

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Biochemische und funktionale Untersuchungen zur
Regulation von ADP-Ribosylierungsfaktoren und
Proteintyrosinkinasen in der Aktivierung von
Lymphocyten

von
Thomas Knorr
aus
Pegnitz

München 2000

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Februar 1998 von Prof. Dr. W. Kolanus betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 7. Dezember 2000

(Thomas Knorr)

Dissertation eingereicht am 11. Dezember 2000

- | | |
|---------------|-------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. W. Kolanus |
| 2. Gutachter: | PD. Dr. M. Meisterernst |

Mündliche Prüfung am 14. März 2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus bin ich sowohl für die Vergabe des Themas dieser Dissertation sowie für die umfassende und hilfreiche Betreuung während der gesamten Zeit dankbar.

Herrn Dr. Wolfgang Nagel danke ich für die intensive Zusammenarbeit, für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfestellung bei der Planung und Realisierung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für das hervorragende wissenschaftliche Umfeld, das er durch die Gründung des Münchner Genzentrums geschaffen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und das gute Arbeitsklima bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Lutz Zeitlmann für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich bei der Verwirklichung meines wissenschaftlichen Werdeganges mit allen Kräften unterstützt haben.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt jedoch meiner Frau Simone, die mich bei dieser Arbeit tatkräftig unterstützte und mir immer liebevoll zur Seite stand.

Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1996 bis September 2000 im Labor von Dr. Waldemar Kolanus am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen bzw. Manuskripten verwendet:

1. **Zeitmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P., Kolanus, W.** (1998). T cell activation by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70 (1998). *J Biol Chem.* **273**(25), 15445-52
 2. **Knorr, T., Nagel, W., Kolanus, W.** (2000). Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of Cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur J Biochem.* **267**(12), 3784-3791
 3. **Gawaz, M. , Besta, F., Ylänne, J., Knorr, T., Dierks, H. and Kolanus, W.** (2001). Differential regulation of cell surface expression and internalization of the β_3 integrin A isoform by the β_3 -endonexin pathway. *J. Cell Sci.*, **114**(Pt 6): 1101-1113
 4. **Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Böhm, T., Knorr, T., Jackson, C.L., Kolanus, W. and Famulok, M.** (2000). Specific RNA-aptamer based inhibition of cytohesin-family guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factors. (submitted)
 5. **Kliche, S., Nagel, W., Atzler, C., Knorr, T., Koszinowski, U., Kolanus, W. and Haas, J.** (2000). Cellular Transformation by Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Kaposin A is mediated through Cytohesin-1. (submitted)
-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	T-Zell vermittelte Immunität durch den T-Zell-Rezeptor-Komplex	2
1.2	Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über den TCR-Komplex sowie über kostimulatorische Signale	6
1.3	Adhäsion von T-Zellen	8
1.3.1	Selectine (CD62)	9
1.3.2	Integrine	9
1.3.2.1	Regulation der Integrin Funktion	12
1.3.2.2	Signaltransduktion durch LFA-1 erfolgt über assoziierte Proteine	13
1.3.2.3	Sec7-Domäne katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der ARF Proteine	15
2	Aufgabenstellung	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Laborgeräte	19
3.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	20
3.1.3	Radiochemikalien	21
3.1.4	Enzyme	22
3.1.5	Kommerzielle Reaktionssysteme	22
3.1.6	Antikörper	22
3.1.7	Medien /Seren für eukaryontische Zellkulturen	22
3.1.8	Medien für prokaryontische Kulturen	23
3.1.9	Molekularbiologische Hilfsmittel	23
3.1.10	Lösungen und Puffer	23
3.1.11	Bakterienstämmen	23
3.1.12	Eukaryontische Zelllinien	24
3.1.13	Virusstämmen und Phagenstämmen	24
3.1.14	DNA- und Protein-Längenstandards	25
3.1.15	Plasmide	25
3.1.16	Proteinfusionsanteile	26
3.1.17	Oligodesoxyribonukleotide	26

3.2 Methoden	28
3.2.1 Kultivierung von prokaryontischen Zellen	28
3.2.1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten	28
3.2.1.2 Flüssigkulturen von E.coli	28
3.2.1.3 Anlegen eines Bakterien-Gefrierstocks	29
3.2.2 Transformation von Prokaryonten	29
3.2.2.1 Herstellen kompetenter E.coli nach der Calciumchlorid-Methode	29
3.2.2.2 Transformation kompetenter E.coli	30
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	30
3.2.3.1 Mini-Präparation („Boil-Lysis“-Methode)	30
3.2.3.2 Mini-Präparation („Alkalische Lyse“-Methode)	31
3.2.3.3 Maxi-Präparation („CsCl-Gradient“-Methode)	32
3.2.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	32
3.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion	33
3.2.5 Fällung des PCR-Produktes	35
3.2.6 Herstellen rekombinanter DNA	35
3.2.6.1 Restriktionsverdau von DNA	35
3.2.6.2 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase	36
3.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.2.6.4 Ligation	36
3.2.6.5 DNA-Mutagenisierungsverfahren nach Kunkel	37
3.2.6.5.1 Gewinnung von Einzelstrang-Phagen-DNA	37
3.2.6.5.2 Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids	38
3.2.6.5.3 Synthese des mutierten DNA-Stranges	39
3.2.7 Sequenzierung	39
3.2.7.1 Sequenzier-Reaktion	40
3.2.7.2 Sequenzier-Gelelektrophorese	40
3.2.8 Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine mit 6xHis-Fusionsanteil aus E.coli	41
3.2.8.1 Proteinexpression	41
3.2.8.2 Präparation des exprimierten Fusionsproteins	42
3.2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	43
3.2.9 Methoden der eukaryontischen Zellkultur	43
3.2.9.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	43
3.2.9.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen	43
3.2.9.1.2 Kultivierung adhärenter Zellen	43
3.2.9.2 Anlegen eines Gefrierstocks aus Eukaryonten-Zellen	44
3.2.10 Transfektion von eukaryontischen Zellen	44
3.2.10.1 DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS-7m6-Zellen	44

3.2.10.2	Transfektion humaner T-Zellen durch Elektroporation	45
3.2.10.3	Infektion eukaryontischer Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren	45
3.2.10.3.1	Herstellen rekombinanter Viren	45
3.2.10.3.2	Selektion rekombinanter Viren	46
3.2.10.3.3	Identifikation rekombinanter Viren	47
3.2.10.3.4	Vermehrung rekombinanter Viren	47
3.2.10.3.5	Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren	47
3.2.11	Aufschluß eukaryontischer Zellen	48
3.2.12	Trennung von cytoplasmatischen und membranständigen Proteinen	49
3.2.13	Immunpräzipitation von Proteinen	50
3.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	50
3.2.14.1	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen	52
3.2.15	Immunblot (Western Blot)	52
3.2.15.1	Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran	52
3.2.15.2	Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembran mit Antikörper	53
3.2.15.3	„Stripping“ von Nitrozellulosemembranen	54
3.2.16	Immuncytochemie	54
3.2.16.1	Nachweis von Proteinen durch die FACS-Analyse	54
3.2.16.2	Nachweis von Proteinen durch die Fluoreszenzmikroskopie	55
3.2.17	Radioaktive in vitro Proteinphosphorylierung	56
3.2.18	Zweidimensionale Phosphopeptidkartierung	56
3.2.19	Messung der IL-2 Promotoraktivität nach T-Zell-Aktivierung	57
3.2.20	In vitro Interaktionsuntersuchungen von Proteinen („Cross-Pulldown“-Methode)	58
3.2.21	In vitro GDP/GTP Austauschreaktion	58
3.2.22	Liposomen-Präparation	59
4	Ergebnisse	61
4.1	Cytohesin-1 vermittelt Adhäsion von T-Zellen an ICAM	61
4.2	Die Sec7-Domäne katalysiert in vitro unspezifisch die GTP-Bindung an die ARF-GTPasen	62
4.3	Klonierung der ARF-Proteine	63
4.4	Erzeugen von ARF-Fusionsproteinen	64
4.5	Biochemische Untersuchungen zur Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion der ARF Proteine in Abhängigkeit von Cytohesin-1	66
4.5.1	Prokaryontische Expression und Aufreinigung von ARF Proteinen	66

4.5.2	Gründe für die fehlende Modifikation rekombinanter ARF6 Proteine durch die N-Myristoyltransferase in einem prokaryontischen Expressionssystem	68
4.5.3	Der Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 wird durch Phospholipide reguliert	69
4.6	Untersuchungen zur Aktivität und Funktion eukaryontisch exprimierter ARF Proteine	72
4.6.1	Die Mutation spezifischer Aminosäuren führt zu GTP-bindungsdefizienten und GTPase-inaktiven ARFs	72
4.6.2	ARF Konstrukte werden in hoher Dichte in eukaryontischen Zellen nach Infektion mit rekombinanten Vaccinia Virus exprimiert	73
4.6.3	Die Expression der ARFs erfolgt in vivo in distinkten Kompartimenten	76
4.6.3.1	Die zelluläre Lokalisation wird durch das gebundenen Guaninnukleotid determiniert.	76
4.6.3.2	Die N-terminale Modifikation der ARF-Fusionsproteine bestimmt die subzelluläre Lokalisierung	78
4.6.4	Cytohesin-1 interagiert sowohl in vivo als auch in vitro mit ARF1, ARF5 und ARF6	80
4.6.4.1	Cytohesin-1 interagiert mit ARF1, ARF5 und ARF6 sowohl in der GDP als auch in der GTP-gebundenen Form	82
4.6.4.2	Kolokalisierung von Cytohesin-1 mit ARF6 an Lipidmembranen bewirkt Interaktion	83
4.6.5	Katalytische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 auf eukaryontisch exprimierte ARF Proteine	85
4.6.5.1	Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch von immobilisiertem eukaryontisch exprimierten ARF Proteinen	85
4.6.5.2	Der Einfluß von Lipidmembranen auf den GDP/GTP-Austausch	88
4.6.5.3	PtdIns(4,5)-P ₂ - und PtdIns(3,4,5)-P ₃ - Abhängigkeit des Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6	89
4.6.6	Die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF1 und ARF6 kompetitiert mit der Cytohesin-1/CD18-Interaktion	92
4.6.7	Dominant negative und positive Mutanten von ARF1 und ARF6 beeinflussen Zelladhäsion und Cytoskelett nicht	97
4.7	ARF6 besitzt Signalfunktion in aktivierten T-Zellen	99
4.7.1	GTP-gebundenes ARF6 aktiviert den IL-2 Promotor in T-Zellen	99
4.7.2	Die Internalisierung des T-Zell Rezeptors wird nicht durch ARF6 reguliert.	102
4.7.3	ARF6 ist nicht direkt in die Signalwege der Rho GTPasen involviert	105
4.7.3.1	Die Interaktion von Vav und ARF6 in der IL-2 Aktivierung	105
4.7.3.2	Die Aktivierung der c-Jun NH ₂ -Kinase	106
4.7.3.3	ARF6 und Rho GTPasen	108

4.8 T-Zell Aktivierung durch ZAP-70 erfolgt über den Phosphorylierungsstatus diverser Tyrosinreste	111
4.8.1 Die Phosphorylierung von ZAP-70 in vivo wird durch die Tyrosinreste 597 und 598 reguliert	112
4.8.2 Die Kinase-Aktivität von ZAP-70 ist notwendig für die Phosphorylierung der ζ -Kette und die Assoziierung von ZAP-70 an die ζ -Kette.	114
4.8.2.1 Kinaseaktivität von ZAP-70 vermittelt differenzierte Phosphorylierung der ζ -Kette in Jurkat E6	114
4.8.2.2 Die Phosphorylierung der ζ -Kette und die Assoziierung von ZAP-70 an die ζ -Kette verläuft in COS-7m Zellen ohne TCR/CD3-assoziierte Kinasen	115
4.8.3 Bindung von ZAP-70 an die phosphorylierte ITAM-Domäne von der ζ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von ZAP-70.	117
4.8.4 ζ -assoziiertes ZAP-70 (YF-C) zeigt in vitro eine moderate Erhöhung der katalytischen Aktivität	119
4.8.5 ζ -assoziiertes ZAP-70 zeigt erhöhte Autophosphorylierungsaktivität an bestimmten Tyrosinresten	120
5 Diskussion	123
5.1 Cytohesin-1 reguliert die Bindung von LFA-1 an ICAM-1	123
5.2 Sec7-Domäne von Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der ADP-Ribosylierungsfaktoren	123
5.2.1 In vitro katalysiert die Sec7-Domäne den Guaninnukleotid Austausch von ARF1 und ARF6	125
5.2.2 ARF/Sec7-Interaktion	127
5.2.3 Myristoylierung hat Einfluss auf die induzierte GTP Bindung von ARF-Proteinen	129
5.2.3.1 Myristoylierung von ARF6	129
5.2.3.2 Lokalisation und Funktion sind von der Myristoylierung abhängig	130
5.2.3.3 Die Membranaffinität ist abhängig vom gebundenen Guanin-Nukleotid	131
5.2.3.4 Die Interaktion von ARF mit Membranen ist für ihre Aktivierung wichtig	132
5.2.4 Die Regulation des Guaninnukleotid Austausches durch Lipid-modifizierende Proteine	133
5.2.4.1 Lipide beeinflussen die Proteininteraktion und Aktivität der ARF Proteine	133
5.2.4.2 Die Initiation der ARF-Aktivierung	135
5.2.4.3 Die ARFs werden zu distinkten Membrankompartimenten dirigiert und erfüllen verschiedene Aufgaben	136
5.2.5 Die Regulation der ARF-Aktivität in der Zelle	137
5.3 Cytohesin-1 reguliert β_2 -Integrin vermittelte Adhäsion sowohl durch Interaktion mit LFA-1 als auch ARF-GEF Funktion	142

5.4	Mögliche Regulation der Integrinfunktion durch ARF	144
5.4.1	ARF6 stimuliert den IL-2-Promotor	145
5.4.2	Die Regulation der Signaltransduktion durch den gerichteten Vesikeltransport	148
5.5	T-Zell Aktivierung und ZAP-70	149
5.5.1.1	Die Kinaseaktivität wird durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten reguliert	150
5.5.1.2	Die Tyrosine 597 und 598 regulieren die Phosphorylierung diverser zellulärer Proteine	151
5.5.1.3	Die Phosphorylierung der ζ -Kette wird durch ZAP-70 vermittelt	152
5.5.1.4	Die Tyrosine 597 und 598 inhibieren die Phosphorylierung distinkter Tyrosinreste	153
6	Zusammenfassung	155
7	Literaturverzeichnis	157
8	Anhang	184
8.1	Abkürzungen	184
8.1.1	Allgemein	184
8.1.2	Einheiten	186
8.1.3	Vorsätze	186
8.1.4	Abkürzungen der Nukleoside bzw. Nukleotide	187
8.1.5	Abkürzungen der Aminosäuren	187
9	Lebenslauf	188

1 Einleitung

Die Immunität eines Organismus beruht auf der Fähigkeit, Infektionen mit einem Pathogen oder Mikroorganismen gezielt zu begegnen. Sowohl die angeborene Immunität als auch die erworbene Immunität basieren auf der Reaktion weißer Blutzellen (Leukocyten). Die angeborene (adaptive) Immunität wird zu einem großen Teil von den Granulocyten getragen. Die Granulocyten bilden eine Gruppe verschiedenartiger Zellen, zu der sowohl die Makrophagen als auch die Phagocyten gehören. Die erworbene oder adaptive Immunantwort beruht auf den Lymphocyten. Die Lymphocyten werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: die B-Lymphocyten oder B-Zellen und die T-Lymphocyten oder T-Zellen. Sowohl die B- als auch T-Lymphocyten entstehen im Knochenmark, aber nur die B-Zellen reifen auch dort. Die T-Zellen wandern zur Reifung aus dem Knochenmark in den Thymus. Nach der vollständigen Reifung gelangen beide Typen von Lymphocyten ins Blut, von wo aus sie zu den peripheren lymphatischen Organen wandern, um über die Lymphknoten wieder in den Blutstrom zu gelangen.

Die B-Zellen vermitteln dabei die humorale Immunantwort. Der Antigenrezeptor der B-Zellen ist ein membrandurchspannendes Immunglobulinmolekül der Zelloberfläche, das mit den invarianten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ -Ketten in einem nichtkonvalentem Komplex assoziiert ist. Werden B-Zellen durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert, so differenzieren sie sich zu Plasmazellen, die IgM -Antikörper mit der Spezifität des ursprünglichen Rezeptors ausbilden.

Die T-Zellen bilden die Grundlage der Zell-vermittelten Immunantwort. Charakteristisch für die T-Zellen sind die heterodimeren Antigenrezeptoren, die mit den Proteinen des $CD3$ -Komplexes assoziiert sind. Die meisten T-Zellen tragen $\alpha:\beta$ heterodimere Rezeptoren, jedoch besitzt die Subpopulation der $\gamma:\delta$ -T-Zellen $\gamma:\delta$ heterodimere Rezeptoren. Das charakteristische Merkmal der Antigenerkennung durch T-Zellen ist die Form des Liganden, der von dem T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt wird. Dieser besteht aus einem Peptid, das von einem fremden Antigen stammt und an ein Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekül (major histocompatibility complex, MHC) gebunden ist. Die MHC-Moleküle können in zwei Klassen eingeteilt werden. Für jeden Typ eines MHC-Moleküls gibt es mehrere Gene, die in einem Cluster im Haupthistokompatibilitätskomplex angeordnet sind. MHC-Klasse I binden Peptide aus Proteinen, die im Cytosol abgebaut werden. Fremde Proteine, die von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, stammen von viralen Infektionen der Zelle. Zellen, die fremde Proteine an MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren, werden von $CD8$ -T-Zellen oder cytotoxischen T-Zellen erkannt und abgetötet. Da alle Zellen mit Kern von viralen Infektionen betroffen sein können, werden MHC-Klasse-I-Moleküle auf fast allen Zellen exprimiert. MHC-Klasse-II-Moleküle, die den $CD4^+$ -T-Zellen Peptide präsentieren, binden Peptide von Proteinen, die in lysosomalen Vesikeln abgebaut werden. Dazu zählen Proteine, die von phagocytierenden Makrophagen bzw. nach Bindung an den Antigenrezeptor der B-Zellen (BCR) durch Endocytose aufgenommen werden. $CD4^+$ -T-Zellen unterteilen sich in die inflammatorischen T_H1 -Zellen, die T_H2 oder $CD4^+$ -T-Helferzellen und die T_H3 -Zellen, die den transformierenden Wachstumsfaktor- β als Reaktion auf Antigene, aufgenommenen über die Mundschleimhaut, produzieren. T_H1 -Zellen aktivieren Makrophagen, so dass diese intravesikuläre Bakterien in ihrem Inneren töten; T_H2 -Zellen veranlassen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern.

Die Differenzierung zu bewaffneten T-Effektorzellen und Aktivierung der aus dem Thymus entlassenen naiven T-Zellen erfolgt durch Kontakt des spezifischen Antigens auf der Oberfläche

professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) in den peripheren lymphatischen Organen. Diese spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen erkennt man anhand bestimmter Oberflächenmoleküle, die mit spezifischen Antigenen bei der Aktivierung naiver T-Zellen zusammenwirken. Die wichtigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen sind Makrophagen und dendritische Zellen, deren einzige bekannte Funktion in der Antigenpräsentation besteht. Das erste Zusammentreffen einer naiven Zelle mit einem Antigen auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle führt zu einer primären Immunantwort und zur Differenzierung zu T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen. Neben der Erkennung des Antigens, das an ein MHC-Molekül gebunden ist, werden weitere kostimulierende Signale von professionellen antigenpräsentierenden Zellen benötigt. Die Aktivierung naiver Zellen nach einem ersten Zusammentreffen mit Antigenen auf der Oberfläche einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle wird als „priming“ bezeichnet. Im Unterschied dazu stehen die Reaktionen der bewaffneten T-Effektorzelle und die Antwort der aktivierten T-Gedächtniszellen auf das Antigen. Daher besitzt eine T-Zelle im Laufe ihrer Entwicklung verschiedenartige Oberflächenrezeptoren, welche die Reifung, Differenzierung als auch Aktivierung steuern.

1.1 T-Zell vermittelte Immunität durch den T-Zell-Rezeptor-Komplex

Jeder T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem CD3-Komplex. Der TCR wird aus zwei verschiedenen glykosylierten Polypeptidketten, der T-Zell-Rezeptorkette- α und der β -Kette, die durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind, gebildet. Die α : β -Heterodimere sind für die Antigenerkennung aller funktionalen Klassen von T-Zellen verantwortlich (Bentley und Mariuzza, 1996). Der T-Zell-Rezeptor aus dem γ : δ Heterodimer wird auf 1- 5% aller CD3-positiven T-Zellen exprimiert und kommt hauptsächlich im Epithel vor. Die genaue Funktion dieser T-Zell-Subpopulation ist unklar, jedoch scheinen sie an der Immunantwort infizierter Epithelzellen beteiligt zu sein (Chien *et al.*, 1996). Die α -Ketten werden durch Rekombination der V_{α} - und J_{α} -Gensegmente gebildet und bewirken deren polymorphe Struktur. Die β -Ketten haben zusätzlich zu den V_{β} - und J_{β} -Segmenten noch D_{β} -Segmente. Diese rekombinatorische Kapazität der α - und β -Ketten und die Vielzahl der V-, D- und J-Gensegmente bilden die Grundlage für die hohe Variabilität des T-Zell-Rezeptors und für die Erkennung zahlreicher Antigene. Keine der Ketten des T-Zell-Rezeptor Heterodimers besitzt eine enzymatisch aktive cytoplasmatische Domäne, welche die Übertragung von Signalen nach Bindung des Antigens durch den TCR in das Zellinnere ermöglicht.

An der Aktivierung der T-Zellen ist der CD3-Komplex beteiligt. Der CD3-Komplex besteht aus 3 transmembranen Proteinen, CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ sowie den dimeren ζ -Ketten, die mit dem TCR an der Plasmamembran assoziiert sind. Die CD3-Proteine sowie die ζ -Kette sind für die Expression des TCR an der Zelloberfläche wichtig. Sie besitzen einen extrazellulären Immunglobulinanteil. Die ζ -Ketten bilden ein Dimer, das über Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die ζ -Ketten Dimere sind nichtkovalent mit dem TCR und dem CD3-Komplex assoziiert. Die ζ -Kette ist ein transmembranes Protein mit einer kurzen, aus 9 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Domäne. Der 24 Aminosäure langen transmembranen Domäne schließt sich der cytoplasmatische Bereich aus 115 Aminosäuren an. Die cytoplasmatische Domänen der ζ -Kette sowie der CR3-Proteine enthalten Sequenzmotive, die als Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivator-domäne oder ITAMs (immunreceptor tyrosine-based activation motifs) bezeichnet werden. Die ζ -Kette besitzt drei aufeinanderfolgende ITAM-Motive, während die CD3-Proteine CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ nur jeweils ein ITAM besitzen. Die ITAMs haben als gemeinsames Merkmal zwei YxxL-Motive (Y: Tyrosin; L: Leucin; x: variable Aminosäure), die 6 – 8 Aminosäuren voneinander distanziert sind. Allein diese ITAM-Motive

ermöglichen es dem TCR-Komplex nach Stimulierung des TCR durch Antigen mit cytosolischen Proteintyrosinkinasen zu assoziieren und so das Signal in das Zellinnere zu übertragen (Malissen und Malissen, 1996).

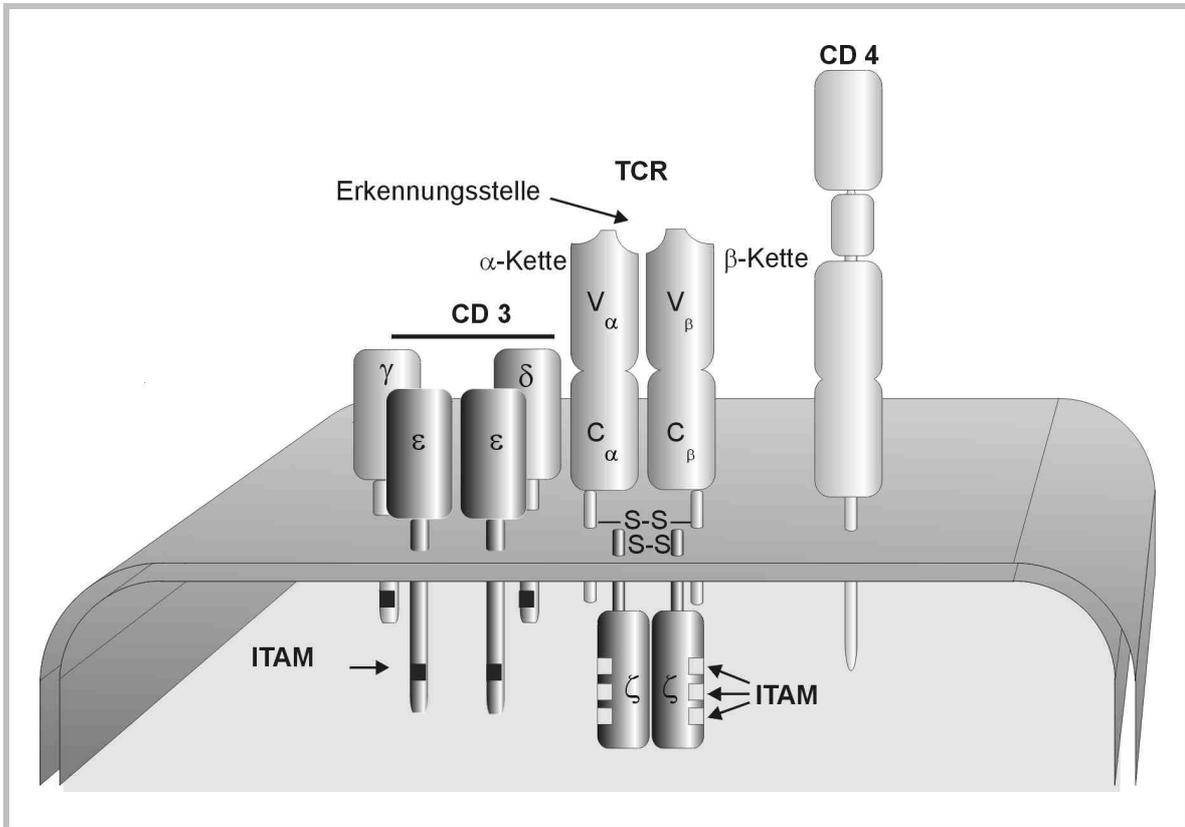


Abbildung 1.1.1: Struktur des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes

Der T-Zell-Rezeptorkomplex besteht aus dem antigenbindenden T-Zell-Rezeptor (TCR) sowie den signalvermittelnden Untereinheiten (δ , ϵ , γ und ζ) des CD3-Komplexes. CD4 sowie CD8 (hier nicht angegeben) sind Corezeptoren, die an der TCR/Antigen-Wechselwirkung durch Bindung an die MHC-Moleküle beteiligt sind.

Die Untereinheiten des CD3-Komplexes, die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors sowie CD4 gehören zur Immunglobulinsuperfamilie. Die Anzahl der Immunglobulin-domänen ist schematisch angegeben. Die cytoplasmatische Domäne der δ -, ϵ - und γ -Untereinheiten des CD3-Komplexes besitzen jeweils eine, die der ζ -Ketten jeweils 3 Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivator-domänen (ITAMs).

Für die Signaltransduktion des aktivierten T-Zell-Rezeptor-Komplexes ist die Assoziation der Corezeptoren CD4 bzw. CD8 erforderlich. CD4 ist ein einzelkettiges Molekül aus vier immunglobulinartigen Domänen und bindet MHC-Klasse-II Molekül (vgl. Abbildung 1.1.1). Das CD8-Molekül dagegen ist ein, durch eine Disulfidbrücke verbundenes, Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette. CD8 nimmt Kontakt mit MHC-Klasse-I Molekülen auf. Beide Ketten besitzen eine einzelne immunglobulinartige Domäne. CD4 sowie CD8 gehören auf Grund ihrer Struktur zur Superfamilie der Immunglobuline. Sowohl die cytoplasmatische Domänen von CD4 als auch CD8 interagieren mit der lymphozytenspezifischen Src-Proteintyrosinkinase Lck ($p56^{lck}$). Durch Stimulation des TCR/CD3-Komplexes und der dadurch bedingten Aggregation kommt es zur Aktivierung von Lck und Fyn, einer weiteren Kinase der Src-Familie. Daraus resultiert die differentielle Phosphorylierung der beiden Tyrosine in dem ITAM-Motiv der ζ -Kette (Kersh *et al.*, 1998). Die

Phosphorylierung beider Tyrosinreste induziert die Rekrutierung von ζ -Ketten assoziiertem Protein-70 (Zap-70) über die intrinsischen SH2-Domänen, welche die Bindung an phosphoryliertes ITAM vermitteln (Iwashima *et. al.*, 1994; Huby *et. al.*, 1997). Die Aktivierung von Zap-70 benötigt die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr-493 durch die Src-Kinasen Lck oder Fyn. Aktiviertes ZAP-70 wiederum phosphoryliert SLP-76 und LAT (Zhang W. *et. al.*, 1998, Finco *et. al.*; 1998) und löst somit die Ras/MAPK und PLC γ 1 Signalkaskade aus. Tyrosinphosphoryliertes LAT bindet an die SH2 Domäne von Grb2, das Sos an die Plasma Membran rekrutiert. Sos aktiviert Ras und initiiert damit den Signalweg ausgehend von Ras über Raf-1 und MEK über ERK bis zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und AP-1.

Zudem rekrutiert Tyrosin-phosphoryliertes LAT, das konstitutiv in Glycolipid-angereicherten Mikrodomänen lokalisiert ist, PLC γ 1 zur Membran und bringt dadurch PLC γ 1 in räumliche Nähe zu dessen Substrat Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) (Wang und Samelson, 1996). Dadurch werden die Second Messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃, Ins(1,4,5)P₃) gebildet. IP₃ erhöht durch Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und induziert dadurch die Ca²⁺-vermittelte Aktivierung über Calcineurin von NF-AT. DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, die letztendlich unter anderem in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 resultiert. Darüber hinaus scheint phosphoryliertes SLP-76 die Rekrutierung der Tec-Kinase Itk an die Membran zu induzieren. Itk aktiviert durch Phosphorylierung PLC γ 1, das möglicherweise direkt mit SLP-76 interagiert (Su *et. al.*, 1999; Perez-Villar und Kanner, 1999).

Tyrosin-phosphoryliertes SLP-76 ermöglicht die Rekrutierung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Vav über dessen SH2-Domäne (Wu *et. al.*, 1996). Vav wird durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert und induziert über das G-Protein Rac-1 die Aktivierung der c-Jun-Kinase (JNK). Dieser Komplex ist zudem zusammen mit weiteren Proteinen, wie Nck und Pak-1, für die Regulation des Cytoskeletts und dessen Umstrukturierung wichtig.

Die genannten intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes werden in der Abbildung 1.1.2 schematisch im Überblick dargestellt:

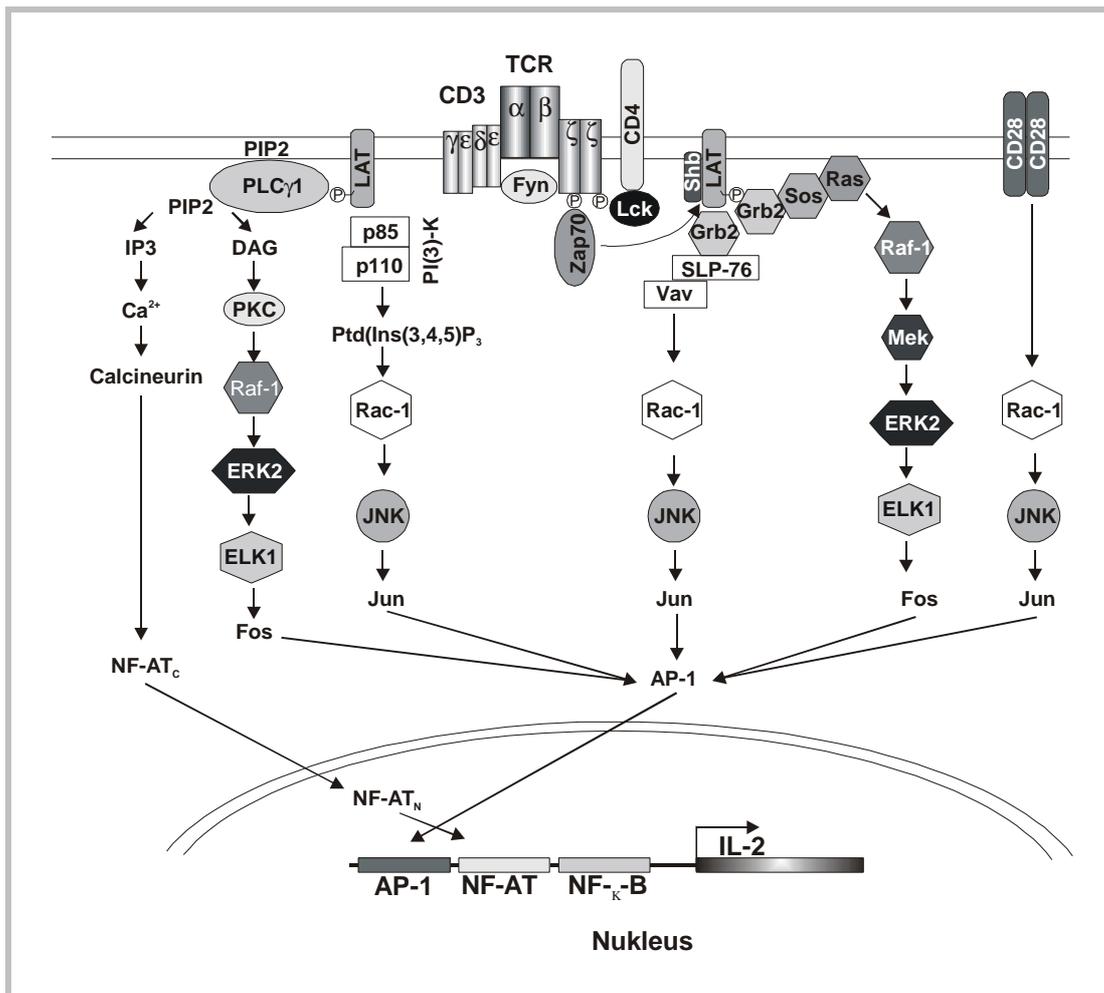


Abbildung 1.1.2: **Signaltransduktion in T-Zellen nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes**

Die Aktivierung des T-Zell-Antigenrezeptors durch den MHC/Peptid-Komplex induziert die Aktivierung der Proteintyrosinkinasen Fyn, Lck und Zap-70. Daraus resultiert die Phosphorylierung von LAT. LAT koppelt zahlreiche Signalwege an den aktivierten TCR. Die Aktivierung der Phospholipase C γ 1 führt zur Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol(1,4,5)-Trisphosphat (IP $_3$). Als weiteres Enzym des Inositol-Lipid-metabolismus wird die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI-(3)-K) aktiviert, die zur Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (Ptd(I3,4,5)P $_3$) führt. Durch die Bindung von Grb2 an phosphoryliertes LAT wird der durch Ras und Vav vermittelte Signalweg induziert. Alle bezeichneten Signalwege führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-AT, die an ihre jeweiligen Erkennungssequenzen im IL-2-Promotor binden.

Die hier skizzierten Vorgänge geben ein nur ungenügendes Bild der Wechselwirkungen der genannten Moleküle. Sie stellen vielmehr schematisch die Vielzahl der Signalwege dar, die durch Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes induziert werden (Abbildung 1.1.2). Neuere Studien haben begonnen die Signalereignisse nach TCR-Stimulation im zellbiologischen Kontext zu erforschen. Ein Bereich der Untersuchungen richtet sich dabei auf die membranen Subdomänen, in denen Cholesterol und Glycosphingolipide angereichert sind und die als GEMs, DIGs oder Lipid-Rafts bezeichnet werden (Xavier *et. al.*, 1998). Diese sind allgemein definiert als Lipid Fraktionen, die bei einer niedrigen Konzentration nicht-ionischen Detergenz unlöslich sind. In ihnen sind acetylierte und Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verbundene Proteine signifikant konzentriert. Nach Stimulation des TCR wird eine Reihe von Proteinen, die keinen Lipidrest besitzen, in die Lipid-Rafts rekrutiert. Die Rolle der Lipid-Rafts sowie der Mechanismus der Rekrutierung einzelner Komponenten in diese

Membranbereiche ist noch unklar, jedoch gibt es einzelne funktionale Hinweise. Die Lipid-Rafts scheinen kostimulatorisch zur Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes an der Reorganisation des Actin-Cytoskeletts beteiligt zu sein (Moran und Miceli, 1998; Viola *et al.*, 1999; Harder und Simons, 1999). Nach einem neuen Modell stellt ein frühes Ereignis der T-Zell-Aktivierung die Ausbildung einer „immunologischen Synapse“ dar, einer Formation einer stabilen Interaktion zwischen dem TCR/CD3-Komplex und dem MHC/Peptid-Komplex. (Monks *et al.*, 1998; Monks *et al.*, 1997; Dustin und Shaw, 1999). Die Formation dieser immunologischen Synapse wird durch Integrine unterstützt, die eine Ansammlung aktivierter TCR-Komplexe umschließen (Grakoui *et al.*, 1999).

1.2 Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über den TCR-Komplex sowie über kostimulatorische Signale

Die Bindung eines Liganden an den T-Zell-Rezeptor und die Aktivierung des TCR-Komplexes stellt kein ausreichendes Signal dar, um die Proliferation und Differenzierung naiver Zellen zu bewaffneten Effektorzellen zu stimulieren. Die am besten charakterisierten kostimulierenden Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen sind die strukturverwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Diese sind homodimere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie und werden ausschließlich auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, wie den Makrophagen oder dendritischen Zellen, exprimiert. Der Rezeptor für die B7-Moleküle auf den naiven T-Zellen ist CD28, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Das kostimulatorische Signal von CD28 in Verbindung mit dem aktivierten TCR/CD3-Komplex führt zum Wechsel der naiven Zelle von der G₀- in die G₁-Phase. Dies induziert zugleich die Synthese des Cytokins Interleukin-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors. Die α -Kette bildet mit den konstitutiv exprimierten β - und γ -Ketten einen hochaffinen IL-2-Rezeptor (Wang und Smith, 1987). Die Bindung von IL-2 an den trimeren IL-2-Rezeptor liefert ein essentielles Signal, um Apoptose oder Anergie zu vermeiden, die durch Signale des aktivierten TCR/CD3-Komplex induziert werden (Hatakeyama *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1994; Lenschow *et al.*, 1996; Chambers und Allison, 1997; Gomez *et al.*, 1998). CD28 stellt den einzigen Corezeptor naiver Zellen dar. In aktivierten Zellen wird darüber hinaus die Expression der Rezeptoren CTLA-4 (cytotoxische T-Lymphocyten Antigen-4) und ICOS (induzierbarer Costimulator) induziert (Hutloff *et al.*, 1999). Beide sind strukturell mit CD28 verwandt, jedoch besitzt CTLA-4 eine 20-mal höhere Bindungsaffinität zu den B7-Proteinen als CD28. CTLA-4 ist ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung, da es die IL-2-Produktion limitiert. ICOS fördert dagegen die Proliferation der T-Zellen sowie die Produktion verschiedener Cytokine (vgl. Tabelle 1.2.1), jedoch nicht die Produktion von IL-2. ICOS spielt möglicherweise für T_H1- und T_H2-Zellen bei der Förderung der B-Zell-Proliferation zu Gedächtniszellen und Plasmazellen durch IL-10 eine Rolle (Hutloff *et al.*, 1999, Coyle *et al.*, 2000).

Die Interaktion von LFA-1 aus der Integrin Familie (vgl. 1.3.2) mit seinen Liganden, den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM)-1, -2 und -3, spielt eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Lub *et al.*, 1995). Die Bedeutung der LFA-1/ICAM-1 Interaktion in der T-Zell Kostimulation wurde durch die Verwendung TCR-transgener Maus-Modelle erkannt. Die Abwesenheit von LFA-1 in Gegenwart von CD28 führt zu einer Verringerung der Sensivität des TCR/CD3-Komplexes zu dem MHC/Peptid-Komplex (Bachmann *et al.*, 1997). Salomon und Bluestone (1998) konnten anhand TCR-transgener T-Zellen zeigen, dass die LFA-1/ICAM-1-Interaktion die Cytokin-Produktion in T_H2-Zellen supprimiert.

CD2 sowie SLAM, ein Mitglied der CD2 Subfamilie der Immunglobulinsuperfamilie, sind weitere Moleküle, die bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielen. CD2 bindet an CD58 (LFA-3) und ist an der IL-2-Stimulation ruhender T-Zellen beteiligt. SLAM steigert in kultivierten T-Gedächtniszellen die IFN- γ Produktion (Aversa *et. al.*, 1997). Die Überexpression des SLAM assoziierten Proteins (SAP) führt zur Aktivierung des IL-2-Promotors nach Ligation von SLAM in Jurkat T-Zellen.

Die Familie der TNF Rezeptoren steigert die Proliferation der T-Zellen. 4-1BB wird auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert und stimuliert die IL-2-Produktion in ruhenden T-Zellen in Abwesenheit des CD28 Signals nach Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes (DeBenedette *et. al.*, 1997; Chu *et. al.*, 1997; Saoulli *et. al.*, 1998). Der Ligand 4-1BBL wird auf normalen B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert (Hurtado *et. al.*, 1997). 4-1BB spielt möglicherweise eine Rolle, die T-Zell-Aktivierung nach Endocytose von CD28 aufrecht zu erhalten (Watts und DeBenedette, 1999). Wie 4-1BB ist die Expression von OX40 auf aktivierte T-Zellen beschränkt. Die Bindung des Liganden OX40L an OX40 stimuliert die Proliferation und die IL-2-Produktion zusammen mit der Aktivierung von CD28 durch B7-Proteine (Higgins *et. al.*, 1999). CD27 steigert jedoch nach Bindung an den Liganden CD70 nur mäßig die IL-2-Produktion, fördert jedoch die T-Zell-Proliferation und die TNF- α -Produktion. Da sowohl CD27 als auch CD70 auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und CD70 nicht auf dendritischen Zellen vorkommt, wurde vermutet, dass die CD27/CD70-Interaktion während der T-Zell/T-Zell-Interaktion die T-Zell Expansion nach initialer Aktivierung durch CD28 unterstützt (Lens *et. al.*, 1998).

Die nachfolgende Tabelle gibt eine kurze Übersicht über einige kostimulatorische Moleküle in T-Zellen, deren Liganden und die wichtigsten zellulären Funktionen:

Rezeptor (Familie)	Signal (naive T- Zellen)	Ligand (Familie)	Funktion und Eigenschaften Assoziierte Signalmoleküle und Funktion
CD28 ⁽¹⁾ (CD28 Subfamilie)	Ja	B7.1 und B7.2 (Ig Superfamilie)	<ul style="list-style-type: none"> • Induziert IL-2 Produktion • vermeidet Apoptose / Anergie • Effekt auf CD4+ > CD8+ T-Zellen
CTLA-4 ⁽²⁾ (Ig Superfamilie)	Nein	B7.1 und B7.2 (Ig Superfamilie)	
ICOS ⁽³⁾ (CD28 Subfamilie)	Nein	B7RP-1 (Yoshinaga <i>et. al.</i> , 1999) GL50 (Ling <i>et. al.</i> , 2000)	<ul style="list-style-type: none"> • Nur auf aktivierten T-Zellen • Produktion von IL-4, IL-5, IFN-γ, TNF-α und GM-CSF • Erhöht IL-10 aber nicht IL-2 Produktion
LFA-1 (CD11a/CD18) ⁽⁴⁾ (Integrin Familie)	Nein	ICAM-1,-2,-3 (Ig Superfamilie)	<ul style="list-style-type: none"> • Adhäsion und cytoskelettale Reorganisation
SLAM (CDw150) ⁽⁵⁾ (CD2 Subfamilie)	Nein	SLAM	<ul style="list-style-type: none"> • Fördert IFN-γ-Produktion • SAP reguliert SLAM Funktion • Steigert Proliferation von T-Gedächtniszellen
4-1BB(CD137) ⁽⁶⁾ (TNFR Familie)	Ja	4-1BBL (TNF Familie)	<ul style="list-style-type: none"> • Effekt auf CD8+ Zellproliferation > CD4+-Zellen • hält CD4+ T-Zell-Antwort aufrecht • steigert CD8+ T-Zell Antwort <i>in vivo</i> • fördert IFN-γ-Produktion durch CD8+ und CD4+ • Bindet TRAF-1,-2,-3 und aktiviert NF-κB/JNK
OX40(CD134) ⁽⁷⁾ (TNFR Familie)	Nein	OX40L (TNF Familie)	<ul style="list-style-type: none"> • Fördert T_H2-Antwort • Hält CD4+ T-Zell-Antwort aufrecht • Steigert IL-2 und T_H2 Cytokin-Produktion • Bindet TRAF-2,-3,-5 und aktiviert NF-κB/JNK
CD27 ⁽⁸⁾ (TNFR Familie)	Nein	CD70 (CD27L) (TNF Familie)	<ul style="list-style-type: none"> • Funktion in T-Zell/B-Zell und T-Zell/T-Zell Interaktion • beteiligt an der Expansion von T-Zellen nach CD28 Kostimulation • Bindet TRAF-2,-3,-5 und aktiviert NF-κB/JNK

Tabelle 1.2.1: **Übersicht über kostimulatorische Moleküle in naiven und aktivierten T-Zellen**
(Nach Watts und DeBenedette, 1999)

1.3 Adhäsion von T-Zellen

Die Adhäsion von T-Zellen ist sowohl bei der Wanderung naiver T-Zellen durch den Lymphknoten als auch bei der Erzeugung der Immunreaktion und den Wechselwirkungen zwischen bewaffneten T-Effektorzellen und ihren Zielzellen wichtig. Die Bindungsreaktionen werden von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des T-Lymphocyten, die eine komplementäre Anordnung auf der Oberfläche der Zellen erkennen, mit denen die T-Zelle interagiert, vermittelt. Die wichtigsten Klassen, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei den Lymphocyteninteraktionen spielen, sind die Cadherine, Selectine, die Integrine, Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie sowie einige dem Mucin ähnliche Moleküle.

1.3.1 *Selectine (CD62)*

Die Selectine (CD62) vermitteln adhäsive Wechselwirkungen zwischen den Leukocyten und den Endothelzellen und bewirken, dass die Zellen von den Blutgefäßen in die Lymphknoten eindringen können. L-Selectin (CD62L), wird auf naiven T-Zellen exprimiert und bindet an die sulfatisierten Sialyl-Lewis^x-Anteile der vaskulären Adressine CD34 und GlyCAM-1 auf Lymphknotenvenolen mit hohem Endothel. CD34 ist durch einen Transmembrananker auf der Zelloberfläche fixiert, während der Mechanismus der Membranverankerung von GlyCAM-1 auf Grund einer fehlenden transmembranen Domäne unbekannt ist. Die relative Bedeutung von CD34 und GlyCAM-1 bei dieser Wechselwirkung ist noch unklar. Daneben wird CD34 auch auf Endothelzellen vieler Gewebe exprimiert, auf Grund einer differentiellen Glykosylierung aber nicht von L-Selectin gebunden. Die Bindung von L-Selectin an die Adressine fördert ein Entlangrollen naiver T-Zellen an der Wand postkapillärer Venolen mit hohem Endothel und spielt eine wichtige Rolle bei der Zielortbestimmung naiver Zellen. Obwohl sie zu schwach ist, um den Übergang aus den Blutgefäßen in Lymphgefäße, auch Extravasation genannt, zu unterstützen, bildet sie die Voraussetzung für die anschließende Ausbildung stärkerer Interaktionen zwischen den T-Zellen und dem hohen Endothel.

P-Selectin (CD62P) und E-Selectin (CD62E) dagegen werden auf dem vaskulären Endothel exprimiert und binden an Sialyl-Lewis^x-Einheiten auf Leukocyten. Sie spielen zusammen mit den Integrinen unter anderem bei der Extravasation von Leukocyten eine Rolle (vgl. Abschnitt 1.3.2).

1.3.2 *Integrine*

Die Integrine umfassen eine große Familie von Zelloberflächenproteinen, welche die Adhäsion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort und der inflammatorischen Antwort ermöglichen. Alle Integrine sind Heterodimere und bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Bis jetzt sind 8 verschiedene β und 16 verschiedene α Untereinheiten identifiziert worden, die zusammen mindestens 22 verschiedene Integrine bilden können. In der großen Integrin-Familie gibt es verschiedene Unterklassen, die jeweils die gleiche β -, aber unterschiedliche α -Ketten besitzen. Integrine werden auf den verschiedensten Zelltypen exprimiert. Auf Lymphocyten kommen die β_1 , β_2 und β_7 -Integrine vor, wobei die β_2 -Integrine Leukocyten spezifisch sind. Diese Integrin Unterfamilie, auch LeuCam (leukocyte cell adhesion molecule, Leukocyten Zell-Adhäsionsmolekül) genannt, besteht aus den vier Mitgliedern LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$) CR3 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$), gp150/95 (CD11c/CD18; $\alpha_X\beta_2$) und $\alpha_4\beta_2$. (CD11d/CD18), die alle die gleiche 95 kD β_2 -Untereinheit besitzen. T-Lymphocyten exprimieren normalerweise fast ausschließlich LFA-1 (Arnaout, 1990), während auf Neutrophilen alle β_2 -Integrine vorhanden sind. Diese Rezeptoren sind sowohl an der Zell/Zell als auch an der Zell/Matrix-Wechselwirkung beteiligt und sind von zentraler Bedeutung für die Fähigkeit der Zellen in der Immunabwehr. Kommt es zum Verlust der Expression der β_2 -Untereinheit und somit zum Ausfall der gesamten β_2 -Integrine, entsteht das Syndrom der Leukocyten-Adhäsionsdefizienz (leukocyte adhesion deficiency, LAD). Personen mit dieser Krankheit sterben in jungen Jahren an wiederkehrenden bakteriellen Infektionen, da vorwiegend Neutrophile aber auch Monozyten auf einen inflammatorischen Reiz hin nicht durch das Endothelium zum Infektionsherd wandern können.

Der erste Schritt dieses als Extravasation bezeichneten Vorgangs wird durch Selectine vermittelt (vgl. Abbildung 1.3.1). Nach Kontakt mit LTB₄, C5a oder Histamin gelangt das in Granula, den Weibel-Palade Körperchen, gespeicherte P-Selectin innerhalb weniger Minuten an die Zelloberfläche. Die

Expression von E-Selectin an der Zelloberfläche wird durch $\text{TNF-}\alpha$ induziert und benötigt ein paar Stunden. Die Wechselwirkung von P-Selectin und E-Selectin mit den Sialyl-Lewis^x-Einheiten auf der Zelloberfläche der Leukocyten führt zu einer reversiblen Anheftung an die Gefäßwand. Dadurch „rollen“ die Leukocyten an den Endothelien entlang, bis durch ein kostimulatorisches Signal die Affinität des Leukocytenintegrins LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) auf der Leukocyten Zelloberfläche zu den interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM), ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 auf der Endothelzelloberfläche, stark erhöht wird. Die Expression von ICAM-1 wird durch $\text{TNF-}\alpha$ induziert. Das kostimulatorische Signal kann dabei durch Chemokine wie IL-8 induziert werden, die von Zellen am Infektionsherd ausgeschüttet werden. Die Bindung des Chemokins an den entsprechenden Chemokinrezeptor induziert eine Aktivierung von LFA-1 und eine stärkere Wechselwirkung mit ICAM-1. Diese adhäsive Wechselwirkung leitet die Diapedese, das Hindurchzwängen der Leukocyten durch die Endothelzellen und die Basalmembran, ein. Dabei spielt die Interaktion von LFA-1 und Mac-1 mit CD31, das an der Adhäsion der Endothelzellen untereinander beteiligt ist, eine Rolle. Die Basalmembran wird mit Hilfe proteolytischer Enzyme durchstoßen. Die Leukocyten folgen auf ihrem Weg durch das Gewebe zu dem Infektionsherd einem Konzentrationsgradienten der Chemokine.

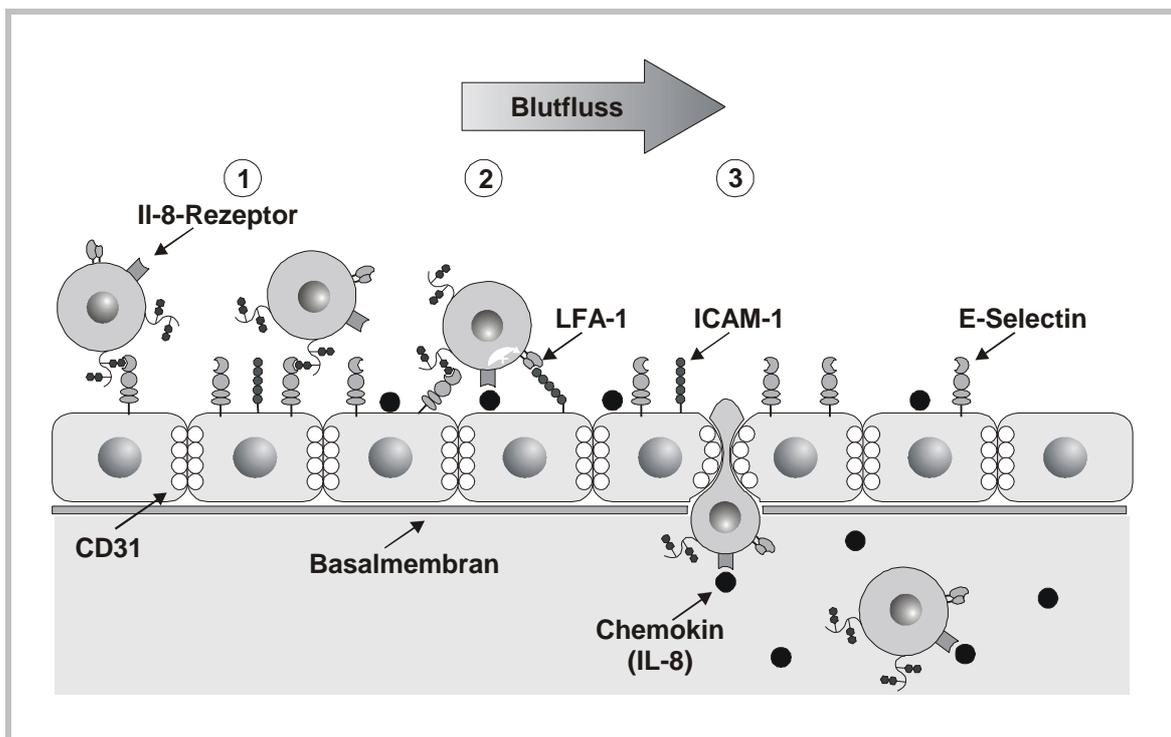


Abbildung 1.3.1: **Modell der Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen, die durch Cytokine induziert werden, während der Extravasation und Diapedese von Leukocyten**

Leukocyten rollen auf Grund der schwachen Wechselwirkungen zwischen den Selectinen und den Sialyl-Lewis^x-Einheiten auf dem Gefäßendothel, getrieben durch den Blutstrom, entlang (1). Durch ein kostimulatorisches Signal wie die Bindung des Chemokins IL-8 an den IL-8-Rezeptor wird die Affinität von LFA-1 zu ICAM-1 stark erhöht und beendet die Rollbewegung (2). Dies ist die Voraussetzung, dass die Leukocyten sich zwischen die Endothelzellen und durch die Basalmembran hindurch zwängen und entlang des Konzentrationsgradienten des Chemokins an den Infektionsherd gelangen. (3).

Die Wechselwirkung von LFA-1 mit ICAM-1 spielt auch bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu bewaffneten Effektorzellen sowie der Interaktion der Effektorzelle mit ihrer Zielzelle eine entscheidende Rolle. Die vorübergehende Bindung naiver Zellen an professionelle antigenpräsentierende Zellen ist wichtig, damit eine Interaktion des TCR/CD3-Komplexes mit dem MHC/Peptid-Komplex erfolgen kann. Professionelle antigenpräsentierende Zellen, besonders dendritische Zellen, binden naive T-Zellen durch Interaktionen zwischen LFA-1, CD2 und ICAM-3 auf der T-Zelle und ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 und LFA-3 auf der antigenpräsentierenden Zelle. Wird der MHC/Peptid-Komplex nicht vom TCR/CD3-Komplex erkannt, kommt es zur Lösung der transienten Bindung der naiven T-Zelle an die antigenpräsentierende Zelle. Erkennt dagegen der TCR/CD3-Komplex spezifisch den MHC/Peptid-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle, kommt es zur Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes. Als Folge kommt es zur Aktivierung und zur stärkeren Adhäsion von LFA-1 an ICAM-1 (Dustin und Springer, 1989). Die Aktivierung der Integrine wird dabei durch die Bildung spezifischer Epitope charakterisiert (Van Kooyk *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994).

