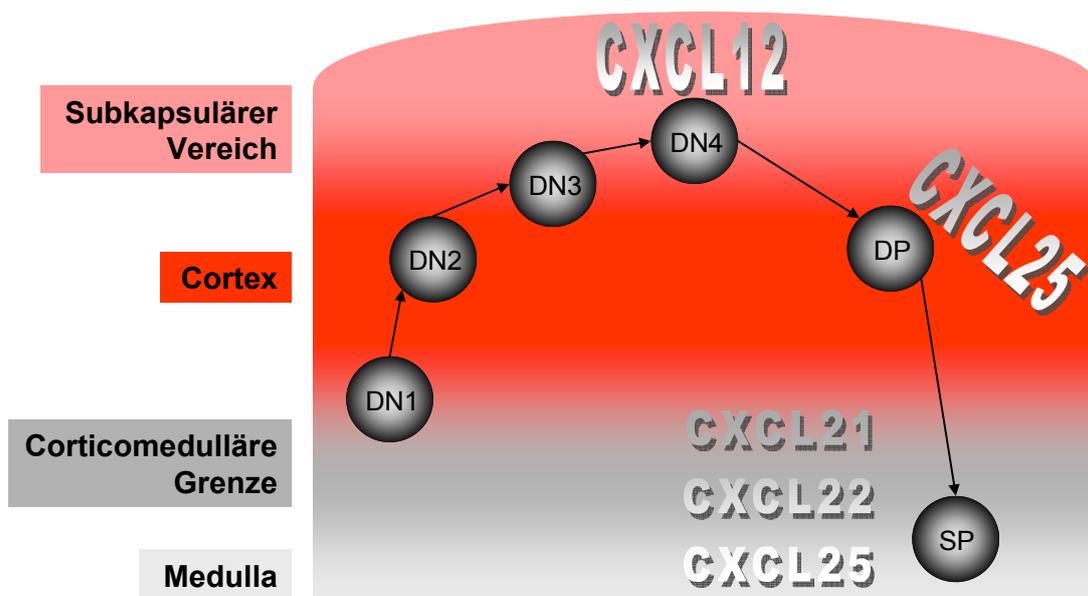


Abb.1.1 Die Entwicklungsstadien der T-Zellen in verschiedenen Bereichen des Thymus sowie die Expression relevanter Chemokine (verändert nach Gill et al. 2003).

DN = doppelt negative T-Zelle, DP = doppelt positive T-Zelle, SP = einfach positive T-Zelle

Die DP Zellen ändern ihre Migrationsrichtung und wandern zurück in die Medulla (Gray et al. 2005). Auf diesem Weg werden sie einer positiven sowie einer negativen Selektion unterzogen. Bei der positiven Selektion erhalten nur diejenigen Zellen ein Überlebenssignal, welche die eigenen MHC-Moleküle (MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex) auf den Epithelzellen des Cortex erkennen. Dabei ist es wichtig, dass die Affinität des T-Zell-Rezeptors für das eigene MHC-Molekül weder zu hoch noch zu niedrig ist, da beides zu einer Eliminierung der T-Zellen führen würde. Die Zellen, deren T-Zell-Rezeptor eine zu niedrige Affinität für MHC-Moleküle besitzt, sterben aufgrund eines fehlenden Überlebenssignals. Das gleiche gilt für Zellen, die keinen funktionellen T-Zell-Rezeptor exprimieren. Ein Großteil der entstandenen DP T-Zellen besitzt jedoch einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, der die körpereigenen Peptid-MHC-Moleküle nicht erkennen kann, und wird aufgrund des fehlenden Überlebenssignals durch den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Die T-Zellen, deren Rezeptor die MHC-I-Moleküle erkennt, entwickeln sich zu CD8-positiven Zellen und diejenigen, deren Rezeptor die MHC-II-Moleküle erkennt, zu CD4-positiven Zellen (Germain 2002). Dies wurde in Mäusen gezeigt, denen eines der beiden MHC-Moleküle fehlt. Mäuse ohne MHC-I-Molekül entwickelten nur wenige CD8-positive Zellen (Zijlstra et al. 1990; Kjoller and Hall 1999), Mäuse ohne MHC-II-Molekül nur wenige CD4-positive Zellen (Cosgrove et al. 1991; Grusby et al. 1991). Die negative Selektion erfolgt durch dendritische Zellen und Makrophagen, die aus dem Knochenmark stammen, und in der Medulla körpereigene Peptide präsentieren. Besitzt ein T-Zell-Rezeptor eine zu hohe Affinität für diese körpereigenen Peptid-MHC-Komplexe, erhält die Zelle ein Signal, das den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet. Die Medulla spielt bei der Gewährleistung der Toleranz naiver T-Zellen gegen körpereigene Antigene also eine wichtige Rolle, da sie eine große Auswahl an körpereigenen Antigenen enthält, so dass die Wahrscheinlichkeit, autoreaktive naive T-Zellen detektieren und eliminieren zu können, groß ist (Kyewski and Derbinski 2004).

Es gibt aktuelle Theorien, die besagen, dass autoreaktive T-Zellen durch Bindung an einen agonistischen Liganden auch positiv selektiert werden und zu reifen T-Zellen differenzieren können. Diese speziellen T-Zell-Populationen, zu denen NK-T-Zellen und $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen gehören, besitzen ungewöhnliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften, die ihnen die Regulation der Immunantwort erlauben (Kronenberg and Gapin 2002; Baldwin et al. 2004; Wing et

al. 2005). Die Signale, die zur Entstehung dieser speziellen T-Zell-Populationen führen, sind jedoch noch nicht bekannt. Die CD4- oder CD8-positiven T-Zellen, die nach überstandener negativer und erfolgreicher positiver Selektion in die Peripherie wandern (nur etwa 2% der DP Thymozyten), werden als naive T-Zellen bezeichnet, da sie aufgrund des fehlenden Kontakts mit ihrem spezifischen Antigen noch ungeprägt sind.

Chemokine, wie z.B. SDF-1 α , spielen bei der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus eine wichtige Rolle, da sie die Wanderung der Zellen und somit deren Exposition gegenüber ganz spezifischen Stimuli steuern (Norment and Bevan 2000). In den verschiedenen Bereichen des Thymus werden unterschiedliche Chemokine exprimiert (Abb.1.1). Ein SDF-1 α -Gradient (*engl. stromal cell-derived factor 1 α* , auch CXCL12) lenkt die Thymozyten in Richtung des subkapsulären Bereichs, doppelt positive Zellen wandern dann in Richtung eines CCL25-Gradienten, der von kortikalen Thymus-Epithelzellen produziert wird. Nach den Selektionsereignissen wandern die einfach positiven Zellen dann in die Medulla in Richtung von CCL21-, CCL22- und CCL25-Gradienten. Entsprechend verändern die Thymozyten während der Reifung durch differentielle Expression der Chemokin-Rezeptoren ihre Sensitivität für verschiedene Chemokine (Aiuti et al. 1999; Ansel and Cyster 2001).

1.1.2 Bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen differenzieren naive T-Lymphozyten zu Effektor- und Gedächtniszellen

Die Reifungsprozesse im Thymus liefern eine große Armee kampfbereiter naiver T-Zellen, von denen jede einzelne einen einzigartigen T-Zell-Rezeptor besitzt. Diese T-Zellen müssen in der Lage sein, unzählige Antigene unterschiedlichster Form zu erkennen und zu eliminieren. Die Tatsache, dass zu jedem möglichen Antigen eine passende T-Zelle existiert, stellt das Immunsystem vor ein Problem: Eine bestimmte T-Zelle muss das Antigen irgendwo im Körper finden. Um dies zu gewährleisten, zirkulieren die naiven T-Zellen durch den Körper, wobei sie aus dem Blut bevorzugt in lymphatische Gewebe wandern. Dabei stellt ein komplexes Leitsystem sicher, dass die T-Zellen nicht orientierungslos durch den Körper wandern, sondern gezielt zu den lymphatischen Geweben, in denen mögliche Antigene von dendritischen Zellen präsentiert werden. Zu diesem Leitsystem gehören vor allem Gradienten konstitutiv exprimierter Chemokine, z.B. ELC (*engl. Epstein Barr virus-induced*

receptor ligand chemokine) (Baekkevold et al. 2001) und SDF-1 α (Blades et al. 2002; Phillips and Ager 2002), in deren Richtung die T-Zellen wandern (Tang and Cyster 1999). Die Migration der Lymphozyten in bestimmte Gewebe wird außerdem durch gewebespezifisch exprimierte Adhäsionsmoleküle induziert; beispielsweise exprimieren die Endothelzellen der Venolen mit hohem Endothel in Lymphknoten so genannte Addressine, die ein Anheften der Lymphozyten ermöglichen (Jutila et al. 1989). Bei Entzündungsprozessen werden zudem lokal so genannte inflammatorische Chemokine wie zum Beispiel MIP-1 α (*engl. macrophage inflammatory protein 1 α*), MIP-1 β (*engl. macrophage inflammatory protein 1 β*) (Taub et al. 1993) und RANTES (*engl. regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) (Schall et al. 1990) produziert, die Lymphozyten anlocken (Nelson and Krensky 1998).

Trifft eine naive T-Zelle in den lymphatischen Geweben nicht auf ihr spezifisches Antigen, so zirkuliert sie weiter durch den Körper. Bindet der T-Zell-Rezeptor jedoch an den MHC-Komplex eines spezifischen Antigen-Peptids an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle, so beendet die T-Zelle die Migration (Negulescu et al. 1996; Dustin et al. 1997) und bildet eine spezifische Kontaktzone mit der Antigen-präsentierenden Zelle, die so genannte immunologische Synapse. Während der Kontakt des T-Zell-Rezeptors mit seinem Liganden nur wenige Sekunden andauert, bleibt die Interaktion zwischen der T-Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle mehrere Stunden bestehen (Iezzi et al. 1998; Mempel et al. 2004). Dabei tastet die T-Zelle die Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle ab, organisiert die Signaltransduktion der nun ausgereiften immunologischen Synapse und integriert die Signale von T-Zell-Rezeptor und costimulatorischen Molekülen. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus α/β -Untereinheiten, die den Peptid-MHC-Komplex erkennen, und dem CD3-Komplex, der die Übertragung der Signale ins Innere der Zelle bis in den Zellkern vermittelt. In Kooperation mit den Signalen der costimulatorischen Moleküle induziert CD3 die Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase der Src-, Syk-, und Tec-Familie sowie die Phosphorylierung der Adapterproteine SLP-76 (*engl. SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*) und LAT (*engl. linker for activation of T cells*). Dadurch wird die Aktivierung zweier zentraler Effektor-Enzyme induziert, PLC- γ 1 (Phospholipase C- γ 1) und PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), die durch Induktion verschiedener Signalwege die Weiterleitung der Signale von der Plasmamembran ins Innere der Zelle bewirken. Eine wichtige Rolle spielen in diesem

Zusammenhang Ras-, PKB (Proteinkinase B)-, PKC (Proteinkinase C)- und Calcium-induzierte Kaskaden (Cantrell 2002).

Für die stabile Induktion der eben beschriebenen Signalereignisse und die daraus resultierende Induktion der Genexpression und der Zellzyklusprogression ist der andauernde Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle notwendig. Es ist noch nicht genau bekannt, welche Faktoren diesen andauernden Kontakt regulieren, jedoch deuten aktuelle Studien auf eine Beteiligung von Chemokin-Rezeptoren hin. So wurde gezeigt, dass die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 während der T-Zell-Stimulierung zur immunologischen Synapse wandern und dort akkumulieren. Diese Rekrutierung bewirkt eine stärkere Bindung zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle, eine verminderte Sensitivität der T-Zelle für Chemokin-Gradienten und eine verstärkte T-Zell-Proliferation in Verbindung mit einer erhöhten Cytokin-Produktion (Molon et al. 2005).

Diese komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Prozesse führen zur klonalen Expansion der T-Zelle mit dem Ziel, genügend spezifische Effektor-Zellen für die effektive Bekämpfung des Antigens zu produzieren. Die CD4-positiven Zellen differenzieren zu T-Helferzellen, wobei der Typ 1 (T_H1 -Zellen) eine zelluläre Immunantwort vermittelt, während der Typ 2 (T_H2 -Zellen) die humorale Immunantwort unterstützt (Romagnani 1994; Abbas et al. 1996; Santana and Rosenstein 2003). Diese beiden Typen unterscheiden sich u.a. in ihrer Cytokin-Sekretion. Während T_H1 -Zellen hauptsächlich IL-2 (Interleukin-2), IFN- γ (Interferon γ) und TNF- β (Tumornekrosefaktor β) produzieren, sind die Cytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 typisch für T_H2 -Zellen. Diese beiden Zellpopulationen verhalten sich komplementär, wobei je nach Art des Antigens ein Typ dominant ist. Bei Viren und intrazellulären Parasiten sind dies T_H1 -Zellen, bei extrazellulären Parasiten T_H2 -Zellen. Die CD8-positiven Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen töten (Zinkernagel 1996). Nach der erfolgreichen Eliminierung des Antigens sterben die meisten Effektor-Zellen durch Apoptose, einige überleben jedoch als Gedächtnis-Zellen und gewährleisten einen unmittelbaren Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Antigen. Man unterscheidet Effektor-Gedächtniszellen, deren Aufgabe die „Überwachung“ der peripheren Gewebe ist, und zentrale Gedächtniszellen, die in den Lymphknoten zu finden sind (Sallusto et al. 1999).

Sowohl bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen als auch bei der Bildung von Gedächtniszellen spielt das komplexe Zusammenwirken zahlreicher Cytokine und Chemokine eine Rolle (Tough et al. 1999). Grundsätzlich unterstützen die Cytokine IL-12, IFN-1 und IFN- γ die Bildung von T_H1-Zellen und das Cytokin IL-4 die Bildung von T_H2-Zellen. Neben diesen Faktoren spielen jedoch weitere Cytokine und Chemokine eine Rolle, die von Zellen produziert werden, die ihrerseits dem Einfluss von Cytokinen und Chemokinen unterliegen. Durch diese direkten und indirekten Effekte und die gegenseitige Beeinflussung ist die Aufklärung der Cytokin-Chemokin-Wechselwirkungen sehr schwierig. Das Chemokin CCL2 beispielsweise verstärkt die Differenzierung von T-Zellen zu T_H2-Effektorzellen (Luther and Cyster 2001). Dies geschieht indirekt durch die Reduktion der IL-12-Produktion von Antigen-präsentierenden Zellen (Chensue et al. 1996) und direkt durch die Erhöhung der IL-4 Produktion der aktivierten T-Zelle selbst (Karpus et al. 1997). Die verminderte IL-12- und verstärkte IL-4-Produktion beeinflussen dann wiederum andere Zellen.

Die Entstehung von Gedächtniszellen wird durch die Kooperation von IL-7 und IL-15 reguliert (Schluns and Lefrancois 2003). Während ein Großteil der Effektorzellen am Ende der Immunantwort stirbt, induziert IL-7 das Überleben der potentiellen Gedächtniszellen, deren IL-7-Rezeptor-Expression hochreguliert ist (Schluns et al. 2000; Goldrath et al. 2002). Das Cytokin IL-15 gewährleistet die Proliferation der Gedächtniszellen und damit deren Erneuerung und andauernde Präsenz (Kanegane and Tosato 1996; Becker et al. 2002). Die differentielle Expression von Chemokin-Rezeptoren auf Gedächtniszellen, beispielsweise die Hochregulierung der CXCR4-Expression (Kobayashi et al. 2004), lässt auf eine wichtige Funktion in diesem Zusammenhang schließen. Bisher wurden Chemokine hauptsächlich mit der Lokalisierung der verschiedenen T-Zell-Populationen in Verbindung gebracht (Ohl et al. 2003), wobei die Lokalisierung der Gedächtniszellen u.a. durch die Chemokine SDF-1 α , SLC (*engl. secondary lymphoid tissue chemokine*), ELC (*engl. Epstein Barr virus-induced receptor ligand chemokine*) und TECK (*engl. thymus-expressed chemokine*) beeinflusst wird (Moser and Loetscher 2001).

1.2 Cytokin- und Chemokin-induzierte Signalwege regulieren Prozesse, welche die T-Zell-Homöostase aufrechterhalten

Ein Gleichgewicht der verschiedenen Lymphozyten-Populationen, das für eine funktionierende Immunreaktion essentiell ist, wird durch streng regulierte zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben und Apoptose gewährleistet. Fehlende Apoptose und unkontrollierte Proliferation werden mit Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Siegel et al. 2000; Dianzani et al. 2003), während übermäßige Apoptose von T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von AIDS (*engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome*) spielt (Alimonti et al. 2003).

A

Cytokin	Effekt auf T-Zellen
IL-1 α	Aktivierung
IL-2	Proliferation
IL-6	Wachstum und Differenzierung
IL-15	Wachstum, Überleben von CD8-Gedächtniszellen
IL-21	Proliferation
FasL	Apoptose
Trail	Apoptose aktivierter T-Zellen
TGF- β	Hemmung des Zellwachstums

(Janeway et al. (2005) Immunobiology, 6.Auflage)

B

Chemokin	Effekt auf T-Zellen
CCL2	negative Regulation der TH1-Antwort (Moser and Loetscher 2001)
MCP-1	Proliferation (Futagami et al. 2003)
MIP-1 α MIP-1 β	Costimulierung der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation (Taub et al. 1996)
RANTES	Costimulierung der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation (Bacon et al. 1995)
SDF-1 α	Costimulierung der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation (Nanki and Lipsky 2000), Apoptose (Colamussi et al. 2001)

Tabelle.1.1 Übersicht über die Effekte einiger (A) Cytokine und (B) Chemokine auf T-Zellen.

IL = Interleukin, FasL = Fas-Ligand, Trail = *engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TGF = *engl. transforming growth factor*, MCP = *engl. monocyte chemoattractant protein*, MIP = *engl. macrophage inflammatory protein*, RANTES = *engl. regulated on activation normal T cell expressed and secreted*, SDF = *engl. stromal cell-derived factor*.

Prozesse wie T-Zell-Proliferation, Überleben und Apoptose werden durch zahlreiche extrazelluläre Signale, beispielsweise Cytokine und Chemokine, reguliert. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Effekte einiger Cytokine und Chemokine. Diese Faktoren binden an Rezeptoren auf der Zell-Oberfläche und induzieren Signalkaskaden in der Zelle. Damit die Zelle mit dem richtigen Programm auf den gleichzeitigen Einfluss verschiedener extrazellulärer Stimuli reagiert, muss sie die synergistischen und antagonistischen Signale auf Ebene der Signalkaskaden integrieren. Diese intrazelluläre Signalverarbeitung wird noch nicht vollständig verstanden. Um im Falle einer Fehlfunktion korrigierend in die zellulären Programme eingreifen zu können, ist es jedoch wichtig zu verstehen, wie einzelne Signale sich gegenseitig beeinflussen.

Zwei extrazelluläre Faktoren, mit denen T-Zellen während der Zirkulation durch den Körper häufig in Kontakt kommen, sind IL-2 und SDF-1 α . Da diese beiden Faktoren auch Gegenstand dieser Arbeit sind, werde sie im Folgenden näher vorgestellt.

1.3 Das Cytokin IL-2 aktiviert Signalwege, die zur T-Zell-Proliferation führen

1.3.1 Das Cytokin IL-2 – Allgemeine Informationen

Das Cytokin IL-2 (Interleukin-2) wird hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten produziert und spielt eine Rolle bei der klonalen Expansion von T-Zellen sowie bei der Regulation der peripheren T-Zell-Toleranz. Nachdem IL-2 als eines der ersten Cytokine kloniert worden war (Taniguchi et al. 1983), wurde seine Hauptfunktion in der Unterstützung der Immunantwort gesehen, da IL-2 die klonale Expansion der T-Zellen induziert. Dass dies die einzige wichtige Funktion von IL-2 ist, wurde erst in Frage gestellt, als bei Mäusen, denen das Gen für IL-2 fehlt, Lymphoproliferation in Verbindung mit letaler Autoimmunität festgestellt wurde (Sadlack et al. 1993; Sadlack et al. 1994; Sadlack et al. 1995). Inzwischen weiß man, dass diese Mäuse eine stark verminderte Zahl an CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen besitzen (Malek et al. 2002). Die genaue Funktion von IL-2 bei der Entstehung und Funktion regulatorischer T-Zellen ist allerdings noch nicht bekannt.

IL-2 induziert durch Interaktion mit dem IL-2-Rezeptor T-Zell-Proliferation (Katzen et al. 1985). Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten, der α -Kette (CD25), der β -Kette (CD122) und der γ -Kette (CD132). Durch Bindung von IL-2 bildet sich ein

stabiles Heterotrimer der drei Untereinheiten. Dies führt zur Initiierung zahlreicher Signalkaskaden in der Zelle. Das Prinzip von Signalkaskaden ist die Weiterleitung von Signalen von der Zelloberfläche ins Cytoplasma bzw. in den Kern. IL-2 aktiviert eine Vielzahl von Signalwegen, von denen einige in Abb.1.2 dargestellt sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung aller Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen verzichtet). Diese Signalwege induzieren Modifikationen bereits vorhandener Proteine, bzw. Transkriptionsereignisse, die in Überleben und Proliferation der T-Zellen resultieren. Eine wichtige Rolle bei der IL-2-induzierten Signaltransduktion spielen Jak-Stat-Signalwege (Beadling et al. 1994), die Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) (Merida et al. 1991) und infolgedessen RhoA (Reif et al. 1996) und Akt (Reif et al. 1997), sowie die Aktivierung von Rac (Arriemerlou et al. 1998). Ein weiterer Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der IL-2-induzierten zellulären Effekte spielt, ist die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade (Graves et al. 1992; Marks et al. 2003), die im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

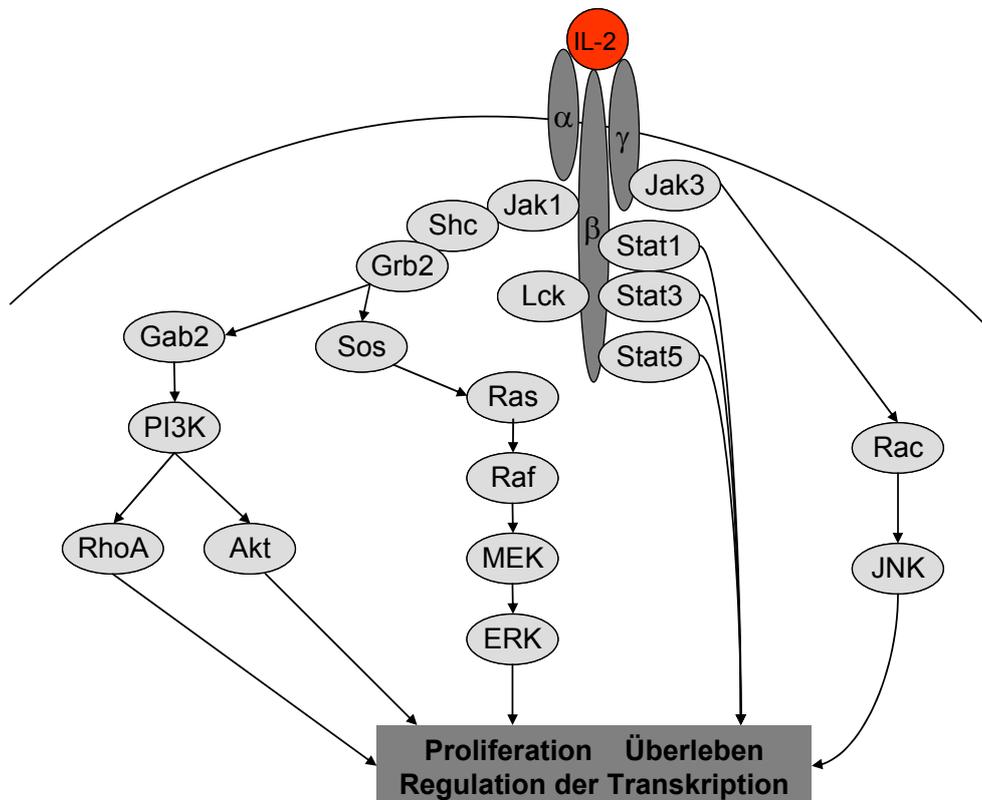


Abb.1.2 IL-2-induzierte Signalwege.

1.3.2 Die Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade ist ein hoch konservierter Signalweg, dessen Aktivierung streng kontrolliert wird

Die Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade ist ein in der Evolution hoch konservierter Signalweg, welcher grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose steuert. Die Regulation dieses Signalweges ist von großer Bedeutung, da eine übermäßige Aktivierung, z.B. durch fehlende inhibitorische Signale oder durch aktivierende Mutationen einzelner Komponenten, zu unkontrollierter Proliferation und damit zu lymphoproliferativen Erkrankungen führen kann. Die Überexpression der Protein-Tyrosin-Kinase Lck beispielsweise, die in T-Zellen den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg aktiviert, hat in transgenen Mäusen die Bildung von Thymomen zur Folge (Abraham et al. 1991). In einer Reihe humaner Tumore wurden Raf-Mutationen identifiziert (Storm and Rapp 1993) und die konstitutive Aktivierung von MEK (MAPK/ERK-Kinase; MAPK = *engl. mitogen activated protein kinase*) führt zur zellulären Transformation (Cowley et al. 1994; Mansour et al. 1994). Eine Hemmung der Signalübertragung durch den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg ist daher eine Erfolg versprechende Strategie für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebs (Sebolt-Leopold 2000; Herrera and Sebolt-Leopold 2002).

In T-Zellen aktivieren Cytokine wie IL-2 oder die Bindung von MHC-Antigen-Komplexen an den T-Zell-Rezeptor die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade. Dabei wird die kleine GTPase Ras aktiviert und induziert ein Signalmodul, welches aus drei übereinander geschalteten Kinasen besteht (siehe Abb. 1.2). Zunächst wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf aktiviert.

Die Raf-Aktivierung ist ein komplexer Vorgang, bei dem Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Ereignisse, regulatorische Signalwege sowie Adapterproteine eine wichtige Rolle spielen (Chong et al. 2003). Ras selbst hat bei der Raf-Aktivierung zwei Funktionen. Zum einen erfolgt durch Bindung der Ras-Bindedomäne von Raf (Raf-RBD) an aktives GTP-gebundenes Ras die Lokalisierung von Raf an die Membran. Zum anderen aktiviert Ras weitere Signalkaskaden, wie beispielsweise den Rac-PAK Signalweg, die zur Raf-Aktivierung beitragen (Li et al. 2001). In Abb. 1.3 sind einige der aktivierenden (rot, rechteckig) und inaktivierenden (grau, oval) Phosphorylierungsstellen dargestellt sowie die Signalwege, welche die (De-) Phosphorylierungsereignisse vermitteln.

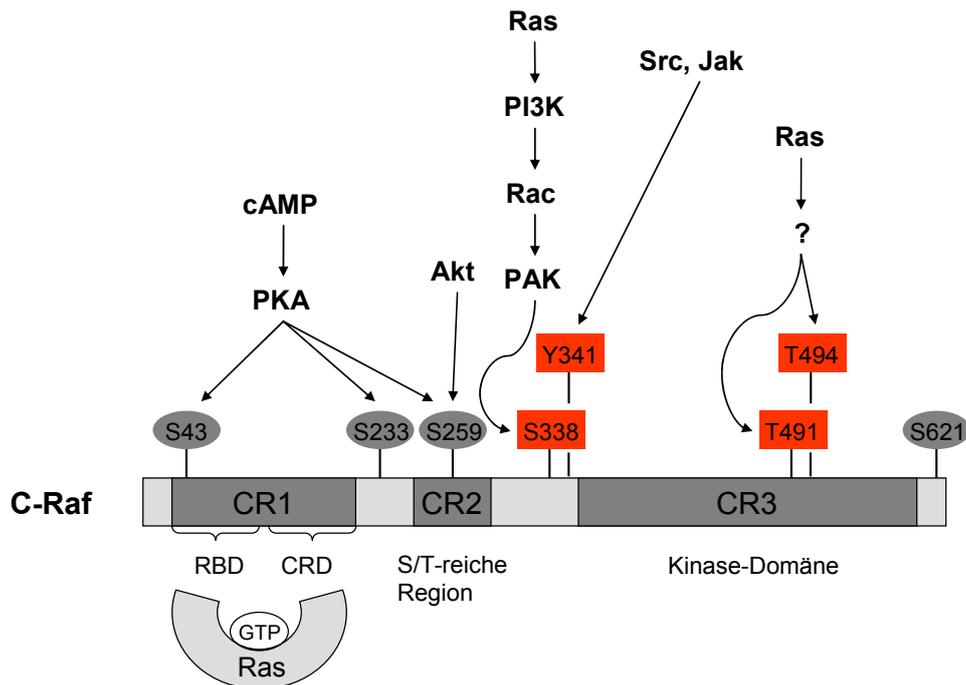


Abb.1.3 Die Regulation der Raf-Aktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung.
 CR = konservierte Region, RBD = Ras-Bindedomäne, CRD = Cystein-reiche Region

Der exakte Ablauf der Raf-Aktivierung ist noch nicht vollständig aufgeklärt, außerdem gibt es Zelltyp-spezifische Unterschiede. Die grundlegende Abfolge der Phosphorylierungsereignisse bei der Raf-Aktivierung stellt man sich nach dem heutigen Kenntnisstand jedoch folgendermaßen vor: Die inhibitorische Phosphorylierungsstelle S259 ist im inaktiven Raf-Molekül ständig phosphoryliert und stellt in diesem Zustand eine Bindungsstelle für das Adapterprotein 14-3-3 dar, welches Raf im inaktiven Zustand stabilisiert (Dumaz and Marais 2003). Dies verhindert die Translokation von Raf an die Membran (Dhillon et al. 2002). Wird Raf-S259 durch die Phosphatase PP2A dephosphoryliert, so findet eine Konformationsänderung statt, die weitere Phosphorylierungsstellen zugänglich macht und die Translokation an die Membran durch Interaktion mit aktivem Ras ermöglicht (Ory et al. 2003; Raabe and Rapp 2003). An der Membran finden dann weitere Phosphorylierungsereignisse statt, u.a. wird das Serin 338 durch PAK phosphoryliert (King et al. 1998; Zang et al. 2002). Diese Phosphorylierung ist allerdings nicht ausreichend; für eine vollständige Raf-Aktivierung sind weitere Modifikationen notwendig, beispielsweise die Phosphorylierung des Tyrosin 340/341 (Wellbrock et al. 2004). Zusätzlich zu den etablierten, relativ gut charakterisierten

Phosphorylierungsstellen werden immer neue Phosphorylierungsstellen identifiziert, beispielsweise das Serin 471, das einen wichtigen Beitrag zur Raf-Aktivierung liefern soll (Zhu et al. 2005) sowie S29, S289, S296, S301 und S642, deren Phosphorylierung von ERK vermittelt wird und damit Teil eines Feedback-Mechanismus ist (Dougherty et al. 2005; Hekman et al. 2005). Allerdings ist die genaue Funktion dieser Phosphorylierungsstellen noch nicht bekannt.

Nach erfolgreicher Raf-Aktivierung folgt die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase MEK (MAPK/ERK-Kinase), die anschließend ebenfalls durch Phosphorylierung die MAP-Kinase ERK (*engl. extracellular-signal-regulated kinase*) aktiviert. ERK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die zahlreiche Zielproteine phosphoryliert, z.B. die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und c-myc, die Kinasen SHP-2 (*engl. SH2-containing protein tyrosine phosphatase*) und Phospholipase A₂ sowie Elemente des Cytoskeletts (Denhardt 1996). Außerdem trägt ERK zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT (*engl. nuclear factor of activated T cells*) und AP-1 (*engl. activator protein 1*) bei, die in T-Zellen die Expression von IL-2 induzieren (Genot et al. 1996). Auf diese Weise aktiviert ERK verschiedene zelluläre Programme wie Proliferation oder Differenzierung.

