

KfK 5086 B
August 1992

**IL-2 Rezeptor und
MHC-Klasse II Antigene:
Elemente der
Wachstumskontrolle
Theileria parva-infizierter
Lymphozyten**

M. Eichhorn
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5086 B

**IL-2 Rezeptor und MHC-Klasse II Antigene:
Elemente der Wachstumskontrolle *Theileria parva*-
infizierter Lymphozyten**

Margarete Eichhorn

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Fridericiana Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Theileria parva ist ein protozoischer Parasit, der Rinderlymphozyten infiziert und sie zum klonalen Wachstum veranlaßt. Die blastoide Transformation der Lymphozyten durch die Infektion mit dem Parasiten ermöglicht es, *in vitro* Zelllinien zu erhalten. Diese Zelllinien verhalten sich wie Tumorzellen, d.h. sie vermehren sich unbegrenzt und verursachen nach Injektion in nackte Mäuse Tumore. Im Gegensatz zu den z.B. durch Viren transformierten Leukämie-Zelllinien ist die Transformation der Lymphozyten durch *Theileria parva* reversibel. Dies stellt ein einzigartiges Modell zur Untersuchung von Zellen in transformiertem und nicht transformiertem Zustand dar.

Der Mechanismus der Induktion des kontinuierlichen Wachstums in *Theileria*-infizierten Lymphozyten ist noch unbekannt. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß die permanente Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Oberflächenmolekülen, die während der T-Zellaktivierung exprimiert werden, für den proliferativen Phänotyp der infizierten Lymphozyten verantwortlich sein könnten. Zu diesen Molekülen gehören z.B. Interleukin 2, Interleukin 2 Rezeptor und MHC-Klasse II Antigene. Hierbei ist die Expression der Moleküle nicht wie in normalen T-Zellen transient, sondern in abnormer Weise konstitutiv.

Im ersten Teil der Arbeit konnte die Beteiligung eines autokrinen Wachstumsmechanismus in *Theileria*-infizierten T-Zellen aufgezeigt werden. Dabei spielten der Wachstumsfaktor IL2 und sein Rezeptor eine entscheidende Rolle. Durch die Blockierung der Funktion des IL2 mit Hilfe von Antikörpern und Hemmung der Expression der IL2R α -Kette durch Anwendung von "antisense"-RNA-Technik, konnte deren Bedeutung für das kontinuierliche Wachstum *Theileria*-infizierter T-Zellen nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein neuartiger Mechanismus der negativen Regulation der Proliferation von T-Zellen identifiziert. Am Modellsystem *Theileria*-infizierter T-Zellen wurde die Wichtigkeit der MHC-Klasse II Antigene für die Weiterleitung wachstumshemmender Signale in T-Zellen festgestellt. Nach Bindung von anti-Klasse II Antikörpern an ihre Liganden entstanden in infizierten und in nicht infizierten T-Zellen Signale, die schnell zu einer reversiblen Hemmung des Wachstums führten. Weiterhin wurde gezeigt, daß die MHC-Klasse II-vermittelte Wachstumshemmung nicht über die Inhibition der T-Zellaktivierung erfolgt. Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen und Tyrosinphosphorylierungen spielten, neben einer möglichen Beteiligung zusätzlicher Oberflächenmoleküle, an den MHC-Klasse II-vermittelten negativen Wachstumseffekten eine wichtige Rolle. Die hier beschriebene Proliferationshemmung von aktivierten T-Zellen stellt ein interessantes immunologisches Phänomen dar, das zum größeren Verständnis des Krankheitsverlaufs von Autoimmun-Erkrankungen und AIDS beitragen könnte.

ABSTRACT

IL-2 receptor and MHC class II antigens: elements of proliferative control in *Theileria*-infected lymphocytes

The protozoan parasite *Theileria parva* infects bovine lymphocytes and causes an uncontrolled proliferation of the host cell. The infection with the parasite induces blast transformation of the lymphocytes and continuously proliferating cell lines of *Theileria parva*-infected cells can easily be established in vitro. *Theileria*-infected cell lines exhibit many properties of tumor cell lines. Most notable are their unlimited growth potential and the fact that lymphoid tumors will develop when infected cells are injected into nude mice. Unlike virus-transformed leukemia cell lines the *Theileria*-induced transformation of lymphocytes is reversible. Upon elimination of the parasite by treating the cultures with a theilericidal drug, cells stop proliferating and revert to a resting phenotype. This offers an unique model for the study of lymphocytes in the transformed and non-transformed state.

The mechanism of the induction of the continuous growth in *Theileria*-infected cells is unknown. Recent results indicate the importance of permanent interactions between growth factors, growth factor receptors and also between other surface molecules. In this regard interleukin 2, interleukin 2 receptor and MHC class II antigens may play a significant role. These molecules, which appear only transiently in normal activated T cells, are constitutively expressed in *Theileria*-infected T cells.

In the first part of the work the involvement of an autocrine mechanism in the growth of *Theileria*-infected T cells could be demonstrated. The significance of IL2/IL2R for the continuous growth of *Theileria*-infected T cells could be proven by blocking the function of IL2 with antibodies and by inhibiting the expression of the IL2R α -chain using antisense RNA technique.

The second part of the work deals with a new mechanism concerning the negative regulation of T cell proliferation. Using *Theileria*-infected T cells as a model, it could be shown that MHC class II molecules transmit signals that can result in the inhibition of the proliferation of activated T cells. The binding of anti-class II antibodies leads to a fast and reversible growth inhibition. It was shown that this is not due to an inhibition of T cell activation or induction of apoptosis. Changes in intracellular ion concentration and tyrosin phosphorylation play an important role in MHC class II-mediated growth inhibition. The inhibition of activated T cell proliferation described here presents an interesting immunological phenomenon that could contribute to a more detailed understanding of autoimmune diseases and of AIDS.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung/Abstract

Inhaltsverzeichnisi

Abkürzungen v

1 Einleitung 1

Transformation von T-Lymphozyten durch Infektion mit *Theileria parva* 1

IL2 und IL2 Rezeptor 3

MHC-Klasse II Antigene 5

2 Material 7

Bezugsquellen 7

Radiochemikalien 9

Bakterien und Zellen 9

Bakterien-Nährmedien 10

Gewebekultur-Medien 10

Puffer und Lösungen 11

Antikörper 12

DNA-Sonden 13

Plasmide 13

Oligonukleotide 13

3 Methoden 14

3.1 Zellkulturtechniken 14

Kultivierung von Zellen 14

Bestimmung der Zelldichte 14

Morphologische Untersuchung der Zellen 15

Abtrennung toter Lymphozyten 15

| | |
|---|----|
| Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten..... | 15 |
| Eliminierung des Parasiten in Theileria-infizierten Zellen..... | 16 |
| ³ H-Thymidin-Pulsmarkierung der Zellen | 16 |
| Herstellung von "Filler cells" | 16 |
| 3.2 Transiente und stabile Transfektionstechniken..... | 17 |
| DEAE-Dextran-Methode für Lymphozyten..... | 17 |
| Elektroporation..... | 17 |
| Selektion und Klonierung stabil transfizierter Zellklone | 18 |
| Enzymatischer Farbstest für β -Galaktosidase auf Einzell-Niveau | 18 |
| 3.3 CAT-Assay | 18 |
| 3.4 Präparation von nukleären und zellulären Proteinextrakten..... | 19 |
| 3.5 Gelretardations-Analyse | 20 |
| 3.6 Reinigung von Antikörpern über eine ProteinA-Sepharose-Säule | 20 |
| 3.7 Allgemeine Arbeitsmethoden mit Nukleinsäuren..... | 21 |
| Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 21 |
| Phenol/Chloroform-Extraktion..... | 21 |
| Fällung von Nukleinsäuren..... | 22 |
| 3.8 DNA-Klonierungstechniken..... | 22 |
| Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen | 22 |
| Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten..... | 22 |
| Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 22 |
| Auffüllen von 5'-Überhängen..... | 23 |
| Ligation von DNA-Fragmenten..... | 23 |
| Präparation von kompetenten Bakterien für die Transformation..... | 23 |
| Transformation von Bakterien | 24 |
| 3.9 Isolierung von Nukleinsäuren..... | 24 |
| Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab | 24 |
| Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab | 24 |
| Präparation von genomischer DNA | 25 |
| Präparation von polyA ⁺ -RNA | 25 |
| 3.10 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren..... | 26 |
| DNA-Agarose-Gelelektrophorese | 26 |
| DNA-Acrylamid-Gelelektrophorese..... | 26 |
| DNA-Acrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese..... | 27 |
| RNA-Agarose-Gelelektrophorese | 27 |
| 3.11 Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten..... | 28 |
| Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen..... | 28 |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| | Aufreinigung von Oligonukleotiden..... | 28 |
| 3.12 | Sequenzierung von DNA..... | 29 |
| 3.13 | Markierung von DNA mit Radionukliden | 29 |
| | Multiprime labelling | 29 |
| | Kinasierung von Oligonukleotiden | 30 |
| 3.14 | Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonfilter und Hybridisierung | 30 |
| | Southern-Blot | 30 |
| | Slot-Blot | 31 |
| | Northern-Blot | 31 |
| | Heparin-Hybridisierung | 31 |
| | Formamid-Hybridisierung..... | 32 |
| 4 | Ergebnisse..... | 33 |
| 4.1 | Die Rolle des Wachstumsfaktors IL2 und seines Rezeptors für das Wachstum Theileria-infizierter Lymphozyten | 33 |
| 4.1.1 | Hemmung der IL2-Funktion durch Antikörper | 33 |
| 4.1.1.1 | Wachstumshemmung Theileria-infizierter Lymphozyten durch anti-IL2 Antikörper | 33 |
| 4.1.2 | Hemmung der IL2R α -Expression durch Anwendung von "antisense"-RNA- Technik | 35 |
| 4.1.2.1 | Etablierung eines geeigneten induzierbaren Testsystems | 35 |
| 4.1.2.2 | Herstellung der "sense"- und "antisense"-IL2R α -Konstrukte | 37 |
| 4.1.2.3 | Herstellung und Klonierung von stabilen Transfektanten mit den "sense"- und "antisense"-IL2R α -Konstrukten.. .. | 38 |
| 4.1.2.4 | Nachweis der transfizierten Konstrukte in den stabilen Transfektanten..... | 39 |
| 4.1.2.5 | Reduktion endogener IL2R α -mRNA-Menge in "antisense"-IL2R α - Transfektanten | 42 |
| 4.1.2.6 | Hemmung des Wachstums in "antisense"-IL2R α -Transfektanten | 44 |
| 4.2 | MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation..... | 47 |
| 4.2.1 | Bindung von anti-Klasse II Antikörpern an Klasse II Antigene führt zur Hemmung des Wachstums in T-Zellen. | 48 |
| 4.2.2 | Der wachstumshemmende Effekt der anti-Klasse II Antikörper beruht nicht auf Toxizität und er ist reversibel | 50 |
| 4.2.3 | Exogene Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 kann den wachstumshemmenden Effekt von anti-Klasse II Antikörpern nicht aufheben | 52 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.4 | An der Wachstumshemmung durch die MHC-Klasse II Moleküle sind andere Oberflächenproteine indirekt beteiligt | 54 |
| 4.2.5 | MHC-Klasse II-vermittelte wachstumshemmende Signale interagieren nicht mit den für die frühe T-Zellaktivierung typischen Moleküle NF- κ B, AP1, <i>c-myc</i> , IL2 und IL2R..... | 56 |
| 4.2.6 | Extrazelluläres Calcium und Serin/Threonin-Kinasen sind an der Klasse II-vermittelten DNA-Synthese-Hemmung nicht beteiligt. | 59 |
| 4.2.7 | Intrazelluläres Calcium und Tyrosinkinase sind an der Klasse II-vermittelten DNA-Synthese-Hemmung beteiligt | 62 |

5 Diskussion..... 65

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | IL2 und IL2R sind für das autokrine Wachstum Theileria-infizierter T-Zellen von Bedeutung | 65 |
| | Theileria-infizierte T-Zellen brauchen IL2 für ihr Wachstum | 65 |
| | Theileria-infizierte T-Zellen brauchen für ihr Wachstum einen IL2R von hoher Affinität | 66 |
| 5.2 | MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation | 70 |
| | Die über MHC-Klasse II Antigene vermittelten Signale führen zur reversiblen Hemmung der DNA-Synthese in Theileria-infizierten T-Zellen..... | 71 |
| | MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der DNA-Synthese wirkt nicht über die Inhibition der T-Zellaktivierung..... | 72 |
| | Sind andere Oberflächenmoleküle an der Wachstumshemmung durch die MHC-Klasse II Moleküle beteiligt? | 72 |
| | Intrazelluläres Calcium und Tyrosinkinase spielen eine potentielle Rolle bei der Klasse II-vermittelten Wachstumshemmung | 73 |

Literatur 76

Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------------------------|--|
| A: | Adenin |
| Abb.: | Abbildung |
| ATP: | Adenosintriphosphat |
| bp: | Basenpaare |
| BSA: | Rinderserum Albumin |
| BW 720C | Theilerizides Medikament |
| C: | Cytosin |
| CAT: | Chloramphenicol Acetyltransferase |
| Cd: | Cadmium |
| Ci: | Curie |
| cm: | Zentimeter |
| ConA | Concanavalin A |
| cpm: | Zerfälle pro Minute (counts per minute) |
| Dex: | Dexamethason |
| DMSO: | Dimethylsulfoxid |
| DNA: | Desoxyribonukleinsäure |
| DNAse: | Desoxyribonuklease |
| dNTP: | Desoxy-Nukleotidtriphosphat |
| DTT: | Dithiothreitol |
| E: | Extinktion |
| EDTA: | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FCS: | Fötale Kälberserum |
| g: | Erdbeschleunigung |
| G: | Guanin |
| G418: | Genitacin-Sulfat |
| h: | Stunde |
| H7: | 1-(5-Isoquinolinsulfonyl)-2-methylpiperazin dihydrochlorid |
| HEPES: | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure |
| HIV: | Human Immunodeficiency Virus |
| hrIL2: | menschliches rekombinantes Interleukin-2 |
| IgG: | Immunglobulin-g |
| IL2: | Interleukin-2 |
| IL2R: | Interleukin-2 Rezeptor |
| ILRAD: | International Laboratory for Research on Animal Diseases |
| IPTG: | Isopropylthiogalactosid |
| kb: | 1000 Basenpaare |
| LTR: | "Long Terminal Repeat", molar |
| M: | molar |
| MHC Klasse II: | Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II Antigene |
| MMTV | Maus Mamma Tumor Virus |
| mRNA: | Boten RNA |
| mg: | Milligramm |
| min: | Minuten |
| µg: | Mikrogramm |
| mM: | millimolar |
| NaAcetat: | Natriumacetat |
| NF-κB: | Nuklearer Faktor-kappa B |
| ng: | Nanogramm |
| nt: | Nukleotide |
| poly-A ⁺ -RNA: | polyadenylierte RNA |
| RNA: | Ribonukleinsäure |
| RNAse: | Ribonuklease |

| | |
|------------|--|
| RSV: | Rous Sarkoma Virus |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS: | Natriumdodecylsulfat |
| sec: | Sekunden |
| T: | Thymin |
| TK: | Thymidinkinase |
| t-RNA: | Transfer RNA |
| Tris: | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TEMED: | N,N,N'',N''-tetramethyl-ethylendiamin |
| TPA | 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat |
| TpM | <i>Theileria parva</i> Muguga infizierte T-Lymphozyten |
| Upm: | Umdrehungen pro Minute |
| U/ μ l | Enzymeinheit pro μ l |
| UV | Ultraviolett |
| V: | Volt |
| Verl.: | Verleger |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid |

1 EINLEITUNG

Der intrazelluläre protozoische Parasit *Theileria parva* infiziert Rinderlymphozyten und verursacht dadurch eine Rinderkrankheit, die als "East Coast fever" oder Theileriosis bezeichnet wird (Übersicht: Morrison et al., 1986). Die Krankheit tritt hauptsächlich in Ost- und Zentralafrika auf, wo sie wegen der hohen Mortalitätsrate (95%) große ökonomische Schäden verursacht (Brocklesby et al., 1961).

Die Übertragung erfolgt durch die Schildzeckenart *Rhipicephalus appendiculatus*, die dem Parasit als Zwischenwirt dient. Gamogonie und Sporogonie von *T. parva* finden in der Zecke statt, die Schizogonie- und Merogonie-Stadien laufen im Rind ab (Mehlhorn, 1984). Die für die Rinder infektiösen Sporozoiten gelangen während des Blutsaugens der Zecke aus deren Speicheldrüsen in das Rind und infizieren dort hauptsächlich die T-Lymphozyten (Emery et al., 1988). Nach Aufnahme des Sporozoiten ins Zytoplasma durch rezeptorvermittelte Endocytose (Fawcett et al., 1982; Shaw et al., 1991), findet die Differenzierung des Sporozoiten in das pathogene vielkernige Schizontenstadium statt. Der intrazelluläre Makroschizont induziert eine unkontrollierte klonale Vermehrung der Lymphozyten, wobei er sich synchron mit der Wirtszelle teilt (Jarret et al., 1969). Der Krankheitsverlauf ist daher in der Anfangsphase durch eine massive Proliferation der Lymphozyten (Anschwellen der Lymphknoten, Fieber) gekennzeichnet, der später eine durch unspezifische zellvermittelte Immunabwehr hervorgerufene allgemeine Lyse der Lymphozyten folgt (Morrison et al., 1989). Der Tod der Tiere tritt infolge der Bildung von Lungenödemem ca. 3 Wochen nach der Infektion ein (Brocklesby et al., 1961).

Transformation von T-Lymphozyten durch Infektion mit *Theileria parva*

Die lymphoblastoide Transformation der Lymphozyten nach der Theileria-Infektion ermöglicht es, *in vitro* Zelllinien zu erhalten. Infizierte Lymphozyten können durch Biopsie aus den lymphoiden Organen infizierter Rinder oder durch *in vitro* Infektion von Lymphozyten mit isolierten Sporozoiten gewonnen werden (Malmquist et al., 1970; Brown et al., 1973). Die infizierten Zelllinien zeigen viele Merkmale von Tumorzellen. Sie besitzen ein unbegrenztes Wachstumspotential *in vitro* und sie bilden nach Injektion in immunsupprimierte nackte Mäuse metastasierende Tumore (Irvin et al., 1975). Zellklone können durch Wachstum in Weichagar

oder mit Hilfe von "limiting dilution" erhalten werden (Nelson & Hirumi, 1981; Lalor et al., 1986).

Der Mechanismus der Induktion dieses kontinuierlichen Wachstums in Theileria-infizierten Lymphozyten ist noch weitgehend unbekannt. Der transformierte Zustand infizierter Zellen ist allerdings strikt von der Anwesenheit des Parasiten abhängig (Pinder et al., 1981). Zellen, die durch Anwendung eines für die Wirtszelle nicht toxischen Naphtochinon-Derivates (BW720C) vom Parasiten befreit werden, verlieren ihre lymphoblastoiden Merkmale und hören auf zu proliferieren (Pinder et al., 1981; McHardy, 1984). Die Weiterkultivierung dieser Zellen wird nur durch fortlaufende Zugabe des Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL2) und des Phorbolesters 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) ermöglicht (Dobbelaere et al., 1988). Gerade diese Reversibilität des transformierten Zustands eröffnet ausgezeichnete Möglichkeiten zum Studium der Mechanismen, die zum unkontrollierten Lymphozytenwachstum führen.

Theileria-infizierte Lymphozyten besitzen viele Merkmale von normalen aktivierten T-Lymphozyten. Im Gegensatz zu normalen T-Lymphozyten erfolgt jedoch die Expression bzw. Aktivierung der Eigenschaften aktivierter T-Zellen in Theileria-infizierten Lymphozyten in abnormer Weise permanent. Sie sezernieren z.B. den für das Wachstum von normalen T-Zellen essentiellen Wachstumsfaktor Interleukin 2 und exprimieren biologisch funktionelle Interleukin 2 Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche (Coquerelle et al., 1989; Heussler et al., 1992). Außerdem wurde im Kern Theileria-infizierter T-Zellen eine permanente Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nachgewiesen (Ivanov et al., 1989; Baumann et al., 1991), der als transkriptioneller Genregulator des Interleukin 2 und seines Rezeptors fungiert (Böhnlein, 1988; Hoyos, 1989). Als ein weiteres Charakteristikum aktivierter T-Zellen weisen Theileria-infizierte Zellen eine große Anzahl von Oberflächenmolekülen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes Klasse II (major histocompatibility complex, abgekürzt MHC-Klasse II) auf (Dobbelaere et al., 1990). Diese Proteine spielen normalerweise eine Schlüsselrolle bei Reaktionen der Immunantwort (Übersicht: Kourilsky & Claverie, 1989).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle zweier für aktivierte T-Zellen typische Moleküle bei der Proliferation der Theileria-infizierten T-Zelllinie TpM[803] zu untersuchen. Dabei handelt es sich um die Proteinkomplexe: Interleukin 2 Rezeptor (IL2R) und die MHC Klasse II Antigene, die sich auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen befinden. Im folgenden wird zunächst die Bedeutung des IL2 und IL2R und anschließend die Bedeutung der MHC Klasse II Antigene für

die Aktivierung normaler T-Zellen erläutert, und herausgearbeitet, welche mögliche Unterschiede in Theileria-infizierten T-Zellen vorliegen.

IL2 und IL2 Rezeptor

Bei der Vermehrung von normalen T-Lymphozyten spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um Interleukine, die im allgemeinen von den Lymphozyten nur nach Wechselwirkung mit anderen Zellen und einer spezifischen Stimulierung der Oberflächenmoleküle transient synthetisiert und ausgeschüttet werden (Übersicht: Smith, 1988a). Viele der während der Lymphozytenaktivierung in der Zelle ablaufenden Schritte sind bis heute noch nicht erforscht. Es ist bekannt, daß es sich dabei um eine Kaskade von Reaktionen handelt, die zur Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen (Übersicht: Isakov et al., 1988; Rudd, 1990) und von bestimmten regulatorischen Transkriptionsfaktoren (Übersicht: Ullman et al., 1990) sowie letztlich zur Expression von Wachstumsfaktor- und Wachstumsfaktorrezeptorgenen führen. Interleukin 2 (IL2) ist der nach der Aktivierung der T-Zellen zuerst gebildete und für die Proliferation bedeutendste Wachstumsfaktor. Nach Sekretion bindet IL2 an den Rezeptor (IL2R) hoher Affinität ("high affinity") und stimuliert nach Internalisierung des IL2/IL2R-Komplexes die Lymphozyten zum Wachstum (Robb & Green, 1987). Die Interaktion des IL2 mit dem IL2 Rezeptor vermittelt sowohl in IL2 produzierenden Lymphozyten selbst (autokriner Stimulus), als auch in anderen Zellen, die IL2 Rezeptoren exprimieren (parakriner Stimulus), ein Signal zum Durchlaufen des Zellzyklus (Übersicht: Smith, 1988a). Dabei wird die Expression des IL2R erhöht und somit den aktivierten Zellen ermöglicht, optimal auf den Wachstumsfaktor zu reagieren (Smith & Cantrell, 1985). Um eine unkontrollierte Proliferation und somit eine maligne Entartung zu verhindern, besitzen normale Lymphozyten wachstumshemmende Mechanismen. Sie führen zur Hemmung der IL2- und IL2R-Genexpression und damit zum Proliferationsstop der Zellen (Übersicht: Smith, 1988a).

Im Unterschied dazu entziehen sich die in Kultur gehaltenen Theileria-infizierten Lymphozyten diesen Regulationsmechanismen. Sie proliferieren unbegrenzt, haben permanent aktivierte NF κ B Moleküle im Kern und exprimieren kontinuierlich IL2, IL2R und MHC Klasse II Moleküle. Nach Abtötung des Parasiten verschwinden die für aktivierte T-Zellen typischen Moleküle und die Lymphozyten stellen ihr Wachstum ein (Dobbelaere et al., 1988 und 1991; Coquerelle et al., 1989; Ivanov et al., 1989; Heussler et al., 1992). Die Korrelation zwischen dem Vorhandensein der Moleküle, dem Wachstum und der Anwesenheit des Parasiten führte zu

der Vermutung, daß diese Moleküle bei der Transformation Theileria-infizierter T-Lymphozyten eine Rolle spielen könnten.

Da IL2 und IL2R die entscheidende "Triebfeder" für die Proliferation von normalen T-Lymphozyten darstellen, könnte man sich auch im Falle Theileria-infizierter T-Lymphozyten eine Beteiligung von autokrinen Wachstumsmechanismen an der Proliferation vorstellen. Neben der oben erwähnten Expression von IL2 und IL2R unterstützen folgende Daten diese Hypothese. Theileria-infizierte T-Zellen werden nach der Infektion mit dem Parasiten unabhängig von der Zugabe exogener Wachstumsfaktoren. Weiterhin ist in ihren Medienüberständen ein wachstumsstimulierender Faktor mit IL2 Aktivität nachweisbar (Brown et al., 1986). Außerdem wird das Wachstum Theileria-infizierter T-Zellen durch starkes Verdünnen der Zellkulturen vermindert bzw. gehemmt (Dobbelaere et al., 1991). Letzteres deutet auf die Notwendigkeit von Wachstumsfaktoren und von direktem Zell-Zellkontakt für eine optimale Proliferation dieser Zellen hin.

Trotz dieser Ergebnisse bestand die Möglichkeit, daß in Theileria-infizierten Zellen IL2 und IL2R nur als Folge der permanenten Aktivierung koexprimiert werden und keine essentielle Bedeutung für das Wachstum besitzen. Beispielsweise spielen in der Anfangsphase der T-Zell-Transformation durch HTLV-1 (human T-cell leukemia virus, Typ 1) IL2 und IL2R vermutlich eine entscheidende Rolle. Im Verlauf der Zeit werden diese Zellen jedoch in ihrem Wachstum von IL2 unabhängig (Russel, 1989). Ein ähnlicher Mechanismus der Transformation könnte auch im Fall Theileria-infizierter T-Zellen vorliegen.

Ein Ziel der Arbeit war deshalb die Klärung der Frage, ob IL2 und IL2R für das ungehemmte Wachstum infizierter Lymphozyten essentiell sind. Hierzu wurden zwei experimentelle Ansätze zur Untersuchung der biologischen Funktionen beider Moleküle gewählt. Zum einen wurde durch Anwendung von Antikörpern die Wirkung von IL2 blockiert, zum anderen wurde mit Hilfe von "antisense"-Plasmid-Konstrukten die Expression endogener IL2R mRNA gehemmt. Die Auswirkungen beider Blockierungen auf das kontinuierliche Wachstum Theileria-infizierter Zellen wurden untersucht.

MHC-Klasse II Antigene

T-Lymphozyten sind eine der Hauptkomponenten der zellulären Immunantwort. Ihre Funktionen, wie die Eliminierung von infizierten oder entarteten Körperzellen und die Unterstützung bzw. Aktivierung der Immunabwehr, hängen von deren Wechselwirkung mit anderen Zellen ab (Übersicht: Wagner & Eichmann, 1989). Sie können mit Hilfe ihres spezifischen Rezeptors (T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex) nur dann Fremd-Antigene erkennen, wenn sie in Zusammenhang mit zellulären Oberflächenproteinen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) exponiert werden (MHC-Restriktion, Übersicht: Kourilsky & Claverie, 1989). Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen (Antigenen) unterschieden. Klasse I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen, MHC-Klasse II Moleküle fast ausschließlich auf immunokompetenten Zellen, wie aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und anderen antigen-präsentierenden Zellen exprimiert (Übersicht: Benoist & Mathis, 1990). Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit den MHC-Antigenen muß anschließend in entsprechende biochemische Signale, die die zelluläre Antwort kontrollieren, übersetzt werden (Übersicht: Klausner & Samelson, 1991). Dieser Prozeß ist sowohl an der Selektion im Thymus während der Reifung der T-Zellen, als auch an der Regulation der Immunantwort von reifen T-Zellen beteiligt (Übersicht: Finkel et al., 1991).