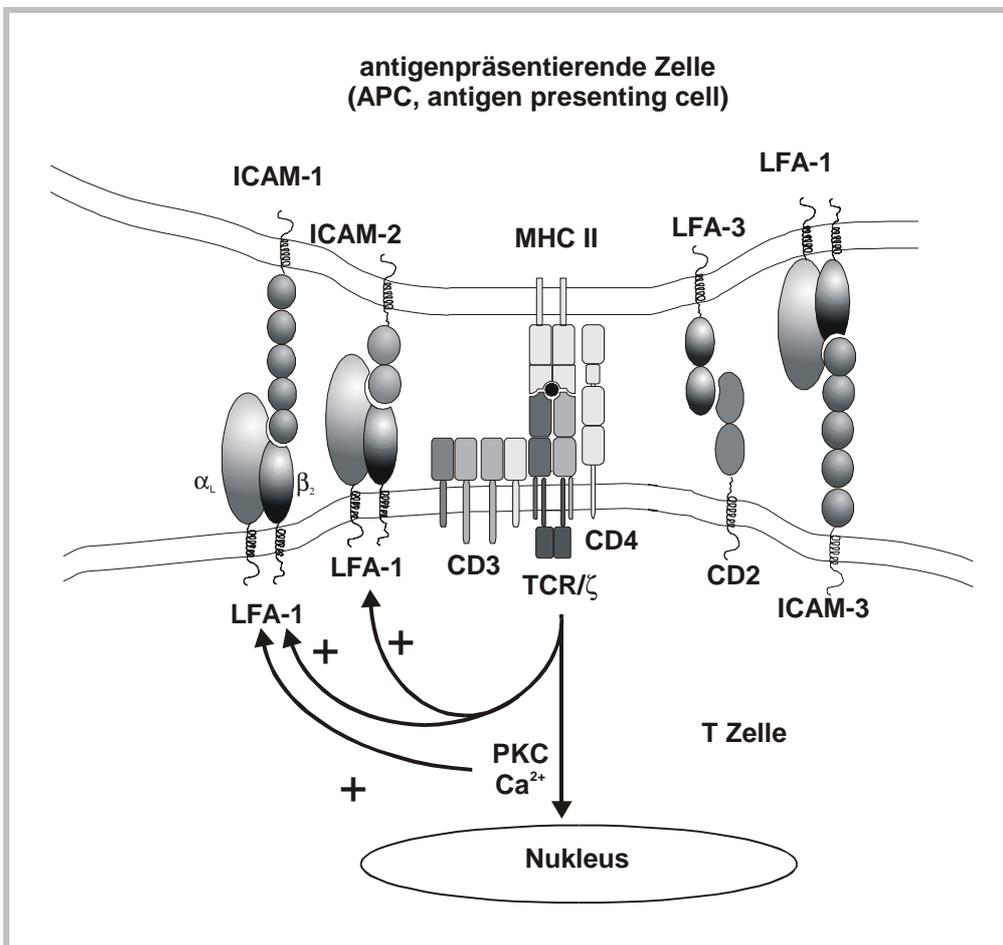


Abbildung 1.3.2: **Die Bindung der naiven T-Zelle an die antigenpräsentierende Zelle wird durch Wechselwirkungen der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche beider Zellen vermittelt.**

Die Bindung einer naiven T-Zelle an eine antigenpräsentierende Zelle erfolgt durch die Interaktion von CD2 mit LFA-3 auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle. Erkennt der TCR/CD3-Komplex das von dem MHC-Molekül gebundene Peptid, wird ein intrazelluläres Signal ausgelöst, das die Aktivierung von LFA-1 und die stärkere Bindung an die ICAMs auf der antigenpräsentierenden Zelle bewirkt.

1.3.2.1 Regulation der Integrin Funktion

Wie die Signale die Adhäsion von LFA-1 exprimierenden Zellen an die Liganden-präsentierenden Zellen beeinflussen und ob die regulatorischen Mechanismen bei allen Integrinen gleich sind, ist vollkommen unklar. Im folgenden sollen die verschiedenen Ebenen der Regulation anhand der β_2 -Integrine erläutert werden.

Die Expression der Integrine kann durch chemotaktische Faktoren reguliert werden. Durch die Behandlung von Leukocyten mit den Cytokinen IL-2 oder IFN γ kommt es zu einer zweifachen Steigerung der LFA-1 Expression (Shimizu *et. al.*, 1990). Die Cytokine beeinflussen dabei aber auch die Expression des Integrinliganden. Die Stimulation des Endotheliums mit IL-1, IL-4, IFN γ oder TNF α resultiert in einer erhöhten Expression von ICAM-1 (Thornhill *et. al.*, 1991; Dustin *et. al.*, 1986), während die Expression von ICAM-2 und ICAM-3 weniger durch Cytokine bestimmt wird.

Mechanistische Modelle wurden vorgeschlagen, die eine Regulation der Zelladhäsion durch Veränderung der Affinität und Avidität versuchen zu erklären. Auf den meisten Zellen kommt es erst nach Aktivierung durch intrazelluläre Signale („inside-out“-Signale) zur Bindung des Liganden. *In vitro* kann die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion durch PMA-Stimulation, welche eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und dadurch eine Phosphorylierung der β_2 -Kette am Serinrest 756 bewirkt, induziert werden. Jedoch resultiert die Mutation des Ser-756 nicht in einer Modulation der Affinität von LFA-1 zu seinem Liganden (Hibbs *et. al.*, 1991). Die Zelladhäsion kann neben der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) nach PMA Behandlung (Valmu *et. al.*, 1999) durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Calcium Ionophor, PLC γ oder PI(3)-Kinase (Lub *et. al.*, 1995; Shimizu und Hunt, 1996) reguliert werden. Die Aktivierung von LFA-1 erfolgt somit durch Signale die nach der Aktivierung oberflächenspezifischer Moleküle wie den TCR CD2, CD28 und CD31 (Shimizu und Hunt, 1996) angeschaltet werden.

Obwohl eine Affinitätsänderung für andere Integrine demonstriert worden ist, gibt es nur begrenzte Hinweise, dass Affinitätsänderungen von LFA-1 eine Rolle spielen (Tominaga *et. al.*, 1998; Hato *et. al.*, 1998; Shattil *et. al.*, 1995). Affinitätsänderungen von LFA-1 ereignen sich nur in Gegenwart der Ectodomäne von LFA-1 durch Bindung divalenter Kationen wie Mn^{2+} -Ionen (Tominaga *et. al.*, 1998; Dransfield *et. al.*, 1992). Darüber hinaus sind Antikörper bekannt, die eine Aktivierung der Integrine induzieren können. KIM185 ist gegen die β_2 -Kette (Ortlepp *et. al.*, 1995) gerichtet und MEM83 gegen die α_L -Untereinheit (Landis *et. al.*, 1993). Dabei erfolgt die Aktivierung nicht durch Zusammenlagern der Integrine, da die Fab-Fragmente eine Aktivierung bewirken können, sondern durch die Stabilisierung der aktiven Konformation. Der mAb24-Antikörper, der ein durch die Bindung von ICAM-1 an LFA-1 induziertes Epitop in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen erkennt, bewirkt dagegen keine Aktivierung von LFA-1 (Dransfield und Hogg *et. al.*, 1989; Dransfield *et. al.*, 1992), sondern charakterisiert diesen Zustand.

Die Integrin/Liganden-Interaktion wird durch die Verteilung der Integrine auf der Zelloberfläche reguliert. Der Begriff Avidität bezeichnet dabei das Bestreben der Moleküle sich in Clustern zusammenzulagern. So erhöht das Zusammenlagern von LFA-1 auf der Zelloberfläche die Bindung an ICAM-1. Jedoch mehren sich die Hinweise, dass das laterale Zusammenlagern von LFA-1 nicht nur den Zell-Zell-Kontakt stärkt, sondern auch eine Voraussetzung für die Aktivierung von LFA-1 und Ligandenbindung darstellt.

1.3.2.2 Signaltransduktion durch LFA-1 erfolgt über assoziierte Proteine

Neben der Regulation des Adhäsionsrezeptors LFA-1 durch intrazelluläre Signale, gibt es zahlreiche Hinweise, dass der Adhäsionsrezeptor an der Signaltransduktion extrazellulärer Signale („outside-in“-Signal) beteiligt ist.

Das Quervernetzen von LFA-1 durch Antikörper führt zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine. Dazu gehören neben vielen anderen der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav (Zheng *et al.*, 1996), das Adapterprotein c-Cbl, das cytoskelettale Protein Paxillin (Fuortes *et al.*, 1994), die extrazellulär-regulierte Kinase ERK (McGilvray *et al.*, 1998) sowie die cytoplasmatische Domäne sowohl der α -Kette als auch der β_2 -Kette (Garnotel *et al.*, 1995). Ein initiales Ereignis der β_2 -vermittelten Signaltransduktion stellt somit die Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen p58^{c-fgr} (Fgr), p59/61^{Hck} (Hck), p53/56^{Lyn} (Lyn) und das nicht zur Familie der Src-Kinasen gehörende p72^{Syk} (Syk) dar (Berton *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1996; Lowell *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997). Zusätzlich sind Mitglieder der Familie der fokalen Adhäsion-Kinase (FAK), p125FAK sowie fakB (fokale Adhäsion-Kinase verwandtes Protein B) und Pyk2 impliziert (Rodriguez-Fernandez *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Jedoch ist der genaue Mechanismus der Aktivierung dieser Tyrosinkinasen durch β_2 -Integrine noch unklar, da Integrine keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzen. Die Assoziation der Tyrosinkinasen mit den β_2 -Integrinen erfolgt möglicherweise indirekt über weitere Proteine. So sind die Integrine an das Actin-Cytoskelett über mehrere Actin-bindende Proteine wie α -Actinin, Talin und Filamin gekoppelt. β_2 -Integrine sind dabei konstitutiv an Filamin (Pavalko und Laroche, 1993) und Talin (Sampath *et al.*, 1998) gebunden, während eine Bindung an α -Actinin erst nach Zusammenlagerung der Integrin-Moleküle erfolgt (Pavalko und Laroche, 1993). Weitere in die Integrinfunktion implizierten actinbindenden Proteine sind Paxillin, Filamin und Spectrin (Miyamoto *et al.*, 1995; Bennett und Gilligan, 1993; Carraway und Carraway, 1989). Viele dieser cytoskelettalen Proteine sind an der Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe (FACs) beteiligt. Die Aggregation von LFA-1 sowie die Ligandenbindung sind für die Bildung des fokalen Adhäsionskomplexes nötig (Yamada *et al.*, 1995). Die fokalen Adhäsionskomplexe, bestehend aus der cytoplasmatischen Domäne der Integrine, verschiedenen cytoskelettalen Proteinen, Proteintyrosinkinasen und vielen weiteren Signalmolekülen, sind definierte, spezialisierte Strukturen innerhalb der Zellmembran. Sie induzieren eine Kaskade intrazellulärer Signale durch die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von LFA-1 nach Ligandenbindung. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die cytoplasmatischen Anteile sowohl der α - als auch der β -Kette die Integrin Aktivität beeinflussen können (O'Toole *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1992; Kassner *et al.*, 1994; Hibbs *et al.*, 1991; Kawaguchi und Hemler, 1993). Die α -Kette enthält eine hoch konservierte membranproximale Sequenz GFFKR (angegeben im Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren), die inhibitorisch auf die Aktivierung der Integrine wirkt. Calreticulin, ein Zellkernprotein und negativer Regulator der Genexpression, bindet direkt an das GFFKR Motiv (Dedhar, 1994; Copolino *et al.*, 1995). Durch Deletion dieser Sequenz kommt es zur konstitutiven Aktivierung der Integrine (O'Toole *et al.*, 1994). Allerdings scheint die konservierte Region (EYRRFEKE) der β_2 -Kette, N-terminal der cytoplasmatischen Domäne, nicht nur für die Interaktion mit dem Cytoskelett, sondern auch für die Expression an der Zelloberfläche wichtig zu sein. Die Deletion der 5 Aminosäuren, die drei aufeinanderfolgende Threonine enthalten, sowie die Deletion des Phenylalanins im C-terminalen Bereich resultieren in einer ICAM-1 bindungsdefizienten LFA-1 Mutante (Hibbs *et al.*, 1991a; Hibbs *et al.*, 1991b; Peter und O'Toole, 1995). Durch Mutation der Threonine wird die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe sowie das Ausbreiten der Zellen auf Liganden-gekoppelten Unterlagen reduziert.

In der in der Hefe durchgeführten Interaktionsanalyse wurden weitere Protein isoliert, die mit der cytoplasmatischen Domäne der β_2 -Kette interagieren können. ILK („integrin-linked kinase“) bindet dabei sowohl an β_1 -, β_2 - und β_7 -Kette (Dedhar und Hannigan, 1996, Hannigan *et. al.*, 1996). ILK ist eine Serin/Threonin Kinase mit vier Ankyrin-verwandten Sequenzwiederholungen. Obwohl das *in vivo* Substrat für ILK unbekannt ist, scheint die β_1 -Kette ein mögliches Substrat zu sein, da ILK Peptide der cytoplasmatischen Domäne der β_1 -Kette phosphorylieren kann. Jedoch führt die durch Integrine vermittelte Zelladhäsion zu einer Verminderung der Kinaseaktivität von ILK (Hannigan *et. al.*, 1996). Konsistent damit inhibiert die Überexpression von ILK die Zelladhäsion epithelialer Zellen und stellt somit einen negativen Regulator der Integrinbindungsaffinität dar.

Als ein spezifisch mit der β_2 -Kette interagierendes Protein wurde von Kolanus *et. al.* (1996) Cytohesin-1 beschrieben. Die Überexpression von Cytohesin-1 führt zur von LFA-1 vermittelten Zelladhäsion an ICAM-1 und stellt somit einen positiven Regulator der Zelladhäsion dar. Cytohesin-1, ein 47kD cytoplasmatisches Protein, besitzt nach der N-terminale α -helicalen Superhelix („coiled-coil“-Domäne) 2 konservierte Proteininteraktionsmotive (Abbildung 1.3.3). Carboxyterminal befindet sich die Pleckstrin homologe Domäne (PH Domäne) und aminoterminal ein Sec7 Motiv, das zu einer kurzen Sequenz des sonst nicht näher verwandten Proteins Sec7 der Hefe homolog ist.

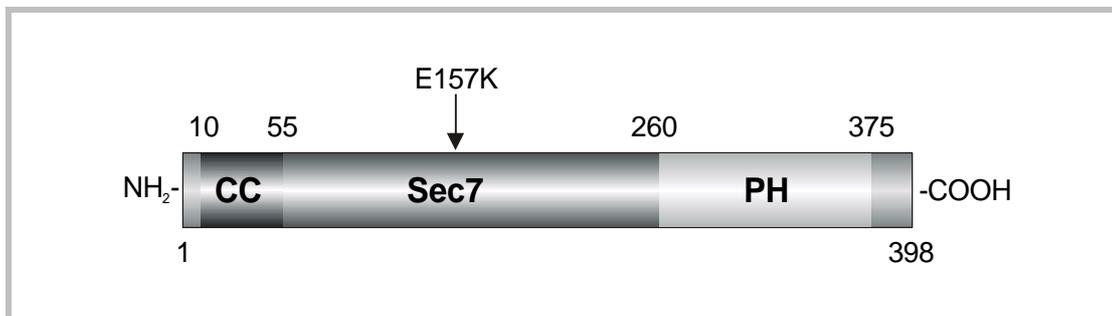


Abbildung 1.3.3: **Domänenstruktur von Cytohesin-1**

Die Position der CC- (Coiled-coil-Domäne), Sec7- und PH-Domäne sind angegeben. Die Mutation in der Sec7-Domäne von Glutaminsäure (E) an Position 157 in Lysin bewirkt eine Inaktivierung. Die Zahlen geben die Position in der Aminosäuresequenz an.

Cytohesin-1 interagiert dabei direkt im membran nahen N-terminalen Abschnitt der cytoplasmatischen Domäne von CD18. Durch Deletionsanalysen konnte der Bereich der direkten Interaktion den Aminosäuren 732 bis 769 zugeordnet werden.

Die PH Domänen interagieren mit Produkten der Phosphatidylinositol (3)-Kinase (PI(3)-K). Durch die Bindung von Phosphoinositolen bewirkt die PH Domäne die Lokalisierung der Proteine an die Membran (Klarlund *et. al.*, 1997; Harlan *et. al.*, 1995; Rameh *et. al.*, 1997; Lemmon und Ferguson, 1997). Die PH Domäne von Cytohesin-1 interagiert spezifisch mit Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) (Lemmon und Ferguson, 1997; Nagel *et. al.*, 1998). Somit wird die LFA-1-Funktion durch die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 reguliert, die durch die PI(3)-Kinase vermittelt wird. Die Überexpression dieser Domäne führt zur Inhibition der funktionalen Aktivierung von LFA-1 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung (Kolanus *et. al.*, 1996; Nagel *et. al.*, 1998).

Die Überexpression der Sec7-homologe Domäne dagegen führt zu einer konstitutiven Bindung von LFA-1 an ICAM-1 und vermittelt somit die Zelladhäsion (Kolanus *et. al.*, 1996). Verschiedene Sec7-Domänen enthaltende Proteine sind bisher bekannt, sowohl im Menschen (Chardin *et. al.*, 1996; Liu *et. al.*, 1992, Kolanus *et. al.*; 1996) als auch in niederen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* und

Arabidopsis thaliana (Peyroche *et. al.*, 1996; Shevell *et. al.*, 1994; Klarlund *et. al.*, 1997; Telemenakis *et. al.*, 1997). Die Sequenzen dieser Sec7-Domänen sind evolutiv stark konserviert (vgl. Abbildung 1.3.4).

Cytohesin-1	STEERKINMQRNKQVAMGRKKFNMDPKKGIQFLIENDLLKN--TCEDIAQFLYKGGEG-LNKTAI
ARNO	ANEGSKTLQQRNRMAMGRKKFNMDPKKGIQFLVENELLQN--TPEEIARFLYKGGEG-LNKTAI
EMB30	VSFVRRRKYIKRRLMIGADHFNRPKKGLEFLQGTHTLLPDKLDPQSVACFFRYTAG-LDKNLV
Gea1	EIDILKQRDRKTEFILCVETFNEKAKKGIQMLIEKGFIDSD-SNRDIASFLFLNNGRLNKKTI
Sec7	PTQFENLKLKRTALSECIAIFNNKPKKAIPLVLIKKFGLKDD-SPISIAKWLLLETEG-LDMAAV
Cytohesin-1	GDYLGERDEFNIQVLHAFVELHEFTDLNVLQALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFQAQRYCQC
ARNO	GDYLGEREELNLAVLHAFVDLHEFTDLNVLQALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFQAQRYCLC
EMB30	GDFLGNHDEFVQVVLNEFAGTFDFQYMNLDALRLFLFLETFRLPGESQKIQRVLEAFSER YMQ
Gea1	GLLLCD--PKKTSLLKEFIDLDFDKGLRVDEAIRILLTKFRLPGESQOIERIVEAFSSKYSAD
Sec7	GDYLGEGDDKNIAIMHAFVDEFDFTGMSIVDALRSFLQSFRLPGEAQKIDRFMLKFAERFVDQ
Cytohesin-1	NNG-----VFQSTDCYVLSFAIIMLNTSLHNPVNDKPTVER
ARNO	NPG-----VFQSTDCYVLSFAVIMLNTSLHNPVNRDKPGLER
EMB30	SPE-----ILANKDAALVLSYSIIMLNTDQHNQVKKKMTTED
Gea1	QSNDKVELEDKKAGKNGSESMTEDDIIHVQPDADSVFVLSYSIIMLNTDSHNPQVKDHMTFDD
Sec7	NPG-----VFSKADTAYVLSYSLIMLNTDLHSSQIKNKMSLQE
Cytohesin-1	FIAMNRGINDGGDLPEELLRNLYESIKNEPFKIP
ARNO	FVAMNRGINEGGDLPEELLRN LYDSIRNEPFKIP
EMB30	FIRNNRHINGGNDLPREFLSELFHSICNNEIRTT
Gea1	YSNNLRGCYNGKDFPRWYLHKIYTSIKVKEIVMP
Sec7	FLENNEGIDNGRDLPDRDFLEGLFNEIANNEIKLI

Abbildung 1.3.4: **Sequenzvergleich der Sec7-Domänen verschiedener eukaryontischer Proteine**

Dargestellt sind die Sec7-Domäne von ARNO und Cytohesin-1 (*Homo sapiens*), EMB30 (*Arabidopsis thaliana*) und Gea1 und Sec7 (*Saccharomyces cerevisiae*). Die Sec7-Domäne dieser Proteine zeigen hohe Sequenzhomologie (grau unterlegt). Die Konservierung der Sequenz in der Evolution lassen funktionale Übereinstimmungen der Sec7-Domäne vermuten.

1.3.2.3 Sec7-Domäne katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der ARF Proteine

Erste Hinweise auf die Funktion der Sec7-Domäne ergaben sich durch die Isolierung und Charakterisierung des Proteins Gea1 (*S. cerevisiae*). Es besitzt eine 300 Aminosäure lange zentrale Region (AS 500 bis AS 800), die homolog zu Sequenzen des Sekretionsproteins Sec7 (*S. cerevisiae*) ist. Gea1 (Guanine-nucleotide exchange on ARF; Guaninnukleotid Austausch auf ARF) wurde als wichtige Komponente eines Komplexes, der Guaninnukleotid Austauschaktivität für das monomere G-Protein ARF1 (ADP ribosylation factor 1) besitzt (Peyroche *et. al.*, 1996), isoliert. Durch Sequenzvergleich von Gea1 mit einer EST (expressed sequence tag) – Datenbank, wurde das Protein ARNO (ARF

nucleotide binding-site opener) mit Homologie zu den *S. cerevisiae* Proteinen Gea1 und Sec7 isoliert (Chardin *et. al.*, 1996). ARNO besteht aus 399 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 47 kD. ARNO, auch Cytohesin-2 genannt, besitzt 80% Homologie zu Cytohesin-1, das von Kolanus *et. al.* (1996) als Regulator der Zelladhäsion beschrieben wurde. Genau wie Cytohesin-1 besitzt es am N-Terminus eine superhelicale Sekundärstruktur, bestehend aus 2 umeinander geschlungenen α -Helices („coiled-coil“-Struktur), eine zentrale Sec7-Domäne und C-terminal eine PH Domäne (vgl. Abbildung 1.3.3). ARNO katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der monomeren G-Proteine, wobei die Sec7-Domäne ausreichend für die katalytische Aktivität von ARNO ist (Chardin *et. al.*, 1996). Des Weiteren wurde auch Cytohesin-1 als ein Austauschfaktor für ARF Proteine erkannt (Chardin *et. al.*, 1996; Meacci *et. al.*, 1997

Die ARF Proteine sind monomere G Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von 20 kDa und bilden neben der Ras-, Rho-, Rab-, Sar- und Ran- eine eigene Unterfamilie innerhalb der Superfamilie der Ras-GTPasen. ARF ist die Abkürzung für ADP-Ribosylunterfaktor, da sie anfänglich auf Grund ihrer Fähigkeit die ADP-Ribosyltransferase Aktivität der Cholera Toxin A Untereinheit zu aktivieren, erkannt und isoliert wurden (Tsai *et. al.*, 1987; Kahn und Gilman, 1986). Sie spielen unter anderem eine Rolle im intrazellulären Vesikeltransport und in der Aktivierung der Phospholipase D. ARF Proteine können in einer inaktiven GDP-Form und in einer aktiven GTP-Form vorliegen. Der Übergang vom inaktiven GDP-Zustand in den aktiven GTP-Zustand kann durch Beschleunigen der Abdissoziation des gebundenen GDP durch die Wirkung von Proteinen, als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF: guanine nucleotide exchange factor) bezeichnet, bewirkt werden. Das aktivierte Protein kann mit weiteren Moleküle interagieren und aktivieren. Die intrinsische GTPase Aktivität dagegen stellt sicher, dass der aktivierte GTP-gebundene Zustand nur für einen begrenzten Zeitraum vorliegt. Eine Regulierung der GTP-Hydrolyse kann dabei durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) erfolgen (Abbildung 1.3.5).

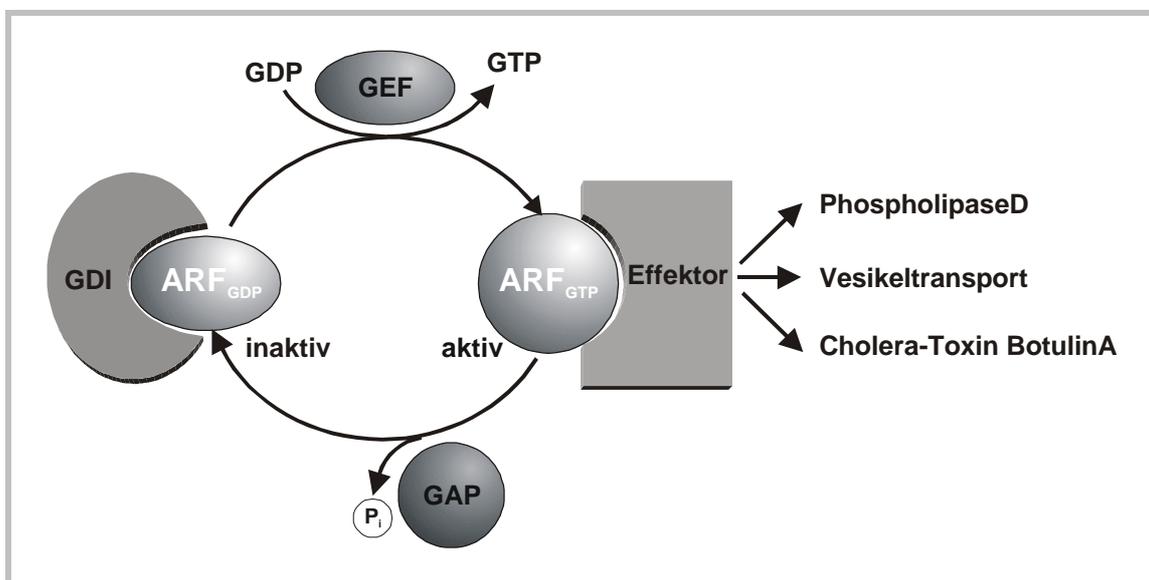


Abbildung 1.3.5: **Modell des ARF-GTPase Zyklus und dessen Regulation**

Inaktives ARF_{GDP} wird durch den Guanin Dissoziationinhibitor (GDI) stabilisiert. Die Aktivierung erfolgt durch den GDP/GTP-Austausch zu ARF_{GTP} . Diese Reaktion wird durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. ARF_{GTP} assoziiert mit Effektorproteinen. Durch die intrinsische GTPase Aktivität, die durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) katalysiert wird, kommt es zur Inaktivierung der ARFs

2 Aufgabenstellung

Die Interaktion von LFA-1 aus der Integrin Familie mit seinen Liganden, den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM)-1,-2 und -3, spielt eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Der cytoplasmatische Anteil der α - und der β_2 -Kette besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung und Funktion von LFA-1. Der Mechanismus jedoch, wie Signale aus dem Inneren der Zelle zu einer Aktivierung des LFA-1 führen, ist unklar. Kolanus *et. al.* (1996) konnten ein Protein, Cytohesin-1, identifizieren, dass mit der cytoplasmatischen Domäne der β_2 -Kette interagiert. Cytohesin-1, ein 47kD cytoplasmatisches Protein, besitzt nach der N-terminalen α -helicalen Superhelix zwei konservierte Proteininteraktionsmotive (vgl. Abbildung 1.3.3). Carboxyterminal befindet sich die Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) und aminoterminal ein Sec7-Motiv. Im Rahmen der Untersuchungen von Kolanus *et. al.* (1996) konnte gezeigt werden, dass die Expression der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 zur Adhäsion von Jurkat LT-Zellen an ICAM-1 führt. Die Bedeutung der Sec7-Domäne in der LFA-1 vermittelten Adhäsion an ICAM-1 wurde durch die Untersuchung einer Sec7-Domänenmutante von Cytohesin-1 unterstützt. Nach Substitution des Aminosäurerestes Glutamat an Position 157 zu Lysin induziert die daraus resultierende Variante Cytohesin-1 (E157K) die Bildung des Aktivierungsepitops, jedoch nicht die Adhäsion von Leukocyten an ICAM-1 (Geiger *et. al.*, 2000). Die Sec7-Domäne vermittelt dabei die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 auf den Guaninnukleotid-Austausch von ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF). Die Mutation des essentiellen Aminosäurerestes Glutamat 157 in der Sec7-Domäne führt dabei zu einer Guaninnukleotid-Austausch defizienten Mutante (Peyroche *et. al.*, 1996). Somit war die Bedeutung der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 und ihrer Guanin-Nukleotid-Austauschfunktion auf ARFs für die Zelladhäsion eindeutig belegt.

Die Identifikation der ARF Proteine, welche mit der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 wechselwirken können, bildeten die Zielsetzung im ersten Teil dieser Arbeit. Kolanus *et. al.* (1996) beschrieb Cytohesin-1 als im Cytoplasma und an der Cytoplasmamembran lokalisiert. Da eine Interaktion der Klasse I ARFs mit Cytohesin-1 in der Zelle auf Grund verschiedener Kompartimente unwahrscheinlich erscheint, blieb die physiologische Bedeutung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 auf ARF1 unklar. Die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran durch Bindung der PH-Domäne an Phosphatidylinositolphosphate nach Aktivierung der PI(3)-Kinase (Nagel *et. al.*, 1998) führt zu einer Kolokalisierung von ARF6 und Cytohesin-1 an der Plasmamembran. Jedoch konnte bisher *in vitro* eine Guaninnukleotid Austauschaktivität der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 nur auf ARFs der Klasse I (ARF1, ARF3), jedoch nicht auf das ARF der Klasse III (ARF6) nachgewiesen werden. Daher sollte geklärt werden, welche ARF Proteine von Cytohesin-1 aktiviert werden, wobei die funktionale Relevanz der ARF/Cytohesin-1-Interaktion berücksichtigt werden sollte. So sollte untersucht werden, durch welche Mechanismen eine Spezifität der Sec7-Domäne gegenüber den ARF Proteinen vermittelt wird.

Da die ARF Proteine vor allem am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind, sollte die physiologische Bedeutung der Aktivierung des ARFs durch Cytohesin-1 für die Integrinaktivität untersucht werden. Da Integrine auch an der Signaltransduktion extrazellulärer Signale in das Zellinnere und an der Aktivierung der T-Zellen involviert sind, sollte die Bedeutung der ARF Proteine an diesem Prozess untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte schließlich als weiterer Aspekt der T-Zell Aktivierung die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung des Proteins ZAP-70, das am Signalweg des aktivierten TCR/CD3-Komplexes beteiligt ist, untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Lutz Zeitlmann durchgeführt. Durch die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 zu Phenylalanin entsteht eine konstitutiv aktive ZAP-70 Mutante, die in T-Zellen die Stimulation des IL-2-Promotors induziert (Zeitlmann *et. al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der C-terminalen Tyrosinreste 597 und 598 in Bezug auf die Regulation der ZAP-70 Aktivität untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Agarosegeldokumentation	Eagle Eye II, Stratagene (Heidelberg)
Agarosegelkammern	Harnischmacher (München)
	Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried)
Autoklaven	MMM (München)
Bakterienschüttler	ISF-1-V, Adolf Kühner (Schweiz)
Bunsenbrenner	Top Count, Canberra/Packard (Frankfurt)
Elektroporationsapparatur	EasyJect Plus D2000, Eurogentec (Seraing, Belgien)
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham (Braunschweig)
FACS-Gerät	Epics XL, Coulter (Miami, USA)
Fluoreszenz-Meßgerät	CytoFluorII, PerSeptive Biosystems
Heizblöcke	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Inkubatoren	Heraeus (Osterode)
Lichtmikroskop	Typ IM35, Zeiss (Jena)
konvokales Lasermikroskop	Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Ikamag Reo, Bachhofer (Reutlingen)
PCR-Heizblock	Modell 761, Kick (Berlin)
pH-Meter	Modell 761, Knick (Berlin)
Photometer	SpectraMax 250, Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Pipetten	P2, P20, P200, P1000, Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Protein-Minigel-Apparaturen	BioRad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München),
.	Schleicher&Schuell (Dassel)
Reinstwasseranlage	MilliRo 30plus, Millipore (Eschborn)
Schüttelgerät	Reax2000, Heidolph (Kelheim)
Sequenzgelapparatur	S2, BRL (Eggenstein)
Sonifikator	Sonifier GM300, Bandelin (Berlin)
Spannungsgeräte	BDK (Sonnenbühl)
Stickstofftank	XLC-230, MVE (New Prague, USA)
Tischschüttler	3020, GFL (Burgwedel)
Überkopfschüttler	Bachhofer (Reutlingen)
Ultraschallbad	Transsonic digital T480/H-2, Elma (Singen)
UV-Illuminatoren (254 nm und 365nm)	Bachhofer (Reutlingen)
Vakuum Gel Trockner	Modell 583, BioRad (München)
Waagen	AE163, Mettler-Toledo (Gießen)

Wasserbäder	Typ 1412, Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen	1086, GFL (Burgwedel)
	Sorvall RC-5C plus, DuPont (Bad Homburg)
	J6-MC und L8-80M, Beckmann (München)
	5417 und 5417R, Eppendorf, (Hamburg)
Zentrifugenrotoren	Beckmann (München)
	DuPont (Bad Homburg)

3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

30% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	Roth (Karlsruhe)
Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Agarose (LMP-Agarose)	NuSieve, Biozym (Oldendorf)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammonium-Hydrogen-Carbonat	Merck (Darmstadt)
Ammonium-Peroxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
ATP	Roche (Mannheim)
Bacto-Trypton	Gibco (Eggenstein)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenzlösung	BioRad (München)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Biomol (Hamburg)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Caesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calcium-Ionophor A23187	Sigma (Taufkirchen)
Casaminoacids	Difco (Detroit)
Chloramphenicol	Sigma (Taufkirchen)
Chloroquin-Phosphat	Sigma (Taufkirchen)
Coomassie Blau R-250	Sigma (Taufkirchen)
DEAE-Dextran	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
DNTP`s	Roche (Mannheim)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma (Taufkirchen)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Gen32 Protein	Roche (Mannheim)
Gentamycinsulfat	Gibco (Eggenstein)
Glukose	Gibco (Eggenstein)
Glutathion (GSH)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)

Glykogen	Roche (Mannheim)
Hefe-Extrakt	Gibco (Eggenstein)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Hypoxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche (Mannheim)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalium-di-Hydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercapto-Ethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Mycophenolsäure (MPA)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
n-Butanol	Roth (Karlsruhe)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen GmbH (Hilden)
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol (Hamburg)
Nonidet P40 (NP40)	ICN
12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Phenol (in TE äquilibriert)	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg)
Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween20)	Roth (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (37%)	Riedel-de-Haen (Seelze)
TEMED	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin	Roche (Mannheim)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton-X-100	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Eggenstein)
Xanthin	Sigma (Taufkirchen)

3.1.3 Radiochemikalien

Nukleotid		
γ -[³² P]-ATP	370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	Amersham (Braunschweig)
α -[³⁵ S]-ATP	370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	
γ -[³⁵ S]-GTP	370 MBq/ml, 1 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	
α -[³² P]-GTP	370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	

3.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Biolabs (Schwalbach) Fermentas (Vilnius, Litauen) Roche (Mannheim)
RNAse A	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4-DNA-Polymerase	Biolabs (Schwalbach)
T4-Polynukleotidkinase	Biolabs (Schwalbach)
VentR-DNA-Polymerase	Biolabs (Schwalbach)

3.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

HRP-Detektionssystem	RPN 2106 ECL, Amersham (Braunschweig)
Luciferase-Detektionssystem	Luciferase-Assay-System, Promega (USA)
Sequenzierungssystem	Sequenase 2.0, Amersham (Braunschweig)

3.1.6 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>konjugiert</i>	<i>Zweck</i>
Ziege anti-human IgG (Fc Fragment)	-	Detektion von Ig und sIg-Fusionsproteinen
Esel anti-Ziege IgG (H+L)	HRP	Sekundärantikörper für Western Blot
Ziege anti-Mensch IgG (Fc Fragment)	FITC	Detektion des primären anti-human IgG Antikörpers im FACS und konvokaler Lasermikroskopie
polyklonaler Ziege anti-ACTIVE™ JNK pAb	-	Ser/Thr phosphorylierte (pTPpY) JNK (Promega, USA)
Ziege anti-Mensch IgG (Fc Fragment)	TRITC	Detektion der Ig-Fusionsproteine im FACS und bei der konvokalen Lasermikroskopie
mab7H2	-	Cytohesin-1 spezifischer monoklonaler Antikörper; Kremmer (GSF, München)
Maus-Anti-ZAP-70		Detektion von ZAP-70
Maus-Anti-Phosphotyrosin		Detektion von Phosphotyrosinen

3.1.7 Medien /Seren für eukaryontische Zellkulturen

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Eggenstein)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Eggenstein)
NuSerum	Gibco (Eggenstein)
RPMI	Gibco (Eggenstein)

3.1.8 Medien für prokaryontische Kulturen

LuriaBroth-Agar (LB-Aga)	Gibco (Eggenstein)
LB-Base	Gibco (Eggenstein)

3.1.9 Molekularbiologische Hilfsmittel

Elektroporationsküvetten	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Filterpapier (Whatman-3MM)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Mikrotiterplatten (Nunc (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran (0,45µm)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Röntgenfilme	Kodak X-Omat, XAR5 (Rochester, USA)
DC-Fertigplatte Cellulose, 20 x 20 cm	Merck (Darmstadt)

3.1.10 Lösungen und Puffer

50x TAE	242 g Tris 57ml 100% Essigsäure 50 mM EDTA H ₂ O _{bidest} ad 1 l
10x TBS	121,1 g Tris 87,66 g NaCl H ₂ O _{bidest} ad 1 l pH 7,5
1x TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O _{bidest} ad 1 l pH 7,4

3.1.11 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21	F- ompT hsdSB (r-B m-B) gal dcm (DE3) (Camr)	Expression von GST- Fusionsproteinen	Studier et. al., 1990
BL21LysS	F- ompT hsdSB (r-B m-B) gal dcm (DE3) pLysS (Camr)	Expression von 6xHIS- Fusionsproteinen	
CJ236d	Dut-1, ung-1, thi-1, relA1, pCJ105 (Camr,F ⁻)	Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel	Sambrook et. al., 1989

<i>E.coli</i> -Stamm	<i>Genotyp</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
MC1061	F ⁻ , araD139, Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)X74, rpsL(Strr), hsdR2(mk-mk-), mcrA, mcrB	Amplifikation von Plasmiden	Casadaban und Cohen, 1980
MC1061-P3	F ⁻ , araD139, Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)X74, rpsL(Strr), hsdR2(mk-mk-), mcrA, mcrB; zusätzlich mit Helferplasmid p3: kann, bla(amp)-am, tet-am	Amplifikation von CDM-Vektoren	Casadaban und Cohen, 1980
DH5α	endA1, hsdR17(rk-mk+), supE44, thi1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1	Amplifikation von Plasmiden	Hanahan, 1983

3.1.12 Eukaryontische Zelllinien

	<i>Eigenschaften</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
CV-1	Fibroblastenähnliche Affennierenzellen („African green monkey“)	Amplifikation rekombinanter Vaccinia Viren	Jensen <i>et. al.</i> , 1964
Cos-7m6	Fibroblastenähnliche CV-1 Affennierenzellen mit integriertem, replikationsdefektem SV40-Genom	transiente Expression von Proteinen durch DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion bzw. Infektion mit rekombinanten Vaccinia Viren	Gluzman, 1981
Jurkat E6	humane T-Zelllinie aus Patienten mit akuter Leukämie	Einsatz in Adhäsions-Analysen	Weiss und Stobo, 1984
Large T (LT)		transiente Expression von Proteinen durch Elektroporation	Clipstone und Crabtree, 1992

3.1.13 Virusstämme und Phagenstämme

Virusstämme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
Vaccinia WT	Insertion rekombinanter DNA in das Vaccinia Genom und anschließende Proteinexpression in eukaryontischen Zellen	Mackett <i>et. al.</i> , 1982

Phagenstämme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
M13K07	Herstellung von ssDNA zur ortsspezifischen Mutagenese nach Kunkel	Dotto und Zinder, 1984

3.1.14 DNA- und Protein-Längenstandards**DNA-Längenstandards**

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Fragmentlängen (Bp)</i>
Lambda DNA EcoRI/HindIII Marker	Fermentas, Vilnius (Litauen)	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

Protein-Längenstandards

In allen Fällen wurde ein vorgefärbter SDS-Protein-Längenstandard (Sigma, Taufkirchen) verwendet, der folgende Proteinzusammensetzung besaß:

<i>Protein</i>	<i>Molekulargewicht (in kDa)</i>
α 2-Makroglobulin	195
β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>	112
Fruktose-6-Phosphat Kinase aus Kaninchenmuskel	84
Pyruvat Kinase aus Hühnermuskel	64
Fumarase aus Schweineherz	52
Laktose-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	35
Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel	32

3.1.15 Plasmide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
CDM7	supF (amp/tet)	Expression nativer Proteine	Seed, 1987
p5C7	amp	Expression nativer Proteine und Proteine mit Ig- bzw. sIg-Fusionsanteil	Kolanus, nicht publiziert
pET-11d	amp	Expression in <i>E. coli</i> .	Promege (USA)
Nmt1p	tet	Expression von N-Myristoyltransferase in <i>E. coli</i> .	
pT7hxpflu	amp	Expression von Proteinen mit 6xHIS-Fusionsanteil in <i>E. coli</i>	
PGL2(IL-2luc)	amp	IL-2-promotorabhängige Luciferasegenaktivierung	Schenborn und Goiffon, 1991
pTKg	amp	Vektor zur homologen Rekombination mit Vaccinia-Genom	Romeo und Seed, 1991

3.1.16 *Proteinfusionsanteile*

<i>Bezeichnung</i>	<i>Aufbau</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
Ig	C _H 2- und C _H 3-Domänensegmente der humanen IgG1-cDNA	Expression zellulärer Proteine zur Präzipitation über den Fusionsanteil an Protein A und zur Vereinfachten Proteindetektion über den Fusionsanteil	Kolanus <i>et. al.</i> , 1996
sIg	Exportsignalsequenz von CD5 extrazellulär: C _H 2- und C _H 3-Domänensegmente der humanen IgG1-cDNA CD7 transmembrane Domäne	Expression von Proteinen zur Präzipitation über den Fusionsanteil an Protein A und zur Quervernetzung membranständiger Proteine	Zeitlmann <i>et. al.</i> , 1998
6xHIS	Oligopeptid aus 6 Histidinen	Expression und vereinfachte Aufreinigung rekombinanter Proteine über den Fusionsanteil an Ni-Agarose	

3.1.17 *Oligodesoxyribonukleotide*

Die in Tabelle 3.1.1 aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden im Labor von Herrn Dr. Arnold (Genzentrum, München) synthetisiert. Die Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der PCR-Produkte enthielten N-terminal nach einer GC-reiche Hexamersequenz die Restriktionsschnittstellen.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
GFP-C.NotI	GGG CCC GCG GCC GCA TGG TGA GCA AGG GCG AG	Klonierung von GFP in p5C7; NotI-Schnittstelle
GFP-C.EcoRI	GGG CCC GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	Klonierung von GFP in p5C7; EcoRI-Schnittstelle
Ig-C.NotI	GGG CCC GCG GCC GCA TGG CAC CTG AAC TCC TGG	Klonierung von Ig in p5C7; NotI-Schnittstelle
Ig-C.EcoRI	GGG CCC GAA TTC TTA GGA GCC GGG ATC CGT CGT CCA CCA	Klonierung von Ig in p5C7; EcoRI-Schnittstelle
ARF1.for.	GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG GGG AAC ATC TTC GCC AAC CTC TTC	Klonierung von ARF1; MluI-Schnittstelle
ARF1_for.NdeI	GCG CGC ACG CGT GCC CAT ATG GGG AAC ATC TTC GCC	Klonierung von ARF1 in pET11d; NdeI-Schnittstelle
ARF1.rev	GCG CGC GCG GCC GCT TCA CTT CTG GTT CCG GAG CTG ATT	Klonierung von ARF1; NotI-Schnittstelle
ARF1_Ig.rev	GGG CCC GCG GCC GCA CTT CTG GTT CCG GAG CTG ATT GG	Klonierung von ARF1.Ig, C-terminal

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
ARF5.for.	GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG GGC CTC ACC GTG TCC GCG CTC	Klonierung von ARF5
ARF5.rev	GCG CGC GCG GCC GCT TTA GCG CTT TGA CAG CTC GTG GGA	Klonierung von ARF5
ARF5_Ig.rev	GGG CCC GCG GCC GCA GCG CTT TGA CAG CTC GTG GGA CAG	Klonierung von ARF5.Ig, C-terminal
ARF6.for	GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG GGG AAG GTG CTA TCC AAA ATC TTC GGG	Klonierung von ARF6; <i>Mlu</i> I-Schnittstelle
ARF6_for.NdeI	GCG CGC ACG CGT GCC CAT ATG GGG AAG GTG CTA TCC	Klonierung von ARF6 in pET11d; <i>Nde</i> I-Schnittstelle
ARF6.rev	GCG CGC GCG GCC GCT TTA AGA TTT GTA GTT AGA GGT TAA CC	Klonierung von ARF6 <i>Not</i> I-Schnittstelle
ARF6_Ig.rev	GGG CCC GCG GCC GCA AGA TTT GTA GTT AGA GGT TAA CC	Klonierung von ARF6.Ig, C-terminal
ARF1 (T31N).for	CCT GGA TGC AGC AGG GAA GAA CAC GAT CCT CTA C	Mutagenese ARF1 (T31N)
ARF1 (T31N).rev	GGA TCG TCG TGT TCT TCC CTG CTG CAT CCA GG	Mutagenese ARF1 (T31N)
ARF6 (T27N).for	GCG GCC GGC AAG GGC GCG GTC CTG TAC AAG TTG AAG CTT	Mutagenese ARF6 (T27N)
ARF6 (T27N).rev	ACA GGA TTG TGT TCT TGC CGG CCG C	Mutagenese ARF6 (T27N)
ARF1 (Q71L).for	GTG GGA CGT GGG TGG CCT GGA CAA GAT TCG GCC CCT GTG	Mutagenese ARF1 (Q71L)
ARF1 (Q71L).rev	CTT GTC CAG GCC ACC CAC GTC CCA C	Mutagenese ARF1 (Q71L)
ARF6 (Q67L).for	GGG ATG TGG GCG GCC TGG ACA AGA TTC GGC CGC TCT GGC	Mutagenese ARF6 (Q67L)
ARF6 (Q67L).rev	GCG GCC GAA TCT TGT CCA GGC CGC CCA CAT CCC ATA CGT	Mutagenese ARF6 (Q67L)
ARF1_G2A.for	GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG GCG AAC ATC TTC GCC AAC	Klonierung von ARF1(G2A)
ARF6_G2A.for	GCG CGC ACG CGT GCC ACC ATG GCG AAG GTG CTG CTA TCC	Klonierung von ARF6(G2A)

Tabelle 3.1.1: **Übersicht über die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung und Mutagenese**

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von prokaryontischen Zellen

Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen unmittelbar neben einer Bunsenbrennerflamme mit sterilen Glas- bzw. Plastikwaren durchgeführt. Zum Ausplattieren von Bakterien wurde ein DRZYGALSKI-Spatel durch Eintauchen in 100% EtOH und Abflammen über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert.

3.2.1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Zur Isolierung einzelner Kolonien wurden Bakterienzellen von einer anderen Agar-Platte, aus einem Bakterien-Gefrierstock oder einem Transformationsansatzes mittels einer ausgeglühten, sterilen Platin-Impföse bzw. einem abgeflamten DRZYGALSKI-Spatels auf einer Agar-Platte mit geeigneter Kombination von Antibiotika (siehe auch 3.2.1.2) ausgestrichen. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank mit dem Deckel nach unten inkubiert. Die Plattenkulturen konnten auf dem Deckel liegend bis zu einem Monat bei 4°C gelagert werden.

3.2.1.2 Flüssigkulturen von *E. coli*

Flüssigkulturen dienen dazu, Bakterien in größeren Mengen für die Isolierung von Plasmiden zu erhalten. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte in sterilen Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 1 h bei 120°C autoklaviert und anschließend mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. In der Regel wurde die Bakterienkultur aus einer Einzelkolonie herangezogen, wobei sich das Volumen an Nährmedium, in dem angeimpft wurde, nach dem Verwendungszweck der Kultur richtete: Für Minipräparationen und Glycerin-Kulturen wurde von einer 5ml Kultur, für Maxipräparationen von einer 1 l Kultur ausgegangen. Zur Vermehrung wurden die Bakterienkulturen über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler, bei 200 rpm inkubiert.

Für Flüssigkulturen bis 10ml wurde mit einer durch Ausglühen sterilisierten, abgekühlten Platinimpföse Material einer Einzelkolonie auf 1xLB-Platte oder eines Bakterien-Gefrierstocks entnommen und in das 1xLB-Flüssigmedium überführt. Bei Kulturen ab 100ml Medium wurden von einer 5 ml ü/N-Kultur 1 ml zum Animpfen dieser Kulturen benutzt. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Sowohl dem Flüssigmedium als auch dem Plattenmedium wurden dabei eine oder mehrere Antibiotika zur Selektion zugegeben. Dabei kamen je nachdem zu selektierenden Plasmid folgende Antibiotika in diesen Konzentrationen zum Einsatz:

- Ampicillin 100µg/ml
- Kanamycin 25µg/ml
- Tetrazyklin 50µg/ml

3.2.1.3 Anlegen eines Bakterien-Gefrierstocks

Mit dieser Methode ist es möglich, Bakterien-Klone auf Dauer zu lagern und bei Bedarf daraus neue Kulturen anzulegen.

1 ml einer Flüssigkultur (3.2.1.2) wurden in ein steriles 1,5 ml Schraubreaktionsgefäß überführt, mit 180 µl sterilem 86%igem Glycerin versetzt, sorgfältig vermischt und bei -70°C gelagert. Für die erneute Anzucht konnte mit einer ausgeglühten Platinöse Material zur Animpfung einer Flüssigkultur entnommen werden.

3.2.2 Transformation von Prokaryonten

Darunter versteht man das Einbringen nackter DNA in entsprechend vorbehandelte Bakterienzellen. Die Vorbehandlung dient dazu, die DNA-Aufnahmefähigkeit der Zelle um ein Vielfaches zu erhöhen und eine ausreichende Menge an transformierten Bakterien (ca. 10^5 - 10^9 Transformanten /µg supercoiled pUC18) zu erhalten.

3.2.2.1 Herstellen kompetenter *E.coli* nach der Calciumchlorid-Methode

Bei der Calciumchlorid-Methode werden die Zellen durch das Calciumchlorid für die Aufnahme von DNA empfänglich gemacht. Mit dieser Methode können Zellen mit einer Transformationsrate von $1 \times 10^{7-9}$ Zellen/µg DNA (pUC18, supercoiled) hergestellt werden. Das nachfolgend beschriebene Verfahren zur Herstellung kompetenter *E.coli* basiert auf dem Protokoll von Mike Scott (UCSF).

Die verschiedenen *E.coli*-Stämme wurden ihrer Resistenz entsprechend auf LB-Agarplatten vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 20 ml TYM in einem 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde im Schüttler bei 200 rpm und 37°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600}=0,5 - 0,8$ kultiviert und in einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 100 ml TYM überführt. Bei einer OD_{600} von 0,5-0,9 wurden weitere 380 ml TYM hinzugefügt. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,6, wurde die Bakterienkultur auf Eis, unter Schwenken, schnell auf 4°C gekühlt. Nach Überführen der Kultur in einen sterilen 500 ml Zentrifugenbecher, wurden die Zellen 10 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 ml kaltem Tfb I vorsichtig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Tfb II aufgenommen, 200 µl Aliquots in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung kompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte bei -80°C. Mit dieser Methode wurden kompetente *E. coli* MC1061 und DH5α hergestellt. Von jedem Ansatz wurde eine Testtransformation durchgeführt.

TYM	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0.1 M NaCl 10 mM MgSO ₄	Sterilisation durch Autoklavieren
TfB I	30 mM KOAc 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin	Sterilisation durch Autoklavieren
TfB II	50 mM MnCl ₂ (separat autoklaviert) 10 mM HEPES (pH 7.0) 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin	Sterilisation durch Autoklavieren

3.2.2.2 Transformation kompetenter *E.coli*

100 µl einer kompetenten *E.coli* Suspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl eines 50 µl Ligationsansatzes (3.2.6.4) bzw. 5 - 10 ng einer Plasmid-DNA-Präparation vermischt. Anschließend wurden die Bakterien weitere 15 min auf Eis und danach 5 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten mit den Antibiotika der Plasmidresistenz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

3.2.3.1 Mini-Präparation („Boil-Lysis“-Methode)

Die Boil-Lysis-Methode, basierend auf dem Protokoll von Holmes und Quigley (1981), war für die schnelle und billige Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* die bevorzugte Methode. Die dabei isolierte DNA eignete sich für alle gentechnischen Verfahren wie Restriktions-Reaktionen und Transformationen.

Aus einer 5 ml ü/N-Flüssigkultur wurden die Zellen bei 20800 x g in der Eppendorffzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym/RNase-Mix wurden die Reaktionsgefäße im Wasserbad bei 100°C für 3 min

inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur mit 20800 x g für 10 min abzentrifugiert. Der klare Überstand (ca. 200 µl) wurde von dem flockigen Zelldebris mit einer Gilson-Pipette abgezogen und in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA für Restriktion-Reaktionen bzw. Transformationen wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 200 µl 5,0 M Ammoniumacetat und 400 µl Isopropanol gefällt und bei 20800 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand gründlichst abgezogen und in der Speed-Vac für 2-5 min getrocknet. Je nach Bedarf wurde das trockene Pellet in 20 - 100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Die Ausbeute betrug 2-5µg (high-copy-Plasmid).

STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose 5% Triton X-100 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM EDTA (pH 8,0) Lagerung bei 4°C
-------------	--

Lysozym/Rnase-Mix	10 mg /ml Lysozym 1 mg /ml Rnase A 50 mM EDTA (pH 8,0) Lagerung in 500 µl Aliquots bei -20°C
-------------------	---

3.2.3.2 Mini-Präparation („Alkalische Lyse“-Methode)

Dieses Verfahren wurde verwendet, um möglichst schnell und effizient die gewünschte Plasmid-DNA zu erhalten, die sich auf Grund der Reinheit insbesondere für Anwendungen wie Sequenzierung und Transfektion von eukaryontischen Zellen eignete.

5 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer vereinzelt Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 min mit 20800 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Puffer 1 resuspendiert und anschließend, zur alkalischen Lyse, mit 300 µl Puffer 2 gut durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden 300 µl Puffer 3 zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung chromosomaler DNA, RNA und Proteine, wurde anschließend 15 min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert. Aus dem 900 µl Überstand wurden noch vorhandene Proteine mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Sigma) aus der wässrigen Phase mit der DNA ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde von der wässrigen Phase durch Zentrifugation (5 min mit 20800 x g und Raumtemperatur) getrennt und die Plasmid-DNA anschließend durch Zugabe von 0,8 Vol Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15 min, 20800xg, 4°C). Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 70%igem kaltem Ethanol wurde die DNA in der Speedvac 3 min getrocknet und in der Regel in 50 µl TE-Puffer oder H₂O_{bidest} aufgenommen. Zum Abbau noch vorhandener RNA wurde die Lösung ca. 30 min mit 1µg RNase A bei Raumtemperatur behandelt.

Puffer 1: 10 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer 2: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer 3: 2,5 M KOAc

3.2.3.3 Maxi-Präparation („CsCl-Gradient“-Methode)

Zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA (3-8 mg) in hoher Qualität wurde die Maxi-Präparation angewendet. Die hierzu eingesetzte Methode erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Birnboim und Doyle (1979) sowie von Ish-Horowicz und Burke (1981). Dabei bedient man sich eines Dichtegradientes und der spezifischen Dichte von Plasmid-DNA.

1 l einer ü/N-Bakteriensuspension wurde 20 min bei 5000 x g zentrifugiert und die sedimentierten Bakterienzellen anschließend in 40 ml Puffer resuspendiert. Die alkalische Zellyse erfolgte analog der Mini-Präparation (3.2.3.2) durch Zugabe von 80 ml Puffer 2 und vorsichtigem Umschwenken. Die alkalische Lyse wurde nach 2-5 min durch Zugabe von 40 ml Puffer 3 gestoppt und anschließend 10min bei 5000 x g zur Abtrennung der Bakterienzellreste zentrifugiert. Der Überstand wurde durch mehrlagigen Verbandmull in einen 500 ml Zentrifugenbecher filtriert, die DNA durch Zugabe von 200ml Isopropanol gefällt und anschließend 10 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment, das zudem noch RNA, chromosomale DNA und Salze enthielt, wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 4 ml Puffer 1 resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte über einen CsCl-Gradienten. Hierzu wurde die Lösung in ein 15 ml Plastikröhrchen gegeben, das 5,5g CsCl enthielt, mit 4 ml einer wässrigen EtBr-Lösung (10mg/ml) versetzt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer 4-stündigen Ultra-Zentrifugation bei 80.000 rpm in einem NVT90 Rotor wurde die EtBr-gefärbte Plasmid-DNA-Bande im CsCl-Gradienten mittels einer Spritze abgezogen. Das EtBr wurde anschließend durch mehrmaliges Ausschütteln mit n-Butanol, das mit 1 M NaCl abgesättigt war, entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung und mit 2 Volumen absolutem EtOH gefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 6700 x g und 4°C wurde das Pellet mit 70 % kaltem EtOH gewaschen, getrocknet und je nach Ausbeute in 1-1,5 ml H₂O_{bidest} aufgenommen.