Die korrekte Signalübertragung innerhalb des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges wird durch die hohe Spezifität der beteiligten Kinasen und eine Reihe anderer Mechanismen sichergestellt. So spielt beispielsweise das Chaperon Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) bei der Stabilisierung von Raf eine Rolle (Schulte et al. 1995) und Adapterproteine wie MP1 (MEK-Partner 1) oder KSR (*engl. kinase suppressor of ras*) unterstützen die Interaktion der einzelnen Komponenten des Signalwegs (Schaeffer et al. 1998; Morrison 2001). Die Signalmoleküle können durch Phosphatasen, z.B. Serin/Threonin-Phosphatasen wie PP2A (Protein-phosphatase 2A), Protein-Tyrosin-Phosphatasen wie PTP (Proteintyrosin-phosphatase) oder im Kern lokalisierte Protein-Phosphatasen wie MKP-1 (MAPK-Phosphatase), in ihren inaktiven Grundzustand überführt werden (Denhardt 1996; Kolch 2000). All dies spielt eine wichtige Rolle, um die Dauer und Stärke der Aktivierung des ERK-Signalwegs zu kontrollieren.

1.4 Das Chemokin SDF-1 α – mehr als nur ein chemotaktisches Protein

1.4.1 Das Chemokin SDF-1 α – Allgemeine Informationen

Das Chemokin SDF-1 α (*engl. stromal cell-derived factor 1 α*), ein Mitglied der Chemokin-CXC-Unterfamilie, ist im Körper weit verbreitet. Es wird sowohl in primären und sekundären lymphatischen Geweben (Cyster 1999; Moser and Loetscher 2001) als auch in nicht-lymphatischen Geweben wie Gehirn, Herz, Niere, Leber und Lunge produziert. Die weite Verbreitung und konstitutive Expression von SDF-1 α sowie die Tatsache, dass die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz von SDF-1 α hoch konserviert ist (Shirozu et al. 1995), deuten auf eine wichtige biologische Funktion dieses Chemokins hin. Zuerst beschrieben wurde SDF-1 α als Wachstumsfaktor für Vorläuferzellen der B-Lymphozyten (Nagasawa et al. 1994). Seitdem wurde SDF-1 α mit zahlreichen weiteren zellulären Effekten in verschiedenen Zelltypen in Verbindung gebracht. Die Hauptfunktion von SDF-1 α ist dabei die Induktion der Zellmigration, beispielsweise bei Lymphozyten, myeloiden Vorläuferzellen und Stammzellen.

Die entwicklungsbiologische Relevanz von SDF-1 α und dessen spezifischem Chemokin-Rezeptor CXCR4, einem heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wurden durch Untersuchungen mit Mäusen demonstriert, bei denen das entsprechende Gen für SDF-1 α bzw. CXCR4 gentechnisch ausgeschaltet wurde. SDF-1 α -defiziente Mäuse sterben perinatal. Die Embryos weisen eine reduzierte Zahl an B-Vorläuferzellen in Leber und Knochenmark auf, sowie eine reduzierte Zahl an myeloiden Vorläuferzellen in der Leber. Dies weist darauf hin, dass SDF-1 α eine Rolle bei der Entwicklung von B-Zellen spielt. Außerdem zeigen die Mutanten einen kardialen Ventrikelseptumdefekt (Nagasawa et al. 1996), eine Fehlbildung der Blutgefäße des Gastrointestinaltrakts (Tachibana et al. 1998) sowie eine abnorme Entwicklung des Zerebellums. Da SDF-1 α eine wichtige Funktion bei der Zellmigration besitzt, könnte der Grund für diese Fehlbildungen ein gestörtes Migrationsverhalten von Vorläuferzellen der verschiedenen Organe während der Embryonalentwicklung sein. Die Tatsache, dass CXCR4-defiziente Mäuse einen sehr ähnlichen Phänotyp besitzen, spricht für eine monogame Beziehung zwischen SDF-1 α und CXCR4 (Ma et al. 1998). In Bezug auf die T-Zell-Entwicklung wurden in SDF-

1α - und CXCR4-defizienten Mäusen keine Defekte festgestellt, jedoch deuten Untersuchungen mit chimären Mäusen auf eine Funktion von SDF- 1α und CXCR4 bei der Expansion von T-Vorläuferzellen im Thymus hin (Ara et al. 2003). Da SDF- 1α nur geringfügig das Überleben von unreifen Thymozyten fördert, jedoch eine große chemotaktische Wirkung auf diese hat, wird vermutet, dass die hauptsächliche Funktion von SDF- 1α darin besteht, die Thymozyten an die richtige Stelle im Thymus zu locken. In der Nähe der SDF- 1α -exprimierenden Stromazellen erhalten die frühen T-Vorläuferzellen anti-apoptotische und proliferationsfördernde Signale von anderen Cytokinen wie SCF (*engl. stem cell factor*) und IL-7. SDF- 1α und CXCR4 spielen also bereits bei der Entwicklung der T-Zellen im Thymus, vor allem bei der Lokalisierung der frühen T-Vorläuferzellen in den richtigen Thymusregionen, eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund ist die Untersuchung ihrer Funktion bei reifen T-Zellen anhand von Mausmodellen schwierig. Für das Verständnis der Regulation von T-Lymphozyten durch SDF- 1α ist daher die Untersuchung der involvierten Signalwege auf zellulärer Ebene wichtig. Versteht man den Effekt dieses Chemokins auf die einzelne T-Zelle, kann man Rückschlüsse auf die Funktion bei der Immunreaktion ziehen.

SDF- 1α aktiviert durch Bindung an seinen spezifischen Chemokin-Rezeptor CXCR4 zahlreiche Signalwege in der Zelle, von denen einige in Abb.1.4 dargestellt sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung aller Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen verzichtet). Durch Aktivierung des zentralen Signalmoleküls PLC γ (Phospholipase C γ) erfolgt die transiente Induktion des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs sowie die Freisetzung von intrazellulärem Ca $^{2+}$. Diese Signalwege tragen, genau wie der ebenfalls aktivierte Jak-Stat-Signalweg (Zhang et al. 2001), durch die Regulierung von Transkriptionseignissen zu zellulären Prozessen wie Proliferation und Migration bei. Die Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) führt zur Induktion von Signalmolekülen, welche auch eine Rolle bei der Reorganisation des Actin-Cytoskeletts spielen, wie z.B. Paxillin und Fak (*engl. focal adhesion kinase*) (Ganju et al. 1998). Weiterhin wird durch SDF- 1α die Aktivierung kleiner GTPasen der Rho-Familie induziert (Vicente-Manzanares et al. 2002), die im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

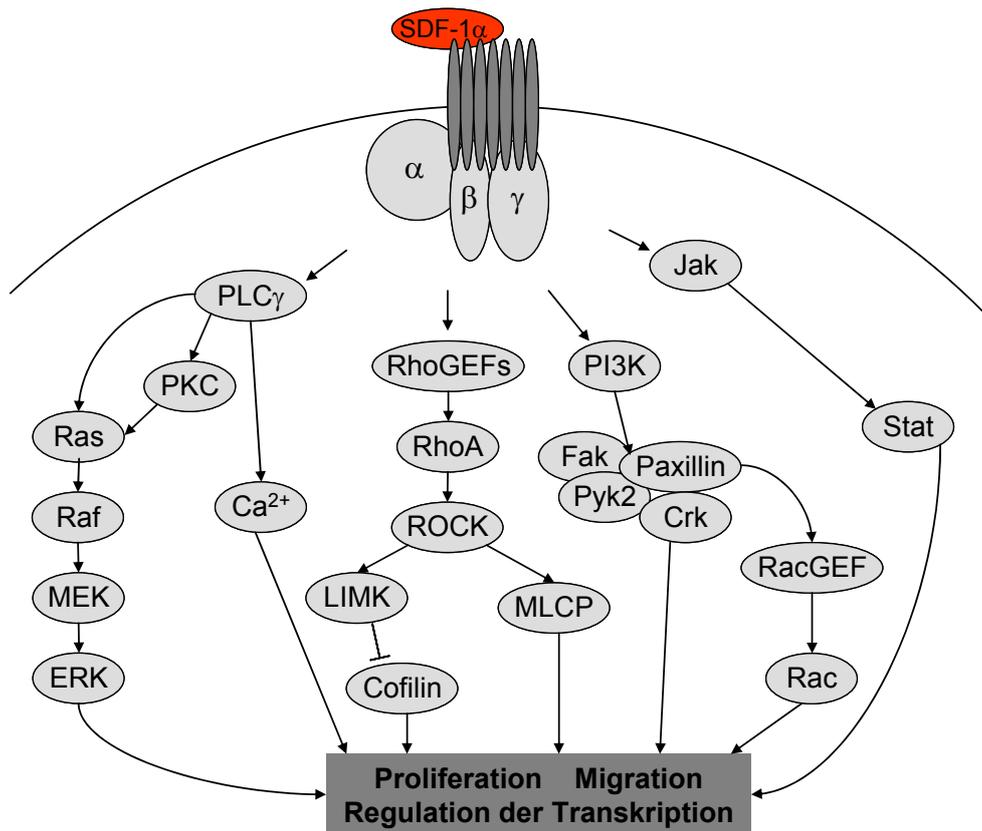


Abb.1.4 SDF-1 α -induzierte Signalwege.

Wachsendes Interesse an CXCR4 entstand durch die Identifizierung dieses Rezeptors als Co-Rezeptor für T-trope HIV-Stämme. Die Interaktion des HIV-Glykoproteins gp120 ermöglicht dem Virus den Eintritt in die Zelle (Feng et al. 1996). Die Interaktion von gp120 mit CXCR4 induziert mehrere Signalwege in T-Zellen, welche zur viralen Replikation beitragen (Popik et al. 1998). Außerdem induziert gp120, das von infizierten Zellen gebildet wird, bei nicht-infizierten T-Zellen durch Bindung an CXCR4 Apoptose (Westendorp et al. 1995; Berndt et al. 1998).

1.4.2 RhoA – ein Schlüsselprotein bei SDF-1 α -induzierten Signalereignissen

Der Name Rho ist abgeleitet von „Ras homologue“. Die Familie der Rho-Proteine, zu der Rho (A, B, C), Rac (1, 2, 3), Cdc42 und TC10 (Bishop and Hall 2000) gehören, ist ein Teil der Ras-Superfamilie. Erstmals beschrieben wurde das Rho-Gen in *Aplysia* (Madaule and Axel 1985); das Rho-Gen von Säugetieren wurde 1987 identifiziert (Yeramian et al. 1987). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind Signalmoleküle,

die nach Ligandenbindung an heptahelikale Membranrezeptoren unter Vermittlung von heterotrimeren G-Proteinen aktiviert werden (Buhl et al. 1995; Gohla et al. 1999), so zum Beispiel durch LPA (*engl. lysophosphatidic acid*), Sphingosin-1-phosphat, Bombesin, Thrombin und Endothelin (Kjoller and Hall 1999), SDF-1 α und fMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) (Laudanna et al. 1996; Vicente-Manzanares et al. 2002).

Ein charakteristisches Merkmal der Rho-GTPasen ist, dass sie in der GTP-gebundenen Form aktiv und in der GDP-gebundenen Form inaktiv sind. Dieser Aktivitätszustand wird intrazellulär hauptsächlich durch drei verschiedene Faktoren reguliert: GEFs (*engl. guanine nucleotide exchange factors*) beschleunigen den Austausch von GDP durch GTP und fördern damit den Übergang in den aktiven Zustand (Cerione and Zheng 1996). GAPs (*engl. GTPase activating proteins*) vermitteln die Inaktivierung von Rho, indem sie die Hydrolyse von GTP aktivieren (Ridley et al. 1993). GDIs (*engl. guanine nucleotide dissociation inhibitors*) können die GTPasen entweder im aktiven oder im inaktiven Zustand fixieren (Fukumoto et al. 1990).

Bisher ist noch nicht genau bekannt, welche Faktoren die SDF-1 α -induzierte Aktivierung der Rho-GTPasen vermitteln. In Bezug auf die kleine GTPase RhoA ist jedoch beschrieben, dass bei deren Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren im Allgemeinen die G $_{\alpha 12/13}$ -Untereinheit über p115RhoGEF (Kozasa et al. 1998; Wells et al. 2001) bzw. die G $_{\alpha q/11}$ -Untereinheit über LARG (*engl. leukemia associated RhoGEF*) (Vogt et al. 2003) eine Rolle spielen.

RhoA hat in der Zelle viele unterschiedliche Funktionen, die über Rho-abhängige Signalwege induziert werden und entweder die Transkription neuer Proteine oder die Modifikation bereits vorhandener Proteine erfordern. Für RhoA charakteristisch ist die Bildung von Stressfasern. Außerdem induziert RhoA die Reorganisation des Actin-Cytoskeletts und trägt so zur Motilität von Zellen bei. Durch klassische biochemische Verfahren und Hefe-Zwei-Hybrid-Ansätze sind eine Reihe von Effektorproteinen identifiziert worden, an die Rho-GTP bindet und welche die zellulären Effekte der Rho-Aktivierung vermitteln. Hierzu zählen Proteinkinasen wie ROCK (*engl. Rho-associated coiled-coil containing kinase*), PKN (Proteinkinase N) und Citron, Lipid-Kinasen wie PIP5-Kinase und DAG-Kinase (Diacylglycerol-Kinase) sowie die Adapterproteine Kinectin und Dia (*engl. Diaphanous-related formin protein*), aber auch Zielproteine ohne offensichtliche katalytische Domäne wie Rhotekin oder

Rhopilin (Aspenstrom 1999). Die Aktivierung der Effektoren durch GTP-gebundenes RhoA erfolgt meist durch Unterbrechung intramolekularer autoinhibitorischer Interaktionen, wodurch funktionelle Domänen im Effektor-Protein freigesetzt werden. Die Rho-Effektoren ROCK und PKN enthalten beispielsweise solche autoinhibitorischen Domänen (Takahashi et al. 1998; Yoshinaga et al. 1999). Auch das Adapterprotein Dia wird durch autoinhibitorische Domänen in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Bindung von GTP-gebundenem RhoA an eine N-terminale Sequenz hebt diese Inhibierung auf (Watanabe et al. 1999).

Am besten untersucht sind die Effekte von RhoA in Fibroblasten. Dort wurde erstmalig gezeigt, dass RhoA die Reorganisation des Actin-Cytoskeletts induziert und damit Veränderungen von Zellform und Motilität vermittelt (Ridley and Hall 1992). Bei der für RhoA spezifischen Bildung von Stressfasern spielen die Rho-Effektoren ROCK und Dia eine Rolle. Aktives RhoA bindet an ROCK und bewirkt dadurch die Aktivierung dieser Kinase. ROCK phosphoryliert daraufhin die Myosin-bindende Untereinheit (MBS, *engl. myosin-binding subunit*) der MLC-Phosphatase (MLC = *engl. myosin light chain*), welche infolgedessen inaktiviert wird (Kimura et al. 1996). Daraus resultiert die Akkumulierung der phosphorylierten Form der leichten Kette des Myosins (MLC), welche die Bindung von Myosin-Actin-Filamenten und damit die Bildung von Stressfasern erhöht (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996). ROCK kann die leichte Kette des Myosins auch direkt phosphorylieren. Außerdem geht von ROCK ein weiteres Signal aus, durch das die LIM-Kinase aktiviert wird, welche dann Cofilin inaktiviert. Daraus resultiert eine Stabilisierung der Actin-Filamente (Maekawa et al. 1999). In einem weiteren Signalweg induziert aktives RhoA die Erhöhung der Actin-Polymerisierung durch Dia (Watanabe et al. 1999). Auch die Stimulierung der PIP₂-Synthese (PIP₂ = Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphatase) durch RhoA (Chong et al. 1994) spielt bei der Bildung von Stressfasern eine Rolle: PIP₂ induziert eine Konformationsänderung von Vinculin, welches dadurch mit Talin interagieren kann. Talin bindet an Actin und bewirkt so die Reorganisation des Actin-Cytoskeletts (Gilmore and Burridge 1996). Die RhoA-induzierte Reorganisation des Actin-Cytoskeletts spielt eine Rolle bei der Cytokinese (Kosako et al. 2000) und beeinflusst die Zellmorphologie und die Zellmigration. Auch in T-Zellen vermittelt RhoA nach Aktivierung durch Chemokine wie SDF-1 α (*engl. stromal cell-derived factor 1 α*) oder fMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) Veränderungen des Cytoskeletts und trägt damit zur Motilität der T-Zellen bei

(Laudanna et al. 1996; Vicente-Manzanares et al. 2002).

Eine weitere zelluläre Funktion von RhoA ist die Beeinflussung von Transkriptionsereignissen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF (*engl. serum response factor*). SRF kontrolliert die Expression früher Gene, so genannter „immediate-early genes“, sowie in T-Zellen die Expression von IL-2. Stimulierung von Zellen mit Serum oder LPA führt über einen RhoA-abhängigen Signalweg zur Aktivierung des SRF (Hill et al. 1995; Sotiropoulos et al. 1999). Zwei RhoA-induzierte Signalwege sind an der Induktion des SRF beteiligt (Tominaga et al. 2000; Copeland and Treisman 2002; Geneste et al. 2002). Der ROCK-LIM-Kinase Signalweg stabilisiert, wie oben bereits beschrieben, durch Inaktivierung von Cofilin das F-Actin, während der RhoA-Dia Signalweg die Actin-Polymerisierung erhöht. Die SRF-Aktivierung resultiert aus der Entfernung des G-Actin, da eine Überexpression von Actin-Derivaten, die nicht polymerisieren können, die Aktivierung des SRF hemmen (Posern et al. 2002).

Weitere zelluläre Effekte von RhoA werden durch Interaktion dieser kleinen GTPase mit anderen Signalkaskaden vermittelt. In Fibroblasten wurde beispielsweise gezeigt, dass konstitutiv aktives RhoA den Ras-induzierten Anstieg der p21^{Waf1/Cip1}-Synthese antagonisiert (Olson et al. 1998). Der Mechanismus hierfür ist noch unbekannt; es wurde lediglich gezeigt, dass RhoA nicht mit der Ras-induzierten ERK-Aktivierung interferiert. In T-Zellen wurde gezeigt, dass aktives RhoA mit der Ras-induzierten Phosphorylierung von ERK interferiert (Weg-Remers et al. 2002).

1.4.3 SDF-1 α kooperiert mit anderen extrazellulären Signalen

Interessant ist, dass SDF-1 α oft Effekte, die von anderen extrazellulären Stimuli induziert werden, unterstützt oder sogar verstärkt. So unterstützt SDF-1 α das Cytokin-vermittelte Überleben humaner Leukämie-B-Zell-Vorläufer (Nishii et al. 1999) und verstärkt das Überleben myeloider Vorläuferzellen durch Kooperation mit den Cytokinen GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor), SLF (Steel-Faktor) und TPO (Thrombopoietin), was zu einer synergistischen Stimulierung des anti-apoptotischen ERK- sowie Akt-Signalwegs führt (Lee et al. 2002). In CD4-positiven T-Zellen erhöht SDF-1 α die anti-CD3-induzierte Proliferation sowie die Produktion von IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-10 und wurde daher als Co-Stimulus der T-Zell-Aktivierung beschrieben (Nanki and Lipsky 2000; Nanki and Lipsky 2001).

SDF-1 α scheint also in Kooperation mit anderen Signalen, die durch Cytokine oder T-Zell-Rezeptor-Stimulierung initiiert werden, eine Art „Feinabstimmung“ zellulärer Prozesse zu vermitteln.

1.5 Fragestellung

Die Homöostase der Lymphozyten ist für eine effektive Immunantwort sehr wichtig. Deshalb wird die Proliferation durch extrazelluläre Faktoren wie Cytokine und Chemokine streng reguliert. Das ubiquitär exprimierte Chemokin SDF-1 α , dem zirkulierende T-Lymphozyten ständig ausgesetzt sind, wurde bereits als Co-Aktivator der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation beschrieben (Nanki und Lipsky, 2000). Die Frage war nun, ob SDF-1 α auch die Cytokin-induzierte Proliferation der T-Zellen beeinflusst und auf diese Weise zur T-Zell-Homöostase beiträgt.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob und wie SDF-1 α die IL-2-induzierte T-Zell-Proliferation beeinflusst. Dabei sollten eventuelle Interaktionen der involvierten Signalereignisse untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien sowie ihre Bezugsquellen aufgelistet.

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
30% Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	peqLab, Erlangen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Otto Nordwald KG, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete-Tabletten, EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
ConcanavalinA (ConA)	Sigma, Taufkirchen
Coomassie brilliant Blau G-250	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ficoll-Paque PLUS	Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Agarose	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma, Taufkirchen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Luziferin	Promega, Mannheim

Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Promochem GmbH, Wesel
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Protein-G-Agarose	Calbiochem, Darmstadt
Puffer-gesättigtes Phenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Xylenzyanol	BioRad, München

Tabelle 2.1 Allgemeine Chemikalien

2.1.2 Zellkulturchemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe
HEPES-Puffer (1 M, pH 7,2-7,5)	Gibco, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol (50mM)	Gibco, Karlsruhe
PBS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Pen., 10.000 µg/ml Strep.)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe

Tabelle 2.2 Zellkulturchemikalien

2.1.3 Kits und sonstige Reagenzien

Kit	Bezugsquelle
Annexin V Apoptosis Detection Kit	Santa Cruz, Heidelberg
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics, Mannheim
Human T Cell Nucleofector Kit	Amaya, Köln
ECL Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
PeqGOLD Prestained Protein Marker	PeqLab, Erlangen
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.3 Kits und sonstige Reagenzien

2.2 Plasmidkonstrukte

Plasmid	Bezugsquelle
pRK5myc	zur Verfügung gestellt von Alan Hall
pRK5myc-RhoAL63	
pRK5myc-RhoAL63-F39A	im eigenen Labor durch Mutagenese des Plasmids pRK5myc-RhoAL63 hergestellt
pRK5myc-RhoAL63-F39V	
pRK5myc-RhoAL63-E40L	
pRK5myc-RhoAL63-E40N	
pRK5myc-RhoAL63-Y42C	
pRK5myc-HaRasL61	zur Verfügung gestellt von Alan Hall
pRK5myc-RacL61	
pRK5myc-RacL61-F37A	
pRK5myc-RacL61-Y40C	
pSG-Gal4-Elk1 (Gal-Elk)	zur Verfügung gestellt von Peter Shaw
pG5.Ef Δ lux3 (Gal-Luc)	
pCR-CXCR4	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program
pGEX-Raf-RBD	aus dem eigenen Institutsbestand
MEK1-DD	zur Verfügung gestellt von Axel Knebel
Raf-BXB	zur Verfügung gestellt von Ulf R. Rapp
pSRE-Luc	Stratagene, USA

Tabelle 2.4 Plasmidkonstrukte

2.3 Antikörper und Proteine

2.3.1 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Primärantikörper für Western Blot	
Anti-c-Myc (9E10)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Erk1 (K-23)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-MEK-1 (H8)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PAK	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-cRaf (Ser259)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-cRaf (Ser338)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-MEK1/2 (Ser 217/221)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-p44/p42 MAPK (Thr 202/Tyr 204)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-PAK1(Thr423)/PAK2(Thr402)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Raf-1 (C-12)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Ras10	Upstate, Hamburg
Anti-RhoA (26C4)	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper für Western Blot	
Alexa Fluor 680 Anti-Maus IgG	Molecular Probes
Anti-Kaninchen HRP	Dako, Hamburg
Anti-Maus HRP	Dako, Hamburg
Anti-Ziege HRP	Dako, Hamburg
IRDye 800 Anti-Kaninchen IgG	Rockland
Antikörper für die Durchflusszytometrie	
Anti-human CD3-FITC (UCHT-1)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-CXCR4-PE (12G5)	Pharmingen, Heidelberg
Antikörper zur Stimulierung von Zellen	
Anti-human CD28	Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD3 (UCHT-1)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-Fas (CH-11)	Mobitec, Göttingen

Tabelle 2.5 Antikörper

2.3.2 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Gibco (Karlsruhe) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.3.3 Rekombinante Proteine

Protein	Bezugsquelle
CNFy	zur Verfügung gestellt von Gudula Schmidt
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
gp120	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program
GST-MEK	zur Verfügung gestellt von Veronique Orian-Rousseau
GST-Raf-RBD	eigene Produktion (s. Kapitel 3.2.7)
SDF-1 α	R&D Systems, Wiesbaden

Tabelle 2.6 Rekombinante Proteine

2.4 siRNA

Bezeichnung	Zielsequenz	Bezugsquelle
Control siRNA	keine Zielsequenz	Santa Cruz, Heidelberg
Hs_RHOA3_HP siRNA	Zielsequenz: TAC CTT ATA GTT ACT GTG TAA	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.7 siRNA

2.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bakterien-Petrischalen (94 mm)	Greiner, Frickenhausen
Bakterien-Schüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank (Temperatur)	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Temperatur, CO ₂)	Labotect, Göttingen
Branson Sonifier	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Discovery M120SE Ultrazentrifuge	Sorvall, Langenselbold
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Elektrophorese-Apparatur	von eigener Werkstatt hergestellt
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elektroporator (E.coli Pulser)	BioRad, München
Elektroporator (Gene Pulser)	BioRad, München
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Feinwaage AE163	Mettler, Giessen
Film-Entwicklungsmaschine	Kodak, Stuttgart
Geltrockner Modell 583	BioRad, München
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Kanülen	neoLab, Heidelberg
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Avanti J-20	Beckman, Stuttgart
Kühlzentrifuge Centrikon H-401	Hermle, Gosheim
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Lumat LB9501	Berthold, Bad Wildbad
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop (ID02)	Zeiss, Jena
Netzgerät EPS 2A200	Hoefer Scientific Instruments, USA
Neubauer-Zählkammer	VWR, Bruchsal
Nucleofector II	Amaxa, Köln
Odyssey-Infrared-Imager	Li-cor Biosciences, Bad Homburg
PP-Röhrchen (15 ml)	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran Immobilon	Millipore, Schwalbach
Schüttler Polymax 2040	Heidolph, Kehlheim
Semidry-Blotter	H.Hölzel GmbH, Hörlkofen
Spritzen	neoLab, Heidelberg
Sterilfilter	Renner GmbH, Dannstadt
Tisch-Kühlzentrifuge Z233MK	Hermle, Gosheim
Tisch-Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiscan Plus MKII	Flow Laboratories, Meckenheim
UV-Gerät Eagle Eye	Stratagene, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Gerät	Bender und Hobein, Karlsruhe
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Western Blot Transfer-Kammer	BioRad, München
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen (versch. Ausführungen)	Greiner, Frickenhausen

Tabelle 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.6 Bakterien und eukaryotische Zellen

2.6.1 Bakterien

BL21(DE3)pLysS Zellen	Genotyp:
<i>(erhältlich bei Invitrogen, Karlsruhe)</i>	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam ^R)
TOP10	Genotyp:
<i>(erhältlich bei Invitrogen, Karlsruhe)</i>	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZ ΔM15ΔlacX74 recA1 deoR araD139Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (Str ^R) endA1nupG

2.6.2 Eukaryotische Zellen

Jurkat E6.1	humane T-Lymphom-Zell-Linie (Weiss et al. 1984; Sladowski et al. 1993), bezogen von ECACC
Primäre humane T-Zellen	isoliert aus Leukozyten-Konzentraten (s. Kapitel 3.4.2), die freundlicherweise von Dr. Ruf (ZLMT, Städtisches Klinikum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt wurden

2.7 Zellkultur-Medien

2.7.1 Medien zur Kultur von Bakterien

Agar-Platten:

15 g Bacto-Agar auf 1000 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin

LB-Medium:

1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl

SOB:

2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

SOC:

10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose in SOB

2.7.2 Medien zur Kultur von eukaryotischen Zellen

Kultur-Medium für Jurkat-Zellen und primäre humane T-Zellen:

RPMI, 10% FBS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin

Wasch-Medium für mononukleäre Zellen:

RPMI, 10% FBS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES (pH 7,2-7,5), 0,05 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Glutamin

Einfrier-Medium für Jurkat-Zellen:

10% DMSO in Medium

Einfrier-Medium für primäre humane T-Zellen:

10% DMSO in FCS

2.8 Puffer und Lösungen

Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das mit Hilfe eines Milli-Q Reinstwasser-Systems der Firma Millipore (Schwalbach) entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt.

Bradford-Lösung:

100 mg Coomassie Brilliant-Blau G-250, 50 ml 95% Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure, mit H₂O auf 1000 ml; filtrieren

Calcium-Bindungspuffer:

10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

Coomassie-Blau-Färbelösung:

10% Essigsäure, 0,006% Coomassie Brilliant-Blau G-250, 90% H₂O

FACS-Medium:

PBS mit 3% FCS

Fixierungslösung (Coomassie):

25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 65% H₂O

GlyGly-Puffer pH 7,8:

25 mM GlyGly, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA (pH mit NaOH einstellen)

GTLB1:

50 mM Tris pH 8, 40 mM EDTA, 25% Saccharose, 1 mM PMSF, 1 Complete-Tablette (EDTA-frei)

GTLB2:

50 mM Tris pH 8, 100 mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 Complete-Tablette (EDTA-frei)

10x Laemmli-Puffer:

25 mM Tris pH 8,6, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Luziferin-Reaktionslösung:

0,2 mM Luziferin in GlyGly-Puffer

Lysepuffer pH 7,5 (Luziferase-Reporter-Test):

0,1 M Tris-acetat, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 (pH mit Essigsäure einstellen)

Lysepuffer (RasGTP-Affinitätspräzipitation) :

25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0,25% Natriumdeoxycholat, 10% Glycerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM Natrium-orthovanadat, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin

PBS-Waschpuffer :

1mM DTT und 0,2% Tween-20 in PBS

PCI:

Puffer-gesättigtes Phenol + Chloroform/Isoamylalkohol 1 : 1

2x Probenpuffer :

2% SDS, 10% Glycerol, 60 mM Tris pH 6,8, 0,001% Bromphenolblau, 100 mM DTT

Reaktionspuffer (Luziferase-Reporter-Test):

2 mM ATP, 1 mM DTT in GlyGly-Puffer

Reaktionspuffer (Raf-Kinase-Test):

20 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT

RIPA-Puffer:

10% Glycerol, 20 mM Tris pH 8, 137 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0,1% SDS, 0,5% Natriumdeoxycholat, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 5 mM Natriumorthovanadat

10x Stopmix:

0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylenzanol, 50% Glycerol

„Stripping“-Lösung:

62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 50 mM DTT

50x TAE pH 7,9:

121 g Tris, 28,55 ml Essigsäure, 50 ml 0,5 M EDTA pH 8, mit H₂O auf 500 ml auffüllen, pH mit Eisessig einstellen

10x TBS:

200 mM Tris pH 7,6, 1,4 M NaCl

TBS-Tween:

0,2% Tween20 in TBS

TE:

10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8

Transfer-Puffer für Western Blot (Semidry-Blotter):

192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,01% SDS, 20% Methanol

Transfer-Puffer für Western Blot (Transfer-Kammer):

25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol

Waschpuffer (Raf-Kinase-Test):

10mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5% NP-40, 20 µg/ml Aprotinin

3 Methoden

3.1 Methoden zur Modifikation und Analyse von DNA

3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA (Kleinmaßstab)

Plasmid-DNA im Kleinmaßstab („Minipreps“) wurden mit den Puffern des „Qiagen Plasmid Purification Kits“ für Maxipreps durchgeführt. Das Aufbrechen der Bakterien erfolgt dabei durch die im Puffer P2 enthaltenen Reagenzien SDS und NaOH (alkalische Lyse). Die anschließende Zugabe von Kaliumacetat (Puffer P3) bewirkt die Präzipitation der chromosomalen DNA und der Proteine, welche dann durch Zentrifugation entfernt werden.