Anhand der Oberflächenmoleküle (CD4/CD8) werden die T-Lymphozyten grob in zwei Gruppen unterteilt. Die CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen oder Killerzellen erkennen alle pathogen veränderten Körperzellen an den von MHC-Klasse I präsentierten Fremd-Antigenen und zerstören sie mit Hilfe spezieller Enzyme (Salter et al., 1990). Die CD4-positiven T-Zellen oder Helferzellen hingegen erkennen nur die Antigene, die von antigen-präsentierenden Zellen mit Hilfe von MHC-Klasse II Proteinen an der Zelloberfläche präsentiert werden (Gay et al., 1987). Die so aktivierten Helferzellen schütten Wachstumsfaktoren (Interleukine) aus, die sie selbst und die antikörper-produzierenden B-Zellen zur Teilung anregen und damit die Immunantwort regulieren. Neben dieser antigen-spezifischer Aktivierung von Lymphozyten, können die MHC-Klasse II Moleküle unter gewissen, pathologischen Bedingungen (in Assoziation mit "Superantigenen") Lymphozyten unspezifisch polyklonal zum Wachstum anregen (McDonald et al., 1988; Choi et al., 1989; Übersicht: Cole & Atkin, 1991).

In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß die MHC-Klasse II Proteine nicht nur bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle spielen (Übersicht: Germain, 1986; Marrack & Kappler, 1988), sondern auch bei der Weiterleitung von Signalen ins Innere der Klasse II-exprimierenden Zelle (Cambier et al., 1987a und 1987b; St-Pierre et al., 1989; Cambier &

Lehman, 1990; Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990; Ødum et al., 1991). Besonders intensiv wurde die Signaltransduktion durch die MHC-Klasse II Antigene in B-Zellen untersucht (Cambier et al., 1987a und 1987b; St-Pierre et al., 1989; Cambier & Lehman, 1989 und 1990; Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990). Die Klasse II-vermittelten Signale können sich sowohl negativ, als auch positiv auf das Wachstum der B-Zellen auswirken (Clement et al., 1986; Cambier & Lehman, 1989 und 1990). Je nach Aktivierungszustand der B-Zellen, werden diese durch die Klasse II-vermittelten Signale zur Proliferation oder zur Differenzierung (Wachstumsstop) angeregt.

Aktiviert T-Zellen exprimieren auch MHC-Klasse II Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Ob durch die Bindung eines Liganden an die MHC-Klasse II Moleküle, ähnlich wie in B-Zellen ein wachstumsmodulierendes Signal übertragen werden kann, war bisher nicht bekannt. Studien der Klasse II-vermittelten Signale in aktivierten T-Zellen beschränkten sich auf die Analyse der Aktivierung von Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Adhäsionsmolekülen, die an der Signaltransduktion in T-Zellen beteiligt sind (Mourad et al., 1990; Ødum et al., 1991). Deren direkte Auswirkungen bezüglich der Proliferation aktivierter T-Zellen wurden aber nicht untersucht.

Theileria-infizierte T-Zellen exprimieren eine große Anzahl an MHC-Klasse II Molekülen und lösen in nicht-infizierten Lymphozyten eine starke polyklonale Aktivierung und Proliferation aus (Pearson et al., 1979; Eugui & Emery, 1981). Dabei besteht die Möglichkeit, daß sich die infizierten T-Zellen untereinander über den selben Mechanismus stimulieren könnten. Interessanterweise wird nach Abtötung des Parasiten die Menge an MHC-Klasse II Molekülen reduziert (D. Dobbelaere persönliche Mitteilung, Dobbelaere et al., 1990). Deswegen war es vorstellbar, daß Theileria-infizierte T-Zellen durch die MHC-Klasse II Moleküle wachstumsstimulierende Signale erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch Anwendung von anti-Klasse II Antikörpern die Bindung natürlicher Liganden an die MHC-Klasse II Moleküle simuliert und der daraus resultierende Effekt auf das Wachstum Theileria-infizierter T-Zellen näher untersucht.

2 MATERIAL

Bezugsquellen

Chemikalien wurden soweit nicht anders aufgeführt von der Firma Merck, Darmstadt bezogen, Enzyme soweit nicht anders aufgeführt von Boehringer, Mannheim oder Promega Biotec, Heidelberg.

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| Acetyl-Coenzym A, Li-Salz | Pharmacia, Freiburg |
| Acrylamid | Sigma, München |
| Agarose | Appligene, Heidelberg |
| Ammoniumperoxodisulfat | Bio Rad, München |
| Ampicillin | Sigma, München |
| Aprotinin | Sigma, München |
| Bacto-Agar | Difco Laboratories, Detroit |
| Bacto-Hefeextrakt | Difco Laboratories, Detroit |
| Bacto-Trypton | Difco Laboratories, Detroit |
| Bakterienschalen (9 cm) | Greiner, Nürtingen |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| BSA | Serva, Heidelberg |
| BW720C | Cooper's Animal Health, UK |
| ConA | Pharmacia, Freiburg |
| DEAE-Dextran | Pharmacia, Freiburg |
| DEAE-Membran, NA45 | Schleicher&Schuell, Dassel |
| Desoxy-Nukleosidtriphosphate | Boehringer, Mannheim |
| Dexamethason | Sigma, München |
| Dialyseschläuche | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| Dimethylchlorsilan | Fluka, Neu-Ulm |
| Dimethylsulfoxid | Fluka, Neu-Ulm |
| Dithiothreitol | BRL Inc., Neu-Isenburg |
| DNase I | Pharmacia, Freiburg |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma, München |
| Ethylacetat | Merck, Darmstadt |
| Ficoll 400 | Serva, Heidelberg |
| Ficoll Paque | Pharmacia, Uppsala, Schweden |
| Formamid | Merck, Darmstadt |
| Fötales Kälberserum | Gibco, Karlsruhe |
| Folin-Reagenz | Merck, Darmstadt |
| G418 | Gibco, Karlsruhe |
| Genistein | Sigma, München |
| Giemsa | Merck, Heidelberg |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glyoxal | BRL (Gibco), Karlsruhe |
| Harnstoff | Bio Rad, München |
| HEPES | Sigma, München |
| Herbimycin A | Sigma, München |

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Hybond N/N+ Filter | Amersham-Büchler, Braunschweig |
| hr Interleukin-2 | Amersham-Büchler, Braunschweig |
| Isoton | Sigma; München |
| Kieselgel-DC-Platten | Macherey-Nagel, Düren |
| L15 | Gibco, Karlsruhe |
| Lachs-Spermien-DNA Typ III, Na-Salz | Sigma, München |
| Leupeptin | Boehringer, Mannheim |
| Lysozym | Boehringer, Mannheim |
| β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| Mikrotiterplatten | Linbro, Flow Lab., Meckenheim |
| NACS-Prepac-Säulen | Gibco, Karlsruhe |
| Natriumorthovanadat | Sigma, München |
| N-Broth | Difco Laboratories, Detroit |
| Nifedipin | Sigma, München |
| N,N'-Methylen-bisacrylamid | Bio Rad, München |
| Nonidet P-40 | Bio Rad, München |
| Oligo-dT-Cellulose Typ VII | Collaborative Research Inc. |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Karlsruhe |
| Proteaseinhibitoren | Sigma, München |
| Protein A-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| Proteinase K | Merck, Darmstadt |
| Quiagen-tip-500-Säulen | Diagen, Düsseldorf |
| Quicxkszint | Zinsser, Frankfurt |
| Röntgenfilme (HyperfilmMP) | Amersham, Braunschweig |
| RPMI 1640 | Gibco, Karlsruhe |
| SDS | Serva, Heidelberg |
| Sephadex G-50 | Pharmacia, Freiburg |
| TEMED | Bio Rad, München |
| TPA | Sigma, München |
| transfer-RNA (aus Kalbsleber) | Boehringer, Mannheim |
| Transformations-Chemikalien | Fluka, Buchs Schweiz |
| Tris-HCl, Tris-Base | Sigma, München |
| TritonX-100 | Bio Rad, München |
| Trypan Blau | Serva, Heidelberg |
| Tryptose Phosphat Broth | Gibco, Karlsruhe |
| Trypsin | Gibco, Karlsruhe |
| Whatman 3MM-Papier | Bender & Hobein, Karlsruhe |
| Zellkulturflaschen | Greiner, Nürtingen |

Radiochemikalien:

α -³²P-dATP (370MBq/ml, 110 TBq/mmol)

γ -³²P-dATP (370MBq/ml, >185 GBq/mmol)

α -³²P-dCTP (370MBq/ml, 110 TBq/mmol)

D-threo-(dichloracetyl-1-¹⁴C)-Chloramphenicol (7.4MBq/ml, 2.11 GBq/mmol)

(methyl-³H) Thymidin (37 MBq/ml, >1.55 TBq/mmol)

Alle Radiochemikalien wurden von Amersham, Braunschweig bezogen.

Bakterien und Zellen

- **E. coli TG1**: Derivat von JM 101, Genotyp Δ (lac pro), supE, thi, hsd Δ 5(r-m-)F' traD36, proAB, lacIqZ, dN15

- ***Theileria parva* Muguga infizierte Rinderlymphozyten:**

- **TpM [803]**: T-Zellen, CD4 positiv, CD8 negativ, erhalten von ILRAD, Nairobi

- **B1 [D409]**: B-Zellen, erhalten von ILRAD, Nairobi

- **In7**: T-Zellen, CD4 negativ, CD8 positiv, zur Verfügung gestellt von Dr. Ina Baumann, Karlsruhe

- **Nicht infizierte Rinderlymphozyten**, isoliert aus Lymphknoten (vom Schlachthof, Karlsruhe) und mit ConA (5 μ g/ml) stimuliert.

- **Hela tk-**: menschliche Cervix-Karzinoma-Zellen aus der Zell-Bank des IGT, Karlsruhe

- **HL-60**: menschliche promyelotische Leukämie-Zellen (erhalten von Dr. H. Krug, Karlsruhe).

Bakterien-Nährmedien

Alle Medien wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde 15% Agar zugegeben

2xYT-Medium:

1.6% Bacto-Trypton, 1 % Bacto-Hefeextract, 1 % NaCl

SOB-Medium:

20% Bacto-Trypton, 5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2.5 mM KCl

LB-Medium:

10% Bacto-Trypton, 5% NaCl, 5% Bacto-Hefeextrakt, 1% Glukose

Einfrier-Medium (Bakterien):

75% LB-Medium, 25% Glycerol

Gewebekultur-Medien

Complete Leibovitz 15-Medium (cL15):

10% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert), 10% Tryptose Phosphat Broth, 20 µg L-Glutamin, 20 mM HEPES pH 7.1, 1% Penicillin/Streptomycin

Complete RPMI 1640-Medium (cRPMI):

10% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert), 20 µg L-Glutamin, 20 mM HEPES pH 7.1, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 µg β-2-Mercaptoethanol

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM):

10% FCS (30 min bei 56°C inaktiviert), 1% Penicillin/Streptomycin

Einfrier-Medium (Zellkultur):

90% Medium, 10% DMSO

Puffer und Lösungen

PBS pH7.3: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

1xTBE: 135 mM Tris , 7.5 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.9

1xTAE: 40 mM Tris, 40 mM NaAcetat, 2 mM EDTA pH 8.3

1xTE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8

1xNTE: 10 mM Tris, % mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7.5

1xTBS: 137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.6 mM Na₂HPO₄

PiPpi: 200 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na₂HPO₄, 1.5% Na₂P₂O₇

20xSSC: 3 M NaCl, 300 mM NaCitrat pH6.5

50xDenhardts: 1%, Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA

Lowry-Reagenz I: 2% NaCO₃, 0.1 M NaOH

Lowry-Reagenz II: 2% NaK-Tartrat

Lowry-Reagenz III: 1% CuSO₄

Lowry-Reagenz IV: Gemisch aus Reagenz I (10 ml) + II (0.1ml) + III (0.1ml)

Lowry-Reagenz V: Folin-Ciocalteu/H₂O (1:1)

0.1 M Phosphatpuffer: 0.1 M NaH₂PO₄/0.1 M Na₂HPO₄, unterschiedlicher pH-Wert entsteht durch verschiedene Volumenanteile der zwei Komponenten

5xDNA-Ladepuffer: 10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau

RNA-Ladepuffer: 50% Glycerin, 10 mM Na₂HPO₄, 0.4% Bromphenolblau

Sanger-Ladungspuffer: 20 mM EDTA, 99% deionisiertes Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau

Antikörper

Alle Präimmun- und Immunsereen wurden vor der Anwendung über ProteinA-Sepharose-Säulen gereinigt und gegen Medium dialysiert.

- **Präimmunsereum:** Kaninchensereum aus nicht immunisierten Tieren (Kontrollantikörper).

- **anti-IL2 Antikörper:** Kaninchensereum gegen menschliches IL2, gekauft bei Genzyme, München.

- **anti-Klasse II Antikörper:** Hybridoma-Medienüberstand, monoklonale Antikörper vom Isotyp IgG2a, gegen menschliches MHC-Klasse II (anti-HLA-DR, M704), gekauft bei Dakopatts, Hamburg.

- **IgG2a Antikörper:** Hybridoma-Medienüberstand, monoklonale Antikörper vom Isotyp IgG2a, nicht spezifisch, (anti-β-2-6-Fruktosan, UPC10, Kontrollantikörper für anti-Klasse II Antikörper), gekauft bei Sigma, München.

- **anti-CD2:** Maus-Ascites, monoklonale Antikörper gegen Rinder CD2 (IL-A 42) vom Isotyp IgG2a, erhalten von ILRAD, Nairobi.

- **anti-CD45:** Maus-Ascites, monoklonale Antikörper gegen Rinder CD45 (CC1) vom Isotyp IgG1, erhalten von Dr. C. Howard, Compton.

DNA-Sonden

- Rinder IL2- und IL2R α -cDNA, erhalten von Dr. R. Reeves, Washington
- Rinder *c-myc* genomische DNA (Regionen aus dem Exon 2 und 3), erhalten von Dr. D. Dobbelaere, Bern
- Rinder Aktin und Theileria Aktin-cDNA, erhalten von Dr. A. Ehrfeld, Freiburg

Plasmide

- **HIV-CAT**: -121/+232 des HIV-1 LTR vor dem CAT-Gen im pBLCAT5 Vektor (Stein, et al., 1988).
- **MMTV-CAT**: -631/+125 des MMTV LTR vor dem CAT-Gen (Cato, et al., 1986)
- **IL2R α -cDNA**: Rinder IL2R α -cDNA im pTZ18U Vektor (Weinberg, et al., 1988).
- **HS1-CAT**: -770/+73 des menschlichen Metallothionein IIa Promotors vor dem CAT-Gen im PUC8 Vektor (Scholer, et al., 1986)
- **RSVneo**: Austausch vom CAT-Gen im RSV-CAT-Vektor (Gorman, et al., 1982a) durch Neomycin-Gen Sequenzen.

Oligonukleotide

- **NF κ B** (HIV-1, Position -92 bis -79, Ivanov, et al., 1989)
 5' AGCTTGGGGACTTTCCAGCCG 3'
 3' ACCCCTGAAAGGTCGGCCTAG 5'
- **AP1** (Kollagenase-Gen, TRE-C-1, Position -72 bis -65, Angel, et al., 1987)
 5'GATCGAGCATGAGTCAGACACA 3'
 3'CTAGCTCGTACTCAGTCTGTGT 5'

3 METHODEN

Die beschriebenen Methoden wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, aus den Handbüchern Ausubel et al. (1989) und Maniatis et al. (1982) abgeleitet.

3.1 Zellkulturtechniken

Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 37⁰C als Suspensionskulturen in 75 cm² und 175 cm² Kulturflaschen ohne CO²-Begasung kultiviert. Das Zellmedium wurde mit 10 mM HEPES pH 7.1 gepuffert. Alle 3-4 Tage wurde frisches Medium zugefügt und die Zellen mit einer Dichte von 1x10⁵/ml (transformierte Zelllinien) bzw 5x10⁵/ml (primäre Zellen) angesetzt. Bei der Kultivierung von primären Lymphozyten isoliert aus Rinderlymphozyten wurde 5 µg/ml ConA und 10 U/ml rekombinantes menschliches IL-2 zugegeben. Zum Einfrieren von Zellen wurden ca. 5x10⁶ Zellen bei 330xg zentrifugiert, in 1 ml Medium mit 10% DMSO aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis gestellt. Zum Aufbewahren verblieben die Zellen zunächst 1 Tag bei -80⁰C, anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196⁰C) überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37⁰C Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie mit 10 ml warmem Medium gewaschen und in 20 ml Medium in eine 75 cm² Kulturflasche gegeben.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Einerseits durch Zählen der Zellen in Gegenwart von Trypan-Blau in einer Neubauer-Zählkammer, andererseits durch Zählen im Coulter Counter (Model ZBI, Coulter Electronics LTD) in geeigneten isotonischen Lösungen.

Morphologische Untersuchung der Zellen

Ca. 1×10^4 Zellen wurden in einem Volumen von 100-200 μl in den Cytospin (Shandon & Southern, England) pipettiert und 5 min mit 1000 rpm auf Ethanol-gereinigte Objektträger zentrifugiert. Die Zellen, die sich nun auf dem Objektträger befanden, wurden 5 min bei RT getrocknet, 5 min in 100% Methanol fixiert und anschließend in einer 6%-igen Giemsa-Lösung bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung dekantiert und die Objektträger bei RT getrocknet. Die so hergestellten Präparate konnten mit Hilfe von Immersionsöl im Mikroskop bei einer 1250x Vergrößerung betrachtet und fotografiert werden.

Abtrennung toter Lymphozyten

Die Lymphozyten-Zellsuspension wurde mit doppeltem Volumen an Ficoll-Paque (Pharmacia) unterschichtet und die toten Zellen durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 1500xg abgetrennt. Die lebenden Zellen, die sich in der Interphase befanden, wurden vorsichtig abgenommen, einmal mit Medium gewaschen und anschließend in frischem Medium resuspendiert.

Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten (Mastro & Pepin, 1980)

Die Lymphknoten (aus der Leistengegend) eines frischgeschlachteten Rindes wurden zunächst von Fett befreit, dann mit Skalpell und Schere in RPMI-Medium (1% P/S, 0.1% DNase) zerkleinert. Dieses Gemisch aus Zellen und Gewebepartikel wurde durch eine feinmaschige Gaze filtriert. Die so gewonnenen Zellen wurden nach zweimaligem 15 minütigen Waschen mit RPMI-Medium (1% P/S, 0.1% DNase) bei 1000xg mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6/\text{ml}$ im Medium aufgenommen. Diese Zellen wurden in Anwesenheit von ConA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert. Nach längerer Kultivierung (mehr als 2 Wochen) erfolgte ein Zusatz von 10 U/ml IL-2.

Eliminierung des Parasiten in Theileria-infizierten Zellen

Infizierte Lymphozyten wurden durch Zugabe von 50 ng/ml BW 720C, einem für Säugerzellen nicht toxischem Naphtochinon, vom Parasiten befreit. Die so behandelten Zellen konnten in Anwesenheit von TPA und IL-2 (10 U/ml) für 3-4 Wochen in Kultur gehalten werden.

³H-Thymidin-Pulsmarkierung der Zellen

Zur Messung der DNA-Synthese wurden die Zellen mit oder ohne Behandlung durch verschiedene Stoffe (z.B. Antikörper oder Inhibitoren) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Volumen: 200 µl) verteilt. Nach einer Inkubation von 2-72 Stunden bei 37⁰C wurden die Zellen mit 0.7 µCi/200 µl ³H-Thymidin für 2 Stunden bei 37⁰C markiert. Danach wurden die Zellen mit Hilfe von Cell Harvester Combi (Scatron AS, Lier, Norwegen) auf Glasfilter gesaugt und mit destilliertem Wasser lysiert. Nach Trocknen der Filter wurden sie mit 3 ml Quickszintflüssigkeit (Zinsser, Frankfurt) versetzt und die eingebaute Radioaktivität wurde im Betamatic Liquid Scintillation Counter gemessen.

Herstellung von "Filler cells"

Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803]) wurden in 25 cm² Kulturflaschen für 3 min der γ -Strahlung (5000 rad) ausgesetzt. Anschließend bei RT mit 1000xg zentrifugiert, in kalter 0.2% Glutaraldehyd/PBS-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis fixiert. Nach der Fixierung wurden die "Filler cells" zweimal mit kalter PBS-Lösung, zweimal mit kaltem L15-Medium und zweimal mit kaltem cL15-Medium gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (1300xg) wurden die "Filler cells" in warmem cL15-Medium mit lebenden Theileria-infizierten T-Zellen (TpM[803]) in bestimmten Verhältnis gemischt und für weitere Experimente in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) verteilt.

3.2 Transiente und stabile Transfektionstechniken

DEAE-Dextran-Methode für Lymphozyten

Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit 1.5×10^5 Zellen/ml angesetzt, sodaß sie sich am folgenden Tag in logarithmischer Wachstumsphase befanden. Ca 5×10^6 Zellen wurden 5 min bei 1200xg zentrifugiert und mit 10 ml warmem 1xTBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM NaHPO_4) gewaschen. Die Lymphozyten wurden mit 1 ml DNA-DEAE-Dextran-Lösung (10 µg DNA, 300 µl DEAE-Dextran in 1xTBS) gut resuspendiert und für 1/2 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen für exakt 3 min mit 733 µl 25% DMSO in 1xTBS behandelt. Durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml warmem 1xTBS wurde die Reaktion gestoppt. Das Zellpellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und falls gewünscht mit verschiedenen Induktoren (Dexamethason, Cadmium) oder Antikörpern behandelt. Diese Methode wurde nur für transiente Transfektionen angewendet. Die Proteinextraktion für den CAT-Assay erfolgte nach 42 Stunden.

Elektroporation

Pro Ansatz wurden 3×10^6 logarithmisch wachsende Lymphozyten 5 min bei 1200xg zentrifugiert und mit einer Zelldichte von 1×10^7 /ml in geeignetem eiskaltem Elektroporationspuffer (10 mM Phosphatpuffer pH 7.3, 214.5 mM Sucrose, 0.5 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose) aufgenommen. Je 300 µl dieser Zellsuspension wurde in sterile Plastik-Küvetten pipettiert und mit 15 µg Plasmid-DNA für 3 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation mit Hilfe einer Apparatur (Jouan) bei 1 kV/cm und 1 msec Pulsdauer in 5 Intervallen von je einer Sekunde. Nachdem die elektroporierten Zellen 10 min bei RT standen, wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen. Diese Methode wurde zur Herstellung stabil transfizierter Zellen verwendet. Dabei wurden die Zellen neben dem gewünschten DNA-Plasmid mit einem Neomycin-Resistenz vermittelnden DNA-Plasmid kotransfiziert.

Selektion und Klonierung stabil transfizierter Zellklone

48 Stunden nach der Elektroporation wurde dem Medium 1 mg/ml G418 (Neomycin) zugegeben, um nur den Zellen das Wachstum zu ermöglichen, die das kotransfizierte Neomycin-Resistenz-Gen aufgenommen haben. Nach 8 Tagen wurden die toten Zellen über eine Ficoll-Paque-Säule abgetrennt und die lebenden Zellen in frischem Medium mit 300 µg/ml G418 für weitere 2 Wochen kultiviert. Nach nochmaliger Entfernung toter Zellen wurden die lebenden Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Volumen: 200 µl) mit einer Zelldichte von 0,5, 1 und 10 Zellen pro ml in Anwesenheit von 300 µg/ml G418 verteilt. Die Platten wurden in einer feuchten Plastik-Schachtel bei 37⁰C aufbewahrt. Nach 2-3 Wochen wurden die Platten nach wachsenden Kolonien untersucht und die hochgewachsenen Klone weiter expandiert. Die transfizierten Zellen wurden permanent mit 300 µg/ml G418 kultiviert.

Enzymatischer Farbttest für β-Galaktosidase auf Einzelzell-Niveau (Chang & Brenner, 1988)

Dieser Test diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz der Elektroporations-Methode. 48 Stunden nach der Transfektion der Lymphozyten mit dem pSG5-β-gal-Plasmid wurden 1-5x10⁵ Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Cytospin auf Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden für 5 min bei RT in 2% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Objektträger für 2-24 Stunden bei 37⁰C in die Färbelösung (5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆], 2 mM MgCl₂, 1 mg/ml X-Gal) gelegt. Danach konnte man im Lichtmikroskop die blauen Zellen mit β-Galaktosidase - Aktivität auszählen.

3.3 CAT-Assay (Gorman et al., 1982b)

Zunächst wurden die Zellen ca. 42 Stunden nach Transfektion durch Gefrierschock aufgebrochen. Dazu wurden sie zweimal mit 1xTBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,4, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,6 mM NaHPO₄) gewaschen und in 80-100 µl 0,25 M Tris pH 7,8 aufgenommen und gut gemischt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch dreimaliges Eintauchen in ein Trockeneis/Ethanol-Bad mit anschließendem Auftauen im 37⁰C

Wasserbad. Der Proteinextrakt wurde für 7 min bei 60⁰C erhitzt und für 10 min mit 13000xg zentrifugiert.

Die Proteinbestimmung im Überstand erfolgte nach der Methode von Lowry et al., 1951. Bei jeder Messung wurde parallel eine Eichkurve mit dem Standard-Protein BSA (1mg/ml) erstellt. 5 µl der Proteinextrakte wurden mit 135 µl Lowry-Reagenz I gemischt und mit 250 µl frisch hergestelltem Lowry-Reagenz IV für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde unter sofortigem Mischen 30 µl 50% Folin-Lösung zugegeben. Nach 60-120 min im Dunkeln wurde die Extinktion bei 735 nm gemessen. Die Proteinmenge in den Proben wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

Für den CAT-Assay wurde von allen Proben die gleiche Menge an Protein eingesetzt. Die Proben wurden mit 0.25 M Tris pH 7.8 auf 80 µl aufgefüllt, 1.25 µl ¹⁴C-Chloramphenicol und 20 µl 4 mM Acetyl-CoA wurden zugesetzt und die Reaktion für 2 Stunden bei 37⁰C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Essigsäureethylester wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Mischen der Probe wurde die obere Essigsäureethylester/Chloramphenicol-Phase abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge 30 min eingetrocknet. Das Chloramphenicol wurde wieder in 20 µl Essigsäureethylester aufgelöst und tröpfchenweise punktförmig auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. In einer Glas-Kammer mit Chloroform:Methanol (9:1) als Laufmittel wurde die Chromatographie für 60-90 min durchgeführt. Nach Lufttrocknung der DC-Platte wurde diese mit einem Röntgenfilm bei -80⁰C exponiert.

Die Auswertung des CAT-Assay erfolgte über die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität (pmol/mgxmin) der Chloramphenicol-Transferase, indem die verschiedenen Formen des acetylierten und nicht acetylierten Chloramphenicols aus der DC-Platte ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler gemessen wurden. Da bekannt war, wieviel pmol ¹⁴C-Chloramphenicol eingesetzt wurde, wieviel Substrat in 2 Stunden acetyliert und welche Proteinmenge eingesetzt wurde, konnte man die spezifische Aktivität berechnen.

3.4 Präparation von nukleären und zellulären Proteinextrakten

Vor der Präparation der Extrakte wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und das Zellsediment je nach Zellzahl in 25 µl (5x10⁶) oder in 100 µl (2x10⁷) Lysis-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgenommen. Nach 5 min auf Eis wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 1000xg vom zytoplasmatischen Proteinüberstand abgetrennt. Der zytoplasmatische Extrakt wurde mit halbem Volumen Kern-Puffer (250 mM Tris pH 7.8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT,

1 mM PMSF) verdünnt und 30 min bei 13000xg klar zentrifugiert. Die Kerne wurden mit dem Lysis-Puffer ohne NP-40 vorsichtig gewaschen und in 25 µl bzw. 100µl Kern-Puffer resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen im Trockeneis/Ethanol-Bad wurden die Kerne aufgebrochen. Die Kerntrümmer wurden durch 30 min Zentrifugieren bei 13000xg abgetrennt und die Proteinkonzentration beider Extrakte nach Lowry-Methode bestimmt. Alle Schritte wurden bei 4⁰C durchgeführt und die Proteinaseinhibitoren wurden den Puffern immer frisch zugesetzt.