3.2.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsmessung von DNA wurden 2 µl DNA-Lösung in 200 µl H₂O verdünnt und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀), dem maximalen Absorptionsbereich von Purin- und Pyrimidinbasen, spektralphotometrisch bestimmt.

Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer OD₂₆₀ = 1,0 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook *et. al.*, 1989). Längere, einzelsträngige DNA-Moleküle wie Oligos und Primer weisen bei einer OD₂₆₀=1,0 eine Konzentration von 33 µg/ml auf. Die Konzentration berechnet sich daher nach folgenden Formeln:

- **doppelsträngige DNA**

$$[c] = OD_{260} \times 50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probe}}}$$

- **Berechnen der Konzentration von Oligos (Primer)**

$$[c] = OD_{260} \times 33 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probe}}}$$

Die Konzentration von Oligodesoxyribonukleotiden wurde anhand der Basenzusammensetzung bestimmt. Es liegen folgende Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen zugrunde (Wallace und Miyada, 1987):

Base	$\epsilon^{M}_{260\text{nm}}$
Adenin	15,2 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Cytosin	7,05 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Guanosin	12,01 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Thymin	8,4 mM ⁻¹ cm ⁻¹

Der Extinktionskoeffizient ϵ_{gesamt} wird als Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen angenähert.

Um die Konzentration [c] der synthetisierten Primer zu berechnen, wurde daher folgende Formel verwendet:

$$c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Gesamt} - OD_{260\text{nm}} \times 100}{(n_A \times 1,54) + (n_G \times 1,17) + (n_C \times 0,75) + (n_T \times 0,92)}$$

Eine Lösung der Konzentration 1 nmol/ml besitzt eine Molarität von 1 μM .

Wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutete dies auf eine Verunreinigung der Lösung durch Proteine hin. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten, die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden, gab Aufschluss über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient bei ungefähr 2. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte hingegen können ein Anzeichen für das Vorhandensein von RNA sein oder zeigen an, dass die DNA denaturiert ist.

3.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient dazu, eine DNA-Zielsequenz (Target-DNA) *in vitro* zu amplifizieren. Man nutzt hierbei die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang ausgehend von einem kurzen doppelsträngigen Bereich, meist einem hybridisierenden Oligodesoxynukleotid, zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren zu können. Durch mehrmaliges Wiederholen der einzelnen Schritte der DNA-Denaturierung, dem Hybridisieren der Oligodesoxynukleotide und der anschließenden Polymerase-Reaktion kommt es zu einer

exponentiellen Anreicherung (ca. 10^6 – 10^7 -fach) eines DNA-Abschnittes zwischen zwei jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementären Oligodesoxynukleotide. (Saiki *et. al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et. al.*, 1988).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Ansätze wurde in der Regel die Vent[®]-DNA-Polymerase eingesetzt, da sie im Vergleich zu anderen Polymerasen wegen der fehlerkorrigierenden 3' - 5' Exonuklease-Aktivität eine geringere Fehlerrate (ca. $2,7 \times 10^{-6}$) bei der Amplifikation aufweist. Besonders bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus der NK-cDNA-Bank, bei der von wenigen Zielsequenzen ausgegangen wurde, kam es auf eine hohe Fehlerkorrekturleserate an. Pro PCR-Ansatz wurden eingesetzt:

200 ng	DNA
0,5µg	Vorwärts-Oligodesoxyribonukleotid
0,5µg	Rückwärts-Oligodesoxyribonukleotid
4 µl	10x Vent-Polymerase-Puffer
4 µl	2,5 mM dNTP-Mix
1 µl	Vent _R -Polymerase (1U/ µl)
ad 40 µl	H ₂ O _{bidest}

Die PCR-Reaktion wurde in der RoboCycle-PCR-Maschine, entsprechend der programmierten Temperaturen für Strangtrennung, Oligodesoxyribonukleotid-Hybridisierung und - Strangverlängerung, durchgeführt:

Nach Beendigung der Reaktion wurde ein 5 µl-Aliquot des Produktes zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

10x Vent-Polymerase-Puffer	100 mM KCl
	200 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	20 mM MgSO ₄
	1 % (v/v) Triton X-100
2,5 mM dNTP-Mix	2,5 mM dGTP
	2,5 mM dATP
	2,5 mM dTTP
	2,5 mM dCTP

3.2.5 Fällung des PCR-Produktes

Zum Klonieren des PCR-Fragmentes war es nötig, die DNA umzupuffern, das Ausgangsvolumen zu verringern und die DNA von der Polymerase zu reinigen. In Anwesenheit der Polymerase bei einem Restriktionsverdau werden die überhängenden Enden durch die enzymatische Aktivität der Polymerase wieder aufgefüllt.

Zu diesem Zweck wurde das Volumen des PCR-Ansatzes durch Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 200 μl ergänzt. Nach Zugabe von 200 μl Phenol (in TE äquilibriert) wurden die Proteine durch Mischen in der phenolischen Phase gelöst. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA durch Zugabe von 1 μl Glykogen und 800 μl EtOH gefällt. Die DNA wurde 5 min bei 20800 x g abzentrifugiert, das Sediment mit 70% EtOH gewaschen und in 10-25 μl H_2O gelöst.

Zur Klonierung der aufgereinigten DNA wurde der Restriktionsverdau mit jeweils 3U Restriktionsenzym ü/N bei 37°C inkubiert.

3.2.6 Herstellen rekombinanter DNA

3.2.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA zu charakterisieren bzw. gezielt zu modifizieren, wurde die DNA mit Restriktionsenzymen der Klasse II verdaut. Diese Restriktionsenzyme spalten innerhalb spezifischer DNA-Erkennungssequenzen (meist Palindrome aus 4-8 Nukleotiden) in beiden Strängen die Phosphodiester-Brückenbindungen an definierter Position (cleavage site).

Alle Verdau wurden unter denen vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeiten richteten sich im allgemeinen nach der eingesetzten DNA-Menge und den eingesetzten Units an Restriktionsenzym. Als Standardreaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

x μl	DNA
0,1 – 0,5 μl	Restriktionsenzym (5-20 Units/ μl)
3 μl	10 x Puffer (nach Herstellerangaben)
0,3 μl	BSA (optional)
ad 30 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Restriktion einer DNA-Probe mit mehreren verschiedenen Restriktionsenzymen konnte simultan durchgeführt werden, wenn beide Enzyme in einem gemeinsamen Puffer ausreichende Aktivität aufwiesen. War dies nicht der Fall, so wurde die DNA zuerst mit einem Enzym nach der Standardreaktion unter den optimalen Pufferbedingungen verdaut. Nach einer Ethanol-fällung mit dem 2-fachen Volumen Ethanol und dem 1-fachen Volumen 1M NH_2SO_4 (vgl. 3.2.3.3) wurde die DNA für

den nachfolgenden Verdau umgepuffert. Der Erfolg des Verdaus wurde jeweils durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit einem Aliquot des Restriktionsansatzes überprüft.

3.2.6.2 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase

Durch die Dephosphorylierung wird die endständige 5'-Phosphat-Gruppe linearer doppelsträngiger DNA entfernt. Als Enzym wurde die *calf intestine alkaline Phosphatase* (*CIP*, *CIAP*) verwendet. Dieses Enzym spaltet im alkalischen Milieu (pH 9,5 –10,0) unspezifisch die 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA ab. Während zahlreiche organische Phosphatester durch dieses Enzym hydrolysiert werden, sind die internen Phosphodiester-Brückenbindungen gegen das Enzym resistent. Die *CIP* kann durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden. Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um eine Rezirkularisierung linearisierter Vektoren nach dem Restriktionsverdau (3.2.6.1) mit kohäsiven Enden ohne Aufnahme von Donor-DNA zu verhindern. Dazu wurde 1 µl Alkalische Phosphatase (*CIAP*) 1U/µl dem Restriktionsverdau hinzugefügt und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde 1/3 eines Restriktionsansatzes auf ein LMP-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretische aufgetrennt. Unter UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=365$ nm wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück durch Erwärmen auf 65°C geschmolzen. Die DNA im flüssigen Gel wurde direkt für den Ligationsansatz (3.2.6.4) verwendet.

3.2.6.4 Ligation

Unter Ligation versteht man das kovalente Verknüpfen zweier DNA-Stränge durch die Bildung einer Phosphodiester-Brückenbindung, zwischen dem phosphoryliertem 5'-Ende und dem 3'-Hydroxyl-Ende. Dabei sind sowohl intra- als auch intermolekulare Reaktionen möglich. Mit dieser Reaktion ist es möglich, rekombinante DNA zu erzeugen. Als Enzym wurde die T4-Ligase verwendet, die aus mit T4-Phagen infizierten *E. coli* isoliert wird.

Nach Schmelzen der LMP-Agaroseblöckchen (3.2.6.3) wurden Insert und Vektor in einem molaren Mengenverhältnis von 1:1 für den Ligationsansatz eingesetzt. Um Inhibition der Ligation zu vermeiden, betrug die Konzentration der LMP-Agarose im Ligationsansatz höchstens 1%. Für die Ligationsreaktion kohäsiver Enden wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

x µl	Vektor-DNA (in LMP Agarose)
y µl	Insert-DNA (in LMP Agarose)
5 µl	10 x Ligase-Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase (4 Weiß-U/ µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C bei AT-reichen DNA-Überhängen (z.B. *Hind*III, *Xba*I) oder 2 Stunden bei Raumtemperatur bei GC-reiche DNA-Überhängen (z.B. *Mlu*I, *Not*I) durchgeführt.

10x Ligationspuffer:	400 mM Tris-HCl
	100 mM MgCl ₂
	100 mM DTT
	5 mM ATP
	pH 7,8 einstellen

3.2.6.5 DNA-Mutagenisierungsverfahren nach Kunkel

Grundlage des DNA-Mutagenisierungsverfahrens nach Kunkel (Kunkel, 1985; Kunkel *et al.*, 1987) ist die Transformation von Plasmid-DNA in den Uracil-N-Glykosylase- und dUTPase-negativen *E.coli*-Stamm CJ236 (Lindahl, 1974; Konrad und Lehman, 1975; Duncan *et al.*, 1978; Hochhauser und Weiss, 1979). CJ236 vermittelt den Austausch von Thymin gegen Uracil. Aufgrund dieses Austausches wird Uracil-haltige Plasmid-DNA gebildet, die durch den Helferphagen M13K07 als Einzelstrang-DNA (ssDNA) verpackt wird. Durch *in vitro*-Polymerisation der Einzelstrang-DNA mit einem Oligodesoxyribonukleotid, das die gewünschte Mutation beinhaltet, entsteht eine Thymin-haltige Kopie des Uracil-haltigen Stranges. Nach Transformation in *E.coli* MC1061 erfolgt der Abbau der Uracil-haltigen DNA und damit eine Selektion zugunsten der mutierten, Thymin-haltigen DNA-Sequenz.

3.2.6.5.1 Gewinnung von Einzelstrang-Phagen-DNA

Die Präparation der Phagen-Einzelstrang-DNA erfolgte nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989).

5 ng Plasmid-DNA wurden in die Bakterienzelllinie CJ236 transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) ü/N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 3 ml 2xYT-Medium (inkl. 50 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und 5 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Zugabe des Helferphagen M13K07 in einer Endkonzentration von 2x10⁷ pfu/ml Medium wurde die Bakterienkultur 2 h bei 37°C und 200 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 70 µg/ml zugegeben und die Kultur ü/N bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension (3 ml) wurde zur Präparation der Einzelstrang-Phagen-DNA 5 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 5 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert. Zum Überstand wurden 400 µl PEG-Lösung gegeben und der Ansatz gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut gemischt und 15 min bei 20800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl TE aufgenommen. Der Lösung wurden 100 µl Phenol (in TE äquilibriert) hinzugefügt und nach Mischen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Mischen wurden die Proben 3 min bei 20800 x g zentrifugiert. Zum Überstand wurden 15 µl 8 M LiCl und 400 µl absoluter Ethanol gegeben. Die Einzelstrang-DNA wurde ü/N bei -20°C gefällt, 15 min bei 20800 x g zentrifugiert und mit 1 ml 70 %

EtOH gewaschen. Nach 5 min Trocknen im Vakuum-Konzentrator wurde die Einzelstrang-DNA in 50µl TE gelöst.

Die Konzentration der ssDNA-Lösungen wurde photometrisch ($\lambda=260$ nm) bestimmt (3.2.3.4).

2x YT-Medium	16 g Bacto-Trypton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl	pH 7,4 einstellen H ₂ O _{bidest} ad 1 l Sterilisation durch Autoklavieren
PEG-Lösung	2,5 M NaCl 20 % (w/v) Polyethylenglykol 6000 H ₂ O _{bidest} ad 40 µl	

3.2.6.5.2 Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids

Für die Polymerisation des mutierten Stranges benötigt die DNA-Ligase eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende, um die beiden Stränge durch eine Phosphodiester-Brückenbindung kovalent zu verknüpfen. Da die synthetisierten Primer am 5'-Ende jedoch keine Phosphatgruppen tragen, mußten diese enzymatisch durch die T4-Polynukleotid-Kinase addiert werden. Die T4-Polynukleotid-Kinase überträgt bei dieser direkten Phosphorylierung der 5'-Hydroxy-Enden eine γ -Phosphat-Gruppe aus ATP auf ein 5'-Hydroxyl-Ende eines DNA- oder RNA-Moleküles. Hierzu wurde folgender Phosphorylierungsansatz pipettiert:

5 mg Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotid
3 µl 10x LA-Puffer
3 µl 10x Restriktionspuffer 4 (Boehringer Mannheim)
1 µl T4-Polynukleotidkinase (1 U/µl)
H ₂ O _{bidest} ad 30 µl

Die Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids erfolgte ü/N bei 37°C. Zur Inaktivierung der T4-Polynukleotidkinase wurde der Ansatz 20 min bei 65°C inkubiert und anschließend mit 70 µl H₂O_{bidest} versetzt. Die phosphorylierten Primer konnten bei -20°C für mehrere Wochen aufgehoben werden.

3.2.6.5.3 Synthese des mutierten DNA-Stranges

Zur Synthese des mutierten DNA-Stranges wurden 200 ng ssDNA, 3 pmol phosphoryliertes Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotid und 1 µl 10x Annealingpuffer in einem Endvolumen von 10 µl H₂O_{bidest} zusammen pipettiert. Die ssDNA wurde 5 min in einem Aluminiumblock bei 70°C im Wasserbad denaturiert und für 30 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Überführen der Ansätze auf Eis wurden 1 µl 10x Synthesepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase, 2,5 µg Gen32-Protein und 1 U T4-DNA-Polymerase zugegeben und 5 min auf Eis gekühlt. Die Proben wurde 5 min bei 25°C und nachfolgend 90 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Synthesereaktion wurden 90 µl Stoppuffer zugegeben. Das neu synthetisierte Doppelstrang-Plasmid wurde wie oben beschrieben (3.2.2.2) in *E. coli* MC1061 transformiert und auf LB_{amp}-Platten ausplattiert.

10x LA-Puffer:	10 mM ATP 20 mM DTT 1 mg/ml BSA 10 mM Spermidin
----------------	--

10x Annealingpuffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 2 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl
----------------------	---

10x Synthesepuffer:	4 mM dGTP 4 mM dATP 4 mM dTTP 4 mM dCTP 7,5 mM ATP 175 mM Tris-HCl (pH 7,4) 37,5 mM MgCl ₂ 5 mM DTT
---------------------	---

Stoppuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA
-------------	---------------------------------------

3.2.7 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden zum Teil von der Firma Medigene (Martinsried) bzw. mit dem Sequenzierungskit Sequenase 2.0 (Amersham) nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al* (1977) durchgeführt. Eine Modifikation dieses Protokolls ermöglichte die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA (Chen und Seeburg, 1985). Alle benötigten Reagenzien für die Sequenzier-Reaktion waren in dem Sequenzierungskit Sequenase 2.0 enthalten

3.2.7.1 Sequenzier-Reaktion

Denaturierung der DNA

Für die Sequenzierung wurden 5 µg DNA eingesetzt. Von der Plasmid-Präparation wurde nach Bestimmen des DNA-Gehalts (3.2.3.4) eine entsprechende Menge DNA-Lösung entnommen und mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 90 µl DNA-Lösung gebracht. Durch Zugabe und Vermischen mit 10 µl 2M NaOH/2 mM EDTA wurde die DNA 30 min bei 37°C und weitere 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Durch Zugabe von 10 µl 3M Na-Acetat wurde die denaturierte DNA neutralisiert, mit 400 µl 99,8 % Ethanol gefällt und mit 70% kaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen in einem Vakuumkonzentrator wurde die DNA in 7 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und bis zur Annealing-Reaktion auf Eis gestellt.

Annealing-Reaktion

Zum Hybridisieren des Oligodesoxyribonukleotids wurde die vorbereitete denaturierten DNA mit 2 µl „Annealing-Puffer“ und 1 µl Sequenzier-Oligodesoxyribonukleotid (5 pm/ µl) vermischt und bei 65°C 2 min inkubiert. Die Proben wurden in 20 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Markierungs- und Kettenabbruch-Reaktion

Zum radioaktiven Markieren der DNA wurden 3 µl „Markierungsgemisch (dATP)“, 1 µl α-[³⁵S]-dATP (10µCi/µl) und 2 µl T7-DNA-Polymerase in „Enzym-Verdünnungspuffer“ (1,5 U/µl) den Proben zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Termination der Sequenzierung erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Didesoxyribonukleotide. Dazu wurden jeweils 2,5 µl des jeweiligen Terminationsgemisches („ddATP“, „ddCTP“, „ddGTP“, „ddTTP“) auf 37°C vorgewärmt und mit jeweils 4,5 µl des radioaktiv markierten Reaktionsansatzes vermischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei 37°C wurde die Reaktion in den 4 Terminationsansätzen durch Zugabe von jeweils 5 µl „Formamid-Auftragungspuffer“ gestoppt.

Annealing-Puffer	
Markierungsgemisch (dATP)	
Enzym-Verdünnungspuffer	
ddATP-Terminationsgemisch	Sequenase 2.0-Kit (Amersham)
ddCTP-Terminationsgemisch	
ddGTP-Terminationsgemisch	
ddTTP-Terminationsgemisch	

3.2.7.2 Sequenzier-Gelelektrophorese

Für die Sequenzier-Gelelektrophorese wurden 6%-ige PAA-Gele verwendet. Die Sequenziergele zeichnen sich durch den Gehalt an Harnstoff aus, der denaturierend auf DNA wirkt. Somit wird das Laufverhalten der einzelsträngigen DNA-Fragmente nur durch ihre Molekulargröße und nicht durch eventuelle Sekundärstrukturen bestimmt.

Nach Zugabe von 300 µl 10% APS und 60 µl TEMED in 60 ml einer 6% Acrylamid-Gellösung wurden diese sofort luftblasenfrei zwischen 2 Glasplatten gegossen und waagrecht positioniert. Der direkte Kontakt wurde durch einen 0,4 mm-Abstandshalter verhindert. Für die Aussparung der Probenaschen wurde ein Kamm mit den Zähnen nach außen zwischen die Glasplatten gesteckt. Das Gel polymerisierte 2 Stunden bis über Nacht aus.

Die Elektrophorese erfolgte in einer BRL-Apparatur mit 1 x TBE als Laufpuffer. Der Vorlauf des Gels erfolgte 10-20 min bei 1500 V. Der Kamm wurde umgedreht eingesteckt und die Probenaschen mit dem Laufpuffer gespült.

Zum Laden wurden die Proben bei 95°C für 5 min denaturiert. Pro Probenasche wurden 1,5 µl aufgetragen. Der eigentliche Elektrophoreselauf erfolgte bei 1500 V. Das Ende der Elektrophorese richtete sich nach der zurückgelegten Wanderungstrecke der Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol.

Am Ende der Elektrophorese wurde in die untere Pufferkammer 200 ml 3 M Natriumacetat gegeben und mit dem Laufpuffer vermischt. Nach 15 min Elektrophorese bei 1500 V wurde das Gel aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen und eine der beiden Glasplatte abgenommen. Das Gel wurde zur Fixierung mit 10% Essigsäure überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abgießen der Essigsäure wurde das Sequenziergel mit Ethanol_{abs.} benetzt bis eine Trübung auftrat. Das fixierte Gel wurde durch Auflegen von Whatman 3MM-Papier von der Glasplatte gelöst und auf dem Papier für 2 h bei 80°C im Geltrockner getrocknet.

6% Acrylamid-Gellösung:	6% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29 : 1)
	8M Harnstoff
	1 x TBE

3.2.8 *Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine mit 6xHis-Fusionsanteil aus E.coli*

Die Expression rekombinanter Gene in *E. coli* mit dem aus einem Hexahistidinpeptid (6xHis) bestehenden Fusionsanteil, ermöglicht eine schnelle und qualitative Aufreinigung bei hoher Ausbeute. Dabei bedient man sich der Immobilisierung des 6xHis-Fusionsanteil an Nickel-Agarose (Ni-Agarose).

3.2.8.1 *Proteinexpression*

Zur Expression eines 6xHis-Fusionsproteins wurden die entsprechenden cDNA in den Vektor pT7HxPflu kloniert, so dass die Transkription unter der Kontrolle des intrinsischen LacZ-Promotors stand. Das rekombinante Plasmid wurde in CaCl₂-kompetente *E.coli* BL21LysS transformiert (3.2.2.2), auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und ü/N bei 37°C inkubiert. Von einer einzelnen Bakterienkolonie wurde eine ü/N-Kultur in 5 ml angelegt und damit 1l LB_{Amp}-Medium angeimpft (3.2.1.2). Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C unter Schütteln herangezogen. In dieser Phase des logarithmischen Wachstums wurde durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid

(IPTG), einem nicht metabolisierbaren Induktors des Lac-Operons, in einer Endkonzentration von 2 mM die Transkription des 6xHis-Fusionsproteins induziert. Die Bakterienkultur wurde anschließend 4h bei Raumtemperatur geschüttelt. Unmittelbar vor der Induktion mit IPTG und nach Beendigung der Proteinexpression wurde jeweils 1 ml Bakteriensuspension für eine spätere Analyse der Proteinexpression entnommen. Die Bakterien wurden hierzu pelletiert, in je 60 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95°C aufgeköcht.

3.2.8.2 *Präparation des exprimierten Fusionsproteins*

Die Bakteriensuspension wurde in 1 l Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 5000 x g zentrifugiert. Alle weiteren Schritte zur Aufreinigung des 6xHis-Fusionsproteins wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Zum Aufschließen der Bakterienzellen wurden diese in das Zellpellet in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und ü/N bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Zellsuspension wurde der Puffer mit Lysozym, Aprotinin und Leupeptin (siehe unten) komplettiert und die Bakterien bis zur vollständigen Lyse mit Ultraschall bei mittlerer Intensität und einer Pulsdauer von 50% sonifiziert. Noch unlösliche Bakterienbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 30000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand aufbewahrt, das erhaltene Pellet in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und nochmals sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden wie oben abzentrifugiert und die erhaltenen Überstände in einem 50 ml Plastikröhrchen vereinigt.

Das klare Gesamtsonifikat wurde mit 1 ml einer in Sonifikationspuffer äquilibrierten Ni-NTA-Agarose versetzt und 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Ni-NTA-Agarose 4 mal mit 50 ml Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in einem 15 ml Plastikröhrchen in 2 Schritten, mit je 5 ml Elutionspuffer, bei 4°C und einer 5 minütigen Inkubation am Drehrad.

Von den verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden jeweils 40 µl Aliquots entnommen, mit je 20 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Qualität der Überexpression (3.2.8.1) und Aufreinigung wurde mittels einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung (3.2.14) analysiert.

Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde ebenfalls mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels und einem bekannten Proteinstandard abgeschätzt, da das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol bei einer Proteinbestimmung nach Bradford (3.2.8.3) störend wirkt. In der Regel konnten mit dieser Methode der Aufreinigung ca. 10 – 20 mg Protein erhalten werden. Die Proteinfractionen wurden bei -20°C gelagert.

Sonifikationspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0 0,3 M NaCl 100 µg/ml Lysozymlösung (Stocklösung: 100µg/µl (w/v)) 6 µg/ml Aprotinin 6 µg/ml Leupeptin
----------------------	---

Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,0
--------------	-----------------------

	0,3 M NaCl
	10 % (v/v) Glycerin
	20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,0
	0,3 M NaCl
	10 % (v/v) Glycerin
	100 mM Imidazol

3.2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wird durch die Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung basiert auf der Absorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue bei einer Wellenlänge von $\lambda=595\text{nm}$ in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbstoff bindet an basische (Ausnahme Arginin) und aromatische Aminosäurereste.

Die Eichkurve des Standardproteins BSA verschiedener Konzentration (1, 2, 5, 10, 20, 30 μg) ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben. Es wird eine konzentrierte Bradford-Reagenzlösung (BioRad[™]) verwendet, die 1:5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt wird. Die Messung der optischen Dichte erfolgt nach Mischen von 1 ml der verdünnten Farbstofflösung mit 20 μl der Proteinprobe unbekannter Konzentration.

3.2.9 Methoden der eukaryontischen Zellkultur

3.2.9.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Züchtung und Vermehrung eukaryontischer Zellen *in vitro* erfolgte in kontrollierter Umgebung in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO_2 , 96% relative Luftfeuchtigkeit). Die zur Züchtung der Zellen verwendeten Kulturgefäße bestanden aus Plastik (PP), das durch γ -Strahlen sterilisiert war. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt.

3.2.9.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Eukaryontische Suspensionszellen wurden in Plastikzellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycinsulfat kultiviert. Wurde die Zelldichte in den Zellkulturflaschen zu hoch ($> 4 \times 10^6$ Zellen /ml), so wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 900 x g für 5 min gesammelt und das Medium entfernt. Die Zellen wurden anschließend in entsprechender Verdünnung in frisches RPMI /10% FCS-Medium überführt. Wurden die Zellen jedoch für weitere Analysen (z.B. Immunpräzipitation) benötigt, so wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 900 x g gesammelt und wie in den jeweiligen Methoden angegeben entsprechend weiterbehandelt.

3.2.9.1.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärenente eukaryontische Zellen (COS, CV-1) wurden als Monolayer-Kulturen in beschichteten Zellkulturschalen (5 - 15 cm Durchmesser) in dem halbsynthetischem DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycinsulfat kultiviert. Zur Umsetzung wurden die

adhärente Zellen von der Unterlage der Zellkulturschalen durch enzymatischen Verdau der Adhensionsmoleküle mit Trypsin gelöst. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen mit 5 ml 1xPBS gewaschen. Nach Zugabe von 2,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml), das enzymatische Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt, wurde die Trypsinierung der Zelloberflächenproteine durch Zugabe von DMEM-Medium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend in entsprechender Verdünnung in frisches DMEM /10% FCS-Medium überführt. Wurden die Zellen jedoch für weitere Analysen (z.B. Immunpräzipitation) benötigt, so wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 900 x g gesammelt und wie in den jeweiligen Methoden angegeben entsprechend weiterbehandelt.

3.2.9.2 Anlegen eines Gefrierstocks aus Eukaryonten-Zellen

Zur langfristigen Lagerung von eukaryontischen Zellen wurden Gefrierstocks angelegt. Das Zellmaterial wurde wie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben geerntet. Die Zellen wurden in Aliquoten à 10^6 - 10^7 Zellen in 750 µl Medium/10% FCS resuspendiert, mit 750 µl eiskaltem FCS/30% DMSO (v/v) vermischt und auf Eis in sterile Einfrierröhrchen (Kryo-Tubes) abgefüllt und bei -80°C langsam eingefroren. Die längerfristige Lagerung der Dauerkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Anlegen einer neuen Flüssigkultur wurden die eingefrorenen Zellen ca. 15 - 20 min auf Eis aufgetaut und für 45 Sekunden im 37°C -Wasserbad geschüttelt. Die Zellen wurden erneut 2 min auf Eis gekühlt und die Zellsuspension in 75 cm²/270 ml Gewebekulturflaschen bzw. Zellkulturplatten mit vorgewärmten Kulturmedium überführt.

3.2.10 Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.10.1 DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS-7m6-Zellen

Die DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion ermöglichte die transiente Überexpression nativer und chimärer Proteine in adhärennten Zellen (COS-7m6-Zellen). Bei dieser Transfektionsmethode wird die Plasmid-DNA im Komplex mit DEAE-Dextran mittels Endocytose über einen bisher nicht geklärten Mechanismus aufgenommen. Die Transfektionsprozedur erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Lopata *et al.* (1984). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden jedoch verschiedene Parameter modifiziert (Sussman und Milman, 1984)

COS-7m6-Zellen einer konfluenten Schale wurden 24 h vor der Transfektion in eine neue Schale umgesetzt und verdünnt (3.2.9.1),so dass die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 60 - 80% aufwiesen. Das Medium wurde durch 5 ml DMEM/10% NuSerum ersetzt und 5 - 10µg Plasmid-DNA jedes zu transfizierenden Konstruktes zugegeben. 200 µl einer 25-fach konzentrierten DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung startete die Transfektion. Nach ca. 4-5 h Inkubation bei $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, wenn sich 80% der Zellen morphologisch abgerundet hatten aber noch adhärerten,wurde das Medium wieder entfernt. Die Zellen wurden für 2 min mit 5 ml PBS/10% DMSO (v/v) gewaschen. Die PBS/DMSO-Lösung wurde verworfen und die Zellen ü/N bei $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ in 10 ml DMEM/10% FCS inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 1:1 auf frische Platten umgesetzt. Nach weiteren 24-48 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen für die verschiedenen Analysen verwendet.

25x DEAE-Dextran/Chloroquin	10 mg/ml (w/v) DEAE-Dextran 2,5 mM Chloroquinphosphat in 1 x PBS Sterilisation durch Filtration Lagerung in 1 ml Aliquots bei -20°C
-----------------------------	--

3.2.10.2 Transfektion humaner T-Zellen durch Elektroporation

Die Transfektion humaner Zellen mittels Elektroporation wurde zur transienten Proteinüberexpression vor allem bei Suspensionszellen (Jurkat LT, E6 usw.) eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen in Gegenwart der einzubringenden DNA kurzen elektrischen Pulsen unter hoher Spannung ausgesetzt und so die Zellmembran kurzfristig für DNA-Moleküle permeabilisiert.

Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit 900 x g für 5 min abzentrifugiert und durch Aufnahme des Zellpellets in RPMI /10% FCS-Medium in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen/400 μ l eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 400 μ l in eine sterile Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4 cm) pipettiert und mit bis zu 40 μ g DNA (in H₂O_{bidest}) versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei Raumtemperatur mit der für die einzelnen Zelllinien erforderlichen Spannung und Kapazität:

	<i>Spannung</i>	<i>Feldstärke</i>
Jurkat LT	310 V	1200 μ F
Jurkat E6	210 V	960 μ F

Zur Expression wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 ml RPMI/10 % FCS-Medium überführt und ü/N im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

3.2.10.3 Infektion eukaryontischer Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren

Das Vaccinia-Virus wird für die transiente Expression von Genen in Säugerzellen (Panicali und Paoletti, 1982; Mackett *et. al.*, 1982) als „Vektorsystem“ benützt. Der Vorteil der Vaccinia-Viren besteht in ihrem breiten Wirtsspektrum und der hohen Expressionsrate.

3.2.10.3.1 Herstellen rekombinanter Viren

Von einer konfluenten 10 cm-Schale CV-1-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden mit 10^8 - 10^9 pfu (plaque forming unit) des Vaccinia-Wildtypvirus pro ml Medium infiziert und 2 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative

Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und das Plasmid pTKG mit dem jeweiligen Insert auf folgende Weise vorbereitet und zugegeben:

Zu 500 µl 250 mM CaCl₂ wurden 10µg pTKG-Plasmid-DNA gegeben. Unter heftigem Schütteln wurde diese Mischung in 500 µl 2x HEBS-Lösung getropft, um einen sehr feinen Niederschlag aus CaPO₄ zu erhalten. Unter Schwenken wurde der Ansatz auf die CV-1-Zellen gegeben. Nach 12 h Inkubation bei 37°C/5 % CO₂, wurde das Medium durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt und die Zellen weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die so infizierten Zellen wurden anschließend mit dem Zellschaber gelöst und durch Zentrifugation 5 min bei 900 x g geerntet. Das Zellpellet wurde in 500 µl DMEM (ohne Zusätze) aufgenommen und die Zellen durch 3-maliges Einfrieren auf Trockeneis/Methanol und Auftauen lysiert. Zur vollständigen Lyse wurde die Suspension anschließend mit 500 µl Trypsin (2x umkristallisiert, Worthington) versetzt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die so aufgeschlossene Zellsuspension, die neben rekombinatem auch noch Wildtyp Virus enthielt, konnte zur Selektion auf rekombinante Viren eingesetzt werden.

2x HEBS-Lösung	270 mM NaCl
	12 mM D ⁺ -Glucose
	100 mM KCl
	1,4 mM Na ₂ HPO ₄
	40 mM HEPES
	pH 7,1
	Sterilisation durch Filtration
	Lagerung bei -20°C

3.2.10.3.2 Selektion rekombinanter Viren

Zur Selektion wurden konfluente 6 cm CV-1-Zellkulturschalen ü/N mit 3 ml Selektionsmedium vorinkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und durch 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit der Suspension aus rekombinatem und Wildtyp Virus versetzt und zur Infektion 1 h bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und durch 3 ml Selektionsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 36 – 48 h wurden durch rekombinanten Virus lysierte Zellbereiche als Viren-Plaques sichtbar. Die Viren-Plaques wurden unter sterilen Bedingungen von der Platte entfernt, in 200 µl 10 mM Tris (pH 9,5) überführt und für eine erneute Selektionsrunde eingesetzt. Nach 3 – 4 Selektionsrunden lag der rekombinante Virus in der Regel in reiner Form vor und konnte auf Proteinexpression getestet werden.

Selektionsmedium	190 ml DMEM
	2,5 % (v/v) FCS
	10 mg MPA
	100 mg Xanthin
	3 mg Hypoxanthin

3.2.10.3.3 Identifikation rekombinanter Viren

Zur Identifikation rekombinanter Viren wurde die Expression des klonierten Proteins mit einem spezifischen Antikörper getestet.

Konfluente Schalen mit CV-1 wurden mit dem rekombinanten Vaccinia-Stock infiziert, so dass einzelne Plaques nach 24 h zu erkennen waren. Das Medium wurde abgenommen und durch 1 ml 1 x PBS ersetzt.

Zum Anfärben des überexprimierten Proteins wurde der spezifische Antikörper in einer 1:500 Verdünnung zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Zellen wurden danach 3-mal mit 1 x PBS gewaschen und erneut mit 1 ml PBS überschichtet. Dann wurden 2 µg eines alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpers zugegeben, erneut 1 h bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert und anschließend 4x mit PBS gewaschen. Die Detektion der überexprimierten Proteine erfolgte anschließend durch Zugabe von 2,5 ml AP-Puffer, 8,25 µl BCIP (50 mg/ml) und 16,5 µl NBT (50 mg/ml). Rekombinantes Protein exprimierende Zellen färbten sich dabei nach etwa 10-20 min violett.

AP-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂

3.2.10.3.4 Vermehrung rekombinanter Viren

2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) wurden in einer dicht bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale mit CV-1-Zellen mit 20 µl einer rekombinanten Vaccinia-Virus Präparation versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C/5 % CO₂ wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml DMEM/10 % FCS ersetzt.

Die gleichmäßige Infektion mit Virus wurde nach 12-36 h bei der Betrachtung im Mikroskop durch Auflösung des homogenen Zellverbandes sichtbar. Die Zellen wurden in diesem Stadium 2-mal mit 5ml PBS gewaschen und nach erneuter Zugabe von 5 ml PBS mit einem sterilen Plastikzellschaber von der Platte abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation bei 900 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 300 µl 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) aufgenommen. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur lysiert, im Ultraschallbad bei maximaler Beschallungsstärke für 30 sek. vereinzelt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.10.3.5 Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die Zellen in möglichst kleinem Volumen Medium ohne Zusätze resuspendiert. Die Infektion mit rekombinantem Virus mit 10 MOI (multiplicity of infection, entspricht 10 Viren pro Zelle) erfolgte für 1 h bei 37°C/5% CO₂. Dem Infektionsansatz wurden danach 5 ml – 15 ml Medium mit 10% FCS hinzugefügt. Nach einer Expressionsdauer von 6 h – 15 h bei 37°C/5% CO₂ konnten die Zellen für weitere Analysen eingesetzt werden.

3.2.11 *Aufschluß eukaryontischer Zellen*

Um endogene und exogene Zellproteine in Lösung zu bringen, wurden die Zellen je nach weiterem Verwendungszweck hypotonisch oder mittels eines Detergenz aufgeschlossen. Als Detergenz wurde in der Regel das nichtionische Detergenz Triton X-100 verwendet, da die Tertiär – und Quartärstruktur der Proteine durch Behandlung mit diesem milden Detergenz weitgehend erhalten bleibt. Dazu wurden die Zellen wie unter Abschnitt 3.2.9.1 gesammelt. Das Zellpellet wurde auf Eis in 150 µl – 500 ml Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren lysiert. Durch Zentrifugation bei 20800 x g und 4°C wurden der unlösliche Zelldebris, unter anderem bestehend aus Membranfraktionen und chromosomaler DNA, von dem Überstand mit den gelösten Proteinen getrennt. Der Überstand, das Gesamtzelllysate, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen wie SDS-PAGE (3.2.14) oder Präzipitationsstudien (3.2.13) verwendet.

Der verwendete Lysis-Puffer richtete sich nach der weiteren Analyse. Um eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen der zu untersuchenden Proteine zu vermeiden, wurde der Phosphatase-Lysis-Puffer verwendet, dem als Phosphatase-Inhibitoren NaF und Vanadat VO_4^{3-} zugesetzt war. Bei Analysen, in dem der Phosphorylierungsstatus der Proteine nicht relevant war, wurde der Lysis-Puffer verwendet.

Lysepuffer	100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8,0) 1% (v/v) Detergenz (Triton-X-100) 40 µg/ml PMSF 20 µg/ml Aprotinin 20 µg/ml Leupeptin
Phosphatase-Lysepuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,2 40 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM NaF 0,5 mM Na_3VO_4 1% (v/v) Detergenz (Triton-X-100) 40 µg/ml PMSF 20 µg/ml Aprotinin 20 µg/ml Leupeptin

3.2.12 Trennung von cytoplasmatischen und membranständigen Proteinen

Der biochemische Nachweis in welchem Zellkompartiment Proteine lokalisiert sind, erfolgte durch Trennung der Zellmembranen von dem Cytosol.

Nach dem mechanischen Ablösen der COS Zellen von der Unterlage mittels eines Gummischabers, werden die Zellen durch Zentrifugation bei 900 x g geerntet und der Medium-Überstand vollständig entfernt. Die Zellen wurden 1 mal mit 1 x PBS sorgfältig gewaschen und das Zellpellet in 500 µl Hypotonischer Puffer pH 7,9 resuspendiert.

Durch wiederholtes luftblasenfreies Auf- und Abziehen (15 – 20 mal) in einer 1 ml Spritze wurden die Zellen hypotonisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugation in einer gekühlten Eppendorffzentrifuge bei 20800 x g für 5 min wurde die primäre Membranfraktion von der cytoplasmatischen Fraktion, bestehend aus dem Überstand, getrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die Inkubation mit Protein A Sepharose mit 50 µl NP-40 (10%) und 20 µl 5M NaCl versetzt. Das verbleibende Pellet, die primäre Membranfraktion, wurde 2 mal in Hypotonischen Puffer durch 5-10 maliges Aufziehen in einer 1 ml Spritze gewaschen. Nach Zentrifugation bei 20800 x g bei 4°C und Entfernen des Hypotonischen Puffers wurde das Pellet in 500 µl Lysis-Puffer pH 7,9 aufgenommen.

Nach Zentrifugation bei 20800 x g für 5 min wurde der Überstand, der nun die Membranfraktion darstellte, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das verbleibende Zentrifugat wurde verworfen.

Zum Nachweis der exogenen Ig-Fusionsproteine wurden die Cytoplasmafraktion und die Zellmembranfraktion mit 30 µl Protein A Sepharose für 1-2 Stunden bei 4°C im Drehrad inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend 2 mal mit Lysis-Puffer pH 7,9 gewaschen und in 1 x SDS Auftragspuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Analyse der Proben erfolgte durch einen Immunblot (3.2.15).

Hypotonischer Puffer	10 mM HEPES
	10 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM EDTA
Lysis-Puffer pH 7,9	10 mM HEPES
	10 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	150 mM NaCl
	1% NP-40
	Protease-Inhibitoren (50 µl PMSF
	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
	25 µl DTT
	25 µl Aprotinin
	25 µl Leupeptin)

3.2.13 Immunpräzipitation von Proteinen

Nach der Lyse der zu untersuchenden Zellen (3.2.11) erfolgte die Immunpräzipitation der Proteine entweder direkt über den Ig-Fusionsanteil an Protein A/6MB-Sepharose (Pharmacia) oder indirekt über spezifische Antikörper.

Zur Präzipitation des Immunglobulin-Fusionsproteins an Protein A, das hochaffin an den Fc-Teil vieler Immunglobuline bindet und an einer polymeren Matrix aus Sepharose immobilisiert war, wurden je 500 µl Zellysate in der Regel 30 µl in Lysis-Puffer voräquilibrierten Protein A/6MB-Sepharose (Pharmacia) eingesetzt.

Zur Immunpräzipitation der Proteine über spezifische Antikörper wurde dem Gesamtzellysate der spezifische Antikörper in definierter Endkonzentration zugesetzt, 1 h auf dem Drehrad bei 4°C vorinkubiert und anschließend 10 – 30 µl in Lysis-Puffer voräquilibrierten Protein A-Sepharose zugesetzt.

Die Immobilisierung an Protein A-Sepharose erfolgte in beiden Fällen für 1 – 2 h auf dem Drehrad bei 4°C. Die Sepharosekügelchen wurden durch Zentrifugation bei 900 x g sedimentiert und der Überstand vollständig abgezogen. Um unspezifisch an die Protein A-Matrix gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Sepharosekügelchen 2 x mit 1 ml des jeweiligen Lysis-Puffers gewaschen. Bei der Notwendigkeit stringenterer Waschbedingungen wurde dem Lysis-Puffer NaCl in einer Endkonzentration von 300 – 500 mM zugesetzt. Um die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese zu analysieren, wurden die Sepharosekügelchen in 30 µl Lysis-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 30 µl 3 x SDS-Auftragspuffer (3.2.14) 5 min bei 95°C aufgekocht.

3.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurde zur Trennung von Proteingemischen und zur Größenbestimmung der darin enthaltenen Proteine eingesetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in der Regel unter denaturierenden Bedingungen (0,1% (w/v) SDS) durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Polyacrylamid als Trägermedium besitzt den Vorteil, dass es chemisch inert ist und zudem die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid leicht variiert werden kann. Proteine besitzen aufgrund ihrer Zusammensetzung aus basischen, neutralen und sauren Aminosäuren eine pH-abhängige Nettoladung, die durch Anlagerung der negativ geladenen SDS-Moleküle, direkt proportional zur Molekulargröße des Proteins, überdeckt wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-haltigen Gelen wird somit durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und dem Vernetzungsgrad des Gels bestimmt.

Ein Gel für eine SDS-PAGE bestand aus zwei aneinander angrenzenden Teilgelen, einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Sammelgel, das etwa 1/4 der Gesamtlänge eines gesamten Protein-Gels ausmachte, konzentriert die geladenen Proben am Übergang zum Trenngel zu einer scharfen Bande, so dass auch größere Probenvolumina ohne Beeinträchtigung der Auflösung aufgetragen werden können. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach dem Massen/Ladungsverhältnis.

Nach dem Reinigen der Glasplatten mit Ethanol wurde die Gelgießvorrichtung mit einem Abstandshalter (0,75 mm Stärke) zwischen den Glasplatten aufgebaut. Das Trenngel wurde zwischen

die Glasplatten gegossen, bis es eine Höhe von 3/4 des gesamten Gels ausmachte. Für das Trenngel wurden je nach erforderlicher Konzentration die folgenden Agenzien in angegebener Reihenfolge vermischt:

<i>Trenngel</i>	8% (ml pro Gel)	10 % (ml pro Gel)	12% (ml pro Gel)
H ₂ O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml
30 % Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl

Das noch flüssige Gel wurde vorsichtig mit ca. 2 ml Wasser überschichtet, um eine plane Oberfläche des Trenngels zu erzeugen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, wobei durch eine Schablone die Probenaschen ausgespart blieben.

<i>Sammelgel</i>	5 % (ml pro Gel)
H ₂ O	1,4 ml
30 % Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	0,25 ml
10 % SDS	20 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	3 µl

Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Taschen gründlich mit Laufpuffer gespült, um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen. Vor dem Auftragen wurde den Proteinproben $\frac{1}{3}$ Volumen 3 x SDS-Probenpuffer zugesetzt und der Ansatz 5 min bei 95°C aufgeköcht. Das Gel wurde mit den Proben beladen und der Gellauf in 1x SDS-Laufpuffer bei 35 mA für 1-4 Stunden durchgeführt, bis eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht war. Das Trenngel wurde je nach Verwendungszweck gefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

3x SDS-Probenpuffer (reduzierend)	150 mM Tris/HCl pH 6,8 300 mM DTT 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,3% (w/v) Bromphenolblau Der Puffer wurde in Aliquots bei – 20°C gelagert
-----------------------------------	---

10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
--------------------	--

3.2.14.1 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Zur raschen Anfärbung der durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde das Verfahren der Coomassie-Blau-Färbung angewendet. Das Polyacrylamid-Gel wurde hierzu ca. 1 h bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt und anschließend 3 x 15 min mit der Entfärbelösung inkubiert. Zum Trocknen wurde das Gel luftblasenfrei auf ein Whatman-Papier aufgebracht und für 1h bei 80°C in einem Geltdrockner getrocknet.

Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,2 % (w/v)Coomassie Blau R-250
Entfärbelösung:	20 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure

3.2.15 Immunblot (Western Blot)

3.2.15.1 Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Mit dieser Methode werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach einer SDS-PAGE auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. Nitrocellulose oder Nylon, übertragen. Dadurch wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Das ursprüngliche im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replikation des ursprünglichen Gels entsteht. Da beim Transfer die Immunreaktivität der Proteine in der Regel erhalten bleiben, können sie mit Antikörpern detektiert und so quantitativ und qualitativ untersucht werden.

Der Proteintransfer erfolgte stets auf nicht aktivierte Nitrocellulosemembran nach dem „Elektroblotting“-Verfahren (Towbin *et. al.*, 1979, Burnette, 1981). Der Aufbau der Elektroblotting-Apparatur CarboGlas Semidry-Apparatur (Schleicher&Schuell) erfolgte nach dem in Abbildung 3.2.1 wiedergegebenen Schema mit Filterpapier, Nitrocellulosemembran und Polyacrylamidgel, die zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurden.

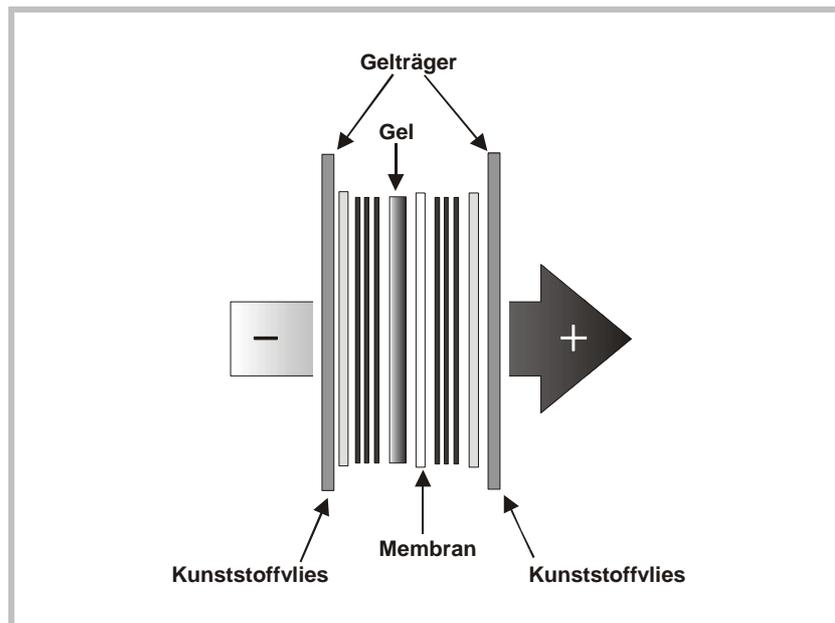


Abbildung 3.2.1: Schema der Western Blot Apperatur

Der Transfer der Proteine erfolgte für ca. 90 min bei $2\text{mA}/\text{cm}^2$ Gelfläche.

Transferpuffer	5,8 g Tris-Base
	2,9 g Glycin
	3,7 ml 10% (w/v) SDS
	200 ml Methanol
	mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 1 l

3.2.15.2 Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembran mit Antikörper

Auf der Membran lassen sich einzelne Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen. Dies bedeutet, dass die Membran zuerst mit dem Antikörper behandelt wird, der das gesuchte Protein erkennt. Dieser Antikörper wird primärer Antikörper genannt. Um den gebundenen primären Antikörper auf der Membran sichtbar zu machen, wird ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper) benötigt, der den primären Antikörper detektiert. An diesen zweiten Antikörper ist ein Enzym, die Meerretichperoxidase, gekoppelt. Die Meerretichperoxidase spaltet H_2O_2 ; die dabei frei werdenden Sauerstoffradikale können zur Oxidation anderer Substrate benutzt werden. Das verwendete *ECL Detection System* (Amersham) nutzt die Reaktion, Luminol unter alkalischen Bedingungen und Anwesenheit von H_2O_2 zu oxidieren. Bei dieser Reaktion wird das Luminol kurzfristig in einen angeregten Zustand versetzt; bei der Rückkehr in den energieärmsten Zustand wird die überschüssige Energie in Form von Lichtquanten ($\lambda_{\text{max}} = 428\text{nm}$) abgestrahlt. Diese Lichtquanten können dazu benutzt werden einen aufgelegten Röntgenfilm (Kodak® X-OMAT-AR) zu schwärzen.

Dazu wurde die Membran nach dem Blot (3.2.15.1) mit 1 x TBS gewaschen. Zum Absättigen der proteinfreien Bereiche der Membran, um eine unspezifische Anlagerung des primären Antikörpers zu

verhindern, wurde die Nitrocellulosemembran für mindestens 30 min in der Blockierlösung 1 x TBS/1% BSA geschwenkt. Nach Abgießen der Blockierlösung wurde die Membran mit 10 ml 1x TBST/0,1% BSA mit definierter Endkonzentration des primären Antikörpers 1 – 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde 3-mal mit 150 ml 1 x TBST für jeweils 5 min gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurde wie bei der Hybridisierung des primären Antikörpers verfahren. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit 1 ml ECL-Detection Lösung 1min behandelt und in Plastikfolie eingelegt. Die Expositionszeit des aufgelegten Röntgenfilms (Kodak® X-OMAT-AR) richtete sich nach der Intensität der Chemilumineszenz.

1x TBST 10 % 10x TBS
 0,1 % (v/v) Tween 20
 pH 7,5 mit HCl einstellen

Blockierungslösung 0,25 % (w/v) Gelatine in 1x TBST

3.2.15.3 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen

Das „Stripping“-Verfahren ermöglicht das Entfernen spezifischer Antikörper von Nitrozellulosemembranen durch Reduktion und Denaturierung der Antikörper. Dadurch wird die mehrfache Detektion mit Antikörpern verschiedener Spezifität auf einer Membran ermöglicht.

Membrane mit antikörpergebundenen Proteinen wurden 5 min bei 70°C in „Stripping“-Puffer unter leichtem Schwenken gewaschen. Nach Entfernen des Puffers wurde die Membran 3x 5 min bei Raumtemperatur mit 50 ml 1x TBST gewaschen und konnte anschließend erneut zur spezifischen Proteindetektion (3.2.15.2) eingesetzt werden.

„Stripping“-Puffer: 100 mM 2-Mercapto-Ethanol
 2 % SDS
 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7)

3.2.16 Immuncytochemie

Bei der Immuncytochemie werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um die Expression und subzelluläre Lokalisation von Proteinen in den Zellen zu bestimmen.

3.2.16.1 Nachweis von Proteinen durch die FACS-Analyse

Die Quantifizierung sowohl extrazellulär als auch intrazellulär exprimierter Proteine erfolgte durch fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (FACS = fluorescence activated cell sorting). Dazu werden die

Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern markiert und die Anzahl der nach Anregung mit Laserlicht spezifischer Wellenlänge aufleuchtenden Zellen bestimmt.

Etwa 3×10^6 Zellen wurden dazu 5 min bei $900 \times g$ in einem 15 ml Plastikröhrchen sedimentiert, mit 5 ml 1 x PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Zur extrazellulären Proteinfärbung wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit dem spezifischen Antikörper in einer geeigneten Verdünnung 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und erneut in 1 ml 1x PBS mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper (gerichtet gegen den ersten Antikörper) im Dunkeln 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Mittels des FACS-Meßgerät Epics XL konnte der Prozentsatz proteinexprimierender Zellen anhand der Fluoreszenz bestimmt werden.

Die Anfärbung und Detektion intrazellulär exprimierter Proteine erfolgte auf ähnliche Weise, hier wurden lediglich die Zellen vor der Inkubation mit dem primären Antikörper zunächst mit 1 ml 1xPBS/2 % HCOH (v/v) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, die Zellen wie oben abzentrifugiert und anschließend noch überschüssiges Formaldehyd mit 2 ml einer 1 x PBS /2 % Glycin (w/v)-Lösung zur Reaktion gebracht. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und zur Anfärbung die entsprechenden Antikörper in 1 ml 1 x PBS /0,2 % Triton-X-100 (v/v) verdünnt und die Zellen analog wie oben weiterbehandelt.

3.2.16.2 Nachweis von Proteinen durch die Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht die Analyse der Proteinexpression und der subzellulären Lokalisation bestimmter Proteine in Zellen. Die zu analysierenden Proteine werden analog der FACS-Analyse mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern markiert und in einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

Pro Färbeansatz wurden etwa $1 - 3 \times 10^6$ Zellen für 5 min bei $900 \times g$ abzentrifugiert und in $200 \mu\text{l}$ 1xPBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Sigma) aufgetragen und 20 min bei 37°C stehen gelassen, so dass die Zellen über nicht kovalente Wechselwirkungen an dem Poly-L-Lysin adhären konnten. Überschüssige Zellen wurden vorsichtig mit 1 x PBS abgewaschen und anschließend die adhären Zellen mit 1 x PBS/2% Formaldehyd (v/v) für 15 min auf dem Objektträger fixiert. Nach Absättigung des verbliebenen Formaldehyds mit 1x PBS/2% Glycin (w/v) erfolgte für 30 – 60 min die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper definierter Endkonzentration in 1 x PBS /0,2% Triton-X-100(v/v) bei intrazellulären Proteinen bzw. 1 x PBS bei extrazellulären Proteinen. Überschüssiger Antikörper wurde durch 2-maliges Waschen des Objektträgers mit 1 x PBS /0,2% Triton-X-100(v/v) bzw. 1 x PBS entfernt. Der sekundäre Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper wurde anschließend analog dem jeweiligen primären Antikörper verdünnt und im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Überschüssiger sekundärer Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen wie oben beschrieben entfernt und die Zellen anschließend mit „mounting“-Medium überschichtet, um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Nach dem Auflegen eines Deckglases wurden die beiden Glasplatten mit Nagellack abgedichtet, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Zellen konnten nun mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica) auf die markierten Proteine untersucht werden.

3.2.17 Radioaktive *in vitro* Proteinphosphorylierung

Bei dieser Methode erfolgte die radioaktive *in vitro* Phosphorylierung von in COS-Zellen transfizierten Ig-Fusionsproteinen (3.2.10). Nach der Transfektion der COS-Zellen und anschließender Immunpräzipitation (3.2.13) an Protein A Sepharose wurden die Sepharosekügelchen mit den immobilisierten Fusionsproteinen mit 500 μ l 20 mM HEPES äquilibriert. Nach Entfernen der 20 mM HEPES-Lösung durch Zentrifugation für 2 min bei 900 x g, wurden die Proben in 20 μ l Phosphorylierungspuffer aufgenommen. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 0,5 – 1 μ l γ - 32 P]ATP gestartet und 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugaben von 30 μ l 3 x SDS-Auftragungspuffer und anschließender Inkubation bei 95°C für 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend in einer SDS-Gelelektrophorese (3.2.14) analysiert.