3-5 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin wurden mit Bakterien, die das entsprechende Plasmid enthielten, angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden ca. 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 11.000 upm 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Puffer P2 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer P3 folgten weitere 3 min auf Eis. Der Ansatz wurde 30 min bei 10.000 upm in der Tisch-Kühlzentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung (siehe Abschnitt 3.1.4) aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA in 20-50 µl TE aufgenommen.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA (Großmaßstab)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine „Maxiprep“ mit dem „Qiagen Plasmid Purification Kit“ durchgeführt. Die Lyse der Bakterien funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie bei der „Miniprep“ (siehe Abschnitt 3.1.1) Hinzu kommt hier die Isolierung der Plasmide mit Hilfe einer Ionen-Austausch-Säule.

200 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin, je nach Resistenzgen auf dem entsprechenden Plasmid, wurden mit Bakterien (die das entsprechende Plasmid enthalten) angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 5000 upm 15 min in der Kühlzentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 (50 mM TrisCl, 10 mM EDTA, pH 8) + 100 µg/ml RNaseA resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS)

5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) folgten weitere 20 min auf Eis. Der Ansatz wurde 30 min bei 10.000 upm in einer Centrikon H-401 Kühlzentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Den Überstand ließ man durch eine vorher mit 10 ml QBT Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) equilibrierte Säule (Qiagen) laufen. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% Isopropanol) gewaschen und anschließend mit 15 ml QF Puffer (1,25 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,5, 15% Isopropanol) in ein 30 ml Corex-Röhrchen eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 vol (= 10,5 ml) Isopropanol präzipitiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 9000 upm und 4°C für 30 min in einer Avanti J-20 Kühlzentrifuge wurde die DNA zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde nach dem Trocknen in 200-500 µl TE aufgenommen. Es folgten Konzentrationsmessung und Restriktionsverdau zur Überprüfung des Plasmids.

3.1.3 DNA-Konzentrationsmessung

Bei der Konzentrationsbestimmung einer wässrigen DNA-Probe macht man sich die Absorptionseigenschaft der DNA für UV-Licht zunutze. DNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei einer Extinktion von 1 hat doppelsträngige DNA zum Beispiel eine Konzentration von 50 mg/ml. Zusätzlich wird die Absorption bei 280 nm bestimmt, da bei dieser Wellenlänge Proteine absorbieren, die die Probe verunreinigen können. Der Quotient A_{260}/A_{280} zeigt deshalb die Reinheit der Probe an. Die Messung der wässrigen DNA-Probe erfolgte in UV-Küvetten und wurde in einem BioPhotometer von Eppendorf durchgeführt.

3.1.4 Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Die DNA wurde in einem Volumen von 250 µl aufgenommen. Hinzugefügt wurden 250 µl PCI (Puffer-gesättigtes Phenol + Chloroform/Isoamylalkohol 1:1), das Gemisch wurde gut gemischt und 5 min bei 10.000 upm in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA wurde nach Zugabe von 25 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 ml Ethanol reinst. mindestens 15 min auf Eis durchgeführt (oder bei -20°C gelagert). Die DNA wurde 15 min bei 10.000 upm

abzentrifugiert. Die DNA wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

3.1.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktions-Endonukleasen schneiden DNA an bestimmten Erkennungs-Sequenzen. Die Reaktion wurde folgendermaßen angesetzt:

- 1-2 µg DNA
- + 0,1x Endvolumen des entsprechenden 10x Puffer
- + 10 U/µg DNA jedes Restriktionsenzym
- + H₂O (bis das gewünschte Endvolumen erreicht ist)

Das Endvolumen sollte mehr als das 10-fache Volumen des zugegebenen Volumens an Restriktionsenzymen sein. Die Reaktion wurde 1-18 h bei 37°C (bzw. bei der vom Hersteller angegebenen idealen Arbeitstemperatur des Restriktionsenzym) durchgeführt. Der Verdau wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

3.1.6 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird eine elektrische Spannung an ein Agarosegel angelegt. DNA wandert aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen des Doppelhelix-Rückgrats zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit, mit der ein DNA-Molekül durch das Gel wandert, durch dessen Größe festgelegt. Dies ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Molekülen verschiedener Länge. Die DNA wird mit Ethidiumbromid angefärbt. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV (260-360 nm) rot-orange (560 nm).

Je nach gewünschter Konzentration des Gels wurden 1-2% Agarose in 1xTAE durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe von 0,25 µg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gegossen. Dann wurde sofort der Kamm eingesetzt, damit sich Proben-Taschen ausbilden können. Nach dem Erkalten des Gels wurde dieses mit 1x TAE übergossen; anschließend wurde der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit Stopmix gemischt. Durch das Glycerol im Stopmix wurde die Dichte der Probe erhöht, so dass diese beim Auftragen auf das Gel in die Geltasche sinkt. Die Proben und der DNA-Molekulargewichts-Marker wurden in die Geltaschen gefüllt. Der Gel-Lauf dauerte bei 75 V ca. 1 h. Danach wurde das Gel auf dem UV-Tisch angeschaut und fotografiert.

3.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.2.1 Bradford-Methode

Bei der Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung mit der Bradford-Methode wird die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant-Blau an Proteine photometrisch (bei 595 nm) gemessen. Die Intensität der Blaufärbung ist proportional zum Proteingehalt der Lösung. Um aus der gemessenen Extinktion die Proteinmenge ermitteln zu können, wird eine Eichgerade mit verschiedenen BSA-Mengen erstellt. Mit der Bradford-Methode kann man 1-10 µg Protein quantifizieren.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden die Aliquots der zu analysierenden Proben bzw. die verschiedenen BSA-Mengen für die Eichkurve mit 0,15 M NaCl auf 100 µl aufgefüllt. Je Probe wurde 1 ml Bradford-Lösung zugegeben, gut gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm in einem BioPhotometer von Eppendorf.

3.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) trennt Proteine unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt nach ihrem Molekulargewicht auf. Die am weitesten verbreitete Methode stammt von Laemmli (Laemmli 1970).

Die zu analysierende Probe:

Zur Herstellung von Gesamtzell-Lysaten wurden die Zellen geerntet und in 2x Probenpuffer lysiert. Danach wurde das Lysat durch eine 26G-Kanüle gezogen, um die DNA zu scheren. Nach 5 min Zentrifugieren bei 10.000 upm und 4°C in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge zur Sedimentation der gescherten DNA-Fragmente wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 95°C gekocht. Dies diente der Denaturierung der Proteine in den Lysaten. Die Probe wurde dann mittels SDS-PAGE sofort analysiert bzw. bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Das SDS-Gel:

Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel (große Poren, niedrige Salzkonzentration, niedriger pH-Wert), in dem die Proteinbanden fokussiert werden, und einem Trenngel (kleine Poren, hohe Salzkonzentration, hoher pH-Wert), in dem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Zunächst wurden mit 70% Ethanol gereinigte Glasplatten mit Abstandshaltern

zusammengesetzt und abgedichtet. Dann wurde das Trenngel zwischen die Platten gegossen. Die Zusammensetzung ist hier beispielhaft für ein 10%iges Trenngel angegeben, je nach Größe der Proteine wurden auch 7,5%ige und 15%ige Gele verwendet.

Trenngel 10% :	8,3 ml	30% Acrylamid
	6,25 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	10,05 ml	H ₂ O
	125 µl	20% SDS

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels zwischen die Glasplatten wurden

250 µl	10% APS
25 µl	TEMED

zugegeben. APS initiiert die Polymerisierung, TEMED beschleunigt diese Reaktion, indem es die Bildung freier Radikale aus APS katalysiert. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren (mindestens 1 h) wurde das Sammelgel gegossen, welches sich wie folgt zusammensetzt:

Sammelgel 5% :	1,7 ml	30% Acrylamid
	1,25 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	6,75 ml	H ₂ O
	50 µl	20% SDS

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels zwischen die Glasplatten wurden

100 µl	10% APS
10 µl	TEMED

zugegeben. Sofort wurde der Kamm eingesetzt, damit sich Taschen für die Proben ausbilden konnten. Nach 1 h konnte das Gel dann geladen werden. Dazu wurden die Proben, nach ihrer Erhitzung mit 2x Probenpuffer für 5 min, mit einer Hamilton-Spritze ebenso wie der Protein-Längenstandard auf das Gel geladen. Der Lauf erfolgte 1 h bei 120 V und weitere 1-2 h bei 160 V.

3.2.3 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde zunächst 60 min bei RT in Fixierungslösung vorsichtig geschüttelt, um die Proteine im Polyacrylamid-Gel zu präzipitieren. Danach wurde die Fixierungslösung durch Coomassie-Blau-Färbelösung ersetzt und das Gel so lange darin geschüttelt, bis die Banden die gewünschte Intensität hatten. Zur Entfärbung wurde das Gel in 10% Essigsäure geschüttelt. Dabei wird lediglich der Hintergrund

entfärbt, die Proteinbanden bleiben blau. Sobald die gewünschte Färbungsintensität erreicht war, wurde das Gel in 7% Essigsäure eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.2.4 Western Blot

Bei einem Western Blot werden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (die durch SDS eine negative Ladung tragen) aus dem Gel auf eine immobilisierende PVDF-Membran (die positiv geladen ist) transferiert. Der Transfer wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes beschleunigt. Anschließend werden die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Der Transfer erfolgte für Proteine bis ca. 70 kDa mit Hilfe eines Semidry-Blotters, für Proteine ab ca. 70 kDa mit Hilfe einer Blot-Kammer.

Transfer mit „halbtrockener“ Methode (Semidry-Blotter)

Auf die Kathode wurden 3 Lagen zurechtgeschnittenes 3MM Whatman-Papier gelegt, das vorher mit Transferpuffer angefeuchtet worden war; darauf wurde die mit Methanol angefeuchtete Membran gelegt. Das Gel wurde aus der Gelkassette gelöst und zurechtgeschnitten, mit Transferpuffer angefeuchtet und auf die Membran gelegt. Es folgten 3 weitere Lagen angefeuchtetes 3MM Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte 90 min bei x mA ($x = \text{Fläche des Gels in cm}^2$).

Transfer mit „nasser“ Methode (Transfer-Kammer)

Das Gel wurde aus der Gelkassette gelöst, zurechtgeschnitten und in Transferpuffer auf 3 Lagen zurechtgeschnittenes 3MM Whatman-Papier gelegt. Die mit Methanol angefeuchtete Membran wurde auf das Gel gelegt, ebenso 3 weitere Lagen 3MM Whatman-Papier. Dieser Blot-Stapel wurde mit einer Halterung in eine mit Transferpuffer gefüllte Transfer-Kammer gehängt. Der Transfer erfolgte ü.N. im Kühlraum bei 300 mA.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese mit 5% BSA/TBS-Tween (bei Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern) bzw. mit 5% BSA/TBS (bei Verwendung von Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern) geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in der Block-Lösung verdünnt wurde (Tabelle 3.1). Danach wurde die Membran in TBS-Tween gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, und anschließend mit dem sekundären Antikörper behandelt, welcher in TBS-Tween oder Block-Lösung verdünnt wurde. Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden dabei in einer

Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, die Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Detektion durch ECL (enhanced chemiluminescence) bei HRP-gekoppelten Antikörpern, oder durch Detektion des Infrarot-Farbstoffs mit Hilfe des Odyssey-Infrared-Imagers der Firma Li-cor Biosciences.

(Anmerkung: Der Vorteil bei der Verwendung Infrarot-Farbstoff-gekoppelter Sekundärantikörper besteht unter anderem darin, dass die Detektion zweier unterschiedlicher Proteine mit Hilfe verschiedener Farbstoffe möglich ist. So konnte eine Membran beispielsweise gleichzeitig mit anti-phospho-Mek Antikörpern (Kaninchen) und pan-Mek Antikörpern (Maus) behandelt werden. Ansonsten liefert diese Methode das gleiche Ergebnis wie die Verwendung der Chemilumineszenz. Die Verwendung beider Methoden resultiert lediglich aus der Umstellung des Systems in unserem Institut während meiner Arbeit.)

Soll die Membran mit einem anderen Antikörper behandelt werden, ist das Ablösen des Antikörpers von der Membran mit „Stripping“-Lösung (bei 50°C für 40 min, schütteln) möglich. Die Membran kann danach erneut geblockt und wie oben beschrieben mit Antikörpern behandelt werden.

Antikörper	Verdünnung	Firma
Phospho-spezifische Antikörper		
Anti-phospho-p44/p42 MAPK (Thr 202/Tyr 204)	1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho-MEK1/2 (Ser 217/221)	1:1500	Cell Signaling
Anti-phospho-PAK1(Thr423)/PAK2(Thr402)	1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho-cRaf (Ser259)	1:1000	Cell Signaling
Anti-phospho-cRaf (Ser338)	1:1000	Cell Signaling
Antikörper zur Ladekontrolle der phosphorylierten Proteine		
Anti-Erk1 (K-23)	1:1000	Santa Cruz
Anti-MEK-1 (H8)	1:1500	Santa Cruz
Anti-γPAK (V19)	1:1000	Santa Cruz
Anti-Raf-1 (C-12)	1:1000	Santa Cruz
Sonstige Antikörper		
Anti-c-Myc (9E10)	1:1000	Santa Cruz
Anti-Ras10	1:5000	Upstate

Tabelle 3.1 Primärantikörper im Western Blot

3.2.5 Luziferase-Reporter-Test

Die mit einem Luziferase-Reporter-System transfizierten und je nach Experiment behandelten Zellen wurden geerntet und zweimal in eiskaltem PBS ohne Ca/Mg gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 300 µl Lysepuffer (Luziferase-Reporter-Test) je Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 5 min bei 10.000 upm in der Kühlzentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und konnte auf Eis einige Stunden, bzw. bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden. Für die Luziferase-Messung wurden je Probe 350 µl Reaktionspuffer (Luziferase-Reporter-Test) und 100 µl Luziferin-Reaktionslösung angesetzt und in das Luminometer-Gerät gestellt. Von jeder Probe wurden 200 µl Lysat gemessen.

Die Messwerte wurden unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration, die mittels Bradford-Methode (siehe Abschnitt 3.2.1) ermittelt wurde, normalisiert. Anschließend wurden die Induktionsfaktoren errechnet und in einem Balkendiagramm dargestellt. Zur statistischen Auswertung erfolgte die Berechnung der Standardabweichung (jeder Ansatz wurde dreifach durchgeführt), die ebenfalls in das Balkendiagramm eingefügt wurde. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit MS-Excel.

3.2.6 Detektion von Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer (CD3-/CXCR4-Doppelfärbung)

1×10^6 Zellen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit FACS-Medium gewaschen. Die Zellen wurden in 85-95 µl FACS-Medium aufgenommen, so dass sich nach Zugabe von 10 µl anti-CD3-FITC und / oder 5 µl anti-CXCR4-PE ein Envolumen von 100 µl ergab. Für jeden Ansatz wurden zusätzlich zur Doppelfärbung auch ungefärbte und mit jedem Antikörper einfach gefärbte Zellen mitgeführt. Diese Proben wurden für die Einstellung des Durchflusszytometers benötigt. Die Zellen wurden mit den Antikörpern 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal mit FACS-Medium bei 4°C gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5-1 ml FACS-Medium aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert oder fixiert. Dazu wurden die Zellen 10 min in ca. 200 µl Formalin bei 4°C inkubiert und zweimal mit FACS-Medium gewaschen. Die Zellen wurden bis zur Messung in 0,5-1 ml FACS-Medium bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.2.7 Herstellung eines GST-Fusionsproteins

E.coli BL21 wurden mit einem pGEX-Vektor zur Expression von GST-Raf-RBD transformiert (siehe Abschnitt 3.3.1). Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mind. 6 h inkubiert und anschließend ü.N. in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin pipettiert und 2 h bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Transkription und damit der Proteinexpression von pGEX-Vektoren wurde die Bakterienkultur bei RT weitere 4-5 h geschüttelt. Zur Isolierung der GST-Fusionsproteine wurden die Bakterien bei 4000 upm und 4°C 10 min zentrifugiert und in 15 ml GTLB1 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde die Suspension 20 min bei RT rotiert. Anschließend wurden 8 ml GTLB2 hinzugefügt und der Ansatz 20 min bei 4°C rotiert. Das Lysat wurde zur Scherung der DNA kurz (4x10 s mit jeweils 10 s Pause) auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die DNA sowie unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15.000g und 4°C 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 50ml-Röhrchen überführt. Die weitere Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml einer 50% Glutathion-Agarose-Lösung, mit der das Lysat ü.N. bei 4°C rotiert wurde. Durch nicht-kovalente Bindung assoziierte dabei der GST-Anteil des Fusionsproteins mit dem an Agarose gekoppelten Glutathion. Im Anschluss daran wurde die Glutathion-Agarose 4x mit eiskaltem PBS-Waschpuffer gewaschen. Die Glutathion-Agarose wurde bis zu einem Endvolumen von 500 µl mit PBS / 1mM DTT aufgefüllt. 5 µl dieser Suspension wurden für die Proteinanalyse und Konzentrationsbestimmung entfernt. Der Rest wurde nach Zugabe von 500 µl Glycerol aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Proteinanalyse wurden die 5 µl des Lysats mit 45 µl PBS / 1mM DTT verdünnt, mit 50 µl 2x Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Probe wurde zusammen mit bekannten Mengen BSA zur Konzentrationsbestimmung auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 3.2.3) sichtbar gemacht; die Konzentrationsabschätzung erfolgte dann durch den direkten Vergleich mit dem BSA.

3.2.8 Bestimmung der Ras-Aktivität (RasGTP-Affinitätspräzipitation)

Bei der Bestimmung der Aktivität kleiner GTPasen macht man sich die Eigenschaft ihrer Effektormoleküle, ausschließlich an die GTP-gebundene und damit aktive Form zu binden, zunutze. Die Bindedomäne eines jeweils spezifischen Effektorproteins wird als GST-Fusionsprotein in *E.coli BL21* exprimiert und an Glutathion-Agarose gekoppelt (siehe Abschnitt 3.2.7). Mit Hilfe dieses Fusionsproteins hat man die Möglichkeit, aus einem Zell-Lysat die aktive GTPase zu präzipitieren.

2×10^7 Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3- sowie 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-Antikörpern, die mit 20 $\mu\text{g/ml}$ eines anti-Maus-Immunglobulins vernetzt waren, in PBS bei 37°C für 5 min induziert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer (RasGTP-Affinitätspräzipitation) auf Eis lysiert. Die DNA wurde durch mehrmaliges Ziehen des Lysats durch eine 26G-Kanüle geschert. Das Lysat wurde 15 min bei 10000 upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Ladekontrolle wurden 40 μl des Lysats mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer gemischt. Der Rest des Lysats wurde mit 40 μg des an Glutathion-Agarose gekoppelten Fusionsproteins gemischt, das zuvor 2x mit Lysepuffer gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt worden war. Die Präzipitation erfolgte 1 h bei 4°C, wobei die Proben rotiert wurden, damit sich die Glutathion-Agarose nicht absetzt. Um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Glutathion-Agarose anschließend 4x mit je 1 ml Lysepuffer (RasGTP-Affinitätspräzipitation) gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des restlichen Waschpuffers wurde die Glutathion-Agarose mit 20 μl Probenpuffer gemischt und anschließend 5 min bei 95°C gekocht, ebenso wie das vorbereitete Lysat für die Ladekontrolle. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.2) und nachfolgendem Western Blot mit einem anti-Ras-Antikörper zur Detektion von Ras (siehe Abschnitt 3.2.4) analysiert.

3.2.9 Raf-Kinase-Test

Zur Messung der Raf-Aktivität wird die Fähigkeit von immunpräzipitiertem Raf getestet, in einer *in vitro*-Reaktion rekombinantes MEK zu phosphorylieren.

Für die Raf-Immunpräzipitation wurden pro Ansatz 70 μl Protein-G-Agarose 2x mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Pro Immunpräzipitation wurden 2 μg anti-Raf-1-Antikörper dazupipettiert und durch

Rotieren bei 4°C (ca. 1 h) an die Protein-G-Agarose gebunden.

Die entsprechend vorbehandelten Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit 1 ml RIPA-Puffer 20 min auf Eis lysiert. Durch mehrmaliges Ziehen durch eine Kanüle wurde die DNA geschert. Das Lysat wurde anschließend 10 min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert.

800 µl des Lysats wurden mit 70 µl der vorbereiteten anti-Raf-1-Protein-G-Agarose gemischt und 2-3 h bei 4°C rotiert. Die Protein-G-Agarose wurde anschließend 3x mit RIPA-Puffer, 1x mit Waschpuffer (Raf-Kinase-Test) und 1x mit Reaktionspuffer (Raf-Kinase-Test) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Protein-G-Agarose nochmals zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.

Die Protein-G-Agarose mit immunpräzipitiertem Raf wurde in 40 µl Reaktionspuffer (Raf-Kinase-Test) aufgenommen. Die Kinase-Reaktion erfolgte nach Zugabe von 20 µM ATP und 500 ng GST-MEK 30 min bei 30°C, wobei die Reaktion regelmäßig gemischt wurde. Durch Zugabe von 40 µl 2x Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 95°C gekocht und zusammen mit einem Aliquot der Zell-Lysate mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.2) und Western Blot (siehe Abschnitt 3.2.4) mit anti-phospho-MEK und anti-MEK-Antikörpern zur Detektion der Aktivierung des rekombinanten GST-MEK und mit anti-Raf-Antikörpern zur Ladekontrolle analysiert.

3.3 Bakterien

3.3.1 Transformation elektrokompenter *E.coli*

Die elektrokompenten *E.coli* (z.B. TOP10, BL21) wurden auf Eis aufgetaut. 40 µl der Bakteriensuspension wurden dann mit 1 ng Plasmid-DNA gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm electrode gap) überführt. Die Elektroporation erfolgte im E.coli Pulser (Biorad) bei 1,8 kV. Danach wurde der Bakterien-DNA-Mix sofort mit 1 ml SOC aus der Küvette pipettiert und in einem 15 ml-Röhrchen 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

3.3.2 Einfrieren transformierter Bakterien

Die Bakterien wurden 3 min bei 2800 upm und 4°C abzentrifugiert und mit 10% Glycerol, das vorher steril filtriert worden war, gewaschen. Dann wurden die Bakterien in 10 µl 10% Glycerol aufgenommen, auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

3.4 Eukaryotische Zellen

3.4.1 Kultur der humanen T-Lymphom-Zell-Linie Jurkat

Die Zellen wurden in 145 mm-Zellkulturschalen, die jeweils 30 ml Medium enthielt, bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn die Zellen dicht waren (i.d.R. nach zwei Tagen) wurden sie in ein 50 ml - Röhrchen pipettiert und bei 1400 upm 5 min abzentrifugiert. Ein Teil der Zellen wurde in frischem Medium wieder ausplattiert.

3.4.2 Isolierung und Kultur primärer humaner T-Zellen

Zur Isolierung primärer humaner T-Zellen wurden zunächst die mononukleären Zellen aus Leukozytenkonzentraten (so genannten „Buffy coats“) mit Hilfe einer Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation isoliert. Dazu wurden je 15 ml Leukozytenkonzentrat mit 20 ml Waschmedium verdünnt. 15 ml Ficoll-Hypaque wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit dieser Verdünnung vorsichtig überschichtet und 20 min bei 700-850 g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Der weißliche Ring zwischen Medium und Ficoll beinhaltete die mononukleären Zellen. Der Überstand wurde bis knapp über dem Ring abgenommen und verworfen. Der Zellring wurde abpipettiert und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Dabei wurden je 2 Zellringe zusammen in ein Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden mit Waschmedium auf 40 ml verdünnt und 15 min bei 450-700g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Waschmedium aufgeschlagen und mit Waschmedium auf 30 ml verdünnt. Die Zellen wurden 10 min bei 250-300g und RT zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Der letzte Waschschrift wurde noch 3x wiederholt.

Die mononukleären Zellen wurden eingefroren (siehe Abschnitt 3.4.4) oder zur Anreicherung der T-Zellen wie folgt kultiviert:

Durch spezifische Stimulierung der T-Zellen mit Concanavalin A (ConA) wurden diese angereichert und mit IL-2 weiter expandiert. Die mononukleären Zellen wurden dazu mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml Medium ausplattiert und in Anwesenheit von 5 µg/ml Concanavalin A 72 h inkubiert. Dabei wurde nach 48 h das Medium gewechselt und frisches Concanavalin A zugegeben, wobei die Zellen ggf. in einem kleineren Volumen aufgenommen wurden. Nach der Inkubation mit Concanavalin A wurden die Zellen mit Medium gewaschen und mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml Medium mit 10 U/ml IL-2 72 h weiterkultiviert. Die Zellen wurden danach 2x mit Medium gewaschen und für die jeweiligen Experimente ausgesät.

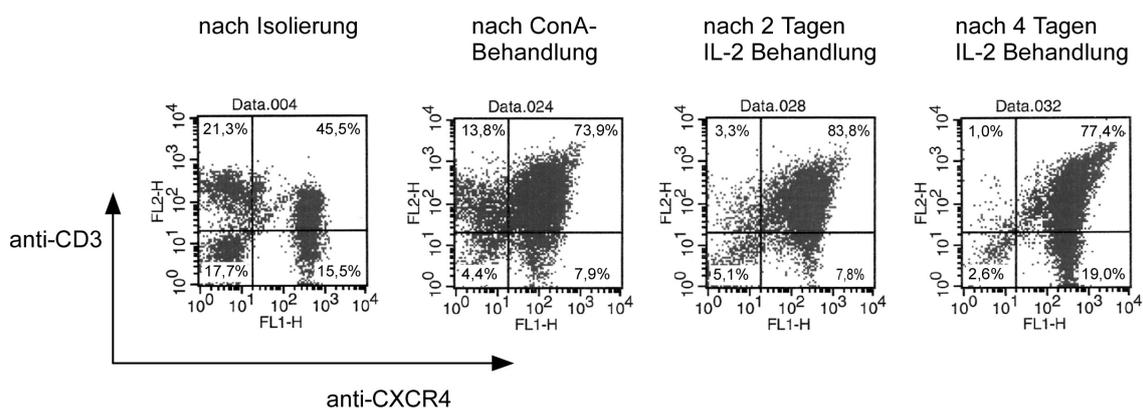


Abb.3.1 Kontrolle der Reinheit und CXCR4-Expression der primären humanen T-Zellen.

1×10^6 Zellen pro Färbung wurden an verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung zur Anreicherung der T-Zellen mit anti-CD3-FITC und anti-CXCR4-PE Antikörpern inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Jeweils 10.000 Zellen wurden ausgewertet und das Ergebnis der Messung zusammen mit den jeweiligen Prozentzahlen im Punkte-Diagramm dargestellt.

Die Überprüfung der Reinheit der T-Zell-Kultur erfolgte mittels Detektion des T-Zell-spezifischen Oberflächenproteins CD3 mit einem FITC-gekoppelten (FITC = Fluorescein-Isothiocyanat) anti-CD3 Antikörper und anschließender Messung im Durchflusszytometer (siehe Abschnitt 3.2.6). Da in den geplanten Experimenten der Effekt des Chemokins SDF-1 α auf die T-Zellen untersucht werden sollte, wurde zusätzlich die Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4 durch Färbung mit PE-gekoppelten (PE = Phycoerythrin) anti-CXCR4 Antikörpern getestet. Die Messergebnisse der Doppelfärbung wurden im Punktediagramm dargestellt (Abb.3.1).

Direkt nach Isolierung der mononukleären Zellen aus den Leukozytenkonzentraten betrug der Anteil an T-Zellen (CD3-positiv) etwa 60%. Durch 3 Tage spezifischer Stimulierung mit Concanavalin A wurden die T-Zellen auf 80% der Gesamtzellen angereichert, nach weiteren 4 Tagen IL-2-Stimulierung auf über 90%. Zu jedem Zeitpunkt exprimieren mindestens 75% der CD3-positiven Zellen auch CXCR4, wobei der größte Anteil an CXCR4-exprimierenden T-Zellen nach 2 Tagen IL-2-Stimulierung erreicht war. Bei allen gezeigten Experimenten betrug die Reinheit der T-Zell-Kultur 90-95%. Zum Zeitpunkt des Experiments exprimierten 80-98% der T-Zellen CXCR4.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10 µl der Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert. Es folgte das Auszählen von 3-4 Quadraten. Die Zellzahl eines Quadrates entspricht der Zellzahl in 0,1 µl. Die Umrechnung auf Zellen/ml erfolgt, indem man die Zellzahl pro Quadrat mit 10^4 multipliziert.

3.4.4 Einfrieren von Zellen

Jurkat Zellen:

Die Zellen von vier dicht bewachsenen 145 mm-Schalen wurden geerntet, in 10 ml Einfriermedium (4°C) aufgenommen und auf Kryo-Röhrchen verteilt (je 1 ml). Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen dann in eine auf 4°C vorgekühlte Einfrierbox gestellt und bei -80°C 1-2 Tage gelagert. Dabei werden die Zellen langsam auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Primäre humane T-Zellen:

$1,8 \times 10^7$ mononukleäre Zellen wurden in 900 µl FCS aufgenommen, in ein Einfrierrohrchen überführt und auf Eis gekühlt. 900 µl eiskaltes FCS mit 20% DMSO wurden vorsichtig zugetropft und erst vor dem Überführen in die auf 4°C vorgekühlte Einfrierbox gemischt. Die Einfrierbox wurde bei -80°C 1-2 Tage gelagert. Dabei werden die Zellen langsam auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.5 Auftauen von Zellen

Jurkat Zellen:

Im Gegensatz zum Einfrieren von Zellen erfolgt das Auftauen schnell. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 ml Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in eine 90 mm Zellkulturschale mit 10 ml Medium ausplattiert und unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert.

Primäre humane T-Zellen:

Die mononukleären Zellen wurden sehr schnell bei 37°C aufgetaut und in ein 50 ml – Röhrchen überführt. Zunächst wurden 10 ml eiskaltes Waschmedium zugetropft, anschließend wurden weitere 20 ml Waschmedium schnell zugegeben. Die Zellen wurden 10 min bei 250g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden nochmals mit 20 ml Waschmedium gewaschen und mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml Medium ausplattiert. Die Anreicherung der T-Zellen erfolgte dann wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.4.6 Transfektion von Jurkat Zellen durch Elektroporation

Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes an eine Zellsuspension, die sich in einer Elektroporations-Küvette befindet, entstehen in der Zellmembran vorübergehend Löcher, durch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangen kann.

Pro Ansatz wurden $1-3 \times 10^7$ Zellen in 400 µl RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 30 µg der zu transfizierenden DNA gemischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer Küvette (4 mm electrode gap) bei 960 µF und 250 V oder 280 V in einem Gene Pulser-Elektroporator. Bei 250 V starben weniger Zellen, bei 280 V dagegen war die Transfektionseffizienz größer. Die Spannung wurde je nach experimenteller Anforderung individuell gewählt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen mit etwas Medium aus der Küvette pipettiert und pro 1×10^7 Zellen in 5 ml Medium ausplattiert.

3.4.7 Transfektion von Jurkat Zellen durch Lipofektion (Lipofectamine 2000, Invitrogen)

Lipofektions-Reagenzien bestehen aus positiv geladenen Lipiden, die spontan mit der negativ geladenen DNA interagieren und sie umschließen. Die Komplexe können dann die Zellmembran durchdringen. Diese Transfektionsmethode kam bei Luziferase-Experimenten zur Anwendung (siehe Abschnitt 3.2.5).