3.5 Gelretardations-Analyse

Mit Hilfe der Gelretardations-Analyse ("bandshift"-Analyse) wurde die DNA-Protein-Interaktion untersucht. Dazu wurden 2 µg Kernextrakt bzw. 10 µg Zytoplasmaextrakt 5 min bei RT in einem Gesamtvolumen von 18 µl in 10 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 4% Ficoll 400, 1 mM DTT, 1 mM EDTA mit 2 µg poly(dI-dC) inkubiert. Danach wurde, falls erwünscht, für weitere 5 min nicht markiertes Oligonukleotid bzw. Antikörper zum Kompetieren zugesetzt, bevor dann die Inkubation mit dem markierten Oligonukleotid erfolgte. Die DNA-Protein-Bindung erfolgte 30 min bei RT mit 2 fmol radioaktivmarkiertem Oligonukleotid. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurde auf 14x15 cm großen, 1 mm dicken 4% Acrylamid-Gelen (30:0.8) in 0.25xTBE mit 10 V/cm 1.5 Stunden durchgeführt. Die Gele wurden 10 min in 10% Essigsäure fixiert, dann 30 min auf einem 3MM Whatman-Papier bei 75⁰C getrocknet und bei -80⁰C mit einer Verstärkerfolie auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.6 Reinigung von Antikörpern über eine Protein A-Sepharose-Säule

Um die Antikörper von anderen, störenden Proteinen (z.B. Serumproteine) abzutrennen, wurde eine Filtration der Antikörper über eine Protein A-Sepharose-Säule (Staphylococcus-Protein A gebunden an Sepharose CL4B, Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde die Protein A-Sepharose zunächst im Verhältnis 1:1 in TSA (10 mM Tris pH 8, 140 mM NaCl, 0.025% NaN₃) aufgelöst und in dieser Form auch bei 4⁰C aufbewahrt. Für die Reinigung der Antikörper wurde die Protein A-Sepharose in eine 1 ml Glassäule luftblasenfrei gepackt und mit Hilfe des FPLC-Gerätes (Pharmacia) mit Bindungspuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 8) 1 Stunde

äquilibriert. 500 µl der Antikörper wurden mit 500 µl 0.2 M Phosphatpuffer pH 8 gemischt und auf die Säule aufgetragen. Die nicht an die Säule gebundenen Proteine wurden zunächst 30 min mit Bindungspuffer aus der Säule gespült, die gebundenen Antikörper mit McIlvaines Universal-Puffer pH 4 (0.2 M Na₂HPO₄/0.1 M Citrat, 1:1.6) eluiert. Die Elution wurde über die Messung der optischen Dichte verfolgt. Die Fraktionen, die eine große Menge an eluierten Antikörpern enthielten, wurden vereinigt und der saure pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Tris-base neutralisiert. Die Menge der gereinigten Antikörper wurde nach der Lowry-Methode bestimmt und die Antikörper wurden über Nacht bei 4⁰C gegen L15- oder RPMI-Medium dialysiert. Während der Dialyse wurde das Medium dreimal gewechselt. Danach wurden die Antikörper durch Filter (Millipore) sterilfiltriert und bei 4⁰C aufbewahrt.

3.7 Allgemeine Arbeitsmethoden mit Nukleinsäuren

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der wässrigen Nukleinsäurelösung wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer berechnet. Dabei wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprechen 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Um die Proteinverunreinigungen aus der wässrigen Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde diese zunächst mit gleichem Volumen Phenol (TNE-gesättigt) und gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gut gemischt. Die Auftrennung der Phasen erfolgte durch 2 min Zentrifugieren. Die wässrige Oberphase wurde zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

Fällung von Nukleinsäuren

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 1/10 Volumen an 3M NaAcetat, pH 4,8 und mit 2,5 fachem Volumen an Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte 15-120 min auf Eis oder über Nacht bei -20°C . Die ausgefällten Nukleinsäuren wurden anschließend 10-30 min bei 13000xg zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde der Niederschlag mit 80% Ethanol gewaschen.

3.8 DNA-Klonierungstechniken

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig verdaut. Die DNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde mit 2-10 Einheiten Restriktionsenzym pro μg DNA in Gegenwart der vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen für 3 Stunden bzw. über Nacht inkubiert.

Präparation von Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten

5 μg Vektor-DNA wurden in einer 50 μl -Reaktion mit dem gewünschten Enzym verdaut. Ein Aliquot (500ng) wurde auf einem Agarose-Minigel auf vollständigen Verdau überprüft. Die restliche DNA wurde dephosphoryliert, Phenol/Chloroform extrahiert und nach dem Fällen in Wasser aufgelöst.

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die DNA wurde in einem Endvolumen von 50 μl mit 1 μl Alkalischer Phosphatase (1U/ μl) und 1/10 Volumen 10xDephosphorylierungspuffer(500 mM Tris pH 9, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , 10 mM Spermidin) versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurde das Enzym durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

Auffüllen von 5'-Überhängen

Die DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l mit 2 μ l 10x Polymerase-Reaktionspuffer (70mM Tris pH 7.5, 70mM MgCl₂, 500mM NaCl) und 1 μ l E. coli DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ μ l) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 μ l einer 2 mM dNTP-Lösung (2 mM dATP, 2mM dTTP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 10 mM Tris pH 7.5) zugegeben und weitere 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

Ligation von DNA-Fragmenten

100ng der geschnittenen und dephosphorylierten Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l mit Insert-DNA (Vektor-DNA in 3x molarem Überschuß zur Insert-DNA), 1 μ l 10x Ligase-Puffer (660mM Tris pH 7.6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 1 μ l 10 mM ATP und 1 μ l T4 DNA-Ligase (2.5U/ μ l, Amersham) versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 15⁰C über Nacht.

Präparation von kompetenten Bakterien für die Transfomation

Eine Übernachtskultur von E.coli TG1 in 10 ml SOB-Medium (2% Baktotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl) mit Magnesiumsalzen (10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) wurde im Endvolumen von 50 ml 1:50 mit frischem SOB-Medium verdünnt und bei 37⁰C solange geschüttelt bis die OD₆₀₀ etwa 0.5 betrug. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 5 min bei 1500xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 25 ml 0.5M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis stengelassen. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1500xg wurde das Bakteriensediment in 5 ml kalter 0.5M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Bakterien waren nun kompetent rekombinante DNA aufzunehmen.

Transformation von Bakterien

Zu 200 µl kompetenten Bakterien wurden 5 µl eines Ligationsansatzes bzw 10 ng eines Plasmides gegeben und der Ansatz für 1 Stunde auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock von 5 min bei 37⁰C wurden die Bakterien für eine weitere Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurde 800 µl SOB-Medium zugegeben und die Bakterien wurden 1 Stunde bei 37⁰C inkubiert. Danach wurden die Bakterien 5 min bei 1500xg zentrifugiert und der Niederschlag in 200 µl SOB-Medium aufgenommen und auf Selektiv-Agarplatten (LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Bei Verwendung von pUC19 Vektoren wurde vor dem Ausplattieren der Bakterien 100 µl 2% X-Gal und 30 µl 2% IPTG auf dem Agar ausgestrichen. Bakterien mit rekombinierter DNA wurden durch Restriktionsanalyse der in kleinem Maßstab isolierten Plasmid-DNA identifiziert.

3.9 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Eine Bakterien-Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid wurde in 5 ml 2xYT-Medium (1.6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 100mM NaCl) in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin bei 37⁰C über Nacht geschüttelt. Die Bakterien wurden 10 min bei 1500xg zentrifugiert, der Niederschlag in 500 µl 50 mM Tris pH 8 und 50 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert und 30 min auf Eis stehengelassen. Nach Zugabe von 50 µl 0.5M EDTA pH 7.5 und einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 min wurde 50 µl 10% Triton X-100 zugegeben und für 10 min auf Eis gelassen. Anschließend wurde 15 min bei 13000xg zentrifugiert, der Überstand mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 25 µl 3 M NaAcetat und mit 1 ml Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 50 µl Wasser aufgenommen.

Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab

200 ml 2xYT-Medium (1.6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 100mM NaCl) mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37⁰C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 8000xg und 4⁰C 10 min zentrifugiert, das Sediment in 10 ml Puffer 1 (100µg/ml RNase A, 50 mM Tris, 10 mM EDTA

pH 8) aufgenommen und anschließend 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 10 ml 2.5 M KAc pH 4.8 hinzugefügt und sofort für 30 min bei 16000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% Ethanol, 15% Triton X-100) äquilibrierte Quiagen-tip-500 Säule gegeben. Nach Durchfluß dieses Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8.2) eluiert. Das Eluat wurde mit 4 ml Isopropanol bei RT gefällt und sofort bei 16000xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 500 µl Wasser gelöst.

Präparation von genomischer DNA (Miller et al.,1988)

Etwa 3×10^7 Zellen wurden in 50 ml Falcon Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Homogenisations-Puffer (0.3M Sucrose, 10 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgAc, 0.1% NP40, 1 mM DTT) aufgenommen, 5 min auf Eis gestellt und 5 min bei 1500xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml TNE (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7.5) mit Proteinase K (200 µg/ml) und 0.5% SDS aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde vorsichtig zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und die genomische DNA mit 2-fachem Volumen Ethanol gefällt. Die ausgefällten DNA-Fäden wurden mit einer Pasteurpipette herausgenommen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in Wasser gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Präparation von PolyA⁺-RNA (Aviv & Leder, 1972)

Etwa 5×10^7 Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 10 ml kaltem STE (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA pH 7.8) mit 300 µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS für 30 Sekunden mit einem Ultraturrax homogenisiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Anschließend wurde der Lösung NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.5 M zugesetzt und etwa 100 mg Oligo-dT-VII-Cellulose in 1 ml HSB (0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA pH 7.8, 0.1% SDS) zugegeben. Durch Mischen auf einer Rotationsapparatur über Nacht wurde die PolyA⁺-RNA an die Oligo-dT-Cellulose adsorbiert. Das Adsorptionsmaterial wurde 4 min bei 330xg zentrifugiert und

dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Die RNA wurde dreimal mit 1 ml sterilem Wasser eluiert, die 3 ml RNA-Lösung wurden vereinigt und zur vollständigen Abtrennung des Adsorptionsmaterials nochmals zentrifugiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4.8 und 2.5-fachem Volumen Ethanol gefällt. Nach Zentrifugieren und Trocknen des Niederschlages wurde die RNA mit einer Konzentration von 1 µg/ml in sterilem Wasser aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.10 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte nach Größe der DNA-Fragmente in 0.8% bis 1.5% Agarose-Gelen. Je nach Größe und Volumen der Gelkammern (30, 100 oder 250 ml) wurde 1xTAE-Puffer (40 mM Tris pH 8.3, 40 mM NaAc, 2 mM EDTA) mit entsprechender Menge an Agarose versetzt und bis zur Auflösung der Agarose erhitzt. Entsprechend der Art der aufzutrennenden DNA wurde die Agarose sofort mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt oder das Gel wurde erst nach dem Lauf mit Ethidiumbromid angefärbt. Nach Gießen des Geles in einen horizontalen Geltank wurde das Gel mit 1xTAE-Laufpuffer überschichtet und die DNA-Proben in 1xLadepuffer (2 mM EDTA, 2% Glycerin, 0.02% SDS, 0.004% Bromphenolblau) in die mit einem Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte entweder 1 bis 2 Stunden bei 100V oder über Nacht bei 20V-40V. Die DNA-Fragmente waren unter UV-Licht sichtbar und konnten mit Hilfe einer Polaroidkamera fotografiert werden.

DNA-Acrylamid-Gelelektrophorese

30 ml einer 6% Acrylamid-Lösung (3 ml 30:0.8 Acrylamid/Bisacrylamid, 3 ml 10x TBE und 21 ml Wasser) wurde mit 200 µl 10% Ammoniumperoxydisulfat und 15 µl TEMED versetzt. Das Gel wurde zwischen zwei 14x15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Kunststoff-Abstandshaltern gegossen und ein geeigneter Kamm wurde eingesetzt. Nach 15 min wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden in einer Gelapparatur fixiert, der Spalt zwischen Kammer und Glasplatte mit 1% Agarose abgedichtet und die Pufferkammern mit 1xTBE aufgefüllt. Nach Auftragen der Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau)

erfolgte die Auftrennung 1 Stunde bei 100V. Danach wurde die obere Glasplatte entfernt und das Gel für 10 min in 200 ml 1xTBE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Banden wurden unter UV sichtbar gemacht.

DNA-Acrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (Sequenzier-Gel)

50 ml einer 6% Acrylamid/Harnstoff-Stammlösung (30:0.8 Acrylamid/Bisacrylamid, 7 M Harnstoff in 1xTBE) wurden mit 80 µl 25% Ammoniumperoxydisulfat-Lösung und 80 µl TEMED versetzt, in eine Gelkammer (20x40 cm, 0.4 mm Abstandshalter) gegossen und für 30 min polymerisiert. Die Geltaschen wurden durch einen 48-zähligen Kamm gebildet. Als Laufpuffer diente 1xTBE (90 mM Tris pH 8.3, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA). Die Proben wurden in Sanger Probenpuffer (20 mM EDTA, 99% deionisiertes Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) aufgenommen, 3 min gekocht, auf Eis abgekühlt, unverzüglich auf das Gel aufgetragen und die Proben bei 28 mA 2-8 Stunden aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde die obere Glasplatte entfernt, das an der unteren Glasplatte haftende Gel 15 min in 10% Methanol/10% Essigsäure-Lösung fixiert, das Gel auf ein Whatman-3 MM-Papier abgezogen und 30 min bei 70°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde autoradiographiert. Zur Aufreinigung der Oligonukleotide wurden 1 mm dicke 20% Gele mit 2 cm breiten Taschen benutzt sie wurden anschließend in 1xTBE mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt.

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben wurde 4 µl poly A⁺-RNA mit 7.2 µl Denaturierungspuffer (30 µl 30% deionisiertes Glyoxal, 105 µl DMSO, 4.2 µl 500 mM Na₂HPO₄, pH 6.9) versetzt und 10 min bei 55°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde dem Gemisch 1 µl RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM Na₂HPO₄, 0.4% Bromphenolblau) zugegeben und auf ein 1.4% Agarosegel geladen. Die Elektrophorese wurde mit 75V 2.5 Stunden auf einem horizontalen Agarosegel durchgeführt. Der Laufpuffer (pH 6.9) wurde während der Elektrophorese durch eine peristaltische Pumpe rezirkuliert (Laufrichtung von + zum - Pol). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 10 min mit Acridinorange (30 µg/ml in RNA-Laufpuffer) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch dreimaliges 20 min Waschen im RNA-Laufpuffer. Die RNA wurde anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

3.11 Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Bei der Extraktion von Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde die DNA mit Hilfe von DEAE-Membran aus dem Gel entfernt. Zunächst wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht lokalisiert, mit einem Skalpell ein Schnitt unterhalb der Bande gemacht und ein Stück DEAE-Membran hineingeschoben. Die Elektrophorese wurde solange fortgesetzt bis sich die Bande vollständig in der Membran befand. Anschließend wurde die DNA mit 500 μ l 1.5 M NaCl 5 min gevortext, 30 min bei 65⁰C aus der DEAE-Membran eluiert und das Gemisch aus Membran und Eluat durch ein mit Quarzsand gefülltes Eppendorfröhrchen in ein neues Röhrchen filtriert. Die DNA wurde mit 1 ml Ethanol gefällt.

Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide, die auf einem Gene Assembler (Pharmacia) synthetisiert wurden, wurden 16 Stunden bei 50⁰C mit konzentriertem Ammoniak aus der Kassette gelöst. Nach dem Eintrocknen des Ammoniak wurden die Oligonukleotide in 500 μ l Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt. Die Reinigung erfolgte über ein 20% denaturierendes Acrylamid/8.3 M Harnstoff-Gel. 250 μ g Oligonukleotide wurden in 60 μ l Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) aufgenommen und für 3 Stunden bei 1000V aufgetrennt. Nach 2 Stunden wurde der Laufpuffer (1xTBE) gewechselt. Nach 10 min Anfärben des Geles in 1xTBE mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid wurde unter UV-Licht eine, die dem vollständig synthetisiertem Oligonukleotid entsprechende Bande herausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde mit einem Skalpell zerkleinert und mit 1 ml Wasser über Nacht eluiert. Nach Filtration über Glaswolle wurde die Konzentration bestimmt, gleiche Menge an komplementären Einzelsträngen vereinigt und mit 4 M NH₄Acetat auf eine Endkonzentration von 0.25 M eingestellt. Die Endaufreinigung erfolgte über Nacs-Prepac Säule, die zunächst mit 4 M NH₄Acetat gewaschen und viermal mit 0.25 M NH₄Acetat äquilibriert wurde. Nach Auftragen der doppelsträngigen Oligonukleotide, wurde die Säule mit 0.25 M NH₄Acetat gewaschen und die Oligonukleotide mit viermal 100 μ l 4 M NH₄Acetat eluiert. Anschließend wurde das Eluat eingetrocknet und das zähe Pellet einige Male in Wasser aufgenommen.

3.12 Sequenzierung von DNA (Sanger et al. 1977)

Die Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger in vitro mit Hilfe eines synthetischen Startermoleküls (Primer), das an einer einzelsträngigen DNA hybridisiert, sequenziert. Dabei wurde durch die Zugabe von entsprechenden Didesoxynukleotide nach kurzer Strangverlängerung die Kettenabbruch-Reaktion ausgelöst. 1 µg doppelsträngiger Plasmid-DNA (in 8 µl Volumen) wurde zunächst mit 2 µl 2 M NaOH für 10 min bei RT denaturiert, anschließend mit 3 µl 3 M NH₄Acetat pH 4.5 und 7 µl Wasser versetzt und für 15 min auf Eis mit 60 µl Ethanol ausgefällt. Nach Waschen und Trocknen des Niederschlages wurde die DNA in 10 µl Wasser aufgenommen, 1 µl Primer (2.5 ng/µl) und 2 µl Sequenase-Puffer (280 mM Tris pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 350 mM NaCl) zugegeben, 20 min bei 37⁰C erhitzt und anschließend bei RT abkühlen lassen. Die Kettenverlängerung erfolgte durch Zugabe von 2 µl eines Nukleotid-Mixes (2 µM dGTP, 2 µM dCTP, 2 µM dTTP) 1 µl DTT, 0.5 µl α-³⁵S-dATP und 2 µl T7 DNA-Polymerase für 5 min bei RT. Je 4.5 µl dieser Lösung wurde durch Zugabe von 4 verschiedenen Terminations-Mixe (150 µM dGTP, 150 µM dATP, 150 µM dCTP, 150 µM dTTP, 10 mM MgCl₂, 40 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl), die entweder 15 µM ddATP oder 15 µM ddCTP oder 15 µM ddTTP oder 15 µM ddGTP, 5 min bei 37⁰C gestoppt. Nach Abstoppen der Reaktion mit Sanger-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.5, 95% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.05% Bromphenolblau) und 3 min Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Acrylamid/7 M Harnstoff-Gel aufgetrennt.

3.13 Markierung von DNA mit Radionukliden

Multiprime labelling (Feinberg & Vogelstein, 1983)

Für diese Markierung stand ein Kit der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig zur Verfügung. 25 ng DNA in 10 µl Wasser wurde für 5 min bei 95⁰C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 18 µl Wasser, 10 µl Lösung 1 (dATP, dGTP, dTTP in Tris pH 7.8-Puffer), 5 µl Lösung 2 (Hexanukleotide mit zufälliger DNA-Sequenz), 5 µl α-³²P-dCTP (50 µCi) und 2 µl Lösung 3 (DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment, 1 U/µl) gemischt und für 30 min bei 37⁰C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl 5 mM EDTA gestoppt. Die Abtrennung der freien Nukleotiden von der radioaktiv-markierten DNA erfolgte über eine Sephadex G50-Säule. Dazu wurde eine 1 ml Spritze mit Glaswolle abgedichtet und mit dem Säulenmaterial luftblasenfrei gefüllt. Nach dem

Abzentrifugieren des überschüssigen Puffers wurde die radioaktive Probe aufgetragen und durch nochmaliges Zentrifugieren befand sich die Probe im Säulendurchlauf. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte im Betamatic Liquid Scintillation Counter durch Cerenkov-Zählung.

Kinasierung von Oligonukleotiden

20 ng doppelsträngiges Oligonukleotid (ca. 2 pmol) wurde in einem Endvolumen von 20 µl mit 4 µl 5x Kinase-Puffer (250 mM Tris pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 25 mM DTT), 5 µl γ-³²P-ATP und 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10U/µl) versetzt und für 1 Stunde bei 37⁰C inkubiert. Danach wurde der Lösung 0.8 µl 0.5 M EDTA pH 8, 10 µg tRNA, 30 µl 1xTE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5) 50 µl 0.2 M NaCl in 1xTE zugegeben. Eine Nacs-Prepac-Säule wurde mit 1 M NaCl in 1xTE gewaschen und viermal mit 0.1 M NaCl in 1xTE äquilibriert. Nach Aufladen der Probe wurde die Säule wieder viermal mit 0.1 M NaCl in 1xTE gewaschen und die Probe mit dreimal 100 µl 1 M NaCl in 1xTE eluiert. Das Eluat wurde mit 10 µg tRNA, 25 µl 3 M NaAcetat pH 4.8 und 1 ml Ethanol über Nacht bei -20⁰C gefällt.

3.14 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonfilter und Hybridisierung

Southern Blot (Southern, 1975)

Das Agarose-Gel mit elektrophoretisch aufgetrennter DNA wurde zuerst für 10 min in 0.25 M HCl geschüttelt und dann für 1 Stunde in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl denaturiert. Danach wurde das Gel für mindestens 1 Stunde in 1 M Tris pH 8/1.5 M NaCl neutralisiert. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf den Nylonfilter erfolgte in einer Wanne, die einen mit 20xSSC getränkten Schwamm enthielt. Dabei wurde das Gel auf ein Whatman-3MM-Papier, das sich auf dem Schwamm befindet, gelegt. Auf das Gel wurde luftblasenfrei ein Nylonfilter von passender Größe plaziert. Auf den Filter kamen 3 Lagen Whatman-3MM-Papier und ein Stapel von Papierhandtüchern, die mit einem Gewicht beschwert waren. Nach dem Transfer über Nacht wurde der Nylonfilter 5 min mit UV-Licht bestrahlt und in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Slot-Blot (Bresser et al., 1983, modifiziert)

1-2x10⁵ Zellen wurden in 10 µl Lysispuffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris pH 8, 0.01 M EDTA, 0.2% SDS) für 15 min bei 37⁰C inkubiert, dann mit 90 µl SDS-freien Lysispuffer verdünnt und mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurden die zellulären Proteine über Nacht bei 37⁰C verdaut. Anschließend wurde die DNA 5 min bei 95⁰C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und mit gleichem Volumen (120 µl) 20xSSC gemischt. Die denaturierte DNA wurde mit Hilfe eines Mehrfach-Filtrationsgerätes für Mikroproben (Schleicher & Schuell, Minifold II, SRC 072/0) auf einen mit 10xSSC befeuchteten Hybond N⁺-Nylonfilter transferiert. Der Filter wurde mit der DNA nach oben für 5 min auf 3 MM Whatmann-Papier, das mit 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl getränkt war, gelegt. Anschließend wurde der Filter für 1 min in 1 M Tris pH 8/1.5 M NaCl neutralisiert und für 20 min in 0.4 M NaOH denaturiert. Nach kurzem Schwenken in 10xSSC wurde der Filter in Folie eingeschweißt und entweder bei 4⁰C aufbewahrt oder gleich bei 65⁰C in der Hybridisierungslösung (5xSSC, 5xDenhardt's, 0.5% SDS) vorhybridisiert (mindestens für 4 Stunden) und über Nacht in gleicher Lösung mit der gewünschten DNA-Sonde hybridisiert. Das Waschen des Filters erfolgte wie in der Heparin-Hybridisierungsmethode beschrieben.

Northern-Blot (Thomas, 1980)

Die auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennter RNA wurde nach dem Photographieren, da sie schon durch die Bedingungen des Gellaufs denaturiert vorlag, sofort, wie in der Methode für Southern-Blot beschrieben, auf ein Nylonfilter transferiert. Das denaturierende Glyoxal wurde nach dem Blot durch 2 Stunden Backen bei 80⁰C aus dem Filter entfernt. Nun war der Filter für die Hybridisierung vorbereitet.

Heparin-Hybridisierung

Der Filter wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen für 4-24 Stunden in der Heparin-Hybridisierungslösung (0.5% Heparin, 5xSSC, 0.1 % SDS, 0.5% PiPPi, 5xDenhardt's) bei 65⁰C vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde für 5 min bei 95⁰C denaturiert, sofort im Eis abgekühlt und mit 0.5-2 x 10⁶cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben. Nach 16 Stunden bei 65⁰C wurde der Filter

stufenweise für je 30 min mit 2xSSC/0.1%SDS, 1xSSC/0.1%SDS, 0.1xSSC/0.1%SDS bei der selben Temperatur in einem Schüttelwasserbad gewaschen.

Formamid-Hybridisierung

Bei dieser Hybridisierungsmethode wurde der Filter bei 42⁰C über Nacht in der Vorhybridisierungslösung (50% Formamid, 4xSSC, 0.1% SDS, 0.1% PiPPi, 10xDenhardt's) inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte auch bei 42⁰C in der Hybridisierungslösung (50% Formamid, 6xSSC, 0.1% SDS, 0.1% PiPPi, 5xDenhardt's, 10% Dextransulfat). Das Waschen des Filters erfolgte wie für die Heparin-Hybridisierungs-Methode beschrieben.

Der noch feuchte Filter wurde wieder in eine Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm der Marken Kodak X-AR oder Amersham HyperfilmTM in Kassetten mit Verstärkerfolie bei -80⁰C exponiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Rolle des Wachstumsfaktors IL2 und seines Rezeptors für das Wachstum Theileria-infizierter Lymphozyten

Theileria-infizierte Lymphozyten zeigen eine permanente Expression des Interleukin 2 Gens (IL2) und funktioneller Interleukin 2 Rezeptoren (IL2R) auf der Zelloberfläche (Coquerelle et al., 1989; Heussler et al., 1992). Nach spezifischer Abtötung des Parasiten verschwinden diese Moleküle und die Zellen hören auf zu wachsen (McHardy, 1984; Dobbelaere et al., 1988; Heussler et al., 1992). Die Korrelation zwischen Vorhandensein der Moleküle, Wachstum der Zellen und Anwesenheit des Parasiten führte zur Vermutung, daß diese Moleküle bei der Transformation Theileria-infizierter Lymphozyten eine Rolle spielen könnten.

Um direkt zu beweisen, daß IL2 und IL2R essentiell für das Wachstum sind, wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Zum einem wurde die Funktion des IL2 durch Antikörper blockiert, zum anderen wurde die Expression der IL2R α -Kette durch Anwendung von "antisense"-RNA-Technik gehemmt.