3.2.18 Zweidimensionale Phosphopeptidkartierung

Die Phosphopeptidkartierung diente dazu, Phosphorylierungsereignisse in einem Protein bestimmen zu können. Dazu wurden die Proteine *in vitro* mit radioaktiv markiertem Phosphat (32 P) markiert und mit der Proteinase Trypsin verdaut. Auf Grund der Spaltungsspezifität des Trypsins C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin entstehen Oligopeptide, die nach zweidimensionaler Auftrennung identifiziert werden können. In der ersten Dimension werden die Peptide elektrophoretisch entsprechend ihrem isoelektrischem Punkt, in der zweiten Dimension dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt.

Nach radioaktiver *in vitro*-Phosphorylierung (3.2.17) wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.14) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (3.2.15.1). Zum Absättigen der Membran, um eine Immobilisierung des Trypsins und die dadurch verursachte Inaktivierung des Trypsins zu vermeiden, wurde die Membran 30 min in 1% Polyvinylpyrrolidon/ H_2O_{bidest} (w/v) inkubiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms wurden die radioaktiv markierten Proteine lokalisiert, die entsprechenden Bereiche aus der Nitrocellulosemembran mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Membranstücke wurden in 100 μ l 50 mM Ammoniumcarbonat (pH 7,9) aufgenommen und 12 μ l Trypsinlösung (TPCK-behandelt) bei 37°C inkubiert. Um den Verdau zu komplettieren, wurde am nächsten Tag weitere 5 μ l der Trypsinlösung zugegeben und 2 h bei 37°C stehen gelassen. Das Membranstück, das nun keine gebundenen Peptidfragmente mehr enthielt, wurde entnommen und 500 μ l H_2O_{bidest} in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Ammoniumcarbonat wurde durch mehrmaliges Lyophilisieren der Proteine in einem Vakuum-Konzentrator und erneuter Aufnahme in H_2O_{bidest} entfernt. Zuletzt wurden die lyophilisierten Proteine in 15 μ l Elektrophoresepuffer (pH 4,72) 10 min bei Raumtemperatur resuspendiert. In Abhängigkeit der Ladungseigenschaft der Proteine und dem pH-Wert des verwendeten Elektrophorese-Puffers wurden jeweils 7 μ l der Proben an den entsprechenden Positionen auf die 20 x 20 cm DC-Fertigplatte Cellulose (Merck) aufgetragen. Als Laufkontrolle der Elektrophorese wurde 1 μ l des Farbstoffmarkers entsprechend den Herstellerangaben auf die Zellulose-Platte aufgetragen. Zum punktförmigen Konzentrieren der aufgetragenen Proben und zum Äquilibrieren der Dünnschichtplatten, wurde ein mit Elektrophoresepuffer (pH 4,72) getränktes Whatman 3MM-Papier, an dem kreisrunde Löcher mit einem Durchmesser von ca. 2 cm ausgeschnitten worden waren, vorsichtig auf die Dünnschichtplatten aufgelegt und leicht angedrückt. Nachdem sich die Patte vollständig mit dem Elektrophoresepuffer (pH 4,72) vollgesogen hatte, wurde das Whatman-Papier entfernt und den Angaben des Herstellers in

die Elektrophorese-Apparatur Hunter Thin Layer Peptide Mapping System (CBS Scientific, USA) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 36 min bei 1000V in dem Elektrophorese-Puffer (pH 4,72) unter ständiger Kühlung der Dünnschichtplatte auf 4°C. Nach der Elektrophorese wurden die Platten vollständig getrocknet und in eine mit Isobuttersäure-Puffer äquilibrierte Chromatographiekammer gestellt, so dass der Flüssigkeitspegel zu Beginn 1 cm unter der Probenfront lag. Die Chromatographie wurde beendet, sobald die Puffer-Lauffront bis 2 cm unterhalb der oberen Kante der Dünnschichtplatte nach ca. 8-12 h gestiegen war. Die Platten wurden bei Raumtemperatur getrocknet und autoradiographisch durch Auflegen eines Röntgenfilmes für wenigstens 24 h ausgewertet..

Trypsinlösung (TPKC-behandelt):	1 mg/ml Trypsin (TPKC-behandelt) Lagerung in 25 µl Aliquots bei -80°C
Elektrophorese-Puffer (pH 4,72):	100 ml n-Butanol 50 ml Pyridin 50 ml Essigsäure H ₂ O _{bidest} ad 2000 ml
Farbstoffmarker:	5 mg/ml ε-DNP-Lysin 1 mg/ml Xylencyanol 500µl Elektrophorese-Puffer (pH 4,72) H ₂ O _{bidest} ad 1 ml Lagerung in 50µl Aliquots bei -20°C
Isobuttersäure-Puffer:	626 ml Iso-Buttersäure 48 ml Pyridin 29 ml Essigsäure 19 ml n-Butanol H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml

3.2.19 Messung der IL-2 Promotoraktivität nach T-Zell-Aktivierung

Die Stimulierung von T-Zellen führt zur Transkriptionsinduktion des Interleukin-2 Gens. Um die Aktivität des IL-2-Promotors messen zu können, bedient man sich der Hilfe eines transfizierten Reporterplasmids mit einem IL-2 promotorabhängigen Luciferase-Gen (IL-2 luc). Durch Bestimmen der Luciferaseaktivität in diesen Zellen, erhält man einen Maßstab für die Aktivität des IL-2 Promotors in diesen Zellen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 10µg IL-2 luc und weiteren eukaryontischen Expressionsvektoren (2 – 40µg) je 1,5 x 10⁷ Zellen durch Elektroporation (3.2.10.2) transfiziert. Nach 14 – 16 h Inkubation in einem Brutschrank wurden die Zellen bei 900 x g abzentrifugiert und in 3-5 ml frischem RPMI/10% FCS aufgenommen. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in die Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben und nach Zugabe von Antikörper, 1µl Calcium-Ionophor A23187 (700 µg/ml

in DMSO) und 1 µl des Diacylglycerin-Analogons PMA (50 µg/ml in DMSO) in der jeweilig angegebenen Kombination weitere 8 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 900 x g für 5 min sedimentiert, in 50 – 70 µl Luciferase-Reporter-Lysispuffer (Promega) aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Ansätze wurden 10 min bei –80°C eingefroren und nach dem Auftauen 3 min bei 20800 x g zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in eine FluoroNunc-Microtiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 95 µl IL-2 Reagenz wurde die Chemilumineszenz-Intensität im TopCount Microplate Scintillation Counter (Packard) bestimmt.

3.2.20 *In vitro* Interaktionsuntersuchungen von Proteinen („Cross-Pulldown“-Methode)

In vitro Interaktionsuntersuchungen werden zur Analyse von Protein/Protein-Wechselwirkungen durchgeführt, wenn die Wechselwirkungen der beiden Interaktionspartner für eine Koimmunpräzipitation zu schwach sind oder unter definierten Bedingungen analysiert werden sollen. Das Prinzip beruht auf der Anreicherung eines der beiden Proteine durch Immobilisierung an einer Matrix. Das so präparierte Protein kann anschließend mit rekombinanten, bakteriell exprimierten Protein in höherer Konzentration unter definierten Bedingungen zur Interaktion angeboten werden.

Das Ig-Fusionsprotein wurde in eukaryontischen Zellen transfiziert (3.2.10). Das exogen überexprimierte Fusionsprotein wurde wie in Abschnitt 3.2.13 beschrieben an Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Sepharose-Kügelchen wurden gründlich mit dem verwendeten Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Äquilibration der Protein A Matrix mit dem Puffer, in dem die Interaktion untersucht werden sollte. Die Sepharose-Kügelchen wurden in 50 µl Puffer aufgenommen und das rekombinante, aus Bakterien aufgereinigte Protein (3.2.8) in definierter Endkonzentration zugesetzt. Die Interaktion der beiden Proteine erfolgte normalerweise bei 37°C für 10 – 20 min unter ständigem Schütteln der Proben, um ein Absetzen der Matrix zu verhindern und somit für eine gute Durchmischung der beiden Interaktionspartner zu sorgen. Die Sepharose-Kügelchen wurden 4-5 mal mit dem Interaktionspuffer gewaschen, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Um die Protein/Protein-Interaktion mittels SDS-PAGE (3.2.14) und Immunoblot (3.2.15) analysieren zu können, wurden die Proben in 3 x SDS-Probenpuffer (3.2.14) aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht.

3.2.21 *In vitro* GDP/GTP Austauschreaktion

GTP bindende Proteine (G-Proteine) besitzen eine Nukleotidbindungsstelle, die sowohl GDP als auch GTP binden kann. Liegt das Protein in der GDP gebunden Form vor, so kann durch Proteine, die mit dem G-Protein in direkte Interaktion treten, der Austausch von GDP mit GTP katalysiert werden. Um Proteine auf die katalytische Fähigkeit zu analysieren, den GDP/GTP-Austausch zu katalysieren, wird der Austausch unter definierten Bedingungen durchgeführt. Dabei verwendet man das radioaktiv markierte GTP-Analogon γ -[³⁵S]GTP, das im Gegensatz zu GTP nicht zu GDP hydrolysiert werden kann. Das Protokoll von Franco *et al.*, 1995, das für bakteriell exprimierte rekombinante Proteine etabliert war, wurde für Protein A immobilisierte Ig-Fusionsproteine modifiziert.

Zur Expression der rekombinanten Immunglobulin-Fusionsproteine wurden konfluente COS-7m Zellen in 15cm-Zellkulturschalen mit Vaccinia Virus exprimiert wie unter Abschnitt 3.2.10.3 beschrieben. Die infizierten Zellen wurden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative

Luftfeuchtigkeit) 15 – 17 h in RPMI/10% (v/v) FCS weiter inkubiert. Nach dieser Zeit waren alle Zellen infiziert und begannen die Adhärenz an die Unterlage zu verlieren. Das Medium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig mit 7 ml 1 x PBS überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch von der Unterlage gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellkulturschalen wurden mit 7 ml 1 x PBS gespült und mit der Zellsuspension vereint. Durch Zentrifugation bei 900 x g wurden die Zellen gesammelt. Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit 1x PBS wurde das Zellpellet in 500µl eiskaltem Lysis-Puffer (3.2.11) aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis für 10 min vollständig lysiert. Das Zelldebris wurde bei 20800xg für 5 min bei 4°C sedimentiert und der klare Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Gesamtzelllysat wurden zu je 500µl Lysis-Puffer 30µl in Lysis-Puffer voräquilibrierte Protein A/6MB Sepharose beigefügt und ca. 1,5 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Dabei banden die Ig-Fusionsproteine über die Immunglobulin-Sequenz an die Protein A-Matrix. Die immobilisierten Proteine wurden 3-mal mit je 1 ml Lysis-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zum Äquilibrieren wurde die Protein A-Matrix in 200µl kalter 50 mM HEPES Lösung aufgenommen und gegebenenfalls auf mehrere Ansätze verteilt. Die immobilisierten Proteine wurden in 50µl GDP/GTP Austauschpuffer aufgenommen. Die kontrollierten Bedingungen für den Austausch wurden durch Zugabe von Liposomen (3.2.22) und bakteriell exprimierten Proteinen (3.2.8), die den GDP/GTP Austausch katalysieren, in definierter Endkonzentration in den GDP/GTP Austauschpuffer eingestellt. Der GDP/GTP Austausch wurde durch Zugabe von radioaktivem γ -[³⁵S] GTP (0,02µCi/µl) gestartet und die Reaktion bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach definierter Reaktionsdauer wurde der GDP/GTP Austauschpuffer vollständig von den Sepharose-Kügelchen entfernt und die Reaktion durch Zugabe von GDP/GTP Waschpuffer gestoppt. Nach mehrmaligen Waschen der Protein A-Sepharose mit dem GDP/GTP Waschpuffer, um ungebundene Radioaktivität aus dem Ansatz zu entfernen, wurden zu jedem Ansatz 1 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben. Die gebundene Radioaktivität wurde im Scintillationszähler quantifiziert.

GDP/GTP Austauschpuffer	50 mM Hepes 1 mM MgCl ₂ 1 mM DTT
GDP/GTP Waschpuffer	20 mM Hepes 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂

3.2.22 Liposomen-Präparation

Als Membransurrogat des *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austausches (3.2.21) dienten unilamelare Vesikel. Der Vorteil dieser künstlichen als Liposomen bezeichneten Membranvesikel besteht darin, dass die Zusammensetzung der Membranlipide sowie der Inhalt des Lumen genau definiert werden kann. Die nach dem modifizierten Protokoll von Szoka und Papahadjopoulos (1978) verwendete Methode wird

als die „Reversphase Evaporationsmethode“ bezeichnet und bedient sich dem Prinzip einer „Wasser in Öl“-Emulsion.

Dazu wurden 7 mg β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylchol und 3 mg Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (Sigma) zusammen mit 15 mg des Detergenzes Octyl- β -D-Thioglucopyranosid in Chloroform/Methanol (1:2)-Lösung aufgenommen und in einem Glaskolben überführt. Liposomen, die entweder Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) bzw. Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) (jeweils Avanti, USA) enthalten sollten, wurden wie oben beschrieben präpariert, wobei Anteile des β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -phosphatidylchol durch die jeweilige Menge der Phosphatidylinositolphosphate ersetzt wurde. Unter ständigem Drehen wurde in einem Vakuum-Rotationserdampfer das organische Lösungsmittel für 2 h vollständig abgedampft, so dass sich an der Glaswand eine gleichmäßige, dünne Schicht der Phospholipide absetzte. Der Glaskolben wurde mit 1 ml des Liposomen-Puffers versetzt und unter heftigem Schütteln die Lipide in der wässrigen Phase aufgenommen, wobei sie unilamellare Vesikel ausbilden sollten. Das überschüssige Detergenz wurde nach Überführen der primären Liposomenpräparation in einen Dialyseschlauch durch 3-malige Dialyse im Liposomen-Dialyse-Puffer entfernt. Die drei Dialyseschritte wurden dazu in jeweils 500 ml 4°C kaltem Liposomen-Dialyse-Puffer für 1 h, 2 h und über Nacht durchgeführt, wobei der zuvor verwendete Dialysepuffer vollständig entfernt wurde.

Liposomen-Puffer	10 mM HEPES pH 7,4 80 mM KCl 15 mM NaCl 0,7 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM EGTA 50 mM n-Octyl- β -D-glucopyranosid
Liposomen-Dialyse-Puffer	10 mM HEPES pH 7,4 80 mM KCl 15 mM NaCl 0,7 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM EGTA

4 Ergebnisse

4.1 Cytohesin-1 vermittelt Adhäsion von T-Zellen an ICAM

Cytohesin-1 wurde in einer *in vivo* Interaktionsanalyse in *Saccharomyces cerevisiae* als ein mit der β_2 -Kette (CD18) interagierendes Protein isoliert. Durch Überexpression von Cytohesin-1 in Leukocyten kommt es zur LFA-1 vermittelten Adhäsion an ICAM-1 (Kolanus *et. al.*, 1996, Abbildung 4.1.1A). Eine Expression der PH Domäne von Cytohesin-1 blockiert die Adhäsion stimulierter Jurkat Zellen an ICAM-1. Die Expression der Sec7-Domäne resultiert dagegen in einer konstitutiven Adhäsion von Jurkat Zellen an ICAM-1 (Kolanus *et. al.*, 1996, Abbildung 4.1.1B). Außerdem zeigt eine Substitution des Glutamatrestes an Position 157 zu Lysin in der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 einen dominant negativen Einfluss auf die Zelladhäsion (Geiger *et. al.*, 2000). Somit kommt der Sec7-Domäne eine entscheidende funktionale Rolle bei der Induktion der Zelladhäsion zu. Die Sec7-Domäne vermittelt dabei die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 auf den Guaninnukleotid-Austausch der ARF Proteine.

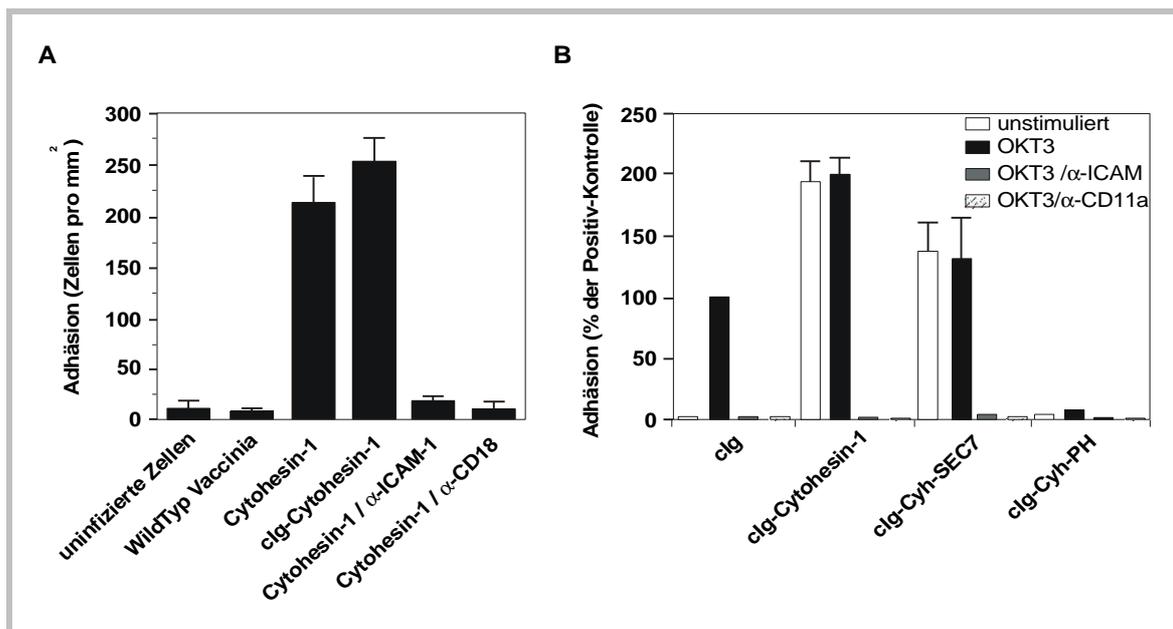


Abbildung 4.1.1120: **Cytohesin-1 und die Sec7-Domäne vermitteln Adhäsion von Jurkat E6 Zellen an ICAM-1 (mit freundlicher Genehmigung aus Kolanus *et. al.* (1996))**

- A) Cytohesin-1 Wildtyp oder cIg-Fusionsprotein induzieren die Adhäsion von Jurkat Zellen an ICAM-1 beschichtete Zellkulturplatten.
- B) T Zellen adhären an ICAM-1 beschichtete Zellkulturplatten nach Stimulierung des T-Zell Rezeptors durch den T-Zell Rezeptor spezifischen Antikörper OKT3 (cIg, schwarze Säule). Cytohesin-1 oder Sec7-Domäne Fusionsproteine induzieren konstitutive Adhäsion von Jurkat Zellen an ICAM-1 auch ohne Stimulierung des T-Zell Rezeptors (weiße Säule). Die Expression des PH-Fusionsproteines besitzt einen dominant negativen Einfluss auf die LFA-1/ICAM-1 Interaktion.
- A, B) Die LFA-1/ICAM-1 Interaktion kann durch LFA-1 (α -CD18) oder ICAM-1 (α -ICAM-1) spezifische Antikörper verhindert werden (graue und schraffierte Säule)

4.2 Die Sec7-Domäne katalysiert *in vitro* unspezifisch die GTP-Bindung an die ARF-GTPasen

Die ARF Proteine aus Säugetieren werden in 3 Klassen eingeteilt, die sich in der Aminosäuresequenz, der Genstruktur und der phylogenetischen Analyse unterscheiden. Die ARF Proteine zeigen nicht nur innerhalb einer Klasse stark konservierte Sequenzen (Abbildung 4.2.1, grau unterlegte Bereiche). Zwischen den Klassen sind die Domänen der Bindungsstelle des Guanin-Nukleotids und die Domäne für die intrinsische GTPase Aktivität stark homolog. Unterschiede zwischen den 3 Klassen bestehen sowohl in der Genstruktur als auch in der Funktion. Der genaue Mechanismus, wie sich die Unterschiede in der Sequenz auf funktionale Unterschiede zurückführen lassen, ist unklar.

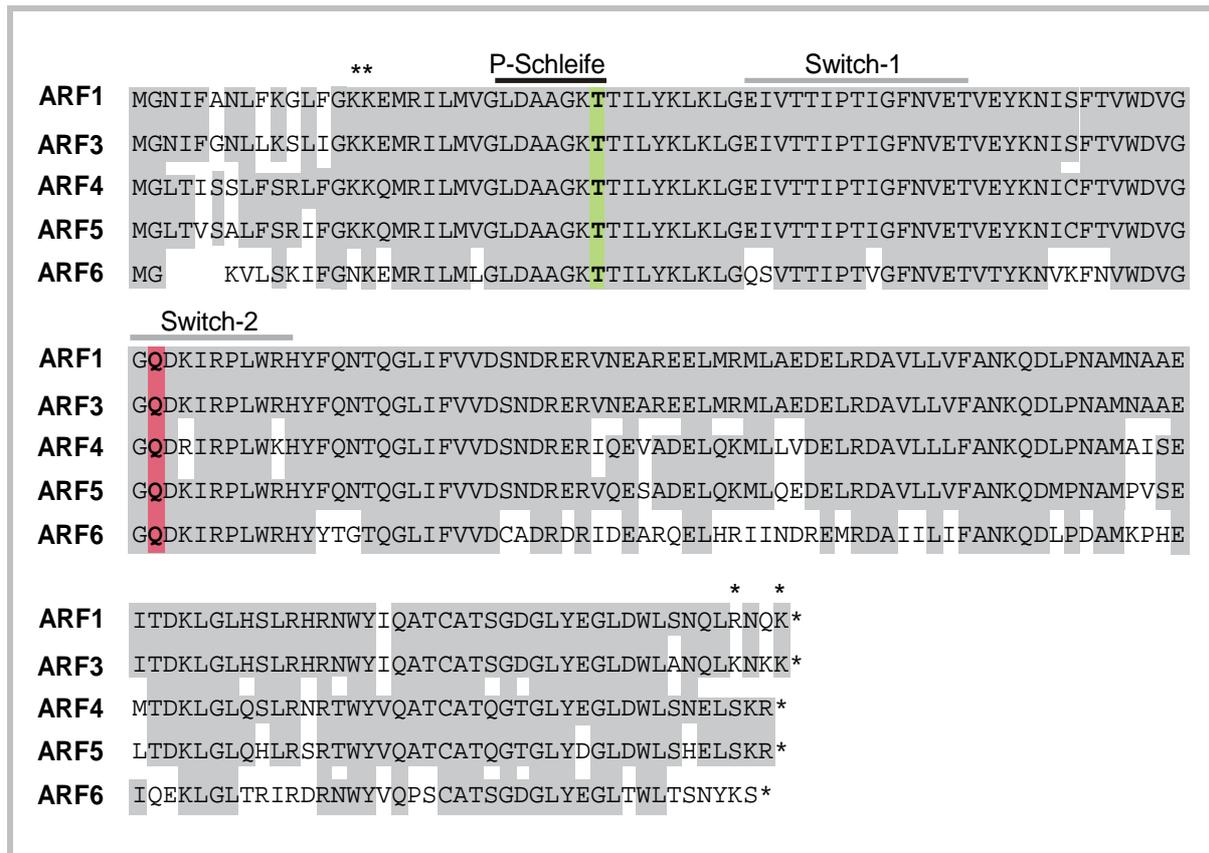


Abbildung 4.2.1: **Sequenzvergleich der humanen ARF Proteine**

Angegeben sind die Protein-Sequenz der humanen ARF Proteine der Klasse I (ARF1, ARF3), der Klasse II (ARF4, ARF5) und der Klasse III (ARF6). Homologe Bereiche innerhalb der Proteinsequenz der ARF Proteine sind grau unterlegt. Bereiche mit starker Konservierung vermitteln die GTP-Bindung (graue und schwarze Balken) sowie die GTPase Aktivität (Switch-2). Die jeweiligen funktional wichtigen Aminosäuren der jeweiligen Region sind fett gedruckt.

So sind die Klasse I ARFs (ARF1, ARF3) mit der Golgimembran und der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziiert (Stearn *et al.*, 1990; Teal *et al.*, 1994). Sie regulieren den vesikulären Transport zwischen Golgi und endoplasmatischen Retikulum (Balch *et al.*, 1992). ARF1 kontrolliert die Bildung des Coatomer, eines 700 kDa Komplexes an der Golgi Membran, indem sie an der Rekrutierung von COPI an die Golgimembran beteiligt sind (Serafini *et al.*, 1991, Donaldson *et al.* 1992a; Donaldson *et al.* 1992b). Die Rekrutierung zahlreicher ARF Moleküle führt zur Deformation der Membran und zur Bildung von Membranvesikeln. Den ARFs der Klasse II (ARF4, ARF5) dagegen

konnte noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden; sie sind aber als Golgimembran assoziierte Proteine beschrieben worden. ARF6 als einziger Vertreter der Klasse III ist im Cytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert und wurde als regulatorisches Protein des Vesikeltransportes zwischen der Plasmamembran und tubovesikulären Endosomen erkannt (D'Souza-Schorey *et. al.*, 1995). Unklar dabei erscheint jedoch die funktionale Rolle der Regulation der ARF Aktivität durch Cytohesin-1.

4.3 Klonierung der ARF-Proteine

Um die Interaktion von Cytohesin-1 mit den ARFs untersuchen zu können, wurden die cDNA-Sequenzen der zu untersuchenden ARF-Proteine in DNA-Vektoren kloniert. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie beschränkte sich die Auswahl der zu klonierenden ARFs auf das die jeweilige Klasse der ARFs charakterisierende ARF-Gen. ARF1 war als Zielprotein der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 beschrieben worden (Chardin *et. al.*, 1996). Zudem unterscheiden sich ARF1 und ARF3 nur durch 7 Aminosäuren, die sich ausschließlich im C- und N-terminalen Teil befinden. Aus der Klasse II wurde ARF5 kloniert, das sich von ARF4 durch 11 Aminosäuren unterscheidet. Als einziger Vertreter der Klasse III wurde ARF6 kloniert, das wegen seiner zellulären Lokalisation in der Plasmamembran einen potentiellen Kandidaten der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 darstellt.

Die für die PCR verwendeten ARF spezifischen Oligodesoxynukleotide (Abbildung 4.3.1A) richteten sich nach den Sequenzen der ARF-Gene, die der GenBank-Datenbank entnommen wurden. Die Klonierung der ARF Gene ARF1 (Accession-Nummer: NM_001658; Bobak *et. al.*, 1989; Kahn *et. al.*; 1991; Lee *et. al.*, 1992; Amor *et. al.*, 1994; Hirai *et. al.*, 1996), ARF5 (Accession-Nummer: NM_001662; Tsuchiya *et. al.*, 1991; McGuire *et. al.*, 1997) und ARF6 (Accession-Nummer: NM_001663; Tsuchiya *et. al.*, 1991; D'Souza-Schorey *et. al.*, 1995; Kim 1999) erfolgte über eine PCR aus einer cDNA-Bank natürlicher Killerzellen. Obwohl die Gene der ARF Familie in fast allen menschlichen Geweben exprimiert werden (Peng *et. al.*, 1989, Tsuchiya *et. al.*, 1991, Mishima *et. al.*, 1992), erwies sich die verwendete cDNA-Bank natürlicher Killerzellen geeigneter als eine cDNA-Bank aus Jurkat LT-Zellen. Um die optimale Hybridisierungstemperatur der Desoxyoligoribonukleotide zu ermitteln, wurde die PCR mit einem Temperaturgradienten von 52°C bis 61°C Annealing-Temperatur durchgeführt. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie der ARF Gene auf DNA-Basis (vgl. Abbildung 4.2.1) besonders am 5'-Ende zeigte es sich, dass durch eine höhere Annealing-Temperatur die Spezifität der PCR-Amplifikation erhöht wurde. Für die Klonierung wurden die PCR-Produkte bei 62°C Annealing-Temperatur verwendet. Die Klonierung erfolgte am 5'-Ende über die *MluI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende über die *NotI*-Schnittstelle in den p5C7-Vektor (Kolanus *et. al.*, 1996). Positive Klone der Ligation wurden durch PCR mit den ARF spezifischen Primern und Restriktionsverdau charakterisiert (Abbildung 4.3.1B). Durch Sequenzierung mit dem Oligodesoxyribonukleotide T7seq, das komplementär zur Vektor-DNA am 5'-Ende der klonierten Fragmente ist, wurden PCR bedingte Mutationen der positiven Klone ausgeschlossen.

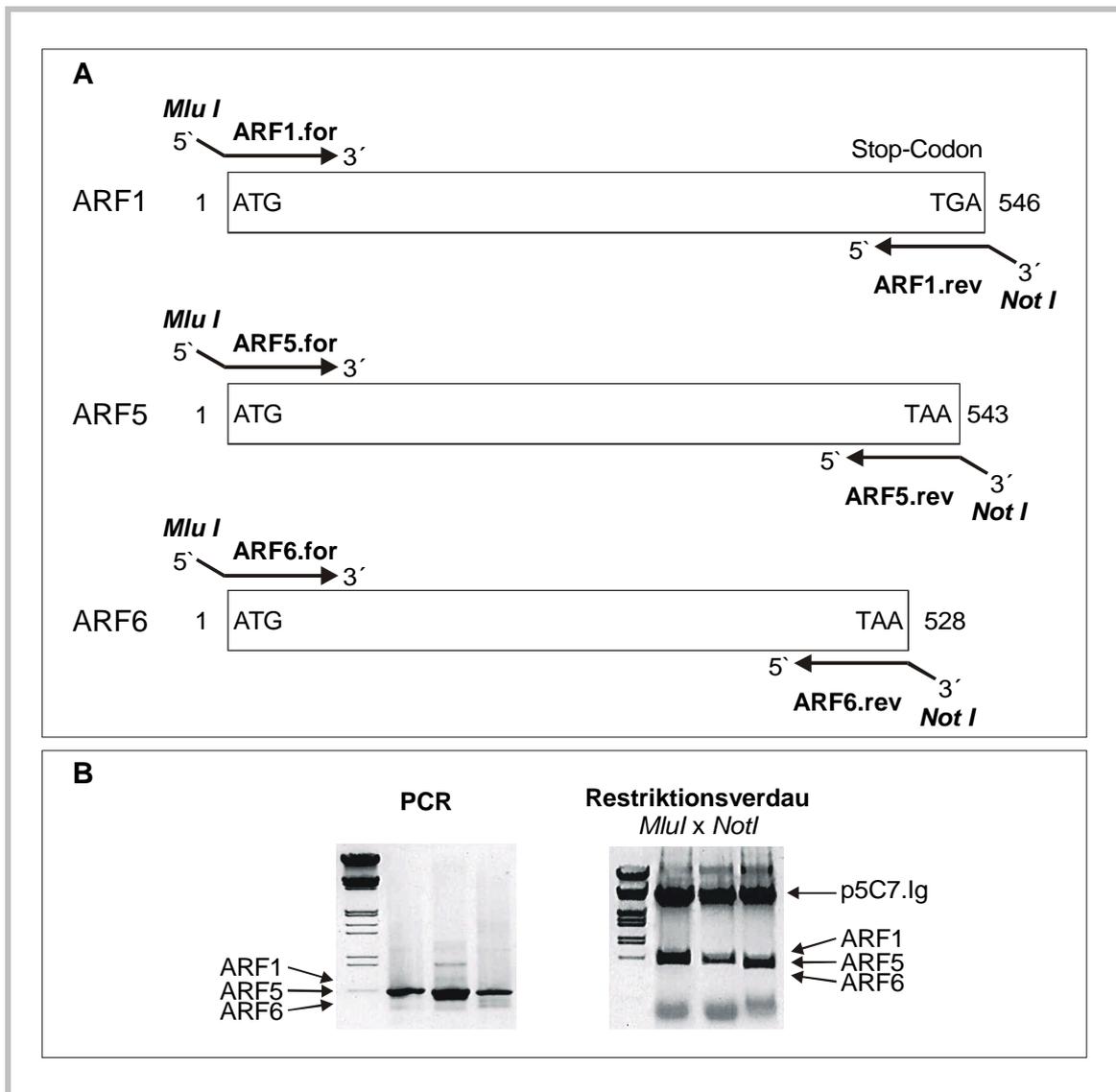


Abbildung 4.3.1: **PCR-Strategie zur Klonierung der ARF Gene aus NK cDNA**

- A) Die angegebenen Oligodesoxyribonukleotide wurden für die Amplifizierung der cDNA Sequenz aus einer NK cDNA Bank verwendet. Die Restriktionsschnittstellen in den Oligodesoxyribonukleotiden dienen zur Klonierung der PCR Fragmente in den Vektor p5C7. Die Länge der jeweiligen cDNA, sowie das jeweilige Start- und Stopcodon sind angegeben.
- B) Die PCR ergab Fragmente der Längen 576 bp (ARF1), 543 bp (ARF5) und 528 bp (ARF6). Nach erfolgreicher Klonierung der PCR Fragmente in den p5C7 konnte aus den Plasmiden nach *MluI* x *NotI*-Restriktionsverdau die entsprechenden ARF-Fragmente herausgeschnitten werden. Die Auftrennung erfolgte jeweils in einem 1,5% Agarosegel.

4.4 Erzeugen von ARF-Fusionsproteinen

Da zum Zeitpunkt der Arbeit keine gegen humane ARF-Proteine gerichteten Antikörper zur Verfügung standen, wurden die ARF-Gene mit Sequenzen bekannter Proteine kombiniert. Als Fusionsanteil wurden die C_H2 und C_H3-Sequenzen des humanen ImmunglobulinG (IgG) und das grün-fluoreszierende Protein eGFP (auf humanen Codon-Gebrauch optimiertes GFP) gewählt. Der

Vorteil der verwendeten Fusionsanteile bestand erstens darin, dass kommerziell gegen den Fusionsanteil gerichtete Antikörper zur Verfügung stehen. Zweitens können die rekombinanten Proteine über den IgG Proteinanteil mit hoher Affinität an der Protein A Matrix immobilisiert werden. Der eGFP Anteil dagegen ermöglicht es, die Expression der rekombinanten Proteine nach Anregung mit monochromatischen Laser der Wellenlänge 574 nm im konvokalen Lasermikroskop *in vivo* zu untersuchen.

Der IgG und eGFP-Anteil bildete den C-Terminus, um Interferenzen mit Amino-terminalen Modifikationen wie Myristoylierung von ARF zu vermeiden. Inhibition oder Veränderung der ARF Aktivitäten waren grundsätzlich nicht zu erwarten, da carboxylterminales Markieren der ARFs schon beschrieben worden war (Peters *et. al.*, 1995).

Die Klonierung des IgG und GFP-Fusionsanteil erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde nach einer PCR die Sequenz des IgG bzw. eGFP-Anteils in den p5C7 und tKG5 über die eingefügten *NotI* und *EcoRI*-Schnittstellen kloniert. In den daraus resultierenden Vektor p5C7.Ig wurde im zweiten Schritt die ARF-Sequenz über die *MluI*- und *NotI*- Schnittstelle inkloniert. Dazu wurde die ARF-DNA durch eine erneute PCR amplifiziert, so dass die Konstrukte am 3'-Ende kein Stopcodon besaßen und das Leseraster mit dem Leseraster der 3'-gelegenen Ig- bzw GFP-Sequenz übereinstimmte. Abbildung 4.4.1 zeigt schematisch die aus dieser Klonierungsstrategie resultierenden ARFs mit den N-terminalen Fusionsanteilen IgG bzw. GFP.

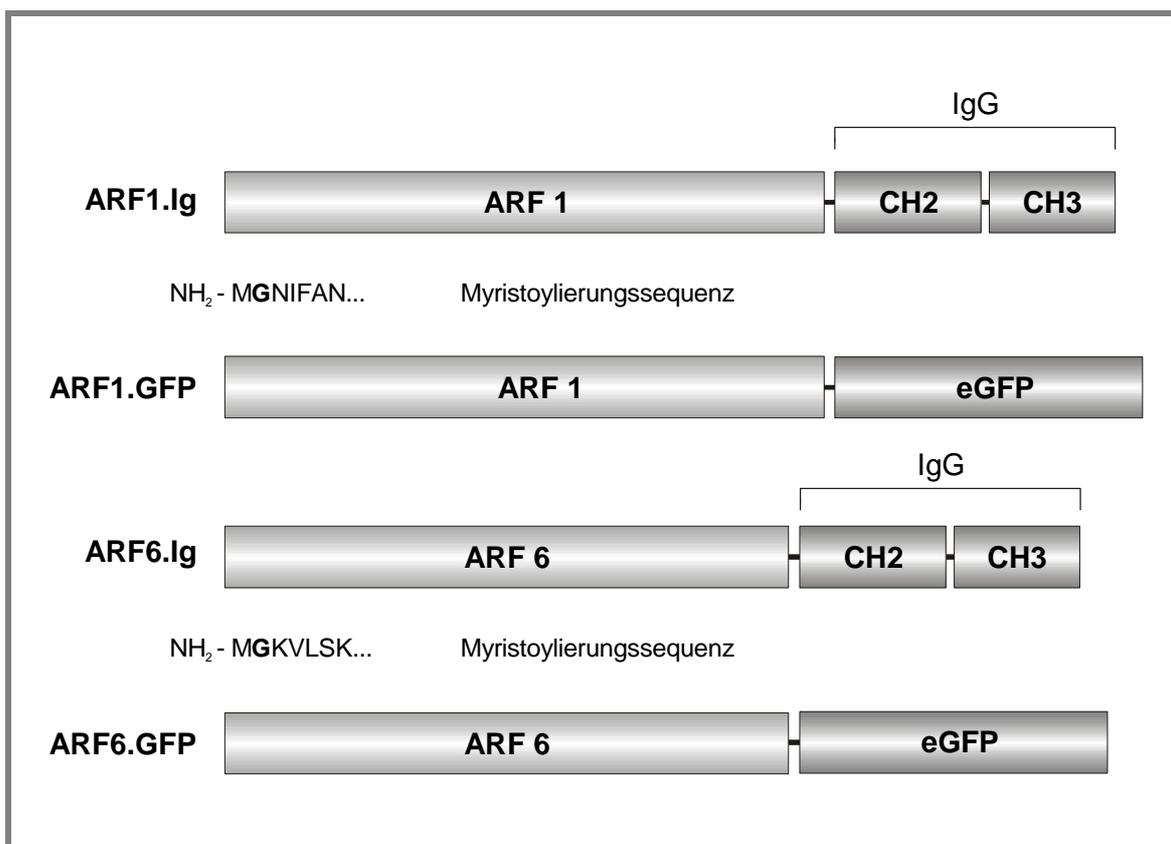


Abbildung 4.4.1: **Schematische Darstellung der ARF-Fusionsproteine**

Die N-terminalen Sequenzen, die eine Myristoylierungskonsensus-Sequenz enthalten, sind angegeben. Die Myristoylierung erfolgt dabei nach Prozessierung der nativen Proteine durch Abspaltung des N-terminalen Methionins (M) am fett dargestellten Glycin (G).

4.5 Biochemische Untersuchungen zur Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion der ARF Proteine in Abhängigkeit von Cytohesin-1

4.5.1 Prokaryontische Expression und Aufreinigung von ARF Proteinen

Für Untersuchungen der *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion in Abhängigkeit von Cytohesin-1, wurden die nativen ARF Proteine in Bakterien überexprimiert und aufgereinigt. Dazu wurden die in den p5C7 klonierten ARF Konstrukte über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *EcoRI* in den prokaryontischen Expressionsvektor pET11d umkloniert. Die Expression der in diesen Vektor eingebrachten rekombinanten Gene kann durch den vorgeschalteten LacZ Promotor in *E. coli* gezielt induziert werden.

Die Membranassoziation sowie die Funktion der ARF Proteine wird durch Modifikation des N-terminalen Glycins durch Ankopplung eines Myristatrestes an die NH₂-Gruppe des Glycins bewirkt (Franco *et. al.*, 1993; Haun *et. al.*, 1993). Der hydrophobe Myristatrest kann nach Bindung von GTP in die Lipiddoppelschicht der Membran eindringen und so die ARF Proteine an der Plasmamembran verankern (Franco *et. al.*, 1993). Die Myristoylierung hat zudem einen entscheidenden Effekt auf die Guaninnukleotid Austausch Rate von ARF1 (Franco *et. al.*, 1993; Franco *et. al.*, 1995). Da in Prokaryonten kein Enzym zur Myristoylierung von Proteinen endogen exprimiert wird, erfolgte eine Kotransfektion der rekombinanten ARF Konstrukte mit der eukaryontischen N-Myristoyltransferase NMT1p (prokaryontisches Expressionskonstrukt freundlicherweise von Dr. Kolanus zur Verfügung gestellt). Die Selektion auf die Transfektion beider Konstrukte erfolgte in Medium, das sowohl die Antibiotika Ampicillin als auch Kanamycin enthielt, deren Resistenz auf den jeweiligen Plasmiden kodiert wurde. Von den positiven Klonen wurden 5 ml Kulturen in LB_{Amp/Kan} angelegt und bis zu einer Dichte von OD=0,6 kultiviert. In dieser logarithmischen Wachstumsphase erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG. Als Substrat für die Myristoylierung durch die N-Myristoyltransferase NMT1p wurde zu diesem Zeitpunkt dem Kulturmedium Myristat beigegeben. Nach der Induktion wurden die Bakteriensuspension bei 25°C 2 h weiter inkubiert. Die Bakterien wurden geerntet und mittels einer SDS-PAGE und einer anschließenden Coomassie-Blau-Färbung auf Expression der rekombinanten Gene untersucht. Abbildung 4.6.5A zeigt, dass die Zugabe von 1 mM IPTG ohne Zusatz von Myristat eine Induktion eines ca. 20 kDa sowie eines 30-33 kDa Proteins in den doppeltransfizierten Zellen induziert. In untransfizierten *E. coli* Bl21 lysS erfolgte keine Induktion homologer Banden im Proteingel. Das 20 kDa-Protein entspricht daher dem exprimierten Protein von ARF1 und ARF6, wobei der Größenunterschied von ARF1 (181 Aminosäuren) und ARF6 (175 Aminosäuren) in dem 12% PAA-Gel sichtbar wird. Die Bande mit einem Molekulargewicht von 30-33 kDa entspricht dabei der kotransfizierten N-Myristoyltransferase Nmt1p. Bei der Induktion mit Myristat als Substrat für die N-Myristoyltransferase zeigte sich, dass ARF1 in Prokaryonten durch die kotransfizierte N-Myristoyltransferase modifiziert wird (Abbildung 4.5.1B), da nach der Coomassie-Färbung 2 induzierbare Banden zu erkennen sind. Die myristoylierte Form lässt sich von der unmyristoylierten Form durch differentes Laufverhalten während der Gelelektrophorese in einem denaturierenden SDS-Gel unterscheiden (Haun *et. al.*, 1993; Franco *et. al.*, 1995). Die obere Bande entspricht somit auf Grund niedrigerer Mobilität der unmyristoylierten und die untere Bande der myristoylierten Form (Abbildung 4.5.1B, Spur 2; mit Pfeil markiert). Bei ARF6 tritt nach Induktion mit IPTG auch nach Zugabe von Myristat nur eine Bande auf, die das gleiche Laufverhalten wie unmyristoyliertes ARF6 in der Gelelektrophorese zeigt (Abbildung 4.5.1B, Spur 3). Dies stellte einen

starken ersten Hinweis dar, dass ARF6 in dem selben System nicht bzw nur unzureichend myristoyliert wird.

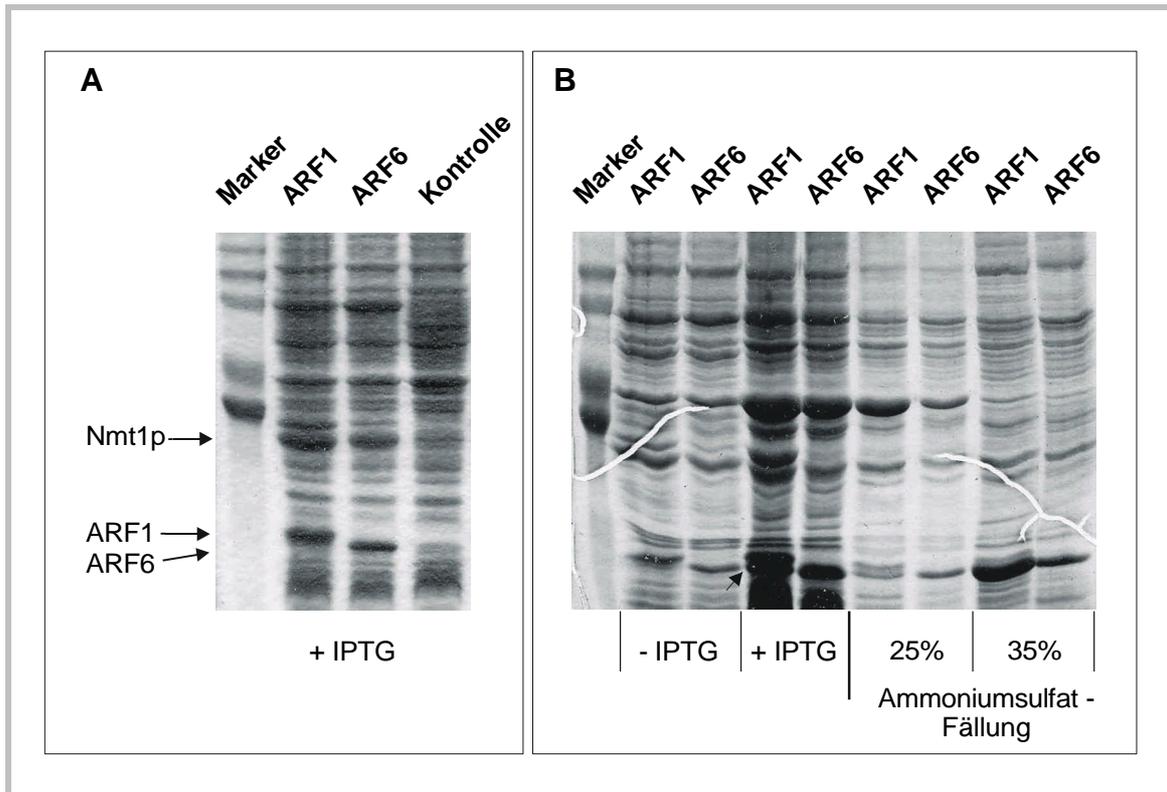


Abbildung 4.5.1: **Expression von ARF1 und ARF6 in *E. coli* nach Induktion mit IPTG**

- A) Die Expression der transfizierten ARF1 und ARF6 Konstrukte wird durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Zudem kommt es zur Expression der kotransfizierten N-Myristoyltransferase (Nmt1p) aus *S. cerevisiae*. Die Laufhöhe der Banden ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.
- B) Die Induktion der ARF1 und der ARF6 Konstrukte erfolgte nach Zugabe von Myristat als Substrat für die N-Myristoyltransferase. Dabei treten bei ARF1 2 Banden auf, wobei die untere (Pfeil) der myristoylierten Form entspricht. ARF6 kommt nur in der unmyristoylierten Form vor. Die Aufreinigung der ARF Proteine erfolgte durch schrittweise Ausfällung der Proteine mit Ammoniumsulfat.

Zum Aufreinigen der Proteine wurden von den positiven Doppeltransfektanten 1l Flüssigkulturen angelegt. Nach Induktion mit IPTG und Zugabe von Myristat, wie bei den 5 ml Kulturen (siehe oben), erfolgte der Aufschluss der Bakterien mit Hilfe von nichtionischen Detergenz und Ultraschallbehandlung. Aus dem Zellysate erfolgte die Anreicherung der Proteine durch stufenweise Ammoniumsulfatfällung (Abbildung 4.5.1, Spur 6 - 9). Myristoyliertes ARF1 sowie ARF6 präzipitierten dabei fast vollständig bei einer Konzentration von 35% Ammoniumsulfat (Abbildung 4.5.1, Spur 8 und 9), während bakterielle Proteine weitestgehend eliminiert wurden. Das Protokoll richtete sich nach Angaben für die Anreicherung von myristoylierten ARF1 Proteinen nach Franco *et. al.* (1993) und Franco *et. al.* (1995). Die daraus resultierenden primären Proteinfraktionen der Fällung bei 35% Ammoniumsulfat (Abbildung 4.5.1, Spur 8 und 9) wurden für Untersuchungen der *in vitro*-Guaninnukleotid Austauschaktivität verwendet.

4.5.2 Gründe für die fehlende Modifikation rekombinanter ARF6 Proteine durch die N-Myristoyltransferase in einem prokaryontischen Expressionssystem

Das Fehlen einer zweiten Bande bei der prokaryontischen Expression ließ vermuten, dass ARF6 in dem bakteriellen System von der kotransfizierten N-Myristoyltransferase Nmt1p aus *S. cerevisiae* nur unzureichend erkannt und umgesetzt wird. Nmt1p (Glycylpeptide N-Tetradecanoyltransferase, Peptide N-Myristoyltransferase) katalysiert absolut spezifisch die Addition eines Myristat-Restes an Proteine mit N-terminalen Glycin. Nmt1p zeigt dabei Substratspezifität; Proteine mit ungeladenen Aminosäureresten an Position 2 nach dem Glycin stellen Substrate dar, während Proteine mit Lysin, Prolin oder großen hydrophobischen Resten an dieser Position nicht myristoyliert werden. Proteine mit aromatischen Resten an dieser Position werden zwar von der N-Myristoyltransferase erkannt, jedoch nicht umgesetzt (Towler *et. al.*, 1987a). Das Spektrum der zulässigen Aminosäuren an der Position 3 und 4 ist sehr weit, für die Position 5 dagegen gibt es strenge Restriktionen an die erlaubten Aminosäuren (Towler *et. al.*, 1987b). Auf Grundlage dieser Untersuchungen lautet die Konsensus-Sequenz des Substratproteins am N-Terminus G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P} (Towel *et. al.*, 1987, Rudnick *et. al.*, 1993). Aminosäuren in {} sind an dieser Position nicht erlaubt, Aminosäuren in [] kommen dagegen bevorzugt an dieser Position vor. Vergleicht man den N-Terminus von ARF1 (NH₂-GNIFAN...-COOH) mit dieser Konsensus-Sequenz, so erkennt man, dass ARF1 Proteine ein potentielles Substrat für die N-Myristoyltransferase darstellen. Der N-Terminus von ARF6 (NH₂-GKVLSK...-COOH) dagegen besitzt nach dem N-terminalen Glycin eine in dieser Position unerlaubte Aminosäure Lysin und wird daher nach bisherigem Kenntnisstand nicht von der N-Myristoyltransferase modifiziert. Dadurch lässt sich die fehlende Modifizierung der bakteriell exprimierten ARF6 Proteine, kotransfiziert mit Nmt1p, erklären. Allerdings lassen sich daraus keine Rückschlüsse auf die Myristoylierung von ARF6 in eukaryontischen Zellen ziehen, zumal die Myristoylierung von ARF6 *in vivo* gezeigt worden war (D'Souza-Schorey und Stahl, 1995) Es ist anzunehmen, dass in höheren Eukaryonten N-Myristoyltransferasen mit einer ähnlichen aber dennoch unterschiedlichen Substratspezifität exprimiert werden, die auch ARF6 *in vivo* modifizieren, zumal diese über ihren Myristatrest mit der Membran assoziieren (D'Souza-Schorey und Stahl, 1995). SYN-Kinase, Gi alpha und Transducin-alpha sind Beispiele, die mit N-Myristoyltransferasen in Rattenleberfraktionen, jedoch nicht mit der N-Myristoyltransferase aus *S. cerevisiae*, N-myristoyliert werden (Towler *et. al.*, 1988). Die N-Myristoyltransferasen aus Hefe und Menschen besitzen überlappende aber dennoch distinkte Substratspezifitäten (Rudnick *et. al.*, 1992). In Säugetierzellen existieren zudem zwei Gene, NMT-1 und NMT-2, die 77% homolog sind und ubiquitös exprimiert werden. NMT-2 besteht aus einem 68 kDa Protein während NMT-1 aus mehreren Isoformen von 49 kDa bis 68 kDa besteht (Glover *et. al.*, 1995; Giang *et. al.*, 1998). Die genaue Funktion dieser N-Myristoyltransferasen ist unklar, jedoch gibt es Hinweise, dass NMT-1 und NMT-2 sich in der Substratspezifität als auch Lokalisierung unterscheiden (Giang *et. al.*, 1997). Durch die Vielzahl dieser N-Myristoyltransferase in Säugetierzellen kann eine Regulation von Proteinen auf der Ebene der Myristoylierung durch N-Myristoyltransferase vermutet werden, wie z.B. für Gpa1p gezeigt wurde (Dohlman *et. al.*, 1993).

4.5.3 Der Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 wird durch Phospholipide reguliert

Es sollte untersucht werden, ob durch Cytohesin-1 die Bindung von GTP an die in den Proteinfractionen angereicherten ARF-Proteinen katalysiert wird. Der GDP/GTP-Austausch der ARFs benötigt Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor. Franco *et al.*, 1994 konnten zeigen, dass der Austausch von myristoyliertem ARF1 und unmyristoyliertem ARF1 von der Konzentration der Mg^{2+} -Ionen abhängt. Dabei verläuft der Guaninnukleotid-Austausch von unmyristoyliertem ARF1 bei physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen im millimolaren Bereich sehr langsam, während bei Mg^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren Bereich unmyristoyliertes ARF1 sehr effektiv mit GTP beladen wird. Im Gegensatz dazu wird myristoyliertes ARF1 sowohl bei $1 \mu M$ Mg^{2+} als auch bei $1 mM$ Mg^{2+} effektiv mit GTP beladen (Franco *et al.*, 1995). Daher sollte die Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen untersucht werden. Anhand der funktionalen Differenzen bestand somit die Möglichkeit die myristoylierte und unmyristoylierte Form zu unterscheiden.

Dazu wurden in $100 \mu l$ GDP /GTP Austauschpuffer Gesamtvolumen $30 \mu l$ der jeweiligen Proteinfraction aufgenommen. Der Austausch erfolgte unter definierten Bedingungen. Da die Anlagerung von ARF Proteinen an Liposomen den GDP/GTP Austausch begünstigen (Franco *et al.*, 1995), wurde ein Teil der Ansätze mit $1 \mu g/\mu l$ Liposomen bestehend aus 70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin und 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol versetzt. Zum Einstellen der geeigneten Mg^{2+} -Konzentration wurden Ansätze mit sowohl $1 \mu M$ Mg^{2+} als auch mit $1 mM$ Mg^{2+} vorbereitet. Nach Zugabe von $0,02 \mu g$ 6xHis Cytohesin-1, aus Bakterien aufgereinigt (3.2.8 oben), wurde die Reaktion durch Zugabe von $10 \mu Ci$ α - $[^{32}P]$ GTP gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 45 und 60 min) wurden jeweils $10 \mu l$ des Ansatzes auf eine Nitrocellulosemembran punktförmig aufgebracht und die Reaktion durch Waschen der Membran mit GDP/GTP Waschpuffer gestoppt. Die an die Nitrocellulosemembran gebundene Radioaktivität wurde mittels eines Phosphoimagers bestimmt.

In Abbildung 4.5.2 sind die Zeitkurven der durchgeführten Guanin-Nukleotid-Austauschreaktionen dargestellt. Der Guaninnukleotid-Austausch wird durch 6xHisCytohesin-1 nach 60 min bei $1 \mu M$ und $1 mM$ Mg^{2+} jeweils 2-3-fach gesteigert. Jedoch erfolgt die Umsetzung der halbmaximalen Substratmenge mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $V_{t_{1/2}} = 25$ min bei einer Konzentration von $1 \mu M$ Mg^{2+} , während bei $1 mM$ Mg^{2+} die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit bei $V_{t_{1/2}} = 15$ min liegt. Durch die Zugabe der Phospholipid-Liposomen kommt es bei $1 \mu M$ Mg^{2+} -Konzentration zu keiner weiteren Steigerung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität. Bei der physiologischen Mg^{2+} -Konzentration von $1 mM$ dagegen wird die Guaninnukleotid-Austauschaktivität nochmals um den Faktor 2 gesteigert. Zudem erfolgt der Guaninnukleotid-Austausch in Gegenwart von Phospholipiden mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit $V_{t_{1/2}} = 4$ min. Die Reaktionsgeschwindigkeit des Guanin-Nukleotid-Austausches ohne Phospholipide verläuft mit $V_{t_{1/2}} = 35$ min. Dies ist konsistent mit Daten von Franco *et al.* (1995), die eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit und der Effizienz von myristoyliertem ARF1 gegenüber unmyristoyliertem ARF1 beschrieben. Daher wurde gefolgert, dass die in der Proteinpräparation enthaltenen ARF1-Moleküle überwiegend myristoyliert vorliegen und dass die Myristoylierung bei physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen ($1 mM$) sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Effizienz erhöhen.