Pro Ansatz wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen in 750 μ l Medium ohne Antibiotika aufgenommen und in einer 24-Loch-Platte kultiviert. Außerdem wurden 1-1,5 μ g DNA sowie 3 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in separaten Reaktionsgefäßen mit 75 μ l RPMI-Medium ohne Zusätze verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA- mit der Lipofectamine 2000-Verdünnung gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Die so entstandenen DNA-Lipofectamine 2000-Komplexe wurden zu den Zellen pipettiert und gemischt. Die Transfektion erfolgte ü.N. bei 37°C und 6% CO₂. Danach wurde das Medium gewechselt, wobei die Zellen wieder in Medium ohne Antibiotika ausplattiert wurden

3.4.8 Transfektion primärer humaner T-Zellen mit Amaxa

Mit Hilfe der Nucleofector-Technologie (Amaxa) werden auch bei schwer zu transfizierenden Zellen, beispielsweise bei primären Zellen, durch Kombination von elektrischen Parametern und Zelltyp-spezifischen Lösungen gute Transfektionseffizienzen erreicht. Diese Methode wurde hier verwendet, um primäre humane T-Zellen mit RhoA-siRNA (Qiagen) zu transfizieren.

Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers für vorstimulierte humane T-Zellen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5×10^6 humane T-Zellen (angereichert aus mononukleären Zellen durch 3 Tage Kultur mit Concanavalin A und 2 Tage Kultur mit IL-2, siehe Abschnitt 3.4.2) in 100 μ l Nucleofector-Lösung aufgenommen und mit 1,5 μ g siRNA gemischt. In einer Küvette wurde die Zellsuspension dann im Amaxa-Nucleofector mit dem Programm T-23 behandelt. Danach wurden sofort 500 μ l vorgewärmtes Medium in die Küvette gegeben und die Zellen mit einer Plastikpipette in eine vorbereitete 6-Loch-Platte mit 2,5 ml vorgewärmtem Medium überführt. Nach 4-6 h Inkubation bei 37°C und 6% CO₂ wurde das Medium gewechselt, wobei die Zellen in Medium mit 10 U/ml IL-2 aufgenommen wurden.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Messung der Proliferation durch BrdU-Inkorporation

Das Pyrimidin-Analog 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) wird anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut, d.h. bei Kultivierung von Zellen in Anwesenheit von BrdU werden alle proliferierenden Zellen markiert. Zur Detektion des inkorporierten BrdU werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-BrdU-Antikörper behandelt, welcher an Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Durch Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) erfolgt eine Farbreaktion, welche in einem Spektrophotometer gemessen werden kann. Dabei sind die Farbintensität und damit auch die Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge direkt proportional zur Menge der neu synthetisierten DNA und damit zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Aktivierung der Zellen:

Die primären humanen T-Zellen wurden zunächst 24 h ohne IL-2 kultiviert und in dieser Zeit ggf. mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Die Re-Stimulierung erfolgte dann durch Zugabe von 100 U/ml IL-2 oder durch Ausplattieren der Zellen in Vertiefungen einer mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 96-Loch-Platte. Die Beschichtung der Platten erfolgte ü.N. bei 4°C mit 1 μ g/ml anti-CD3- und/oder 9 μ g/ml anti-CD28-Antikörpern in PBS.

Messung der Proliferation mit dem Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit (Roche Diagnostics):

Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt.

Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 8×10^4 primäre humane T-Zellen in 200 μ l Medium eingesetzt. 48 h nach Induktion der Proliferation mit IL-2 oder anti-CD3/anti-CD28 wurden die Zellen 2-6 h in Anwesenheit von 10 μ M BrdU bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte 10 min bei 300g zentrifugiert, um die Suspensionszellen am Boden der Platte zu sammeln. Das Medium wurde abgesaugt und die Platte 1 h bei 60°C getrocknet. Nach diesem Schritt konnte die Platte bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden. Zur Detektion des inkorporierten BrdU wurden die Zellen 30 min bei RT mit 200 μ l FixDenat-Lösung behandelt. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und durch 100 μ l anti-BrdU-POD-Lösung ersetzt. Nach 90 min Inkubation bei RT wurde die Flüssigkeit entfernt und die ungebundenen Antikörper wurden durch Waschen der Zellen mit 3x 200 μ l Waschlösung entfernt. Die Zellen

wurden nun durch Zugabe von 100 µl Substratlösung 5-30 min bei RT gefärbt. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl 1M H₂SO₄ gestoppt. Die Intensität der Färbung wurde innerhalb von 5 min nach Abstoppen der Reaktion bei 450 nm gemessen. Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte in MS-Excel. Dabei wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung der 3 Messwerte ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Außerdem wurde die Signifikanz durch einen zweiseitigen Student t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt.

3.5.2 Apoptose-Test

Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe einer AnnexinV/Propidiumiodid-Doppelfärbung detektiert. Verwendet wurde dazu ein Annexin V Apoptosis Detection Kit der Firma Santa Cruz, wobei der mitgelieferte Puffer durch einen selbst angesetzten Calcium-Bindungspuffer ersetzt wurde. FITC-gekoppeltes AnnexinV bindet an das Membranlipid Phosphatidylserin, welches nur bei apoptotischen Zellen externalisiert wird und so an der Zelloberfläche verfügbar ist. Es können aber auch nekrotische Zellen durch AnnexinV gefärbt werden, da bei diesen die Zellmembran nicht mehr intakt ist, so dass AnnexinV in die Zelle eindringen kann. Man färbt also zusätzlich die nekrotischen Zellen durch Propidiumiodid, um sie von den apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der an DNA bindet. Aufgrund seiner Größe kann er nur durch eine bereits perforierte Membran dringen. Vitale Zellen werden durch keinen der beiden Farbstoffe gefärbt.

1x10⁶ Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 300g für 4 min geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS ohne Ca/Mg bei 4°C gewaschen, in 400 µl Calcium-Bindungspuffer aufgenommen und auf 4 Ansätze mit je 100 µl aufgeteilt.

Zu den Ansätzen wurden

1. -
2. 5 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) (färbt die nekrotischen Zellen)
3. 2 µl AnnexinV (0,2 µg/µl) (färbt die apoptotischen Zellen)
4. 5 µl Propidiumiodid + 2 µl AnnexinV

pipettiert und die Ansätze vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4°C im Dunkeln wurde die Färbung durch Zugabe von 600 µl PBS ohne Ca/Mg

gestoppt. Die Zellen wurden sofort im Durchflusszytometer analysiert. Die Einstellung der Mess-Parameter erfolgte mit Hilfe der einfach gefärbten Proben.

4 Ergebnisse

Die Homöostase der Lymphozyten ist für eine effektive Immunantwort sehr wichtig. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Überleben und Apoptose wird durch verschiedene extrazelluläre Signale wie Cytokine und Chemokine sichergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Zusammenwirken des Cytokins IL-2 (Interleukin-2) und des Chemokins SDF-1 α (*engl. stromal cell-derived factor 1 α*) untersucht. IL-2 induziert T-Zell-Proliferation, u.a. bei der klonalen Expansion von T-Zellen nach Aktivierung mit ihrem spezifischen Antigen. Dies ist jedoch nur ein extrazellulärer Stimulus von vielen, denen die T-Zellen ständig ausgesetzt sind und auf die sie zur selben Zeit reagieren müssen. Die Frage war deshalb, wie die Zellen die Informationen, die sie gleichzeitig von mehreren Faktoren erhalten, integrieren und infolgedessen mit dem richtigen zellulären Programm reagieren. Zusätzlich zu IL-2 wurde hier das Chemokin SDF-1 α verwendet. SDF-1 α wird in vielen Geweben exprimiert und ist in geringen Konzentrationen auch im Blut ständig anwesend. In den Geweben kommt SDF-1 α hauptsächlich in Gradienten vor, in deren Richtung die Zellen migrieren. Neben der Rolle als chemotaktisches Protein wurde SDF-1 α mehrfach als Co-Stimulus beschrieben, der in Kooperation mit anderen Cytokinen deren Effekte verstärkt. In T-Zellen wurde SDF-1 α als Co-Aktivatoren der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation beschrieben. Die Frage war nun, ob SDF-1 α auch den Effekt von Cytokinen wie IL-2 auf zirkulierende T-Zellen unterstützt und so zur T-Zell-Homöostase beiträgt. Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst in primären humanen T-Zellen untersucht, ob SDF-1 α die IL-2-induzierte Proliferation beeinflusst.

4.1 Effekt von SDF-1 α auf die IL-2-induzierte Proliferation und Signaltransduktion

4.1.1 SDF-1 α interferiert in primären humanen T-Zellen mit IL-2-induzierter Proliferation

Das Zusammenwirken der extrazellulären Faktoren IL-2 und SDF-1 α in Bezug auf die Proliferation von T-Zellen wurde in den aus Leukozytenkonzentraten angereicherten und dadurch vorstimulierten T-Zellen (Reinheit 90-95%, siehe

Abschnitt 3.4.2) untersucht. Den T-Zellen wurden dazu 24 h vor Beginn des Experiments ohne IL-2 kultiviert, da die Proliferation zu einem definierten Zeitpunkt des Experiments wieder mit IL-2 induziert werden sollte, wobei ein Teil der Zellen in dieser Zeit mit 10 ng/ml SDF-1 α vorbehandelt wurde. Die Re-Stimulierung erfolgte dann mit 100 U/ml IL-2 für 48 h. Anschließend wurde durch Messung der BrdU-Inkorporation die Proliferation der Zellen in den einzelnen Ansätzen gemessen (siehe Abschnitt 3.5.1). Die Auswertung der Messergebnisse ist in Abb.4.1A in einem Balkendiagramm dargestellt. Bei den Zellen, die nicht mit IL-2 stimuliert wurden, sind die Messwerte sehr niedrig (Abb.4.1A, Balken 1 und 2). Dies deutet auf eine geringe Proliferationsrate hin, könnte aber auch auf eine reduzierte Überlebensrate zurückzuführen sein, da primäre T-Zellen, die mehrere Tage ohne Wachstumsfaktoren kultiviert werden, in Apoptose gehen. Die Proliferation, die durch IL-2 induziert wird (Abb.4.1A, Balken 3), ist bei den mit SDF-1 α vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen auf 70% reduziert (Abb.4.1A, Balken 4). Auch hier muss man beachten, dass geringere Messwerte auch aus erhöhter Apoptose resultieren können, da in diesem Fall weniger Zellen pro Ansatz vorhanden wären. Um auszuschließen, dass SDF-1 α eine vermehrte Apoptose bewirkt, wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie eben beschrieben der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen gemessen. Die Zellen wurden dazu mit FITC-markiertem Annexin V, welches apoptotische und nekrotische Zellen färbt, sowie Propidiumiodid, welches ausschließlich nekrotische Zellen färbt, behandelt und anschließend mit Hilfe eines Durchflusszytometers untersucht (siehe Abschnitt 3.5.2). Die vitalen Zellen sind für beide Farbstoffe negativ. Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wurde in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb.4.1B). Das Diagramm zeigt das Messergebnis eines repräsentativen Experiments. Das Cytokin IL-2 erhöht, wie bereits vermutet, den Anteil der überlebenden Zellen. SDF-1 α hat allerdings keinen Effekt auf die Überlebensrate, der Anteil der vitalen T-Zellen ändert sich durch SDF-1 α nicht. Das bedeutet, dass die beobachtete Hemmung der Proliferation ein direkter Effekt von SDF-1 α ist. Zusätzlich wurde überprüft, ob SDF-1 α die Sensitivität der T-Zellen für CD95-induzierte Apoptose erhöht. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb.4.1C). Das Diagramm zeigt das Messergebnis eines repräsentativen Experiments. Die Behandlung der Zellen mit anti-CD95-Antikörpern erhöht zwar die

Apoptose, jedoch gibt es keinen Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne SDF-1 α .

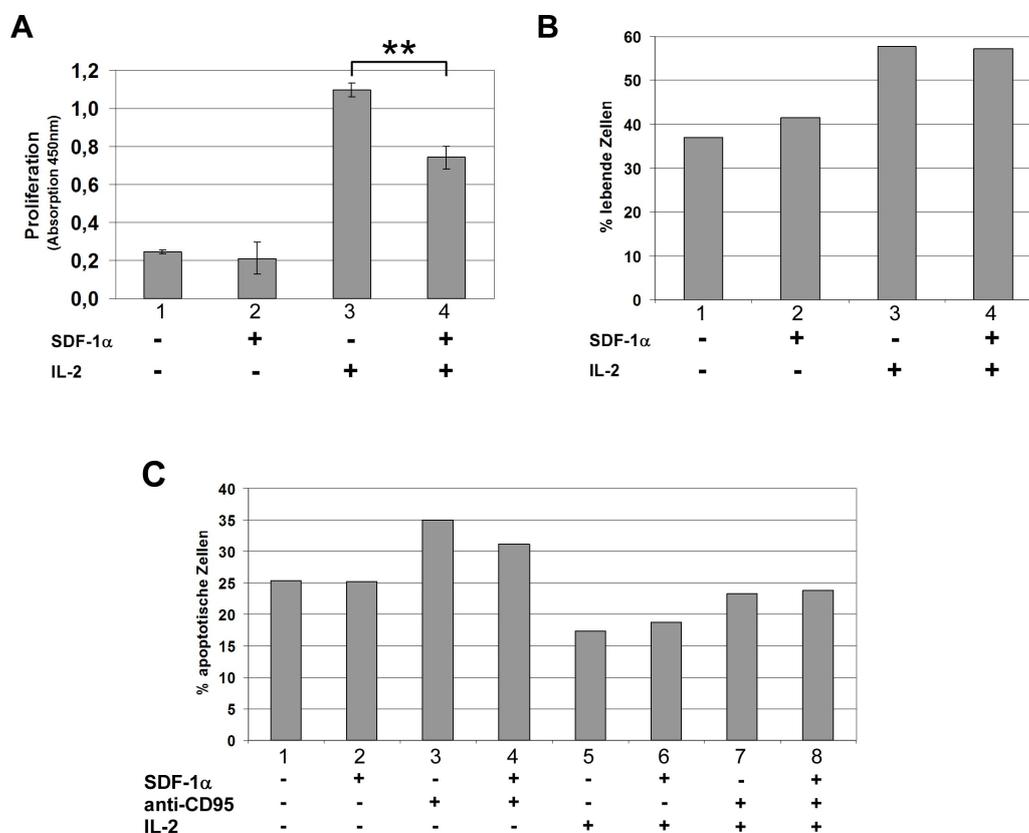


Abb.4.1 SDF-1 α verringert die IL-2 induzierte Proliferation in primären humanen T-Zellen, während die Apoptose nicht beeinflusst wird.

(A) Für jede Versuchsbedingung wurden 4 Ansätze mit je 8×10^4 primären humanen T-Zellen 24 h in Medium mit 0,25% FCS ohne IL-2 kultiviert und ggf. gleichzeitig mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Die Proliferation wurde durch Zugabe von 100 U/ml IL-2 induziert und nach 48 h mittels BrdU-Inkorporation für 2 h detektiert. Die Signifikanz wurde mit dem Student t-Test berechnet (** $p < 0,01$). (B) und (C) 3×10^6 primäre humanen T-Zellen wurden 24 h in Medium mit 0,25% FCS ohne IL-2 kultiviert und ggf. gleichzeitig mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 U/ml IL-2 für 48 h. Bei (C) wurde zusätzlich ggf. 6h vor Ende des Experiments durch Zugabe von anti-CD95-Antikörpern Apoptose induziert. Zur Unterscheidung der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden 1×10^6 primäre humane T-Zellen 15 min mit Propidiumiodid (PI) und Annexin V (A) inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der prozentuale Anteil der (B) lebenden bzw. (C) apoptotischen Zellen wurde im Balkendiagramm dargestellt.

Aus den durchgeführten Experimenten kann man schließen, dass SDF-1 α in primären humanen T-Zellen keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat, aber mit der IL-2-induzierten Proliferation interferiert. SDF-1 α und IL-2 haben also in Bezug auf T-Zell-Proliferation nicht wie erwartet synergistische, sondern vielmehr antagonistische Wirkungen. Dabei wird die Proliferation nicht vollständig gehemmt, jedoch signifikant reduziert. In den folgenden Experimenten wurde der Mechanismus, der zu einer Verringerung der IL-2-induzierten Proliferation führt, näher untersucht.

Dabei sollten vor allem die involvierten Signalereignisse aufgeklärt sowie die Interaktionspunkte der verschiedenen Signalkaskaden identifiziert werden, durch die eine Integration der Signale ermöglicht wird.

4.1.2 SDF-1 α interferiert mit der Signaltransduktion der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade in primären humanen T-Zellen

Da die Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade an der Induktion der Proliferation beteiligt ist (Pages et al. 1993; Romero and Zella 2002), lag die Vermutung nahe, dass SDF-1 α durch Herunterregulierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung mit der T-Zell-Proliferation interferiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die IL-2-induzierte MEK-Aktivierung in Anwesenheit und Abwesenheit von SDF-1 α untersucht. Wie bei den bisherigen Experimenten wurden die T-Zellen 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 α vorbehandelt und anschließend mit 100 U/ml IL-2 re-stimuliert. Die Detektion des aktiven MEK-Proteins in den Zell-Lysaten mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern zeigt, dass die Vorinkubation der Zellen mit SDF-1 α in einer Reduktion der MEK-Phosphorylierung resultiert (Abb.4.2A, vgl. Spur 4 mit Spur 3). Auch bei der Verwendung von TPA, einem Stimulus, der die Signalkaskade auf der Ebene von Ras und Raf induziert (Downward et al. 1990; Carroll and May 1994), hat SDF-1 α einen hemmenden Effekt auf die MEK-Aktivierung (Abb.4.2B, vgl. Spur 4 mit Spur 3).

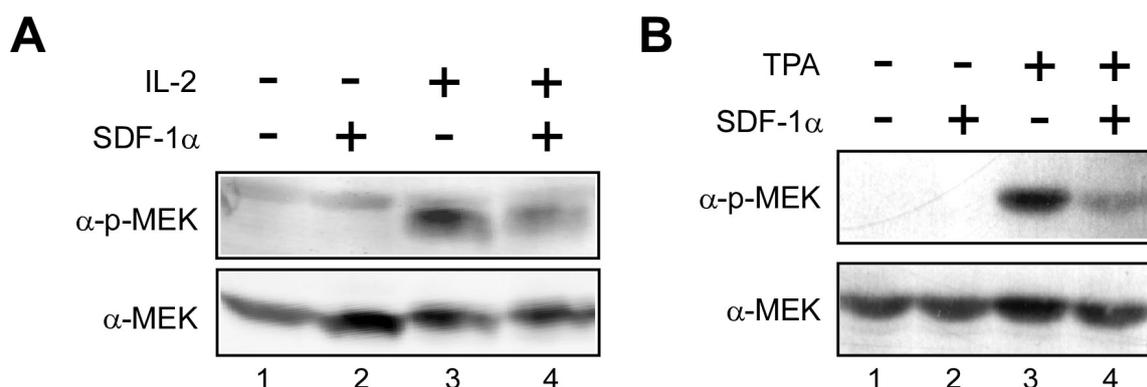


Abb.4.2 SDF-1 α interferiert in primären T-Zellen mit dem Ras-ERK Signalweg.

Um den Einfluss von SDF-1 α auf MEK-Aktivierung zu untersuchen, wurden 3×10^6 primäre T-Zellen 24 h in Medium mit 0,25% FCS kultiviert und gleichzeitig mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Danach wurden die Zellen (A) 1 min mit 100 U/ml IL-2 oder (B) 10 min mit 2 ng/ml TPA induziert und anschließend sofort geerntet und lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei phospho-MEK und pan-MEK Antikörper verwendet wurden.

Diese Experimente zeigen, dass SDF-1 α wie vermutet mit der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion interferiert, wobei der SDF-1 α -Effekt nicht spezifisch für die IL-2-vermittelte T-Zell-Aktivierung ist, sondern auch bei direkter Aktivierung von Ras und Raf auftritt. Dies weist darauf hin, dass die Hemmung nicht auf der Ebene der proximalen Signalereignisse am Rezeptor stattfindet, sondern auf der Ebene der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade.

4.1.3 Auch in der humanen T-Lymphom Zell-Linie Jurkat hemmt SDF-1 α die Ras-Raf-MEK-ERK Aktivierung durch TPA

Für eine weitergehende Analyse der involvierten Signalwege mit dem Ziel, den Mechanismus der Hemmung aufzuklären, sollte eine Zell-Linie verwendet werden. Zunächst sollte die in primären Zellen beobachtete Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung in einer Zell-Linie reproduziert werden. Um einen stabilen Effekt zu erreichen, wurden Jurkat-Zellen (eine humane T-Zell-Linie) mit einem Expressionsplasmid für CXCR4 transfiziert und 24 h mit SDF-1 α vorbehandelt. Anschließend wurde der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg mit TPA induziert. Eine Analyse der ERK-Aktivierung im Western Blot mit phospho-spezifischen ERK-Antikörpern zeigt, dass die ERK-Phosphorylierung in Anwesenheit von SDF-1 α reduziert ist (Abb.4.3A, vgl. Spur 4 mit Spur 3). Bei Untersuchung der Phosphorylierung der übergeordneten Kinase MEK wurde ebenfalls eine Hemmung der TPA-induzierten Phosphorylierung in SDF-1 α stimulierten Zellen beobachtet (Abb.4.3B, vgl. Spur 4 mit Spur 3), ebenso wie zuvor in primären humanen T-Zellen gezeigt.

Das Ziel der folgenden Experimente war es nun, den Mechanismus der Interaktion der involvierten Signalwege aufzuklären. Dazu sollte der von CXCR4 ausgehende Signalweg identifiziert werden, der das negativ regulatorische Signal vom Rezeptor zur Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade weiterleitet. Darüber hinaus war es ein Ziel zu klären, auf welcher Ebene der Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung die Hemmung stattfindet und welcher Mechanismus dabei eine Rolle spielt. Für diese Signaltransduktions-Studien wurden die Jurkat-Zellen als Modell-System verwendet. In diesen Zellen wird durch Elektroporation eine Transfektionseffizienz von ca. 50% erreicht, eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung von Experimenten unter Verwendung aktiver Mutanten von Signalproteinen.

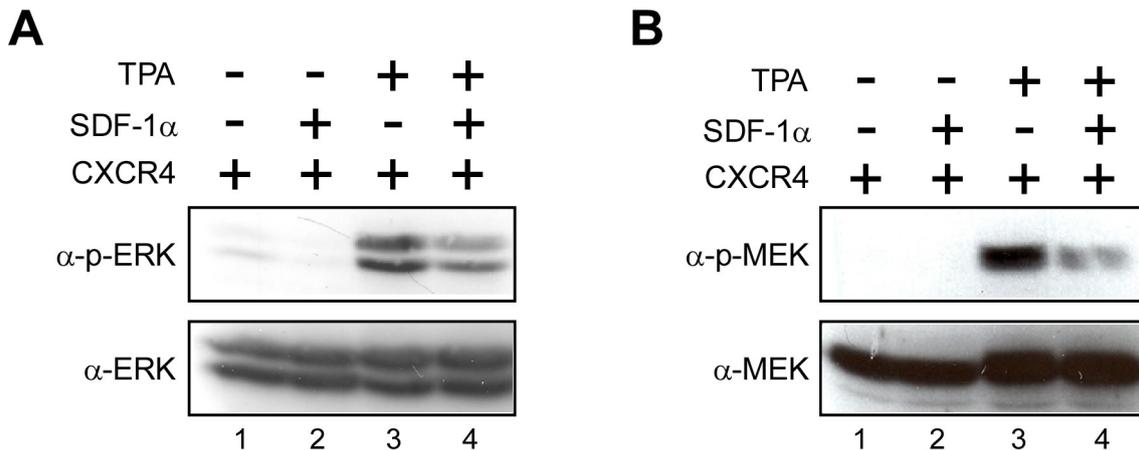


Abb.4.3 SDF-1 α interferiert auch in Jurkat-Zellen mit dem Ras-ERK Signalweg.

Um den Einfluss von SDF-1 α auf ERK- und MEK-Aktivierung zu untersuchen, wurden 2×10^7 Jurkat-Zellen mit 30 μ g eines CXCR4-Expressionsplasmids transfiziert und 6 h in Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf 4 Ansätze verteilt und in Medium mit 0,25% FCS kultiviert. 23 h nach der Elektroporation wurden die Zellen für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt, anschließend 10 min mit 0,2 ng/ml TPA induziert und sofort geerntet. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei (A) phospho-ERK und pan-ERK bzw. (B) phospho-MEK und pan-MEK Antikörper verwendet wurden.

4.2 Charakterisierung der kleinen GTPase RhoA als Teil des SDF-1 α induzierten inhibitorischen Mechanismus

4.2.1 Die kleine GTPase RhoA wird durch SDF-1 α aktiviert und hemmt die Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung

Zunächst sollte geklärt werden, durch welchen von SDF-1 α induzierten Signalweg das negativ regulatorische Signal für die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade vermittelt wird. SDF-1 α aktiviert durch Bindung an CXCR4 zahlreiche Signalwege, z.B. PKB, Erk, PI3-Kinase (Ganju et al. 1998), den JAK/STAT-Signalweg (Zhang et al. 2001), verschiedene Protein-Tyrosin-Kinasen (Ganju et al. 1998) und kleine GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac, Cdc42) (Vicente-Manzanares et al. 2002). Auch in unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die kleine GTPase RhoA in Jurkat-Zellen in der Tat von SDF-1 α aktiviert wird, wobei diese Aktivierung bis zu 24h andauert (Weg-Remers, unveröffentlichte Daten).

Da aus früheren Experimenten in unserer Gruppe bereits bekannt war, dass konstitutiv aktives RhoA die Ras-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk sowie die Aktivierung der übergeordneten Kinase ERK in der murinen T-Zell-Linie LB17 hemmt (Weg-Remers et al. 2002), war diese kleine GTPase ein guter Kandidat für ein Schlüsselprotein in dem gesuchten Signalweg.

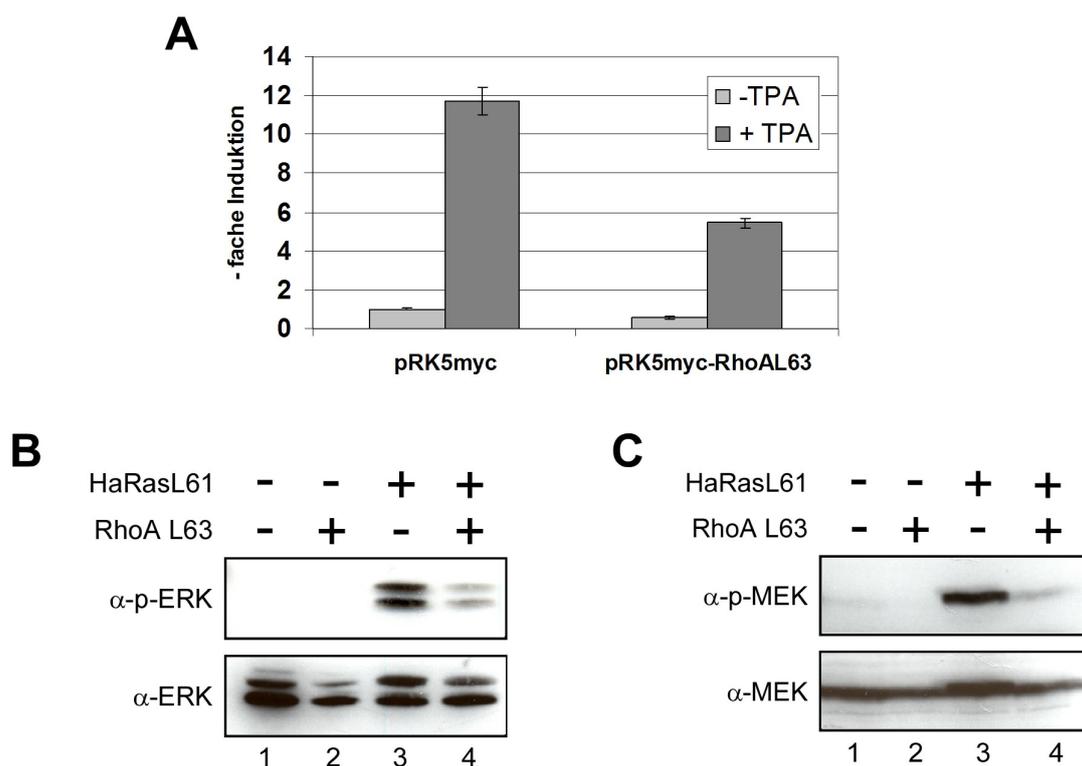


Abb.4.4 Konstitutiv aktives RhoA hemmt Ras-ERK Signalübertragung in Jurkat-Zellen.

(A) Der Effekt von RhoA auf Elk-Aktivierung wurde mit Hilfe eines Gal-Elk/Gal-Luc-Reportersystems getestet. 4×10^6 Jurkat-Zellen wurden mit $4 \mu\text{g}$ eines RhoAL63-Expressionsplasmids bzw. des entsprechenden Leervektors, $0,4 \mu\text{g}$ Gal-Elk und $1,6 \mu\text{g}$ Gal-Luc durch Lipofektion mit Lipofectamine2000 transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen mit 40 ng/ml TPA induziert und nach weiteren 6 h geerntet und lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen. (B) und (C) Um den Effekt von RhoAL63 auf HaRasL61-induzierte (B) ERK-Phosphorylierung bzw. (C) MEK-Phosphorylierung zu testen, wurden 1×10^7 Jurkat-Zellen pro Ansatz mit $20 \mu\text{g}$ eines RhoAL63-Expressionsplasmids und $10 \mu\text{g}$ eines HaRas-L61-Expressions-plasmids bzw. den entsprechenden Leervektoren durch Elektroporation transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei (B) phospho-ERK und pan-ERK bzw. (C) phospho-MEK und pan-MEK Antikörper verwendet wurden.

Zunächst wurde geprüft, ob RhoA auch in humanen T-Zellen die Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion hemmt. Um die Ergebnisse aus der murinen Zell-Linie in Jurkat-Zellen zu reproduzieren, wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk in Anwesenheit von konstitutiv aktivem RhoA mittels eines Gal-Elk/Gal-Luc-Reportersystems gemessen. Das Gal-Elk-Konstrukt (pSG-Gal4-Elk1) enthält die kodierende Sequenz für die Transaktivierungs-Domäne des Transkriptionsfaktors Elk-1 sowie die DNA-Binde-Domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4. Das Gal-Luc-Konstrukt (pG5.Ef Δ lux3) enthält ein Pentamer der DNA-Bindestelle von Gal4, welches mit den Positionen +1 bis +38 des Adenovirus E4 Promotors und einer Luziferase-cDNA fusioniert ist. Nach Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges wird die Elk-Transaktivierungsdomäne phosphoryliert und kann durch

die Gal4-vermittelte Bindung an die DNA-Bindestelle die Transkription der Luziferase induzieren (Frost et al. 1997). Die Luziferase-Aktivität, welche proportional zur Elk-Aktivierung ist, wird dann in einer Luziferase-Messung bestimmt. Die Stimulierung der mit dem Leervektor pRK5myc transfizierten Zellen mit TPA resultiert in einer etwa 12-fachen Induktion der Elk-Aktivität (Abb.4.4A, links). In den mit dem RhoAL63-Expressionsplasmid transfizierten Zellen wurde dagegen mit TPA nur eine etwa 5,5-fache Induktion erreicht (Abb.4.4A, rechts). Dieses Experiment zeigt, dass aktives RhoA auch in der humanen T-Zell-Linie Jurkat mit der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion interferiert. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Analyse der ERK- und MEK-Aktivierung im Western Blot mit phospho-spezifischen Antikörpern. Die durch aktives HaRasL61-induzierte ERK-Phosphorylierung wird durch Co-Transfektion von RhoAL63 beeinträchtigt (Abb.4.4B). Gleiches gilt für die Ras-induzierte MEK-Aktivierung (Abb.4.4C).