4.1.1 Hemmung der IL2-Funktion durch Antikörper

4.1.1.1 Wachstumshemmung Theileria-infizierter Lymphozyten durch anti-IL2 Antikörper

Die Transkription des IL2-Genes wurde durch Anwendung einer neuen, empfindlichen Nachweismethode ("Polymerase chain reaction") in allen Theileria-infizierten Lymphozyten nachgewiesen (Heussler et al., 1992). Um die mögliche Bedeutung des IL2 für das Wachstum (autokriner IL2/IL2R "loop") Theileria-infizierter Lymphozyten zu untersuchen, wurden Wachstums-Experimente mit Antikörpern durchgeführt. Festgestellt werden sollte, ob die Blockierung des von den Zellen ins Kulturmedium sezernierten IL2 nach Bindung der Antikörper zu einer Wachstumshemmung führt. Dabei wurden die Zellen mit Antikörpern in Mikrotiterplatten für 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde die DNA-Synthese durch Pulsmarkierung mit ^3H -Thymidin gemessen. Da keine Antikörper vorhanden waren, die gegen

das Rinder-IL2 gerichtet waren, wurden polyklonale Antikörper, die gegen das menschliche IL2 gerichtet waren (Immuns Serum vom Kaninchen) eingesetzt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß sowohl infizierte als auch nicht-infizierte Rinderlymphozyten bei exogener Zugabe von rekombinanten, menschlichen IL2 mit verstärkter Proliferation reagieren. Dies deutet auf eine hohe Homologie des IL2-Proteins zwischen den beiden Spezies (Mensch-Rind) hin. Um zu testen, ob die Antikörper, die gegen das menschliche IL2 gerichtet waren, auch das Rinder IL2 erkennen, wurde die DNA-Synthese von nicht-infizierten, IL2 abhängigen ConA-stimulierte Rinderlymphozyten nach anti-IL2 Antikörper Zugabe gemessen. ConA ist ein Pflanzenlektin, das zur polyklonalen Wachstumsstimulierung von T-Zellen angewendet wird. Gleichzeitig wurde eine Theileria-infizierte T-Zelllinie (TpM[803]) und eine Theileria-infizierte B-Zelllinie (B1) getestet.

| Zellen | Antikörper | ³ H-Thymidineinbau ±Standardabweichung | |
|----------------------------|--------------------------|--|---------|
| ConA- Rinderlymphozyten | Kontroll-AK anti-IL-2 | 2961 | (±219) |
| | | 1166 | (±148) |
| TpM[803] | Kontroll-AK anti-IL-2 | 45856 | (±1095) |
| | | 23172 | (±375) |
| B1 | Kontroll-AK anti-IL-2 | 52863 | (±349) |
| | | 51406 | (±1780) |

Tab. 1: Wachstumshemmung Theileria-infizierter Lymphozyten durch anti-IL2 Antikörper. Nicht infizierte, ConA-stimulierte Rinderlymphozyten (4 Wochen in Kultur) wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 /ml, Theileria-infizierte Zellen (TpM[803] und B1) wurden mit einer Zelldichte von 2.5×10^4 /ml angesetzt und für 24 h in Anwesenheit von 100 µg/ml Kontrollantikörpern (Kontroll-Ak, Präimmuns Serum vom Kaninchen) oder 100 µg/ml anti-IL2 Antikörpern (anti-IL-2, Immuns Serum vom Kaninchen) in Mikrotiterplatten inkubiert. Die DNA-Synthese wurde durch Pulsmarkierung mit 3.5 µCi/ml ³H-Thymidin für 2 h bei 37°C gemessen. Die Werte sind in cpm ±Standardabweichung von vier unabhängigen Ansätzen angegeben.

Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen, wurden sowohl die nicht-infizierten, IL2 abhängigen ConA-stimulierte Rinderlymphozyten, als auch die Theileria-infizierte T-Zelllinie (TpM[803]) nach anti-

IL2 Antikörper Zugabe um 50%-60% in ihrem Wachstum im Vergleich zu Kontroll-Antikörpern (Präimmenserum von Kaninchen) reduziert. Die Theileria-infizierte B-Zelllinie (B1) wurde hingegen durch die anti-IL2 Antikörper in ihrem Wachstum nicht inhibiert. Diese Ergebnisse zeigten zum einen, daß die wachstumshemmenden Effekte des anti-IL2 Antikörpers spezifisch und nicht toxisch sind. Zum anderen, daß die Theileria-infizierte T-Zelllinie (TpM[803]) in ihrem Wachstum von IL2 abhängig sind.

4.1.2 Hemmung der IL2R α -Expression durch Anwendung von "antisense"-RNA-Technik

4.1.2.1 Etablierung eines geeigneten induzierbaren Testsystems

Bei der Anwendung von "antisense"-RNA-Techniken werden "antisense"-Konstrukte von dem entsprechenden Gen hergestellt, die nach Transfektion in die Zellen die Proteinexpression dieses Gens verhindern sollen (Übersicht: Walder, 1988). Dabei bindet die "antisense"-RNA an die komplementären Sequenzen der entsprechenden endogenen Transkripte und blockiert sowohl Transport aus dem Kern wie die Übersetzung in das Protein. Gleichzeitig wird das aus endogener mRNA und "antisense"-RNA gebildete Hybrid durch ein spezifisches Enzym erkannt und abgebaut (Übersicht: Walder, 1988). Als Kontrolle für den hemmenden Effekt der "antisense"-Konstrukte werden parallel dazu "sense"-Konstrukte hergestellt, die zur endogenen mRNA homologe Sequenzen produzieren und somit die Translation nicht hemmen können.

"antisense"-RNA kann man von außen z.B. durch Mikroinjektion in die Zellen transferieren (Melton, 1985) oder mit Hilfe eines transfizierten DNA-Konstruktes innerhalb der Zelle produzieren (Izant, 1985; Übersicht: Walder, 1988). In den hier vorgestellten Experimenten wird die "antisense"-RNA endogen hergestellt.

Da der Effekt der "antisense"-RNA auf das Wachstum infizierter Zellen untersucht wird, sollte der Vektor einen induzierbaren Promotor besitzen. Dadurch kann die Produktion der "antisense"-RNA durch Zugabe eines Induktors kontrolliert werden. Das geeignete Vektor-/Induktor-System sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Der induzierbare Promotor sollte in Theileria-infizierten Zellen funktionell aktiv sein.
- Die Basalexpression des Promotors sollte ohne Induktor niedrig sein.
- Die Menge an Induktor, die effizient den Promotor einschaltet, sollte für Theileria-infizierte Zellen nicht toxisch sein.

Es wurden zwei induzierbare Vektoren gewählt. Zum einen wurde der Vektor -631/+125 MMTV-CAT (Cato et al., 1986), der als Promotor das hormoninduzierbare LTR des Mouse-Mamma-Tumor Virus (MMTV) enthält, auf die Erfüllung der oben genannten Voraussetzungen untersucht. Der Promotor besitzt vier Bindungsstellen (-200/-60 im LTR) für den Glukokortikoid-Rezeptor, so daß er durch Zugabe des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason induziert werden kann. Zum anderen wurde der Vektor HS1-CAT (Scholer et al., 1986), der den Promotor des menschlichen Metallothionein IIa-Genes vor dem CAT-Gen inseriert hat und durch Schwermetalle wie z.B. Cadmium induziert werden kann, verwendet.

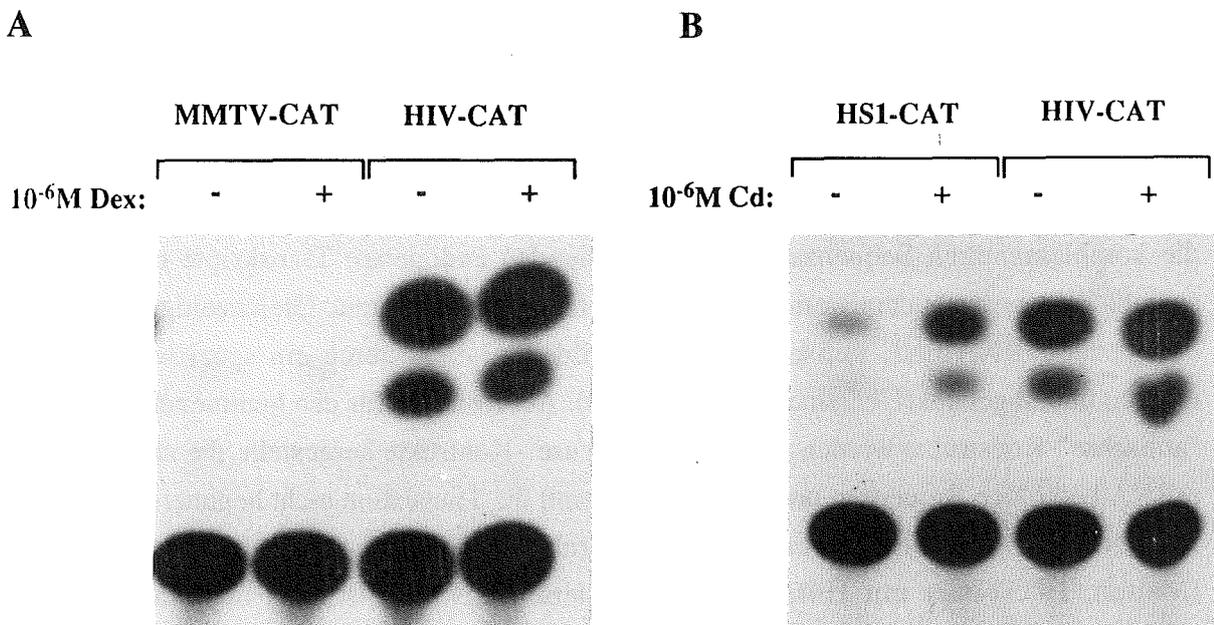


Abb. 1: Test der Induzierbarkeit der MMTV-CAT und HS1-CAT Vektoren in Theileria-infizierten Zellen (CAT-Assay). (A) Je 10 μ g MMTV-CAT- oder HIV-CAT-Plasmide wurden transient in Theileria-infizierte Zellen transfiziert. Den Zellen wurde entweder 10^{-6} M Dexamethason zugegeben (+) oder sie blieben unbehandelt (-). Nach 42 Stunden wurde ein CAT-Assay durchgeführt. (B) Je 10 μ g vom HS1-CAT- oder HIV-CAT-Plasmiden wurden transient in Theileria-infizierte Zellen transfiziert. Den Zellen wurde entweder 10^{-6} M Cadmium zugegeben (+) oder sie blieben unbehandelt (-). Nach 42 Stunden wurde ein CAT-Assay durchgeführt. Pro Versuchansatz wurde jeweils die gleiche Proteinmenge aufgetragen.

Zunächst wurde in transienten Transfektionen getestet, ob beide Vektoren in Theileria-infizierten Zellen induzierbar sind. Dabei wurde die Aktivität des bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reportergens vor und nach Induktion mit 10^{-6} M Dexamethason bzw. 10^{-6} M Cadmium untersucht. Als Kontrolle für einen konstitutiv aktivierten Promotor in Theileria-infizierten Zellen wurde der Vektor -121/+232 HIV-CAT (Nabel & Baltimore, 1987; Stein, et al., 1988), der in seiner LTR-Promotorregion zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B besitzt, verwendet.

Wie in Abb.1A zu erkennen ist, wurde das MMTV-CAT-Konstrukt in Theileria-infizierten Zellen durch Dexamethason nicht induziert. Hingegen wurde der Metallothionein-Promotor des HS1-CAT durch das zugesetzte Cadmium aktiviert (Abb.1B). Da sowohl die Basalaktivität des Metallothionein-Promotors relativ niedrig war, als auch die Untersuchung von verschiedenen Cadmium-Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} M) auf das Wachstum Theileria-infizierter Zellen über mehrere Tage keinen hemmenden (10^{-6} und 10^{-7} M)) Effekt zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde für die Herstellung der "sense"-/"antisense"-Konstrukte der HS1-CAT Vektor verwendet.

4.1.2.2 Herstellung der "sense"- und "antisense"-IL2R α -Konstrukte

Die "sense"-/"antisense"- IL2R α -Konstrukte wurden aus dem 1020 bp langen Rinder IL2R α -cDNA-Fragment (Weinberg et al., 1988) und dem mit *NcoI* linearisierten HS1-CAT Plasmid (Abb. 2) hergestellt. Das CAT-Gen wurde im Konstrukt belassen, da es später die Detektion der aufgenommenen DNA und auch der RNA in den stabil transfizierten Zellen erleichtern sollte.

Das 1020 bp lange IL2R α -Fragment wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* aus der 2600 bp langen Rinder IL2R α -cDNA herausgeschnitten (Abb. 2). Da dieses Fragment den 5' nicht-translatierten Bereich und den gesamten proteinkodierenden Bereich des IL2R α -Gens beinhaltet, wurde eine effektive Hemmung der Proteintranslation durch die "antisense"-RNA erwartet.

Mit Hilfe einer *Hind III*-Schnittstelle im 1020 bp IL2R α -Fragment konnte nach der Ligation mit dem HS1-CAT Plasmid die Orientierung des Fragments innerhalb des Vektors festgestellt werden. Die Fragmentlängen, die bei der Restriktionsanalyse mit *Hind III* entstehen, betragen

bei den hergestellten IL2R α -Konstrukten 4500bp und 1600bp ("sense") und 3900bp und 2200bp ("antisense"). Durch Sequenzierung der so ausgewählten "sense"- und "antisense"-Konstrukte wurde die Orientierung des IL2R α -Fragmentes nochmals bestätigt (Daten nicht gezeigt).

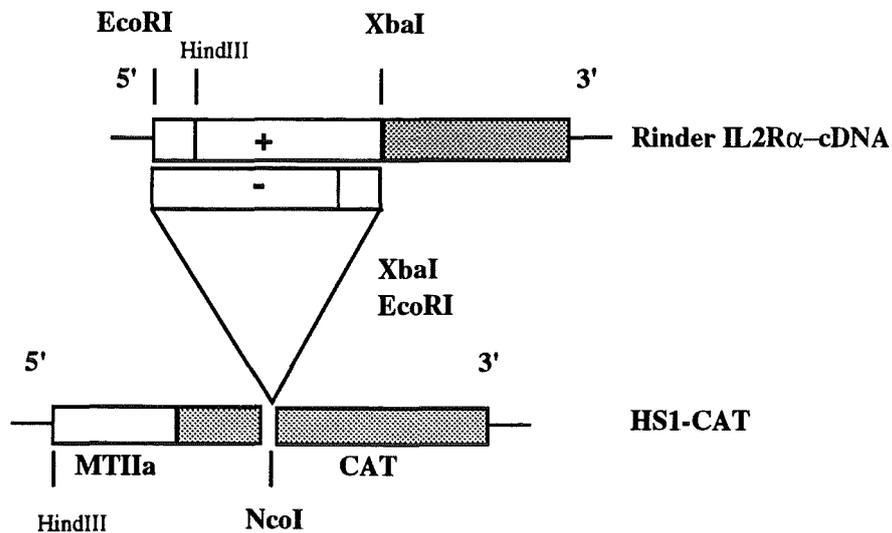


Abb. 2: Die Rinder IL2R α "sense"-und "antisense"-Konstrukte. Schematische Darstellung der IL2R α -cDNA-Region aus dem pTZU18-Vektor (Weinberg, et al., 1988) und der Metallothionein-Promotor (MTIIa)/Cat-Gen-Region des HS1-CAT-Vektors (Scholer, et al., 1986). Das 1020 bp lange *EcoRI/XbaI*-Fragment der Rinder IL2R α -cDNA wurde in die *NcoI*-Schnittstelle im CAT-Gen des HS1-CAT Vektors in "sense"-(+) oder "antisense"-(-) Orientierung kloniert. Die *HindIII*-Schnittstelle diente der Bestimmung der Orientierung des IL2R α -Fragmentes.

4.1.2.3 Herstellung und Klonierung von stabilen Transfektanten mit den "sense"- und -"antisense"-IL2R α -Konstrukten

Da die wachstumshemmende Wirkung der "antisense"-Konstrukte in infizierten Zellen wegen der geringen Transfektionseffizienz (0.1%) nicht in transienten Analysen untersucht werden konnten, mußten die Zellen stabil mit diesen Konstrukten transfiziert werden. Dazu wurde, nach dem Testen von verschiedenen Methoden, eine effizientere Transfektionsmethode etabliert. Theileria-infizierte Lymphozyten konnten mit herkömmlichen Transfektionsmethoden wie z.B. Calciumphosphat- oder DEAE-Dextran-Methode nicht erfolgreich stabil transfiziert werden, erst nach Anwendung von Elektroporation wurden stabile Transfektanten erhalten. Zur

Selektion stabiler Transfektanten wurden die Zellen zusätzlich mit einem Antibiotikaresistenz-Gen (Neomycin-Gen) kotransfiziert (RSVneo Vektor) und dann in einem antibiotikahaltigen (Neomycin[G418]) Medium kultiviert. Die Transfektanten wurden zunächst für 8 Tage mit 1 mg/ml Neomycin vorselektioniert, für die weitere Kultivierung wurde dann eine niedrigere Dosis von 300 µg/ml gewählt.

Da Theileria-infizierte Lymphozyten in Suspension wachsen, entsteht nach der Transfektion eine Mischpopulation, die aus

- nicht-transfizierten Zellen,
- nur mit dem Resistenzgen transfizierten Zellen,
- nur mit den "sense"-oder -"antisense"-IL2R α -Konstrukten transfizierten Zellen
- oder Zellen, die beide Vektoren aufgenommen haben, besteht.

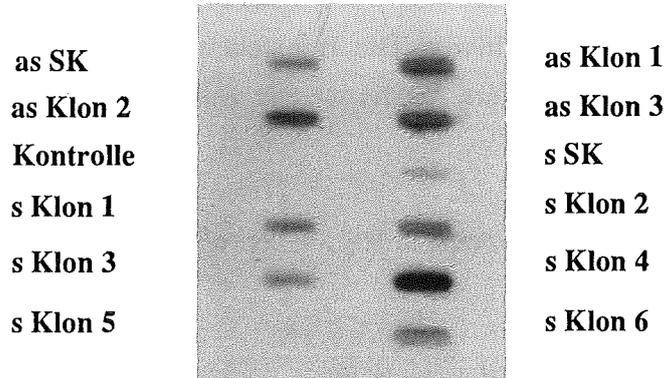
Um einen mit dem Resistenzgen und "sense"/"antisense"-IL2R α -Konstrukten transfizierten Zellklon zu erhalten, wurden die Transfektanten durch Anwendung der "limiting dilution"-Methode kloniert. Dabei wurden die Zellen so verdünnt, daß theoretisch nur eine Zelle pro Mikrotiterplattenvertiefung vorhanden war. Nach 2-4 wöchiger Kultivierung in Mikrotiterplatten wurden 6 "sense"-IL2R α -Klone und 1 "antisense"-IL2R α -Klon erhalten. Um weitere "antisense"-Klone zu erhalten, wurde die Klonierung wiederholt, wobei 2 "antisense"-Klone hochwuchsen.

Die "sense"/"antisense"-Klone wurden durchnummeriert und je nach Herkunft ("sense"=s, "antisense"=as) wurden sie als s-Klon 1 bis 6 oder as-Klon 1 bis 3 bezeichnet. Die ursprünglichen Stammkulturen (SK), aus denen sie kloniert wurden, wurden entsprechend als s-SK oder as-SK benannt.

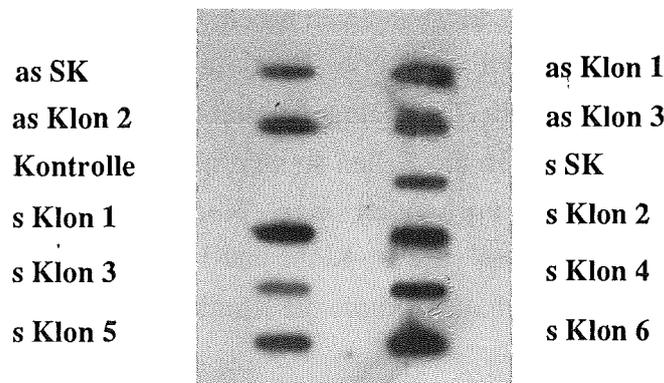
4.1.2.4 Nachweis der transfizierten Konstrukte in den stabilen Transfektanten

Um zu überprüfen, ob die neomycinresistenten Klone die transfizierten "sense"/"antisense"-Konstrukte stabil in ihr Genom aufgenommen hatten, wurde genomische DNA aus ihnen isoliert. Die genomische DNA wurde entweder direkt ("Slot-Blot") oder nach Auftrennung der enzymgeschnittenen DNA-Fragmente ("Southern-Blot") auf ein Filter gebracht. Durch Hybridisierung mit dem CAT-Gen-Fragment, das nur mit den transfizierten "sense"/"antisense"-Konstrukten reagiert, konnte die erfolgte Aufnahme in das Genom nachgewiesen werden.

A



B



Neo

Abb. 3: Nachweis der transfizierten Konstrukte in den stabilen Transfektanten durch "Slot-Blot"-Analyse. Je 1×10^5 Zellen nicht-transfizierter Theileria-infizierter Lymphozyten (Kontrolle), "sense"- und "antisense"-Stammkulturen (s SK, as SK), "sense"-Transfektanten (s Klon 1-6) und "antisense"-Transfektanten (as Klon 1-3) wurden lysiert und auf Nylon N^+ -Filter transferiert. Nach Hybridisierung mit dem CAT-Gen (A) oder mit dem Neomycin-Gen (B) wurden die Filter mit einem Röntgenfilm exponiert.

In der "Slot-Blot"-Analyse (Abb. 3) wurde aus 1×10^5 Zellen/Klon ein Lysat hergestellt, das sofort auf ein Nylon-Filter transferiert wurde. Es wurden zwei identische Filter hergestellt, die mit dem CAT-Gen (Abb. 3A) oder mit dem Neomycin-Gen (Abb. 3B) hybridisiert wurden. In der Abb. 3B ist zu erkennen, daß alle Transfektanten das Neomycin-Gen aufgenommen haben. Auch die "sense"-/"antisense"-IL2R α Konstrukte waren, mit Ausnahme des "sense"-IL2R α -

Klone 5, in den *Theileria*-infizierten Lymphozyten vorhanden (Abb. 3A). Als negative Kontrolle für beide Hybridisierungen dienten nicht-transfizierte *Theileria*-infizierte Lymphozyten.

Für die "Southern-Blot"-Analyse wurde genomische DNA aus den transfizierten und nicht-transfizierten Zellen isoliert und mit dem Enzym *Hind III* geschnitten. Wie aus den Restriktions-Analysen mit *Hind III* bekannt (Kapitel 4.1.2.2), waren nach Hybridisierung mit dem CAT-Gen, die für "sense"- (1600bp) und "antisense"- (2200bp) IL2R α -Konstrukte typische Fragmente sichtbar (Abb. 4). In den nicht-transfizierten Kontrollzellen und in dem "sense"-IL2R α -Klon 5 waren, wie erwartet, keine Banden sichtbar.

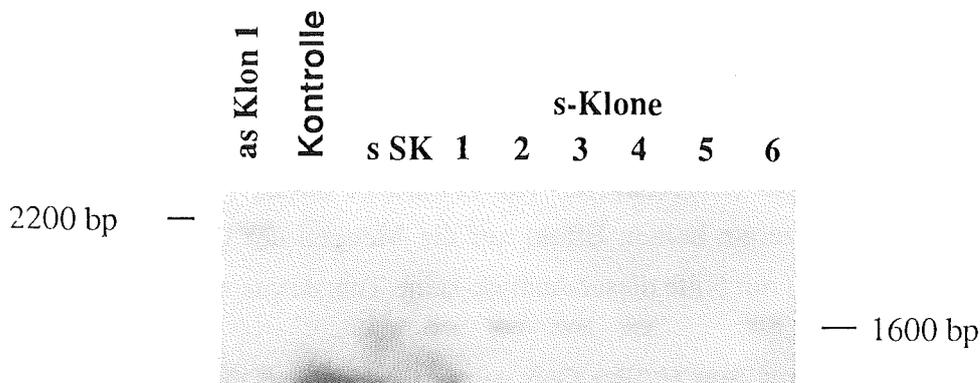


Abb. 4: Nachweis der transfizierten Konstrukte in den stabilen Transfektanten durch "Southern-Blot"-Analyse. Je 15 μ g genomischer DNA aus nicht-transfizierten *Theileria*-infizierten Lymphozyten (Kontrolle), aus der "sense"-Stammkultur (s SK,), aus "sense"-Transfektanten (s Klon 1-6) und aus einem "antisense"-Transfektanten-Klon (as Klon 1) wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind III* geschnitten, auf einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Nylon-Filter transferiert. Der Filter wurde mit dem radioaktiv markierten CAT-Gen hybridisiert. Als Größenmarker diente DNA des Phagen Lambda, die mit dem Enzym *BstE II* geschnitten worden ist.

4.1.2.5 Reduktion endogener IL2R α -mRNA-Menge in "antisense"-IL2R α -Transfektanten

Nach dem oben geführten Nachweis der Aufnahme der "sense"-/"antisense"-IL2R α -Konstrukte, wurde im folgenden die Transkription transfizierter Vektoren durch "Northern-Blot"-Analyse untersucht. Durch Zugabe von Cadmium über einen längeren Zeitraum (3 Tage) sollte eine verstärkte Transkription der "antisense"-RNA stattfinden und damit eine deutliche Abnahme an endogener, "steady state" IL2R α -mRNA-Menge zu sehen sein. Dafür wurden nicht-transfizierte Theileria-infizierte Zellen, ein "antisense"-Klon und ein "sense"-Klon mit und ohne Cadmium (10^{-6} M) für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde aus diesen Zellen polyA⁺ RNA isoliert. Nach dem Transfer der polyA⁺ RNA auf einen Nylon-Filter, wurde dieser mit verschiedenen DNA-Sonden hybridisiert. Als Kontrolle für die gleiche Menge an aufgetragenen polyA⁺ RNA wurde der Filter mit Rinder-Aktin- und Theileria-Aktin-Gensonden hybridisiert.

Durch die Hybridisierung mit dem CAT-Gen sollte die Transkription der transfizierten Konstrukte nachgewiesen werden (siehe Abb. 2). Wie in Abb. 5 zu sehen, sind nur in dem "sense"-Klon Transkripte (CAT/IL2R α) von erwarteter Größe (~2600 bp) zu erkennen. Zugabe von Cadmium zeigte keinen Effekt auf die Mengen der CAT/IL2R α -mRNA. Im "antisense"-Klon konnten mit Hilfe dieser Analyse keine Transkripte nachgewiesen werden.

Durch Hybridisierung mit dem IL2R α -Gen wurde gezeigt, daß die Menge an endogenem IL2R α -Transkript im "antisense"-Klon im Vergleich zum "sense"-Klon und nicht-transfizierten Kontrollzellen drastisch reduziert wurde. Also müssen die "antisense"-Transkripte effektiv synthetisiert werden. Es ist anzunehmen, daß die entstehenden Hybride aus "antisense"-IL2R α -RNA und endogener IL2R α -mRNA von spezifischen RNAsen degradiert wurden.

Da noch eine gewisse Menge an endogenen IL2R α -Transkripten sichtbar waren, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß es sich bei den klonierten "antisense"-Transfektanten um IL2R α -negative "Klonmutanten" handelt. Bisher wurde bei der Klonierung von Theileria-infizierten T-Zellen noch nie ein Klon erhalten, der nicht die IL2R α -Kette exprimiert (persönliche Mitteilung Dr. I. Baumann und Dr. D. Dobbelaere)

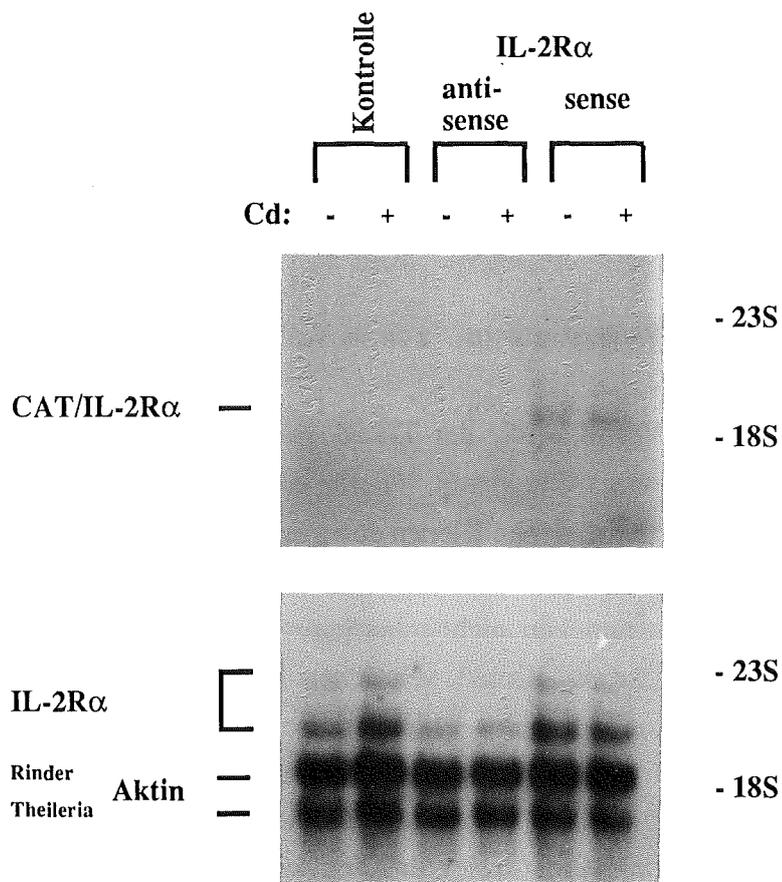


Abb. 5: Die Menge an endogener IL2R α -mRNA ist in "antisense"-IL2R α Transfektanten verringert ("Northern-Blot"-Analyse). Theileria-infizierte Zellen (Kontrolle), "antisense"-Klon 1 (antisense) und "sense"-Klon (sense) wurden für 3 Tage mit und ohne 10^{-6} M Cadmium behandelt und polyA⁺RNA isoliert. 4 μ g RNA wurde auf einem 1.4% Agarose-Gel aufgetrennt und auf ein Nylon-Filter transferiert. Der Filter wurde mit verschiedenen DNA-Sonden nach der Formamid-Methode hybridisiert: CAT-Gen, Rinder IL2R α -Gen, Rinder Aktin-Gen und Theileria Aktin-Gen.