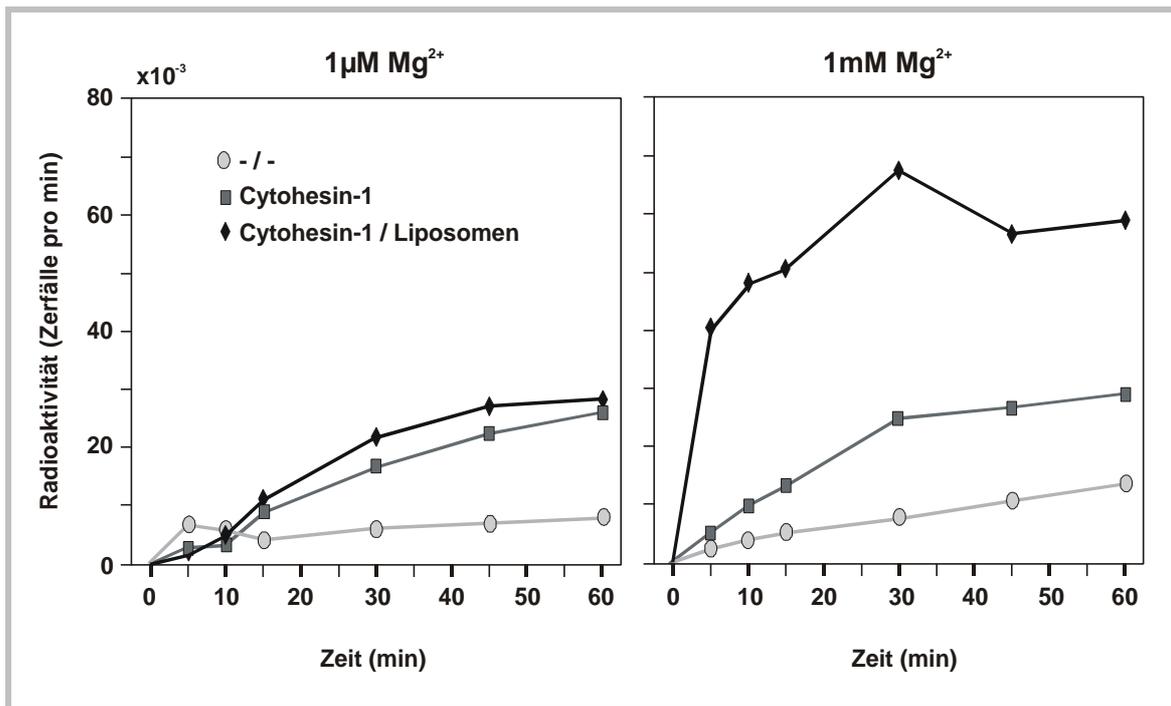


Abbildung 4.5.2: **Zeitkurve der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ Bindung an ARF1 in Abhängigkeit von Phospholipidvesikeln und Mg^{2+} -Konzentration.**

Der Austausch erfolgte mit einer 1 μM bzw. 1 mM Mg^{2+} -Konzentration unter definierten Bedingungen in Guanin-Nukleotid-Austauschpuffer. Die Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Liposomen bestehend aus 70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin und 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol erfolgte in einem Teil der Ansätze (schwarze Raute). Nach Zugabe von jeweils 0,02 μg 6xHisCytohesin-1, wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 10 μCi α - $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gestartet. Die Bestimmung der von ARF1 gebundenen Radioaktivität erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 45 und 60 min).

Um den von Cytohesin-1 katalysierten Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 miteinander vergleichen zu können, wurde die Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion bei 1 mM Mg^{2+} durchgeführt. Das obere Experiment hatte gezeigt, dass die Myristoylierung von ARF1 bei dieser Mg^{2+} -Konzentration ein kritischer Faktor für den Guaninnukleotid-Austausch in Gegenwart von Phospholipiden ist. Wie Abbildung 4.5.3 zeigt, wird die Guaninnukleotid-Austauschaktivität sowohl von ARF1 als auch von ARF6 durch Cytohesin-1 ungefähr um den Faktor 3 gesteigert. Jedoch hat nur bei ARF1 die Zugabe von Phospholipidvesikeln einen positiven Einfluss auf die Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion. So wird der GDP/GTP-Austausch um das ca. 2-fache gesteigert. Phospholipide dagegen vermögen nicht den Guaninnukleotid-Austausch von ARF6 zu steigern. Diese Unterschiede in der Katalyse des Guanin-Nukleotid-Austausches bei Vorliegen von Phospholipiden werden möglicherweise durch die fehlende Myristoylierung des ARF6 bedingt.

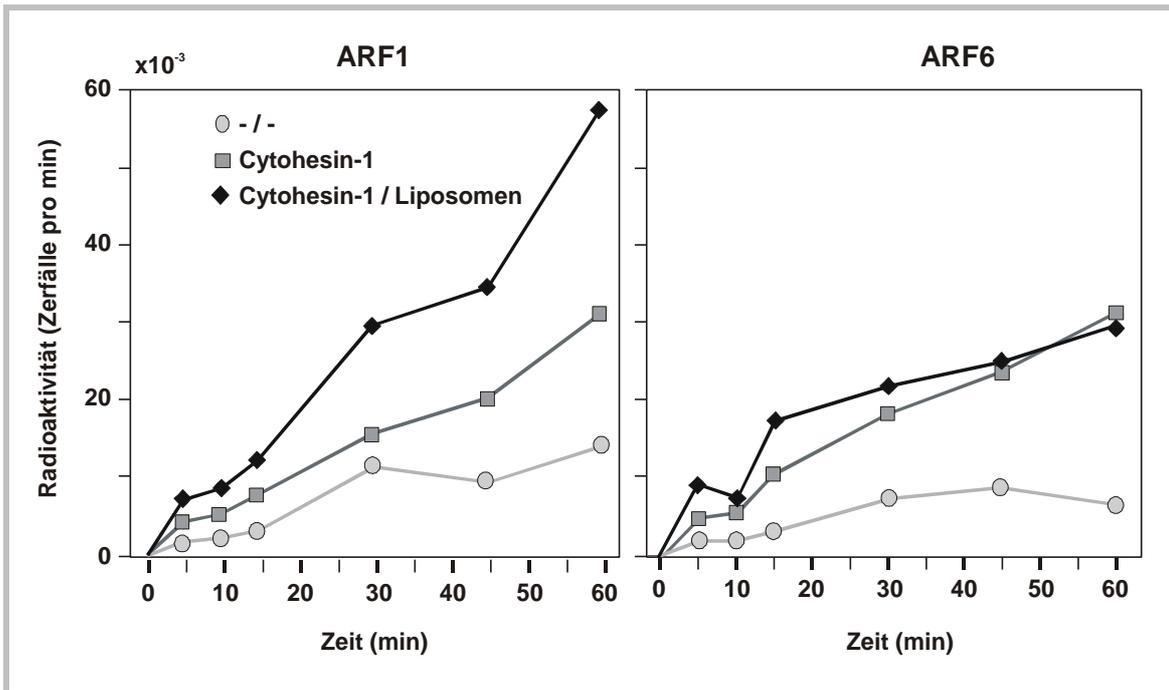


Abbildung 4.5.3: **Zeitkurve der $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ Bindung an ARF1 und ARF6 in Abhängigkeit von Phospholipidvesikeln**

Der Austausch erfolgte unter definierten Bedingungen in Guanin-Nukleotid-Austauschpuffer mit 1 mM Mg^{2+} . Nach Zugabe von jeweils $0,02\mu\text{g}$ 6xHisCytohesin-1, wurde die Reaktion durch Hinzufügen von $10\mu\text{Ci}$ $\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{GTP}$ gestartet. Die Zugabe von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Liposomen bestehend aus 70% (w/w) $\beta\text{-Palmitoyl-}\gamma\text{-oleoyl-L-}\alpha\text{-Phosphatidylcholin}$ und 30% (w/w) $\text{Dioleoyl-L-}\alpha\text{-phosphatidyl-DL-Glycerol}$ steigert den Guaninnukleotid-Austausch von ARF1, während bei ARF6 keine Aktivitätssteigerung eintritt (schwarze Raute). Die Bestimmung der von ARF1 und ARF6 gebundenen Radioaktivität erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 45 und 60 min).

4.6 Untersuchungen zur Aktivität und Funktion eukaryontisch exprimierter ARF Proteine

Die *in vitro* Daten zur von Cytohesin-1 katalysierten Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion von ARF1 und ARF6 zeigen, dass auf Grund biochemischer Untersuchungen keine Aussagen zur spezifischen Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF1 oder ARF6 getroffen werden können. Erschwerend kommt hinzu, dass durch die bakterielle Expression Proteinmodifikationen wie Myristoylierung, die funktionale Relevanz besitzen, möglicherweise nicht korrekt erfolgen. Daher sollte die Spezifität der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 durch zellbiologische Untersuchungen sowie durch biochemische Untersuchungen der Interaktion von eukaryontisch exprimierten ARFs bestimmt werden.

4.6.1 Die Mutation spezifischer Aminosäuren führt zu GTP-bindungsdefizienten und GTPase-inaktiven ARFs

Für Untersuchungen der biologischen Relevanz eignet sich die Verwendung konstitutiv aktiver und dominant negativer Formen der ARFs. G-Proteine kommen in zwei Zuständen vor, einer GDP-gebundenen Form und einer GTP-gebundenen Form. Die Aktivität der G-Proteine richtet sich dabei nach dem gebundenen Guanin-Nukleotid. Die GTP gebundene Form wird als der aktive Zustand bezeichnet, während die GDP-gebundene Form den inaktiven Zustand darstellt. Der Wechsel von ARF/GDP zu ARF/GTP erfolgt durch den Austausch von GDP gegen GTP. ARF/GTP wird durch die intrinsische GTPase Aktivität der ARF Proteine zu ARF/GDP hydrolysiert. An der Bindung von GTP durch ARF1 ist unter anderem der Aminosäurerest Threonin-31 beteiligt (Amor *et. al.*, 1994). Die Mutation dieses Aminosäurerestes zu Asparagin resultiert in einer ARF1-Variante ARF1 (T31N), die GTP nicht mehr binden kann und daher konstitutiv in der GDP-Form vorliegt. Durch Mutation des Glutamins an Position 71 zu Leucin entsteht die konstitutiv aktive Variante ARF1 (Q71L), bei der die intrinsische GTPase Aktivität zerstört ist. Glutamin-71 ist homolog zu Glutamin-61 in Ras, dass für die Hydrolyse des GTP wichtig ist (Frech *et. al.*, 1994; Zhang *et. al.*, 1994; Kahn *et. al.*, 1995). Für ARF1 waren solche Mutanten bereits beschrieben (Dascher *et. al.*, 1994) und in Untersuchungen eingesetzt worden (Zhang *et. al.*, 1994; Vasudevan *et. al.*, 1998). Analoge Mutanten von ARF6, ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L), konnten auf Grund der hohen Sequenzhomologie der beiden Proteine in den Guanin-Nukleotid-bindenden Bereichen erzeugt werden (vgl. Abbildung 4.2.1: P-Schleife; Switch-2).

Die Einbringung der Mutationen in die cDNA von ARF1 und ARF6 erfolgte durch spezifische Oligodesoxynukleotide während der PCR. Die Abbildung gibt ein Schema zur Vorgehensweise bei der auf Oligodesoxynukleotid basierenden Mutagenese wieder. Dargestellt sind die jeweiligen Oligodesoxyribonukleotide und die mutierten DNA Sequenzen. Durch die Einführung bzw. Deletion von Restriktionsschnittstellen als stille Mutationen war die Charakterisierung der rekombinanten DNA durch Restriktionsanalyse möglich. Die durch Restriktionsanalyse positiv erkannten Klone wurden zusätzlich sequenziert, um die Punktmutationen zu verifizieren und um Mutationen, die möglicherweise durch die Vent®-Polymerase während der PCR verursacht wurden, auszuschließen.

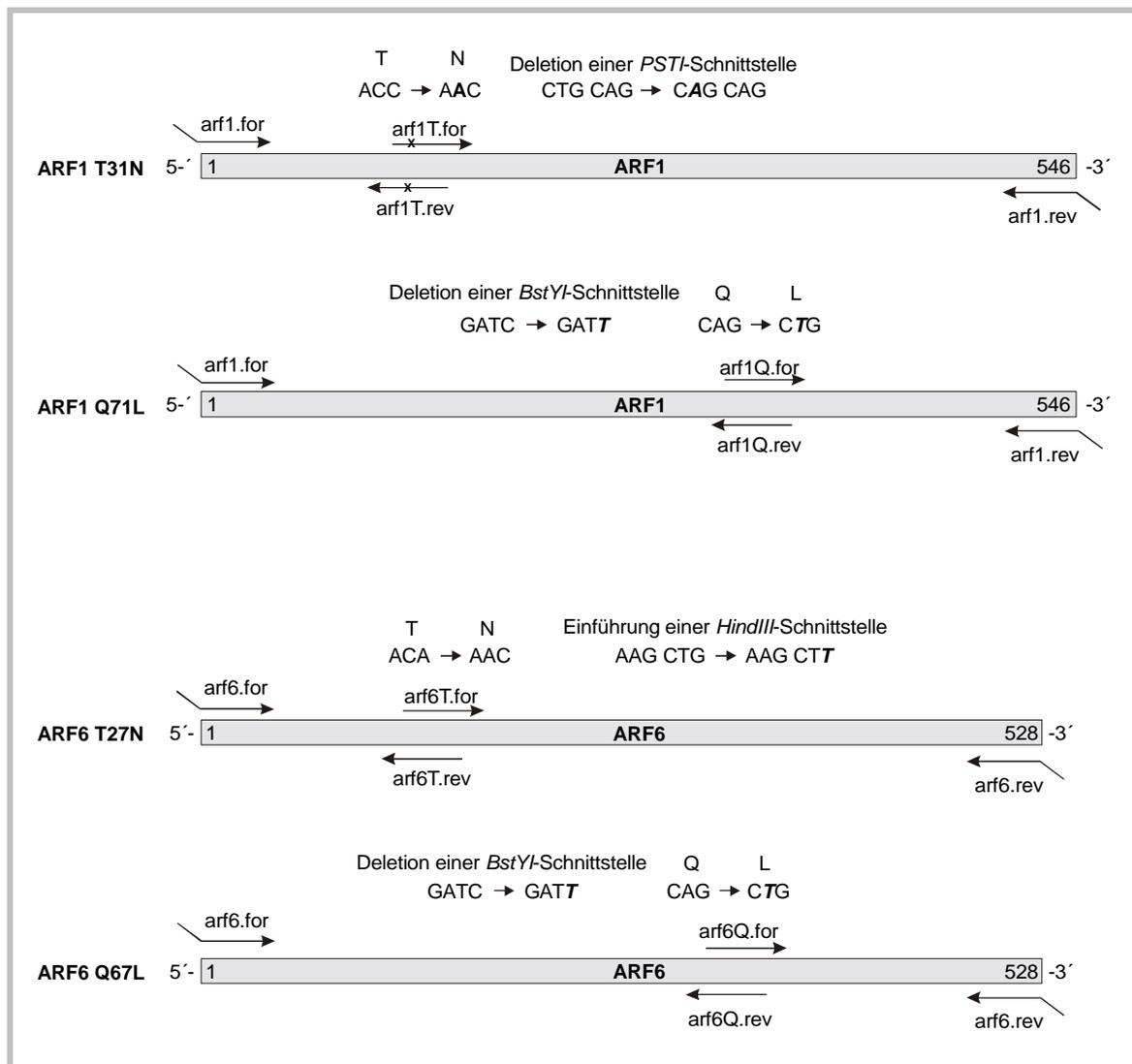


Abbildung 4.6.1: **Schema zur Erzeugung der ARF Mutanten**

Die für die PCR-Reaktion verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind angegeben. Die für den Aminosäureaustausch eingeführte Mutation in dem jeweiligen Tripletts sind dargestellt, wobei die mutierte Base fett und kursiv unterlegt ist. Zusätzliche Mutationen mit den Oligodesoxyribonukleotiden dienen dazu, Restriktionsschnittstellen einzuführen bzw. zu deletieren, um eine Charakterisierung positiver Klone durch Restriktionsverdau durchführen zu können. Die mutierten Sequenzen und die dadurch bedingten Änderungen der Restriktionsschnittstellen innerhalb der ARF DNA-Sequenz sind angegeben.

4.6.2 *ARF Konstrukte werden in hoher Dichte in eukaryontischen Zellen nach Infektion mit rekombinanten Vaccinia Virus exprimiert*

Eine hohe Expressionsdichte der rekombinanten ARF Proteine in eukaryontischen Zellen wurde durch die Verwendung des viralen Vaccinia-Vektorsystems erreicht. Durch die Methoden der exogenen Genexpression wie Elektroporation oder Transfektion (Ca_2Cl_2 - oder DEAE/Dextran-Transfektion) wurde eine Transfektionseffizienz von 10% - 30% erreicht (Daten nicht gezeigt), was sich für die meisten Untersuchungen als ungenügend herausstellte. Der Vaccinia Virus wurde 1982 als Vektor zur transienten Expression von Genen in eukaryontischen Zellen eingeführt (Pancali and

Paoletti *et. al.*, 1982; Macket *et. al.*; 1982). In diesem Expressionssystem erfolgt die Transkription im Cytoplasma der Zelle statt im Zellkern. Der Vorteil des Vaccinia Virus liegt darin, das es einen breiten Wirtsbereich besitzt, so dass die Expression der Proteine in den verschiedensten eukaryontischen Zellsystemen erfolgen kann. Zudem kommt es zu einer hohen Expressionsdichte in der Zelle, da das Virus die zelleigene Proteinsynthese völlig abschaltet und nur noch virale Proteine transkribiert und translatiert werden. Somit sind physiologische Untersuchungen mit diesem System nur in beschränktem Ausmaß nach extensiven Kontrollen möglich. Jedoch erfolgen der Transport, Prozessierung und posttranslationale Modifikationen wie durch die Primärstruktur des exprimierten Proteins und des verwendeten Zelltyps bestimmt.

Die ARF-Konstrukte wurden dazu aus dem p5C7 ARF.Ig Vektor in den pTKg-Vektor umklontiert. In diesen war zuvor der C_H2 und C_H3-Anteil über PCR aus dem p5C7 ARF.Ig Vektor über die *NotI* und *EcoRI* umklontiert worden. Mit den pTKg ARF.Ig Konstrukten erfolgte die Generierung rekombinanter Vaccinia-Viren durch Selektion (3.2.10.3.2). Die Expressionskontrolle nach Infektion rekombinanter Vaccinia Viren erfolgte in Jurkat LT -Zellen durch Western Blot und FACS-Analyse. Im Western Blot mit einem anti-humanIgG Antikörper wurde in infizierten COS-7m Zellysaten Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa detektiert (Abbildung 4.6.2 B), das sich aus dem 20 kDa-Molekulargewicht des ARF-Anteils und aus dem ca. 30 kDa Molekulargewicht des IgG Anteils ergibt. Somit erfolgte eine korrekte Transkription und Translation der ARF.Ig-Konstrukte im durchgehenden Leseraster. Für die FACS-Analyse wurden die infizierten Zellen geerntet und in Formaldehyd fixiert. Die Zellen wurden in 1xPBS/0.02% TritonX-100 mit anti-human IgG Antikörper inkubiert, um die intrazellulären ARF.Ig Proteine detektieren zu können. Nach Waschen der Zellen und Detektion des primären anti-human IgG Antikörpers durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Analyse in einem FACS Gerät. Mit den rekombinierten Vaccinia Viren wurden Expressionsraten zwischen 70% und 85% erreicht (Abbildung 4.6.2 A). Eine höhere Expressionsrate konnte auch nach weiteren Selektionsschritten nicht erreicht werden. Jedoch zeigten andere rekombinante Vaccinia Viren durchaus eine höhere Expressionsrate sowie Expressionsdichte (Kolanus, persönliches Gespräch, eigene Daten nicht gezeigt). Auffällig bei der Expression ist, dass die ARFs nur mit einer geringen Dichte in den Zellen exprimiert werden. Möglicherweise ist dies auf einen letalen Phänotyp der ARFs in hoher Expressionsdichte zurückzuführen. Das deutet darauf hin, dass ARF Proteine relevante zelluläre Funktionen übernehmen, so dass ein Überschuss an diesen Proteinen von der Zelle nicht toleriert werden kann. Unterstützt wird diese Annahme durch Daten, dass die Überexpression von ARF1 (Q71L) sowohl für Säugetierzellen als auch für Hefezellen letal ist (Zhang *et. al.*, 1994; Kahn *et. al.*, 1995).

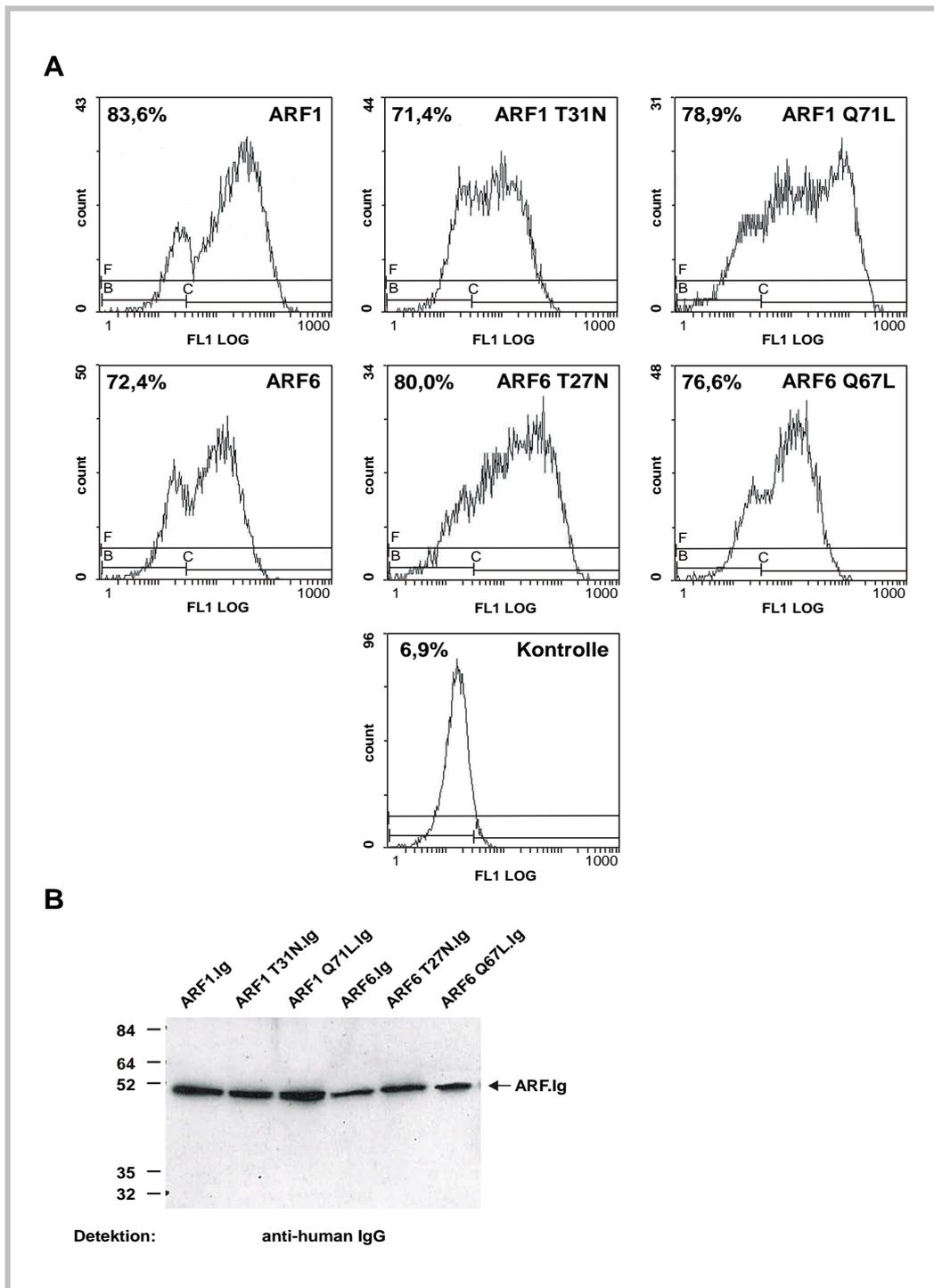


Abbildung 4.6.2: **Expression rekombinanter Vaccinia Viren**

Jurkat LT Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Virus infiziert und 24h weiterkultiviert

A) Für die FACS Analyse wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert. Die Detektion der exogenen Proteine erfolgte in 1xPBS/0,02% Triton-X100 mit anti-human IgG Antikörper als primären Antikörper und einem FITC markierten sekundären Antikörper, der gegen den IgG-Anteil der Fusionsproteine gerichtet ist. Die Expression der ARF-Fusionsproteine wird in % der Gesamtzahl infizierter Zellen angegeben. Als Kontrolle dienten Jurkat LT Zellen, die nicht mit Vaccinia infiziert worden sind.

B) Nach dem Ernten wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einer SDS-PAGE separiert. Die Detektion der rekombinanten ARF.Ig Proteine erfolgte mit einem anti-humanIgG Antikörper.

4.6.3 Die Expression der ARFs erfolgt in vivo in distinkten Kompartimenten

Für die direkte Interaktion von Cytohesin-1 mit den ARF Proteinen ist eine Kolo-kalisierung der Proteine in den Zellen notwendig. Daher sollte geklärt werden, in welchen zellulären Kompartimenten ARF1 und ARF6 exprimiert werden. Dabei war die Frage von Bedeutung, welche Determinanten für die Lokalisierung der ARFs in der Zelle wichtig sind. Die Lokalisierung von Proteinen wird im allgemeinen durch deren Aminostruktur, Modifikationen und Interaktionspartner bestimmt. Da kein gegen ARF1 und ARF6 gerichteter Antikörper zur Verfügung stand, erfolgten die nachfolgenden Untersuchungen mit ARF.Ig- bzw. ARF.GFP-Chimären.

4.6.3.1 Die zelluläre Lokalisation wird durch das gebundenen Guaninnukleotid determiniert.

Um die Lokalisierung in Abhängigkeit des gebundenen Guanin-Nukleotids der exogenen ARF.Ig Fusionsproteine zu untersuchen, erfolgte die transiente Expression der ARF.Ig Konstrukte durch Elektroporation in verschiedenen Zelllinien. Dabei zeigte sich, dass rekombinantes Wildtyp-ARF1 in allen untersuchten Zelllinien in intrinsischen distinkten subzellulären Kompartimenten (Abbildung 4.6.3, oberste Reihe, Abbildung 4.6.4B) lokalisiert ist. Dies stimmt mit Untersuchungen an endogenem bzw. Epitop-markierten ARF1 überein. ARF1 wird darin als Golgi-assoziiertes Protein beschrieben, das am Vesikeltransport zwischen den intrazellulären Kompartimenten des Golgi und des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt ist (Cavenagh *et al.*, 1996; Hosaka *et al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998). Die dominant negative Mutante ARF1(T27N).Ig, die nur in der GDP-gebundenen Form vorliegt, zeigt eine diffuse Verteilung in der Zelle. Die Lokalisierung von ARF1 wird somit durch das gebundenen Guaninnukleotid determiniert. Dagegen ist die konstitutiv aktive GTP-gebundene Mutante ARF6 (Q67L).Ig wie die Wildtypform in distinkten Kompartimenten mit intrazellulären Membrankompartimenten assoziiert. Somit erfolgt eine Interaktion des aktivierten ARF1 Proteins mit seinen Effektorproteinen an intrazellulären Membransystemen. Die GDP-gebundene Form dagegen bindet nicht an Membranen und bleibt diffus im Cytoplasma verteilt. Die Aktivierung von ARF1 durch GDP/GTP-Austausch bewirkt eine Rekrutierung von ARF1_{GTP} an intrazelluläre Membranen. Dies ist konsistent mit Daten von Franco *et al.* (1996), die belegen, dass die Interaktion von ARF1 mit Phospholipiden durch GTP gesteigert wird, indem sowohl der Myristatrest als auch das Protein direkt mit der Membran interagieren können.

Im Gegensatz zu ARF1 ist ARF6 hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert. Nach Überexpression der rekombinanten ARF6.Ig Fusionsproteine zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in der von D'Souza Schorey *et al.* (1998) für endogenes ARF6 beschriebenen Studie (Abbildung 4.6.3, untere Reihe; Abbildung 4.6.4B). Die dominant negative Mutante ARF6 (T27N).Ig dagegen liegt diffus im Cytoplasma verteilt vor. Die GTP-Form ARF6 (Q67L)-Ig lokalisiert in distinkten Membrankompartimenten wie die Plasmamembran und membrannahen Vesikeln. Durch die Aktivierung von ARF6 kommt es somit zur Membranassoziation von GTP gebundenen ARF6.

Die Lokalisierung der ARF1 und ARF6 Konstrukte erfolgt in distinkten subzellulären Kompartimenten und wird durch das gebundene Guaninnukleotid determiniert. Während ARF1 an intrazelluläre Membranen durch den Austausch von GDP zu GTP dirigiert wird, wird ARF6 nach Aktivierung zur Plasmamembran rekrutiert. Die Lokalisierung ist dabei unabhängig vom verwendeten Zelltyp (vgl. Abbildung 4.6.3 und Abbildung 4.6.4B). Dies lässt darauf schließen, dass die Rekrutierung der ARFs an die Membran durch die Zusammensetzung der Membran determiniert wird und nicht

durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren erfolgt, da die konstitutiven Guanin-Nukleotid-gebundenen Varianten mit den Membranen assoziieren.

Auf Grund der Lokalisation von Cytohesin-1 in der Plasmamembran (Kolanus *et. al.*, 1996, Nagel *et. al.*, 1998) stellt ARF6 ein potentielles Effektorprotein der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 dar. In anderen Untersuchungen wurde Cytohesin-1 als Golgi-assoziiertes Protein beschrieben, so dass eine zelluläre Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF1 nicht ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise kann auch Cytohesin-1 mit ARF1 *in vivo* interagieren, da in dem verwendeten Expressionssystem eine teilweise Lokalisierung der ARF1-Moleküle an der Plasmamembran auftritt. Im konfokalen Lasermikroskop ist eine Unterscheidung von membranassoziierten ARF1 mit membranahen ARF1-Proteinen nicht möglich. Jedoch ist ARF1 überwiegend in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, so dass eine plasmamembrane Lokalisierung auch unspezifisch, durch die Überexpression von ARF1 verursacht, erfolgt.

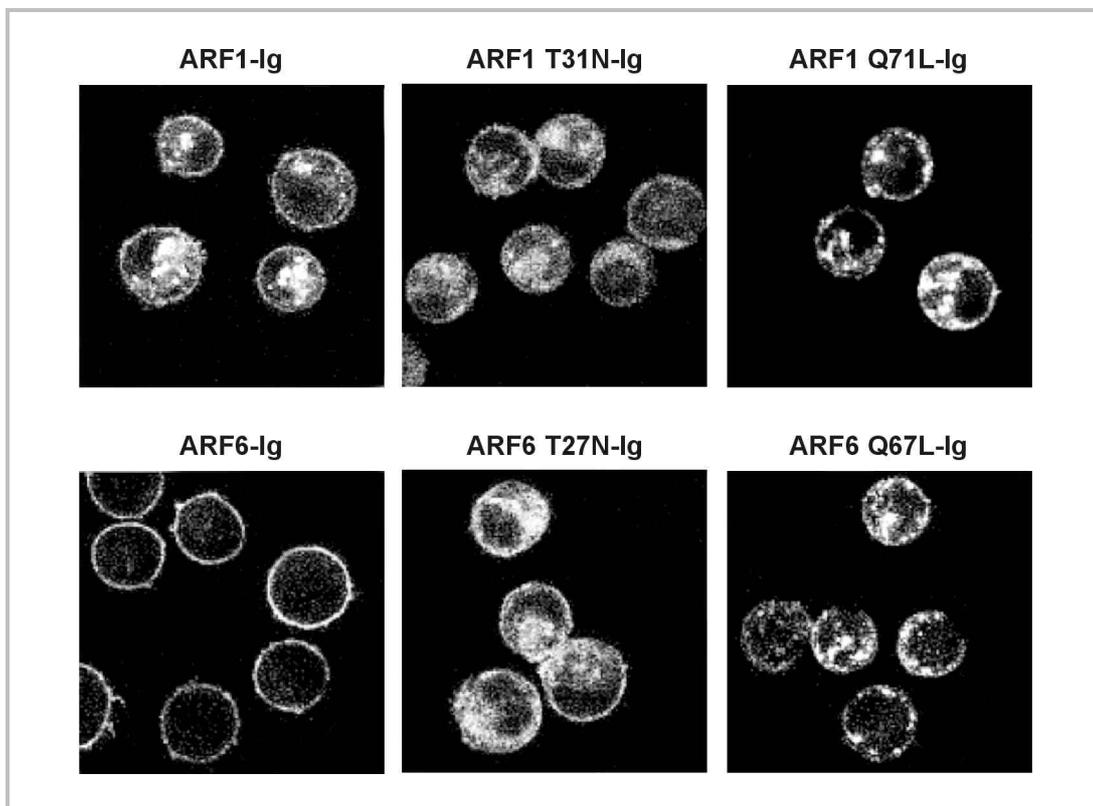


Abbildung 4.6.3: **Lokalisierung der rekombinanten ARF1.Ig und ARF6.Ig Konstrukte und deren Mutanten in HeLa Zellen**

Die ARF-Konstrukte wurden durch Elektroporation in HeLa Zellen eingebracht und die intrazellulären Ig-Fusionsproteine nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit FITC-gekoppelten Antikörper gegen humanIgG1 gerichtet.

4.6.3.2 Die N-terminale Modifikation der ARF-Fusionsproteine bestimmt die subzelluläre Lokalisierung

Die Modifikation der ARF Proteine durch Myristoylierung des N-terminalen Glycins stellt ein wichtiges Ereignis bei der Prozessierung der ARF Proteine *in vivo* dar. Die Myristoylierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Guaninnukleotid-Austauschaktivität sowie auf die Lokalisierung der ARF Proteine. Der Nachweis der Myristoylierung der ARF Proteine erfolgte dabei auf indirektem Weg. Dafür wurden in einer PCR die Mutanten ARF1 (G2A) und ARF6 (G2A) durch Austausch des Glycins gegen Alanin an Position 2 erzeugt. Diese Mutanten können nicht mehr myristoyliert werden, da N-Myristoyltransferasen Myristat nur an Glycin addieren können.

Die Mutanten ARF1 (G2A).Ig und ARF6 (G2A).Ig wurden nach Elektroporation in COS-7m bzw. Jurkat LT Zellen transient überexprimiert. Als Kontrolle wurden die Wildtyp Ig-Fusionsproteine von ARF1 und ARF6 verwendet. Eine Modifikation der Wildtyp Proteine ließ sich in einem SDS-PAGE nicht nachweisen, da das Laufverhalten der Wildtyp-Formen sich nicht von dem Laufverhalten der Mutanten ARF1 (G2A) und ARF6 (G2A) unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Der biochemische Nachweis der Myristoylierung erfolgte durch partielle Zellfraktionierung. Da die Myristoylierung für die Membranassoziiierung notwendig ist, sollten die Mutanten nicht mit Zellmembranen assoziiert sein. Dazu wurden die ARF Konstrukte durch Elektroporation in der T-Zelllinie Jurkat LT überexprimiert. Die Zellen wurden hypotonisch aufgeschlossen und die Membranfraktion von der cytoplasmatischen Fraktion durch Zentrifugation getrennt. Dabei zeigte sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine und Analyse mit anti-human IgG Antikörper zur Detektion der IgG Fusionsproteine, dass Wildtyp ARF1 und ARF6 mit Zellmembranen assoziiert sind. Die Mutanten ARF1 (G2A) und ARF6 (G2A) dagegen konnten überwiegend in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.6.4 A). Dies zeigt, dass eine Myristoylierung der ARF.Ig Chimären in der verwendeten T-Zelllinie erfolgt. Geringe Mengen von unmyristoyliertem ARF1 und ARF6 in der Membranfraktion ist auf eine direkte Interaktion der ARF Proteine mit Phospholipiden zurückzuführen (Franco *et. al.*, 1996).

Der biochemische Nachweis der korrekten Myristoylierung der chimären Proteine ARF1.Ig und ARF6.Ig wurde durch *in vivo* Untersuchungen zur Lokalisierung der myristoylierungsdefizienten Mutanten unterstützt. Dazu wurden die Konstrukte sowohl in die T-Zelllinie Jurkat LT als auch in die eukaryontische Zelle COS-7m durch Elektroporation eingebracht. Die Zellen wurden auf Glaträgern mit Formaldehyd fixiert und die intrinsischen Proteine mit einem FITC-gekoppelten anti-human IgG Antikörper in den permeabilisierten Zellen detektiert. Dabei zeigte sich, dass ARF1 in distinkten intrazellulären Membrankompartimenten lokalisiert ist (vgl. dazu auch Abbildung 4.6.3). Die Mutante ARF1 (G2A) dagegen lokalisiert diffus im gesamten Cytoplasma der Zelle. ARF6 dagegen wird überwiegend im Zellkortex exprimiert. Durch Substitution des Glycins gegen Alanin kommt es zur diffusen Lokalisierung von ARF6 (G2A) (Abbildung 4.6.4 B). Die Lokalisierung der Proteine ist dabei zelltypunabhängig. Es zeigte sich das gleiche Expressionsmuster in der T-Zelllinie Jurkat LT sowie in COS-7m Zellen. Wie analoge Untersuchungen mit C-terminalen GFP-Anteil gezeigt haben, hat der C-terminale Ig-Fusionsanteil keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation (Daten nicht gezeigt).

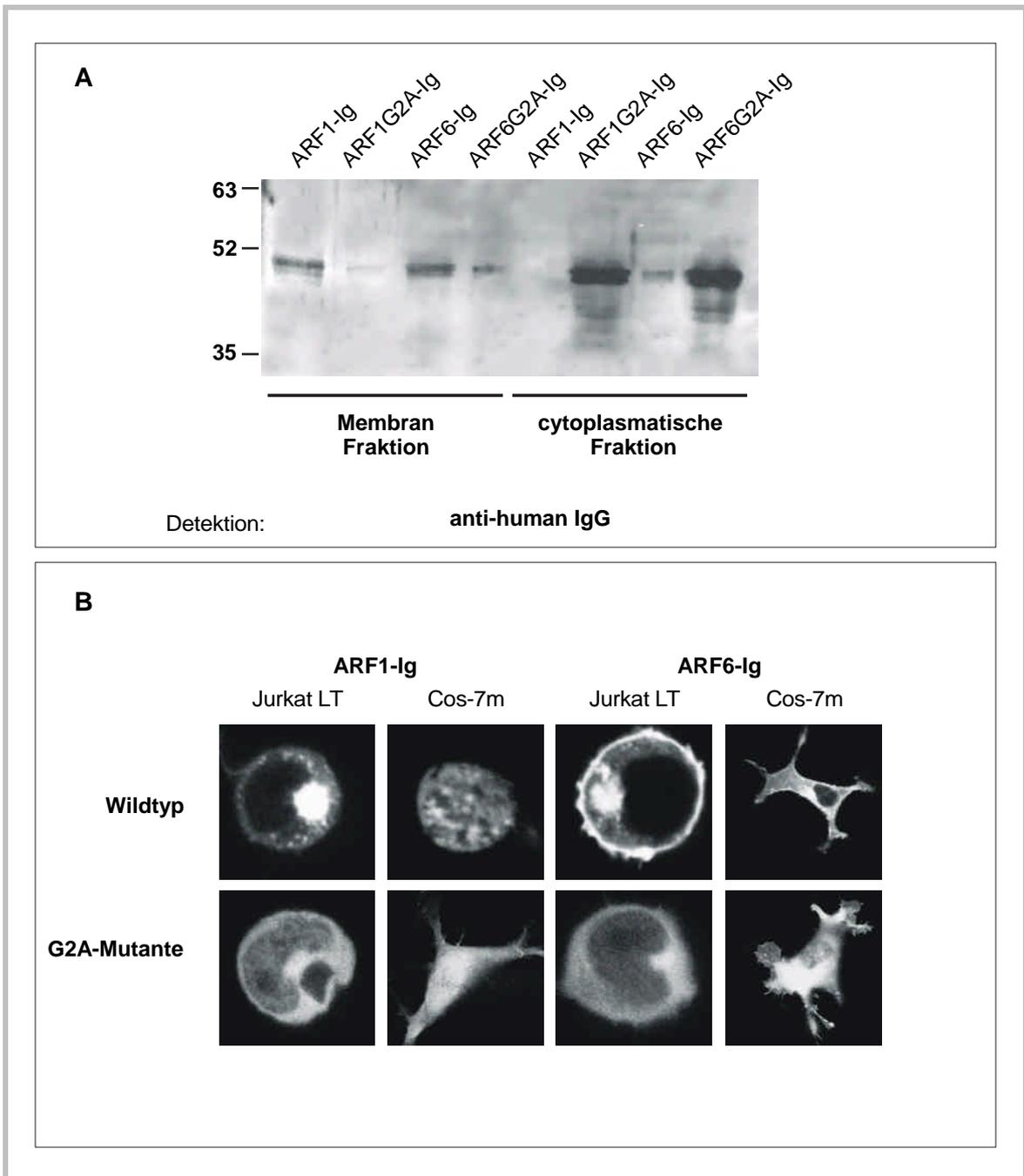


Abbildung 4.6.4: Lokalisierung von ARF1 und ARF6 ist abhängig von der Myristoylierung des N-terminalen Glycins

Die ARF Konstrukte wurden durch Elektroporation in den Jurkat LT überexprimiert

A) Die Zellen wurden hypotonisch aufgeschlossen und die Membran Fraktion von der cytoplasmatischen Fraktion getrennt. Die Fraktionen wurden in einem 10% SDS Gel aufgetrennt und im Western Blot die ARF.Ig-Fusionsproteine detektiert. Dabei sind die Wildtyp-Formen ARF1.Ig und ARF6.Ig vorwiegend in der Membranfraktion enthalten, während die Mutanten ARF1(G2A)-Ig und ARF6(G2A)-Ig in der cytoplasmatischen Fraktion enthalten sind

B) Die Myristoylierungsdefizienten Mutanten ARF1(G2A)-Ig und ARF6(G2A)-Ig (rechte Spalte) sind diffus, während ARF1.Ig und ARF6.Ig (linke Spalte) in distinkten Kompartimenten in der Zelle lokalisiert sind. Die Detektion der rekombinanten Konstrukte erfolgte in den permeabilisierten Zellen mit FITC gekoppelten Antikörper gegen humanes IgG1 gerichtet.

Die Modifikation des N-terminalen Glycins durch eine N-Myristoyltransferase ist entscheidend für die korrekte subzelluläre Lokalisierung von ARF1 und ARF6 in der Zelle. Dies konnte zum einen als indirekter Beweis für eine korrekte Modifizierung und damit volle Funktionalität der chimären ARF1.Ig und ARF6.Ig Proteine gewertet werden; die Modifikationen des N-terminalen Glycins durch die N-Myristoyltransferase in den verwendeten eukaryontischen Zellsystemen wird durch den C-terminalen Ig-Fusionsanteil nicht gestört. Zum anderen zeigen diese Daten, dass die Myristoylierung nicht nur die Membranassoziation induziert, sondern auch eine wichtige Rolle im posttranslationalen Proteintransport besitzt. So sind die GDP-gebundenen myristoylierten ARF-Formen (vgl. Abbildung 4.6.3) nicht mit Membranen assoziiert, zeigen aber dennoch ARF1- und ARF6-spezifische Lokalisation in der Zelle. Somit wird der korrekte Proteintransport sowohl durch die posttranslationale Modifikation der Proteine als auch durch intrinsische Merkmale der ARFs determiniert.

4.6.4 *Cytohesin-1 interagiert sowohl in vivo als auch in vitro mit ARF1, ARF5 und ARF6*

Zwei Proteine des gleichen Zellkompartiments können miteinander wechselwirken, wenn sie sich auf Grund von Van-der-Waals-Kräften hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in räumliche Nähe rücken können. Die Interaktion wird durch die Tertiärstruktur der beiden Proteine bestimmt. Bei der direkten Interaktion zweier Proteine kann eine Spezifität der Wechselwirkung auf Grund ihrer Struktur *in vivo* bewirkt werden. Jedoch ist die unmittelbare Wechselwirkung zweier Proteine *in vitro* noch kein Anzeichen dafür, dass diese Interaktion der Proteine physiologische Bedeutung besitzt. Durch regulatorische Proteine, durch Modifikation wie Phosphorylierung sowie durch die Lokalisierung der Proteine kann die direkte Wechselwirkung zweier Proteine *in vivo* gesteuert werden. Die bisherigen *in vivo* gewonnenen Daten lassen ARF6 auf Grund der zellulären Lokalisation an der Plasmamembran als ein potentielles Effektorprotein der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 erscheinen. Jedoch wurde die Guaninnukleotid-Austauschaktivität bakteriell exprimierten ARF6 von Cytohesin-1 an Membranlipiden nur uneffektiv katalysiert. Um zu prüfen, ob der reduzierte GDP/GTP-Austausch von bakteriell exprimierten ARF6 in Anwesenheit von Cytohesin-1 auf Affinitätsänderungen der Interaktion beider Proteine zurückzuführen ist, wurde die Interaktion der ARF Proteine mit Cytohesin-1 unter *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austauschbedingungen bestimmt. Dazu wurden die C-terminalen Ig-Fusionsproteine in COS-7m Zellen nach der DEAE/Dextran Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die überexprimierten ARF-Fusionsproteine nach Lyse der Zellen an Protein A Sepharose über den Ig-Anteil immobilisiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit 1 µg 6xHisCytohesin-1, unter den gleichen Bedingungen bei denen der *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch durchgeführt wurde, bei 37°C inkubiert. Die immobilisierten ARF Proteine wurden gründlich gewaschen, um ungebundenes 6xHisCytohesin-1 zu entfernen. Die Ansätze wurden nach einer SDS-Gelelektrophorese im Western Blot auf noch gebundenes 6xHisCytohesin-1 analysiert. 6xHisCytohesin-1 bindet unter diesen Bedingungen in gleichem Maße an ARF1.Ig, ARF5.Ig und ARF6.Ig. (Abbildung 4.6.5 A, Spur 1-3). Eine unspezifische Bindung von 6xHisCytohesin-1 erfolgte unter diesen Bedingungen nicht an Protein A-Sepharose bzw. den IgG-Anteil der ARF-Fusionsproteine (Abbildung 4.6.5 A, Spur 4). *In vitro* interagiert Cytohesin-1 über die Sec7-Domäne ohne relevante Affinitätsunterschiede sowohl mit ARF1, ARF5 als auch mit ARF6.

Durch das Überangebot eines möglichen Interaktionspartners *in vitro* kann es zu artifiziellen Wechselwirkungen zweier Proteine kommen. Diese können durch eine mögliche partielle

Denaturierung des aufgereinigten, bakteriell exprimierten 6xHis Cytohesin-1 in diesem System bedingt sein. Durch konformationale Änderungen können somit hydrophobe Proteinbereiche aus einer hydrophoben Umgebung im Inneren des Proteins an der Proteinoberfläche präsentiert werden. Dadurch können diese Bereiche der Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einer artifiziellen Bindung führen. Genauere Ergebnisse können durch die Untersuchung der Interaktion zweier Proteine *in vivo* erhalten werden. Daher wurde untersucht, ob endogenes Cytohesin-1 mit ARF Proteinen in T-Zellen interagieren kann. Die Expression von Cytohesin-1 in T-Zellen war von Kolanus *et. al.* (1996) gezeigt worden. Da keine gegen endogene ARF-Proteine gerichteten Antikörper zur Verfügung standen, wurden durch Elektroporation rekombinante Ig-Fusionsproteine der ARFs in Jurkat E6 Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden 12 – 14 h nach der Transfektion geerntet und lysiert und die rekombinanten ARF Proteine über den Ig-Anteil an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Durch den Cytohesin-1 spezifischen Antikörper mAb7H2 (Nagel *et. al.*, 1998) konnte ein mit ARF1.Ig und ARF6.Ig kopräzipitiertes Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 50 kDa nachgewiesen werden. Jedoch kopräzipitierte ARF5 mit einem ca. 52 kDa-Protein. Der verwendete Antikörper ist gegen die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 gerichtet; zudem werden auch die stark homologen Proteine Cytohesin-2 (ARNO, 398 Aminosäuren) und Cytohesin-3 (GRP1, 399 Aminosäuren) erkannt (Nagel *et. al.*, 1998). Aus dem Laufverhalten der Banden bei ARF1 und ARF6 wurde geschlossen, dass das kopräzipitierte Protein endogenes Cytohesin-1 (398 Aminosäuren, ca. 46 kDa) ist. Auf Grund des Molekulargewichtes kann die mit ARF5 komigrierte Bande keinem der genannten Proteine der Cytohesin-Familie zweifelsfrei zugeordnet werden. Da jedoch keine spezifisch gegen ARNO oder GRP-1 gerichteten Antikörper zur Verfügung standen, konnte das Protein nicht näher identifiziert werden. Die physiologische Bedeutung dieser Entdeckung bleibt daher unklar. Jedoch kann man aus der Kopräzipitation von endogenem Cytohesin-1 an ARF1 und ARF6 schließen, dass diese Proteine *in vivo* interagieren können.

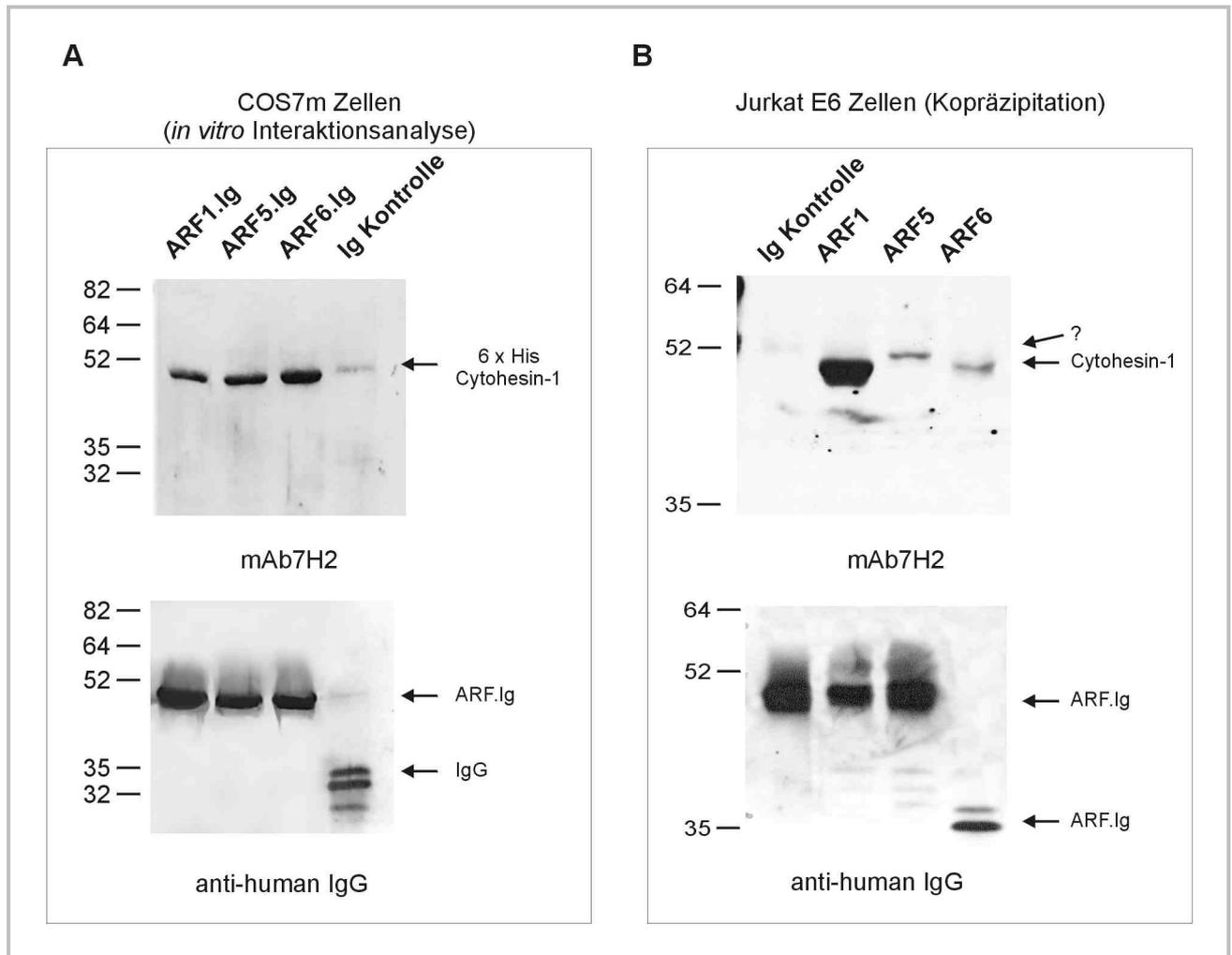


Abbildung 4.6.5: **Interaktion von 6xHis Cytohesin-1 mit immobilisiertem ARF.Ig**

- A) aus COS-7m überexprimierte Ig-Fusionsproteine der ARFs wurde an Protein A Sepharose immobilisiert. Unter *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austauschbedingungen wurden die ARF Proteine mit gereinigtem bakteriell exprimierten 6xHis Cytohesin-1 inkubiert und an ARF gebundenes 6xHis Cytohesin-1 im Western Blot nachgewiesen.
- B) Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Virus infiziert und die überexprimierten ARF Fusionsproteine an dem Ig-Fusionsanteil aus den lysierten Zellen immunpräzipitiert. In einem Western Blot erfolgte der Nachweis des mit dem ARF koimmunpräzipitierten endogenen Cytohesin-1 mit dem Antikörper mAb7H2

4.6.4.1 Cytohesin-1 interagiert mit ARF1, ARF5 und ARF6 sowohl in der GDP als auch in der GTP-gebundenen Form

Die Affinität von Cytohesin-1 hängt nicht von dem gebundenen Guaninnukleotid ab. *In vivo* bindet Cytohesin-1 an die GDP-Form von ARF und katalysiert dadurch den Guaninnukleotid-Austausch zu GTP. ARF in der aktiven GTP-gebundenen Form dagegen sollte eine geringere Affinität zu Cytohesin-1 besitzen, um den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor wieder zu entlassen, damit Cytohesin-1 für einen weiteren Zyklus zur Verfügung steht. Paris *et. al.* (1997) konnten zeigen, dass die Affinität der Sec7-Domäne am höchsten zu unbeladenen ARF ist, dass aber in diesem Zustand nur für kurze Momente in der Zelle vorliegt. Die Affinität nimmt dabei von der GDP-gebundenen Form über die GTP-gebundene Form ab.

Cytohesin-1 interagiert sowohl mit ARF_{GDP} (ARF1 (T31N).Ig und ARF6 (T27N).Ig) (Abbildung 4.6.6 A, Spur 4 und 6) als auch mit ARF_{GTP} (ARF1 (Q71L).Ig und ARF6 (Q67L).Ig) (Abbildung 4.6.6 A, Spur 5 und 7). Überraschenderweise zeigte Cytohesin-1 dabei eine höhere Affinität zur konstitutiv aktiven GTP-gebundenen Form als zur GDP-Form. Die quantitativen Unterschiede lassen sich nicht auf unterschiedliche Mengen an immobilisierten ARF Proteinen zurückführen (Abbildung 4.6.6 B). Die Affinitätsunterschiede in der Cytohesin-1 Bindung resultieren möglicherweise aus der Punktmutation kritischer Aminosäuren, die zu Konformationsänderungen führen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung von Cytohesin-1 an ARF1 (Q71L) und ARF6 (Q67L) zur Dissoziation des gebundenen GTP führt und ein stabiler Cytohesin-1/ARF-Komplex gebildet wird (Paris *et. al.*, 1997). Diese Daten zeigen indes, dass die Spezifität der Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF Proteinen folglich nicht durch die Tertiär-Struktur der ARF Proteine bestimmt wird. So konnte Pacheco-Rodriguez *et. al.* (1998) zeigen, dass die Sec7-Domäne eine große Bandbreite von ARF-verwandten Sequenzen binden kann.