Um den inhibitorischen Effekt von aktivem RhoA auf die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs zu bestätigen, wurde im nächsten Experiment anstelle der Expression von RhoAL63 das endogene RhoA aktiviert. Dazu wurde ein GST-Fusionsprotein des bakteriellen Toxins CNFy aus *Yersinia pseudotuberculosis* verwendet. CNFy aktiviert in HeLa-Zellen und hippocampalen Neuronen selektiv RhoA, während die Aktivität anderer kleiner GTPasen, wie z.B. Rac, unverändert bleibt (Hoffmann et al. 2004). Auch in Jurkat-Zellen aktiviert CNFy spezifisch RhoA (Weg-Remers, unveröffentlichte Daten). Damit stellt dieses Toxin ein geeignetes Werkzeug dar, um den Effekt der Aktivierung des endogenen RhoA auf die Signaltransduktion des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs zu untersuchen. Jurkat-Zellen wurden 24 h mit 400 ng/ml CNFy vorbehandelt und anschließend mit 0,2 ng/ml TPA induziert. Die MEK-Aktivierung wurde wie bereits beschrieben im Western Blot überprüft. In den Zellen, in denen RhoA durch CNFy aktiviert worden war, ist die MEK-Phosphorylierung deutlich reduziert (Abb.4.5). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion durch aktives RhoA gehemmt wird und schließt eine unspezifische Reaktion, bedingt durch Überexpression von RhoAL63, aus. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass SDF-1 α über die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA mit der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion, und als Folge davon mit T-Zell-Proliferation, interferiert.

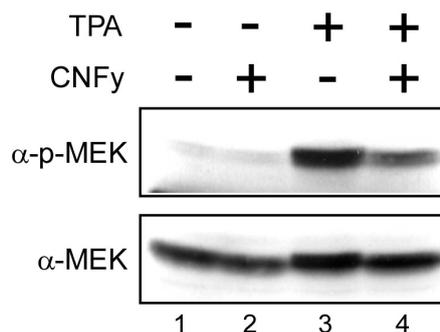


Abb.4.5 Aktivierung von endogenem RhoA durch CNFy interferiert mit der TPA-induzierten MEK-Aktivierung in Jurkat-Zellen.

Um den Effekt von endogenem aktivem RhoA auf die MEK-Aktivierung zu überprüfen, wurden 3×10^6 Jurkat-Zellen 24 h mit 400 ng/ml CNFy behandelt, anschließend 10 min mit TPA induziert und sofort geerntet. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei phospho-MEK und pan-MEK Antikörper verwendet wurden.

4.2.2 RhoA vermittelt die SDF-1 α -induzierte Hemmung der Proliferation

Die Hypothese, dass RhoA in den von SDF-1 α induzierten Mechanismus zur Hemmung der Proliferation involviert ist, wurde mit Hilfe von RhoA-siRNA überprüft.

Als siRNA (*engl. small interfering RNA*) bezeichnet man kleine doppelsträngige RNA-Fragmente (ca. 22 Nukleotide), die der Sequenz eines Zielgens komplementär sind. In der Zelle dient siRNA dem Abbau von Fremd-RNA, sowie der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse. Synthetisch hergestellte siRNA wird zur spezifischen Herunterregulierung eines bestimmten Gens (Knockdown) benutzt. Die siRNA bindet an die mRNA, führt zu deren Degradierung und verhindert so die Translation. Damit stellt die siRNA ein Werkzeug für die gezielte Untersuchung der Funktion von Genen bzw. Proteinen dar (Elbashir et al. 2001).

Mit RhoA-spezifischer siRNA wurde die Expression dieser kleinen GTPase in primären humanen T-Zellen deutlich herunterreguliert (Abb.4.6A). Die Frage war, ob SDF-1 α in diesen Zellen die IL-2-induzierte Proliferation noch hemmt. Das Experiment zur Untersuchung der Proliferation wurde wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben durchgeführt. In Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, interferiert SDF-1 α wie bereits beschrieben mit der IL-2-induzierten Proliferation (Abb.4.6B, Balken 3 und 4). Wird die RhoA-Expression durch Transfektion einer spezifischen RhoA-siRNA gehemmt, so ist SDF-1 α nicht mehr in der Lage, die Proliferation zu beeinträchtigen (Abb. 4.6B, Balken 7 und 8). Dies beweist, dass die kleine GTPase RhoA die Verringerung der Proliferation durch SDF-1 α vermittelt.

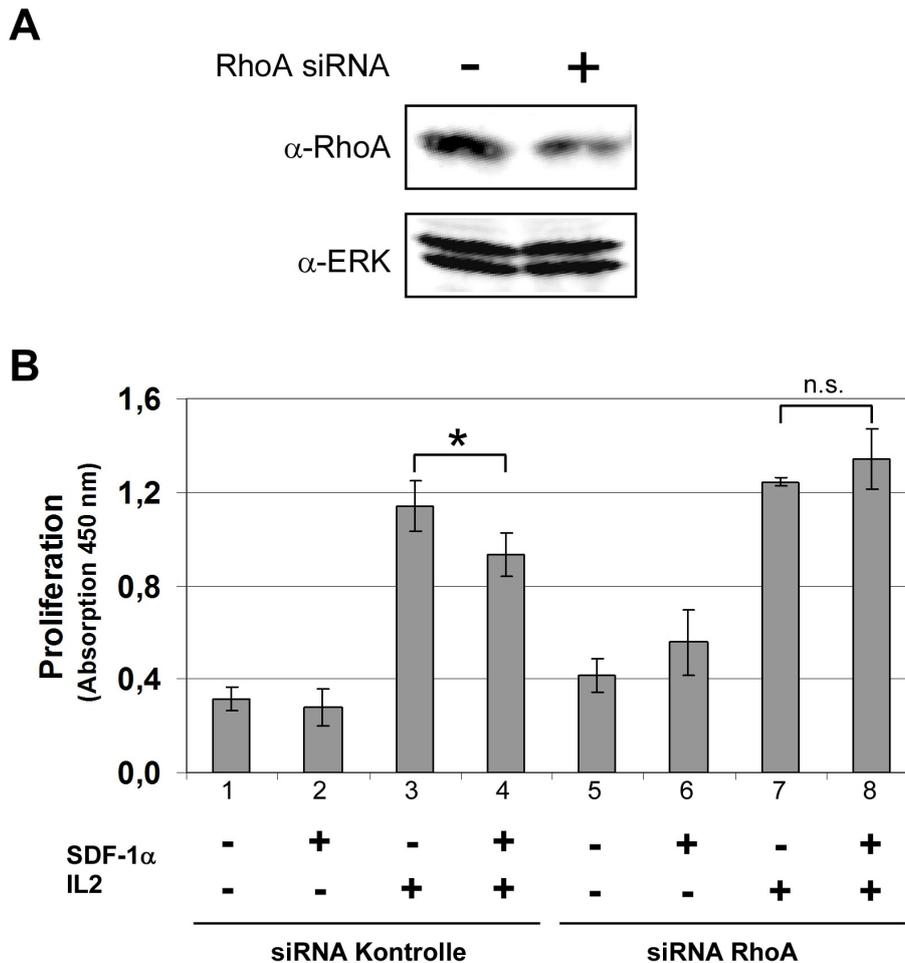


Abb.4.6 RhoA ist an der SDF-1 α -vermittelten Herunterregulierung der IL-2 induzierten Proliferation in primären humanen T-Zellen beteiligt.

Zur Überprüfung der Rolle von RhoA bei der SDF-1 α -vermittelten Herunterregulierung der IL-2-induzierten Proliferation wurden 5×10^6 primäre humane T-Zellen mit $1,5 \mu\text{g}$ siRNA transfiziert (Amaxa-Methode). 20 h nach Transfektion der Kontroll-siRNA bzw. der RhoA-siRNA wurden (A) die Gesamtzell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei RhoA und pan-ERK Antikörper verwendet wurden bzw. (B) für jede Veruchsbedingung 3 Ansätze mit je 8×10^4 primären humanen T-Zellen 24 h in Medium mit 0,25% FCS ohne IL-2 kultiviert und ggf. gleichzeitig mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Die Proliferation wurde durch Zugabe von 100 U/ml IL-2 induziert und nach 48 h mittels BrdU-Inkorporation für 6 h detektiert. Die Signifikanz wurde mit dem Student t-Test berechnet (* $p < 0,05$; n.s. nicht signifikant).

4.2.3 Charakterisierung des beteiligten RhoA-induzierten Signalwegs mit Hilfe von RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten

Bei „effector-loop“-Mutanten wird der Effektor-bindende Teil (*engl. effector loop*) einer konstitutiv aktiven GTPase durch Punktmutation so verändert, dass die Interaktion zwischen verschiedenen Effektormolekülen und der GTPase nicht mehr zustande kommt. Jede „effector-loop“-Mutante kann also nur noch bestimmte Effektoren aktivieren. Mit Hilfe von RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten sollte nun untersucht

werden, welches von RhoA aktivierte Effektor-Molekül die Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs vermittelt.

Die RhoAL63-Mutanten F39A, F39V, E40L, E40N und Y42C wurden durch Mutagenese des RhoAL63-Konstruktes in unserem Labor hergestellt. Ihre Funktionalität wurde zunächst in Bezug auf die Aktivierung des SRF (serum response factor) getestet, da die Aktivierung des SRF durch die RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten bereits in der Literatur beschrieben war (Sahai et al. 1998) und so ein geeignetes Testexperiment darstellt. Verwendet wurde ein SRE-Luziferase-Reporterkonstrukt, bei dem die Expression des Luziferase-Gens durch einen synthetischen Promotor kontrolliert wird, welcher direkte Wiederholungen des SRE (*engl. serum response element*) enthält. Die Luziferase-Expression wird durch Bindung des aktivierten SRF an das SRE induziert. Jurkat-Zellen wurden mit dem SRE-Luziferase-Reporterkonstrukt sowie der jeweiligen RhoAL63-„effector-loop“-Mutante kotransfiziert. Die Luziferase-Aktivität, welche proportional zur SRE-Aktivierung ist, wurde nach 24 h in einer Luziferase-Messung bestimmt.

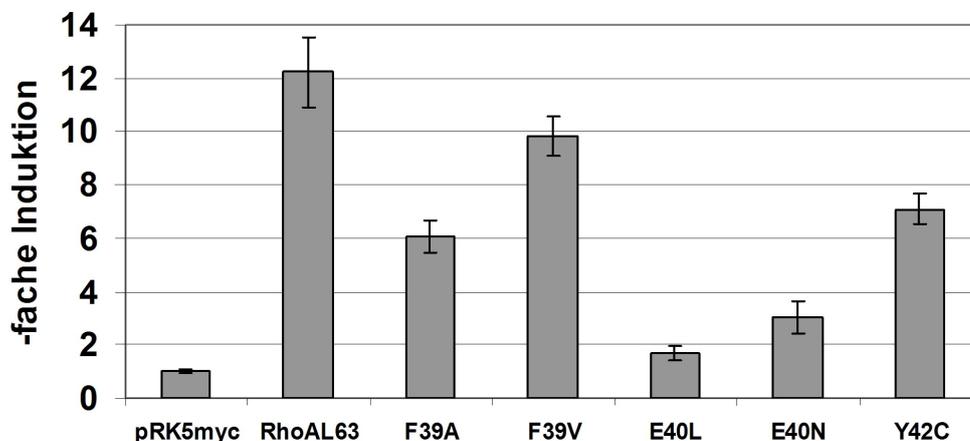


Abb.4.7 SRF-Aktivierung durch RhoAL63 und RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten.

Die Induktion SRF-abhängiger Transkription wurde mit Hilfe eines pSRE-Luc Reportersystems getestet. $1,2 \times 10^6$ Jurkat-Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ des pSRE-Luc Reporterkonstrukts und $0,5 \mu\text{g}$ eines Expressionsvektors für RhoAL63 oder die entsprechende Mutante bzw. des Leervektors durch Lipofektion mit Lipofectamine2000 transfiziert und in Medium 24h kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Luziferase-Aktivität wurde gemessen.

Das Ergebnis dieses Experiments (Abb.4.7) stimmt mit den Daten aus der Literatur überein (Sahai et al., 1998). Während die Mutanten F39A, F39V und Y42C eine 6- bis 10-fache Induktion der Luziferase-Aktivität bewirken, findet durch die Mutante E40L keine, durch die Mutante E40N lediglich eine schwache Induktion statt. Dieses

Experiment zeigt, dass die in unserem Labor hergestellten Mutanten in Jurkat-Zellen den erwarteten Effekt vermitteln. Sie konnten daher eingesetzt werden, um den RhoA-Effektor, der für die Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs verantwortlich ist, näher zu charakterisieren.

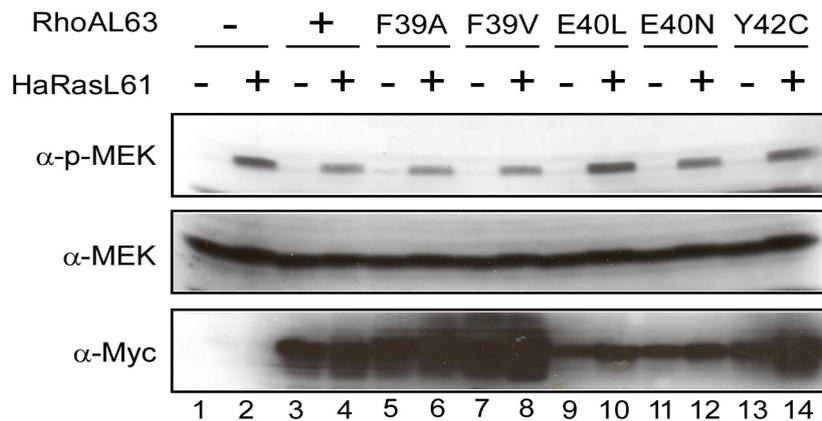
Nun folgte das eigentliche Experiment, in dem getestet wurde, welche RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten nicht mehr in der Lage sind, MEK-Phosphorylierung zu inhibieren. Durch Analyse der Bindungseigenschaften der „effector-loop“-Mutanten können dann die Effektoren eingegrenzt werden, die für die Vermittlung des inhibitorischen RhoA-Effekts in Frage kommen. Der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg wurde in Jurkat-Zellen durch Transfektion eines Expressionsplasmids für konstitutiv aktives Ras induziert. Das Expressionsplasmid für RhoAL63 oder die entsprechende „effector-loop“-Mutante bzw. als Kontrolle der Leervektor wurde kotransfiziert. Die Analyse der MEK-Aktivierung erfolgte nach SDS-PAGE mittels Western Blot mit einem phospho-spezifischen MEK-Antikörper, wobei die Ladung mit einem pan-MEK-Antikörper kontrolliert wurde. Die Expression der RhoA-Mutanten wurde mittels eines Antikörpers gegen das Epitop des c-myc-Proteins überprüft.

Wie bereits zuvor gezeigt, resultiert die Expression von RhoAL63 im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen in einer Reduktion der Ras-induzierten MEK-Phosphorylierung (Abb.4.8A, vgl. Spur 4 mit Spur 2). Eine leichte Reduktion erhält man auch bei Expression der Mutanten F39A, F39V, E40N und Y42C (Abb.4.8A, vgl. die jeweilige Spur mit Spur 2). Die Mutante E40L ist allerdings nicht mehr in der Lage, die MEK-Aktivierung zu hemmen. Von den fünf untersuchten „effector-loop“-Mutanten hat also nur die Mutante E40L die Affinität zu dem Effektormolekül verloren, das die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion vermittelt.

Die Effektor-Bindungseigenschaften der RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten wurden bisher in Hefe-Zwei-Hybrid-Ansätzen sowie *in vitro* durch GST-Affinitätspräzipitationen untersucht (Sahai et al, 1998); sie sind in Abb.4.8B dargestellt. Die Mutante E40L hat demzufolge die Fähigkeit verloren, mit den Effektoren ROCK und Kinectin zu interagieren. Allerdings kann dies nicht der Grund dafür sein, dass diese Mutante nicht mehr mit der MEK-Aktivierung interferiert, da die Mutante F39A ebenfalls nicht mehr mit diesen beiden Effektoren interagieren kann. Die bisher bekannten Daten lassen keinen Schluss auf den gesuchten RhoA-Effektor zu, da die Mutante F39A, welche die Fähigkeit zur Bindung fast aller getesteten Effektoren

verloren hat, die Hemmung der MEK-Phosphorylierung noch vermittelt. Bisher wurden jedoch nicht alle bekannten RhoA-Effektoren in den oben genannten Bindungsexperimenten getestet. Um den gesuchten RhoA-Effektor zu identifizieren, müssten die Bindungseigenschaften der „effector-loop“-Mutanten in Bezug auf weitere RhoA-Effektoren geprüft werden. Außerdem ist es möglich, dass ein bisher unbekannter, möglicherweise T-Zell-spezifischer Effektor involviert ist.

A



B

RhoAL63-Mutante	Effektoren					
	PKN	ROCK	Rhophilin	Kinectin	Citron	mDia2
F39A	-	-	-	-	-	++++
F39V	-	++++	-	-	-	++++
E40L	++	-	++++	-	++++	++++
E40N	++	++++	++++	+	++++	++++
Y42C	-	++++	++	+++	++++	++++

(nach Sahai et al., 1998)

Abb.4.8 Inhibierung der HaRasL61-induzierten MEK-Phosphorylierung durch RhoAL63 und RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten.

(A) Jurkat-Zellen (1×10^7 Zellen pro Ansatz) wurden mit 10 μ g eines Expressionsplasmids für RasL61 und 20 μ g eines Expressionsplasmids für RhoAL63 bzw. der entsprechenden Leervektoren durch Elektroporation transfiziert und nach 24 h geerntet. Es folgten Lyse und Analyse auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot, der mit phospho-(p-) und pan-MEK Antikörpern sowie zur Kontrolle der Expression der RhoA-Mutanten mit myc-Antikörpern behandelt wurde. (B) Bindungseigenschaften der RhoAL63-Effector-loop-Mutanten nach Sahai et al. (1998).

4.3 Die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion – Aufklärung des Mechanismus

4.3.1 Das direkte Ziel der RhoA-vermittelten Hemmung ist Raf

Zur Aufklärung des Mechanismus, mit dem RhoA die Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung hemmt, ist es wichtig zu wissen, auf welcher Ebene RhoA in die Signalkaskade eingreift. Das Signalmolekül, welches das Ziel der RhoA-vermittelten Hemmung ist, sollte daher in den folgenden Experimenten identifiziert werden. Wie bereits gezeigt wurde, interferiert aktives RhoA mit der Ras-induzierten MEK-Aktivierung (Abb.4.4C). Daher muss der inhibitorische Mechanismus zwischen diesen beiden Komponenten der Signalkaskade ansetzen. Das Signal von Ras wird über die Aktivierung von Raf an MEK weitergeleitet. Die Frage, ob aktives RhoA auch die Aktivierung der Kinase Raf hemmt, wurde mit Hilfe eines Raf-Kinase-Tests untersucht. Bei diesem Test wird die Fähigkeit vom immunpräzipitiertem Raf geprüft, in einer *in vitro* Reaktion rekombinantes MEK zu phosphorylieren. Immunpräzipitiertes Raf aus Zellen, welche konstitutiv aktives Ras exprimieren, ist aktiv und phosphoryliert das rekombinante MEK (Abb.4.9A, Spur 2). Exprimieren die Zellen jedoch zusätzlich konstitutiv aktives RhoA, so wird Raf nicht aktiviert, was in einer fehlenden MEK-Phosphorylierung bei der *in vitro*-Reaktion resultiert (Abb.4.9A, Spur 4). Die Kontrolle ohne rekombinantes MEK (Abb.4.9A, Spur 5) sowie die Verwendung eines Isotyp-Kontroll-Antikörpers (Abb.4.9A, Spur 6) zeigen die Spezifität dieses Experiments. Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits auf der Ebene von Raf eine Hemmung durch RhoA stattfindet.

Um zu überprüfen, ob RhoA auch mit der Aktivierung der kleinen GTPase Ras interferiert, wurde die Ras-Aktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von aktivem RhoA untersucht. In Jurkat-Zellen, die mit einem Expressionsplasmid für RhoAL63 transfiziert worden waren, wurde nach 24 h Ras-Aktivierung durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28-Antikörpern induziert. Zur Bestimmung der Ras-Aktivität wurde ein GST-Fusionsprotein der Ras-Bindedomäne von Raf (Raf-RBD) verwendet, welches nur an GTP-gebundenes aktives Ras bindet. Die mit dieser Methode präzipitierten Proteine wurden zusammen mit einem Aliquot der Zell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Mit einem anti-Ras-Antikörper wurde das präzipitierte Ras-Protein sowie das Ras in den Gesamtzell-Lysaten detektiert; zusätzlich wurde in den Zell-Lysaten mit einem phospho-

spezifischen MEK-Antikörper die Aktivierung von MEK sowie dessen Hemmung durch aktives RhoA überprüft. Dieses Experiment zeigt, dass auf der Ebene der Ras-Aktivierung keine Hemmung stattfindet und die Ras-Aktivierung durch aktives RhoA sogar leicht verstärkt wird, obwohl in Anwesenheit von aktivem RhoA die MEK-Aktivierung deutlich gehemmt ist (Abb.4.9B, vgl. Spur 4 mit Spur 3). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die RhoA-vermittelte Inhibierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion auf der Ebene der Raf-Aktivierung stattfindet.

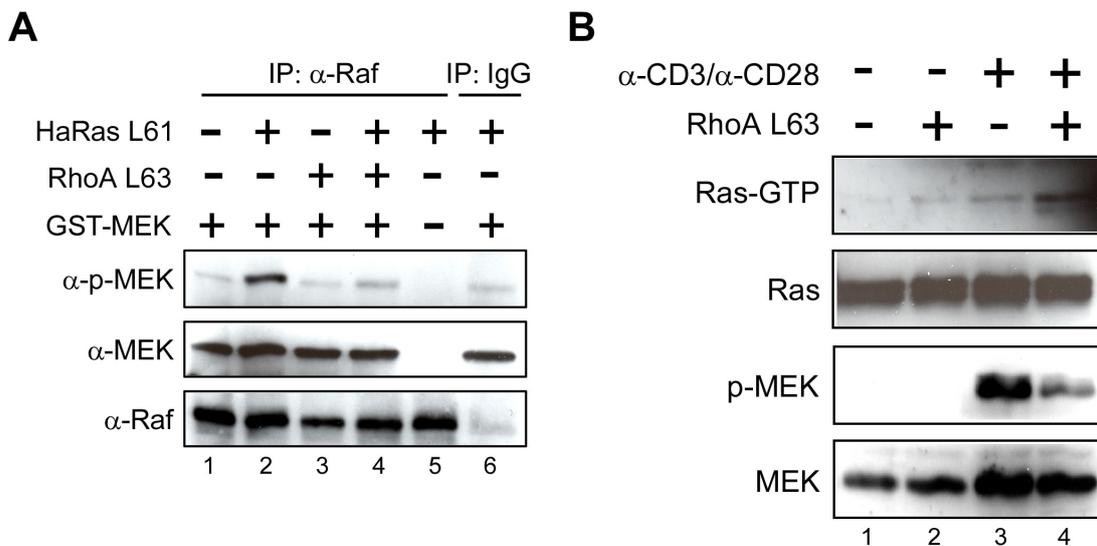


Abb.4.9 RhoAL63 hemmt die Raf-Aktivierung, während die Ras-Aktivität nicht beeinflusst wird. (A) Inhibierung der HaRasL61-induzierten Raf-Aktivierung durch RhoAL63. Aus Jurkat-Zellen (2×10^7 Zellen pro Ansatz), welche mit $20 \mu\text{g}$ eines RhoAL63-Expressionsplasmids und $10 \mu\text{g}$ eines HaRas-L61-Expressionsplasmids bzw. den entsprechenden Leervektoren durch Elektroporation transfiziert und nach 24 h lysiert worden waren, wurde Raf immunpräzipitiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation wurde ein Ansatz mit einem Isotyp-Antikörper mitgeführt. In einem *in vitro*-Kinase-Test wurde die Raf-Aktivität durch Phosphorylierung von rekombinarem GST-MEK getestet. Die Analyse der Kinaseaktivität erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot, der mit phospho-(p-) und pan-MEK sowie zur Kontrolle der Immunpräzipitation mit Raf-Antikörpern behandelt wurde. (B) Intakte Ras-Aktivierung in Anwesenheit von RhoAL63. 6×10^7 Zellen wurden durch Elektroporation mit $60 \mu\text{g}$ eines RhoAL63-Expressionsvektors bzw. des entsprechenden Leervektors transfiziert und nach 24 h Kultivierung in Medium 5 min mit anti-CD3- und anti-CD28 Antikörpern (je $5 \mu\text{g/ml}$), die mittels $20 \mu\text{g/ml}$ Ziege-anti-Maus-Antikörpern vernetzt waren, induziert. Die Zellen wurden lysiert und das aktive Ras mit GST-Raf-RBD präzipitiert. Das aktive Ras wurde mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot mit einem anti-Ras Antikörper zusammen mit den Lysaten als Ladekontrolle analysiert, außerdem wurden phospho-MEK und MEK mit den entsprechenden Antikörpern in den Lysaten detektiert.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen gibt es nun zwei Möglichkeiten für den Mechanismus der RhoA-vermittelten Hemmung. Entweder RhoA interferiert gezielt mit der Aktivierung von Raf, während die Signalübertragung unterhalb von Raf noch funktionieren würde, oder RhoA verhindert die Signalübertragung unterhalb von Ras

vollständig, was beispielsweise durch die Inaktivierung eines so genannten „Scaffold“-Proteins bedingt sein könnte. Ein „Scaffold-Protein“ bringt die einzelnen Komponenten eines Signalwegs in räumliche Nähe zueinander, so dass eine Aktivierung und damit eine Weiterleitung des Signals stattfinden kann. Ein Beispiel für ein solches „Scaffold-Protein“ ist das Protein KSR, das Bindestellen für Raf, MEK und ERK besitzt und die Translokation dieses Komplexes zu Ras an die Membran bewirkt (Roy et al. 2002).

Um zu klären, welche der beiden Möglichkeiten hier eine Rolle spielt, wurden die einzelnen Schritte der Signalübertragung überprüft. Dazu wurden Transfektions-Experimente mit konstitutiv aktiven Mutanten von Raf (Raf-BXB) und MEK (MEK1-DD) durchgeführt. Wird Raf-BXB in Jurkat-Zellen exprimiert, so führt dies zur Phosphorylierung von MEK (Abb.4.10A, Spur 3). Die gleichzeitige Expression von RhoAL63 interferiert nicht mit der MEK-Phosphorylierung; RhoAL63 bewirkt sogar eine leichte Erhöhung der MEK-Aktivierung (Abb.4.10A, Spur 4). Die Expression von MEK-1DD in Jurkat-Zellen induziert ERK-Phosphorylierung (Abb.4.10B, Spur 3), die ebenfalls nicht durch RhoAL63 gehemmt, sondern leicht induziert wird (Abb.4.10B, Spur 4). Die Expression von RhoAL63 wurde durch Detektion des Epitops des c-myc-Proteins überprüft.

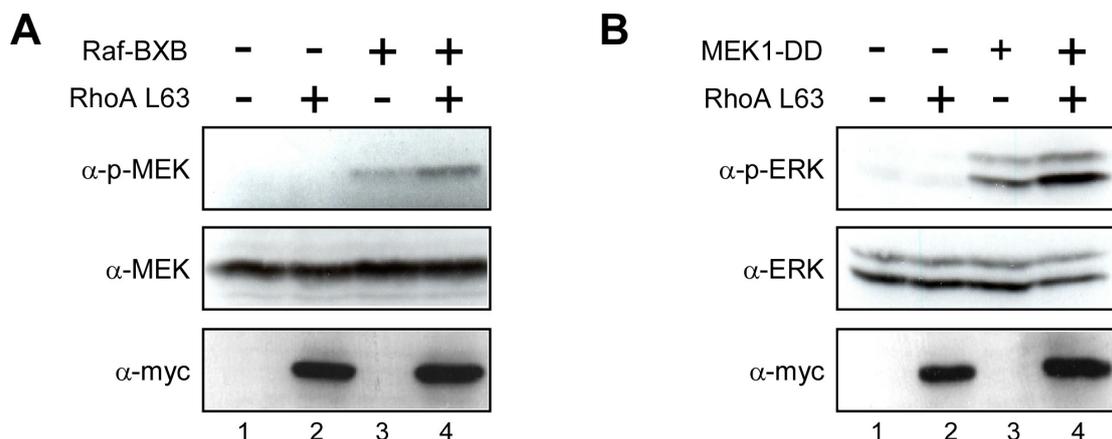


Abb.4.10 Die Raf-MEK-ERK Signalübertragung wird durch RhoAL63 nicht gestört.

Überprüfung der Raf-MEK- sowie der MEK-ERK-Signalübertragung in Anwesenheit von RhoAL63. 1×10^7 Jurkat-Zellen wurden mit 20 µg eines Expressionsplasmids für RhoAL63 und 10 µg eines Expressionsplasmids für (A) Raf-BXB bzw. (B) MEK1-DD oder die entsprechenden Vektorkontrollen durch Elektroporation transfiziert und nach 24 h geerntet. Es folgten Lyse und Analyse auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western Blot, der mit phospho-(p-) und pan-Mek bzw. Erk Antikörpern sowie einem anti-Myc-Antikörper behandelt wurde.

Dies zeigt, dass die Hemmung der Signalübertragung durch RhoA direkt auf der Ebene von Raf stattfindet, während die Signalweiterleitung von Raf über MEK zu ERK noch intakt ist.

4.3.2 RhoA interferiert mit dem Rac-PAK Signalweg und verhindert die Phosphorylierung von Raf-S338

Zur vollständigen Raf-Aktivierung ist das koordinierte Zusammenspiel zahlreicher Ereignisse wie z.B. die Rekrutierung von Raf an die Membran, die Phosphorylierung aktivierender und die Dephosphorylierung inhibitorischer Aminosäurereste notwendig (siehe auch Kapitel 1.3.2). Das Ziel der folgenden Experimente war es, den Mechanismus, mit dem RhoA die Raf-Aktivierung hemmt, näher zu untersuchen. Zunächst wurde überprüft, ob RhoA durch Beeinflussung eines Phosphorylierungs-Ereignisses mit der Raf-Aktivierung interferiert. Zur Analyse der einzelnen Raf-Phosphorylierungsstellen im Western Blot wurden Antikörper verwendet, die jeweils die Phosphorylierung an einer bestimmten Stelle im Raf-Molekül spezifisch erkennen. Zunächst wurde die Phosphorylierung der aktivierenden Stelle Serin 338 untersucht. Die Expression von RhoAL63 führt zu einer deutlichen Reduktion der TPA-induzierten S338-Phosphorylierung (Abb.4.11A, vgl. Spur 4 mit Spur 3). Im Gegensatz dazu hat RhoAL63 keinen Effekt auf die TPA-induzierte Dephosphorylierung der inhibierenden Stelle Serin 259 (Abb.4.11B, vgl. Spur 4 mit Spur 3).

Bereits die Untersuchung dieser beiden Phosphorylierungsstellen lässt einige Schlussfolgerungen in Bezug auf den Mechanismus zu. Da RhoAL63 die Phosphorylierungsstelle S259 nicht beeinflusst, wird nicht der gesamte Raf-Aktivierungsmechanismus, sondern nur ein Teil davon gehemmt. Einer der ersten Schritte, die Dephosphorylierung des S259 (Dhillon et al. 2002), scheint intakt zu sein. Auch die S338-Phosphorylierung ist ein entscheidendes Ereignis für die weitere Raf-Aktivierung (Diaz et al. 1997). Deshalb kann man davon ausgehen, dass darauf folgende Phosphorylierungsereignisse, beispielsweise am Tyrosin 341, ebenfalls gehemmt werden. Es ist also wahrscheinlich, dass die S338-Phosphorylierung der Angriffspunkt der RhoA-induzierten Hemmung ist.