Wie aus der Abb. 5 ersichtlich ist, erfolgte auch im Ansatz ohne Cadmium die Reduktion des endogenen IL2R α -Transkripts durch "antisense"-IL2R α -mRNA. Diese Beobachtung zusammen mit der oben erwähnten Beobachtung, daß keine verstärkte CAT/IL2R α -mRNA durch Cadmium Zugabe im "sense"-Klon stattfand, zeigt, daß die Basalaktivität des Metallothionein-Promotors in den Transfektanten schon völlig ausreicht. Somit konnte auf der mRNA-Ebene in der "Northern-Blot"-Analyse kein Unterschied in der Promotoraktivität mit und ohne Cadmium in den stabilen Transfektanten detektiert werden. In transienten

Transfektionen (Abb. 1B) hingegen, zeigte der Metallothionein-Promotor des HS1-CAT Vektors relativ geringe Basalaktivität und verstärkte CAT-Enzymaktivität nach Cadmium Zugabe. Dies könnte durch ein unterschiedliches Verhalten des Metallothionein-Promotors in Abhängigkeit vom Transfektionszustand (transient-stabil) des Vektors in Theileria-infizierten Zellen erklärt werden.

4.1.2.6 Hemmung des Wachstums in "antisense"-IL2R α -Transfektanten

Um festzustellen, ob die Verringerung der Transkription des IL2R α auch zu biologisch messbaren Effekten auf das Wachstum Theileria-infizierter Zellen führt, wurden Wachstumsexperimente mit transfizierten Klonen durchgeführt.

Zunächst wurde das Wachstum von nicht-transfizierten Theileria-infizierten Zellen, des "antisense"-Klons1 und des "sense"-Klons1, verglichen. Dazu wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen die DNA-Synthese mit Hilfe des ^3H -Thymidineinbaus gemessen. Dafür wurden alle Zellen mit gleicher Zelldichte (2.5×10^4 Zellen/ml) angesetzt und in Mikrotiterplatten (200 μl /Vertiefung) verteilt. Jeden Tag wurde die eingebaute Radioaktivität durch Messung im Szintillations-Zähler bestimmt. Abb. 6 zeigt, daß der "antisense"-IL2R α -Klon1 im Vergleich zum "sense"-IL2R α -Klon1, der das gleiche Wachstumsverhalten wie die nicht-transfizierten Kontrollzellen aufweist, eine deutlich verlangsamte DNA-Synthese hat. Alle 3 "antisense"-Klone wuchsen im Vergleich zu den "sense"-Klonen schlechter (Daten nicht gezeigt). Dies könnte noch einmal mit der erhöhten Basalaktivität des Metallothionein-Promotors in den Transfektanten erklärt werden, die sich nur auf das Wachstum der "antisense"-Transfektanten auswirkte.

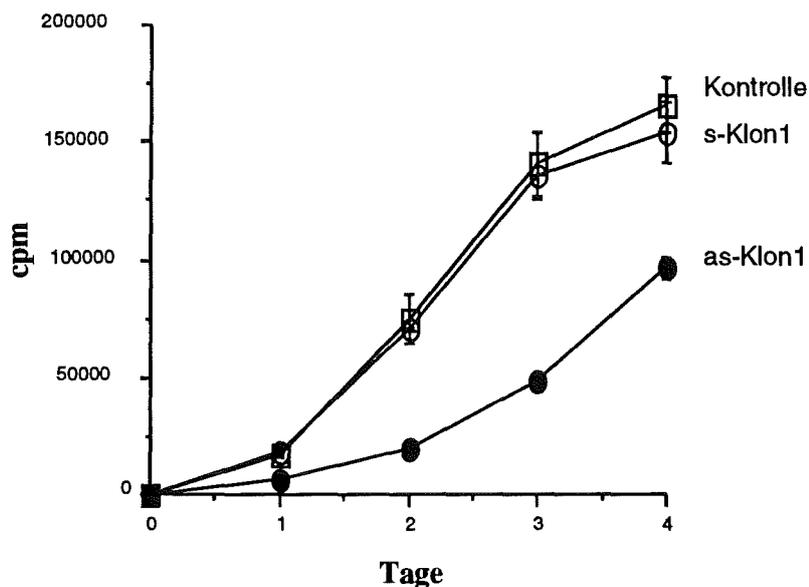


Abb. 6: "antisense"-IL2R α -Transfektanten haben eine niedrigere DNA-Syntheserate als die "sense"-IL2R α -Transfektanten. Theileria-infizierte Zellen (Kontrolle), "sense"-Klon 1 (s-Klon1) und "antisense"-Klon 1 (as-Klon1) wurden mit einer Zelldichte von 2.5×10^4 Zellen/ml in Mikrotiterplatten (200 μ l/Vertiefung) verteilt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen jeden Tag mit 3.5μ Ci/ml 3 H-Thymidin für 2 h bei 37° C pulsmarkiert und das eingebaute 3 H-Thymidin im Szintillations-Zähler bestimmt. Die Werte sind in cpm/200 μ l angegeben. Die Standardabweichungen (die Linien über den Symbolen) wurden aus den Werten von je 4 unabhängigen Ansätzen berechnet.

Um zu zeigen, daß das schlechtere Wachstum der "antisense"-Klone tatsächlich auf eine Abnahme endogener IL2R α -Transkriptmenge beruht, wurde durch Hinzufügen von Cadmium versucht diesen Effekt in "antisense"-Transfektanten zu verstärken. Aufgrund der Halbwertszeit des IL2 Rezeptorproteins von 2-3 Tagen wurde zur Verdeutlichung des Wachstumseffekts ein "sense"-Klon und ein "antisense"-Klon 6 Tage mit und ohne Cadmium (10^{-6} M) kultiviert. Nach Passage am 3. Tag und erneuter Zugabe vom Cadmium wurde an den Tagen 4 bis 6 die DNA-Synthese gemessen. In der Abb. 7 sind die Werte in % des 3 H-Thymidin-Einbaus der ohne Cadmium wachsenden transfizierten Klone angegeben. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden alle Wachstumsexperimente in 4 unabhängigen Kulturen durchgeführt. Cadmium-Zugabe führte im "antisense"-Klon zur einer um ca. 50% reduzierten Thymidin-Inkorporation im Vergleich zum unbehandelten "antisense"-Klon. Der "sense"-Klon hingegen

wurde durch Cadmium in seinem Wachstum über einen Zeitraum von 6 Tagen nicht signifikant beeinflusst.

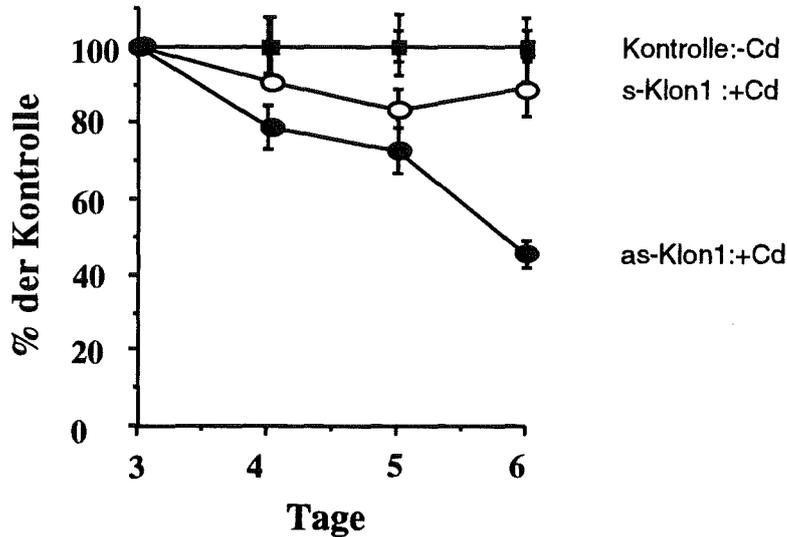


Abb. 7: Hemmung der DNA-Synthese in "antisense"-IL2R α -Transfektanten durch Cadmium Zugabe. "sense"-Klon 1 (s-Klon1) und "antisense"-Klon 1 (as-Klon1) wurden 3 Tage mit (+Cd) und ohne (-Cd) 10^{-6} M Cadmium inkubiert, anschließend passagiert, wieder mit und ohne 10^{-6} M Cadmium versetzt und mit 5×10^4 Zellen/ml in Mikrotiterplatten (200 μ l/Vertiefung) verteilt. Am Tag 4, 5 und 6 nach Cadmium-Zugabe wurden die Zellen mit 3.5 μ Ci/ml 3 H-Thymidin für 2 h bei 37 $^{\circ}$ C pulsmarkiert und das eingebaute 3 H-Thymidin im Szintillations-Zähler bestimmt. Die Werte sind in % von den Kontrollwerten ("sense- und antisense"-Klon ohne Cadmium, Kontrolle:-Cd) angegeben. Die Standardabweichungen (die Linien über den Symbolen) wurden aus den Werten von je 4 unabhängigen Ansätzen berechnet.

Aus diesen Wachstumsexperimenten folgt, daß die IL2R α -Kette für das Wachstum Theileria-infizierter Zellen eine essentielle Rolle spielt. Dies wurde durch weitere Beobachtungen während der Kultivierung bestätigt. Schon beim Klonieren stabiler Transfektanten hat es sich als schwierig erwiesen, "antisense"-IL2R α -Klone zu erhalten. Diese Beobachtungen weisen noch einmal auf die grundlegende Voraussetzung der IL2R α -Expression bei der autokrinen Proliferation Theileria-infizierter Lymphozyten hin.

4.2 MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation

Klasse II Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major histocompatibility complex, MHC) haben nicht nur antigenpräsentierende Aufgaben, sondern sie können selbst als signalweiterleitende Rezeptoren agieren (Cambier et al., 1987a und 1987b; St-Pierre et al., 1989; Cambier & Lehman, 1990; Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990). Dies wurde vor allem für Klasse II Antigene auf B-Zellen gezeigt. Durch Anwendung von Antikörpern, die gegen Klasse II Antigene gerichtet waren, war man in der Lage, die signaltransduzierende Funktion dieser Oberflächenmoleküle *in vitro* zu untersuchen. Die Vernetzung von Klasse II-Antigenen auf B-Zellen durch Antikörper beeinflusste die Entstehung von intrazellulären Signalketten und dadurch auch das Wachstum der Zellen (Clement et al., 1986; Vaickus et al., 1989; Cambier & Lehman, 1989).

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß auch aktivierte T-Zellen Klasse II Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren (Übersicht: Benoist & Mathis, 1990). Die physiologische Bedeutung für die T-Zellen ist noch unbekannt. Bisher wurde nur ein indirekter, wachstumshemmender Einfluß von Klasse II-Antigenen auf T-Zellen gezeigt, der im Zusammenhang mit der Aktivierung der T-Zellen durch anti-T-Zellrezeptor Antikörper in Anwesenheit von Monozyten auftrat (Ruggiero et al., 1987 und 1991).

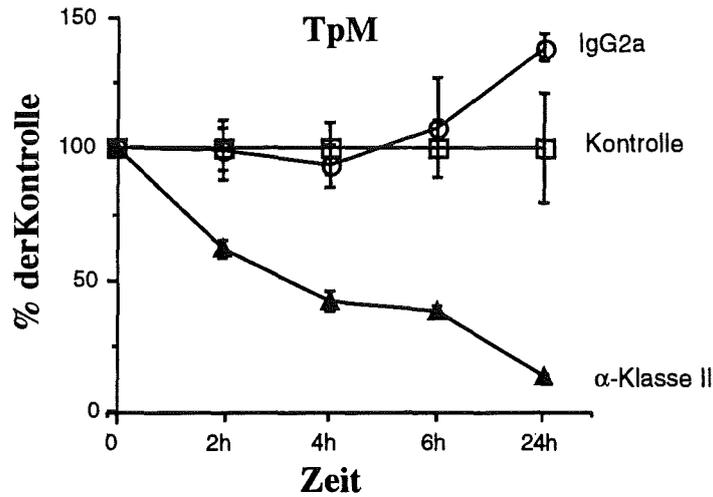
Am Modellsystem Theileria-infizierter T-Zellen sollte untersucht werden, ob Klasse II Antigene auch direkt eine proliferationsinhibierende Funktion in aktivierten, proliferierenden T-Zellen haben. Die Vorexperimente zeigten, daß anti-Klasse II Antikörper eine hemmende Wirkung auf das Wachstum Theileria-infizierter T-Zellen haben (D. Dobbelaere, persönliche Mitteilung). Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieses proliferationshemmende Klasse II-vermittelte Signal auch in nicht-infizierten Zellen auftrat. Da diese Beobachtungen auf ein neuartiges und biologisch interessantes Phänomen der Hemmung von aktivierten T-Zellen hindeuteten, wurde es im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt.

4.2.1 Bindung von anti-Klasse II Antikörpern an Klasse II Antigene führt zur Hemmung des Wachstums in T-Zellen

Im folgendem wurde ein Wachstumsexperiment durchgeführt, bei dem nach Zugabe von anti-Klasse II Antikörpern nach mehreren Zeitpunkten die DNA-Synthese gemessen wurde. Dafür wurden zunächst transformierte, permanent wachsende Theileria-infizierte T-Zelllinien, die wie aktivierte T-Zellen neben IL2 und IL2R auch eine große Anzahl an Klasse II-Antigenen exprimieren, benutzt (Coquerelle, et al., 1989; Dobbelaere, et al., 1990; Heussler, et al., 1992). Als Kontrolle für aktivierte T-Zellen dienten, die mit Con A für 4 Tage polyklonal stimulierte, primäre Lymphozyten.

Ein Teil der Zellen wurde nur mit Medium (Kontrolle), ein Teil mit Medium und anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) und ein Teil mit Medium und unspezifischen Kontrollantikörpern der selben Subklasse (IgG2a) versetzt und in Mikrotiterplatten verteilt. Nach 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert und die DNA-Synthese gemessen. Wie in Abb. 8A zu sehen ist, wurde die DNA-Synthese in permanent wachsenden Theileria-infizierten T-Zellen schon innerhalb von 4 Stunden um fast 50% im Vergleich zum Kontrollansatz reduziert. Die maximale Inhibition der DNA-Synthese von 70% bis über 90% ist nach 24 Stunden erreicht. Auch die DNA-Synthese der primären ConA-stimulierten Lymphozyten (~80-90% T-Zellen, der Rest besteht aus B-Zellen und Makrophagen) wurde durch die Zugabe von anti-Klasse II Antikörpern inhibiert (Abb. 8B). Hier kam der hemmende Effekt nicht so schnell zum Ausdruck, da die Verdopplungszeit (Dauer des Zellzyklus) ConA-stimulierter Lymphozyten (ca. 40 h) im Vergleich zu transformierten, permanent wachsenden Theileria-infizierten Lymphozyten (ca. 20 h) länger ist.

A



B

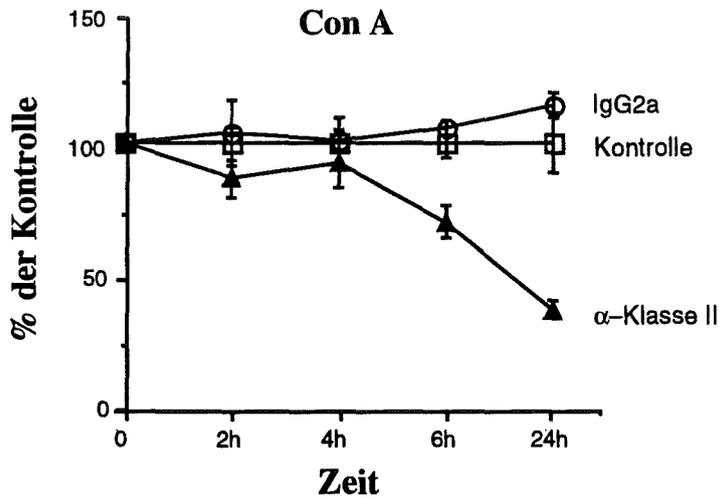


Abb 8: Die Kinetik der DNA-Synthese-Hemmung in anti-Klasse II-behandelten T-Zellen. (A) Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803], 5×10^4 Zellen/ml) und (B) ConA-stimulierte, nicht-infizierte Rinderlymphozyten (4 Tage mit $5 \mu\text{g/ml}$ ConA stimuliert, 5×10^5 Zellen/ml) wurden mit Medium (Kontrolle), $9 \mu\text{g/ml}$ anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder $9 \mu\text{g/ml}$ Kontrollantikörpern (IgG2a) gemischt und in Mikrotiterplatten ($200 \mu\text{l/Vertiefung}$) verteilt. Nach 2, 4, 6, und 24 h wurden die Zellen mit $3.5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin für 2 h bei 37°C pulsmarkiert und das eingebaute ^3H -Thymidin im Szintillations-Zähler bestimmt. Die Werte sind in % von den Kontrollwerten angegeben. Die Standardabweichungen (die Linien über den Symbolen) wurden aus den Werten von je 4 unabhängigen Ansätzen berechnet.

4.2.2 Der wachstumshemmende Effekt der anti-Klasse II Antikörper beruht nicht auf Toxizität und er ist reversibel

Da die Behandlung der T-Zellen mit anti-Klasse II Antikörpern zu einer sehr schnellen Hemmung der DNA-Synthese führte, mußte zunächst ausgeschlossen werden, daß diese Inhibition auf eine Schädigung der Zellen beruhte.

Dafür wurde die Anzahl toter Zellen in anti-Klasse II-behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen mit Medium bzw. Kontrollantikörpern bestimmt. Mit Hilfe von Trypan Blau, das sehr schnell durch die Zellmembran toter Zellen eindringt, konnte nach 24 Stunden Inkubation mit Antikörpern kein Unterschied im prozentualen Anteil toter Zellen (5-10%) zwischen den einzelnen Ansätzen festgestellt werden. Weiterhin zeigten anti-Klasse II Antikörper keinen wachstumshemmenden Einfluß auf andere Zelllinien, die keine MHC-Klasse II Moleküle besitzen wie z.B. HeLa Tk-, HL-60, eine Hybridoma-Zelllinie der Maus (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eine unspezifische Zelltoxizität der anti-Klasse II Antikörper ausgeschlossen werden. Die Spezifität der Signale, welche über Klasse II-vermittelt werden, zeigt Abb. 9A. Hierfür wurden MHC-Klasse II-positive Theileria-infizierte B-Zellen mit anti-Klasse II Antikörpern behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten die DNA-Synthese gemessen. Dieses Experiment wurde parallel mit dem Experiment, das in Abb. 8 gezeigt wurde, durchgeführt.

Ein weiteres Merkmal der anti-Klasse II Antikörper-Inhibition ist die Reversibilität der wachstumshemmenden Wirkung (Abb. 9B). Nach 24 Stunden Behandlung der Theileria-infizierten T-Zellen (TpM[803]) mit anti-Klasse II Antikörpern, wurden die Zellen zweimal mit warmem Medium gewaschen und für weitere 3 Tage kultiviert. Die DNA-Synthese der Zellen wurde durch ³H-Thymidin-Inkorporation verfolgt. Wie man in Abb. 9B erkennen kann, wurde die Hemmung durch anti-Klasse II Antikörper nach dem Auswaschen der Antikörper aufgehoben. Die verbleibende Hemmung am Tag 3 und 4 beruhte vermutlich auf eine Restmenge an Antikörpern, die durch das Waschen nicht vollkommen entfernt werden konnte.

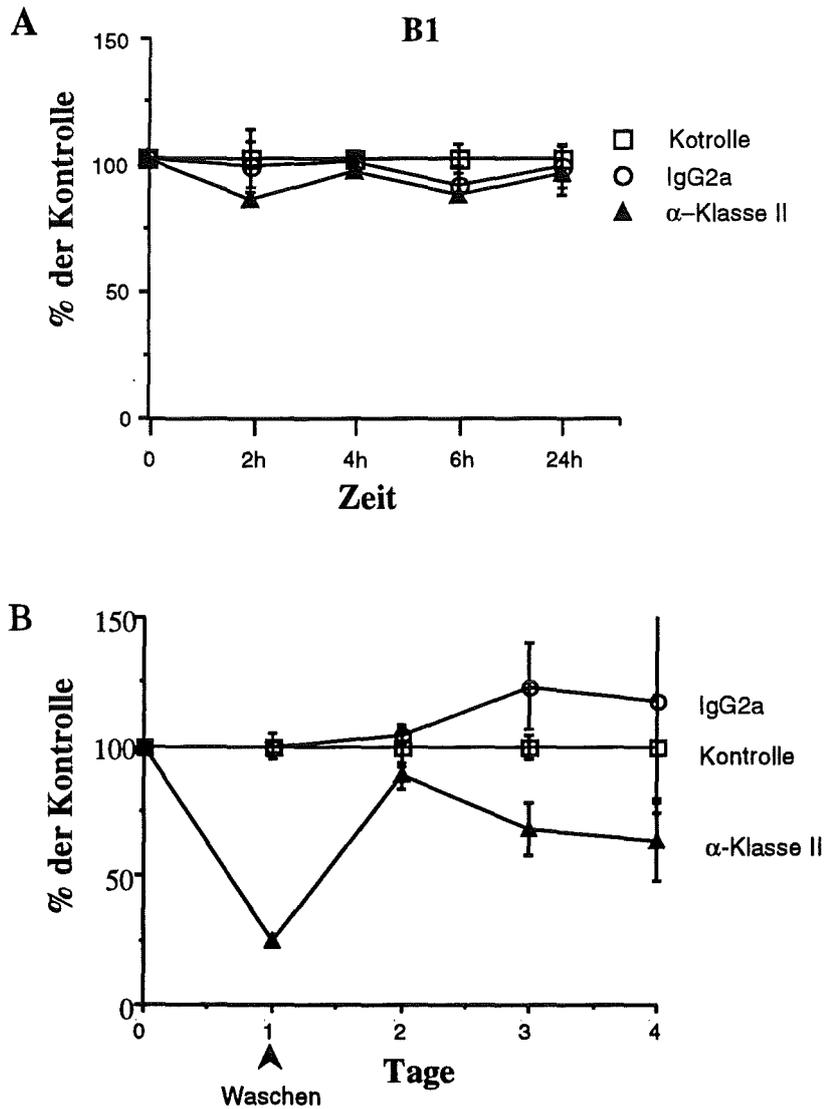


Abb. 9: Anti-Klasse II Antikörper sind nicht toxisch und ihr wachstumshemmender Effekt in T-Zellen ist reversibel. (A) Theileria-infizierte B1-Zellen (5×10^4 Zellen/ml) wurden wie in Abb. 8 beschrieben mit Medium (Kontrolle), anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder Kontrollantikörpern (IgG2a) behandelt und nach 2, 4, 6, und 24 h mit $3.5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin für 2 h bei 37°C pulsmarkiert. Die eingebaute Radioaktivität wurde im Szintillations-Zähler gemessen. **(B)** Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803], 5×10^4 Zellen/ml) wurden für 24 h mit Medium (Kontrolle), anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder Kontrollantikörpern (IgG2a) behandelt, anschließend zweimal mit warmem cL15-Medium gewaschen, in Mikrotiterplatten verteilt und für weitere 3 Tage kultiviert. Jeden Tag wurde der ^3H -Thymidin-Einbau gemessen. Die Standardabweichungen (die Linien über den Symbolen) wurden aus den Werten von je 4 unabhängigen Ansätzen berechnet.

4.2.3 Exogene Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 kann den wachstumshemmenden Effekt von anti-Klasse II Antikörpern nicht aufheben

Die infizierten TpM[803] T-Zellen exprimieren konstitutiv den Wachstumsfaktor IL2 und funktionelle IL2 Rezeptoren und zeigen ein verstärktes Wachstum nach Zugabe von exogenem IL2. Ruggiero (Ruggiero et al., 1987 und 1991) und Racioppi (Racioppi et al., 1990) zeigten, daß nach anti-Klasse II Behandlung CD3-stimulierter T-Zellen die IL2 Expression sowohl auf der mRNA-Ebene, als auch auf der Proteinebene (keine IL2 Aktivität im Mediumüberstand messbar) stark reduziert wird.

Im folgenden wurde deshalb untersucht, ob die wachstumshemmenden Signale von MHC-Klasse II Molekülen durch die Zugabe des Wachstumsfaktors IL2 aufgehoben werden können. Dazu wurde die DNA-Synthese in Theileria-infizierten T-Zellen nach Behandlung mit anti-Klasse II Antikörpern und exogener IL2 Zugabe gemessen.

Theileria-infizierte T-Zellen wurden nur mit Medium oder mit Medium und anti-Klasse II Antikörpern oder mit Medium und Kontrollantikörpern (IgG2a) mit und ohne 10 U/ml IL2 behandelt. Nach 24 h wurde die DNA-Synthese gemessen. Abb. 10A zeigt, daß die Zellen, die mit Medium oder Kontrollantikörpern inkubiert wurden, annähernd die gleiche Menge an ³H-Thymidin eingebaut hatten. Das zugegebene IL2 führte in allen Ansätzen zur um ca. 30% erhöhten ³H-Thymidin-Inkorporation im Vergleich zu Kontrollen ohne IL2. Die Hemmung der DNA-Synthese in Zellen, die mit anti-Klasse II-behandelt wurden, konnte hingegen durch die IL2 Zugabe nicht auf die Werte der Kontrollzellen angehoben werden.

Auch Theileria-infizierte T-Zellen, die vom Parasiten mit Hilfe des Naphtochinonderivates BW 720C 4 Tage kuriert wurden, zeigten 24 h nach anti-Klasse II Zugabe eine starke Inhibition der DNA-Synthese. Exogenes IL2 konnte auch hier die Hemmung der DNA-Synthese nicht auf die Werte der Kontrollzellen erhöhen (Abb. 10B). Dieses Ergebnis zeigt noch einmal, daß die wachstumshemmenden Effekte der anti-Klasse II Antikörper nicht nur auf die infizierten T-Zellen beschränkt sind.

Somit läßt sich ein spezifischer MHC-Klasse II induzierter Signalweg von dem über IL2/IL2R-laufenden experimentell trennen. MHC-Klasse II vermittelt einen eigenen Beitrag zur Wachstumskontrolle.