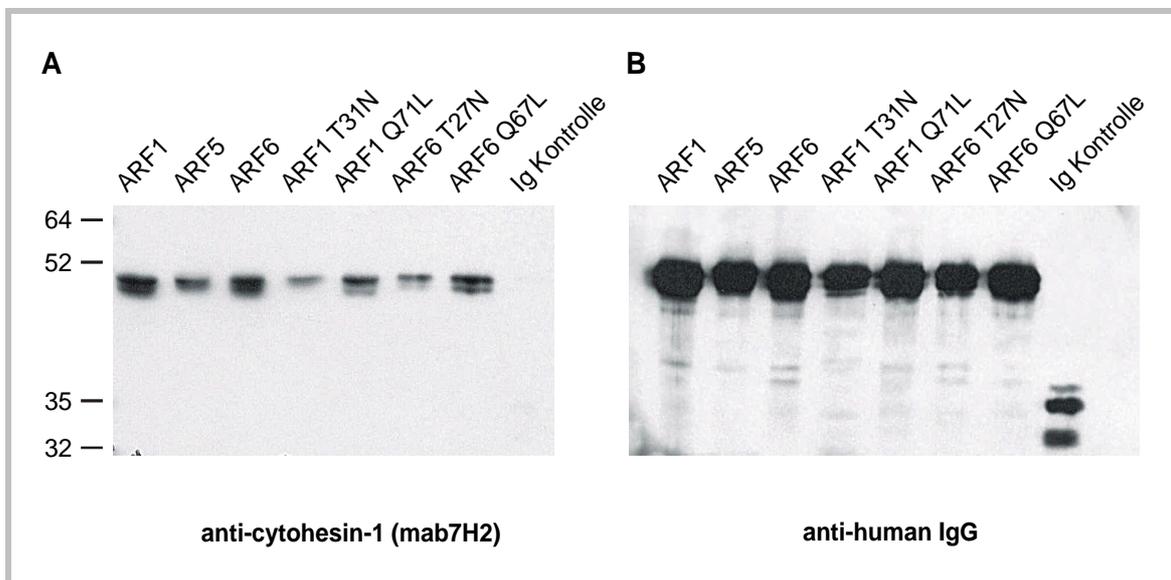


Abbildung 4.6.6: ***In vitro* Interaktion von Cytohesin-1 mit diversen ARF-Proteinen**

- A) Der anti-Cytohesin-1 Blot erfolgte mit dem monoklonalen Hybridom-Überstand mab7H2. In allen Spuren wurde die gleiche Menge aufgeschlossener mit dem jeweiligen rekombinanten Vaccinia Virus infizierter COS-7m Zellen aufgetragen. Die *in vitro* Interaktion konnte mit allen ARF-Konstrukten gezeigt werden, wobei qualitative Unterschiede durch das gebundene Guaninnukleotid bewirkt werden.
- B) Die quantitative Analyse der in jedem Ansatz verwendeten immobilisierten ARF-Proteine erfolgte nach Strippen des anti-Cytohesin-1 Blots mit anschließendem anti-human IgG Blot.

4.6.4.2 Kolokalisierung von Cytohesin-1 mit ARF6 an Lipidmembranen bewirkt Interaktion

Auf Grund der Membranassoziation von ARF6 *in vivo*, wurde vermutet, dass ARF6 das für Cytohesin-1 relevante Effektorprotein darstellt. Es war postuliert worden, dass die durch den Myristatrest bedingte Bindung an die Zellmembran eine konformationale Änderung induziert, die eine Voraussetzung für die Interaktion des GEFs mit den ARFs darstellt (Beraud-Dufour *et. al.*; 1999).

Daher wurde die Interaktion von ARF6 mit Cytohesin-1 unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht. Da sowohl Cytohesin-1 als auch ARF6 in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurde die *in vitro* Interaktionsanalyse mit artifiziellen Membranen, bestehend aus präparierten Liposomen aus 70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin und 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol, durchgeführt. Um schwache von starken Interaktionen unterscheiden zu können, wurde durch verschiedene Konzentrationen das Gleichgewicht der Bindungsreaktion variiert. Dabei zeigte sich (Abbildung 4.6.7), dass ARF6 in Abwesenheit von Liposomen quantitativ Cytohesin-1 bindet, da kein Unterschied nach Inkubation von 0,1 μ g 6xHis Cytohesin-1 oder der 10-fachen Menge davon (1 μ g) detektiert werden konnte. Cytohesin-1 bindet dabei sowohl an die GDP- (ARF6 (T27N)-Ig) als auch GTP-gebundene Form (ARF6 (Q67L)-Ig). Liposomen im Ansatz führen zur Verringerung von ARF6 gebundenem Cytohesin-1. Auf Grund dieser Daten muss gefolgert werden, dass membrangebundenes ARF6 eine geringere Affinität zu Cytohesin-1 besitzt als cytoplasmatisches ARF6. Widersprüchlich dazu sind die Daten, dass Cytohesin-1 den Guaninnukleotid-Austausch von ARF6 in Gegenwart dieser Liposomen katalysieren kann (vgl. Abschnitt 4.6.5.1). Dies kann auch darauf zurückgeführt werden, dass die Liposomen-Präparation auf Grund freier Lipidmoleküle als mildes Detergenz wirkt und so die Interaktion inhibieren kann. Eine Zunahme der Bindungsspezifität des Cytohesin-1 konnte durch Zugabe von Liposomen nicht beobachtet werden. Auf Grund einer Konformationsänderung assoziiert ARF6 (T27N) weniger gut mit Membranen (Franco *et. al.*, 1995, Antony *et. al.*, 1997), so dass eine *in vitro* Interaktion mit einem membranassoziierten Protein teilweise inhibiert wird (Abbildung 4.6.7, ARF6 (T27N)-Ig, Spur 2 und 4).

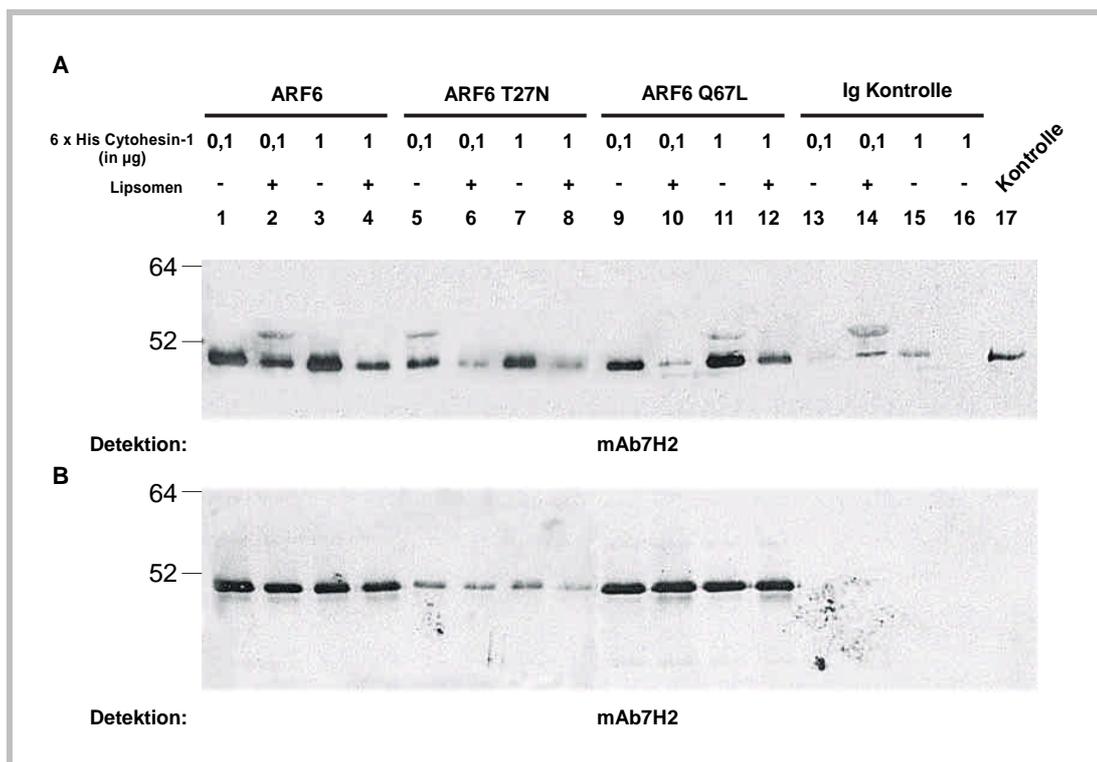


Abbildung 4.6.7: **ARF6 interagiert mit Cytohesin-1 sowohl in der GDP- als auch GTP-Form nach Zugabe von artifiziellen Lipidmembranen**

- A) ARF6 und die Mutanten ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) wurden mit Hilfe rekombinanter Vaccinia Viren in COS-7m6 überexprimiert und an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Die Interaktion von bakteriell exprimierten 6xHis Cytohesin-1 erfolgte unter *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch Bedingungen mit 0,1 μ g bzw 1 μ g in Gegenwart oder Abwesenheit von Liposomen.
- B) Die an Protein A Sepharose immobilisierten ARF6.Ig Fusionsproteine wurden im Western Blot mit anti-human IgG Antikörper detektiert.

4.6.5 **Katalytische Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 auf eukaryontisch exprimierte ARF Proteine**

Eine stabile und permanente Interaktion von ARF6 mit Cytohesin-1 ist für die Katalyse des Guaninnukleotid-Austausches *in vivo* nicht notwendig. Die *in vitro* Interaktionsstudien können daher keinen Aufschluss geben, ob Cytohesin-1 den Guaninnukleotid-Austausch von ARF6 katalysieren kann. Zudem lassen die durch Kopräzipitationsstudien gewonnenen Interaktionsdaten keinen Schluss auf physiologisch relevante Interaktionen in der Zelle ziehen, da durch die Lyse der Zellen Proteine miteinander Wechselwirken können, die in völlig getrennten Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. So kopräzipitiert mit Cytohesin-1 sowohl ARF1 als auch ARF6, wobei ARF6 in geringerem Maße an präzipitiertes Cytohesin-1 gebunden ist als ARF1. Diese Daten zeigen, dass eine Interaktion von Cytohesin-1 mit eukaryontisch exprimierten ARFs erfolgen kann. Auf Grund der zellulären Lokalisation von ARF1 und ARF6 wurde vermutet, dass ARF6 an der Plasmamembran bevorzugt mit Cytohesin-1 interagiert. Da aus den bisher erhaltenen Daten nicht gefolgert werden kann, dass die Myristoylierung für die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF6 notwendig ist, erscheint die Rolle der Myristoylierung dabei noch unklar. Möglicherweise wird der Guaninnukleotid-Austausch durch die Myristoylierung erleichtert, da der Myristatrest bzw. dessen Interaktion mit Membranlipiden zu einer konformationalen Änderung des Proteins im Bereich der Nukleotid-Bindestelle führen, welche die Dissoziation des GDP erlauben. In vorherigen Untersuchungen war gezeigt worden, dass der von Cytohesin-1 katalysierte Guaninnukleotid-Austausch von bakteriell exprimiertem ARF6 durch Liposomen nicht gesteigert wird. Um die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 auf den GDP/GTP Austausch *in vivo* unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, musste eine korrekte Modifikation der eukaryontisch exprimierten rekombinanten ARF-Fusionsproteine erfolgen.

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass die rekombinanten C-terminalen ARF-Fusionsproteine, ARF1.Ig und ARF6.Ig Proteine, durch die transiente Expression in eukaryontischen Zellen Funktionalität in Bezug auf Lokalisation und Modifizierung besitzen und myristoyliert werden. Daher sollte untersucht werden, ob die Myristoylierung von ARF6 Einfluss auf den Cytohesin-1 katalysierten Guaninnukleotid-Austausch besitzt. So wird der Austausch von GDP durch GTP, katalysiert von Cytohesin-1, durch die Myristoylierung von ARF1 begünstigt (Franco *et. al.*, 1995). Die Myristoylierung bewirkt zudem die Membranassoziiierung von GTP gebundenem ARF1 (Franco *et. al.*, 1996).

4.6.5.1 **Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch von immobilisiertem eukaryontisch exprimierten ARF Proteinen**

Durch die Verwendung von eukaryontisch exprimierten Proteinen waren fehlende oder inkorrekte Modifikationen, welche die Aktivität der G-Proteine beeinflussen könnten, auf der Basis der bisherigen Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen. Der neuartige Ansatz, den *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch von eukaryontisch exprimierten ARF.Ig Proteinen zu untersuchen, sollte die Unzulänglichkeiten der bisherigen Untersuchungsmethoden rekombinanter prokaryontisch exprimierter ARFs vermeiden. Durch die Verwendung eines C-terminalen IgG-Fusionsanteil können die ARF Chimären an Protein A Sepharose quantitativ immobilisiert werden. Der N-Terminus jedoch bleibt frei beweglich und kann mit anderen Komponenten, die den Guaninnukleotid-Austausch beeinflussen, interagieren. Dazu gehören Membransubstitute oder auch Liposomen, die mit dem Myristatrest des N-terminalen Glycins Wechselwirken können. Zudem kann die Sec7-Domäne wie in Abschnitt 4.6.4.1 und 4.6.4.2 gezeigt mit den ARF-Chimären wechselwirken. Ob diese Interaktion der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 das Beladen der ARF Proteine mit GTP katalysiert, wurde durch die Verwendung radioaktiv markierter

GTP Analoga untersucht. Dazu wurde ^{35}S markiertes GTP verwendet, bei dem das Sauerstoffatom in γ -Position durch das ^{35}S -Isotop ersetzt wird. Dieses GTP-Analoga GTP γS hat zudem den Vorteil, dass es von der intrinsischen GTPase Aktivität nicht zu GDP hydrolysiert werden kann. Jedoch hat sich gezeigt, dass die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse unter *in vitro* Bedingungen sehr langsam verläuft (Franco *et. al.*, 1994, eigene Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Vorteil von [^{35}S]GTP γS liegt in der verminderten Dissoziation (Franco *et. al.*, 1995).

Dazu wurden die ARF-Fusionsproteine durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia Viren in COS-7m Zellen überexprimiert und aus den lysierten Zellen an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Der GDP/GTP Austausch von Protein A Sepharose immobilisierten ARF Proteinen erfolgte mit [^{35}S]GTP γS nach Zugabe von bakteriell exprimierten und aufgereinigtem 6xHis Cytohesin-1. Dabei wurden zuerst saturierende Bedingungen durch Zugabe eines molaren Überschusses an Cytohesin-1 und langen Inkubationszeiten zum Erreichen eines Reaktionsgleichgewichts verwendet.

Wie in Abbildung 4.6.8 A zu sehen ist, katalysiert Cytohesin-1 den Guaninnukleotid Austausch sowohl von ARF1 als auch von ARF6. Wie erwartet katalysiert Cytohesin-1 keine Bindung von [^{35}S]GTP γS durch die konstitutiven Mutanten ARF1 (T31N) und ARF6 (T27N). Der Umsatz von gebundenen GTP wird bei den Mutanten ARF1 (Q71L) und ARF6 (Q67L) durch Cytohesin-1 nicht merklich gesteigert, obwohl es in geringem Maße zur Einlagerung von [^{35}S]GTP γS kommt. Dies ist möglicherweise auf unbesetzte Guanin-Nukleotid-Bindungsstellen zurückzuführen, die von [^{35}S]GTP γS gebunden werden können. Um den radioaktiven Hintergrund der gewählten Versuchsanordnung zu bestimmen, wurde immobilisiertes IgG unter den selben Bedingungen mit radioaktiv markierten GTP und Cytohesin-1 inkubiert wie die ARF-Chimären. Als weitere Kontrolle für die Spezifität der Reaktion wurde der Guaninnukleotid-Austausch mit Cytohesin-1 (E157K) durchgeführt. Cytohesin-1 (E157K) besitzt eine inaktive Sec7-Domäne durch Austausch einer Aminosäure im katalytischen Zentrum, die für die ARF-GEF (Guanin-Nukleotid-Austauschfunktion) Aktivität der Sec7 von Bedeutung ist. Die Aminosäure E an Position 157 ist homolog zu E156 in der Sec7-Domäne von ARNO, die als wichtig für die Aktivität dieser Domäne erkannt worden war. (Mossesova *et. al.*, 1998). Diese Cytohesin-1 Punktmutante wurde als Hexahistidin gekoppeltes Protein, genau wie 6xHis Cytohesin-1, in Bakterien überexprimiert und über das Hexahistidinpeptid an Nickelagarose gebunden und aufgereinigt. Die Qualität der 6xHis Cytohesin-1 und 6xHis Cytohesin-1 (E157K) Präparation wurde in einem SDS-Gel nach Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 4.6.8 C). Durch die Sec7 defiziente Mutante Cytohesin-1 (E157K) kam es zu keiner Steigerung der GTP-Einlagerung (Abbildung 4.6.8 B). Obwohl Cytohesin-1 (E157K) an ARF1.Ig und ARF6.Ig mit ähnlicher Affinität wie Wildtyp Cytohesin-1 bindet (Abbildung 4.6.8 D) ist es als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor vollständig inaktiv.

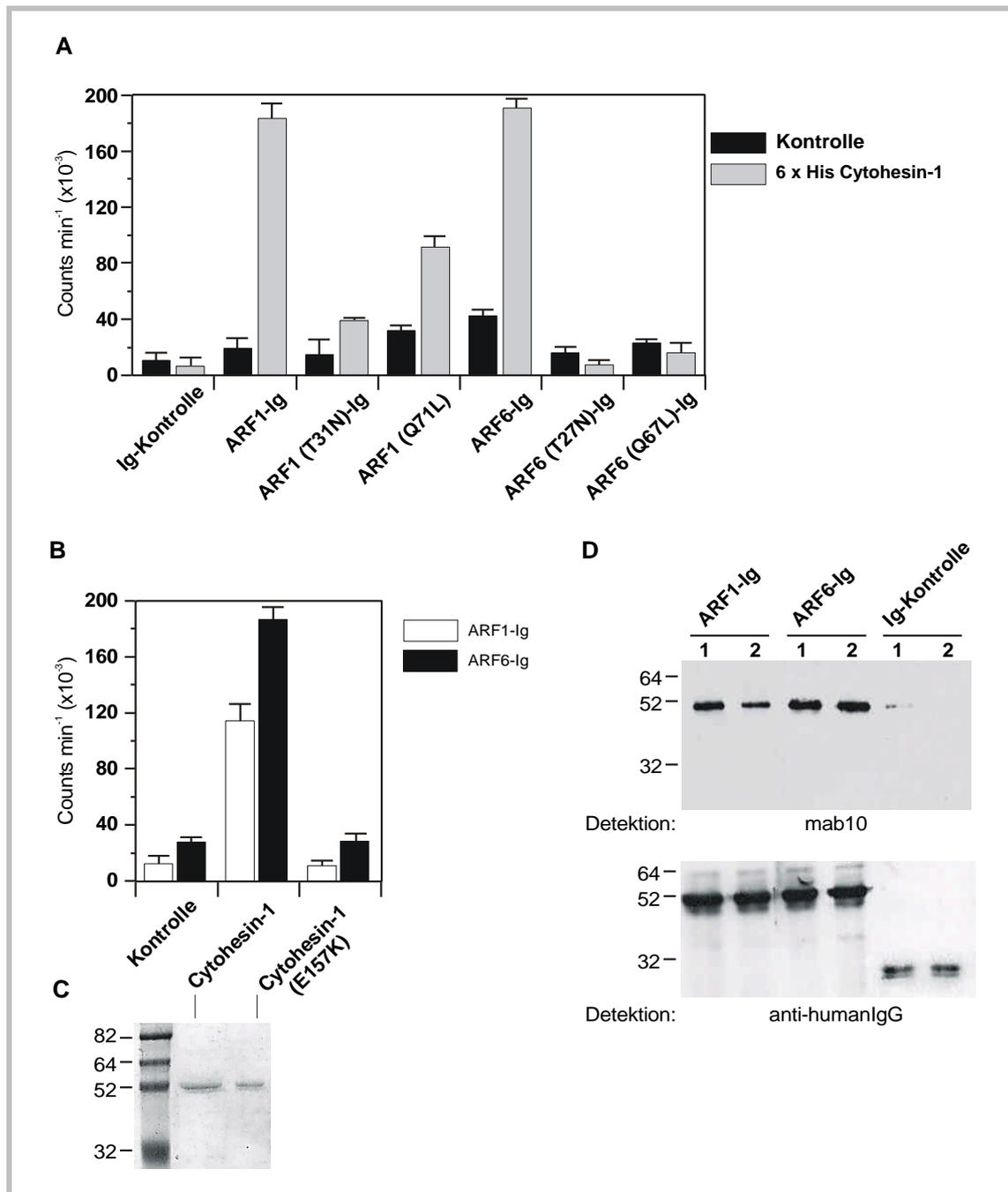


Abbildung 4.6.8: **Cytohesin-1 katalysiert unspezifisch den GDP/GTP-Austausch von ARF1 als auch von ARF6**

COS-7m Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert. Die ARF-Fusionsproteine wurden über ihren C-terminalen Ig-Fusionsanteil an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Der Guaninnukleotid-Austausch erfolgte mit γ -[³⁵S]GTP γ S und bakteriell exprimierten und aufgereinigtem 6xHis Cytohesin-1 bzw. 6xHis Cytohesin-1 (E157K) (nur als Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1 (E157K) bezeichnet).

- A) Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6, während die Mutanten ARF1 (T31N), ARF1 (Q71L), ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) kein GTP binden können.
- B) Die Sec7-Domänen-Mutante Cytohesin-1 (E157K) kann im Gegensatz zu Wildtyp Cytohesin-1 nicht den Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 katalysieren.
- C) Coomassie-Blau Färbung der bakteriell exprimierten und aufgereinigten Proteine 6xHis Cytohesin-1 [1] und 6xHis Cytohesin-1(E157K) [2].
- D) *In vitro* Bindungsstudie von 6xHis Cytohesin-1 [1] und 6xHis Cytohesin-1(E157K) [2] an immobilisiertes ARF1.Ig und ARF6.Ig.

4.6.5.2 Der Einfluss von Lipidmembranen auf den GDP/GTP-Austausch

Die bisherigen Ergebnisse implizierten, dass Cytohesin-1 ein Austauschfaktor sowohl für ARF1 als auch für ARF6 darstellt. Die Interaktion zweier Proteine wird *in vivo* auch von der Umgebung der Proteine bestimmt. ARF1 und ARF6 lokalisieren über die N-terminale Myristatgruppe an der Membran. Franco *et al.* (1995) haben gezeigt, dass die Myristoylierung und die Assoziierung von ARF1 mit der Membran über den Myristatrest Einfluss auf den Guaninnukleotid-Austausch hat. Daher wurde der *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch mit Liposomen, bestehend aus 70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin und 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol, als Substitut für Zellmembranen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Nukleotidaustausch nach 20 min sowohl von ARF1.Ig als auch von ARF6.Ig durch Phospholipidvesikel unter den gewählten *in vitro* Bedingungen nicht beeinflusst wird (Abbildung 4.6.9 A).

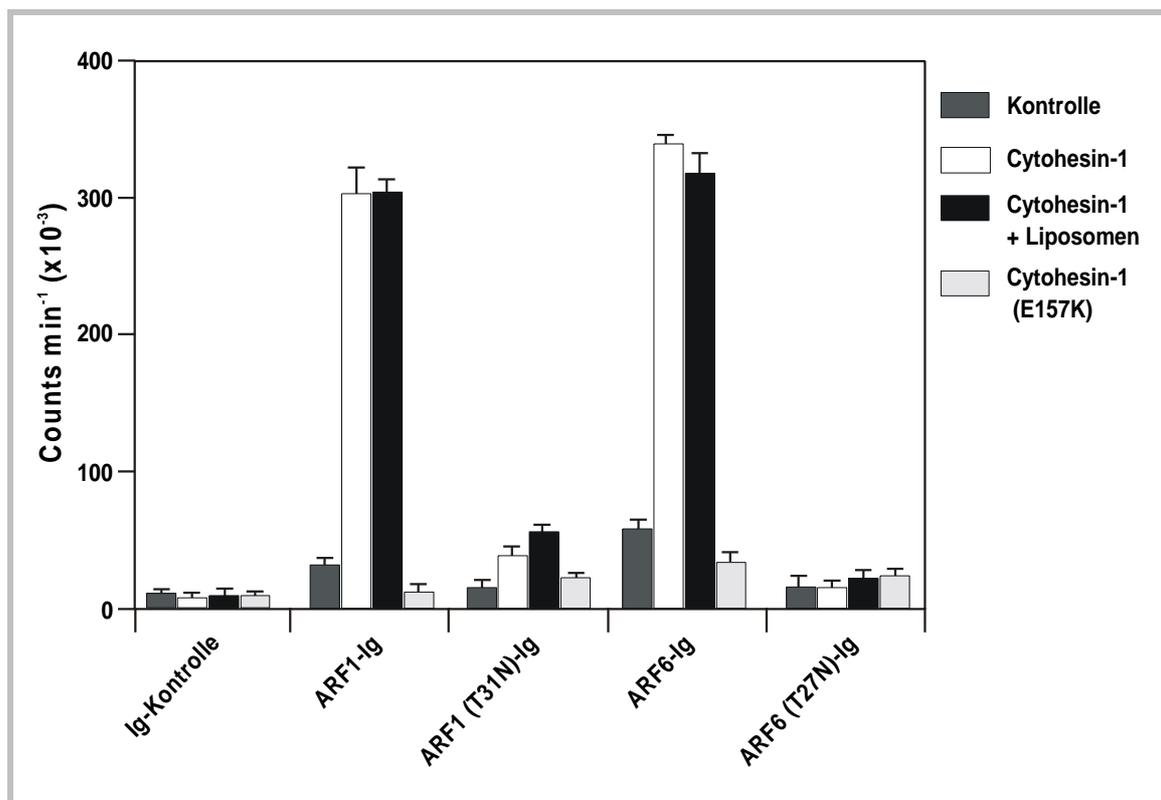


Abbildung 4.6.9: **Zusammensetzung der Membran hat Einfluss auf die Geschwindigkeit des Guaninnukleotid-Austausch**

COS-7m Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert und die ARF-Fusionsproteine an Protein A Sepharose immunpräzipitiert.

Der *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch erfolgte dabei ohne (jeweils 1. Balken) bzw. mit $0,02\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 6xHis Cytohesin-1 jeweils ohne (weiße Balken) bzw. mit Liposomen (70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin, 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol) (schwarze Balken). Als Negativkontrolle erfolgte der Austausch mit $0,02\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der Sec7Domäne inaktiven Mutante 6xHis Cytohesin-1 (E157K) (Cytohesin-1 (E157K); jeweils 4. Balken). Die Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an ARF1.Ig und ARF6.Ig wird durch Liposomen nicht beeinflusst. Die Ig Kontrolle, bestehend aus immobilisiertem IgG-Anteil, diente zur Bestimmung des radioaktiven Hintergrundes.

4.6.5.3 *PtdIns(4,5)-P₂- und PtdIns(3,4,5)-P₃- Abhängigkeit des Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6*

Neben den Membranlipiden enthält die Plasmamembran auch inosithaltige Phospholipide, die Ausgangsverbindungen für die Bildung der Signalstoffe Diacylglycerol und Inosit-Triphosphat sind. In die Plasmamembran ist das Phospholipid Phosphatidylinosit eingelagert, in dem die Phosphatgruppe mit dem cyclischen Alkohol myo-D-Inosit verestert ist. Phosphatidylinosit (PtdIns) wird von spezifischen Kinasen in 4´ und 5´-Stellung des Inositrestes phosphoryliert, wobei Phosphatidylinosit-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) gebildet wird. Von PtdIns(4,5)P₂ führen zwei Wege zu physiologisch bedeutenden Botenstoffen. Das PtdIns(4,5)P₂ wird nach Stimulierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)-Kinase) weiter zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphoryliert, welches als membranständiger Botenstoff dient.

Es war gezeigt worden, dass die PH Domänen Phosphatidylinositol binden können. Die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ an die PH Domäne des Proto-onkogen Akt-1 reguliert die Kinase-Aktivität dieses Proteins (Franke *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 1997). Zudem war gefunden worden, dass PtdIns(3,4,5)P₃ an die PH Domäne von GRP-1, einem Mitglied der Cytohesin Familie aus der Maus, bindet. Untersuchungen in unserem Labor zeigten zudem, dass die PH Domäne von Cytohesin-1 PtdIns(4,5)P₂ und mit höherer Affinität PtdIns(3,4,5)P₃ bindet. Durch die Bindung an PtdIns(3,4,5)P₃ kommt es zur Rekrutierung von Cytohesin-1 nach Stimulation der PI(3)-Kinase an die Plasmamembran (Nagel *et al.*, 1998a, Nagel *et al.*, 1998b). Dies ließ vermuten, dass PtdIns(3,4,5)-P₃ die Reaktion des GDP/GTP-Austausches beeinflussen kann.

Die ARF.Ig Konstrukte wurden nach Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren in COS-7m Zellen überexprimiert und an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Der Austausch erfolgte unter definierten *in vitro* Bedingungen im GDP/GTP Austauschpuffer mit verschiedenen Konzentrationen des aufgereinigten 6xHisCytohesin-1 sowohl mit PtdIns(3,4,5)-P₂ als auch mit PtdIns(3,4,5)-P₃. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt, um den Zeitverlauf des Guanin-Nukleotid-Austausches von ARF1 und ARF6 zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6.10: dargestellt. Durch Zugabe von PtdIns(4,5)-P₂ bleibt die GDP/GTP Austauschaktivität von Cytohesin-1 auf ARF1 beinahe gleich verglichen mit der Kontrolle nach Zugabe von Liposomen ohne PtdIns(4,5)-P₂. Jedoch wird durch Liposomen mit einem 10%-Anteil von PtdIns(3,4,5)-P₃ das Beladen von ARF1 mit [³⁵S]GTPγS ca. 2-fach gesteigert. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Zugabe von Liposomen mit 10% PtdIns(4,5)-P₂ zu einer deutlichen Verringerung der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 auf ARF6. In Anwesenheit von Liposomen, die 10% PtdIns(3,4,5)-P₃ enthalten, wird die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 auf den Guaninnukleotid-Austausch fast vollständig aufgehoben. Dieser Effekt trat sowohl mit 0,02µg /µl als auch mit einer 10 mal geringeren Konzentration des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors 6xHisCytohesin-1 auf. Durch die niedere Konzentration an Cytohesin-1 kam es lediglich zur Verringerung der absolut gebundenen Menge an radioaktivem [³⁵S]GTPγS.

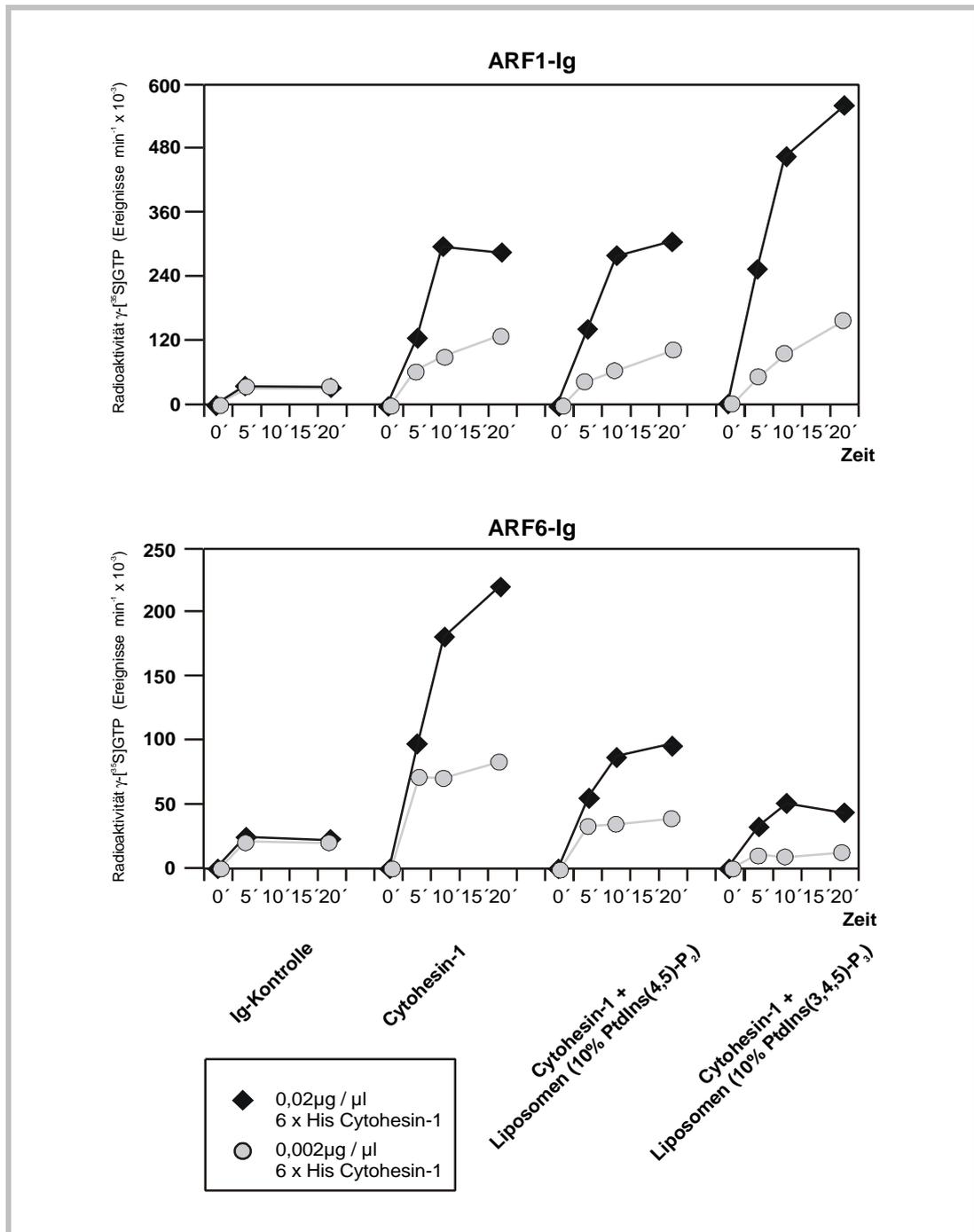


Abbildung 4.6.10: **Guaninnukleotid-Austauschaktivität des Cytohesin-1 an ARF1 und ARF6 wird durch die Phospholipide PtdIns(4,5)-P₂ und PtdIns(3,4,5)-P₃ moduliert**

ARF1.Ig und ARF6.Ig Fusionsproteine wurden aus COS-7m Zellysaten an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Die *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion erfolgte dabei mit 0,02 µg/µl 6xHis Cytohesin-1 (schwarze Raute) oder 1/10 der Menge (0,002 µg/µl 6xHis Cytohesin-1 (grauer Kreis) mit 1 µg/µl Liposomen (60% (w/w) β-Palmitoyl-γ-oleoyl-L-α-Phosphatidylcholin, 30% (w/w) Dioleoyl-L-α-phosphatidyl-DL-Glycerol, 10% PtdIns(3,4)-P₂ bzw. PtdIns(3,4,5)-P₃). Die Rate der Austauschreaktion wurde durch Messen der Radioaktivität des gebundenen γ-[³⁵S]GTP bestimmt. Als Kontrolle wurde jeweils die Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion der immobilisierten Ig-Fusionsproteine in Guanin-Nukleotid-Austauschpuffer ohne Cytohesin-1 und Liposomen gemessen.

Da unklar ist, ob ausschließlich der Überschuss an PtdIns(4,5)-P₂ oder PtdIns(3,4,5)-P₃ den Austausch von GTP katalysieren, wie Terui *et. al.* (1994) beschrieben haben, wurde die Untersuchung zudem mit Liposomen durchgeführt, die nur 5% PtdIns(4,5)-P₂ bzw. PtdIns(3,4,5)-P₃ enthalten. Durch die Verringerung des Phosphatidylinositol-Anteils in den Liposomen kam es zu keiner nennenswerten Veränderung der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 auf ARF1 und ARF6 verglichen zu Liposomen mit 10% Phosphatidylinositol-Anteil (Abbildung 4.6.11).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ARF6 beim Vorliegen von Phosphatidylinositolen kein effektives Substrat für die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 darstellt. Daraus kann gefolgert werden, dass *in vivo* der Guaninnukleotid-Austausch von ARF6 nach Rekrutierung von Cytohesin-1 durch PtdIns(3,4,5)P₃ an die Plasmamembran nur sehr ineffektiv katalysiert wird. Jedoch erfolgt eine deutliche Steigerung der Guaninnukleotid-Austauschaktivität von ARF1 durch Cytohesin-1 mit PtdIns(3,4,5)-P₃. Dies lässt einen möglichen Mechanismus zur Regulation der Katalyseaktivität von Cytohesin-1 durch Phosphatidylinositole vermuten. Von GRP-1 (Cytohesin-3) ist bekannt, dass PtdIns(3,4,5)-P₃ den GDP/GTP-Austausch reguliert (Klarlund *et. al.*, 1998).

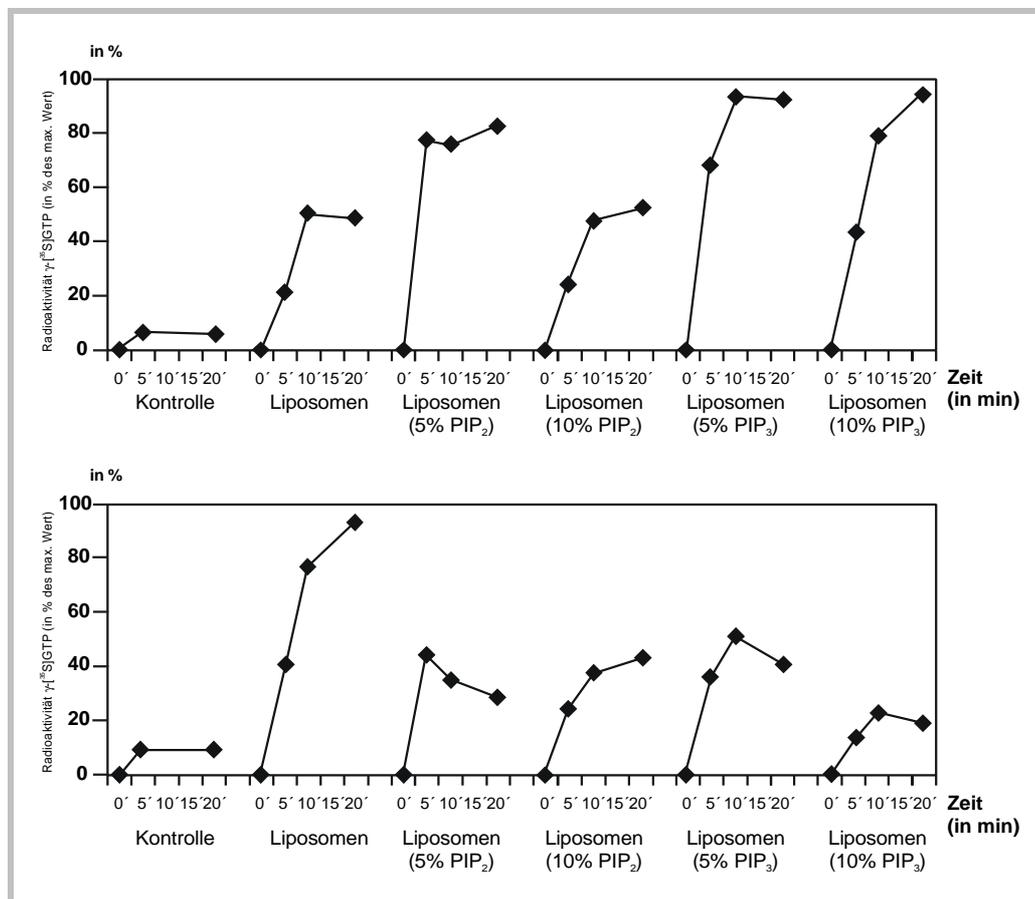


Abbildung 4.6.11: **Guaninnukleotid-Austauschaktivität des Cytohesin-1 an ARF1 und ARF6 wird durch die Phospholipide PtdIns(4,5)-P₂ und PtdIns(3,4,5)-P₃ moduliert**

ARF1.Ig und ARF6.Ig Fusionsproteine wurden aus COS-7m Zellysaten an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Die *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion erfolgte dabei mit 0,02µg/µl 6xHis Cytohesin-1 mit 1µg/µl Liposomen. Die Liposomen enthielten entweder 5% oder 10% PtdIns(3,4)-P₂ bzw. PtdIns(3,4,5)-P₃. Die Rate der Austauschreaktion wurde durch Messen der Radioaktivität des gebundenen γ-[³⁵S]GTP bestimmt. Als Kontrolle wurde jeweils die Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion der immobilisierten Ig-Fusionsproteine in Guanin-Nukleotid-Austauschpuffer ohne Cytohesin-1 und Liposomen gemessen.

4.6.6 Die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF1 und ARF6 kompetitiert mit der Cytohesin-1/CD18-Interaktion

Kolanus *et. al.* (1996) identifizierten Cytohesin-1 als ein mit der β_2 -Kette von LFA-1 interagierendes Protein. In einer *in vitro* Interaktionsuntersuchung in *Saccharomyces cerevisiae* („Two-Hybrid“-System) wurde die cytoplasmatische Domäne der β_2 -Kette als Bindungsstelle von Cytohesin-1 identifiziert. Durch Deletion C-terminaler Aminosäuren konnte die Bindungsstelle auf die 9 membranproximalen Aminosäuren 723 bis 731 eingeschränkt werden. Durch Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass eine Substitution der Aminosäuren 723 – 725 WKA zu TRG die Interaktion mit Cytohesin-1 und somit die Induktion der Zelladhäsion inhibiert (Geiger *et. al.*, 2000).

Cytohesin-1 besitzt somit Interaktionspotential sowohl zu dem cytoplasmatische Teil von CD18 als auch zu ARF Proteinen. Die Proteinsequenz, mit der Cytohesin-1 mit CD18 interagiert war unklar. Allerdings gab es in unserem Labor Hinweise, dass die Sec7-Domäne an der Interaktion beteiligt ist. Die Sec7-Domäne als katalytische Untereinheit von Cytohesin-1 vermittelt die Interaktion von Cytohesin-1 mit den ARF Proteinen (Pacheco-Rodriguez *et. al.*, 1998). Dadurch stellte sich die Frage, wie die Interaktion von Cytohesin-1 sowohl mit der β_2 -Kette als auch mit ARF Proteinen reguliert werden. Um zu klären, ob die Wechselwirkungen unabhängige Ereignisse sind, die zudem durch verschiedene Peptidsequenzen von Cytohesin-1 vermittelt werden, wurde die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF Proteinen und CD18 spezifischen Peptiden untersucht. Abbildung 4.6.12 gibt eine Übersicht über die verwendeten Peptide:

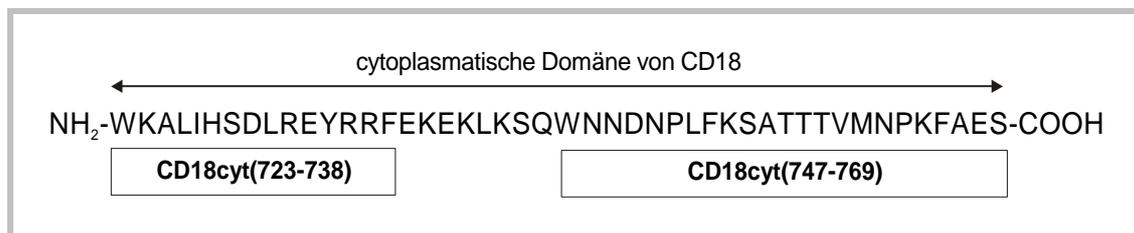


Abbildung 4.6.12: **Übersicht über die verwendeten Peptide der cytoplasmatischen Domäne von CD18**

Die Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von CD18 ist angegeben. Die Sequenz der im Balken angegebenen Peptide erstreckt sich über die Länge des Peptides.

ARF1 und ARF6 wurden als Ig-Fusionsproteine in COS-7m Zellen transient exprimiert und an Protein A Sepharose nach Lyse der Zellen immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 4.6.13 A gezeigt, interagiert bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes 6xHis Cytohesin-1 spezifisch mit ARF1.Ig und ARF6.Ig in Abwesenheit von CD18 spezifischen Peptiden. Dagegen kommt es durch das Peptid CD18cyt(723-738), das der Bindungsdomäne von CD18 an Cytohesin-1 entspricht (Geiger *et. al.*, 2000), in einer Konzentration von 100 nM zu einer Inhibition der Cytohesin-1/ARF-Interaktion. Eine Inhibition durch unspezifische Bindung wurde durch die Verwendung des gleichen Überschusses an dem Peptid CD18cyt(747-769) ausgeschlossen. Die Interaktion kann durch das Peptid CD18cyt(747-769) in einer Konzentration von 100 nM nicht moduliert werden. Von der CD18 Region 732 bis 769 war gezeigt worden, dass keine Wechselwirkung mit Cytohesin-1 stattfindet (Geiger *et. al.*, 2000). Ein analoges Experiment mit der Sec7-Domäne defizienten Mutante Cytohesin-1 (E157K) führte zum selben Ergebnis (Abbildung 4.6.13). Diese Daten bestätigten zudem die Daten vorheriger Experimente, dass Cytohesin-1 (E157K) mit den ARF Proteinen mit vergleichbarer Affinität interagieren kann (vgl. Abbildung 4.6.8). Dies belegt, dass die Inhibition der Cytohesin-1/ARF-

Interaktion unabhängig von der Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion erfolgt. Cytohesin-1 interagiert sowohl mit CD18 als auch mit den ARFs, jedoch inhibieren sich diese Interaktionen gegenseitig.

Ein weiterer Hinweis darauf konnte durch Bestimmen der *in vitro* ARF-GEF Funktion von Cytohesin-1 in Gegenwart des Peptides CD18cyt(723-739) gewonnen werden. Der *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch wurde mit COS-7m Zellen exprimierten und an Protein A Sepharose immobilisierten ARF1.Ig und ARF6.Ig durchgeführt. Die Katalyse des Guanin-Nukleotid-Austausches erfolgte durch Zugabe von 1 µg (=0,2 µM) 6xHis Cytohesin-1. Cytohesin-1 katalysiert dabei sowohl bei ARF1 wie auch bei ARF6 den Austausch von GDP gegen [³⁵S]GTPγS. Der Guaninnukleotid-Austausch wird jedoch durch steigende Konzentrationen von 20 nM bis zu 100 nM des Peptides CD18cyt(723-739) inhibiert (Abbildung 4.6.13 B). Eine vollständige Kompetitierung kann dabei durch Zugabe des 500-fachen Überschusses an dem Peptid CD18cyt(723-739) (= 100 nM) erreicht werden. Die spezifische Kompetition von CD18 mit ARF Proteinen um die Interaktion mit Cytohesin-1, resultiert folglich nicht nur in einer Abnahme der Bindungsaffinität von Cytohesin-1 an ARF, sondern auch in einer Inhibierung der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 auf ARF. Dies kann durch eine direkte Interaktion von ARF und CD18 mit der selben Untereinheit von Cytohesin-1 erklärt werden. Eine weitere Erklärung bietet auch eine sterische Behinderung durch die Bindung von CD18 in räumlicher Nähe zu der Interaktionsdomäne mit ARF. Zudem kann durch eine Bindung von CD18 an Cytohesin-1 eine Konformationsänderung bewirkt werden, welche die Interaktionsstelle von Cytohesin-1 nicht mehr für ARF zugänglich macht.

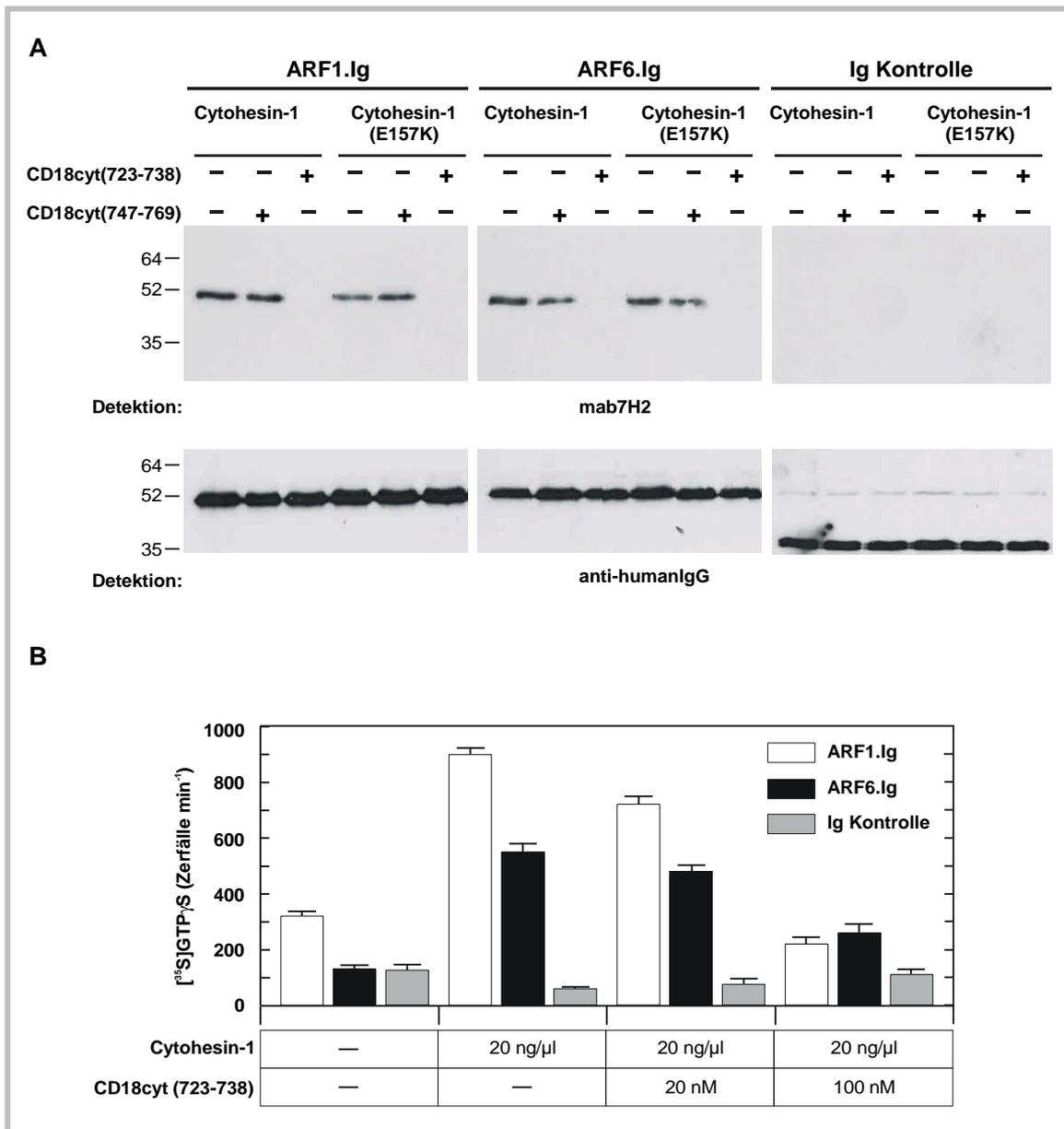


Abbildung 4.6.13: **Die cytoplasmatische Domäne von CD18 kompetiert mit ARF1 und ARF6 um die Interaktion mit Cytohesin-1**

A) Ig-Fusionsproteine wurden in COS-7m Zellen transient exprimiert und nach Lyse der Zellen an Protein A Sepharose immobilisiert. Die Interaktion von Cytohesin-1 erfolgte unter *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch Bedingungen. Dazu wurden die immobilisierten ARF.Ig Proteine mit jeweils 1 μg (= 0,02 nM) 6xHis Cytohesin-1 in Gegenwart (+) von 100 nM des Peptides CD18cyt(747-769) bzw. CD18cyt(723-739) bzw ohne Zugabe von Peptid (-) inkubiert.

B) Der *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch wurde mit an Protein A Sepharose immobilisierten ARF1.Ig und ARF6.Ig durchgeführt. Durch 6xHis Cytohesin-1 kann die GDP/GTP Austauschrate der G-Proteine gesteigert werden. Durch steigende Konzentrationen wird von CD18cyt(723-739) der Austausch fast vollständig gehemmt.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion von CD18 ausschließlich mit Cytohesin-1 und nicht mit ARF erfolgt, wurden die immobilisierten ARF.Ig Proteine in einem weiteren Experiment zuerst mit dem Peptid CD18cyt(747-769) bzw. CD18cyt(723-738) 15 min vorinkubiert. Damit sollten potentielle Bindungsstellen der ARF Proteine zu CD18cyt(723-738) vor Zugabe des Cytohesin-1 abgesättigt werden. Es zeigte sich, dass CD18cyt(723-738) die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF inhibieren kann. In einem Parallelansatz dazu konnte nach Absättigen der ARFs mit Cytohesin-1 durch CD18cyt(723-738) die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF reduziert werden (Abbildung 4.6.14 A). Damit konnte bestätigt werden, dass CD18 direkt mit Cytohesin-1 interagiert, da eine stabile Bindung von CD18cyt(723-738) eine Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF6 inhibieren würde.

Aus vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass Cytohesin-1 *in vitro* sowohl mit der GDP- als auch mit der GTP-gebundenen Form interagieren kann. Diese *in vitro* Daten sind aber nicht auf physiologische Zustände in der Zelle übertragbar, da es *in vivo* nach erfolgtem Guaninnukleotid-Austausch zur Freisetzung der Proteine aus dem intermediären ARF7GEF-Komplex kommt. Es ist daher vorstellbar, dass die ARF/Cytohesin-1-Interaktion nach Aktivierung von ARF6 durch die Wechselwirkung von Cytohesin-1 mit der CD18-Kette des LFA-Rezeptors aufgehoben wird. Dazu muss gefordert werden, dass die Interaktion von ARF_{GTP} mit Cytohesin-1 stärker durch CD18 inhibiert werden kann als die ARF_{GDP}/Cytohesin-1-Interaktion.

Da sowohl ARF6 als auch CD18 in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurde die Kompetition der Wechselwirkung von Cytohesin-1 mit ARF6 durch das CD18-Peptid CD18cyt(723-739) untersucht. Die Mutanten ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) wurden dazu als Fusionsproteine in COS-7m Zellen transient exprimiert und an Protein A Sepharose immunpräzipitiert. Dabei kommt es *in vitro* durch Inkubation mit Cytohesin-1 im molaren Überschuss zur Bindung an ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L). Die Interaktion von Cytohesin-1 mit GDP-gebundenen ARF6 (T27N) als auch die Interaktion von GTP-gebundenem ARF6 (Q67L) kompetitiert gleichermaßen mit der Bindung von CD18cyt(723-738) an Cytohesin-1 (Abbildung 4.6.14 B). Es zeigte sich, dass die Affinität von Cytohesin-1 unter *in vitro* Bedingungen zu ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) kaum Unterschiede aufweist. Diese Daten zeigten, dass die Regulation der Interaktion von ARF/Cytohesin-1 und Cytohesin-1/CD18 kein intrinsisches Merkmal dieser Proteine darstellt.

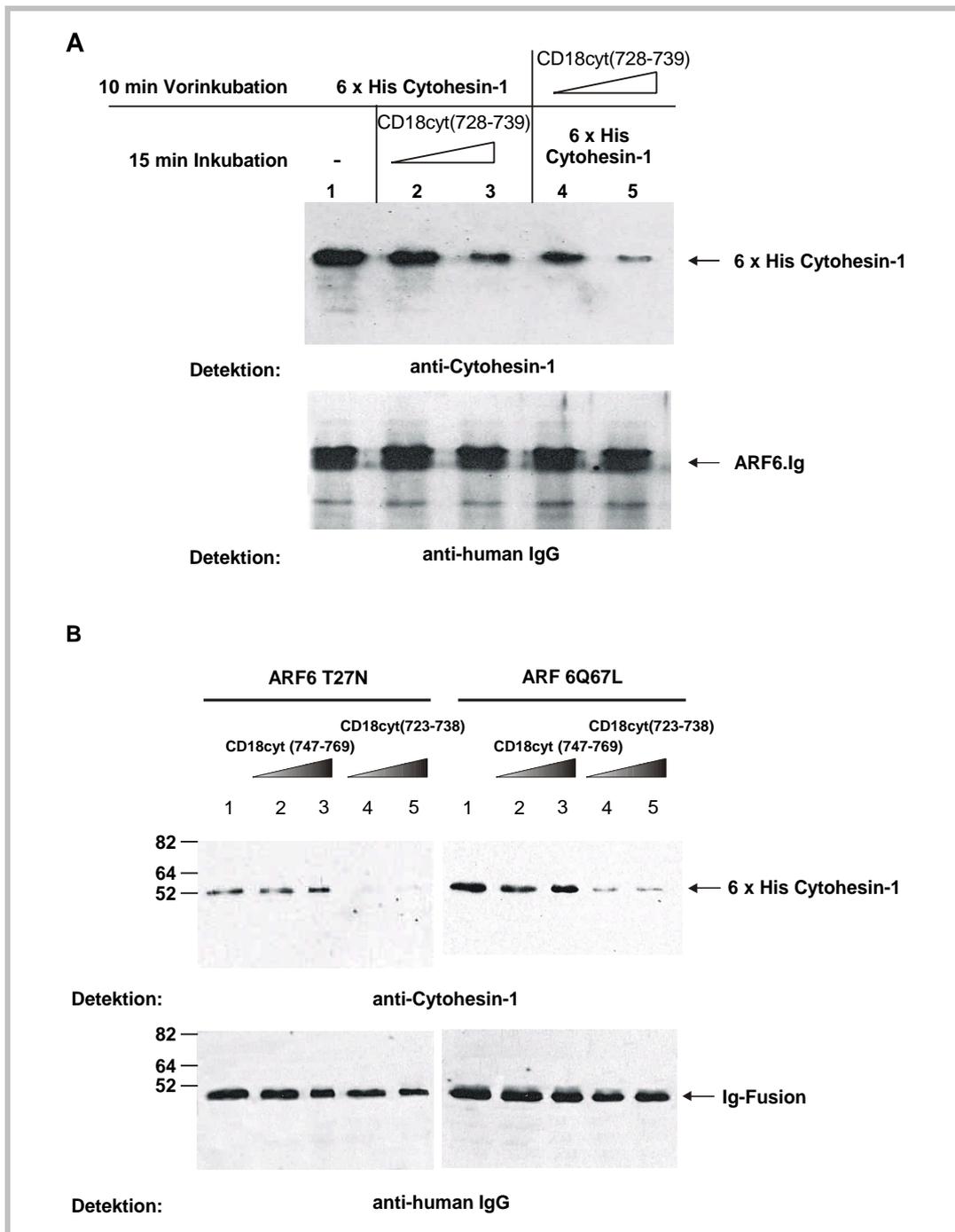


Abbildung 4.6.14: **Die Konkurrenz der Interaktion von ARF6 mit Cytohesin-1 erfolgt über spezifische Wechselwirkung des CD18-Peptides CD18cyt(723-738) mit Cytohesin-1.**

Ig-Fusionsproteine wurden in COS-7m Zellen transient exprimiert und nach Lyse der Zellen an Protein A Sepharose immobilisiert. Der Nachweis der immobilisierten Ig-Fusionskonstrukte erfolgte jeweils im Western Blot mit anti-human IgG Antikörper.