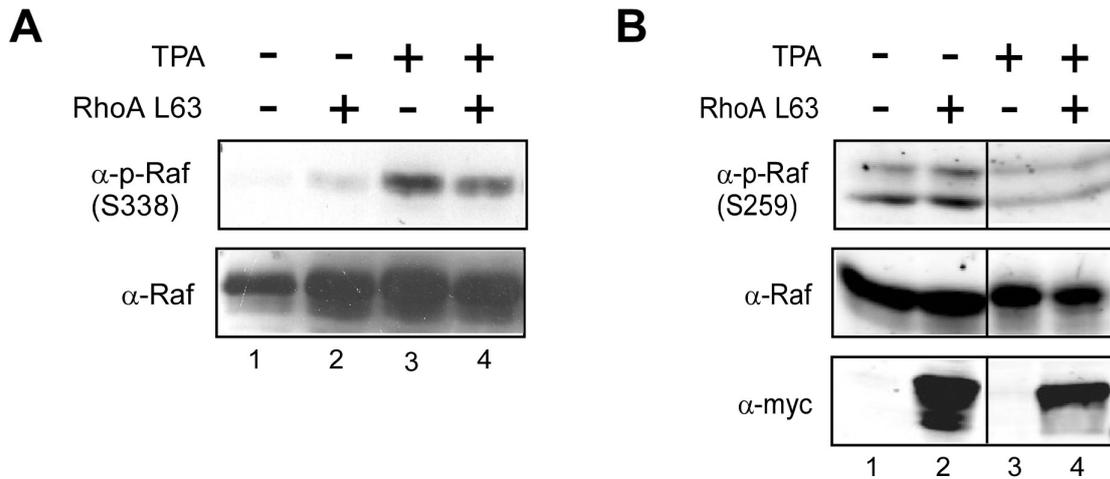


Abb.4.11 Hemmung der Raf-S338 Phosphorylierung durch RhoAL63.

Die Raf-Phosphorylierung wurde mit Hilfe phosphospezifischer Raf-Antikörper untersucht. 1×10^7 Zellen wurden mit 30 μg RhoAL63-Expressionsplasmid bzw. entsprechendem Leervektor durch Elektroporation transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 400 μl PBS bei 37°C 2 min mit 40 ng/ml TPA induziert. Die Zellen wurden lysiert und das Gesamtzell-Lysat mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Verwendet wurde ein (A) anti-p-Raf-S338 bzw. ein (B) anti-Raf-S259 Antikörper. Die gleiche Ladung an Raf-Protein wurde mit einem anti-Raf-1 Antikörper überprüft; bei (B) wurde zusätzlich die Expression von RhoAL63 mit einem anti-Myc-Antikörper überprüft.

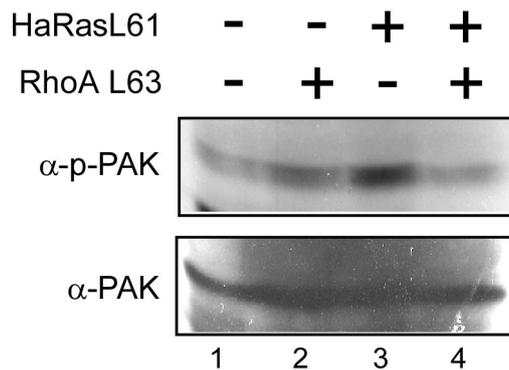


Abb.4.12 RhoAL63 inhibiert die HaRasL61-induzierte PAK-Phosphorylierung.

Der Effekt von RhoAL63 auf PAK-Aktivierung wurde mittels phosphospezifischer PAK-Antikörper untersucht. Dazu wurden 1×10^7 Jurkat-Zellen pro Ansatz mit 15 μg eines RhoAL63-Expressionsplasmids und 15 μg eines HaRas-L61-Expressionsplasmids bzw. den entsprechenden Leervektoren durch Elektroporation transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, wobei phospho-PAK und pan-PAK Antikörper verwendet wurden.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Aktivierung des Rac-PAK Signalwegs in Anwesenheit von RhoAL63 untersucht. Der Rac-PAK Signalweg ist nach bisherigen Erkenntnissen der einzige Signalweg, durch den Raf am Serin 338 phosphoryliert wird (King et al. 1998; King et al. 2001). Die Kinase PAK, deren Aktivität mit phospho-spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden kann, wurde durch Expression von HaRasL61 in Jurkat-Zellen aktiviert (Abb.4.12, Spur 3). Die gleichzeitige Expression von RhoAL63 resultiert in einer verminderten PAK-Phosphorylierung (Abb.4.12, Spur 4). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass RhoA mit der Rac-PAK-Signaltransduktion interferiert, dem Signalweg, der die Phosphorylierung von Raf-S338 vermittelt.

4.3.3 Konstitutiv aktives Rac verhindert sowohl die RhoA- als auch die SDF-1 α -induzierte Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion

Die bisherigen Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass aktives RhoA durch Hemmung des Rac-PAK Signalwegs, und damit der Phosphorylierung des Serin 338 im Raf-Molekül, die Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion stört (Abb.4.13).

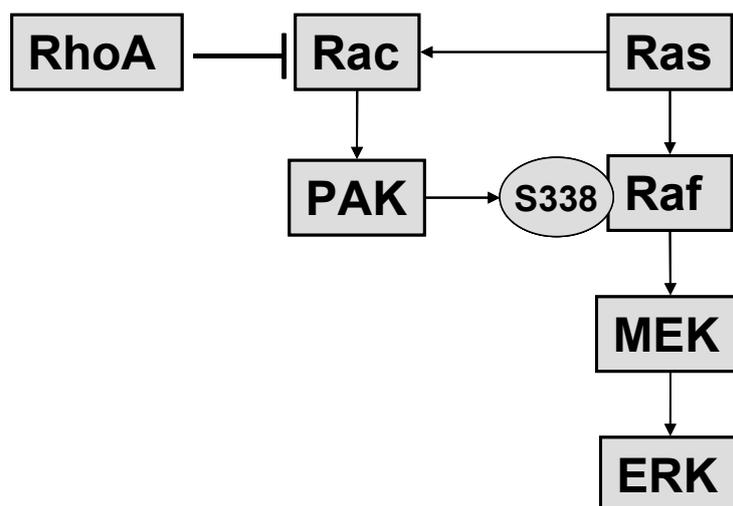


Abb.4.13 Schema: RhoA interferiert mit dem Rac-PAK Signalweg und stört so die Raf-Aktivierung.

Ist die Hypothese richtig, dann sollte es möglich sein, diese Hemmung durch konstitutive Aktivierung des Rac-PAK-Signalwegs zu vermeiden, beispielsweise durch Transfektion eines Expressionsplasmids für aktives Rac (RacL61). Auch die RacL61-„effector-loop“-Mutante F37A, welche in Bezug auf die Aktivierung des Effektors PAK noch intakt ist (Lamarche et al. 1996), sollte die Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs durch aktives RhoA verhindern. Im Gegensatz dazu sollte die „effector-loop“-Mutante Y40C, welche die Affinität für PAK verloren hat (Lamarche et al. 1996), den Effekt durch RhoA nicht beeinflussen.

Um dies zu testen, wurden Jurkat-Zellen mit einem Expressionsplasmid für konstitutiv aktives Rac (RacL61), für die Mutante F37A oder Y40C bzw. mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. RhoA wurde durch 24 h Inkubation der Zellen mit 400 ng/ml CNFy aktiviert. Danach wurde der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg mit 0,2 ng/ml TPA induziert und die Phosphorylierung von MEK in den Gesamtzell-Lysaten überprüft. Die Expression der „effector-loop“-Mutanten wurde mit einem Antikörper gegen das Epitop des c-myc-Proteins kontrolliert. Während in den Leervektor-transfizierten Zellen eine deutliche Hemmung der TPA-induzierten MEK-Phosphorylierung durch aktives RhoA zu sehen ist (Abb.4.14, vgl. Spur 4 mit Spur 3), bleibt die Menge an aktivem MEK in den Zellen, die aktives Rac exprimieren, gleich (Abb.4.14, vgl. Spur 8 mit Spur 7). Das gleiche gilt für die Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für die „effector-loop“-Mutante F37A transfiziert wurden (Abb.4.14, vgl. Spur 12 mit Spur 11). Die Expression der Mutante Y40C dagegen kann die RhoA-vermittelte Hemmung der MEK-Phosphorylierung nicht verhindern (Abb.4.14, vgl. Spur 16 mit Spur 15). Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Hemmung des Rac-PAK Signalwegs der Grund für die Störung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung ist.

Die Untersuchung der RhoA-vermittelten Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion beruht auf der Annahme, dass SDF-1 α durch Induktion dieses Mechanismus mit der Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs, und damit der Proliferation, interferiert. Daher sollte auch die SDF-1 α -vermittelte Hemmung der MEK-Aktivierung durch Expression von konstitutiv aktivem Rac verhindert werden. Diese Annahme wurde durch ein Experiment überprüft, in dem untersucht wurde, ob die Hemmung der TPA-induzierten MEK-Phosphorylierung durch SDF-1 α in Zellen verhindert wird, in denen Rac konstitutiv aktiv ist. Hierfür wurden Jurkat-Zellen mit einem Expressionsplasmid für RacL61 sowie einem Expressionsvektor für CXCR4

transfiziert, mit SDF-1 α vorbehandelt und anschließend mit TPA stimuliert. In den Zell-Lysaten wurde die MEK-Aktivität mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot analysiert. Während in den Leervektor-transfizierten Zellen eine deutliche Hemmung der TPA-induzierten MEK-Phosphorylierung durch aktives RhoA zu sehen ist (Abb.4.15, vgl. Spur 4 mit Spur 3), bleibt die Menge an aktivem MEK in den Zellen, die aktives Rac exprimieren, gleich (Abb.4.15, vgl. Spur 8 mit Spur 7). Dieses Ergebnis bestätigt, dass SDF-1 α durch Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, die mit dem Rac-PAK Signalweg interferiert, die Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung beeinträchtigt.

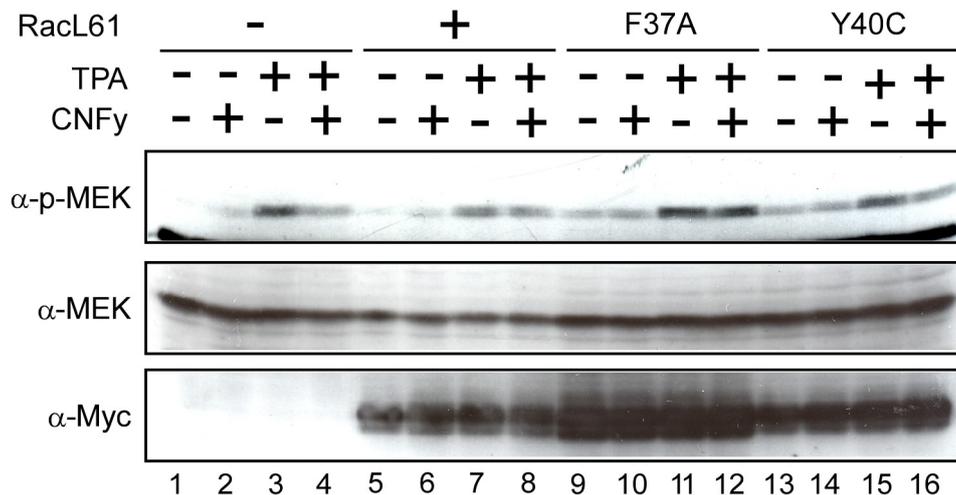


Abb.4.14 Konstitutiv aktives Rac verhindert die RhoA-vermittelte Hemmung der MEK-Aktivierung.

1x10⁷ Jurkat-Zellen wurden mit 30 μ g eines Expressionsvektors für RacL61, RacL61-F37A, RacL61-Y40C bzw. des entsprechenden Leervektors mittels Elektroporation transfiziert. 16 h nach der Elektroporation wurden die Zellen 24 h mit 400 ng/ml CNFy behandelt und danach 10 min mit 0,2 ng/ml TPA induziert. Die Zellen wurden lysiert und auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert, der mit phospho-(p-) und pan-MEK sowie zur Kontrolle der Expression der Rac-Mutanten mit myc-Antikörpern behandelt wurde.

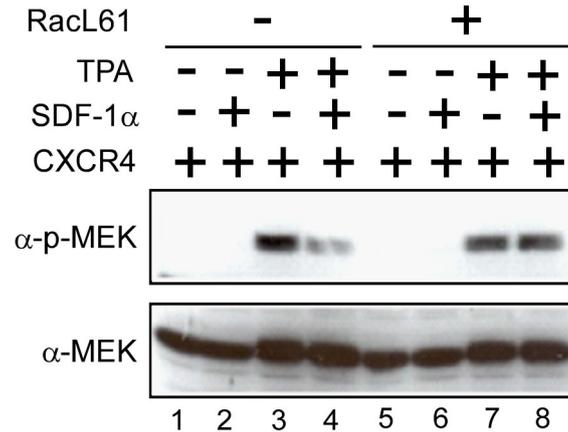


Abb.4.15 Konstitutiv aktives Rac verhindert die SDF-1 α -vermittelte Hemmung der MEK-Aktivierung.

1×10^7 Jurkat-Zellen wurden mit 15 μg eines Expressionsvektors für RacL61 und 15 μg eines Expressionsvektors für CXCR4 bzw. des entsprechenden Leervektors mittels Elektroporation transfiziert. 16 h nach der Elektroporation wurden die Zellen 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt und danach 10 min mit 0,2 ng/ml TPA induziert. Die Zellen wurden lysiert und auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert, der mit phospho-(p-) und pan-MEK-Antikörpern behandelt wurde.

4.4 Überprüfung der Allgemeingültigkeit des beschriebenen Mechanismus

4.4.1 SDF-1 α interferiert nicht mit der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation

In der Literatur ist SDF-1 α als Co-Aktivatoren der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation beschrieben (Nanki and Lipsky 2000; Nanki and Lipsky 2001). Dies lässt vermuten, dass es in Bezug auf den Effekt von SDF-1 α einen Unterschied zwischen der IL-2-induzierten und der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation gibt. Die von Nanki und Lipsky beschriebenen Experimente wurden allerdings unter anderen experimentellen Bedingungen durchgeführt. So wurden die Zellen nur 2 h mit SDF-1 α vorbehandelt und die signifikanten Effekte wurden erst bei sehr hohen SDF-1 α -Konzentrationen (50-500 ng/ml) beobachtet. Diese Experimente lassen sich also nicht direkt mit den hier durchgeführten Experimenten vergleichen. Deshalb wurden im folgenden Experiment T-Zellen 1 h bzw. 24 h mit SDF-1 α vorbehandelt und unter identischen experimentellen Bedingungen mit IL-2, anti-CD3-Antikörpern oder anti-CD3 und anti-CD28-Antikörpern stimuliert (Abb.4.16). SDF-1 α interferiert bereits nach 1 h Vorbehandlung mit der IL-2-induzierten Proliferation, wobei der Effekt nach 24 h SDF-1 α -Vorbehandlung deutlicher wird (Abb.4.16, Balken 4-6). Im Gegensatz

dazu wird weder die anti-CD3 noch die anti-CD3/anti-CD28-induzierte Proliferation durch SDF-1 α gehemmt (Abb.4.16, Balken 7-9 und 10-12). Das T-Zell-Rezeptor-Signal scheint also in Bezug auf Proliferation dominant über das SDF-1 α -Signal zu sein. In unserem Labor durchgeführte Experimente zeigen, dass die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors eine Herunterregulierung der basalen RhoA-Aktivität bewirkt (Weg-Remers, unveröffentlichte Daten). Dies deutet darauf hin, dass durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung der hier charakterisierte negativ regulatorische Mechanismus außer Kraft gesetzt wird, so dass eine vollständige Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs möglich ist.

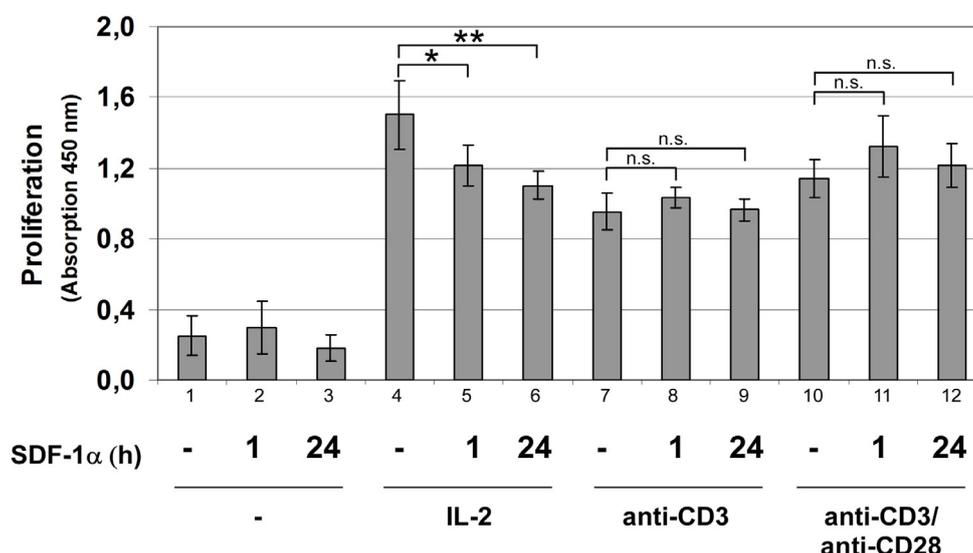


Abb.4.16 Die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation wird nicht durch SDF-1 α gehemmt.

Um zu überprüfen, ob SDF-1 α die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation hemmt, wurden für jede Veruchsbedingung 4 Ansätze mit je 8×10^4 primären humanen T-Zellen 24 h in Medium mit 0,25% FCS ohne IL-2 kultiviert und 24 h bzw. 1 h vor Induktion mit 10 ng/ml SDF-1 α behandelt. Die Proliferation wurde durch Zugabe von 100 U/ml IL-2 oder durch Inkubation der Zellen mit an die Zellkulturschale gebundenen anti-CD3-Antikörpern (1 μ g/ml) und anti-CD28-Antikörpern (9 μ g/ml) induziert und nach 48 h mittels BrdU-Inkorporation für 6 h detektiert. Die Signifikanz wurde mit dem Student t-Test berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. nicht signifikant).

4.4.2 Auch der pathologische CXCR4-Ligand, das HIV-Glycoprotein gp120, interferiert mit der Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade

SDF-1 α ist der einzige bisher beschriebene physiologische Ligand des Chemokin-Rezeptors CXCR4. Jedoch wurde bereits mehrfach beschrieben, dass auch Viren die Chemokin-Rezeptoren für ihre Zwecke verwenden und sich die Signaltransduktion dieser Rezeptoren zunutze machen, um normale zelluläre Programme zu verändern

(Sodhi et al. 2004). Auch CXCR4 spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle, und zwar bei der Pathogenese von HIV (*engl. human immunodeficiency virus*). CXCR4 wurde, neben dem Hauptrezeptor CD4, als Korezeptor für HIV bei der Infektion von T-Zellen identifiziert. Dabei bindet das Glykoprotein gp120, das sich an der Oberfläche des HI-Virus befindet, an CXCR4 und ermöglicht auf diese Weise den Eintritt des HI-Virus in die Zelle. Das Hauptproblem bei der HIV-Infektion ist die Apoptose der CD4-T-Zellen und infolgedessen eine Immunabwehrschwäche, die opportunistische Infektionen ermöglicht. Interessant ist, dass nicht nur infizierte CD4-T-Zellen sterben, sondern vor allem in nicht infizierten Zellen durch lösliche Faktoren wie z.B. gp120 Apoptose induziert wird (Badley et al. 2000; Alimonti et al. 2003). Diese löslichen Faktoren werden von den infizierten Zellen produziert. Es wurde bereits gezeigt, dass gp120 in der Zelle zahlreiche Signalwege induziert, die auch der physiologische Ligand SDF-1 α anschaltet (Popik et al. 1998; Balabanian et al. 2005). Für mögliche spezifische Therapieansätze ist es wichtig, die Signaltransduktion der pathologischen Liganden von Chemokinrezeptoren, wie z.B. CXCR4, zu verstehen und mögliche Unterschiede zu den physiologischen Liganden herauszufinden. Die Frage war daher, ob gp120 auch wie SDF-1 α die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade beeinflusst. Um dies zu testen, wurden primäre humane T-Zellen 1 h, 6 h bzw. 24 h mit gp120 vorbehandelt und anschließend 10 min mit TPA induziert. Die Zellen wurden lysiert und die MEK-Aktivierung mittels phospho-spezifischer MEK-Antikörper im Western Blot untersucht.

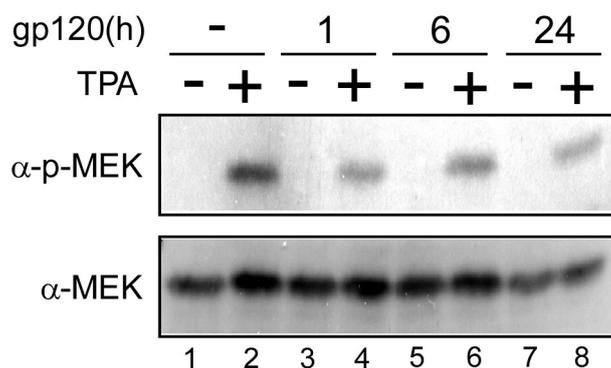


Abb.4.17 Das HIV-Glykoprotein gp120 interferiert mit MEK-Aktivierung in primären humanen T-Zellen.

Um den Einfluss von gp120 auf die MEK-Aktivierung zu testen, wurden 1×10^6 primäre humane T-Zellen 1 h, 6 h bzw. 24 h mit 200 ng/ml gp120 vorbehandelt und anschließend mit 2 ng/ml TPA für 10 min induziert. Die Zellen wurden lysiert und auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert, der mit phospho-(p-) und pan-MEK Antikörpern behandelt wurde.

Bereits nach 1 h gp120-Vorbehandlung wird die TPA-induzierte MEK-Aktivierung deutlich gehemmt (Abb.4.17, vgl. Spur 4 mit Spur 2). Diese Hemmung ist auch nach 24 h gp120-Vorbehandlung noch zu sehen (Abb.4.17, Spur 8). Dies zeigt, dass gp120 ebenfalls mit der Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade interferiert. Interessant wäre es daher zu untersuchen, ob dies unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen in einer verminderten Proliferation und unveränderter Apoptose wie bei SDF-1 α resultiert, oder ob es in Bezug auf die zellbiologische Konsequenz Unterschiede gibt.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SDF-1 α mit der IL-2-induzierten Proliferation von T-Zellen interferiert. Basierend auf diesem Ergebnis erfolgte die Charakterisierung des zugrunde liegenden Mechanismus, wobei der Schwerpunkt auf der Identifizierung der involvierten Signalwege und deren Interaktion lag.

Es wurde gezeigt, dass die durch SDF-1 α verminderte Proliferation durch eine Herunterregulierung der IL-2-induzierten Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion bedingt ist. Die kleine GTPase RhoA wurde als zentrales Signalmolekül des inhibitorischen Mechanismus identifiziert. Eine Reduzierung der RhoA-Expression durch spezifische siRNA konnte die Hemmung der Proliferation durch SDF-1 α verhindern. Hinzu kommt, dass sowohl die Überexpression einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante als auch die spezifische Aktivierung des endogenen RhoA durch das bakterielle Toxin CNF γ zu einer Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs führte. Diese Ergebnisse belegen die Beteiligung von RhoA in dem von SDF-1 α induzierten inhibitorischen Signalweg.

Mit Hilfe von „effector loop“-Mutanten der aktiven RhoA-Mutante wurden die möglichen RhoA-Effektoren eingegrenzt. Es wurde gezeigt, dass keiner der Effektoren PKN, ROCK, RhoGILIN, Kinectin und Citron diesen Effekt vermittelt. Daher scheint ein anderer, möglicherweise noch unbekannter Effektor beteiligt zu sein.

In Bezug auf die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion wurde Raf als direktes Ziel des inhibitorischen Mechanismus identifiziert. RhoA verhindert die Phosphorylierung des für die Raf-Aktivierung wichtigen Serin 338 und infolgedessen die Weiterleitung des Signals von Ras zu MEK und ERK. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass RhoA mit dem Rac-PAK Signalweg, der zur Phosphorylierung des

Serin 338 im Raf-Molekül führt, interferiert. Hinzu kommt, dass die konstitutive Aktivierung des Rac-PAK Signalwegs sowohl den RhoA- als auch den SDF-1 α -induzierten inhibitorischen Mechanismus verhindert. SDF-1 α hebt daher die Schwelle für die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs in T-Zellen an und verhindert so, dass zirkulierende T-Zellen als Antwort auf die Exposition mit unspezifischen Stimuli wie Cytokinen anfangen zu proliferieren.

In weiterführenden Experimenten wurden die bisher verwendeten extrazellulären Stimuli SDF-1 α und IL-2 durch andere ersetzt, um die Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass der pathologische Ligand von CXCR4, das HIV-Glykoprotein gp120, auch mit der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion interferiert. Dies deutet darauf hin, dass gp120 ebenfalls den hier charakterisierten inhibitorischen Mechanismus induziert. Werden die T-Zellen durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung anstelle von IL-2 induziert, so hat SDF-1 α keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation. Die vom T-Zell-Rezeptor ausgehenden aktivierenden Signale scheinen also dominant über das hemmende SDF-1 α Signal zu sein. Diese beiden Experimente stellen die Grundlage für die weitere Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz des hier beschriebenen Mechanismus dar.

5 Diskussion

Die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase durch ein Gleichgewicht von Proliferation, Überleben und Apoptose ist essentiell für eine effektive Immunantwort. Ein wichtiges „Informationsnetzwerk“, das die Zelle über die momentane Situation im Körper informiert, sind Cytokine und Chemokine. Eine Kombination verschiedener Cytokine und Chemokine, die von anderen Zellen oder den T-Zellen selbst produziert werden, induziert in der T-Zelle Signalwege, die bestimmte zelluläre Programme wie z.B. Proliferation oder Apoptose anschalten. Bei der Entscheidung, welches zelluläre Programm ausgeführt wird, spielt die intrazelluläre Integration der Signalereignisse unterschiedlicher extrazellulärer Stimuli eine entscheidende Rolle. T-Zellen besitzen die Kapazität zur schnellen Proliferation innerhalb kurzer Zeit, wie beispielsweise bei der klonalen Expansion, die nach T-Zell-Rezeptor-Stimulierung von IL-2 vermittelt wird. Nach erfolgter Immunantwort werden die T-Zellen, die nicht dem programmierten Zelltod unterliegen, wieder in eine Ruhephase des Zellzyklus überführt. Außerdem muss es Mechanismen geben, die zirkulierende T-Zellen vor einer Induktion durch hohe Umgebungskonzentrationen von IL-2 schützen. Eine Möglichkeit ist die Antagonisierung der aktivierenden Signale durch Cytokine oder Chemokine. Die Aufklärung solcher Mechanismen ist von großem Interesse, da sie eine Möglichkeit bieten, eine übermäßige Proliferation der T-Zellen zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer inhibitorischer Mechanismus beschrieben. Das Chemokin SDF-1 α reduziert die IL-2-induzierte Proliferation. Der zugrunde liegende Mechanismus beinhaltet die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, die durch Interferenz mit der Rac-PAK-Signaltransduktion die Aktivierung von Raf verhindert und so die Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion hemmt.

5.1 Regulation der T-Zell-Proliferation durch SDF-1 α

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des Chemokins SDF-1 α auf die IL-2-induzierte T-Zell-Proliferation untersucht. Überraschenderweise hat SDF-1 α einen inhibitorischen Effekt auf die IL-2-induzierten Proliferation und funktioniert nicht, wie nach bisher publizierten Ergebnissen erwartet (Nanki and Lipsky 2000; Nanki and Lipsky 2001), als Co-Aktivator. Darüber hinaus interferiert SDF-1 α sowohl in primären humanen T-Zellen als auch in der humanen T-Zell-Linie Jurkat mit der IL-2-

induzierten Aktivierung des proliferationsfördernden Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs. Gleichzeitig wird die Apoptose der T-Zellen trotz Hemmung dieses auch anti-apoptotisch wirkenden Signalwegs nicht beeinflusst. Neben dem ERK-Signalweg spielen auch PI3-Kinase- und STAT-abhängige Signalereignisse eine Rolle bei der IL-2-induzierten Proliferation (Brennan et al. 1997; Moriggl et al. 1999; Fung et al. 2003). Daher hemmt ein MEK-spezifischer Inhibitor (U0126) die IL-2-induzierte Proliferation nicht vollständig (DeSilva et al. 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit wird die Proliferation durch SDF-1 α nicht komplett gehemmt, aber signifikant reduziert. Dies könnte daran liegen, dass neben der ERK-Kaskade noch weitere Signalwege an der IL-2-induzierten Proliferation beteiligt sind, die nicht durch SDF-1 α gehemmt werden.

In der Literatur wird SDF-1 α hauptsächlich als chemotaktisches Protein beschrieben, das die Zellmigration während der Embryonalentwicklung, aber auch die Migration von Zellen des Immunsystems im adulten Organismus steuert. Darüber hinaus wurde SDF-1 α als Co-Aktivator der T-Zell-Aktivierung beschrieben, da es bei CD4-positiven T-Zellen die anti-CD3-induzierte Proliferation, sowie die Produktion von IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-10 erhöht (Nanki and Lipsky 2000; Nanki and Lipsky 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SDF-1 α , neben der Funktion als Co-Aktivator von T-Zellen bei der Stimulierung durch Antigene, eine hemmende Wirkung auf die Cytokin-induzierte Proliferation von T-Zellen hat und damit zur T-Zell-Homöostase beiträgt. Dieser negative Effekt von SDF-1 α auf die Cytokin-induzierte T-Zell-Proliferation könnte bei der Zirkulation der T-Zellen durch den Körper eine Rolle spielen. T-Zellen sollen nur an bestimmten Orten und zu einer bestimmten Zeit während der Immunantwort proliferieren. Sie sind jedoch häufig Wachstumsfaktoren ausgesetzt, die unspezifische Aktivierungssignale vermitteln. Eine ständige Aktivierung der T-Zellen wird durch verschiedene Mechanismen verhindert. Zunächst spielt die differentielle Expression der Cytokin-Rezeptoren eine Rolle, durch welche die Sensitivität der Zellen für einzelne Cytokine reguliert wird. Beispielsweise exprimieren naive T-Zellen die IL-2-Rezeptor- α -Kette (CD25) nicht und verfügen daher nur über einen niedrig-affinen IL-2-Rezeptor aus β - und γ -Kette, während bei der T-Zell-Aktivierung die Expression der α -Kette und somit die Bildung eines hoch-affinen IL-2-Rezeptors induziert wird und die Zellen IL-2-abhängig proliferieren (klonale Expansion). Weiterhin gibt es so genannte CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen, die durch Zell-Zell-Kontakt verhindern, dass zirkulierende T-Zellen gegen

körpereigene Antigene eine Autoimmunreaktion initiieren (Wing et al. 2005). Eine dritte Möglichkeit zur Kontrolle bieten antagonisierende Cytokine wie TGF- β und IL-10, die von regulatorischen T-Zellen, wie $\gamma\delta$ -T-Zellen oder NKT-Zellen, sezerniert werden (Battaglia et al. 2004; Tang et al. 2004). Diese Cytokine hemmen u.a. die IL-2 Produktion und die T-Zell-Proliferation (de Waal Malefyt et al. 1993; Bright et al. 1997; Campbell et al. 2001). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Antagonisierung der Cytokin-vermittelten T-Zell-Proliferation durch ein ubiquitär exprimiertes Chemokin stellt einen neuen Mechanismus dar. SDF-1 α hat einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs durch Cytokine und damit auch auf die Cytokin-induzierte Zellzyklus-Progression und Proliferation. Die zirkulierenden T-Zellen sind ständig dem Einfluss des ubiquitär exprimierten SDF-1 α ausgesetzt, das in den Geweben die Migration der T-Zellen induziert (Pelletier et al. 2000); die Funktion von SDF-1 α im Blut ist jedoch noch unklar. Die SDF-1 α -Konzentrationen, welche auf die T-Zellen einwirken, variieren. Jedoch reichen bereits sehr niedrige Konzentrationen, wie sie z.B. im Blut vorkommen und auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden, um sowohl Migration als auch den hier beschriebenen inhibitorischen Signalweg zu induzieren. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die migrierenden T-Zellen durch den permanenten Einfluss von SDF-1 α eine erhöhte Aktivierungsschwelle besitzen und so vor unspezifischer Stimulierung geschützt werden.