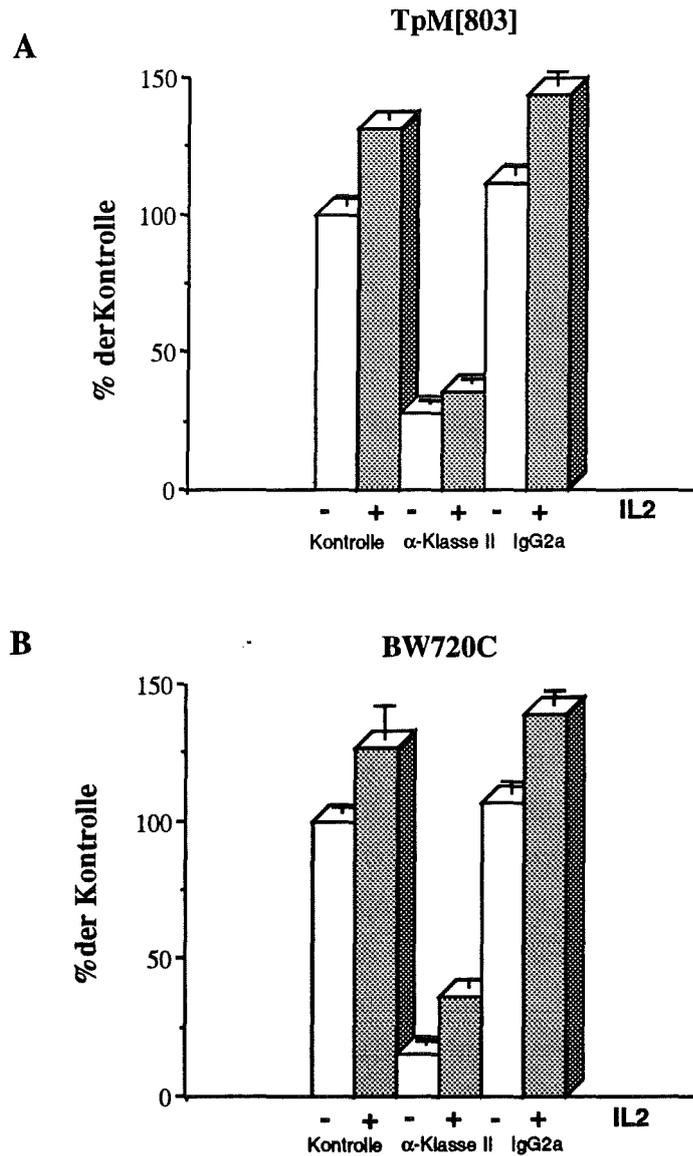


Abb. 10: Exogenes IL2 kann die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung nicht aufheben. (A) Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803], 5×10^4 Zellen/ml) und (B) BW 720C kurierte T-Zellen (4 Tage mit 50 ng/ml BW 720C behandelt, 5×10^5 Zellen/ml) wurden für 24 h mit Medium (Kontrolle), 9 μ g/ml anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder 9 μ g/ml Kontrollantikörpern (IgG2a) mit (+) und ohne (-) rekombinantes menschliches IL2 (10U/ml) inkubiert. Die Zellen wurden mit 3.5 μ Ci/ml 3 H-Thymidin für 2 h bei 37 $^{\circ}$ C pulsmarkiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillations-Zähler gemessen. Die Werte (aus 4 unabhängigen Ansätzen) sind in Prozent von Kontrollwerten angegeben. Die Linien über den Balken geben jeweils die Standardabweichung pro Versuchsansatz an.

4.2.4 An der Wachstumshemmung durch die MHC-Klasse II Moleküle sind andere Oberflächenproteine indirekt beteiligt

Bei der Entstehung einer Signaltransduktion in Lymphozyten wirken meistens zwei oder mehr Oberflächenproteine zusammen. Dies wurde am intensivsten am Beispiel des T-Zellrezeptor-Komplexes untersucht. Um z.B. ein effizientes, stimulierendes Signal zu generieren, müssen mindestens drei verschiedene Oberflächenmoleküle miteinander in räumlicher Nähe interagieren. Dazu gehören in diesem Fall neben dem T-Zellrezeptor-Komplex ($T\alpha\beta/CD3$) auch die CD4- und die CD45-Oberflächenmoleküle und weitere Adhäsionsmoleküle (Owens et al., 1987, Schraven et al., 1990).

Während der Untersuchung der wachstumshemmenden Effekte der anti-Klasse II Antikörper wurde festgestellt, daß die Höhe der DNA-Synthese-Inhibition von der Zelldichte abhängt (Tab. 2). Da sich die Hemmung mit steigender Zelldichte erhöhte, lag die Vermutung nahe, daß entweder sezernierte Faktoren oder andere Oberflächenproteine für diesen Effekt verantwortlich sein könnten. Dazu wurden Theileria-infizierte T-Zellen mit verschiedenen Zelldichten (5 000-100 000 Zellen/ml) mit bestrahlten und fixierten Theileria-infizierte T-Zellen ("Filler cells") gemischt und auf gleiche Endkonzentration von 600 000 Zellen/ml gebracht. Die Fixierung der "Filler cells" schloß die Möglichkeit der Sekretion von löslichen Faktoren aus (Dobbelaere et al., 1991). Durch Zugabe dieser "Filler cells" zu den lebenden Zellen, wurde die Menge an vorhandenen Oberflächenmolekülen "künstlich" erhöht. Anschließend wurden anti-Klasse II Antikörper dazugegeben und die DNA-Synthese 24 h später gemessen. Als Kontrolle für den Effekt der erhöhten Zellkonzentration auf die Klasse II Hemmung wurden die lebenden Zellen mit entsprechenden Zelldichten ohne "Filler cells" nach Behandlung mit anti-Klasse II Antikörpern verwendet.

In Tabelle 2 sind die Werte des 3H -Thymidin-Einbaus nach Behandlung mit anti-Klasse II Antikörpern in % der Werte der mit Kontrollantikörpern behandelten Zellen aufgeführt. In dem Experiment ohne "Filler cells" beträgt die Wachstumsinhibition im Ansatz mit niedrigster Zelldichte (5 000/ml) nur 30%. Mit steigender Zelldichte steigt die Hemmung durch Klasse II Antigene von 30% auf 80%. Nach "künstlicher" Erhöhung der Intensität des interzellulären Kontaktes durch "Filler cells", konnte die Hemmung durch Klasse II Antigene auch im Ansatz mit niedriger Zelldichte (5 000/ml) auf 70% erhöht werden.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß neben den MHC-Klasse II-Antigenen noch andere Oberflächenmoleküle an dem wachstumshemmenden Einfluß beteiligt sind. Weiterhin kann mit

großer Wahrscheinlichkeit die Beteiligung eines sezernierten Faktors ausgeschlossen werden, da die Verstärkung der Wachstumshemmung in Ansätzen mit niedriger Zelldichte in Anwesenheit von bestrahlten und fixierten Zellen auftrat.

| lebende Zellen/ml | 5000 | 10 000 | 50 000 | 100 000 |
|--|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| ohne "Filler cells" | 30 (± 19) | 51 (± 6.4) | 76 (± 1) | 80 (± 0.6) |
| mit "Filler cells" 6×10^5 Zellen | 70 (± 4.5) | 71 (± 3.65) | 76 (± 2.1) | 75 (± 3) |

Tabelle 2: Die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung ist von der Anwesenheit zusätzlicher Oberflächenmoleküle abhängig. Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803]) wurden mit 5000, 10000, 50000 und 100000 Zellen/ ml mit Medium, $9 \mu\text{g/ml}$ anti-Klasse II Antikörpern oder $9 \mu\text{g/ml}$ Kontrollantikörpern mit oder ohne "Filler cells" angesetzt. Die "Filler cells" wurden durch γ -Bestrahlung (5000 rad) und Glutaraldehyd-Fixierung Theileria-infizierter T-Zellen (TpM[803]) erhalten und den lebenden Zellen in der Menge dazugegeben, daß die Endkonzentration in allen Ansätzen mit "Filler cells" 600000 Zellen/ml betrug. Nach 24 h wurden die Zellen mit $3.5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin für 2 h bei 37°C pulsmarkiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillations-Zähler gemessen. Die Werte sind in Prozent Hemmung der DNA-Synthese in Klasse II-behandelten T-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen angegeben. Die Standardabweichung (Werte in Klammern) wurde aus drei unabhängigen Kulturen berechnet.

Für die Untersuchung der Bedeutung anderer Oberflächenmoleküle für die proliferationshemmende Wirkung der MHC-Klasse II Antigene standen monoklonale Antikörper, die gegen die Rinderoberflächenproteine CD2 und CD45 gerichtet waren, zur Verfügung. Für diese beide Moleküle wurde gezeigt, daß sie neben einer proliferationsstimulierenden auch eine proliferationshemmende Signalweiterleitung haben können (Ledbetter et al., 1988; Meuer & Resch, 1989; Kiener & Mittler, 1989; Ohno et al., 1991).

Theileria-infizierte-T-Zellen wurden zunächst mit anti-CD2 oder anti-CD45 Antikörpern für 10 min bei 37°C vorbehandelt und anschließend wurden anti-Klasse II Antikörper dazugegeben. Die Bindung der hier verwendeten anti-CD2/CD45 Antikörper an die entsprechenden Oberflächenmoleküle hatte keinen Einfluß auf den wachstumshemmenden Effekt der anti-Klasse II Antikörper (Daten nicht gezeigt). Ob diese beiden Moleküle eine Rolle bei der von Klasse II-vermittelten Signalen spielen, kann aus diesen Ergebnissen nicht eindeutig bestimmt werden, da manche Antikörper zwar an ihren Liganden binden, dabei aber keine biologische Wirkung ausüben.

4.2.5 MHC-Klasse II-vermittelte wachstumshemmende Signale interagieren nicht mit den für die frühe T-Zellaktivierung typischen Moleküle, NF-κB, AP1, *c-myc*, IL2 und IL2R

Eines der frühen Ereignisse bei der T-Zellaktivierung ist die Expression und Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. *c-fos* und NF-κB, die wiederum an der Regulation von anderen frühen Genen wie z.B. IL2 und IL2R beteiligt sind (Ullman et al., 1990). Da Ruggiero (Ruggiero et al., 1987 und 1990) vorgeschlagen hat, daß anti-Klasse II Antikörper eine Verminderung der IL2 und IL2R Expression verursachen, wurde der mögliche Einfluß Klasse II-vermittelter Signale zunächst auf die regulatorischen Transkriptionsfaktoren, NF-κB und AP1 (*c-fos/c-jun* Komplex), die im Kern Theileria-infizierter T-Zellen permanent aktiviert vorliegen (Ivanov et al., 1989; Baumann et al., 1991), untersucht.

Dafür wurden Kernproteine aus Theileria-infizierten T-Zellen, die nur mit Medium oder mit Medium und anti-Klasse II Antikörpern oder mit Medium und Kontrollantikörpern (IgG2a) für 24 h behandelt wurden, extrahiert. Anschließend wurde in Gelretardations-Analysen die in vitro Bindungsfähigkeit des NF-κB-Proteinkomplexes an synthetische Oligonukleotide untersucht. Hierzu wurden radioaktiv-markierte Oligonukleotide, die die NF-κB-Erkennungssequenzen aus dem HIV-LTR besitzen, benutzt. Während der Inkubation der radioaktiven NF-κB-Oligonukleotide mit den Kernextrakten binden die Transkriptionsfaktoren an die Oligonukleotide und bewirken dadurch, daß diese Oligonukleotid-Protein-Komplexe bei der Elektrophorese auf einem nativen Gel langsamer als die freien Oligonukleotide wandern.

In den Kernextrakten aus mit Antikörpern gegen Klasse II behandelten Zellen wurde nach 24 h keine signifikante Abnahme an aktivierten NF- κ B-Molekülen im Vergleich zu den Kontrollansätzen festgestellt. (Abb. 11A).

Um zu testen, ob diese in Gelretardations-Analysen *in vitro* bindenden NF κ B Moleküle auch biologisch funktionell sind, wurden CAT-Analysen durchgeführt. Dabei wurden *Theileria*-infizierte T-Zellen transient mit dem Vektor -121/+232 HIV-CAT, der im Promotorbereich zwei fast identische Kopien eines NF κ B-Sequenzmotivs enthält, transfiziert.

In der Zeit als die DNA-Synthese-Hemmung ihr Maximum (nach 24 h) erreichte, konnten in anti-Klasse II-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen keine Unterschiede in der CAT-Aktivität beobachtet werden. (Abb.11C). In einigen Experimenten trat nach 48 h eine geringe Reduktion der CAT-Aktivität auf.

Auch für einen anderen nach der T-Zellaktivierung früh induzierten Transkriptionsfaktor, AP1, der ein Multiprotein-Komplex aus den Produkten zweier Proto-Onkogenen (*c-fos* und *c-jun*) bildet, konnten in Gelretardations-Analysen keine quantitative (Abb. 11B) oder qualitative Unterschiede in anti-Klasse II-behandelten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Expression des Wachstumsfaktors IL2, seines Rezeptors (IL2R) und eines weiteren Proto-Onkogens, *c-myc*, ergab keine Unterschiede in den anti-Klasse II-behandelten *Theileria*-infizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Eichhorn et al., 1992). Abb. 12. zeigt eine "Northern Blot"-Analyse, bei der die RNA Menge des IL-2R α , *c-myc* und Aktin Gens nach 24 h Behandlung mit Medium, anti-Klasse II und Kontrollantikörpern bestimmt wurde.

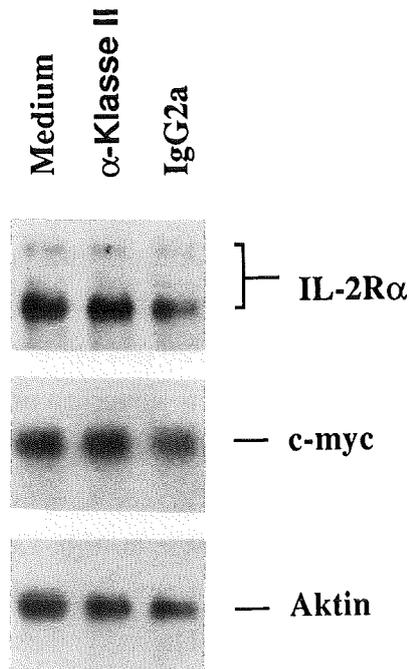


Abb. 12: Die IL-2R α - und c-myc-Transkriptmenge wird in Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen nicht beeinflusst ("Northern-Blot"-Analyse). Je 4 μg polyA⁺ RNA aus Theileria-infizierten T-Zellen (TpM[803]), die für 24 h mit Medium, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kontrollantikörpern (IgG2a) behandelt waren, wurden auf ein 1.4 % Agarose-Gel aufgetrennt und auf ein Nylon-Filter transferiert. Der Filter wurde mit radioaktiv markierten DNA-Sonden für das Rinder IL-2R α -Gen, c-myc-Gen und als Kontrolle für die aufgetragene RNA-Menge mit dem Rinder Aktin-Gen hybridisiert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Klasse II-vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation nicht über eine negative Interaktion mit den Signalwegen, die bei der T-Zellaktivierung erfolgen, verläuft.

4.2.6 Extrazelluläres Calcium und Serin/Threonin-Kinasen sind an der Klasse II-vermittelten DNA-Synthese-Hemmung nicht beteiligt.

In T-Zellen resultieren die MHC-Klasse II-vermittelten Signale in Mobilisierung von Calcium-Ionen, Änderungen im Tyrosin-Phosphorylierungsmuster und in Aktivierung der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase C (Ødum et al., 1991). Eine der Konsequenzen der Interaktion zwischen anti-Klasse II Antikörpern und MHC-Klasse II-Antigenen ist die Aktivierung eines Lymphozyten-Adhäsionsmoleküls (LFA-1, "lymphocyte function associated antigen-1"), das durch die Bindung an seinen Liganden ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") zur verstärkten Aggregation der Lymphozyten führt (Mourad et al., 1990). Das Adhäsionsmolekül LFA-1 wird über die Phosphorylierung seiner β -Kette durch die aktivierte Proteinkinase C (PKC) in Anwesenheit von Calcium und Magnesium im Medium aktiviert (Figdor et al., 1990; Valmu et al., 1991).

Die Behandlung mit anti-Klasse II Antikörpern induzierte eine ausgeprägte Aggregation bei Theileria-infizierter T-Zellen (Abb. 13A). Nun soll untersucht werden, ob die von MHC-Klasse II vermittelte Aktivierung der PKC und der damit verbundenen verstärkten Aggregation durch LFA-1 Moleküle im wachstumshemmenden Effekt involviert ist.

Dazu wurde ein Proteinkinase C-Inhibitor, H7, und ein Chelatbildner, EGTA, eingesetzt, um zu erforschen, ob diese Hemmer der PKC und extrazellulärer bivalenter Kationen mit der Klasse II-vermittelten Hemmung und Aggregation interagieren. Für dieses Experiment wurden Theileria-infizierte T-Zellen 10 min vor anti-Klasse II Antikörper Zugabe mit 20 μ M H7 bzw. 10 mM EGTA vorinkubiert. Nach 24 h wurde die 3 H-Thymidin-Inkorporation gemessen und der Aggregationszustand der Zellen wurde mit einem Lichtmikroskop beobachtet. Die Kontrollansätze sind hier die Zellen, die mit den Kontrollantikörpern (IgG2a) und den entsprechenden Inhibitoren (H7/EGTA) oder Medium behandelt worden sind. Wie in Abb. 13A zu erkennen, verhindern diese zwei Agentien zwar die starke Aggregation in anti-Klasse II-behandelten Zellen, beeinflussen aber dabei nicht die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung (Abb. 13B).

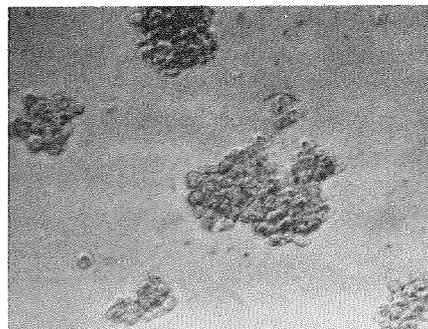
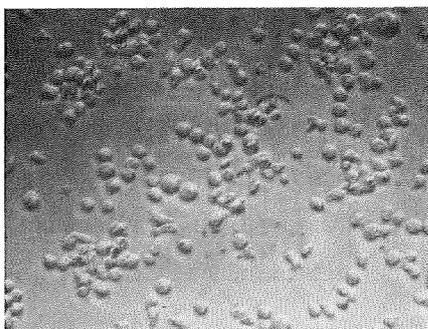
Die Aggregation der Zellen erfolgte schon 1.5 bis 2 Stunden nach anti-Klasse II Antikörper Zugabe. Der hemmende Einfluß von H7 bzw. EGTA auf die Aggregation konnte auch nach dieser kurzen Zeit beobachtet werden. Dies zeigt die schnelle Wirksamkeit dieser Substanzen auf die durch Klasse II-ausgelösten Signale.

A

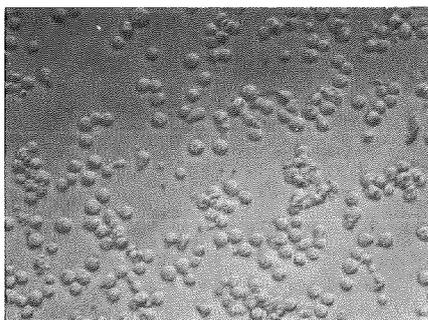
IgG2a

 α -Klasse II

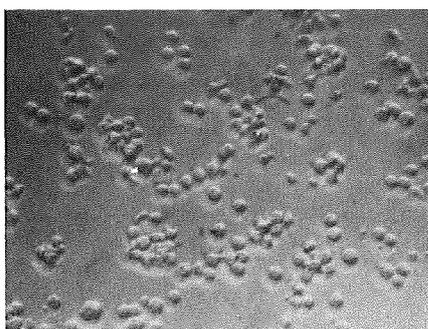
Kontrolle



H7



EGTA



B

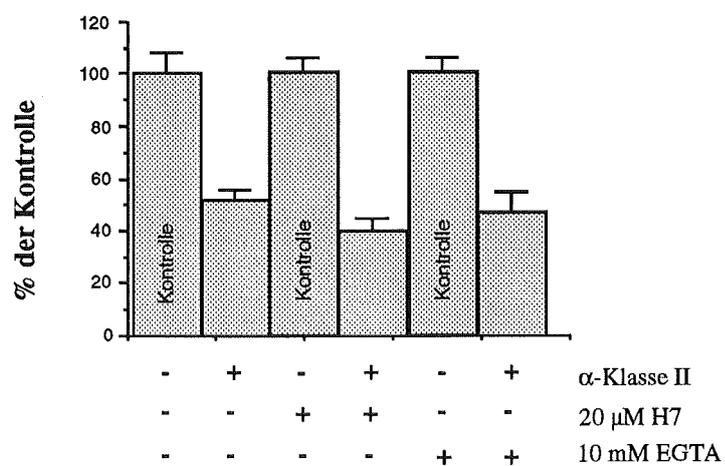


Abb. 13: H7 und EGTA verhindern die Aggregation, nicht aber die DNA-Synthese-Hemmung in Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen. (A) Theileria-infizierten T-Zellen ($TpM[803]$, 1×10^5 Zellen/ml) wurde 20 μ M H7 bzw. 10 mM EGTA zugegeben, anschließend wurden sie für 24 h mit Medium, 9 μ g/ml anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder 9 μ g/ml Kontrollantikörpern (IgG2a) behandelt und photographiert (Vergrößerung 125-fach). (B) Die Zellen wurden wie unter (A) behandelt und nach 24 h mit 3.5 μ Ci/ml 3 H-Thymidin für 2 h bei 37° C pulsmarkiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillations-Zähler gemessen. Die Werte (aus 4 unabhängigen Ansätzen) sind in Prozent von Kontrollwerten angegeben. Die Linien über den Balken geben jeweils die Standardabweichung pro Versuchsansatz an.

Da die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung weder durch H7 noch EGTA beeinflusst wurde, wurde die Beteiligung eines anderen Signalweges, der unabhängig von PKC und extrazellulärem Calcium ist, vermutet.

4.2.7 Intrazelluläres Calcium und Tyrosinkinase sind an der Klasse II-vermittelten DNA-Synthese-Hemmung beteiligt

Ødum et al., 1991, haben gezeigt, daß in anti-Klasse II-behandelten T-Zellen neben einer verstärkten Aktivierung von Tyrosinkinase auch eine Mobilisierung der intrazellulären Konzentration an Calcium stattfindet. Welche Auswirkungen diese Veränderung für das Wachstum Klasse II-behandelter T-Zellen hat, wurde im folgenden untersucht.

Um die Bedeutung von Tyrosinkinase für die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung näher zu untersuchen, wurde die Funktion der Tyrosinkinase durch Anwendung von verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren (Herbimycin A, Genistein) blockiert. Anschließend wurden anti-Klasse II Antikörper dazugegeben und die DNA-Synthese gemessen. Im folgenden werden exemplarisch nur die Ergebnisse, die mit Herbimycin A erhalten wurden beschrieben. Theileria-infizierte T-Zellen wurden über Nacht mit 1μ M Herbimycin A vorbehandelt, mit dem Medium gewaschen und dann in Gegenwart von Medium, anti-Klasse II Antikörpern oder Kontrollantikörpern mit verschiedenen Konzentrationen an Herbimycin A (0.1- 1μ M) für weitere 24 h kultiviert.

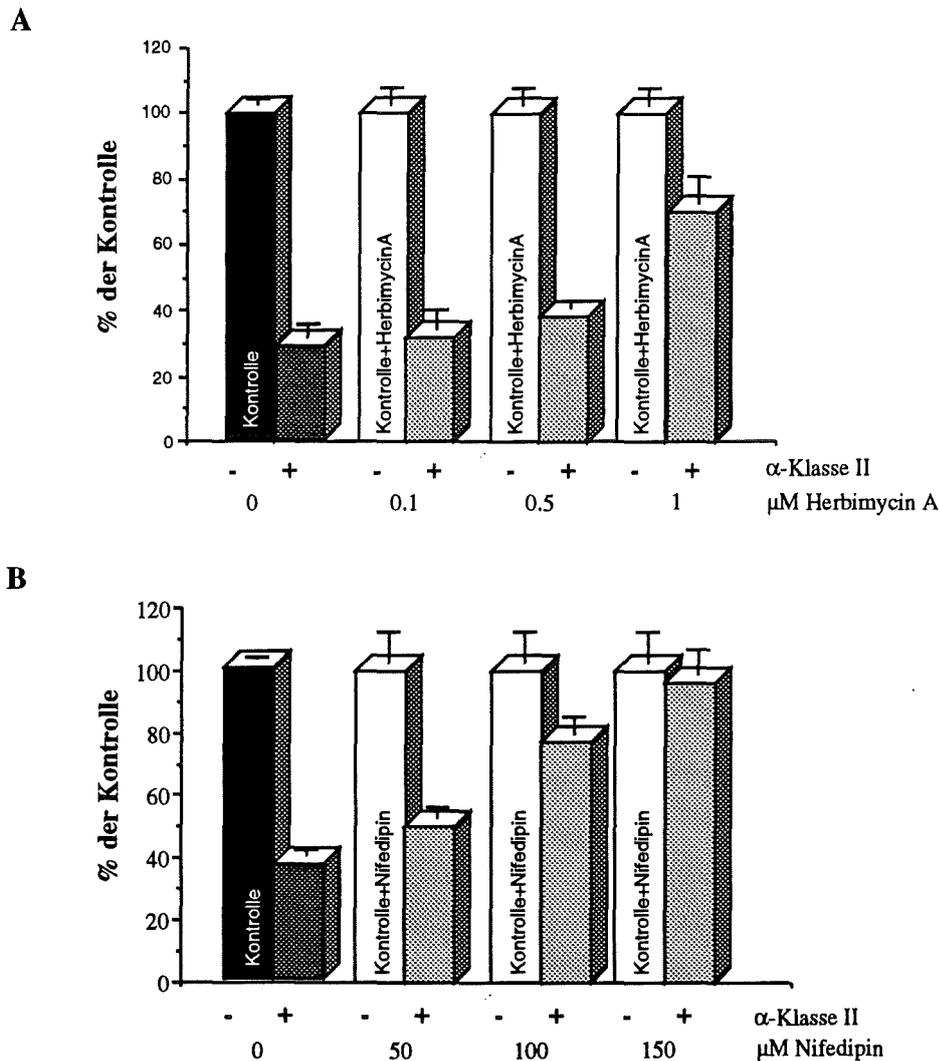


Abb. 14: Herbimycin A und Nifedipin heben die DNA-Synthese-Hemmung in Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen auf. (A) Theileria-infizierte T-Zellen (TpM[803], 1×10^5 Zellen/ml) wurden für 24 h mit 1 μM Herbimycin A vorbehandelt, gewaschen und mit 0,1, 0,5 1 μM Herbimycin A versetzt und für weitere 24 h mit Medium (Kontrolle), 9 $\mu\text{g/ml}$ anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder 9 $\mu\text{g/ml}$ Kontrollantikörpern (IgG2a) inkubiert. Die Zellen wurden mit 3,5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin für 2 h bei 37°C pulsmarkiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillations-Zähler gemessen. Die Werte (aus 4 unabhängigen Ansätzen) sind in Prozent von Kontrollwerten angegeben. Die Linien über den Balken geben jeweils die Standardabweichung pro Versuchsansatz an. **(B)** Theileria-infizierten T-Zellen (TpM[803], 1×10^5 Zellen/ml) wurde 50, 100, 150 μM Nifedipin zugegeben und sie wurden für 24 h mit Medium (Kontrolle), anti-Klasse II Antikörpern (α -Klasse II) oder Kontrollantikörpern (IgG2a) inkubiert. Die DNA-Synthese Messung erfolgte wie in Teil (A) beschrieben.

Abb. 14A zeigt, daß mit steigenden Mengen an Herbimycin A die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung teilweise aufgehoben wird. Die verwendeten Konzentrationen an Herbimycin A zeigten nur einen geringen Einfluß auf die DNA-Synthese Rate in den Kontrollzellen. Weiterhin wurde die Klasse II-vermittelte Aggregation der T-Zellen durch die Tyrosinkinasehemmer nicht verhindert (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse mit Serin/Threoninkinase-Inhibitoren, die im vorherigen Kapitel beschrieben wurden, zeigen, daß die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase, PKC, an der verstärkten Adhäsion der Zellen und nicht am wachstumshemmenden Effekt beteiligt ist.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß die Tyrosinphosphorylierung eine Rolle bei der Klasse II-vermittelten Hemmung spielen könnte, zeigt die Anwendung von einem Tyrosinphosphatase-Inhibitor (Natriumorthovanadat, 15 μM) in Wachstumsexperimenten. Die *in vivo* Wirkung von Natriumorthovanadat wurde in der Arbeit von Beckwith (Beckwith et al., 1991) gezeigt. Das Natriumorthovanadat, das die Abspaltung der Tyrosinphosphat-Reste in anti-Klasse II-behandelten T-Zellen verhindern sollte, führte zur Verstärkung der DNA-Synthese-Hemmung in diesen Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Kontrollzellen wurden durch das Natriumorthovanadat in ihrer DNA-Synthese nur unwesentlich beeinflusst.

Um die Rolle des intrazellulären Calciums für die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung näher zu untersuchen, wurde der Einfluß eines Calciumkanal-Inhibitors getestet. Durch Zugabe von verschiedenen Mengen eines organischen Calciumkanal-Blockers (Nifedipin, 50-150 μM) zu Theileria-infizierten T-Zellen, die mit Medium, anti-Klasse II Antikörpern oder Kontrollantikörpern behandelt wurden, sollte die zusätzliche Mobilisierung des intrazellulären Calcium in Klasse II-behandelten Zellen gehemmt werden. Der Effekt der Blockade der Calciumfreisetzung wurde auf die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung getestet.