- A) Die Interaktion von Cytohesin-1 erfolgte unter *in vitro* Guaninnukleotid-Austausch Bedingungen. Dazu wurden die immobilisierten ARF6.Ig Proteine mit $1\mu\text{g}$ (= $0,02\text{nM}$) 6xHis Cytohesin-1 vorinkubiert (Spur 1-3) und für weitere 10 min mit $1\mu\text{M}$ (Spur 2) bzw $2\mu\text{M}$ (Spur 3) CD18cyt(747-769)- Peptid versetzt. Bei den Spuren 4 und 5 erfolgte erst die Inkubation $1\mu\text{M}$ bzw $2\mu\text{M}$ Peptid CD18cyt(747-769) und danach die Zugabe von 6xHis Cytohesin-1.
- B) Die Bindung von Cytohesin-1 an ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) wird durch steigende Konzentrationen von CD18cyt(723-739) inhibiert. Das Peptid CD18cyt(747-769) hat dagegen keinen Einfluss auf die Wechselwirkung von Cytohesin-1 mit ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) .

4.6.7 Dominant negative und positive Mutanten von ARF1 und ARF6 beeinflussen Zelladhäsion und Cytoskelett nicht

Kolanus *et. al.* (1996) konnten zeigen, dass die Überexpression von Wildtyp Cytohesin-1 die LFA-1 vermittelte Adhäsion von Lymphocyten induzieren kann, während die Mutante mit einer defizienten Sec7-Domäne keine Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 bewirkt. Somit wurde vermutet, dass die Guaninnukleotid-Austauschaktivität von Cytohesin-1 Einfluss auf die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion besitzt. Daher wurde postuliert, dass die Zelladhäsion durch konstitutiv aktives bzw. dominant negatives ARF1 und ARF6 modifiziert werden kann. Die ARF-Konstrukte wurden in Jurkat LT Zellen mittels Vaccinia Viren transient exprimiert und die Zelladhäsion nach PMA Stimulierung bestimmt. Dabei konnte weder durch ARF1 noch durch ARF6 in der GDP-Form als auch in der GTP-Form eine Zelladhäsion induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Durch die Zelladhäsion kommt es zur Ausbreitung der Zellen um den Faktor 2 auf immobilisiertem ICAM-1 (Nagel *et. al.*, 1998). Dieser als „Spreading“ bezeichnete Vorgang geht mit einer Umorganisation des Actin-Cytoskeletts einher. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob die transiente Expression von ARF1 bzw. ARF6 die Organisation des Cytoskeletts modifiziert. Um Reorganisation des Cytoskeletts nach Vaccinia Viren Infektion auszuschließen, wurden die rekombinanten ARF.Ig Konstrukte in LT Zellen durch Elektroporation transfiziert und die Organisation des Actin-Gerüsts im konfokalen Lasermikroskop durch Anfärbung des Actins mit Phalloidin untersucht (Abbildung 4.6.15). Die transiente Expression der ARF-Konstrukte in den T-Zellen Jurkat LT zeigte ein mit in HeLa übereinstimmendes Expressionsmuster (vgl. Abbildung 4.6.3). ARF1 lokalisiert vorwiegend im Golgi-Apparat, ARF6 dagegen in der Plasmamembran und in intrazellulären endosomalen Kompartimenten. Jedoch konnte durch die transiente Expression von konstitutivem ARF_{GDP} (ARF1 (T31N), ARF6 (T27N)) als auch ARF_{GTP} (ARF1 (Q71L), ARF6 (Q67L)) keine morphologische Veränderung des Actin-Cytoskeletts induziert werden (Abbildung 4.6.15, jeweils untere Reihe). Die gleichzeitige Anfärbung des Actin-Cytoskeletts lässt deutlich erkennen, dass ARF1 sowie die Mutanten ARF1 (T31N) und ARF1 (Q71L) nicht mit dem Actin-Gerüst kolokalisieren. Dagegen zeigt ARF6.Ig sowie ARF6 (Q67L).Ig mit dem Actin-Cytoskelett sowie in intrazellulären distinkten Kompartimenten eine deutliche Kolokalisierung. ARF6 (T27N).Ig dagegen lokalisiert innerhalb der Zelle in von Actin distinkten subzellulären Kompartimenten.

ARF6 war als Organisator des Actin-Cytoskeletts und der Endocytose beschrieben worden (D´Souza Schorey *et. al.*, 1998). Unsere Daten deuten jedoch darauf hin, dass die Reorganisation des Actin-Cytoskeletts durch ARF6 nicht induziert werden und keine direkte Rolle bei der durch Cytohesin-1 induzierten Zelladhäsion spielt. Die Aktivierung der ARFs, ARF1 und ARF6, stellt somit kein primäres Ereignis der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion dar. Möglicherweise wird die Reorganisation des Actin-Skeletts durch die konstitutiven ARF_{GDP} als auch ARF_{GTP} durch zelluläre Mechanismen wie Zusammenlagerung der Integrine umgangen.

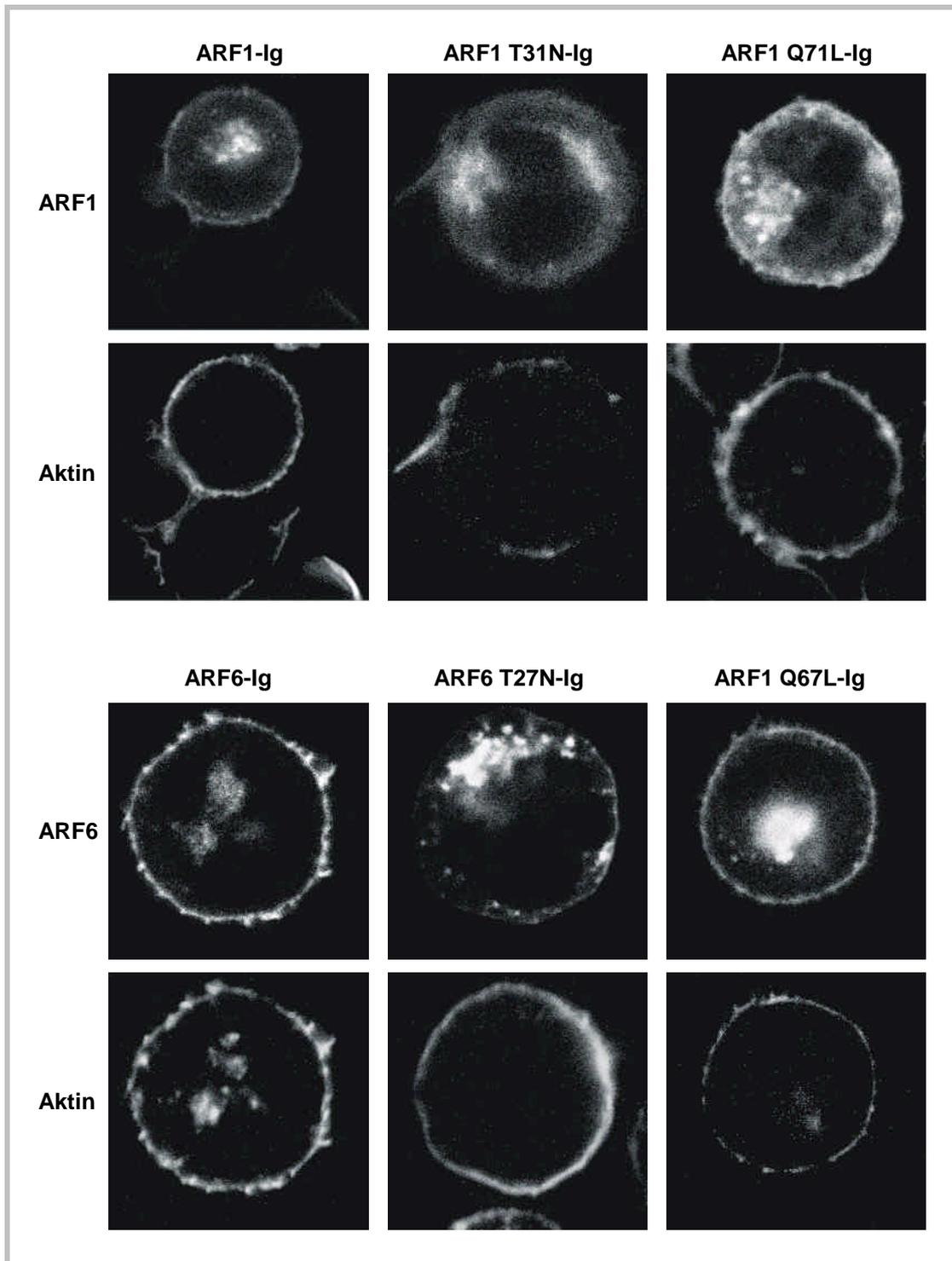


Abbildung 4.6.15: **Organisation des Actin-Cytoskeletts in LT-Zellen nach transienter Expression rekombinanter ARF Konstrukte**

Die ARF-Konstrukte wurden durch Elektroporation in Jurkat LT Zellen transfiziert und die intrazellulären Ig-Fusionsproteine nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit FITC-gekoppelten Antikörper gegen humanIgG1 gerichtet (jeweils 1. Reihe). Die Detektion des F-Actin erfolgte mit TRITC markiertem Phalloidin (jeweils 2 Reihe).

4.7 ARF6 besitzt Signalfunktion in aktivierten T-Zellen

Die Interaktion von LFA-1 mit seinen Liganden, den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM)-1,-2 und -3, spielt eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Lub *et. al.*, 1995). LFA-1 erhöht zusammen mit CD18 die Sensitivität des TCR/CD3-Komplexes zu dem MHC/Peptid-Komplex (Bachmann *et. al.*, 1997). Salomon und Bluestone (1998) konnten anhand TCR-transgener T-Zellen zeigen, dass die LFA-1/ICAM-1-Interaktion die Cytokin-Produktion in T_H2 -Zellen supprimiert. Daher sollte untersucht werden, ob ARF6 eine mögliche Signalrolle in der frühen Phase der T-Zell Aktivierung besitzt. Die Aktivierung des IL-2-Promotors nach T-Zell-Stimulierung kann sehr leicht durch die Verwendung von sogenannten Reporterkonstrukten untersucht werden. Dazu wurde das Plasmid pIL2-GL2 verwendet, in das über die *MluI* und *HindIII*-Schnittstellen die Nukleinsäuren -577 bis +53 des menschlichen IL-2 Promotors in den pGL2-Basic (Promega) vor das Luziferase-Gen kloniert sind. Dieser rekombinante Vektor, IL-2 luc im folgenden genannt, wurde in die Zellen kotransfiziert. Durch die Stimulierung des exogenen IL-2 Promotors kommt es zur Expression des nachgeschalteten Luziferase-Gens. Als Maß der Stimulierung wird die Aktivität der Luziferase in diesen Zellen bestimmt.

4.7.1 GTP-gebundenes ARF6 aktiviert den IL-2 Promotor in T-Zellen

Dazu wurden die Zellen 15 – 16 Stunden nach Elektroporation von 10 μ g der rekombinanten ARF Konstrukte ARF1.Ig, ARF1 (T31N).Ig, ARF1 (Q71L).Ig, ARF6.Ig, ARF6 (T27N).Ig und ARF6 (Q67L).Ig mit PMA oder PMA/Ionophor stimuliert. PMA induziert die Aktivierung der Ser/Thr spezifischen Proteinkinase C (PKC) durch Bindung an die C1 Domäne. Mit der Aktivierung ist eine Translokation zur Zellmembran verbunden, an der auch Rezeptoren der aktivierten Proteinkinase C, die RACK-Proteine (Rezeptoren für aktiviert e Protein Kinase C) beteiligt sind. Substrate der PKC sind die MARCKS-Proteine sowie andere mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine. Weitere Substrate sind die Inhibitoren I κ B des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die RAF-Kinase und unspezifische Proteine (Azzi *et. al.*, 1992). Mit der Kombination aus PMA und Ionophor kommt es zur maximalen Stimulierung der Zellen durch den Einstrom von Ca²⁺ aus dem extrazellulären Medium durch Ionophor als Ionenkanal. Die Stimulierung des IL-2 Promotors nach PMA/Ionophore Stimulation wird als maximaler oder 100% Wert der Luziferase Induktion betrachtet. Wie in Abbildung 4.7.1 A gezeigt, induziert ARF6 in der konstitutiv GTP-gebundenen Form ARF6 (Q67L) die Aktivierung des IL-2 Promotors bei gleichzeitiger Stimulierung der Zellen mit PMA. Dabei kommt es zu einer ca. 10-fachen Stimulierung des IL-2 Promotors verglichen mit der GDP-gebundenen Form ARF6 (T27N). ARF6 in der Wildtyp-Form dagegen stimuliert den IL-2 Promotor um den Faktor 3 gegenüber dem zellulären Hintergrund, dargestellt durch die transiente Expression des Immunglobulin-Anteils (Ig-Kontrolle). Eine Stimulierung des IL-2 Promotors dagegen erfolgt nicht durch die transiente Expression von ARF1 sowie der dominant negativen Mutante ARF1 (T31N) und der konstitutiv aktiven Mutante ARF1 (Q71L). Durch die gleichzeitige Stimulierung des TCR durch Quervernetzung der CD3 Moleküle mit dem CD3 spezifischen Antikörper OKT3 kommt es zur 3-fachen Steigerung der IL-2 Promotoraktivität bei der konstitutiv aktiven Mutante ARF6 (Q67L) gegenüber dem zellulären Hintergrund (Ig-Kontrolle). ARF1 sowie die untersuchten Mutanten von ARF1 stimulieren weder den IL-2 Promotor noch haben sie einen negativen Einfluss auf die IL-2 Promotoraktivität. Auch die dominant negative Mutante ARF6 (T27N) zeigt keine Reduzierung der IL-2 Promotoraktivität. Die beobachtete Erhöhung der Luziferaseexpression lässt sich spezifisch auf die

Expression der GTP-Form von ARF6 zurückführen, da der Ig-Fusionsanteil (Abbildung 4.7.1A: Ig-Kontrolle) keinen Einfluss auf die IL-2 Promotoraktivität nimmt. Transfektionsunterschiede und dadurch verursachte Expressionsunterschiede, die Artefakte bei der IL-2 Promotoraktivierung bewirken können, wurden durch Westernblot der transfizierten Zellen mit anti-humanIgG1-Antikörper ausgeschlossen (Abbildung 4.7.1 B).

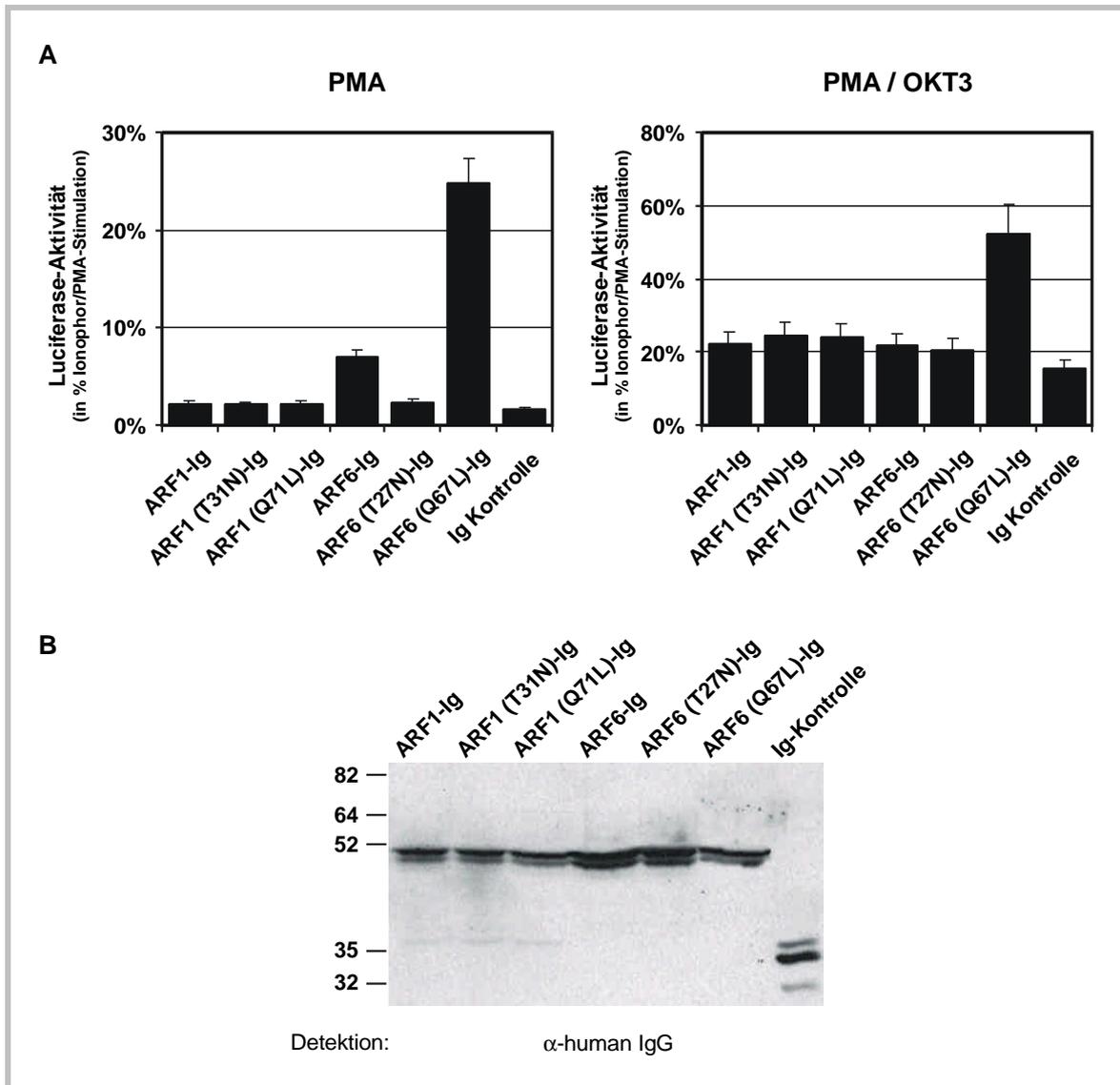


Abbildung 4.7.1: **ARF6 induziert in der GTP-gebundenen Form die Aktivierung des IL-2-Promotors in T-Zellen**

- A) Jurkat LT Zellen wurden transient mit 10 μ g ARF.Ig Konstrukten und 10 μ g IL-2 luc transfiziert. Nach 12 – 16 h erfolgte die Stimulierung der Zellen mit 1,2 μ g/ μ l PMA bzw. 1,2 μ g/ μ l PMA und 3,0 μ g/ μ l OKT3. Zum Ermitteln des 100%-Wertes der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen mit 1,2 μ g/ μ l PMA und 1,2 μ g/ μ l Ionophor maximal stimuliert. Nach 7 h wurden die Zellen in 35 μ l 1xLyse-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 95 μ l IL-2 Reagenz die Luciferase-Aktivität im TopCounter (Packard) gemessen. Die Promotorinduktion nach PMA bzw. PMA/OKT3 Stimulation wurde als prozentualer Wert im Verhältnis zur maximalen T-Zell Stimulation durch PMA/Ionophor angegeben.
- B) Transient exprimierte ARF.Ig Konstrukte sowie die Ig-Kontrolle werden in gleicher Dichte in Jurkat LT Zellen exprimiert. Die Detektion erfolgte im Western Blot mit anti-human IgG Antikörper.

In wieweit die Induzierung des IL-2 Promotors von der exprimierten ARF6 (Q67L) Menge abhängt wurde durch Titration der verwendeten rekombinanten Konstrukte untersucht. Dazu wurden für die Elektroporation 2 bis 15µg rekombinante Plasmid-DNA verwendet. Es zeigte sich, dass steigende Konzentrationen an ARF6 (Q67L), aber auch an Wildtyp-ARF6 zu einer jeweils stärkeren Steigerung der IL-2 Promotoraktivität bei PMA-Stimulation führen (Abbildung 4.7.2). Die der Mutante ARF6 (Q67L) entsprechende Mutante ARF1 (Q71L) sowie die dominant negative Mutante ARF6 (T27N) dagegen induzieren in keiner Konzentration die Stimulierung des IL-2 Promotors. Eine gleichzeitige Stimulierung des TCR durch PMA/OKT3 zeigt auch hier die Konzentrationsabhängigkeit des zellulären Signals ausgehend von ARF6 in der GTP-Form. Die IL-2 Promotoraktivität wird durch konstitutiv aktives ARF6 um den Faktor 3 gesteigert. Verglichen mit Zellen, in denen kein kostimulatorisches Signal des TCR vorliegt, kommt es zu einer Steigerung der IL-2 Promotoraktivität um den Faktor 2. Die Spezifität des von ARF6 ausgehenden Signals zeigt sich an der Konzentrationsabhängigkeit von ARF6 (Q67L).

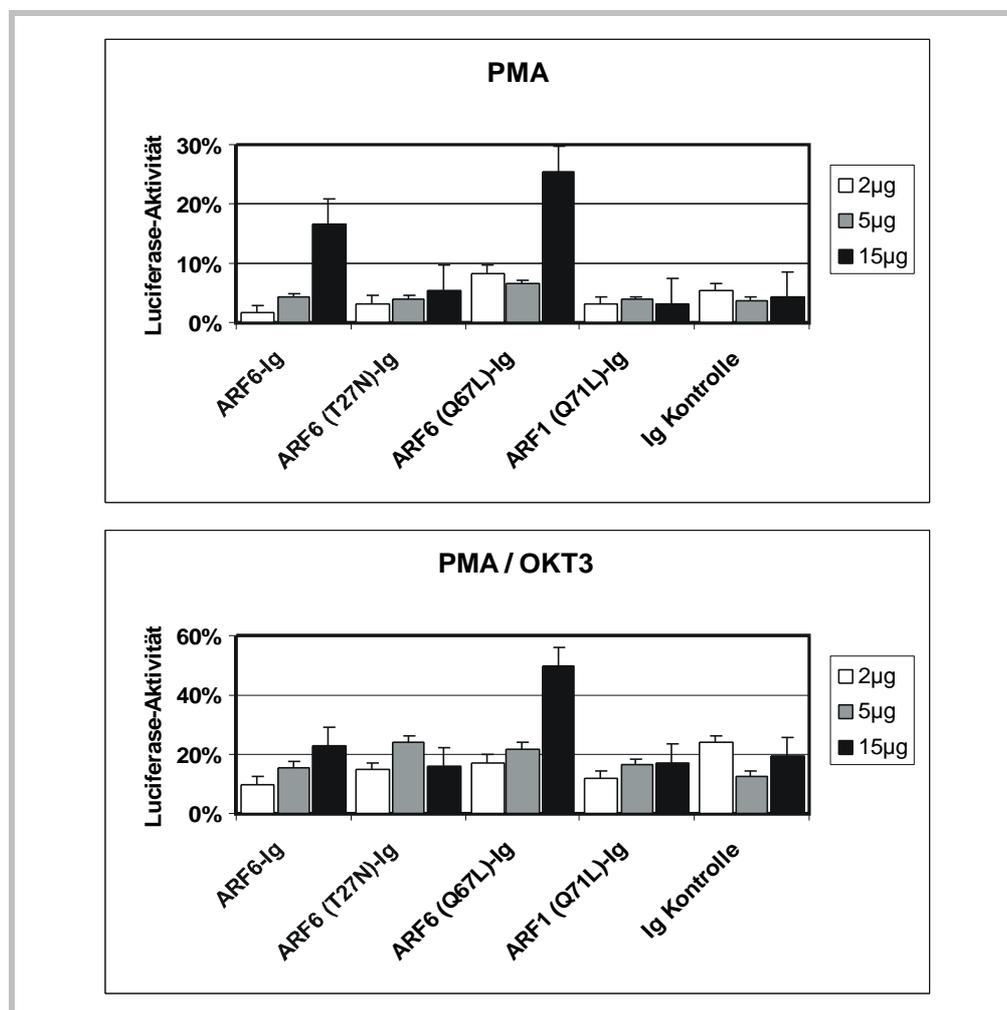


Abbildung 4.7.2: **Die IL-2 Promotoraktivität nimmt mit steigender Konzentration von GTP-gebundenem ARF6 zu.**

Jurkat LT Zellen wurden transient mit ARF.Ig Konstrukten in steigender Konzentration (2µg, 5µg und 15µg) transfiziert. Nach 12–16 h erfolgte die Stimulierung der Zellen mit 1,2µg/µl PMA bzw. 1,2µg/µl PMA und 3,0µg/µl OKT3. Zum Ermitteln des 100%-Wertes der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen mit 1,2µg/µl PMA und 1,2µg/µl Ionophor maximal stimuliert. Nach 7 h wurden die Zellen in 35µl 1xLyse-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 95µl IL-2 Reagenz die Luziferase-Aktivität im TopCounter gemessen. Die Promotorinduktion nach PMA bzw. PMA/OKT3 Stimulation wurde als prozentualer Wert im Verhältnis zur maximalen T-Zell Stimulation durch PMA/Ionophor angegeben.

Diese Untersuchungen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Aktivierung von ARF6 aber nicht von ARF1 in Leukocyten zu einer Transduktion von zellulären Signalen führt, welche die Expression von wichtigen Leukocyten-vermittelten Immun- und inflammatorischen Antworten steigert. Das Signal von aktiviertem ARF6 hat additiven Einfluss auf die Signalwege des stimulierten TCR.

4.7.2 Die Internalisierung des T-Zell Rezeptors wird nicht durch ARF6 reguliert.

Die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem Peptid/MHC-Komplex oder die Quervernetzung des TCR-Komplexes mit anti-TCR- oder anti-CD3-Antikörpern führt zu einer schnellen Verringerung der Konzentration des TCR-Komplexes an der Zelloberfläche durch Endocytose. Die Regulation der an der Oberfläche präsentierten Rezeptoren stellt ein allgemeines Phänomen membranständiger Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinase Aktivität (Seaman *et al.*, 1996) dar. Es gibt Hinweise, dass die Internalisierung von signalinduzierenden Rezeptoren zu einem zweifachen Effekt führt. Erstens kann es zur Signalweitergabe durch Begünstigen der Interaktion zwischen Rezeptor und intrazellulären Signalmolekülen kommen (Rothenberg, 1996; Luton *et al.*, 1997). Und zweitens kann die zelluläre Antwort durch Reduzierung der Rezeptoren an der Oberfläche oder durch Entkoppeln der Rezeptoren von membranverankerten Signalmolekülen terminiert werden (Cai und Wright., 1996). Letztgenannter Effekt wird durch Beobachtungen gestützt, dass TCR-Internalisierung zu zellulärem Sensitivitätsverlust auf nachfolgende Stimulierung führt (Valitutti *et al.*, 1995). Weiterhin kommt es durch die Inhibierung der TCR-Internalisierung durch Überexpression der dominant-negativen Mutante Rab5 zu gesteigerter Signalaktivität (Andre *et al.*, 1997). Die TCR-Internalisierung spielt bei der T-Zell Aktivierung eine wichtige Rolle, da hierdurch multiple TCR-Komplexe durch einige wenige Antigen/MHC-Komplexe ausgelöst werden.

Durch eine Inhibierung der Internalisierung des TCR nach Quervernetzung mit dem CD3 spezifischen Antikörper kann es daher zu einer gesteigerten signalgebenden Aktivität des TCR kommen. Untersuchungen haben gezeigt, dass ARF6 am Transport des Transferrin-Rezeptors von der Zelloberfläche in Cytoplasma und umgekehrt beteiligt ist. Daher ist vorstellbar, dass durch Überexpression der ARF6-Mutanten der Vesikeltransport gestört wird, so dass es zur Inhibition quervernetzter TCR an der Zelloberfläche kommt oder internalisierte TCR nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert werden können. Es war vermutet worden, dass auch der vesikelgebundene internalisierte Rezeptor ein Signal darstellt. Folglich wurde die Internalisierung des TCR nach Quervernetzung mit OKT3, einem CD3-spezifischen Antikörper, untersucht. Dazu wurde nach Überexpression von ARF1, ARF6, ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) in Jurkat LT Zellen der TCR durch Inkubation mit OKT3 quervernetzt und stimuliert. Um die Internalisierung des TCR biochemisch bestimmen zu können, wurde der primäre Antikörper OKT3 mit Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper auf der Zelloberfläche detektiert. Nach der Internalisierung wurden die Zellen mit β -Mercaptoethanol zum Reduzieren des an der Zelloberfläche verbleibenden Biotin-gekoppelten Antikörpers, indirekt an CD3 gekoppelt, behandelt. Der Nachweis des internalisierten und dadurch der Reduktion durch β -Mercaptoethanol nicht zugänglichen Biotins erfolgte nach Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE durch Detektion mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Streptavidin. Streptavidin erkennt reduziertes Biotin an der Zelloberfläche nicht mehr.

An der Zelloberfläche lokalisierte CD3 Moleküle werden durch den OKT3-Antikörper bei Inkubation auf Eis gebunden und vom sekundären Biotin-markierten Antikörper erkannt (Abbildung 4.7.4, jeweils

Ansatz 1). Durch Behandeln der Zellen mit β -Mercaptoethanol wird der, an die Zelloberfläche gebundene, biotinylierte Antikörper fast vollständig reduziert (Abbildung 4.7.4, jeweils Spur 2). Bei 37°C beginnt unverzüglich die Internalisierung des quervernetzten TCR. Dabei zeigte sich, dass CD3 Moleküle fast vollständig nach Quervernetzung internalisiert werden, da die Menge an detektierbarem OKT3 vor und nach der Reduktion gleich sind (Abbildung 4.7.4, jeweils Spur 3 und 4). Die Internalisierung wird dabei weder durch ARF1 noch durch ARF6, als auch durch die dominant-negative Mutante ARF6 (T27N) und die konstitutiv aktive Mutante ARF6 (Q67L), vermindert oder verlangsamt. Diese Daten werden durch konfokale Analysen der Lokalisation von quervernetzten OKT3 unterstützt. Dazu wurden in Jurkat LT transient C-terminal fusionierte ARF-Proteine exprimiert und die Lokalisation von CD3, nach Quervernetzung mit OKT3, durch einen gegen OKT3 gerichteten TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper im konfokalen Lasermikroskop (Abbildung 4.7.4) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass CD3 in GFP exprimierenden Zellen in distinkten cytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert. Durch Expression von ARF1 und ARF6 sowie den Mutanten ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) kommt es ebenso zur Internalisierung durch Membranabschnürung und Vesikelbildung. Aus den biochemischen und konfokalen Lasermikroskop Untersuchungen kann daher gefolgert werden, dass ARF6 nicht an der Bildung von Vesikeln, die bei Internalisierung des TCR-Komplexes initiiert werden, beteiligt ist.

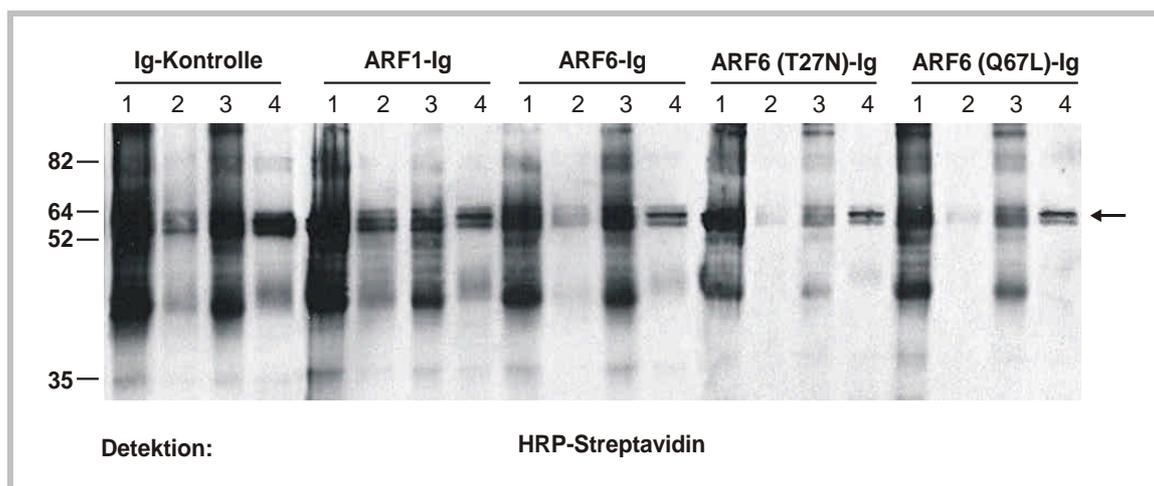


Abbildung 4.7.3: **Internalisierung des T-Zell Rezeptors wird nach Stimulierung mit CD3-spezifischen Antikörper OKT3 nicht durch ARF6 reguliert.**

Nach transienter Expression von ARF.Ig Konstrukten in Jurkat LT Zellen wurde der T-Zell-Rezeptor Komplex mit dem CD3-spezifischen Antikörper auf Eis quervernetzt. Gebundener OKT3-Antikörper wurde mit Biotin-markierten anti-Maus-Antikörper detektiert. Zur Induktion der Internalisierung des quervernetzten TCR-Komplexes wurden die Zellen 15 min auf Eis (Ansatz 1 und 2) bzw. bei 37°C (Ansatz 3 und 4) inkubiert. Durch 3-maliges Waschen der Zellen mit 50 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS, 0,2% BSA, pH 8,6 wurde in den Ansätzen 2 und 4 an der Zelloberfläche verbleibendes Biotin reduziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine durch nicht reduzierende SDS-PAGE getrennt. Zum Bestimmen des nicht reduzierten Biotin-gekoppelten Antikörpers (Pfeil) erfolgte der Western-Blot mit Meerettich-Peroxidase gekoppelten Streptavidin.

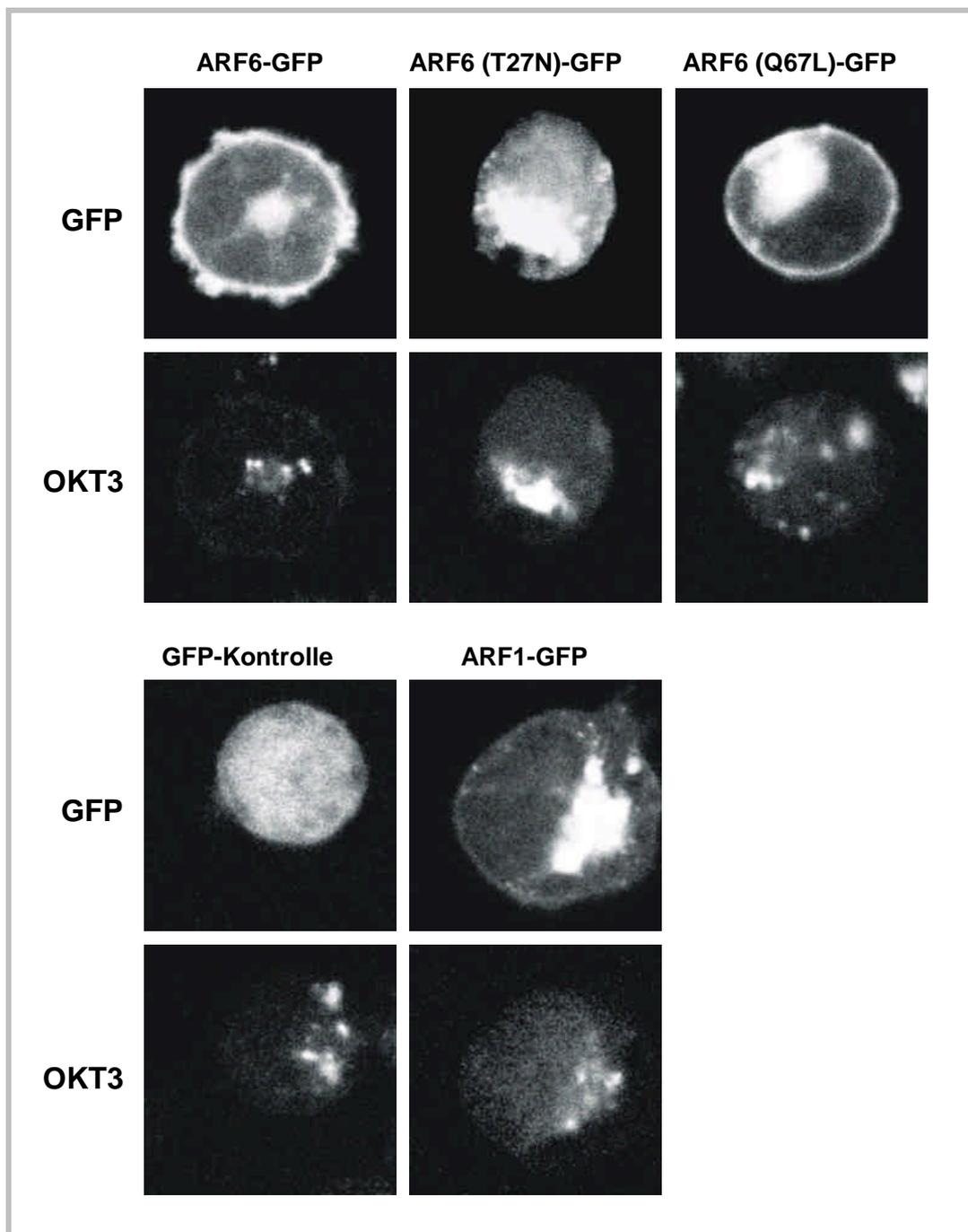


Abbildung 4.7.4: **Konfokale Analyse von internalisiertem CD3 nach Quervernetzung mit CD3-spezifischen Antikörper OKT3.**

In Jurkat LT-Zellen wurden ARF-GFP Konstrukte transient überexprimiert. Die Zellen wurden mit OKT3 15 min bei 37°C stimuliert, mit Formaldehyd fixiert, permeabilisiert mit 0,02% Triton-X100 und mit FITC-gekoppelten anti-humanIgG-Antikörper gefärbt.

4.7.3 ARF6 ist nicht direkt in die Signalwege der Rho GTPasen involviert

GTPasen der Rho-Familie (Rac, Rho und CDC42) wirken als intrazelluläre Schalter, indem sie zwischen der aktiven GTP-gebundenen Form und der inaktiven GDP-gebundenen Form wechseln. Sie kontrollieren einen weiten Bereich zellulärer Prozesse. Rho GTPasen sind dabei sowohl in das Netzwerk des Integrin- und TCR-Signalwegs integriert. Biochemische und genetische Studien haben zur Identifikation dreier Klassen von regulatorischen Proteinen geführt, die den Nukleotid-Status der Rho Familien GTPasen kontrollieren (Boguski und McCormick, 1993). Die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP, ausgelöst durch extrazelluläre Signale (Lenzen *et al.*, 1998). GTPase aktivierende Proteine (GAPs) verstärken die intrinsische GTP hydrolysierende Aktivität und bewirken dadurch die schnelle Konversion zur inaktiven GDP-gebundenen Form. Schließlich verhindern die GDI die spontane und durch GEF katalysierte Dissoziation der Nukleotide und halten die GTPasen in der inaktiven Form.

4.7.3.1 Die Interaktion von Vav und ARF6 in der IL-2 Aktivierung

Das 95 kDa Protein Vav wurde als hämatopoetischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für die Rho GTPase erkannt (Crespo *et al.*, 1996; Crespo *et al.*, 1997; Bustelo *et al.*, 1994; Bustelo, 2000). Es stellt somit ein wichtiges Enzym in der TCR Signalmaschinerie, die zur Aktivierung des IL-2 Gens führen, dar (Cantrell, 1998). Vav wird für die T-Zell Entwicklung und Antigen-Rezeptor vermittelte T-Zell Aktivierung benötigt (Fischer *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997). Vav stellt ein Substrat für Tyrosin-Kinasen nach Antigen-vermittelter Aktivierung des T-Zell Rezeptors dar. Zudem spielt es eine wichtige Rolle in der Zusammenlagerung der TCR nach Stimulation und der Reorganisation des Actin Cytoskeletts (Fischer *et al.*, 1998). Eine korrekte Vav Funktion ist außerdem notwendig für die Aktivierung der MAP Kinase ERK und der Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie für die intakte Ca²⁺-Mobilisierung (Fischer *et al.*, 1998). Durch die Überexpression von Vav in T-Zellen wird die Aktivierung transkriptionaler Elemente im IL-2 Gen, besonders des Transkriptionsfaktors NFAT, gesteigert (Deckert *et al.*, 1996).

Um zu untersuchen, ob ARF6 eine Signalkomponente der von Vav ausgehenden Signalwege ist, wurde ARF6 sowie dessen Mutanten ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) zusammen mit Wildtyp-Vav, einer konstitutiv aktiven Form von Vav, Vav (CA), und einer dominant negativen Form, Vav (DN), in Jurkat LT Zellen koexprimiert (alle Vav-Konstrukte freundlicherweise von Dr. Nagel als N-terminales Flag-Fusionsprotein zur Verfügung gestellt). Es wurde untersucht, wie sich die transiente Transfektion dieser Kombinationen von ARF6- und Vav-Mutanten auf die basale und anti-CD-3 stimulierte Aktivität eines IL-2 Reportergens auswirkt. Wie in Abbildung 4.7.5 gezeigt, kommt es durch die kombinierte Stimulation von Jurkat LT Zellen mit einer Kombination aus anti-CD3-Antikörper und dem Phorbolster PMA zu einer Stimulierung des IL-2 Promotors, während die alleinige PMA-Behandlung keine nennenswerte Stimulation des IL-2 Promotors bewirkt (Ig-Kontrolle, unteres bzw. oberes Diagramm). Die konstitutiv aktive Mutante Vav (CA), stimuliert signifikant die Promotoraktivität nach PMA-Kostimulation mindestens um den Faktor 5. Nach anti-CD3 Stimulation wird die IL-2 Promotoraktivität durch Vav (CA) um den Faktor 3 gesteigert. Die transiente Koexpression von ARF6 (Q67L) und Vav (CA) induziert eine stärkere IL-2 Aktivität nach PMA- bzw. PMA/anti-CD3-Stimulation als ARF6 (Q67L) oder Vav (CA) jeweils alleine. Jedoch kann durch die Koexpression von ARF6 (T27N) mit Vav (CA) die durch Vav (CA) induzierte IL-2 Promotoraktivität nicht inhibiert werden. Dies deutet darauf hin, dass ARF6 nicht in den Signalweg von Vav involviert

ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die IL-2 Promotoraktivität nach transienter Expression von ARF6 (Q67L) weder nach PMA- noch nach PMA/anti-CD3-Stimulation durch die dominant negative Mutante Vav (DN) inhibiert werden kann.

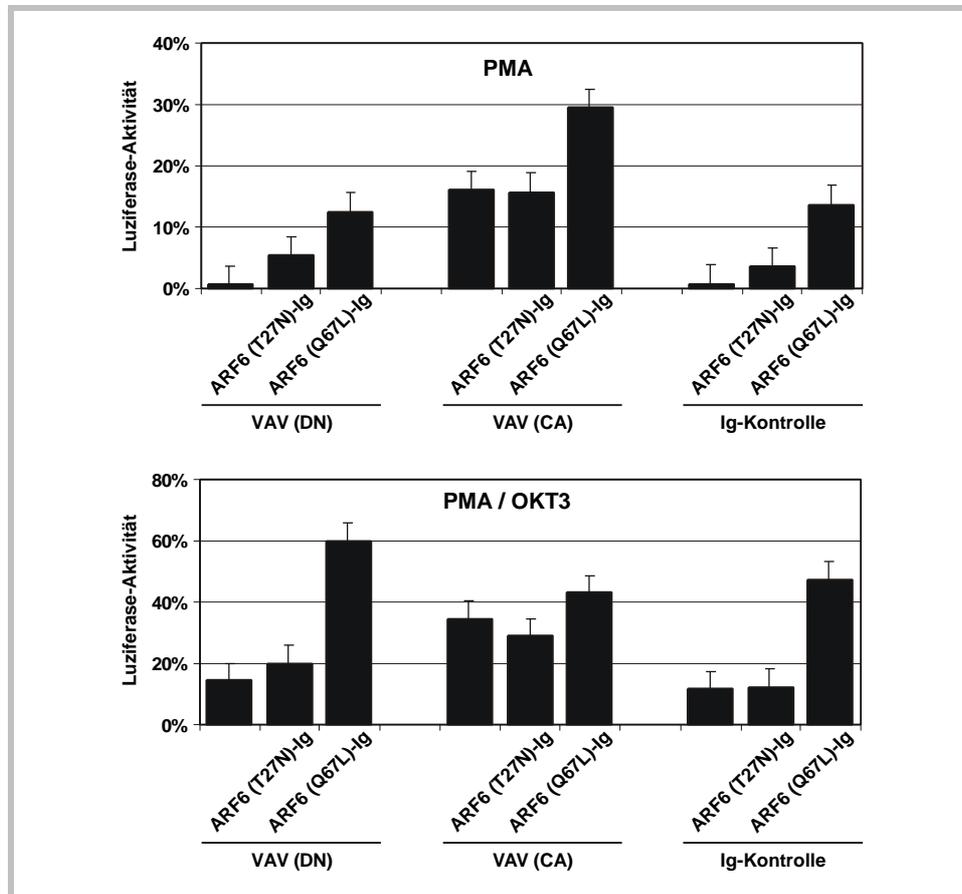


Abbildung 4.7.5: **Interaktion von Vav und ARF6 in der IL-2 Aktivierung**

Jurkat LT Zellen wurden transient mit ARF.Ig Konstrukten (10µg) transfiziert. Dabei wurden konstitutiv aktive Vav (CA)- als auch dominant negative Vav (CN)- Konstrukte kotransfiziert. Bei der Ig-Kontrolle erfolgte die Kotransfektion von dem Ig-Anteil (10µg). Nach 12–16 h erfolgte die Stimulation der Zellen mit 1,2µg/µl PMA bzw. 1,2µg/µl PMA und 3,0µg/µl OKT3. Zum Ermitteln des 100%-Wertes der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen mit 1,2µg/µl PMA und 1,2µg/µl Ionophor maximal stimuliert. Nach 7 h wurden die Zellen in 35µl 1xLyse-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 95µl IL-2 Reagenz die Luziferase-Aktivität im TopCounter gemessen.

4.7.3.2 Die Aktivierung der *c-Jun* NH₂-Kinase

Durch die Ligation der T-Zell Rezeptoren kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung von Vav. Phosphoryliertes Vav dient als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für die Rho-Familien GTPasen Rac-1, RhoA und Cdc42 (Crespo *et al.*, 1997). In der aktiven GTP-gebundenen Form schalten sie weitere stromabwärts gelegene Signaleffektoren an. Die GTPasen Rac-1 und Cdc42 stimulieren dabei unter anderem zwei Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), *c-Jun* NH₂-terminale Kinase (JNK) und p38 (Olson *et al.*, 1995). Als möglicher Weg wurde die Mitogen-aktivierte Proteinkinase/ERK Kinase Kinase (MEKK) und MEKK4 diskutiert, die beide an GTP-gebundenes Rac-1 und Cdc42 binden und so Signale von den GTPasen zu JNK ermöglichen. Daneben kann die JNK-Aktivität auch

über den Ras-Weg reguliert werden, so dass auf der Ebene der JNK-Proteine unterschiedliche Signale zusammenlaufen. JNK aktiviert durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor *c-Jun*, der dadurch zusammen mit *c-fos* in den Kern gelangt und die Transkription von Genen wie z.B. Interleukin-2 (IL-2), die im Promotor eine AP-1 Bindungsstelle besitzen, stimuliert.

Die Phosphorylierung und die dadurch verursachte Aktivierung von JNK stellt ein entscheidendes Ereignis in den Signalwegen der Rho-Familien GTPasen dar. Daher wurde untersucht, ob die GTPase ARF6 die Aktivierung der Rho GTPasen induziert und somit auch die Phosphorylierung der JNK. Die Phosphorylierung erfolgt dabei spezifisch durch eine Ser/Thr-Kinase. Nach transienter Expression der Mutanten ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) wurde der Phosphorylierungsstatus der endogen ubiquitär exprimierten *c-Jun* NH2-terminalen Kinasen 1 und 2 (JNK1 und JNK2) untersucht. Die Zellen wurden dazu 14 h nach der Transfektion in Phosphatase-Lysispuffer aufgeschlossen und die Proteine im Western Blot untersucht. Die Detektion der aktivierten JNK erfolgte durch den polyklonalen Antikörper Anti-ACTIVE™ JNK pAb (Promega, USA), der spezifisch nur Ser/Thr phosphorylierte (pTPpY) JNK erkennt. Wie Abbildung 4.7.6 zeigt kommt es bei unspezifischer Stimulierung der Zellen durch Sorbitol zur Aktivierung sowohl von JNK1 und JNK2. Jedoch kann durch den Antikörper Anti-ACTIVE™ JNK pAb kein phosphoryliertes Protein nach Überexpression von ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) nachgewiesen werden. Daher muss angenommen werden, dass die IL-2 Stimulierung von ARF6 nicht über die JNK erfolgt.

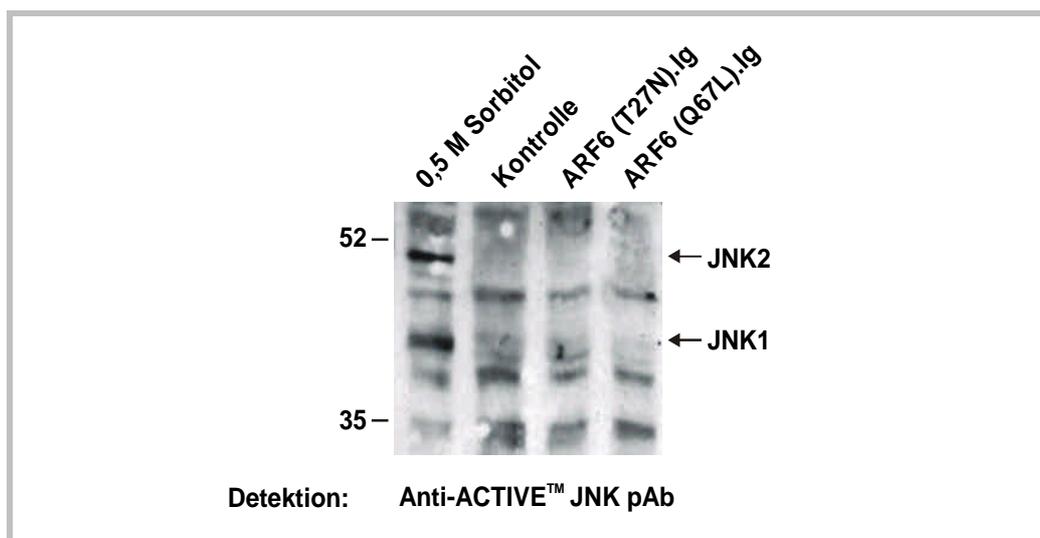


Abbildung 4.7.6: **ARF1 und ARF6 induzieren keine Aktivierung von JNK1 und JNK2.**

Jurkat LT-Zellen wurden mit ARF6 (T27N).Ig oder ARF6 (Q67L).Ig transfiziert und nach 12 h mit 1 µg/ml PMA stimuliert. Die Überexpression dieser Konstrukte resultiert in keiner Phosphorylierung der JNK1 und JNK2. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Positivkontrolle zum Nachweis aktivierter und somit phosphorylierter JNK-Isoformen erfolgte durch Auslösen eines osmotischen Schocks durch Behandlung der Zellen mit 0,5M Sorbitol. Der Nachweis der Ser/Thr-phosphorylierten JNK-Proteine erfolgte durch Anti-ACTIVE™ JNK (Promega, USA).

4.7.3.3 ARF6 und Rho GTPasen

Es war gezeigt worden, dass konstitutiv aktives ARF6 keine Aktivierung der JNK in Jurkat LT-Zellen induziert. Somit ist ARF6 nicht an der Aktivierung der Rho GTPasen durch Vav involviert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der von ARF6 (Q67L) induzierte Signalweg mit der Aktivität der Rho GTPasen interferieren kann. Dazu wurden in Jurkat LT Zellen ARF Konstrukte zusammen mit dominant negativen Mutanten und konstitutiv aktiven Mutanten von RhoA, Rac-1 und Cdc42 überexprimiert, die freundlicherweise von Dr. Nagel zur Verfügung gestellt wurden. Die Aktivitätsbestimmung des IL-2 Promotors erfolgte über das IL-2 Luziferase Reporter Plasmid. Dabei zeigte sich, dass die konstitutiv aktiven GTPasen RhoA (CA) und Rac-1 (CA) (=RacV12) keine Erhöhung der IL-2 Promotoraktivität, weder nach PMA-Stimulation noch nach zusätzlicher TCR Aktivierung durch anti-CD3 Antikörper, bewirken (Abbildung 4.7.7A und Abbildung 4.7.8B). Jedoch kommt es durch die transiente Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 (CA) nach PMA Stimulation zu einer Steigerung der IL-2 Promotoraktivität um den Faktor 3-4 gegenüber der GDP-gebundenen Form Cdc42 (DN). Auch nach dem Stimulieren der T-Zellen durch Aktivierung des T-Zell Rezeptorkomplexes, wird die IL-2 Promotoraktivität durch Cdc42 (CA), im Gegensatz zur Mutante Cdc42 (DN), ca. 3-fach gesteigert (Abbildung 4.7.7A).

Die IL-2 Stimulation durch konstitutiv aktives ARF6 (Q67L) wird durch die GDP-Form der GTPasen RhoA, Rac-1 und Cdc42 nicht moduliert. ARF6 (Q67L) dagegen besitzt synergistischen Effekt auf die Stimulierung des IL-2 Promotors durch die konstitutiv aktive GTP-Form von Cdc42: Es sind im Gegensatz dazu keine kostimulatorischen Effekte durch die gleichzeitige Koexpression der konstitutiv aktiven Mutanten RhoA und Rac-1 mit ARF6 (Q67L) zu beobachten. Zudem vermag die dominant negative Mutante ARF6 (T27N) keinen reduzierenden Einfluss auf die IL-2 Promotoraktivität, induziert durch konstitutiv aktives Cdc42, zu nehmen.

Diese Daten zeigen, dass ARF6 kein Signal über die in der T-Zell Aktivierung regulatorisch tätigen GTPasen der Rho-Familie RhoA, Rac-1 und Cdc42 vermittelt. Auf Grund der unveränderten Stimulation des IL-2 Promotors durch ARF6 (Q67L) bei Koexpression der dominant negativen Mutanten der Rho GTPasen muss geschlossen werden, dass sie nicht in dem von ARF6 (Q67L) induzierten Signalweges stromabwärts liegen.