Die Sensitivität der T-Zellen für das ubiquitär exprimierte Chemokin SDF-1 α wird durch die differentielle Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4 reguliert. Während die naiven T-Zellen und die zentralen Gedächtniszellen eine hohe CXCR4-Expression zeigen, ist der Rezeptor bei Effektor-Zellen nur in geringen Mengen an der Oberfläche zu finden (Kobayashi et al. 2004). Hinzu kommt, dass die CXCR4-Expression durch IL-2-Stimulierung, d.h. während der klonalen Expansion der T-Zellen, hochreguliert wird und nach etwa drei Tagen ihr Maximum erreicht (Bleul et al. 1997). Auffallend ist dabei, dass diejenigen Zellen, die nur durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung aktiviert werden sollen, also naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, eine hohe CXCR4-Expression aufweisen, während die Effektor-T-Zellen, die IL-2-abhängig klonal expandieren, nur wenig CXCR4 exprimieren. Während der klonalen Expansion der Effektorzellen wird die CXCR4-Expression dann durch IL-2 hochreguliert. Dies könnte eine Rolle in der späten Phase der klonalen Expansion spielen. Auch die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen exprimieren CXCR4 (Zou et

al. 2004). Eine strenge Kontrolle der Proliferation ist bei dieser T-Zell-Population notwendig, da sie durch die konstitutive Expression der IL-2R α -Kette (CD25) eine hohe Sensitivität gegenüber IL-2 besitzt. Allerdings ist die Proliferationsrate der regulatorischen T-Zellen nach IL-2-Stimulierung nur sehr gering und die Aktivierung einiger Signalwege, wie z.B. der PI3-Kinase-induzierten Signalereignisse, ist gehemmt (Bensinger et al. 2004). Die regulatorischen Mechanismen, die zu dieser Hypoproliferation infolge von IL-2-Stimulierung führen, sind noch nicht bekannt. Auch hier wäre eine Funktion des SDF-1 α -induzierten inhibitorischen Mechanismus denkbar.

5.2 SDF-1 α interferiert mit der IL-2-induzierten Proliferation – Aufklärung des Mechanismus

5.2.1 Die kleine GTPase RhoA als zentraler Bestandteil des inhibitorischen Mechanismus

In der vorliegenden Arbeit wurde der SDF-1 α -induzierte Signalweg identifiziert, der die Hemmung der Cytokin-induzierten Proliferation bzw. Aktivierung des Ras-ERK-Signalwegs vermittelt. SDF-1 α aktiviert durch Bindung an den heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 zahlreiche Signalwege, u.a. kleine GTPasen der Rho-Familie (Vicente-Manzanares et al. 2002). Dabei induziert SDF-1 α bereits nach wenigen Minuten eine deutliche RhoA-Aktivierung, die bis zu 24 h andauert (Weg-Remers, unveröffentlichte Daten). Der Mechanismus der RhoA-Aktivierung durch CXCR4 ist noch unklar. In Bezug auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Allgemeinen ist jedoch beschrieben, dass die RhoA-Aktivierung durch die $G_{\alpha 12/13}$ -Untereinheit und p115RhoGEF (Kozasa et al. 1998; Wells et al. 2001) bzw. die $G_{\alpha q/11}$ -Untereinheit und den GEF LARG (Vogt et al. 2003) vermittelt wird.

Die kleine GTPase RhoA ist ein guter Kandidat für ein Schlüsselprotein in dem hier analysierten SDF-1 α -abhängigen Signalweg, da sie in unserem Labor schon in früheren Experimenten als negativer Regulator des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs in T-Zellen beschrieben wurde (Weg-Remers et al. 2002). So war bereits bekannt, dass Überexpression einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante (RhoA L63) in den murinen T-Zell-Linien LB-17 und EL-4 mit der Aktivierung von ERK und MEK interferiert. In der vorliegenden Arbeit konnte die Hemmung der ERK- und MEK-

Aktivierung durch Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA in einer weiteren T-Zell-Linie, den humanen Jurkat-Zellen, gezeigt werden. Auch in primären humanen T-Zellen wurde durch spezifische Aktivierung des endogenen RhoA mit Hilfe des bakteriellen Toxins CNF γ eine Hemmung der MEK-Aktivierung erreicht. Durch dieses wichtige Ergebnis konnte zum einen gezeigt werden, dass die Überexpression einer aktiven RhoA-Mutante den gleichen Effekt hat wie die Aktivierung des endogenen RhoA. Zum anderen zeigt dieses Experiment, dass sich die T-Zell-Linien in Bezug auf die RhoA-vermittelte Hemmung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs genauso verhalten wie die primären humanen T-Zellen. Die Überexpression der aktiven RhoA-Mutante in Jurkat Zellen stellt also ein geeignetes Modell für die nähere Charakterisierung des Mechanismus dar. Durch die gezielte Hemmung der RhoA-Expression in primären humanen T-Zellen mittels siRNA ist es in dieser Arbeit außerdem gelungen, RhoA als Komponente des SDF-1 α -induzierten hemmenden Mechanismus zu identifizieren. In Zellen, deren RhoA-Expression durch vorherige Transfektion mit RhoA-spezifischen siRNAs reduziert war, konnte SDF-1 α nicht mit der IL-2-induzierten Proliferation interferieren. Dies beweist, dass RhoA ein Teil des Signalwegs ist, der von SDF-1 α induziert wird und der die Signalweiterleitung durch den Ras-ERK-Signalweg hemmt.

Die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch aktives RhoA wurde bisher nur in primären T-Zellen und verschiedenen T-Zell-Linien beobachtet, während sie in der Fibroblasten-Zell-Linie COS-7 und der Epithel-Zell-Linie HeLa nicht auftritt (Gablenz 2002). Generell wurde die kleine GTPase RhoA bisher als aktivierender Faktor des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs beschrieben (Li et al. 2001). In T-Zellen verhält sich aktives RhoA anders, wobei noch nicht klar ist, ob es sich bei der RhoA-induzierten Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade um ein T-Zell-spezifisches Phänomen handelt, oder ob auch andere hämatopoetische Zellen diesen Signalweg besitzen. Auf jeden Fall muss der RhoA-vermittelte inhibitorische Signalweg eine Zelltyp-spezifische Komponente enthalten. Naheliegend wäre hier ein Zelltyp-spezifischer RhoA-Effektor. Dies würde auch erklären, warum keiner der bisher getesteten bekannten RhoA-Effektoren die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade vermittelt.

5.2.2 Potentielle Mechanismen für die Regulation der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch RhoA-Effektoren

Aufgrund der momentanen Kenntnisse über die Regulation von MAPK-Signalprozessen in der Zelle sind einige Interaktionsmöglichkeiten der kleinen GTPase RhoA und deren Effektoren mit diesen Mechanismen denkbar. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Ras-Aktivierung in Lymphozyten nicht auf die Plasmamembran beschränkt ist, sondern auch am Golgi-Apparat stattfindet. Nach T-Zell-Rezeptor-Stimulierung ist der Golgi sogar der Hauptort der Ras-vermittelten Signaltransduktion (Bivona et al. 2003). Möglicherweise ist die Ras-Aktivierung am Golgi auch unter anderen Induktionsbedingungen von Bedeutung, beispielsweise nach Cytokin-Stimulierung; dies wurde jedoch noch nicht untersucht. Diese neuen Erkenntnisse über die Signaltransduktion eröffnen ganz neue Regulationsmechanismen, bei denen die Mikrotubuli eine zentrale Rolle spielen könnten, da sie die korrekte Organisation des Golgi gewährleisten (Thyberg and Moskalewski 1999; Rios and Bornens 2003). Da RhoA in Lymphozyten die Organisation der Mikrotubuli reguliert (Vicente-Manzanares et al. 2002), besteht an dieser Stelle eine Möglichkeit für RhoA, indirekt in die Ras-Signaltransduktion einzugreifen. Hinzu kommt, dass die Mikrotubuli eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportereignissen spielen, da sich Motorproteine der Kinesin-Familie entlang ihrer Oberfläche ATP-abhängig durch die Zelle bewegen (Howard 1996). Dabei transportieren diese Motorproteine so genannte „Cargo“-Proteine (*engl. Ladung, Facht*). Interessant ist, dass auch „Scaffold“-Proteine als solche „Cargo“-Proteine fungieren können, wie es beispielsweise für JIP (*engl. JNK-interacting protein*) gezeigt wurde, ein „Scaffold“-Protein für Signalmoleküle des JNK-Signalwegs (Nagata et al. 1998; Verhey et al. 2001). In diesem Fall wird ein komplettes Signalmodul durch die Zelle transportiert. Dies gewährleistet, dass die Signalmoleküle schnell zu der übergeordneten Kinase gelangen und dort aktiviert werden, was ohne diese Mechanismen, d.h. nur durch Diffusion, nicht so schnell möglich wäre. Neben dem indirekten Einfluss von RhoA auf diese Transportvorgänge durch Regulation der Stabilität der Mikrotubuli ist auch ein direkter Einfluss möglich. Das RhoA-Effektor-Protein Kinectin bindet an Kinesin und ist in den Vesikeltransport involviert (Hotta et al. 1996; Vignal et al. 2001). Es wäre daher denkbar, dass Kinectin eine Rolle beim Transport von Signalkomplexen spielt und so die Verbindung zwischen RhoA und MAPK-Signalereignissen darstellt.

Auch das Actin-Cytoskelett spielt bei der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion eine Rolle; die Zerstörung des Actin-Netzwerks durch die Wirkstoffe Latrunculin oder Cytochalasin hemmt die Induktion der ERK-Phosphorylierung durch Wachstumsfaktoren (Aplin and Juliano 1999; Davidson et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass das Actin-Cytoskelett eine Funktion bei der Organisation bzw. Lokalisierung der ERK-Signalkaskade hat. Es wurde auch bereits ein Protein identifiziert, das eine Verbindung zwischen Actin-Cytoskelett und Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade herstellt, das Leukozyten-spezifische Actin-bindende Protein LSP-1 (*engl. leukocyte-specific protein 1*). LSP-1 bindet an das „Scaffold“-Protein KSR1, das mit Raf, MEK und ERK einen Komplex bildet, und bewirkt so die Rekrutierung dieses Signalkomplexes zu Actin-Filamenten. Die Abhängigkeit der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion vom Actin-Cytoskelett bietet einen weiteren Angriffspunkt für RhoA, da diese kleine GTPase über die Aktivierung verschiedener Effektorproteine, wie z.B. ROCK oder Dia, eine Reorganisation des Actin-Cytosketts bewirkt (siehe auch Abschnitt 1.4.2).

Die Identifizierung des RhoA-Effektors, der die in dieser Arbeit beschriebene Regulation des Ras-Raf-MEK-ERK Signalwegs durch SDF-1 α vermittelt, könnte einen ersten Hinweis auf den zugrunde liegenden Mechanismus geben. In dieser Arbeit wurde eine RhoAL63-„effector-loop“-Mutante identifiziert, RhoAL63-E40L, die keinen hemmenden Effekt mehr auf die MEK-Phosphorylierung hat. Diese Mutante hat also die Affinität für das involvierte Effektormolekül verloren. Die bisher durchgeführten Bindungsstudien der RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten ergaben, dass die Mutante RhoAL63-E40L nicht mehr an die Effektoren ROCK und Kinectin binden kann (Sahai et al. 1998). Dies konnte jedoch den fehlenden Effekt auf die MEK-Aktivierung nicht erklären, da eine andere Mutante, RhoAL63-F37A, ebenfalls nicht mehr an diese Effektoren bindet, die MEK-Phosphorylierung aber effektiv hemmt. Dies deutet darauf hin, dass ein Effektormolekül die Hemmung der MEK-Aktivierung vermittelt, das in den bisherigen Bindungsstudien nicht getestet wurde. Dabei könnte es sich um einen noch unbekanntem Effektor handeln. Gerade im Bereich zelltypspezifischer Effektoren gibt es immer wieder neue Erkenntnisse. So wurde vor kurzem ein neues Lymphozyten-spezifisches Effektorprotein namens Rhotekin-2 beschrieben (Collier et al. 2004), das vor allem in CD4⁺-T-Zellen und B-Zellen exprimiert wird, und dessen Expression in aktivierten, proliferierenden Zellen

herunterreguliert wird. In unserem Labor werden bereits Co-Immunpräzipitationen sowie Präzipitationen mit GST-Fusionsproteinen der RhoAL63-„effector-loop“-Mutanten durchgeführt, um das RhoA-Effektorprotein zu identifizieren, das die Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade vermittelt. Ein Protein, das nur an die Mutante E40L nicht mehr bindet, wäre ein guter Kandidat für weitere Untersuchungen.

5.2.3 Die Integration der SDF-1 α - und IL-2-induzierten Signale – Ein Modell

Ein entscheidender Schritt bei der Aufklärung des Mechanismus, welcher der RhoA-vermittelten negativen Regulation der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion zugrunde liegt, war die Identifizierung des Zielmoleküls dieser Hemmung innerhalb der Signalkaskade.

Der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg bietet auf jeder Ebene zahlreiche Möglichkeiten der Regulation. Die Dauer und die Stärke der Aktivierung kann die zelluläre Konsequenz, d.h. Proliferation, Differenzierung oder Überleben, beeinflussen; dieser Mechanismus trägt dazu bei, dass ein und derselbe Signalweg unterschiedliche Prozesse regulieren kann (Torii et al. 2004; Ebisuya et al. 2005). Daher ist es wichtig, dass die einzelnen Komponenten der Signalkaskade individuell reguliert werden können. So existieren auf jeder Ebene der Signalkaskade inhibitorische Mechanismen. Auf der Ebene von Ras kann die Aktivierung durch GAPs (*engl. GTPase activating proteins*) wie CAPRI (*engl. Ca²⁺ promoted Ras inactivator*) (Lockyer et al. 2001) herunterreguliert werden, die die GTPase durch Beschleunigung der GTP-Hydrolyse in ihren inaktiven Zustand überführen. Die Kinasen MEK und ERK, die durch Phosphorylierung aktiviert werden, können durch Phosphatasen, z.B. Serin/Threonin-Phosphatasen wie PP2A, Protein-Tyrosin-Phosphatasen wie PTP oder im Kern lokalisierte Protein-Phosphatasen wie MKP-1, inaktiviert werden (Denhardt 1996; Kolch 2000). Außerdem sind für die Aktivierung der verschiedenen Komponenten des Signalweges so genannte „Scaffold“-Proteine notwendig, die mehrere Signalmoleküle binden und sie so in räumliche Nähe zueinander bringen, damit eine Signalübertragung stattfinden kann. Diese „Scaffold“-Proteine fördern die Translokation des kompletten Signalkomplexes an die Membran, wo eine Interaktion mit der übergeordneten kleinen GTPase, in diesem Fall Ras, stattfindet. Die Inaktivierung eines solchen Proteins würde die Signalweiterleitung gleich auf mehreren Ebenen hemmen.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die Kinase Raf als Ziel der Hemmung identifiziert. Es wurde gezeigt, dass durch konstitutiv aktives RhoA die Aktivierung von Raf, MEK und ERK gehemmt wird, während die Aktivierung von Ras unbeeinflusst bleibt. RhoA stört die Signalübertragung von Raf zu MEK nicht, wenn zur Induktion eine konstitutiv aktive Mutante von Raf eingesetzt wird, deren regulatorische Domäne fehlt und die dadurch unabhängig von Phosphorylierungsereignissen ist. Auch die Signalweiterleitung von MEK zu ERK wird durch RhoA nicht gestört.

Da die Raf-Aktivierung ein komplexer mehrstufiger Prozess ist, gibt es zahlreiche Angriffspunkte für eine Regulation. Das Adapterprotein RKIP verhindert z.B. die Interaktion zwischen Ras und Raf (Yeung et al. 1999; Trakul et al. 2005). Außerdem kann die Raf-Aktivierung durch Beeinflussung der Signalwege, die zur Raf-(De)-Phosphorylierung führen, reguliert werden. Die verschiedenen Raf-Aktivierungsstufen lassen sich anhand des Zustandes der Phosphorylierungsstellen verfolgen. So ist die Dephosphorylierung des Serin 259 ein frühes Ereignis, das die Translokation von Raf an die Membran ermöglicht (Ory et al. 2003; Raabe and Rapp 2003), wo dann weitere Phosphorylierungsereignisse stattfinden, u.a. die Phosphorylierung des Serin 338 durch PAK (King et al. 1998; Zang et al. 2002). Die hier durchgeführten Experimente belegen, dass die Dephosphorylierung des Serin 259 durch aktives RhoA nicht beeinträchtigt wird. Daraus kann man schließen, dass die Anfangsphase der Raf-Aktivierung in Gegenwart von aktivem RhoA intakt ist. Im Gegensatz dazu interferiert aktives RhoA mit der Phosphorylierung des Serin 338 sowie mit der Aktivierung des Rac-PAK Signalwegs, dem nach bisherigen Erkenntnissen einzigen Signalweg, der die Phosphorylierung des Raf-Serin 338 vermittelt (King et al. 1998; King et al. 2001). Hinzu kommt, dass die konstitutive Aktivierung des Rac-PAK-Signalwegs durch Überexpression aktiver Rac-Mutanten in Jurkat-Zellen die Hemmung der MEK-Aktivierung durch SDF-1 α sowie durch aktives RhoA verhindert. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen wird das folgende Modell aufgestellt, mit dem der Mechanismus der SDF-1 α -induzierten Hemmung IL-2-abhängiger T-Zell-Proliferation erklärt wird (Abb. 5.1): SDF-1 α aktiviert durch Bindung an CXCR4 die kleine GTPase RhoA. Aktives RhoA interferiert in T-Zellen mit der IL-2-vermittelten Aktivierung des Rac-PAK-Signalwegs und verhindert so die für die Raf-Aktivierung essentielle Phosphorylierung des Serin 338. Infolgedessen wird die

Signalübertragung von Ras zu ERK auf der Ebene von Raf unterbrochen; das Proliferation-induzierende Signal gelangt nicht bis in den Zellkern.

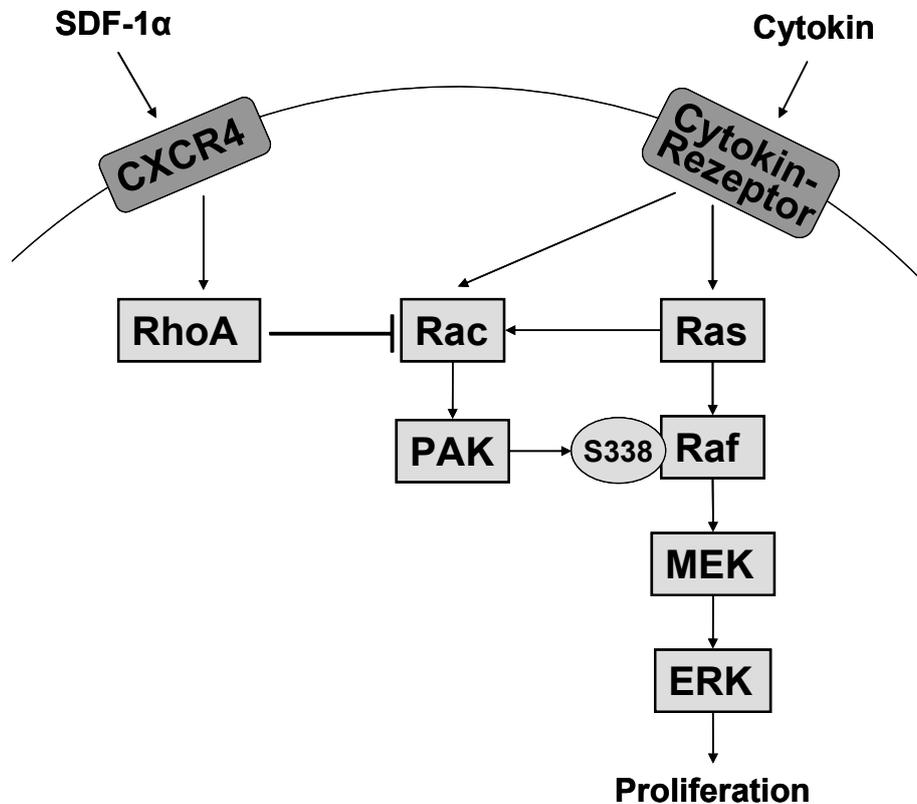


Abb.5.1 Modell: SDF-1 α interferiert mit der Cytokin-induzierten Proliferation durch Hemmung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion.

5.2.4 RhoA und Rac – Die gegenseitige Beeinflussung kleiner GTPasen

Die gegenseitige Regulierung kleiner GTPasen ist ein inzwischen vielfach beschriebener Mechanismus (Ridley and Hall 1992; Nobes and Hall 1995; Nimnual et al. 2003). Allerdings gibt es keine allgemeingültige Regel, wie sich die kleinen GTPasen gegenseitig beeinflussen, ob positiv oder negativ, da dies Situations- und Zelltyp-abhängig ist. Obwohl die Hemmung von Rac durch RhoA bereits mehrfach beobachtet wurde (Leeuwen et al. 1997; Rottner et al. 1999), konnte der Mechanismus für diese Regulation bisher noch nicht aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in T-Zellen ein antagonistisches Verhalten zwischen RhoA- und Rac-Signaltransduktion beschrieben. RhoA interferiert mit der Ras-induzierten Aktivierung des Rac-PAK-Signalwegs. Da die Überexpression einer konstitutiv aktiven Rac-Mutante dies verhindert, kann man davon ausgehen, dass die

Hemmung von RhoA auf der Ebene von Rac oder oberhalb stattfindet. Diese Hypothese wird durch aktuelle Beobachtungen aus unserem Labor unterstützt die zeigen, dass auch andere Signalereignisse unterhalb von Rac, z.B. die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK, durch aktives RhoA beeinträchtigt wird (eigene Beobachtungen und Weg-Remers, unveröffentlichte Ergebnisse). Rac kann durch verschiedene GEFs (*engl. guanine nucleotide exchange factors*) aktiviert werden, die ihrerseits durch PI3K-abhängige oder unabhängige Signalwege induziert werden (Schmidt and Hall 2002; Mertens et al. 2003). In dieser Arbeit wurde der Rac-PAK Signalweg in T-Zellen durch aktives Ras induziert. Ein Mechanismus der Rac-Aktivierung durch Ras ist bereits bekannt. Ras bindet an den GEF Tiam1 (*engl. T-lymphoma invasion and metastasis*) und stimuliert auf diese Weise dessen Rac-GEF-Aktivität (Lambert et al. 2002). RhoA könnte also mit der Rac-Aktivierung durch Inhibierung von Tiam1 interferieren. Weitere Möglichkeiten der Rac-Hemmung durch RhoA wären die Aktivierung eines Rac-GAP-Proteins, das Rac durch Aktivierung der GTPase-Aktivität in den inaktiven Zustand überführt, oder die Induktion eines Rac-GDI, welcher an Rac bindet und dadurch die Lokalisierung an die Membran verhindert.

Die Aufklärung der hier beschriebenen antagonistischen Kommunikation zwischen RhoA und Rac in T-Zellen ist nicht nur für das Verständnis des in dieser Arbeit charakterisierten Mechanismus von Bedeutung, sie würde auch zum Verständnis anderer Prozesse beitragen, in welche die kleinen GTPasen involviert sind, beispielsweise der T-Zell-Migration. In Neutrophilen wurde vor kurzem gezeigt, dass chemotaktische Stoffe wie fMLP in der Zelle zwei unterschiedliche Signalwege induzieren, die zur Polarisierung der Zelle beitragen. Während im vorderen Teil der migrierenden Zelle durch G_i aktiviertes Rac eine Rolle spielt, findet man im hinteren Teil durch $G_{12/13}$ aktiviertes RhoA. Basierend auf der Tatsache, dass die Expression einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante in der Zelle sowohl die Rac-Aktivierung als auch die Polarisierung verhindert, lautet die Hypothese, dass RhoA im hinteren Teil der Zelle mit der Rac-Aktivierung interferiert und so die charakteristische Form des „Hinterteils“ der Zelle stabilisiert (Xu et al. 2003). Die in dieser Arbeit beschriebene antagonistische Kommunikation zwischen RhoA und Rac könnte, entsprechend dem Mechanismus in Neutrophilen, auch bei der Polarisierung und Migration von T-Zellen von Bedeutung sein.

5.3 Effekt von SDF-1 α auf die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation – Spezifität des beschriebenen Mechanismus

Die IL-2-induzierte Proliferation wird durch SDF-1 α auf etwa 70% reduziert. Dagegen hat SDF-1 α unter den gleichen experimentellen Bedingungen keinen inhibitorischen Effekt auf die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Literatur, bei denen die entsprechenden SDF-1 α -Konzentrationen ebenfalls keinen Effekt auf die T-Zell-Rezeptor-induzierte Proliferation hatten (Nanki and Lipsky 2000). Durch höhere SDF-1 α -Konzentrationen wurde dort sogar eine Co-Stimulierung der T-Zell-Rezeptor-Induktion beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass es einen Unterschied zwischen der IL-2-induzierten und der T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation gibt. Der Grund hierfür könnte sein, dass T-Zell-Rezeptor-Stimulierung bereits nach wenigen Minuten zur Hemmung der basalen RhoA-Aktivität führt (Weg-Remers, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu aktiviert IL-2 sogar RhoA und induziert beispielsweise RhoA-abhängige Bcl-2-Expression (Reif et al. 1996; Gomez et al. 1997). Es ist daher möglich, dass der SDF-1 α -induzierte inhibitorische Mechanismus durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung, nicht aber durch die Stimulierung des IL-2-Rezeptors, auf der Ebene von RhoA ausgeschaltet wird. Um einen direkten Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen herzustellen, wären allerdings noch weitere Experimente basierend auf den hier erzielten Ergebnissen notwendig. Zum einen müsste in einem Experiment getestet werden, ob die T-Zell-Rezeptor-Stimulierung tatsächlich die SDF-1 α -vermittelte RhoA-Aktivierung hemmt, während IL-2-Stimulierung dies nicht tut. Zum anderen müsste der Mechanismus untersucht werden, mit dem T-Zell-Rezeptor-Stimulierung mit der RhoA-Aktivität interferiert. Denn durch die Hemmung dieses Mechanismus könnte man dann beweisen, dass die T-Zell-Rezeptor-induzierte Hemmung von RhoA der Grund dafür ist, dass SDF-1 α die Proliferation unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die Hemmung durch SDF-1 α spezifisch für die Aktivierung durch IL-2 ist. Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies nicht der Fall ist, da der durch SDF-1 α induzierte inhibitorische Mechanismus auf der Ebene der Kinase Raf ansetzt und nicht in direktem Zusammenhang mit den am Rezeptor ablaufenden proximalen Signalereignissen steht. Es ist also zu erwarten, dass SDF-1 α auch die Proliferation durch andere

Wachstumsfaktoren hemmt, sofern diese nicht wie der T-Zell-Rezeptor den Mechanismus stören.

5.4 Effekt des pathologischen CXCR4-Liganden gp120 auf die Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion

Das HIV-Glykoprotein gp120 aus der Hülle des HI-Virus ist ein pathologischer Ligand des Chemokin-Rezeptors CXCR4. Es vermittelt durch Interaktion mit CXCR4 und CD4 den Eintritt des HIV in CD4-positive Zellen und wird außerdem in löslicher Form von HIV-infizierten Zellen sezerniert. Interessant ist, dass gp120, im Gegensatz zum physiologischen Ligand SDF-1 α , zusammen mit anderen löslichen Faktoren vor allem in nicht-infizierten CD4⁺-T-Zellen Apoptose induziert (Badley et al. 2000; Alimonti et al. 2003). Der Unterschied zwischen SDF-1 α und gp120 könnte dadurch zustande kommen, dass gp120 zusätzlich an CD4 bindet, so dass die zelluläre Konsequenz aus der Kombination der CD4- und CXCR4-Aktivierung resultiert. Außerdem ist es denkbar, dass sich die SDF-1 α - und gp120-induzierten Signalereignisse ausgehend von CXCR4 sowohl qualitativ als auch quantitativ unterscheiden. Für das Verständnis der HIV-Pathogenese sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist die Aufklärung dieser Unterschiede von großer Bedeutung. Es ist bereits bekannt, dass gp120 in der Zelle zahlreiche Signalwege induziert, die auch der physiologische Ligand SDF-1 α aktiviert (Popik et al. 1998; Balabanian et al. 2004). So induziert gp120, ebenso wie SDF-1 α , bereits nach 1 min ERK-Phosphorylierung (Balabanian et al. 2004). Interessant ist, dass diese gp120-induzierte ERK-Phosphorylierung durch T-Zell-Rezeptor-Vorstimulation erhöht wird, die T-Zell-Rezeptor-Stimulation also die Schwelle für die Ras-Raf-MEK-ERK-Aktivierung durch gp120 heruntersetzt. Der direkte Vergleich zwischen SDF-1 α und gp120 in Bezug auf die Stärke und Dauer dieser Induktion ist schwierig, da sich ihre Affinität zu CXCR4 unterscheidet. Hinzu kommt, dass die exakten Konzentrationen von SDF-1 α und gp120, die unter physiologischen Bedingungen auf die T-Zellen einwirken, nicht bekannt sind.

Aufgrund der Charakterisierung des neuen SDF-1 α -induzierten Signalwegs stellte sich die Frage, ob gp120 ebenfalls die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits 1 h Vorbehandlung von T-Zellen mit gp120 die TPA-induzierte MEK-Aktivierung

hemmt. Das gleiche Ergebnis ergaben 6 h und 24 h Vorbehandlung mit gp120. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass gp120 ebenfalls den für SDF-1 α beschriebenen inhibitorischen Mechanismus induzieren könnte. Interessant ist auch die Hypothese aus der Veröffentlichung von Balabanian et al., dass T-Zell-Rezeptor-Stimulierung die Schwelle für die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch gp120 herabsetzt. Dies könnte bedeuten, dass gp120 wie SDF-1 α sowohl RhoA als auch ERK aktiviert, RhoA in dieser Situation aber eine hemmende Wirkung auf den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg hat und dessen Aktivierung begrenzt. T-Zell-Rezeptor-Stimulierung hebt diese Inhibierung durch Herunterregulierung der RhoA-Aktivität auf (siehe auch Kapitel 5.3). Noch offen ist die Relevanz dieses Mechanismus für die Pathogenese von HIV. Zunächst muss die Frage geklärt werden, ob gp120 genauso wie SDF-1 α mit der Cytokin-induzierten Proliferation interferiert, oder ob es möglicherweise durch qualitative Unterschiede bei der Aktivierung der Signalwege andere physiologische Konsequenzen gibt. Interessant ist vor allem die Frage, ob gp120 die Sensitivität der T-Zellen für Apoptose erhöht, da die Dezimierung der CD4+-T-Zell-Population durch Apoptose das Hauptproblem bei der HIV-Infektion ist, da sie eine Immunabwehrschwäche zur Folge hat, die opportunistische Infektionen ermöglicht.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Mechanismus beschrieben, der durch Hemmung der Cytokin-induzierten T-Zell-Proliferation zur Homöostase der T-Zellen beiträgt. Das Chemokin SDF-1 α erhöht die Aktivierungsschwelle der T-Zellen durch Inhibierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signaltransduktion auf der Ebene der Raf-Aktivierung. Dieser Effekt wird durch Aktivierung der kleinen GTPase RhoA vermittelt, die mit dem Rac-PAK-Signalweg interferiert und so die für die Raf-Aktivierung essentielle Phosphorylierung des Serin 338 im Raf-Molekül verhindert. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in dieser Arbeit ausführlich charakterisiert. Noch offen bleibt die Frage, wie RhoA mit der kleinen GTPase Rac interferiert. Die Aufklärung dieses Mechanismus wäre auch für das Verständnis anderer zellulärer Prozesse, beispielsweise der T-Zell-Migration, von großer Bedeutung.