Abb. 14B zeigt, daß mit steigenden Nifedipin-Konzentrationen die Klasse II-vermittelte Hemmung der ^3H -Thymidin-Inkorporation vollständig aufgehoben werden konnte. Allerdings muß erwähnt werden, daß die Anwendung von Nifedipin, vor allem in höheren Konzentrationen, zur einen allgemeinen Reduktion der DNA-Synthese führte. Die Werte der ^3H -Thymidin-Inkorporation in den Experimenten waren aber immer so hoch, daß signifikante Unterschiede gut meßbar waren.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von Tyrosinkinasen und intrazellulärem Calcium an der MHC-Klasse II-vermittelten DNA-Synthese-Hemmung hin.

5 DISKUSSION

5.1 IL2 und IL2R sind für das autokrine Wachstum Theileria-infizierter T-Zellen von Bedeutung

Mit *Theileria parva* infizierte Lymphozyten wachsen unbegrenzt als transformierte, lymphoblastoide Zelllinien. Diese Proliferation wird durch die Anwesenheit des Parasiten im Zytoplasma der Wirtszelle aufrechterhalten (Dobbelaere et al., 1988). Nach erfolgter Infektion werden die T-Zellen unabhängig von der Zugabe exogener Wachstumsfaktoren (Brown et al., 1986). Experimente mit stark verdünnten *Theileria*-infizierten Zellkulturen, bei denen die Wachstumsrate durch Zugabe von rekombinanten IL2 auf normales Niveau erhöht wird, zeigen, daß diese Zellen in ihrer Proliferation von der Sekretion endogener Wachstumsfaktoren abhängig sind (Dobbelaere et al., 1988). Weiterhin können Mediumüberstände *Theileria*-infizierter Zellen die DNA-Synthese sowohl von nicht-infizierten, IL2-abhängigen T-Zellen (Brown et al., 1986) als auch von stark verdünnten *Theileria*-infizierten Zellen stimulieren (Dobbelaere et al., 1991). Heussler et al. (1992) konnte in neueren Untersuchungen nachweisen, daß in *Theileria*-infizierten Zellen das IL2-Gen transkribiert wird. Diese Ergebnisse sowie die Beobachtung, daß *Theileria*-infizierte Zellen biologisch funktionelle IL2R an ihrer Oberfläche exprimieren (Coquerelle et al., 1989; Dobbelaere et al., 1990), bestärkte die Vermutung eines autokrinen Wachstums *Theileria*-infizierter Zellen.

Für ein besseres Verständnis des Mechanismus der durch Parasiten induzierten Transformation, war es wichtig festzustellen, ob IL2 und IL2R eine notwendige Voraussetzung für das permanente Wachstum sind. Dieser Fragestellung wurde im ersten Teil dieser Arbeit nachgegangen.

Theileria-infizierte T-Zellen brauchen IL2 für ihr Wachstum

Die Bedeutung von IL2 für die Proliferation *Theileria*-infizierter Zellen wird durch die Hemmung der Funktion des Wachstumsfaktors durch anti-IL2 Antikörper deutlich (Tabelle 1, Dobbelaere et al., 1991). Die Behandlung *Theileria*-infizierter T-Zellen mit anti-IL2 Antikörpern führte zur signifikanten Inhibition des Wachstums. Es wurde allerdings keine vollständige Hemmung der DNA-Synthese weder in *Theileria*-infizierten Zellen TpM[803] noch in nicht-infizierten IL2-abhängigen und ConA-stimulierten Lymphozyten erhalten. Dies läßt sich auf

verschiedene Weise erklären. Zum einen ist die Affinität der Antikörper für IL2 viel geringer als die Affinität des IL2 für seinen Rezeptor (Smith, 1988a). Zum anderen wäre es möglich, daß eine gewisse Anzahl von IL2 Molekülen intrazellulär an den IL2 Rezeptor gebunden werden, bevor dieser die Zelloberfläche erreicht, was von Browder et al. (1989) bereits für den Wachstumsfaktor IL-3 gezeigt wurde. Schließlich könnten an der Proliferation Theileria-infizierter Zellen außer IL2 noch andere, bisher noch nicht identifizierte Wachstumsfaktoren beteiligt sein.

Theileria-infizierte T-Zellen brauchen für ihr Wachstum einen IL2R von hoher Affinität

Das Zellzyklus-Progressionssignal durch IL2 erfordert in normalen, aktivierten T-Zellen die Bindung an den "high affinity" IL2R sowie die Internalisierung des IL2/IL2R-Komplexes (Übersicht: Smith, 1988b). Der "high affinity" IL2R besteht aus mindestens zwei nicht kovalent gebundenen Proteinketten (Übersicht: Waldman, 1989), einer 55 kD großen α -Kette (Tac) und einer 75 kD großen β -Kette. Beide Proteinketten, die α -Kette mit niedriger Affinität ($K_d \sim 10^{-8}M$) und die β -Kette mit intermediärer Affinität ($K_d \sim 10^{-9}M$), sind in der Lage, IL2 zu binden. Zusammen bilden sie den IL2R von hoher Affinität ($K_d \sim 10^{-11}M$). Die Wechselwirkung des lymphotropen Wachstumsfaktors IL2 mit seinem Rezeptor führt über die zytoplasmatische Proteindomäne der β -Kette zur intrazellulären Signaltransduktion. Hierdurch wird die Aktivierung einer zur *src*-Protoonkogen-Familie gehörenden Tyrosinkinase (p56^{lck}) ausgelöst (Hatakeyama et al., 1991). Die α -Kette ist zwar allein in der Lage IL2 zu binden, aber sie kann keine Signale weiterleiten (Ferris et al., 1989). Für eine optimale Proliferation mit IL2 müssen T-Zellen in der Regel beide Ketten an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Für verschiedene Lymphozytentypen wie "natural killer"-Zellen (Ortaldo et al., 1984), "large granular"-Lymphozyten (Tsuda et al., 1987) oder für die lymphoblastoide B-Zelllinie SKW6-4 (Tanaka et al., 1987) wurde jedoch gezeigt, daß diese auch ohne die α -Kette, d. h. ausschließlich über die β -Kette auf IL2 reagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression der α -Kette des IL2R eine der Voraussetzungen für die Proliferation Theileria-infizierter Zellen ist. Die hierzu entwickelte "antisense"-Technik unterdrückte durch komplementäre Basensequenzen ("antisense"-RNA) selektiv die α -Ketten-Genexpression. Grundsätzlich ermöglicht die Anwendung von "antisense"-RNA Techniken die Untersuchung der Funktion verschiedener Gene (Übersicht:

Walder, 1988). Am Beispiel der Protoonkogene *c-myc* (Sklar et al., 1991) oder *c-fos* (Holt et al., 1986), die eine essentielle Rolle bei der Zellwachstumsregulation spielen, erfolgte der Nachweis der Effektivität dieser Methode. Aber auch für eine Reihe weiterer Gene, die konstitutiv exprimiert werden wie z.B. γ -Aktin und β -Tubulin (Gunning et al., 1987) oder die schwere Kette des Myosin (Knecht & Leonis, 1987), wurde durch "antisense"-RNA Techniken die Expression dieser Gene erfolgreich blockiert.

Eine Möglichkeit "antisense"-RNA in die Zellen einzuschleusen, ist beispielsweise die Mikroinjektion der *in vitro* produzierten, spezifischen "antisense"-RNA in das Zytoplasma von Zellen bzw Oozyten (Melton, 1985). Diese Technik wird hauptsächlich für die Untersuchung der an der Embryogenese beteiligten Gene angewandt. Nachteilig ist die Kurzlebigkeit der "antisense"-RNA sowie deren mit dem Zellwachstum verbundenen Konzentrationsabnahme. Eine für die durchgeführten Experimente besser geeignete Vorgehensweise endogene Gene kontrolliert zu supprimieren, ist die Transfektion von DNA-Plasmiden, die in der Zelle "antisense"-RNA vom gewünschten Gen produzieren (Izant & Weintraub, 1985). Bei der Untersuchung von Genen, die für die Proliferation essentiell sind, sollte die Produktion der "antisense"-Transkripte durch einen induzierbaren Promotor reguliert werden. Mit Hilfe der kontrollierten Expression der "antisense"-RNA wird das Hochwachsen transfizierter Zellen ermöglicht, bei denen ein für das Wachstum notwendiges Gen durch "antisense"-RNA gehemmt werden soll. Abhängig von dem zu untersuchenden Zelltyp, bieten sich verschiedene induzierbare Promotor-Modelle an: das Steroid-induzierbare LTR des MMTV (Izant & Weintraub, 1985; Holt et al., 1986), der durch Wärme induzierbare Promotor des "Hitze-Schock"-Proteins (McGarry & Lindquist, 1986) oder der durch Schwermetalle induzierbare Promotor des Metallothionein-Gens (Mayo et al., 1982).

In Theileria-infizierten Zellen zeigte der Metallothionein-Promotor des HS1-CAT-Vektors (Abb. 1) nach transientscher Transfektion die gewünschten Eigenschaften wie niedrige Basalaktivität und gute Induzierbarkeit bei nicht toxischen Konzentrationen an Cadmium. Aus diesem Grund wurden aus dem HS1-CAT-Plasmid und den Rinder IL-2R α -cDNA Sequenzen (in Abhängigkeit von der Orientierung des IL2R-Fragmentes) rekombinante "sense"- und "antisense"-Vektoren hergestellt. Wegen der geringen Transfektionseffizienz Theileria-infizierter Zellen konnten die Auswirkungen der "sense"/"antisense"-IL-2R α -RNA auf das Wachstum nur nach stabiler Transfektion und Klonierung erfolgen. Für Theileria-infizierte Zellen wurde deshalb zuerst eine Transfektionsmethode (Elektroporation) optimiert, mit der die Zellen erfolgreich stabil transfiziert werden konnten. Nach Klonierung der stabilen

Transfektanten und Nachweis der Aufnahme der rekombinanten Vektoren in das Genom (Abb. 3 und 4) wurden die Effekte der "antisense"-IL-2R α -RNA in Theileria-infizierten Zellen untersucht.

Eine verstärkte Induktion der Expression der Hybridtranskripte des "sense"/"antisense"-IL-2R α - und des CAT-Genes durch Cadmium konnte auf der mRNA-Ebene nicht gezeigt werden (Abb. 5). Dies steht in Widerspruch mit den oben genannten Daten (Abb. 1), wobei die Induzierbarkeit des Metallothionein-Promotors mit Cadmium durch die Messung der CAT-Enzymaktivität und nicht auf der mRNA-Ebene überprüft wurde. Eine Rolle könnte dabei die unterschiedliche Sensitivität der beiden Nachweismethoden "Northern-Blot" und "CAT-Assay" spielen. Außerdem beruht das unterschiedliche Verhalten des Metallothionein-Promotors mit großer Wahrscheinlichkeit auf der verschiedenen DNA-Struktur der Konstrukte in transienter (nackte, ringförmige DNA) und stabiler (genomisches Chromatin) Analyse. Dies könnte auch die erhöhte Basalaktivität des Metallothionein-Promotors in den stabilen Transfektanten erklären. Die dauernde Aktivität des Promotors führte dazu, daß in "antisense"-IL-2R α -Transfektanten keine "antisense"-IL-2R α -Transkripte nachweisbar waren und die endogene Menge an IL-2R α -Transkripten gegenüber den Kontrollzellen schon ohne Zugabe von Cadmium drastisch reduziert war (Abb. 5). Diese Beobachtung spricht für die geringe Stabilität der "antisense"-IL-2R α -Transkripte und für die Kurzlebigkeit der endogen-"antisense"-IL-2R α -Hybride, in der Art wie es Izant & Weintraub (1984) für das "antisense"-Thymidinkinase-Gen postulieren. Einen weiteren Hinweis auf die erhöhte Basalaktivität des Metallothionein-Promotors und auch auf die Bedeutung der IL-2R α -Kette für die Proliferation Theileria-infizierter T-Zellen wurde bei der Klonierung der stabilen Transfektanten gewonnen. Die Zahl hochgewachsener "antisense"-Klone (1 Klon) war im Vergleich zur Zahl der "sense"-Klone (6 Klone) deutlich geringer. Aber auch das Wachstum der "antisense"-Klone war im allgemeinen gegenüber den "sense"-Klonen reduziert (Abb. 6). Schließlich wird die Abhängigkeit der Proliferation Theileria-infizierter Zellen von einem "high affinity" IL2R im sensitiven biologischen Testsystem nach Kultivierung des "antisense"-Klons in Cadmium sichtbar (Abb. 7). Um sicher zu sein, daß die Anzahl der Proteinmoleküle der IL2R α -Kette (Halbwertszeit von 2-3 Tagen) in den "antisense"-Transfektanten durch Cadmium reduziert wurde, wurden die Transfektanten über einen Zeitraum von 6 Tagen mit dem Schwermetall behandelt. Da die Lymphozyten die Wachstumssignale durch IL2 auch über die β -Kette, allerdings mit geringerer Effizienz, in das Zellinnere weiterleiten können (Hatakeyama et al., 1989), war nach Unterdrückung der IL-2R α -Kettenexpression in Theileria-infizierten Zellen eine vollständige Wachstumshemmung nicht zu erwarten.

Ein weiterer Grund für die nicht so effektive Inhibition des Wachstums in "antisense"-Transfektanten, könnte die suboptimale Menge an "antisense"-IL-2R α -Transkripten sein. Melton (1985), Izant & Weintraub (1984) sowie Kim & Wold (1985) berichten über eine signifikante Inhibition der entsprechenden Gene durch "antisense"-RNA, wenn das Verhältnis von Transkriptmenge des endogenen Genes zu "antisense"-RNA 1:50 oder sogar 1:300 beträgt. Die Produktion so großer Mengen "antisense"-RNA kann beispielsweise durch Aufnahme einer hohen Kopienzahl rekombinanter Vektoren oder einen starken Promotor erreicht werden. Dies scheint für die IL2R-Transfektanten in *Theileria*-infizierten Zellen nicht der Fall zu sein. Die aus den "Southern"- und "Northern-Blots" (Abb.4 und 5) erhaltenen sehr schwachen Hybridisierungssignale legen die Vermutung nahe, daß sowohl die Zahl der ins Genom integrierten Vektoren, als auch die Stärke des Methallothionein-Promotors für eine optimale Hemmung der Genexpression nicht ausreichen. Da die endogene IL2R-mRNA relativ stabil und in größerer Menge vorhanden war, konnte keine komplette Hemmung erwartet werden. Trotz dieses Nachteils, konnte durch Anwendung der "antisense"-RNA-Technik auf biologisch funktioneller Ebene die Bedeutung der IL-2R α -Kette für das Wachstum *Theileria*-infizierter T-Zellen geklärt werden. Zum ersten Mal wurde mit Hilfe von "antisense"-RNA die Funktion eines Wachstumsfaktorrezeptors gehemmt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß *Theileria*-infizierte T-Zellen durch die Interaktion von IL2 mit dem "high affinity" IL2R zur autokrinen Proliferation stimuliert werden. Der für das Wachstum *Theileria*-infizierter T-Zellen notwendige enge Zellkontakt begünstigt zusätzlich die Stimulation (Dobbelaere et al., 1991). Desweiteren ist die konstitutive Expression beider Gene in infizierten Zellen von der Anwesenheit des Parasiten im Zytoplasma der Wirtszelle abhängig (Coquerelle et al., 1989; Heussler et al., 1992).

Einige Beispiele belegen eine Beteiligung von IL2 und IL2R an der Transformation von Lymphozyten (Duprez et al., 1985). Gallo & Wong-Staal (1982) sowie Russel (1989) zeigen, daß IL2 und sein Rezeptor nicht nur beim Wachstum von normalen T-Zellen, sondern auch bei der Entstehung von bestimmten bösartigen Leukämien und Lymphomen einen entscheidenden Einfluß besitzen. Im Falle der durch den Retrovirus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus, Typ 1) verursachten Leukämie im Erwachsenenalter (adult T-cell leukemia, ATL), erfolgt durch ein virales Genprodukt die unkontrollierte Erhöhung der Expression von IL2 und dessen Rezeptor (Siekevitz et al., 1987). Ob in *Theileria*-infizierten T-Zellen die Transformation durch den Parasiten über ähnliche regulatorische Proteine abläuft, muß noch untersucht werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, daß normalerweise die Aktivierung von IL2 und IL2R in T-Zellen über Signale erfolgt, die von der Zelloberfläche kommen (Übersicht: Klausner &

Samelson, 1991). Diese Signale resultieren in einer Kaskade von Aktivierungsschritten, an denen spezifischen Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, die zur Expression von IL2 und IL2R und letztlich zur Proliferation der T-Zellen führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen somit weitere Untersuchungen der Moleküle, die mit der Weiterleitung der Aktivierungssignale in Theileria-infizierte T-Zellen interagieren. Die Identifizierung dieser Moleküle könnte zur Aufklärung des Transformationsmechanismus durch den Parasiten beitragen.

5.2 MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation

MHC-Klasse II Antigene üben sowohl bei der Regulation und Restriktion der Immunantwort (Germain, 1986; Marrack & Kappler, 1988) als auch bei der Signaltransduktion wichtige Funktionen aus (St-Pierre et al., 1989; Cambier & Lehman, 1990; Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990; Ødum et al., 1991). *In vitro* Experimente mit anti-Klasse II Antikörpern an B-Zellen (Forsgren et al., 1984; Cambier et al., 1987; Kabelitz & Janssen, 1989; Kansas & Tedder, 1991) und Monozyten (Ruggiero et al., 1987; Vaickus et al., 1989) haben gezeigt, daß Klasse II Antigene neben der Antigenpräsentation zusätzliche Aufgaben wahrnehmen. Die Bindung eines Liganden an MHC Klasse II Antigene aktiviert eine Signalkette, die zu verschiedenen biologischen Effekten führen kann. Beispielsweise resultieren die Signale, die in anti-Klasse II-behandelten B-Zellen entstehen, je nach Aktivierungszustand der Zellen in einer Inhibition (Clement et al., 1986) oder Stimulierung (Cambier & Lehman, 1989) der Proliferation. Neben dieser Beeinflussung des Wachstums wird oft eine verstärkte Aggregation der Zellen nach deren Behandlung mit anti-Klasse II Antikörpern beobachtet (Mourad et al., 1990; Kansas & Tedder, 1991).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Beteiligung der MHC-Klasse II Antigene an der Regulation der Proliferation der T-lymphozyten am Modellsystem Theileria-infizierter T-Zelllinie (TpM[803]) untersucht.

Die über Klasse II Antigene vermittelten Signale führen zur reversiblen Hemmung der DNA-Synthese in Theileria-infizierten T-Zellen

Die dem Kulturmedium Theileria-infizierter T-Zellen zugegebenen anti-Klasse II Antikörper führten sehr schnell zur Hemmung der DNA-Synthese in diesen Zellen (Abb. 8A). Die beobachtete drastische Inhibition (70% bis über 90%) resultierte nicht aus einer unspezifischen toxischen Wirkung der Antikörper, denn die Lebensfähigkeit der behandelten T-Zellen war nicht beeinträchtigt und verschiedene Kontrollzellen wurden nicht gehemmt. Desweiteren war die Hemmung nach Auswaschen der Antikörper aufgehoben (Abb. 9B), was auf die Reversibilität der durch Klasse II Antigene entstehenden Signale deutet. Für die über Oberflächenmoleküle induzierten Signale gibt es auch Beispiele, die zu einem permanenten Proliferationsstopp führen können. Page & DeFranco (1988) haben über eine irreversible Wachstumshemmung berichtet, die nach Behandlung der B-Lymphoma-Zelllinie WEHI-231 mit anti-Immunglobulin Antikörpern auftrat.

Da die Klasse II-vermittelten wachstumshemmenden Signale sowohl in in normalen ConA-stimulierten Lymphozyten als auch in T-Zellen wirksam wurden, die vom Parasiten befreit wurden, kann man von einem eher allgemeinen Mechanismus der Hemmung des Wachstums von T-Zellen sprechen (Abb. 8B und 10B).

Die Kinetik der DNA-Synthese-Hemmung in anti-Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen weist auf die Entstehung von Signalen hin, die in sehr kurzen Zeiträumen (~2 Stunden) wirksam sein können. Studien mit T-Zellen, die in Gegenwart von Monozyten und anti-CD3 Antikörpern stimuliert wurden, zeigten nach anti-Klasse II Behandlung auch eine Inhibition der Proliferation. Dabei scheinen die anti-Klasse II Antikörper ihren hemmenden Einfluß hauptsächlich auf die Monozyten auszuüben und dadurch die Aktivierung sowie die nachfolgende Proliferation der T-Zellen indirekt zu hemmen (Ruggiero et al., 1987 und 1991). In diesen T-Zellen konnte die Hemmung des Wachstums durch Zugabe von rekombinanten IL2 wieder aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu wurde in Theileria-infizierten T-Zellen nach anti-Klasse II Behandlung durch Zugabe von rekombinanten IL2 die normale Proliferation nicht wieder hergestellt (Abb 10). Dies zeigt die Dominanz der durch Klasse II Antigene vermittelten wachstumshemmenden Signale über die proliferationstimulierenden Signale des Wachstumsfaktors IL2. Welche Signalwege können zu dieser schnellen Hemmung der DNA-Synthese in anti-Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen führen?

Die MHC-Klasse II-vermittelte Hemmung der DNA-Synthese wirkt nicht über die Inhibition der T-Zellaktivierung

Ruggiero et al. (1987 und 1991) und Racioppi et al. (1990) zeigten in ihren Experimenten mit T-Zellen, die durch anti-CD3 Antikörper zur Proliferation angeregt wurden, eine Hemmung der IL2 und IL2R Expression nach Zugabe von anti-Klasse II Antikörpern. Hierbei wurde die Aktivierung der T-Zellen durch anti-Klasse II Antikörper indirekt über eine Hemmung des Proliferationsstimulus durch anti-CD3 Antikörper in Anwesenheit von Monozyten blockiert. Dadurch wurde der Ablauf der Aktivierungskaskade in den T-Zellen verhindert und damit auch die Induktion der entsprechenden Gene. In kontinuierlich wachsenden Theileria-infizierten T-Zellen liegt eine andere Situation vor, denn die für die T-Zellaktivierung typischen Moleküle wie NF- κ B, AP1, *c-myc*, IL2 und IL2R werden permanent exprimiert. Hier stellte sich die Frage, ob die Klasse II-vermittelte DNA-Synthese-Hemmung über die Inhibition der Aktivierungssignale verläuft oder ob andere Signalwege beteiligt sind.

Die Untersuchung der Effekte der anti-Klasse II Antikörper auf den an der Regulation der IL2 und IL2R Expression beteiligten Transkriptionsfaktors NF- κ B (Böhnlein, 1988; Hoyos, 1989), ergab weder in *in vitro* Gelretardations-Analysen noch in biologisch funktionellen Tests ("CAT-Assay", Abb. 11) eine Abnahme an aktivierten NF- κ B Molekülen. Auch die *in vitro* DNA-Bindungsfähigkeit eines anderen regulatorischen Transkriptionsfaktor AP1 (Übersicht: Ullman et al., 1990), der ein Komplex aus Mitgliedern der Proto-onkogenfamilien *c-fos* und *c-jun* bildet, war nach anti-Klasse II Behandlung nicht beeinträchtigt worden (Abb. 11B). Die Expression eines weiteren nach der T-Zellaktivierung sehr früh induzierten Transkriptionsfaktors *c-myc* (Übersicht: Ullman et al., 1990) wurde ebensowenig durch die Klasse II-vermittelten Signale beeinflusst (Abb. 12). Da auch die Expression des IL2 (Eichhorn et al., 1992) und IL2R α -Kette in anti-Klasse II-behandelten Zellen nicht reduziert wurde (Abb. 12), kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Antikörper-vermittelte Wachstumshemmung nicht über die Inhibition dieser Moleküle verläuft.

Sind andere Oberflächenmoleküle an der Wachstumshemmung durch die MHC-Klasse II Moleküle beteiligt?

Fast alle von Lymphozyten bei der Regulation der Immunantwort ausgeübten Funktionen, werden erst durch Kooperation und Interaktion verschiedener Oberflächenmoleküle ermöglicht

(Übersicht: Meuer & Resch 1989; Wagner & Eichmann 1989). Daneben spielt natürlich die Sekretion von Faktoren, die sowohl autokrin als auch parakrin auf die Lymphozyten und andere Zellen wirken können, eine entscheidende Rolle (Übersicht: Hamblin, 1988).

Auch im Fall der Klasse II-vermittelten Hemmung in Theileria-infizierter T-Zellen wird eine Zusammenarbeit mit anderen membrangebundenen Oberflächenproteinen angenommen (Tabelle 2). Der wachstumshemmende Effekt der anti-Klasse II Antikörper war in verdünnten Kulturen nicht so ausgeprägt wie in dichteren Kulturen. Nach Intensivierung des Zellkontaktes mit Hilfe bestrahlter und fixierter "Filler cells" konnte die Hemmung der DNA-Synthese durch anti-Klasse II Antikörper in verdünnten Theileria-infizierten T-Zellen verstärkt werden. Damit wurde gezeigt, daß nicht sezernierte Faktoren, sondern andere bisher noch nicht identifizierte Oberflächenmoleküle mit der Klasse II-vermittelten Inhibition kooperieren. Die Untersuchung von zwei für die T-Zellproliferation und Adhäsion bedeutenden Oberflächenmoleküle CD45 und CD2 (Ledbetter et al., 1988; Kiener & Mittler, 1989; Schraven et al., 1990; Ohno et al., 1991), ergab keinen modulierenden Einfluß auf den wachstumshemmenden Effekt der anti-Klasse II Antikörper. Die Beteiligung dieser Moleküle an Klasse II-vermittelten Proliferationshemmung kann aus dem Ergebnis dieses Experimentes allerdings nicht ausgeschlossen werden, da die Möglichkeit besteht, daß die Bindung der Antikörper an CD2/CD45-Moleküle nicht zu einem physiologischen Effekt geführt hat. Das Austesten von weiteren Antikörpern könnte interessante Informationen über die Rolle anderer Oberflächenmoleküle, wie z.B. CD44, LFA-3, ICAM-1 oder ICAM-2 (Shimizu et al., 1989; Übersicht: Springer, 1990) an Klasse II-vermittelten Proliferationshemmung geben.

Intrazelluläres Calcium und Tyrosinkinase spielen eine potentielle Rolle bei der Klasse II vermittelten Wachstumshemmung

Ähnliche *in vitro* Studien mit Antikörpern, die gegen andere Oberflächenmoleküle der Lymphozyten gerichtet waren, weisen auf die Bedeutung der Änderungen von intrazellulären Ionenkonzentration und Phosphorylierungen für die wachstumshemmenden Wirkung der Antikörper hin (Kiener & Mittler, 1989; Beckwith et al., 1991).

Klasse II-vermittelte Signale resultieren in einer Mobilisierung von Calcium, Änderungen im Tyrosinphosphorylierungsmuster (Lane et al., 1990; Ødum, et al., 1991) und Aktivierung der Serin/Threonin spezifischen Proteinkinase C (Mourad et al., 1990). Über die Wirkungen dieser Signale auf das Wachstum aktivierter T-Zellen war bisher nichts bekannt. Mourad et al. (1990)

beschrieben eine verstärkte Aggregation der anti-Klasse II-behandelten T- und B-Zellen als eine Folge der Aktivierung der Proteinkinase C. Dabei konnten sie zeigen, daß die Aggregation auf eine Interaktion des durch die Proteinkinase C aktivierten Lymphozyten-Adhäsionsmoleküls LFA-1 ("lymphocyte function associated antigen-1") mit seinem Liganden beruht. Die Konformationsänderung des LFA-1 Moleküls wird durch die Phosphorylierung seiner β -Proteinkette durch Proteinkinase C und durch die Präsenz von Magnesium und Calcium im Medium ermöglicht (Übersicht: Figdor, et al., 1990). Auch in anti-Klasse II-behandelten Theileria-infizierten T-Zellen wurde eine verstärkte Aggregation, die durch den Proteinkinase C-Inhibitor H7 und durch Wegfangen von bivalenten Kationen aus dem Medium mit Hilfe des Chelatbildners EGTA gehemmt wurde, beobachtet (Abb. 13A). Die Klasse II-vermittelte Inhibition der DNA-Synthese blieb allerdings unter diesen Bedingungen in diesen Zellen erhalten (Abb. 13B). Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die Hemmung über einen zweiten, unterschiedlichen Signalweg abläuft, an dem PKC und extrazelluläre Ionen nicht beteiligt sind.