Die Tatsache, dass SDF-1 α nicht nur ein Co-Aktivatoren für T-Zellen ist, sondern unter bestimmten Bedingungen auch mit der T-Zell-Proliferation interferiert, wirft eine ganze Reihe von Fragen in Bezug auf die physiologische Funktion auf. Alle bisherigen Studien mit dem Ziel, SDF-1 α -vermittelte Signalereignisse zu charakterisieren und ihren Effekt auf zelluläre Prozesse zu untersuchen, wurden vor dem Hintergrund durchgeführt, dass SDF-1 α die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade aktiviert und Proliferation verstärkt. Nun müssen im Zusammenhang mit SDF-1 α auch Prozesse betrachtet werden, die mit einer negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung zu tun haben. Wie bereits in dieser Diskussion beschrieben, weisen diejenigen Zellen, die nur durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung aktiviert werden sollen, also naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, eine hohe CXCR4-Expression auf, während die Effektor-Zellen, die IL-2-abhängig klonal expandieren, nur wenig CXCR4 exprimieren, dieses jedoch im Laufe der klonalen Expansion hochregulieren. Um zu verstehen, in welcher Phase der Immunantwort die SDF-1 α -vermittelte Regulation tatsächlich eine Rolle spielt, müssen die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen isoliert und in Bezug auf die SDF-1 α -induzierte Herunterregulierung der Proliferation getestet werden.

Das HIV-Glykoprotein gp120 induziert ebenfalls eine Hemmung der MEK-Aktivierung. Hier müssten weitere Experimente durchgeführt werden, um zu belegen, dass es sich um den gleichen Mechanismus handelt wie bereits für SDF-1 α beschrieben. Interessant ist hier vor allem die Untersuchung der physiologischen Konsequenz. Die Frage ist, ob gp120 genauso wie SDF-1 α mit der T-Zell-Proliferation interferiert. Da der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg neben der Induktion der Proliferation auch einen anti-apoptotischen Effekt hat, wäre ebenso eine erhöhte Sensitivität der gp120-behandelten T-Zellen für Apoptose denkbar. Dies wäre im Hinblick auf die Pathogenese von HIV von großer Bedeutung, da die Apoptose der CD4⁺-T-Zell-Population und die damit verbundene Immunabwehrschwäche opportunistische Infektionen ermöglicht.

Es sind also mehrere physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge denkbar, in denen der hier beschriebene neuartige Mechanismus von Bedeutung sein könnte. Die Aufgabe zukünftiger Experimente wird es nun sein, diese neue regulatorische Funktion von SDF-1 α mit dem bisherigen Wissen zu verknüpfen und

die Vorgänge der Immunantwort zu identifizieren, bei denen diese Regulation relevant ist.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Abraham, K. M., S. D. Levin, J. D. Marth, K. A. Forbush and R. M. Perlmutter (1991). "Thymic tumorigenesis induced by overexpression of p56lck." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3977-81.
- Aiuti, A., M. Tavian, A. Cipponi, F. Ficara, E. Zappone, J. Hoxie, B. Peault and C. Bordignon (1999). "Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors." Eur J Immunol **29**(6): 1823-31.
- Alimonti, J. B., T. B. Ball and K. R. Fowke (2003). "Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS." J Gen Virol **84**(Pt 7): 1649-61.
- Ansel, K. M. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development." Curr Opin Immunol **13**(2): 172-9.
- Aplin, A. E. and R. L. Juliano (1999). "Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway." J Cell Sci **112** (Pt 5): 695-706.
- Ara, T., M. Itoi, K. Kawabata, T. Egawa, K. Tokoyoda, T. Sugiyama, N. Fujii, T. Amagai and T. Nagasawa (2003). "A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo." J Immunol **170**(9): 4649-55.
- Arriemerlou, C., E. Donnadieu, P. Brennan, G. Keryer, G. Bismuth, D. Cantrell and A. Trautmann (1998). "Involvement of phosphoinositide 3-kinase and Rac in membrane ruffling induced by IL-2 in T cells." Eur J Immunol **28**(6): 1877-85.
- Aspenstrom, P. (1999). "Effectors for the Rho GTPases." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 95-102.
- Bacon, K. B., B. A. Premack, P. Gardner and T. J. Schall (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." Science **269**(5231): 1727-30.
- Badley, A. D., A. A. Pilon, A. Landay and D. H. Lynch (2000). "Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis." Blood **96**(9): 2951-64.
- Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg and G. Haraldsen (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." J Exp Med **193**(9): 1105-12.
- Balabanian, K., J. Harriague, C. Decrion, B. Lagane, S. Shorte, F. Baleux, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and L. A. Chakrabarti (2004). "CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes." J Immunol **173**(12): 7150-60.
- Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem.
- Baldwin, T. A., K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2004). "The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus." J Immunol **173**(11): 6515-20.
- Battaglia, M., C. Gianfrani, S. Gregori and M. G. Roncarolo (2004). "IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance." Ann N Y Acad Sci **1029**: 142-53.

- Beadling, C., D. Guschin, B. A. Witthuhn, A. Ziemiecki, J. N. Ihle, I. M. Kerr and D. A. Cantrell (1994). "Activation of JAK kinases and STAT proteins by interleukin-2 and interferon alpha, but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes." Embo J **13**(23): 5605-15.
- Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma and R. Ahmed (2002). "Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells." J Exp Med **195**(12): 1541-8.
- Bensinger, S. J., P. T. Walsh, J. Zhang, M. Carroll, R. Parsons, J. C. Rathmell, C. B. Thompson, M. A. Burchill, M. A. Farrar and L. A. Turka (2004). "Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **172**(9): 5287-96.
- Berndt, C., B. Mopps, S. Angermuller, P. Gierschik and P. H. Krammer (1998). "CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12556-61.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.
- Bivona, T. G., I. Perez De Castro, I. M. Ahearn, T. M. Grana, V. K. Chiu, P. J. Lockyer, P. J. Cullen, A. Pellicer, A. D. Cox and M. R. Philips (2003). "Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1." Nature **424**(6949): 694-8.
- Blades, M. C., A. Manzo, F. Ingegnoli, P. R. Taylor, G. S. Panayi, H. Irjala, S. Jalkanen, D. O. Haskard, M. Perretti and C. Pitzalis (2002). "Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces human cell migration into human lymph nodes transplanted into SCID mice." J Immunol **168**(9): 4308-17.
- Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-30.
- Brennan, P., J. W. Babbage, B. M. Burgering, B. Groner, K. Reif and D. A. Cantrell (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F." Immunity **7**(5): 679-89.
- Bright, J. J., L. D. Kerr and S. Sriram (1997). "TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes." J Immunol **159**(1): 175-83.
- Buhl, A. M., N. L. Johnson, N. Dhanasekaran and G. L. Johnson (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." J Biol Chem **270**(42): 24631-4.
- Campbell, J. D., G. Cook, S. E. Robertson, A. Fraser, K. S. Boyd, J. A. Gracie and I. M. Franklin (2001). "Suppression of IL-2-induced T cell proliferation and phosphorylation of STAT3 and STAT5 by tumor-derived TGF beta is reversed by IL-15." J Immunol **167**(1): 553-61.
- Cantrell, D. A. (2002). "T-cell antigen receptor signal transduction." Immunology **105**(4): 369-74.
- Carroll, M. P. and W. S. May (1994). "Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells." J Biol Chem **269**(2): 1249-56.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-22.
- Chensue, S. W., K. S. Warmington, J. H. Ruth, P. S. Sanghi, P. Lincoln and S. L. Kunkel (1996). "Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation:

- relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production." J Immunol **157**(10): 4602-8.
- Chong, H., H. G. Vikis and K. L. Guan (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." Cell Signal **15**(5): 463-9.
- Chong, L. D., A. Traynor-Kaplan, G. M. Bokoch and M. A. Schwartz (1994). "The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells." Cell **79**(3): 507-13.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol **133**(6): 1403-15.
- Colamussi, M. L., P. Secchiero, A. Gonelli, M. Marchisio, G. Zauli and S. Capitani (2001). "Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4+ T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway." J Leukoc Biol **69**(2): 263-70.
- Collier, F. M., C. C. Gregorio-King, T. J. Gough, C. D. Talbot, K. Walder and M. A. Kirkland (2004). "Identification and characterization of a lymphocytic Rho-GTPase effector: rhotekin-2." Biochem Biophys Res Commun **324**(4): 1360-9.
- Copeland, J. W. and R. Treisman (2002). "The diaphanous-related formin mDia1 controls serum response factor activity through its effects on actin polymerization." Mol Biol Cell **13**(11): 4088-99.
- Cosgrove, D., D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist and D. Mathis (1991). "Mice lacking MHC class II molecules." Cell **66**(5): 1051-66.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp and C. J. Marshall (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." Cell **77**(6): 841-52.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-102.
- Davidson, L., A. J. Pawson, R. P. Millar and S. Maudsley (2004). "Cytoskeletal reorganization dependence of signaling by the gonadotropin-releasing hormone receptor." J Biol Chem **279**(3): 1980-93.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel and J. E. de Vries (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-65.
- Denhardt, D. T. (1996). "Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling." Biochem J **318** (Pt 3): 729-47.
- DeSilva, D. R., E. A. Jones, M. F. Favata, B. D. Jaffee, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos and P. A. Scherle (1998). "Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy." J Immunol **160**(9): 4175-81.
- Dhillon, A. S., S. Meikle, Z. Yazici, M. Eulitz and W. Kolch (2002). "Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation." Embo J **21**(1-2): 64-71.
- Dianzani, U., A. Chiochetti and U. Ramenghi (2003). "Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity." Life Sci **72**(25): 2803-24.
- Diaz, B., D. Barnard, A. Filson, S. MacDonald, A. King and M. Marshall (1997). "Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling." Mol Cell Biol **17**(8): 4509-16.
- Dougherty, M. K., J. Muller, D. A. Ritt, M. Zhou, X. Z. Zhou, T. D. Copeland, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. P. Lu and D. K. Morrison (2005). "Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation." Mol Cell **17**(2): 215-24.

- Downward, J., J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter and D. A. Cantrell (1990). "Stimulation of p21ras upon T-cell activation." Nature **346**(6286): 719-23.
- Dumaz, N. and R. Marais (2003). "Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras." J Biol Chem **278**(32): 29819-23.
- Dustin, M. L., S. K. Bromley, Z. Kan, D. A. Peterson and E. R. Unanue (1997). "Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3909-13.
- Ebisuya, M., K. Kondoh and E. Nishida (2005). "The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity." J Cell Sci **118**(Pt 14): 2997-3002.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Frost, J. A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P. E. Shaw and M. H. Cobb (1997). "Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins." Embo J **16**(21): 6426-38.
- Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, Y. Hori, H. Fujioka, S. Araki, T. Ueda, A. Kikuchi and Y. Takai (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins." Oncogene **5**(9): 1321-8.
- Fung, M. M., F. Rohwer and K. L. McGuire (2003). "IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells." Cell Signal **15**(6): 625-36.
- Futagami, S., T. Hiratsuka, A. Tatsuguchi, K. Suzuki, M. Kusunoki, Y. Shinji, K. Shinoki, T. Iizumi, T. Akamatsu, H. Nishigaki, K. Wada, K. Miyake, K. Gudis, T. Tsukui and C. Sakamoto (2003). "Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) released from Helicobacter pylori stimulated gastric epithelial cells induces cyclooxygenase 2 expression and activation in T cells." Gut **52**(9): 1257-64.
- Gablenz, M. (2002). RhoA inhibiert den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg in T-Zellen. Diplomarbeit.
- Ganju, R. K., S. A. Brubaker, J. Meyer, P. Dutt, Y. Yang, S. Qin, W. Newman and J. E. Groopman (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J Biol Chem **273**(36): 23169-75.
- Geneste, O., J. W. Copeland and R. Treisman (2002). "LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics." J Cell Biol **157**(5): 831-8.
- Genot, E., S. Cleverley, S. Henning and D. Cantrell (1996). "Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells." Embo J **15**(15): 3923-33.
- Germain, R. N. (2002). "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision." Nat Rev Immunol **2**(5): 309-22.
- Gilmore, A. P. and K. Burridge (1996). "Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate." Nature **381**(6582): 531-5.

- Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie and G. Schultz (1999). "Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation." J Biol Chem **274**(25): 17901-7.
- Goldrath, A. W., P. V. Sivakumar, M. Glaccum, M. K. Kennedy, M. J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis and E. A. Butz (2002). "Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells." J Exp Med **195**(12): 1515-22.
- Gomez, J., C. Martinez, M. Giry, A. Garcia and A. Rebollo (1997). "Rho prevents apoptosis through Bcl-2 expression: implications for interleukin-2 receptor signal transduction." Eur J Immunol **27**(11): 2793-9.
- Graves, J. D., J. Downward, M. Izquierdo-Pastor, S. Rayter, P. H. Warne and D. A. Cantrell (1992). "The growth factor IL-2 activates p21ras proteins in normal human T lymphocytes." J Immunol **148**(8): 2417-22.
- Gray, D. H., T. Ueno, A. P. Chidgey, M. Malin, G. L. Goldberg, Y. Takahama and R. L. Boyd (2005). "Controlling the thymic microenvironment." Curr Opin Immunol **17**(2): 137-43.
- Grusby, M. J., R. S. Johnson, V. E. Papaioannou and L. H. Glimcher (1991). "Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice." Science **253**(5026): 1417-20.
- Hekman, M., A. Fischer, L. P. Wennogle, Y. K. Wang, S. L. Campbell and U. R. Rapp (2005). "Novel C-Raf phosphorylation sites: serine 296 and 301 participate in Raf regulation." FEBS Lett **579**(2): 464-8.
- Herrera, R. and J. S. Sebolt-Leopold (2002). "Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S27-31.
- Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-70.
- Hoffmann, C., M. Pop, J. Leemhuis, J. Schirmer, K. Aktories and G. Schmidt (2004). "The Yersinia pseudotuberculosis cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA." J Biol Chem **279**(16): 16026-32.
- Hotta, K., K. Tanaka, A. Mino, H. Kohno and Y. Takai (1996). "Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 69-74.
- Howard, J. (1996). "The movement of kinesin along microtubules." Annu Rev Physiol **58**: 703-29.
- Iezzi, G., K. Karjalainen and A. Lanzavecchia (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." Immunity **8**(1): 89-95.
- Jutila, M. A., E. L. Berg, T. K. Kishimoto, L. J. Picker, R. F. Bargatze, D. K. Bishop, C. G. Orosz, N. W. Wu and E. C. Butcher (1989). "Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules." Transplantation **48**(5): 727-31.
- Kanegane, H. and G. Tosato (1996). "Activation of naive and memory T cells by interleukin-15." Blood **88**(1): 230-5.
- Karpus, W. J., N. W. Lukacs, K. J. Kennedy, W. S. Smith, S. D. Hurst and T. A. Barrett (1997). "Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production." J Immunol **158**(9): 4129-36.
- Katzen, D., E. Chu, C. Terhost, D. Y. Leung, M. Gesner, R. A. Miller and R. S. Geha (1985). "Mechanisms of human T cell response to mitogens: IL 2 induces IL 2

- receptor expression and proliferation but not IL 2 synthesis in PHA-stimulated T cells." *J Immunol* **135**(3): 1840-5.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *Science* **273**(5272): 245-8.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia and M. S. Marshall (1998). "The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338." *Nature* **396**(6707): 180-3.
- King, A. J., R. S. Wireman, M. Hamilton and M. S. Marshall (2001). "Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src." *FEBS Lett* **497**(1): 6-14.
- Kjoller, L. and A. Hall (1999). "Signaling to Rho GTPases." *Exp Cell Res* **253**(1): 166-79.
- Kobayashi, N., H. Takata, S. Yokota and M. Takiguchi (2004). "Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8+ T cells during peripheral differentiation." *Eur J Immunol* **34**(12): 3370-8.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Kosako, H., T. Yoshida, F. Matsumura, T. Ishizaki, S. Narumiya and M. Inagaki (2000). "Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow." *Oncogene* **19**(52): 6059-64.
- Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag and P. C. Sternweis (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." *Science* **280**(5372): 2109-11.
- Kronenberg, M. and L. Gapin (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 557-68.
- Kyewski, B. and J. Derbinski (2004). "Self-representation in the thymus: an extended view." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 688-98.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lamarche, N., N. Tapon, L. Stowers, P. D. Burbelo, P. Aspenstrom, T. Bridges, J. Chant and A. Hall (1996). "Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade." *Cell* **87**(3): 519-29.
- Lambert, J. M., Q. T. Lambert, G. W. Reuther, A. Malliri, D. P. Siderovski, J. Sondek, J. G. Collard and C. J. Der (2002). "Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism." *Nat Cell Biol* **4**(8): 621-5.
- Laudanna, C., J. J. Campbell and E. C. Butcher (1996). "Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins." *Science* **271**(5251): 981-3.
- Lee, Y., A. Gotoh, H. J. Kwon, M. You, L. Kohli, C. Mantel, S. Cooper, G. Hangoc, K. Miyazawa, K. Ohyashiki and H. E. Broxmeyer (2002). "Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines." *Blood* **99**(12): 4307-17.
- Leeuwen, F. N., H. E. Kain, R. A. Kammen, F. Michiels, O. W. Kranenburg and J. G. Collard (1997). "The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho." *J Cell Biol* **139**(3): 797-807.

- Li, W., H. Chong and K. L. Guan (2001). "Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation." *J Biol Chem* **276**(37): 34728-37.
- Lockyer, P. J., S. Kupzig and P. J. Cullen (2001). "CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway." *Curr Biol* **11**(12): 981-6.
- Luther, S. A. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." *Nat Immunol* **2**(2): 102-7.
- Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson and T. A. Springer (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9448-53.
- Madaule, P. and R. Axel (1985). "A novel ras-related gene family." *Cell* **41**(1): 31-40.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno and S. Narumiya (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-8.
- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli and L. Kong (2002). "CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2." *Immunity* **17**(2): 167-78.
- Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude and N. G. Ahn (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." *Science* **265**(5174): 966-70.
- Marks, R. E., A. W. Ho, F. Rivas, E. Marshall, S. Janardhan and T. F. Gajewski (2003). "Differential Ras signaling via the antigen receptor and IL-2 receptor in primary T lymphocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **312**(3): 691-6.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-9.
- Merida, I., E. Diez and G. N. Gaulton (1991). "IL-2 binding activates a tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase." *J Immunol* **147**(7): 2202-7.
- Mertens, A. E., R. C. Roovers and J. G. Collard (2003). "Regulation of Tiam1-Rac signalling." *FEBS Lett* **546**(1): 11-6.
- Molon, B., G. Gri, M. Bettella, C. Gomez-Mouton, A. Lanzavecchia, A. C. Martinez, S. Manes and A. Viola (2005). "T cell costimulation by chemokine receptors." *Nat Immunol* **6**(5): 465-71.
- Moriggl, R., D. J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, J. van Deursen, M. Y. Sangster, K. D. Bunting, G. C. Grosveld and J. N. Ihle (1999). "Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells." *Immunity* **10**(2): 249-59.
- Morrison, D. K. (2001). "KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?" *J Cell Sci* **114**(Pt 9): 1609-12.
- Moser, B. and P. Loetscher (2001). "Lymphocyte traffic control by chemokines." *Nat Immunol* **2**(2): 123-8.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* **382**(6592): 635-8.
- Nagasawa, T., H. Kikutani and T. Kishimoto (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2305-9.
- Nagata, K., A. Puls, C. Futter, P. Aspenstrom, E. Schaefer, T. Nakata, N. Hirokawa and A. Hall (1998). "The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with

- activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3." *Embo J* **17**(1): 149-58.
- Nanki, T. and P. E. Lipsky (2000). "Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation." *J Immunol* **164**(10): 5010-4.
- Nanki, T. and P. E. Lipsky (2001). "Stimulation of T-Cell activation by CXCL12/stromal cell derived factor-1 involves a G-protein mediated signaling pathway." *Cell Immunol* **214**(2): 145-54.
- Negulescu, P. A., T. B. Krasieva, A. Khan, H. H. Kerschbaum and M. D. Cahalan (1996). "Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen." *Immunity* **4**(5): 421-30.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky (1998). "Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around." *Curr Opin Immunol* **10**(3): 265-70.
- Nimnual, A. S., L. J. Taylor and D. Bar-Sagi (2003). "Redox-dependent downregulation of Rho by Rac." *Nat Cell Biol* **5**(3): 236-41.
- Nishii, K., N. Katayama, H. Miwa, M. Shikami, M. Masuya, H. Shiku and K. Kita (1999). "Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein." *Br J Haematol* **105**(3): 701-10.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* **81**(1): 53-62.
- Normont, A. M. and M. J. Bevan (2000). "Role of chemokines in thymocyte development." *Semin Immunol* **12**(5): 445-55.
- Ohl, L., G. Bernhardt, O. Pabst and R. Forster (2003). "Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs." *Semin Immunol* **15**(5): 249-55.
- Olson, M. F., H. F. Paterson and C. J. Marshall (1998). "Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1." *Nature* **394**(6690): 295-9.
- Ory, S., M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra and D. K. Morrison (2003). "Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites." *Curr Biol* **13**(16): 1356-64.
- Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche and J. Pouyssegur (1993). "Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8319-23.
- Pelletier, A. J., L. J. van der Laan, P. Hildbrand, M. A. Siani, D. A. Thompson, P. E. Dawson, B. E. Torbett and D. R. Salomon (2000). "Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells." *Blood* **96**(8): 2682-90.
- Petrie, H. T., P. Hugo, R. Scollay and K. Shortman (1990). "Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro." *J Exp Med* **172**(6): 1583-8.
- Phillips, R. and A. Ager (2002). "Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells." *Eur J Immunol* **32**(3): 837-47.
- Popik, W., J. E. Hesselgesser and P. M. Pitha (1998). "Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway." *J Virol* **72**(8): 6406-13.

- Posern, G., A. Sotiropoulos and R. Treisman (2002). "Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor." Mol Biol Cell **13**(12): 4167-78.
- Raabe, T. and U. R. Rapp (2003). "Ras signaling: PP2A puts Ksr and Raf in the right place." Curr Biol **13**(16): R635-7.
- Reif, K., B. M. Burgering and D. A. Cantrell (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase." J Biol Chem **272**(22): 14426-33.
- Reif, K., C. D. Nobes, G. Thomas, A. Hall and D. A. Cantrell (1996). "Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways." Curr Biol **6**(11): 1445-55.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J., A. J. Self, F. Kasmi, H. F. Paterson, A. Hall, C. J. Marshall and C. Ellis (1993). "rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo." Embo J **12**(13): 5151-60.
- Rios, R. M. and M. Bornens (2003). "The Golgi apparatus at the cell centre." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 60-6.
- Robey, E. and B. J. Fowlkes (1994). "Selective events in T cell development." Annu Rev Immunol **12**: 675-705.
- Romagnani, S. (1994). "Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy." Curr Opin Immunol **6**(6): 838-46.
- Romerio, F. and D. Zella (2002). "MEK and ERK inhibitors enhance the anti-proliferative effect of interferon-alpha2b." Faseb J **16**(12): 1680-2.
- Rottner, K., A. Hall and J. V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.
- Roy, F., G. Laberge, M. Douziech, D. Ferland-McCollough and M. Therrien (2002). "KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module." Genes Dev **16**(4): 427-38.
- Sadlack, B., R. Kuhn, H. Schorle, K. Rajewsky, W. Muller and I. Horak (1994). "Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4." Eur J Immunol **24**(1): 281-4.
- Sadlack, B., J. Lohler, H. Schorle, G. Klebb, H. Haber, E. Sickel, R. J. Noelle and I. Horak (1995). "Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells." Eur J Immunol **25**(11): 3053-9.
- Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller and I. Horak (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**(2): 253-61.
- Sahai, E., A. S. Alberts and R. Treisman (1998). "RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation." Embo J **17**(5): 1350-61.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Santana, M. A. and Y. Rosenstein (2003). "What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms." J Cell Physiol **195**(3): 392-401.

- Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss and M. J. Weber (1998). "MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade." *Science* **281**(5383): 1668-71.
- Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy and D. V. Goeddel (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES." *Nature* **347**(6294): 669-71.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson and L. Lefrancois (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." *Nat Immunol* **1**(5): 426-32.
- Schluns, K. S. and L. Lefrancois (2003). "Cytokine control of memory T-cell development and survival." *Nat Rev Immunol* **3**(4): 269-79.
- Schmidt, A. and A. Hall (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." *Genes Dev* **16**(13): 1587-609.
- 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**(41): 24585-8.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2000). "Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway." *Oncogene* **19**(56): 6594-9.
- Shirozu, M., T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara and T. Honjo (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* **28**(3): 495-500.
- Siegel, R. M., F. K. Chan, H. J. Chun and M. J. Lenardo (2000). "The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity." *Nat Immunol* **1**(6): 469-74.
- Singer, A., R. Bosselut and A. Bhandoola (1999). "Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms." *Semin Immunol* **11**(4): 273-81.
- Sladowski, D., S. J. Steer, R. H. Clothier and M. Balls (1993). "An improved MTT assay." *J Immunol Methods* **157**(1-2): 203-7.
- Sodhi, A., S. Montaner and J. S. Gutkind (2004). "Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(12): 998-1012.
- Sotiropoulos, A., D. Gineitis, J. Copeland and R. Treisman (1999). "Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics." *Cell* **98**(2): 159-69.
- Storm, S. M. and U. R. Rapp (1993). "Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors." *Toxicol Lett* **67**(1-3): 201-10.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature* **393**(6685): 591-4.
- Takahashi, M., H. Mukai, M. Toshimori, M. Miyamoto and Y. Ono (1998). "Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11566-71.
- Tang, H. L. and J. G. Cyster (1999). "Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells." *Science* **284**(5415): 819-22.
- Tang, Q., E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi and J. A. Bluestone (2004). "Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function." *Eur J Immunol* **34**(11): 2996-3005.
- Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto and J. Hamuro (1983). "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2." *Nature* **302**(5906): 305-10.

- Taub, D. D., K. Conlon, A. R. Lloyd, J. J. Oppenheim and D. J. Kelvin (1993). "Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta." Science **260**(5106): 355-8.
- Taub, D. D., J. R. Ortaldo, S. M. Turcovski-Corrales, M. L. Key, D. L. Longo and W. J. Murphy (1996). "Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production." J Leukoc Biol **59**(1): 81-9.
- Thyberg, J. and S. Moskalewski (1999). "Role of microtubules in the organization of the Golgi complex." Exp Cell Res **246**(2): 263-79.
- Tominaga, T., E. Sahai, P. Chardin, F. McCormick, S. A. Courtneidge and A. S. Alberts (2000). "Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling." Mol Cell **5**(1): 13-25.
- Torii, S., K. Nakayama, T. Yamamoto and E. Nishida (2004). "Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases." J Biochem (Tokyo) **136**(5): 557-61.
- Tough, D. F., S. Sun, X. Zhang and J. Sprent (1999). "Stimulation of naive and memory T cells by cytokines." Immunol Rev **170**: 39-47.
- Trakul, N., R. E. Menard, G. R. Schade, Z. Qian and M. R. Rosner (2005). "Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation." J Biol Chem **280**(26): 24931-40.
- Verhey, K. J., D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B. J. Schnapp, T. A. Rapoport and B. Margolis (2001). "Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules." J Cell Biol **152**(5): 959-70.
- Vicente-Manzanares, M., J. R. Cabrero, M. Rey, M. Perez-Martinez, A. Ursa, K. Itoh and F. Sanchez-Madrid (2002). "A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis." J Immunol **168**(1): 400-10.
- Vignal, E., A. Blangy, M. Martin, C. Gauthier-Rouviere and P. Fort (2001). "Kinectin is a key effector of RhoG microtubule-dependent cellular activity." Mol Cell Biol **21**(23): 8022-34.
- Vogt, S., R. Grosse, G. Schultz and S. Offermanns (2003). "Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11." J Biol Chem **278**(31): 28743-9.
- von Boehmer, H. and H. J. Fehling (1997). "Structure and function of the pre-T cell receptor." Annu Rev Immunol **15**: 433-52.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." Nat Cell Biol **1**(3): 136-43.
- Weg-Remers, S., H. Ponta, P. Herrlich and H. Konig (2002). "Antagonistic signaling pathways regulate alternative splicing of CD44 in T cells." Ann N Y Acad Sci **973**: 112-5.
- Weiss, A., R. L. Wiskocil and J. D. Stobo (1984). "The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level." J Immunol **133**(1): 123-8.
- Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-85.
- Wells, C. D., S. Gutowski, G. Bollag and P. C. Sternweis (2001). "Identification of potential mechanisms for regulation of p115 RhoGEF through analysis of endogenous and mutant forms of the exchange factor." J Biol Chem **276**(31): 28897-905.

- Westendorp, M. O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin and P. H. Krammer (1995). "Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120." Nature **375**(6531): 497-500.
- Wilson, A., H. R. MacDonald and F. Radtke (2001). "Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus." J Exp Med **194**(7): 1003-12.
- Wing, K., P. Larsson, K. Sandstrom, S. B. Lundin, E. Suri-Payer and A. Rudin (2005). "CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses." Immunology **115**(4): 516-25.
- Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison and H. R. Bourne (2003). "Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils." Cell **114**(2): 201-14.
- Yeramian, P., P. Chardin, P. Madaule and A. Tavitian (1987). "Nucleotide sequence of human rho cDNA clone 12." Nucleic Acids Res **15**(4): 1869.
- Yeung, K., T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy and W. Kolch (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." Nature **401**(6749): 173-7.
- Yoshinaga, C., H. Mukai, M. Toshimori, M. Miyamoto and Y. Ono (1999). "Mutational analysis of the regulatory mechanism of PKN: the regulatory region of PKN contains an arachidonic acid-sensitive autoinhibitory domain." J Biochem (Tokyo) **126**(3): 475-84.
- Zang, M., C. Hayne and Z. Luo (2002). "Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1." J Biol Chem **277**(6): 4395-405.
- Zhang, X. F., J. F. Wang, E. Matczak, J. A. Proper and J. E. Groopman (2001). "Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells." Blood **97**(11): 3342-8.
- Zhu, J., V. Balan, A. Bronisz, K. Balan, H. Sun, D. T. Leicht, Z. Luo, J. Qin, J. Avruch and G. Tzivion (2005). "Identification of Raf-1 S471 as a Novel Phosphorylation Site Critical for Raf-1 and B-Raf Kinase Activities and for MEK Binding." Mol Biol Cell.
- Zijlstra, M., M. Bix, N. E. Simister, J. M. Loring, D. H. Raulet and R. Jaenisch (1990). "Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells." Nature **344**(6268): 742-6.
- Zinkernagel, R. M. (1996). "Immunology taught by viruses." Science **271**(5246): 173-8.
- Zou, L., B. Barnett, H. Safah, V. F. Larussa, M. Evdemon-Hogan, P. Mottram, S. Wei, O. David, T. J. Curiel and W. Zou (2004). "Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals." Cancer Res **64**(22): 8451-5.