Änderungen von Tyrosinphosphorylierungen (Hsi et al., 1989; June, et al., 1990) und die Mobilisierung von Calcium (Übersicht: Gardner, 1989) sind in T-Zellen einer der ersten und fundamentalsten Mechanismen bei der Umwandlung einer Vielzahl extrazellulärer Signale in intrazelluläre Antworten. Ähnliche Ereignisse finden auch nach MHC-Klasse II Stimulierung statt.

Ødum et al. (1991) hat nach Zugabe von anti-Klasse II Antikörpern eine sehr schnelle Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern und einen Anstieg an Tyrosinphosphorylierungen in aktivierten T-Zelllinien beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von verschiedenen Inhibitoren, die Tyrosinkinasen (Herbimycin A, Genistein; June et al., 1990; Beckwith et al., 1991), Tyrosinphosphatasen (Natriumorthovanadat; Kiener & Mittler, 1989; Beckwith et al., 1991) und Calcium-Kanäle (Nifedipin; Lee & Tsien, 1983) hemmen, die Bedeutung dieser Moleküle für die anti-Klasse II-vermittelte Wachstumshemmung in T-Zellen untersucht. Die bei den Experimenten verwendeten Konzentrationen an Inhibitoren führten in den Kontrollzellen zur moderaten Inhibition der DNA-Synthese. Die ^3H -Thymidin-Inkorporation war aber immer so hoch, daß signifikante Unterschiede in den einzelnen Ansätzen gut meßbar waren. Dabei konnte gezeigt werden, daß die anti-Klasse II-vermittelte Wachstumshemmung durch Anwendung von Herbimycin A teilweise und durch Anwendung von Nifedipin vollständig aufgehoben werden konnte (Abb. 14). Desweiteren verstärkte der Tyrosinphosphatase-Inhibitor Natriumorthovanadat die Wachstumshemmung (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung von einer oder mehreren Tyrosinkinasen und von intrazellulärem Calcium an der anti-Klasse II-vermittelten Wachstumshemmung in T-

Zellen hin. Durch Anwendung von Herbimycin A und Natriumorthovanadat haben Beckwith et al. (1991) die Bedeutung von Tyrosinkinasen und Phosphatasen für die anti-IgM-induzierte Wachstumshemmung in B-Zellen aufgezeigt.

Da Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen an fast allen Signalketten beteiligt sind, ist es schwierig aus einer Vielzahl von möglichen Proteinen die für die Hemmung der DNA-Synthese verantwortlichen experimentell zu identifizieren.

Inwiefern haben aber unter *in vivo* Bedingungen diese wachstumshemmende Effekte der anti-Klasse II Antikörper eine Bedeutung? Normalerweise kann man in einem gesunden Organismus keine anti-Klasse II Antikörper detektieren. Es gibt allerdings einige Krankheiten für deren Verlauf sie eine wichtige Rolle spielen könnten. Zum Beispiel wurden im Blut von Patienten mit Autoimmun-Erkrankungen Antikörper nachgewiesen, die gegen MHC-Klasse II Antigene gerichtet sind (Okudaira, et al., 1982). Weiterhin existieren in Patienten, die mit dem Retrovirus HIV-1 (Auslöser des erworbenen Immunschwäche-Syndroms, AIDS) infiziert sind, mit MHC-Klasse II Antigenen reagierende Antikörper (Golding et al., 1988). Die Entstehung solcher anti-Klasse II Antikörper in AIDS-Patienten wird anscheinend durch die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen zwischen Klasse II Antigenen und einigen HIV-1-Peptiden gefördert (Young, 1988; Vega et al., 1990). Die Tatsache, daß HIV-1-Peptide zusätzlich zur Induktion der T-Zellaktivierung (Kornfeld et al., 1988) und somit auch zur verstärkten Expression von MHC-Klasse II Antigenen führen, deutet auf eine Prädisposition dieser Zellen für die wachstumshemmende Wirkung der anti-Klasse II Antikörper in AIDS-Patienten hin. Da AIDS viele klinische und serologische Eigenschaften mit Autoimmun-Erkrankungen gemein hat (Kion & Hoffmann, 1991), ist auch eine Beteiligung der hier beschriebenen Proliferationshemmung von aktivierten T-Zellen am Verlauf dieser Krankheiten vorstellbar.

Wegen ihrer eingangs beschriebener Eigenschaften wie aktivierter (reversibler) Zustand und kontinuierliche klonale Vermehrung bieten Theileria-infizierte T-Zellen ein einzigartiges Modell zur Erforschung von Mechanismen der Transformation, Wachstumskontrolle und immunologischen Phänomenen. Theileria-infizierte T-Zellen haben die Untersuchung eines neuen Mechanismus der negativen Regulation der Proliferation von T-Zellen ermöglicht. Der Klasse II-vermittelte wachstumshemmende Effekt könnte somit zum größeren Verständnis der Mechanismen der Pathogenese von spontan entstehenden Autoimmun-Erkrankungen und viral verursachten AIDS beitragen.

LITERATUR

- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987). 12-o-Tetradecanoyl-Phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2256-2266.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Ass. and Wiley-Interscience, 1+2.
- Aviv, H. und Leder, P. (1972). Purification of biological globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Sci. USA* **69**: 1409-1412.
- Baumann, I., Kelke, C., Eichhorn, M., Stein, B., Lipp, J., Dobbelaere, D. A. E. und Williams, R. O. (1991). Characterization of the NF- κ B complex in *Theileria parva*-infected bovine lymphocytes. *J. Leuk. Biol. Supplement 2*: 69.
- Beckwith, M., Urba, W. J., Ferris, D. K., Freter, C. E., Kuhns, D. B., Moratz, C. M. und Longo, D. L. (1991). Anti-IgM-mediated growth inhibition of a human B lymphoma cell line is independent of phosphatidylinositol turnover and protein kinase C activation and involves tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* **147**: 2411-2418.
- Benoist, C. und Mathis, D. (1990). Regulation of Major Histocompatibility Complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 681-715.
- Böhnlein, E., Lowental, J. W., Siekevitz, M., Ballard, D. W., Franza, B. R., and Greene, W. C. (1988). The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor alpha gene and type I HIV. *Cell* **53**: 827-836.
- Bresser, J., Doering, J. und Gillespie, D. (1983). Laboratory Methods. Quick Blot: Selective mRNA or DNA immobilization from whole cells. *DNA* **2**: 243-254.
- Brocklesby, D. W., Barnett, S. F. und Scott, G. R. (1961). Morbidity and mortality rates in East Coast fever (*Theileria parva* infection) and their application to drug screening procedures. *Br. Vet. J.* **117**: 529-531.

- Browder, T. M., Abrams, J. S., Wong, P. M. C. und Nienhuis, A. W. (1989). Mechanism of an autocrine stimulation in hematopoietic cells producing interleukin-3 after retrovirus-mediated gene transfer. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 204-209.
- Brown, C. G. D., Stagg, D. A., Purnell, R. E., Kanhai, G. K. und Payne, R. C. (1973). Infection and transformation of bovine lymphoid cells *in vitro* by infective particles of *Theileria parva*. *Nature* **245**: 101-103.
- Brown, W. C. und Logan, K. S. (1986). Bovine T-cell clones infected with *Theileria parva* produce a factor with IL2-like activity. *Parasite Immunol.* **8**: 189-192.
- Cambier, J. C., Justement, L. B., Newell, M. K., Chen, Z. Z., Harris, L. K., Sandoval, V. M., Klemz, M. J. und Ransom J. T. (1987a). Transmembrane signals and intracellular "second messengers" in the regulation of quiescent B-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.* **95**: 37-57.
- Cambier, J. C., Newell, M. K., Justement, L. B., McGuire, J. C., Leach, K. L. und Chen, Z. Z. (1987b). Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* **327**: 629-632.
- Cambier, J. C. und Lehman, K. R. (1989). Ia-mediated signal transduction leads to proliferation of primed B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 877-886.
- Cambier, J. C. und Lehman, K. R. (1990). Biological consequences of signal transduction by class II molecules encoded by the Major Histocompatibility Complex Ia. *Immune Recognition and Evasion: Molecular Aspects of Host-Parasite Interaction*. Academic Press, Inc. : 29-37.
- Cato, A. C. B., Miksicek, R., Schütz, G., Arnemann, J. und Beato, M. (1986). The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesteron induction. *EMBO J.* **5**: 2237-2240.
- Chang, A.C.Y. und Brenner, D.G. (1988). Cationic liposome mediated transfection: a new method for the introduction of DNA into mammalian cells. *Focus* **10**: 66-69.
- Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P. und Kappler, J. (1989). Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8941-8945.

- Clement, L. T., Tedder, T. F. und Gartland, G. L. (1986). Antibodies with class II antigens encoded for by the major histocompatibility complex inhibit human B cell activation. *J. Immunol.* **136**: 2375-2381.
- Cole, B. C. und Atkin, C. L. (1991). The *Mycoplasma arthridis* T-cell mitogen, MAM: a model superantigen. *Immunol. Today* **12**: 271-276.
- Coquerelle, T.M., Eichhorn, M., Magnuson, N.S., Reeves, R., Williams, R.O. und Dobbelaere, D.A.E. (1989). Expression and characterization of the interleukin 2 receptor in *Theileria parva*-infected bovine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**: 655-659.
- Dobbelaere, D.A.E., Coquerelle, T.M., Roditi, I.J., Eichhorn M. und Williams, R.O. (1988). *Theileria parva* infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **85**: 4730-4734.
- Dobbelaere, D. A. E., Prospero, T. D., Roditi, I. J., Kelke, C., Baumann, I., Eichhorn, M., Williams, R. O. Ahmed, J. S., Baldwin, C. L., Clevers, H. und Morrison, W. I. (1990). Expression of Tac antigen component of bovine Interleukin-2 receptor in different leukocyte populations infected with *Theileria parva* or *Theileria annulata*. *Infect. Immun.* **58**: 3847-3855.
- Dobbelaere, D. A. E., Roditi, I. J., Coquerelle, T.M., Kelke, C., Eichhorn, M. und Williams, R. O. (1991). Lymphocytes infected with *Theileria parva* require both cell-cell contact and growth factor to proliferate. *Eur. J. Immunol.* **21**: 89-95.
- Duprez, V., Lenoir, G. und Dautry-Varsat, A. (1985). Autocrine growth stimulation of a human T-Cell lymphoma line by interleukin 2. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **82**: 6932-6937.
- Eichhorn, M., Prospero, T., Heussler, V. T. und Dobbelaere, D. A. E. (1992). MHC class II-mediated inhibition of T-cell proliferation does not affect activation. (zur Veröffentlichung vorgelegt)
- Emery, D. L., MacHugh, N. D. und Morrison, W. I. (1988). *Theileria parva* (*Muguga*) infects bovine T-lymphocytes *in vivo* and induces coexpression of BoT4 and BoT8. *Parasite Immunol.* **10**: 379-391.
- Eugui, E. M. und Emery, D. L. (1981). Genetically restricted cell-mediated cytotoxicity in cattle immune to *Theileria parva*. *Nature* **290**: 251-254.

- Fawcett, D. M., Doxsey, S., Stagg, D. A. und Young, A. S. (1982). The entry of sporozoites of *Theileria parva* into bovine lymphocytes *in vitro*: electronmicroscopic observations. *Eur. J. Cell. Biol.* **27**: 10-21.
- Feinberg, A. B. und Vogelstein, P. (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Add. Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- Ferris, D. K., Willette-Brown, J., Ortaldo, J. R. und Farrar, W. L. (1989). IL-2 regulation of tyrosin kinase activity is mediated through the p70-75 β -subunit of the IL-2 Receptor. *J. Immunol.* **143**: 870-876.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. und Keizer, G. D. (1990). On the mode of action of LFA-1. *Immunol. Today* **11**: 277-280.
- Finkel, T. H., Kubo, R. T. und Cambier J. C. (1991). T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol. Today* **12**: 79-85.
- Forsgren, S., Pobor, G., Coutinho, H. A. und Pierres, M. (1984). The role of I-A/E molecules in B lymphocyte activation I. Inhibition of lipopolysaccharide-induced responses by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **133**: 2104-2110.
- Gallo, R. C. und Wong-Staal, F. (1982). Retroviruses as etiological agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tool for elucidating the molecular mechanisms of leukemogenesis. *Blood* **60**: 545-557.
- Gardner, P. (1989). Calcium flux and T lymphocyte activation. *Cell* **59**: 15-20.
- Gay, D., Maddon, P., Sekaly, R., Talle, M. A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, L., Axel, R., Kappler, J. und Marrack, P. (1987). Functional interaction between human T-Cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**: 626-629.
- Germain, R. N. (1986). The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* **322**: 687-689.

- Golding, H., Robey, F. A., Gates III, F. T., Linder, W., Beining, P. R., Hoffman, T. und Golding, B. (1988). Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II β 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patient's sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J. Exp. Med.* **167**: 914-923.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. und Howard, B. H. (1982a). The rous sarcoma virus long terminal repeat is strong promoter when introduced into a variety eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Sci. USA* **79**: 6777-6781.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982b). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
- Gunning, P., Lavitt, J., Muskat, G., Ng, S.-Y. und Kedes, L. (1987). A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc. Natl. Sci. USA* **84**: 4831-4835.
- Hamblin, A. S. (1988). Lymphokines. In: Male, D. und Rickwood, D., (Verl.) *In Focus* IRL Press Limited, Oxford:1-71.
- Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T. und Taniguchi, T. (1989). A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor β chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* **59**: 837-845.
- Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. und Taniguchi, T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the *src*-family kinase p56lck: Identification of novel intermolecular association. *Science* **252**: 1523-1528.
- Heussler, V. T., Eichhorn, M., Reeves R., Magnuson N. S., Williams R. O. und Dobbelaere D. A. E. (1992). Constitutive IL-2 mRNA expression in lymphocytes, infected with the intracellular parasite *Theileria parva*. *J. Immunol.* (in Druck)
- Holt, J. T., Venkat Gopal, T., Moulton, A. D. und Nienhuis, A. W.(1986). Inducible production of *c-fos* antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Sci. USA* **83**: 4794-4798.

- Hoyos, B., Ballard, D. W., Böhnlein, E., Siekevitz, M., und Greene, W. C. (1989). Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* **244**: 457-460.
- Hsi, E. D. Siegel, J. N., Minami, Y., Luong, E. T., Klausner, R. D. und Samelson, L. E. (1989). T-cell activation induces rapid tyrosine phosphorylation of a limited number of cellular substrates. *J. Biol. Chem.* **264**: 10836-10842.
- Irvin, A. D., Brown, C. G. D., Kanhai, G. K. und Stagg, D. A. (1975). Comparative growth of lymphosarcoma cells and lymphoid cells infected with *Theileria parva* in athymic (nude) mice. *Nature* **255**: 713-714.
- Isakov, N., Mally, M. I., Scholz, W. und Altman, A. (1988). T-lymphocytes activation: the role of protein kinase C and the bifurcating inositol phospholipid signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* **95**: 89-111.
- Ivanov, V., Stein, B., Baumann, I., Eichhorn, M., Dobbelaere, D.A.E., Herrlich P. und Williams R.O. (1989). The transcriptional activator NF-kB is constitutively induced in bovine T-lymphocytes infected with the intracellular parasite *Theileria parva*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4677-4686.
- Izant, J. G. und Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**: 1007-1015.
- Izant, J. G. und Weintraub, H. (1985). Constitutiv and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* **229**: 345-352.
- Jarret, W. F. H., Crighton, G. W. und Pirie, H. M. (1969). *Theileria parva*: kinetics of replication. *Exp. Parasit.* **24**: 9.
- June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Siegel, J. N., Phillips, A. F. und Samelson, L. E. (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Sci. USA* **87**: 7722-7726.
- Kabelitz, D., und Janssen, O. (1989). Growth inhibition of Epstein-Barr virus-transformed B cells by anti HLA-DR antibody L243: Possible relationship to L243-induced down-regulation of CD23 antigen expression. *Cellular Immunol.* **120**: 21-30.

- Kansas, G. S., und Tedder, T. F. (1991). Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1 dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Immunol.* **147**: 4094-4102.
- Kiener, P. A. und Mittler, R. S. (1989). CD45-protein tyrosine phosphatase cross-linking inhibits T cell receptor CD3-mediated activation in human T cells. *J. Immunol.* **143**: 23-28.
- Kim, S. K. und Wold, B. J. (1985). Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA. *Cell* **42**: 129-138.
- Kion, T. A. und Hoffmann, G. W. (1991). Anti-HIV and anti-anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmun mice. *Science* **253**: 1138-1140.
- Klausner, R. D. und Samelson, L. E. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* **64**: 875-878.
- Knecht, D. A. und Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **242**: 1081-1086.
- Kornfeld, H., Cruikshank, W. W., Pyle, S. W., Berman, J. S. und Center, D. M. (1988). Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature* **335**: 445-448.
- Kourilsky, P. und Claverie, J.-M. (1989). MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link? *Cell* **56**: 327-329.
- Lalor, P. A., Morrison, W. I. und Black, S. J. (1986). Monoclonal antibodies to bovine leukocytes define heterogeneity of target cells for *in vitro* parasitosis by *Theileria parva*. In: Morrison, W. I. (Verl.) *The ruminant system in health and disease*. Cambridge University Press, Cambridge: 72-87.
- Lane, P. J. L., McConnell, F. M., Schieven, G. L., Clark, E. A. und Ledbetter, J. A. (1990). The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J. Immunol.* **144**: 3684-3692.

- Ledbetter, J. A., Tonks, N. K., Fischer, E. H. und Clark, E. A. (1988). CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **85**: 8628-8632.
- Lee, K. S. und Tsien, R. W. (1983). Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* **302**: 790-794.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Malmquist, W. A. M., Nyindo, M. B. A. und Brown, C. G. D. (1970). East Coast fever: cultivation *in vitro* of bovine spleen cells infected and transformed by *Theileria parva*. *Trop. Anim. Health Prod.* **2**: 139-145.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Marrack, P. und Kappler, J. (1988). The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol. Today* **9**: 308-315.
- Mastro, A. M. und Pepin, K. G. (1980): Suppression of lectin-stimulated DNA synthesis in bovine lymphocytes by the tumor promoter TPA. *Cancer Res.* **40**: 3307-3312.
- Mayo, K. E., Warren, R. und Palmiter, R. D. (1982). The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell* **29**: 99-108.
- MacDonald, H. R., Schneider, R., Lees, R. K., Howe, R. C., Acha-Orbea, H., Festenstein, H., Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1988). T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls-encoded antigens. *Nature* **332**: 40-45.
- McGarry, T. J. und Lindquist, S. (1986). Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. *Proc. Natl. Sci. USA* **83**: 399-403.
- McHardy, N. (1984). Recent advances in the chemotherapy of theileriosis. *Prev. Vet. Med.* **2**: 179-192.
- Mehlhorn, H. (1984). The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* **23**: 37-103.

- Melton, D. A. (1985). Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation *in vivo*. *Proc. Natl. Sci. USA* **82**: 144-148.
- Meuer, S. und Resch, K. (1989). Cellular signalling in T Lymphocytes. *Immunol. Today* **10**: s23-s27.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. und Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1215.
- Mooney, N. A., Grillot-Courvalin, C., Hivroz, C., Ju, L. Y. und Charron, D. (1990). Early biochemical events after MHC classII-mediated signaling on human B lymphocytes. *J. Immunol.* **145**: 2070-2076.
- Morrison, W. I., Lalor, P. A., Goddeeris, B. M. und Teale, A. J. (1986). Theileriosis: antigens and host-parasite interactions. In: Pearson, T. W. (Verl.) *Parasite antigens. Towards new strategies for vaccines*. Marcel Dekker, Inc., New York, and Basel: 167-213.
- Morrison, W. I., Goddeeris, B. M., Brown, W. C., Baldwin, C. L. und Teale, A. J. (1989). *Theileria parva* in cattle: characterization of infected cells and the immunresponse they provoke. *Veterinary Immunol. and Immunopathol.* **20**: 213-237.
- Mourad, W., Geha, R. S. und Chatila, T. (1990). Engagement of Major Histocompatibility Complex Class II molecules induces sustained lymphocyte function-associated molecule 1-dependent cell adhesion. *J. Exp. Med.* **172**: 1513-1516.
- Nabel, G. und Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**: 711-713.
- Nelson, R. T. und Hirumi, H. (1981). *In vitro* cloning of Theileria-infected bovine lymphoblastoid cells: standardization and characterization. In: Irvin, A. D., Cunningham, M. P. and Young, A. S. (Verl.) *Current topics in veterinary medicine and animal science* **14**: *advances in control of Theileriosis*. Den Haag 1981: 120-121.
- Ohno, H., Nakamura, T., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, M. und Saito, T. (1991). Induction of negative signal through CD2 during antigen-specific T cell activation. *J. Immunol.* **147**: 2100-2106.

- Okudaira, K., Searles, R. P., Goodwin, J. S., and Williams, R. C. (1982). Antibodies of patients with systemic lupus erythematosus that block the binding of monoclonal anti-Ia to Ia-positive targets also inhibit the autologous mixed lymphocyte response. *J. Immunol.* **129**: 582-586.
- Ortaldo, J. R., Mason, A. T., Gerard, J. P., Henderson, L. E., Farrar, W. L., Hopkins III, R. F., Herberman, R. B. and Rabin, H. (1984). Effects of natural and recombinant IL 2 on regulation of IFN- γ production and natural killer activity: lack of involvement of the TAC antigen for these immunoregulatory effects. *J. Immunol.* **133**: 779-785.
- Ødum, N., Martin, P. J., Schieven, G. L., Hansen, J. A. und Ledbetter, J. A. (1991). Signal transduction by HLA class II antigens expressed on activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **21**: 123-129.
- Owens, T., de St. Groth, B. und Miller, J. F. A. P. (1987). Coaggregation of the T-cell receptor with CD4 and other T-cell surface molecules enhances T-cell activation. *Proc. Natl. Sci. USA* **84**: 9209-9213.
- Page, D. M. und DeFranco, A. L. (1988). Role of phosphoinositide-derived second messengers in mediating anti-IgM-induced growth arrest of WEHI-231 B lymphoma cells. *J. Immunol.* **140**: 3717-3726.
- Pearson, T. WE., Lundin, L. B., Dolan, T. T. und Stagg, D. A. (1979). Cell-mediated immunity to Theileria-transformed cell lines. *Nature* **281**: 678-680.
- Pinder, M., Kar, S., Withey, K. S., Lundin, L. B. und Roelants, G. E. (1981). Proliferation and lymphocyte stimulatory capacity of Theileria-infected lymphoblastoid cells before and after elimination of intracellular parasites. *Immunology* **44**: 51-60.
- Racioppi, L., Moscarella, A., Ruggiero, G., Manzo, C., Ferrone, S., Fontana S. und Zappacosta, S. (1990). Inhibition by anti-HLA class II monoclonal antibodies of monoclonal antibody OKT3-induced T cell proliferation. Studies at the mRNA level. *J. Immunol.* **145**: 3635-3640.
- Robb, R. J. und Green, W. C. (1987). Internalisation of interleukin 2 is mediated by the β chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.* **165**: 1201-1206.
- Rudd, C. E. (1990). CD4, CD8 and TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol.Today* **11**: 400-406.

- Ruggiero, G., Manzo, C., Fontana, S., Scala, G., Pirozzi, G., Ferrone S. und Zappacosta, S. (1987). Inhibition by anti-HLA class II monoclonal antibodies of monocyte-dependent T cell proliferation induced by monoclonal antibody OKT3. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1585-1592.
- Ruggiero, G., Racioppi, L., Manzo, C., Pirozzi, G., D'oro, U., Ferrone, S., Zappacosta S. und Fontana, S. (1991). HLA class II molecules on monocytes regulate T cell proliferation through physical interaction in the CD3 activation pathway. *Eur. J. Immunol.* **21**: 29-33.
- Russel, S. J. (1989). Interleukin-2 and T cell malignancies: an autocrine loop with a twist. *Leukemia* **3**: 755-757.
- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garret, P. J., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R. und Parham, P. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the $\alpha 3$ domain of HLA-A2. *Nature* **345**: 41-46.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Scholer, H., Haslinger, A., Heguy, A. Holtgreve, H., Karin, M. (1986). In vivo competition between a metallothionein regulatory element and the SV40 enhancer. *Nature* **232**: 76-80.
- Schraven, B., Samstag, Y., Altevogt, P. und Meuer, S. C. (1990). Association of CD2 and CD45 on human T lymphocytes. *Nature* **345**: 71-74.
- Shaw, M. K., Tilney, L. G. und Musoke, A.J. (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: evidence for MHC class I involvement *J. Cell. Biol.* **113**: 87-101.
- Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Siraganian, R., Wahl, L. und Shaw, S. (1989). Dual role of the CD44 in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* **143**: 2457-2463.
- Siekevitz, M., Feinberg, M. B., Holbrook, N., Wong-Staal, F. und Greene, W. C. (1987). Activation of interleukin 2 und interleukin 2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus, type I. *Proc. Natl. Sci. USA* **84**: 5389-5393.

- Sklar, M. D., Thompson, E., Welsh, M. J., Liebert, M., Harney, J., Grossman, H. B., Smith, M. und Prochownik, E. V. (1991). Depletion of *c-myc* with specific antisense sequences reverses the transformed phenotyp in *ras* oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3699-3710.
- Smith, K. A. (1988a). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**: 1169-1176.
- Smith, K. A. (1988b). The bimolecular structure of the interleukin 2 receptor. *Immunol. Today* **9**: 36-37.
- Smith, K. A. und Cantrell, D. A. (1985). Interleukin 2 regulates its own receptor. *Proc. Natl. Sci. USA* **82**: 864-868.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-433.
- St-Pierre, Y., Nabavi, N., Ghogowala, Z., Glimcher, L. H., und Watts, T. H. (1989). A functional role for signal transduction via the cytoplasmic domains of MHC class II proteins. *J. Immunol.* **143**: 808-813.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Büscher, M., Ponta, H. und Herrlich, P. (1988). The uv induced signal transduction pathway to specific genes. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser.* **83**: 1-13.
- Tanaka, T., Saiki, O., Doi, S., Hatakayama, M., Doi, T., Kono, T., Mori, H., Fujii, M., Sugamura, K., Negoro, S., Taniguchi, T. und Kishimoto, S. (1987). Functional interleukin 2 receptors on B cells lacking Tac antigens. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1379-1382.
- Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Sci. USA* **77**: 5201-5205.
- Tsuda, M., Goldman, C. K., Bongiovanni, K. F., Chan, W. C., Winton, E. F., Yagita, M., Grimm, E. A. und Walmann, T. A. (1987). The p75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **84**: 5394-5398.

- Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L. und Crabtree, G. R. (1990). Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: The missing link. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 421-452.
- Vaickus, L., Jones, V. E., Morton, C. L., Whitford K. und Bacon, R. N. (1989). Antiproliferative mechanism of anti-class II monoclonal antibodies. *Cellular Immunol.* **119**: 445-458.
- Valmu, L., Autero, M., Siljander, P., Patarroyo, M. und Gahmberg, C. G. (1991). Phosphorylation of the β -subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.* **21**: 2857-2862.
- Vega, M. A., Guigo, R., und Smith, T. F. (1990). Autoimmune response in AIDS. *Nature* **345**: 26.
- Wagner, H. und Eichmann, K. (1989). T-cell receptors and cellular interactions. *Immunol. Today* **10**: s25-s27.
- Walder, J. (1988). Antisense DNA and RNA: progress and prospects. *Genes Dev.* **2**: 502-504.
- Waldmann, T. A. (1989). The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 875-911.
- Weinberg, A. D., Shaw, J., Paetkau, V., Bleackley, R. C., Magnuson, N. S., Reeves, R. und Magnuson, J. A. (1988). Cloning of cDNA for the bovine IL-2 receptor (bovine Tac antigen). *Immunology* **63**: 603-610.
- Young, J. A. T. (1988). HIV and HLA similarity. *Nature* **333**: 215.