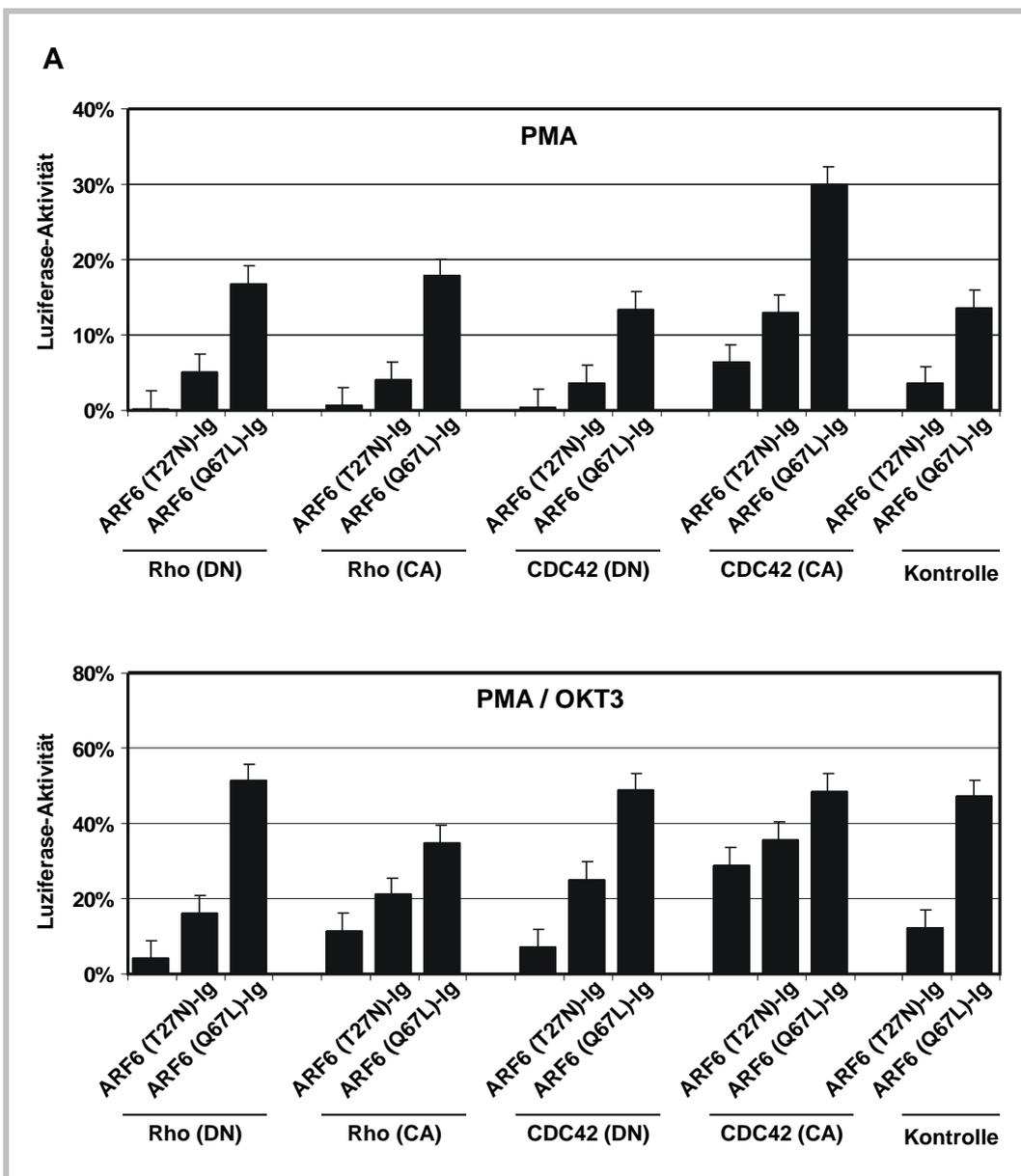


Abbildung 4.7.7: **Interaktion von ARF6 mit Rho-GTPase Signaltransduktionen (A, Fortsetzung folgende Seite)**

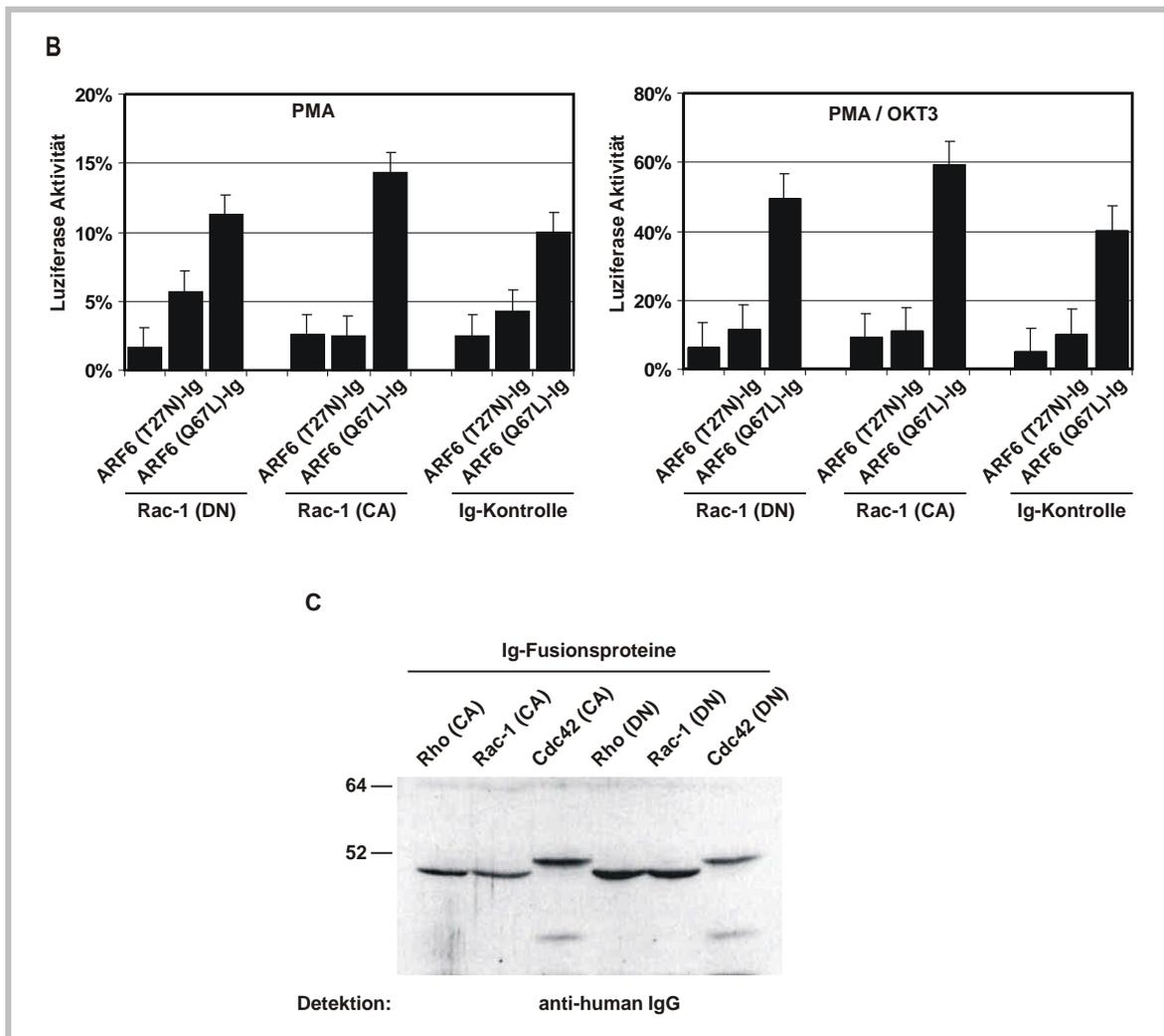


Abbildung 4.7.8: **Interaktion von ARF6 mit Rho-GTPase Signaltransduktionen (B,C) (Fortsetzung von Abbildung 4.7.7).**

A,B) Jurkat LT Zellen wurden transient mit ARF.Ig (10 μ g) und IL-2 luc (10 μ g) transfiziert. Gleichzeitig wurden in die Zellen dominant negative (DN) und konstitutiv aktive (CA)-Formen der GTPasen Rac-1, Cdc42 (Abbildung 4.7.7A) und RhoA (Abbildung 4.7.8B) (jeweils 10 μ g) kotransfiziert. Nach 12–16 h erfolgte die Stimulierung der Zellen mit 1,2 μ g/ μ l PMA bzw. 1,2 μ g/ μ l PMA und 3,0 μ g/ μ l OKT3. Zum Ermitteln des 100%-Wertes der Luziferase-Aktivität wurden die Zellen mit 1,2 μ g/ μ l PMA und 1,2 μ g/ μ l Ionophor maximal stimuliert. Nach 7 h wurden die Zellen in 35 μ l 1xLyse-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 95 μ l IL-2 Reagenz die Luziferase-Aktivität im TopCounter gemessen.

C) Expressionskontrolle der transfizierten Ig-Konstrukte von RhoA, Rac-1 und Cdc42 erfolgte im Western Blot nach Detektion mit anti-human IgG Antikörper.

4.8 T-Zell Aktivierung durch ZAP-70 erfolgt über den Phosphorylierungsstatus diverser Tyrosinreste

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit Lutz Zeitlmann ein weiterer Aspekt der T-Zell-Aktivierung behandelt. Die T-Zell Aktivierung ist ein komplexer Prozess, der durch die Stimulierung des T-Zell-spezifischen T-Zell-Rezeptor/CD3 Komplexes ausgelöst wird. Daran sind zahlreiche Enzyme, Adapter-Proteine und andere zelluläre Proteine beteiligt. Ausgehend vom aktivierten Transmembranrezeptor erfolgt die intrazelluläre Signalleitung überwiegend auf zwei Wege. Zum einen leitet die Aktivierung von Transmembranrezeptoren die Bildung von diffusiblen Botenstoffen ein, die an Effektorproteine binden. Zum anderen läuft eine Kaskade von hintereinandergeschalteten Protein-Tyrosinkinasen (PTK) ab. Biochemische sowie genetische Daten weisen darauf hin, dass Mitglieder der Scr Familie wie Fyn und Lck in T-Zellen, in diesen Prozess involviert sind. Durch die Scr Kinasen werden die intrazellulären Domänen von TCR-assoziierten Proteinen phosphoryliert. Dazu gehören unter anderem ζ -Homodimere als auch der CD3-Komplex bestehend aus der γ , δ und ϵ Kette. Die Proteine enthalten das Motiv ITAM, dessen Phosphorylierung an Tyrosinresten nach Antigen-Rezeptor Stimulation ausreichend für die Initiation der T-Zell Aktivierung ist. Durch die Phosphorylierung wird die cytoplasmatische ZAP-70 Kinase (zeta assoziiertes Protein-70) an den phosphorylierten Rezeptorkomplex über die SH2-Domäne rekrutiert. Dadurch werden membranassoziierte Signalkomplexe formiert, die mehrere Signaltransduktionswege aktivieren. Die Signale gelangen so zum Zellkern, wo sie ein definiertes genetisches Programm induzieren. Das am besten charakterisierte Ereignis dabei ist die Aktivierung der IL-2 Genexpression durch die koordinierte Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren an den IL-2 Promotor (Fan *et. al.*, 1993).

Unklar dabei war, welche Parameter für die Aktivierung der ZAP-70 Kinase wichtig sind. So ist die Bindung von ZAP-70 an die ITAMs über die intrinsische SH2-Domäne für die Aktivierung der Kinase nicht ausreichend (Neumeister *et. al.*, 1995). Es wird vermutet, dass die Bindung von ZAP-70 an phosphoryliertes ζ eine Phosphorylierung durch Scr-Kinasen ermöglicht und somit eine Aktivierung von ZAP-70 bewirkt.

Lck interagiert dabei direkt mit ZAP-70 und ist *in vivo* notwendig für die Phosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 493 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne. Die Phosphorylierung des Restes 493 resultiert in einer Kinase inaktiven und damit funktional dominant negativen Variante von ZAP-70. Zusätzliche Phosphorylierungsereignisse durch Scr Kinasen oder durch andere zelluläre Kinasen sowie die Autophosphorylierung induzieren möglicherweise die Aktivierung von nachgeschalteten Signalkomponenten auf noch unbekanntem Wege. So führt die Substitution des benachbarten Tyrosinrestes 492 zu einer kinasehyperaktiven ZAP-70 Variante (Wange *et. al.*, 1995). Daneben wurden die Tyrosinreste 597 und 598 als wichtige Autophosphorylierungsstellen erkannt, die homolog zu Autophosphorylierungsstellen in p72-Syk sind. Die Konservierung beider Tyrosinreste in Syk und ZAP-70 sowohl im Menschen als auch in der Maus lässt auf eine wichtige regulatorische Funktion durch Phosphorylierung dieser beiden Reste schließen. Erste Hinweise darauf wurden in unserem Labor durch detaillierte Studien von Lutz Zeitlmann im Rahmen seiner Promotion erbracht, in dem er zeigte, dass die transiente Überexpression der ZAP-70 Mutante ZAP-70 (YY597/598FF) (ZAP-70 (YF-C)) zur Aktivierung der Interleukin-2 Expression in Jurkat LT Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT führt.

Der Signalmechanismus, der durch diese beiden Tyrosine reguliert wird, war zum Zeitpunkt der Arbeit völlig unklar. Die weiteren Untersuchungen dienten zur biochemischen Charakterisierung der katalytischen und funktionalen Aktivität von ZAP-70(YF-C) *in vitro*.

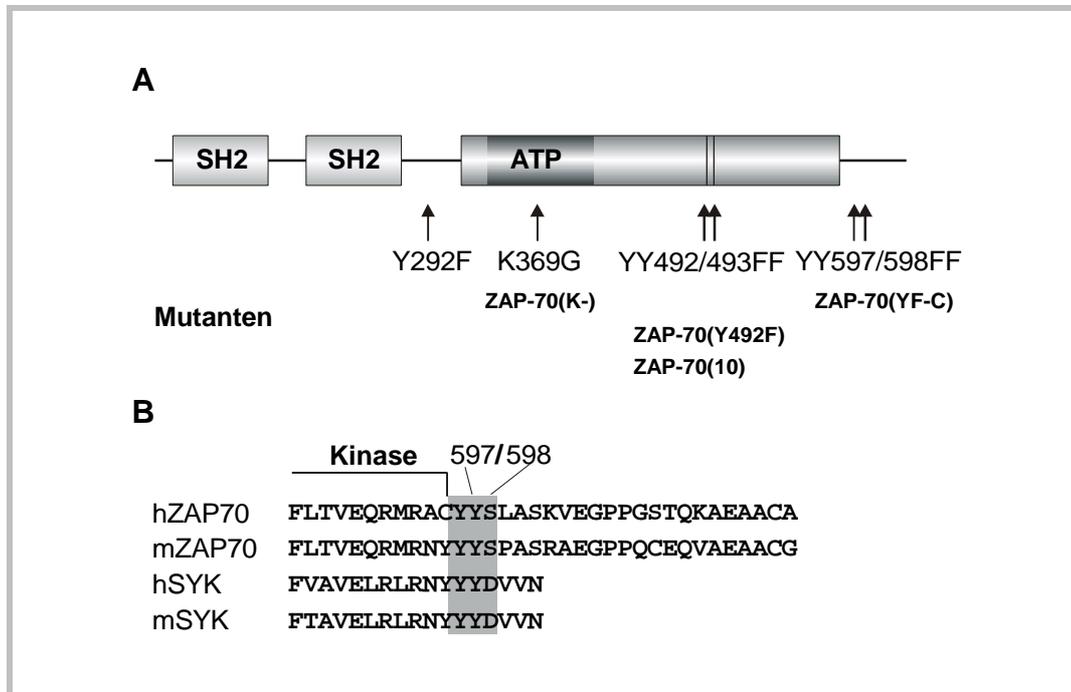


Abbildung 4.8.1: **Übersicht über ZAP-70 und dessen Mutanten (aus Zeitlmann et. al., 1998).**

- A) Die mutierten Aminosäuren, sowie sie daraus resultierenden Konstrukte sind angegeben, wobei ZAP-70(10) eine Doppelmutante durch Substitution der Tyrosinreste –492 und –493 ist.
- B) Die C-terminalen Tyrosinreste –492 und –493 sind in den syk-Kinasen zwischen Mensch und Maus evolutiv stark konserviert.

4.8.1 Die Phosphorylierung von ZAP-70 *in vivo* wird durch die Tyrosinreste 597 und 598 reguliert

Wie oben erwähnt führt die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 nach Phenylalanin zu einer gesteigerten funktionalen Aktivität von ZAP-70 (Zeitlmann *et. al.*, 1998). Um zu analysieren, ob die konstitutiv aktive Funktion von ZAP-70(YF-C) auf einer erhöhten Substratphosphorylierung *in vivo* beruht, wurde das zelluläre Muster tyrosinphosphorylierter Proteine in Jurkat LT-Zellen nach Überexpression von ZAP-70(YF-C) untersucht.

Wie Abbildung 4.8.2 zeigt, resultiert die transiente Expression in der T-Zelllinie Jurkat LT von ZAP-70, ZAP-70(Y492F) sowie des kinase-inaktiven ZAP-70(K-) in einem anti-Phosphotyrosin-Western Blot in keiner signifikanten Steigerung tyrosinphosphorylierter Proteine. Eine Ausnahme bilden dabei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca.70 kDa, die dem exogenen ZAP-70 zugeordnet werden können. Durch die Mutation des Tyrosinrestes 492 in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne von ZAP-70 kommt es weiterhin zur Phosphorylierung des Proteins. Die transiente Expression der kinaseinaktiven Variante ZAP-70(K-), bei der in der ATP-bindenden Untereinheit der Lysinrest 369 durch Glycin substituiert wurde, liegt dagegen in geringerem Maß phosphoryliert vor. Da diese

Mutante gegenüber exogenem Substrat keine katalytische Aktivität mehr aufweist, ist diese Phosphorylierung auf Transphosphorylierung durch scr-Kinasen wie Ick zurückzuführen. Die Phosphorylierung des exogenen Proteins ZAP-70(YF-C) ist gegenüber ZAP-70 leicht erhöht. Somit erfolgt die Phosphorylierung der exogenen ZAP-70 Konstrukte demnach sowohl durch homologe als auch heterologe Phosphorylierungsereignisse. Jedoch korreliert die Phosphorylierung von ZAP-70 nicht mit der funktionalen Aktivität (Zeitlmann *et. al.*, 1998). Durch die Überexpression von ZAP-70(YF-C) kommt es zudem zu einer moderaten Steigerung der Phosphorylierung endogener Proteine bei ca. 150 kDa, 55-56kDa, 50 kDa und 40 kDa (Abbildung 4.8.2; mit Pfeil markiert). Lutz Zeitlmann konnte darüber hinaus noch die gesteigerte Phosphorylierung der ζ -Kette (21-23 kDa) nachweisen.

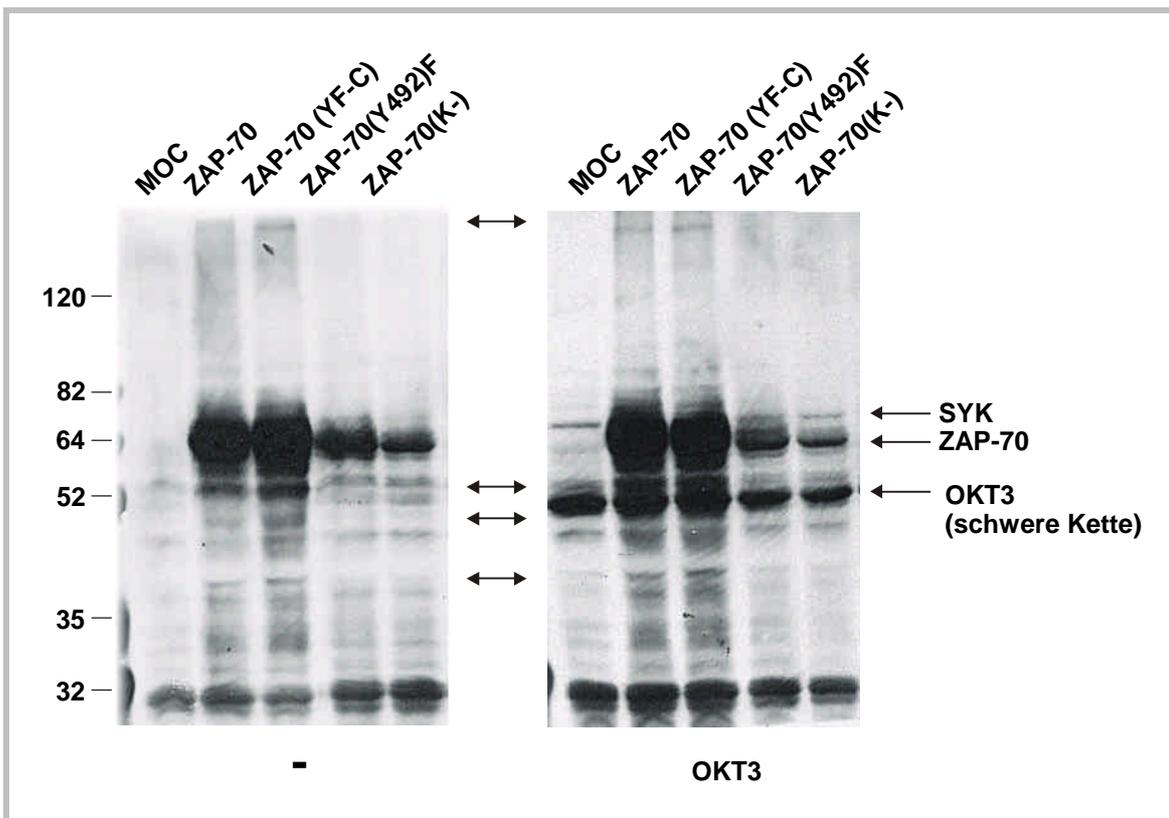


Abbildung 4.8.2: **Überexpression von ZAP-70 Konstrukten in Jurkat LT-Zellen resultiert in der Phosphorylierung der exogenen ZAP-70-Proteine.**

Jurkat-LT-Zellen wurden mit den ZAP-70-Konstrukten transient durch Elektroporation transfiziert. Nach 24 h erfolgte eine Stimulation des TCR/CD3-Komplexes mit der Hälfte der Zellen in 1xPBS bei 37°C mit OKT3.

4.8.2 Die Kinase-Aktivität von ZAP-70 ist notwendig für die Phosphorylierung der ζ -Kette und die Assoziierung von ZAP-70 an die ζ -Kette.

Die Phosphorylierung der ζ -Kette sowie die Assoziation von ZAP-70 an phosphoryliertes ζ stellen einen wichtigen Schritt in der Aktivierung der T-Zelle dar. Der Phosphorylierungsgrad der TCR- ζ Kette ist eng mit dem aktivierenden Potential des T Zell Rezeptors, nach Stimulation durch ein Peptidantigen, korreliert. Während die Stimulation mit antagonistischen oder partiell agonistischen Peptiden zu einer unvollständigen Phosphorylierung der ζ -Kette zur p21 Form führt, resultiert die Stimulation mit agonistischen, mitogenen TCR Liganden in der extensiven Phosphorylierung der ζ -Kette zur p23 Form (Sloan-Lancaster *et. al.*, 1994; Madrenas *et. al.*, 1995). Der Mechanismus dieser differentiellen Phosphorylierung wurde als unterschiedlich effiziente Rekrutierung von CD4-assoziierten p56-lck Molekülen in die Nähe des TCR Komplexes interpretiert (Madrenas *et. al.*, 1997). Unklar war, ob die durch ZAP-70(YF-C) vermittelte zelluläre Aktivierung auf einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der ζ -Kette zurückzuführen ist oder durch eine gesteigerte Kinase-Aktivität verursacht wird.

4.8.2.1 Kinaseaktivität von ZAP-70 vermittelt differenzierte Phosphorylierung der ζ -Kette in Jurkat E6

Um zu klären, ob die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 zu Phenylalanin zu einer verstärkten Rekrutierung von ZAP-70(YF-C) an die TCR- ζ Kette führt, wurde ZAP-70 und dessen Mutanten in der T-Zelllinie Jurkat E6 transient überexprimiert. In diesen Zellen wurde das exogene chimäre Protein sIg-Zeta koexprimiert, das aus dem transmembranen sIg-Fusionsprotein und der cytoplasmatischen Domäne der ζ -Kette besteht (Zeitlmann *et. al.*, 1998). Die Zellen wurden lysiert und sIg-Zeta an Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Wie Abbildung 4.8.3A zeigt, kommt es durch die Überexpression zu einer konstitutiven Phosphorylierung der exogenen cytoplasmatischen Domäne der ζ -Kette. An die phosphorylierte cytoplasmatische ζ -Domäne erfolgt dabei die Bindung aller untersuchten ZAP-70-Mutanten. Die Phosphorylierung von sIg-Zeta kann nicht auf die kotransfizierten ZAP-70-Mutanten zurückgeführt werden, da sowohl in sIg-Zeta als auch in sIg-Zeta/ZAP-70(K-) transfizierten Zellen die exogenen sIg-Zeta Konstrukte phosphoryliert vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass die monomeren cytoplasmatischen ζ -Domänen unspezifisch phosphoryliert werden. So kommt es durch die Quervernetzung der sIg-Zeta-Konstrukte durch anti-humanIgG über den extrazellulären Ig-Anteil, bestehend aus der C_H2- und C_H3-Domäne, zu einer Zusammenlagerung der sIg-Zeta Moleküle (Abbildung 4.8.3B). Damit einhergehend kommt es zu einer differenzierten Phosphorylierung der ZAP-70-Mutanten. Während ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) tyrosinphosphoryliert vorliegen, sind die kinaseinaktiven Mutanten ZAP-70(10) und ZAP-70(K-) nur unzureichend phosphoryliert. Durch die Überexpression von ZAP-70(YF-C) kommt es zur Hyperphosphorylierung von sIg-Zeta. Bemerkenswerterweise jedoch nimmt die Phosphorylierung der Zeta-Kette durch das Zusammenlagern der sIg-Konstrukte ab. Dies deutet darauf hin, dass mit polymeren ζ -Ketten Phosphatasen assoziiert sind, welche die unspezifische Phosphorylierung monomerer ζ -Ketten sowie die damit assoziierten ZAP-70-Proteine verhindern (vgl. Abbildung 4.8.3A und B). Daneben assoziieren mit der ZAP-70(YF-C)-Variante hyperphosphorylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 150 kDa und 21-23 kDa (vgl. Abschnitt 4.8.1 oben).

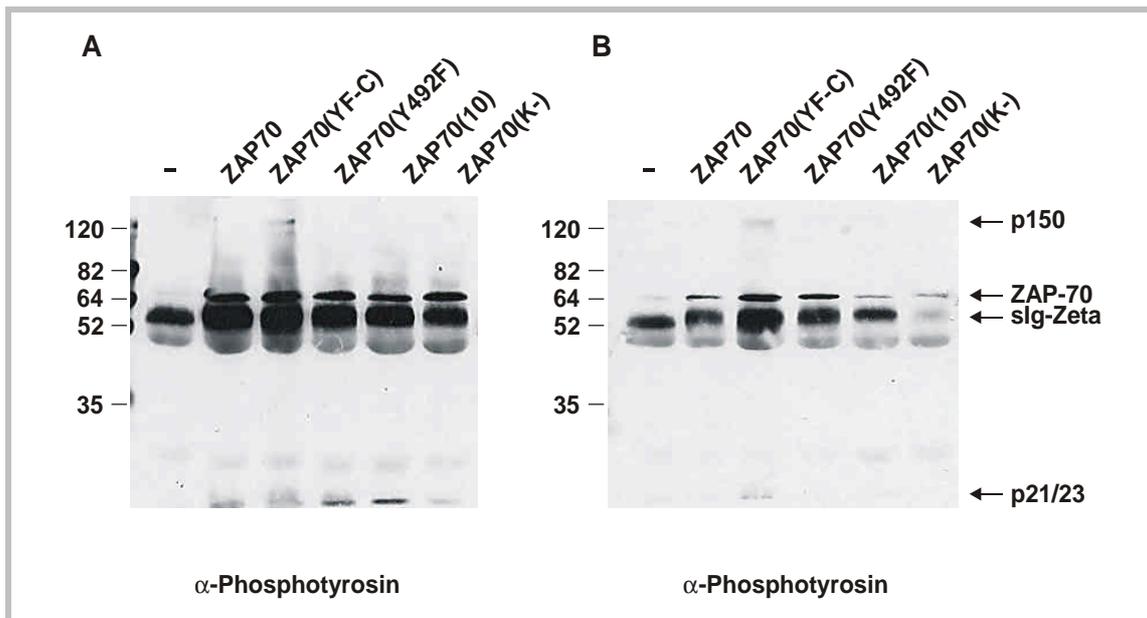


Abbildung 4.8.3: **ZAP-70(YF-C) verstärkt die Phosphorylierung der ζ -Kette in Jurkat E6-Zellen nach Zusammenlagerung der ζ -Ketten.**

Eine chimäre TCR- ζ -Kette, die aus der extrazellulären C_H2/C_H3-Domäne des IgG, der transmembranen Domäne von CD7 und der intrazellulären Domäne der ζ -Kette (sIg-Zeta) besteht, wurde mit diversen ZAP-70-Konstrukten in COS-7m-Zellen transient koexprimiert. Nach Lyse der Zellen in Phosphatase--Lysepuffer erfolgte die Immunpräzipitation von sIg-Zeta an Protein A-Sepharose.

A) Die exogenen ZAP-70-Konstrukte sowie sIg-Zeta werden *in vivo* phosphoryliert.

B) Vor der Lyse der Zellen erfolgt eine Quervernetzung der sIg-Zeta-Konstrukte durch anti-humanIgG. ZAP-70(YF-C) induziert eine verstärkte Phosphorylierung von sIg-Zeta und eine erhöhte Assoziation mit der ζ -Kette. Zudem werden durch anti-Phosphotyrosin-Antikörper phosphorylierte Proteine bei 150 kDa (p150) und bei 21-23 kDa (p21/23) detektiert.

4.8.2.2 Die Phosphorylierung der ζ -Kette und die Assoziierung von ZAP-70 an die ζ -Kette verläuft in COS-7m Zellen ohne TCR/CD3-assoziierte Kinasen

Die Phosphorylierung der ITAMs in der ζ -Kette erfolgt in T-Zellen durch scr-Proteintyrosinkinasen wie Ick. Die Phosphorylierung stellt ein notwendiges, aber nicht ausreichendes Ereignis in der T-Zell-Aktivierung und der damit verbundenen Rekrutierung und Aktivierung von ZAP-70 an den TCR/CD3-Komplex dar. Die durch ZAP-70(YF-C) induzierte Stimulierung des IL-2-Promotors könnte somit durch die gesteigerte Phosphorylierung der ITAM-Motive in der ζ -Kette bedingt sein. Erste Hinweise darauf wurden durch die Überexpression von ZAP-70(YF-C) in der T-Zelllinie Jurkat E6 erhalten, bei der eine verstärkte Phosphorylierung der ζ -Kette beobachtet werden konnte (Zeitlmann *et. al.*, 1998; eigene Daten: siehe oben). Es war jedoch unklar, ob ZAP-70 direkt die Phosphorylierung der ITAM Motive bewirkt oder ob ZAP-70(YF-C) die Aktivierung weiterer T-Zell spezifischer Proteintyrosinkinasen und dadurch die Phosphorylierung der ζ -Kette induziert. Daher sollte untersucht werden, ob die ζ -Kette direkt als Substrat von ZAP-70 fungiert. Um den Einfluss T-Zell spezifischer Kinasen zu vermeiden, erfolgte die transiente Expression der ZAP-70-Konstrukte in der Zelllinie COS-7m. In den Zellen erfolgte die gleichzeitige Expression der chimäre TCR- ζ -Kette, die aus der extrazellulären C_H2/C_H3-Domäne des IgG, der transmembranen Domäne von CD7 und der intrazellulären Domäne der ζ -Kette (sIg-Zeta) besteht. Die Zellen wurden lysiert und die chimären

sIg-Zeta Proteine an ProteinA-Sepharose immunpräzipitiert. Wie Abbildung 4.8.4 A zeigt, komigrieren die Kinase-aktiven ZAP-70-Mutanten ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) mit der ζ -Kette, während die kinaseinaktiven ZAP-70-Mutanten ZAP-70(10) und ZAP-70(K-) nicht mit der ζ -Kette assoziiert sind. Dies ist auf die deutlich reduzierte Phosphorylierung der ζ -Kette zurückzuführen. Die kinaseaktiven Mutanten ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) dagegen bewirken die Phosphorylierung der ζ -Kette (Abbildung 4.8.4 B). Dabei führt die Koexpression von ZAP-70(Y492F) zur stärksten Phosphorylierung der ζ -Kette. Dies ist konsistent mit der Kinasehyperaktivität dieser ZAP-70-Variante, die auch zu einer verstärkten Autophosphorylierung führt (Abbildung 4.8.4 B, untere Reihe). ZAP-70(YF-C) zeigt ebenfalls gegenüber Wildtyp ZAP-70 erhöhte Autophosphorylierungsaktivität sowie gesteigerte Phosphorylierung von sIg-Zeta, jedoch in geringerem Maß wie ZAP-70(Y492F).

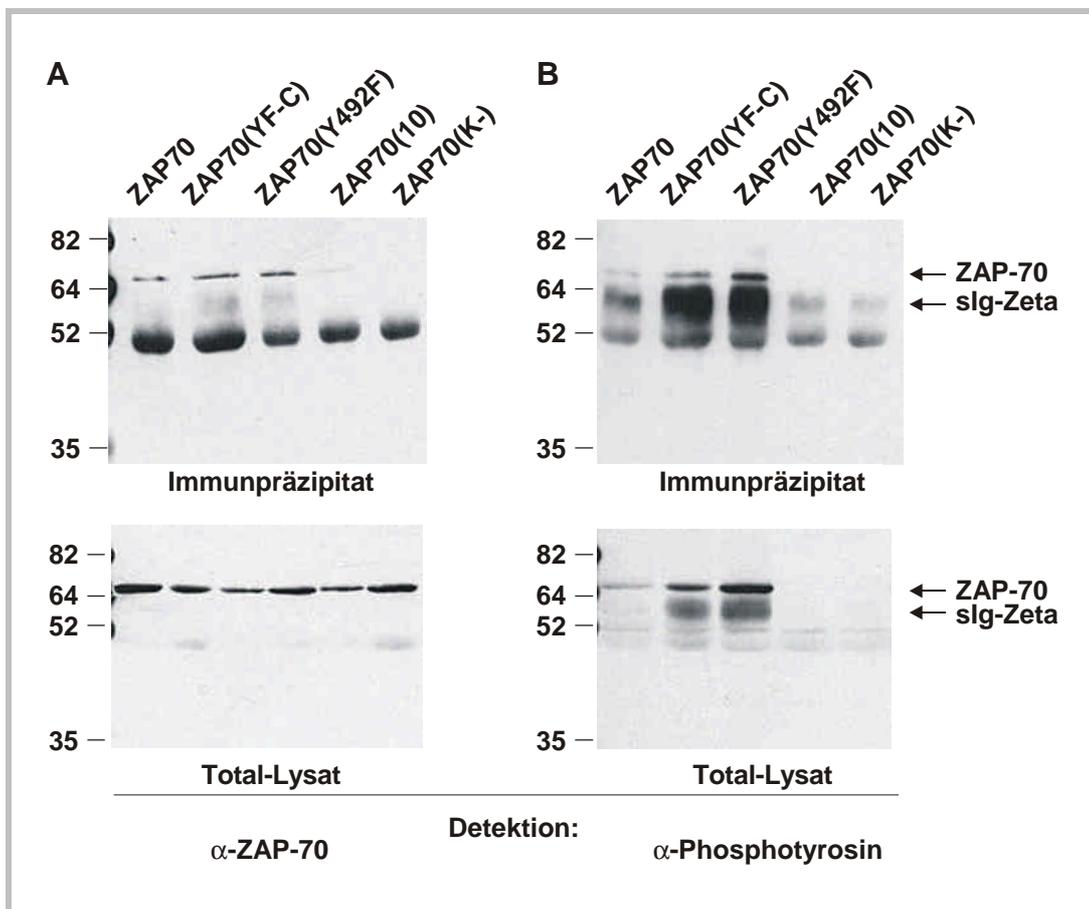


Abbildung 4.8.4: **ZAP-70(YF-C) induziert die Phosphorylierung der ζ -Kette in COS-7m-Zellen und bindet an phosphoryliertes ζ .**

Die chimäre TCR- ζ -Kette, die aus der extrazellulären CH2/CH3-Domäne des IgG, der transmembranen Domäne von CD7 und der intrazellulären Domäne der ζ -Kette (sIg-Zeta) besteht, wurde mit diversen ZAP-70-Konstrukten in COS-7m-Zellen transient koexprimiert. Nach Lyse der Zellen in Phosphatase-Lysepuffer erfolgte die Immunpräzipitation von sIg-Zeta an Protein A-Sepharose.

- A) Die Mutanten ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) kopräzipitieren im Gegensatz zu den Kinase-defekten Mutanten ZAP-70(10) und ZAP-70(K-) mit sIg-Zeta. Der Nachweis erfolgte im Immunpräzipitat sowie in dem totalen Zellysate mit dem anti-ZAP-70-Antikörper.
- B) Durch die Expression von ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) kommt es zur Autophosphorylierung sowie zur Phosphorylierung von sIg-Zeta. Die Kinase-defizienten Mutanten ZAP-70(10) und ZAP-70(K-) dagegen induzieren keine Phosphorylierungsergebnisse.

4.8.3 **Bindung von ZAP-70 an die phosphorylierte ITAM-Domäne von der ζ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von ZAP-70.**

Die Bindung von ZAP-70 an phosphoryliertes ITAM stellt ein wichtiges Ereignis in der Induktion der Signalkaskade in aktivierten T-Zellen dar. Weniger klar dagegen sind die biochemischen Vorgänge, die der Rekrutierung von ZAP-70 an die ζ -Kette folgen. Neben der Bindung von ZAP-70 an die phosphorylierten ITAMs der ζ -Kette sowie der δ -, ϵ - und γ -Kette wird die Aktivität der ZAP-70-Kinase durch die Phosphorylierung distinkter Tyrosinreste reguliert. Die Phosphorylierung kann dabei durch scr-Kinasen induziert werden, jedoch können auch Autophosphorylierungsvorgänge eine Rolle bei der Aktivierung von ZAP-70 spielen. Es sollte daher untersucht werden, ob die Bindung von ZAP-70 bzw. deren konstitutiv aktive Mutante ZAP-70(YF-C) zu einer Aktivierung der Kinaseaktivität durch Autophosphorylierung führen.

Dazu wurden in COS-7m-Zellen durch die Koexpression von sIg-Zeta und Ick die konstitutive Phosphorylierung von sIg-Zeta erreicht. Die phosphorylierten chimären Proteine sIg-Zeta wurden an ProteinA-Sepharose immunpräzipitiert. Die immobilisierten phosphorylierten sIg-Zeta wurden mit Zelllysaten aus COS-7m Zellen inkubiert, in denen transient die ZAP-70-Konstrukte exprimiert wurden. Wie Abbildung 4.8.5A und B zeigt, kommt es zur Bindung der ZAP-70-Mutanten an die phosphorylierten sIg-Zeta Proteine. Die Bindungsaffinität wird dabei von der Phosphorylierung der ZAP-70-Mutanten nicht moduliert. So bindet das kinaseinaktive ZAP-70(K-) mit vergleichbarer Affinität an phosphoryliertes sIg-Zeta wie die kinaseaktiven ZAP-70-Varianten ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) (Abbildung 4.8.5B). Somit wird die Bindungsaffinität der SH2-Domäne nicht durch Mutation der Tyrosinreste wie 394, 492, 597 und 598 moduliert. Die Kinaseaktivität induziert die Phosphorylierung der ZAP-70-Konstrukte, die auf homologe Phosphorylierung bzw. Autophosphorylierung zurückzuführen ist, da die kinaseinaktive Mutante ZAP-70(K-) nicht phosphoryliert wird (Abbildung 4.8.5A). Um untersuchen zu können, ob die Bindung von ZAP-70(YF-C) an phosphoryliertes ζ in einer gesteigerten Autophosphorylierungsaktivität resultiert, wurde die *in vitro* Kinaseaktivität der ζ -gebundenen ZAP-70-Mutanten mittels γ -[32 P]ATP bestimmt. Die Autoradiographie (Abbildung 4.8.5 C) zeigt die Autophosphorylierung von sIg-Zeta assoziierten ZAP-70. Die Fähigkeit zur Autophosphorylierung wird nicht durch die Tyrosinreste 597 und 598 (ZAP-70(YF-C)) bzw. durch den Tyrosinrest 492 (ZAP-70(Y492F)) determiniert; im Gegensatz dazu resultiert die Substitution des Tyrosinrestes 394 zu Glycin (ZAP-70(K-)) in einer Autophosphorylierungsdefizienten Mutante. Die schwach detektierbare Phosphorylierung von ZAP-70(K-) sowie von sIg-Zeta sind auf geringe Spuren von weiteren Kinasen, wie das koexprimierte Ick oder COS-7m spezifische Proteintyrosinkinasen, zurückzuführen.

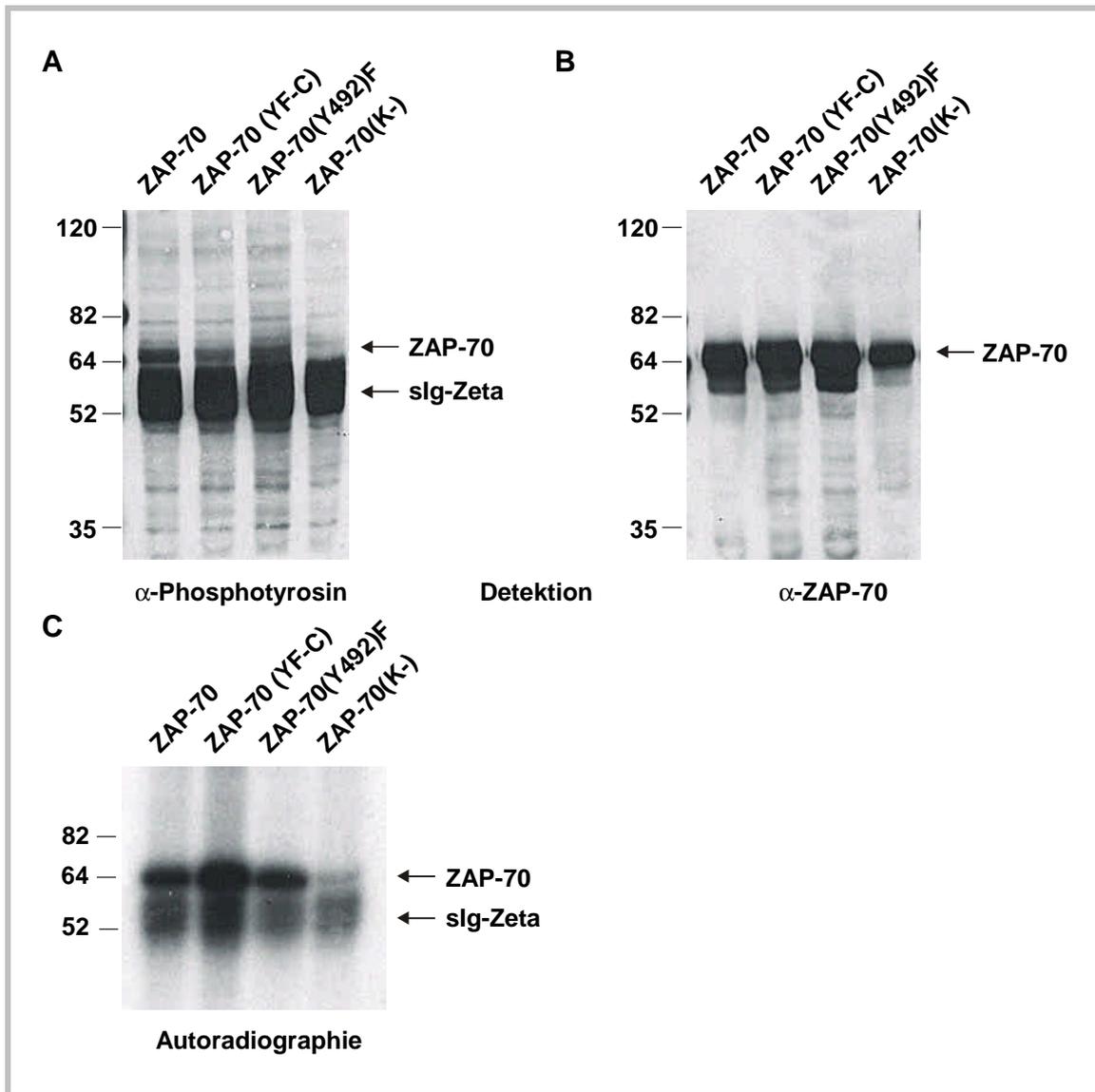


Abbildung 4.8.5: **Bindung von ZAP-70 an phosphoryliertes ζ ist unabhängig von dem Phosphorylierungsgrad von ZAP-70**

COS-7m Zellen wurden nach der DEAE-Dextran/Chloroquin-Methode mit sIg-Zeta und Ick transfiziert. Dadurch kommt es zur konstitutiven Phosphorylierung der ζ -Kette durch Ick. Nach Lyse der COS-Zellen erfolgte die Immunpräzipitation von sIg-Zeta an Protein A-Sepharose. Die an Protein A-Sepharose immobilisierten sIg-Zeta Proteine wurden mit Jurkat LT-Zelllysaten inkubiert, in denen transient die ZAP-70-Konstrukte nach Elektroporation exprimiert wurden.

A) Anti-Phosphotyrosin-Blot der immobilisierten sIg-Zeta nach Inkubation mit dem totalen Zelllysate aus Jurkat-LT-Zellen zeigt, dass die ζ -Kette durch Ick in COS-7m-Zellen phosphoryliert wird. Das an die phosphorylierte ζ -Kette gebundene ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) ist autophosphoryliert.

B) Die Bindung von ZAP-70 ist unabhängig von der Phosphorylierung. Der Nachweis der an phosphoryliertes sIg-Zeta gebundene ZAP-70 (vgl. A) erfolgt über den anti-ZAP-70-Antikörper

C) *In vitro* Autophosphorylierung (mit γ - ^{32}P ATP) der ZAP-70 Konstrukte.

4.8.4 ζ -assoziiertes ZAP-70 (YF-C) zeigt *in vitro* eine moderate Erhöhung der katalytischen Aktivität

Neumeister *et. al.* (1995) haben gezeigt, dass die Bindung von ZAP-70 an phosphoryliertes ζ zu einer gesteigerten Autophosphorylierungsaktivität *in vitro* führt. Die Phosphorylierung von exogenem Substrat ist gegenüber ungebundenem ZAP-70 *in vitro* nicht verändert. Die Bindung von ZAP-70 an die ζ -Kette ist jedoch nicht ausreichend, um die Aktivierung der T-Zelle zu induzieren. Daher wurde postuliert, dass die aktivierende Funktion von ZAP-70(YF-C) auf die IL-2-Produktion auf eine erhöhte Kinaseaktivität gegenüber exogenem Substrat zurückzuführen ist. ZAP-70(YF-C) sowie positive als auch negative Kontrollkonstrukte wurden in COS-7m Zellen transient überexprimiert. Die Immunpräzipitation aus dem Zelllysate erfolgte durch Koimmunpräzipitation an phosphoryliertem sIg-Zeta, das durch die Koexpression von sIg-zeta und lck in COS-7m Zellen erhalten wurde. Als exogenes *in vitro* Substrat der mit den ζ -Ketten assoziierten ZAP-70-Mutanten wurde ein Fragment des SAM68 Proteins (Neumeister *et. al.*, 1995) verwendet, das in *E. coli* als Glutathion-S-Transferase-SAM68-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt worden war (freundlicherweise von Michael Knoll aus unserem Labor zur Verfügung gestellt). Dabei zeigte sich, dass die positive Kontrolle ZAP-70(Y492F), von der eine gesteigerte Kinaseaktivität *in vitro* schon gezeigt war (Wange *et. al.*, 1995; Chan *et. al.*, 1995), eine gegenüber Wildtyp ZAP-70 um den Faktor 4 erhöhte Kinaseaktivität besitzt (Abbildung 4.8.6 B, unteres Diagramm). Die Autophosphorylierung von ZAP-70(Y492F) ist gegenüber ZAP-70 nur um den Faktor 2,5 erhöht (Abbildung 4.8.6 B, oberes Diagramm). Die kinaseinaktive Mutante ZAP-70(K-) als negative Kontrolle zeigte keine Phosphorylierungsaktivität sowohl gegen exogene Substrate als auch gegen sich selbst. Die aktivitätssupprimierte Mutante ZAP-70(10) führt zu einer Reduktion sowohl der Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung exogenen Substrates. Dagegen bewirkte die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 zu Phenylalanin eine nur moderate, ca. zweifache Erhöhung der katalytischen Aktivität. Die autokatalytische Aktivität von ζ -gebundenem ZAP-70(YF-C) im selben Ansatz liegt jedoch nur um den Faktor 1,4 über dem von ZAP-70. Dies deutet darauf hin, dass die katalytische Aktivität *in vitro* durch die Tyrosinreste 597 und 598 reguliert wird.

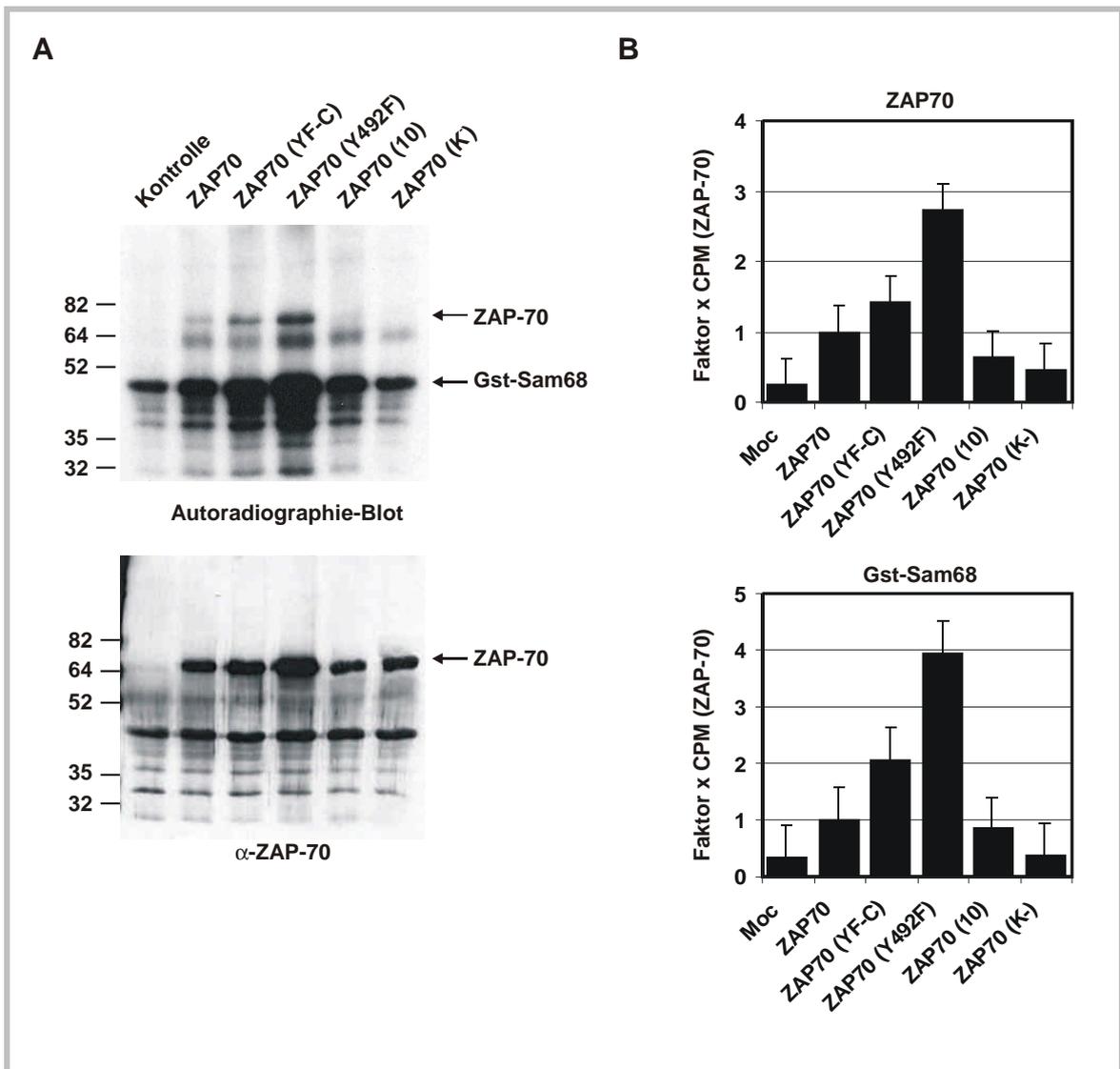


Abbildung 4.8.6: ***In vitro* Kinase-Aktivität der ZAP-70 Mutanten nach Assoziation an die phosphorylierte z-Kette**

- A) *In vitro* katalytische Aktivität der ZAP-70-Mutanten wurde durch Verwendung von 5 µg gereinigtem Glutathion-S-Transferase-Sam68 C-terminalen Fragment (Aminosäuren 331-443) als Substrat bestimmt. ZAP-70 Mutanten wurden aus Jurkat-LT-Lysaten an phosphoryliertem sIg-Zeta koimmunpräzipitiert und die Phosphorylierungsreaktion für 10 min bei 37°C mit γ -[32P]GTP durchgeführt.
- B) Quantitative Bestimmung der Radioaktivität als Maß für die Autophosphorylierung bzw. katalytische Aktivität der ZAP-70-Mutanten. Die von ZAP-70 umgesetzte Radioaktivität diente als Referenzwert und wurde auf 100% (=1) gesetzt.

4.8.5 z-assoziiertes ZAP-70 zeigt erhöhte Autophosphorylierungsaktivität an bestimmten Tyrosinresten

Die gesteigerte *in vitro* Kinaseaktivität der ZAP YF-C Variante impliziert, dass die Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste zur Inhibition der Kinaseaktivität beitragen könnte. Auf welche Weise die YF-C Mutation allerdings die Kinaseaktivität stimuliert, ist nicht geklärt. Denkbar ist ein direkter Einfluss über strukturelle Änderungen des ZAP-70 Moleküls oder ein indirekter Mechanismus über

Rekrutierung modulierender Faktoren. Es wurde postuliert, dass die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 zu einer hyperaktiven Kinase durch die Autophosphorylierung regulatorischer Tyrosinreste führt. Daher sollte die Autophosphorylierung der diversen ζ -assoziierten ZAP-70-Mutanten durch die *in vitro*-Phosphopeptidkartierung untersucht werden. Mit dieser Methode können nach radioaktiver Phosphorylierung Proteine in Peptide durch Verdau mit Trypsin gespalten werden und distinkte Phosphorylierungsereignisse nach zweidimensionaler Auftrennung auf einer Zellulose-Dünnschichtplatte autoradiographisch bestimmt werden.

Die ZAP-70-Konstrukte wurden hierzu in COS-7m-Zellen transient exprimiert. Durch die Koexpression von sIg-Zeta mit Ick in COS-7m Zellen wurden stark tyrosinphosphorylierte ITAMs erhalten. Die sIg-Zeta wurden an ProteinA-Sepharose immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit den Zelllysaten der COS-7m Zellen inkubiert, die zuvor mit den verschiedenen ZAP-70-Mutanten transfiziert waren. Wie schon in Abschnitt 4.8.3 gezeigt, erfolgt die Assoziation der ZAP-70-Mutanten mit phosphoryliertem sIg-Zeta unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus (Abbildung 4.8.7 B). Die Autophosphorylierung der ζ -assoziierten Proteine erfolgte *in vitro* durch Zugabe von radioaktivem γ - $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Durch Trypsin-Verdau wurden die ZAP-70-Mutanten in spezifische Peptide gespalten. Die Auftrennung der Peptide erfolgte zweidimensional auf einer Zellulose-Dünnschichtplatte, wobei die 1. Dimension elektrophoretisch bei 1200V (20 min, pH 4,72) und die 2. Dimension chromatographisch erfolgte. Die autoradiographische Auswertung der Dünnschichtplatten zeigte, dass ZAP-70(YF-C) hyperphosphoryliert an distinkten Peptidfragmenten vorliegt. So tritt ein prominentes Phosphorylierungssignal nur bei ZAP-70(YF-C) auf (Abbildung 4.8.7A, Peptidfragment mit „A“ gekennzeichnet). Daneben kommt es zur Hyperphosphorylierung weiterer Peptidfragmente (Abbildung 4.8.7A, Peptidfragmente mit „B“ und „C“ gekennzeichnet), wobei das mit „B“-gekennzeichnete Phosphorylierungssignal auch bei der hyperaktiven Variante ZAP-70(Y492F) entsteht und somit direkt mit einer erhöhten Kinaseaktivität der Mutanten ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) korreliert. Somit kann gefolgert werden, dass die Tyrosinreste 597 und 598 eine Inhibition der Kinaseaktivität bewirken und der C-Terminus regulatorischen Einfluss auf die *in vitro* Kinaseaktivität nimmt. Die bei der kinaseinaktiven Mutante ZAP-70(K-) sowie bei den kinaseaktiven ZAP-70-Mutanten auftretenden Phosphorylierungsereignisse sind auf die heterologe Phosphorylierung durch Kinasen wie Ick und fyn zurückzuführen, die zusammen mit phosphoryliertem sIg-Zeta koimmunpräzipitieren.

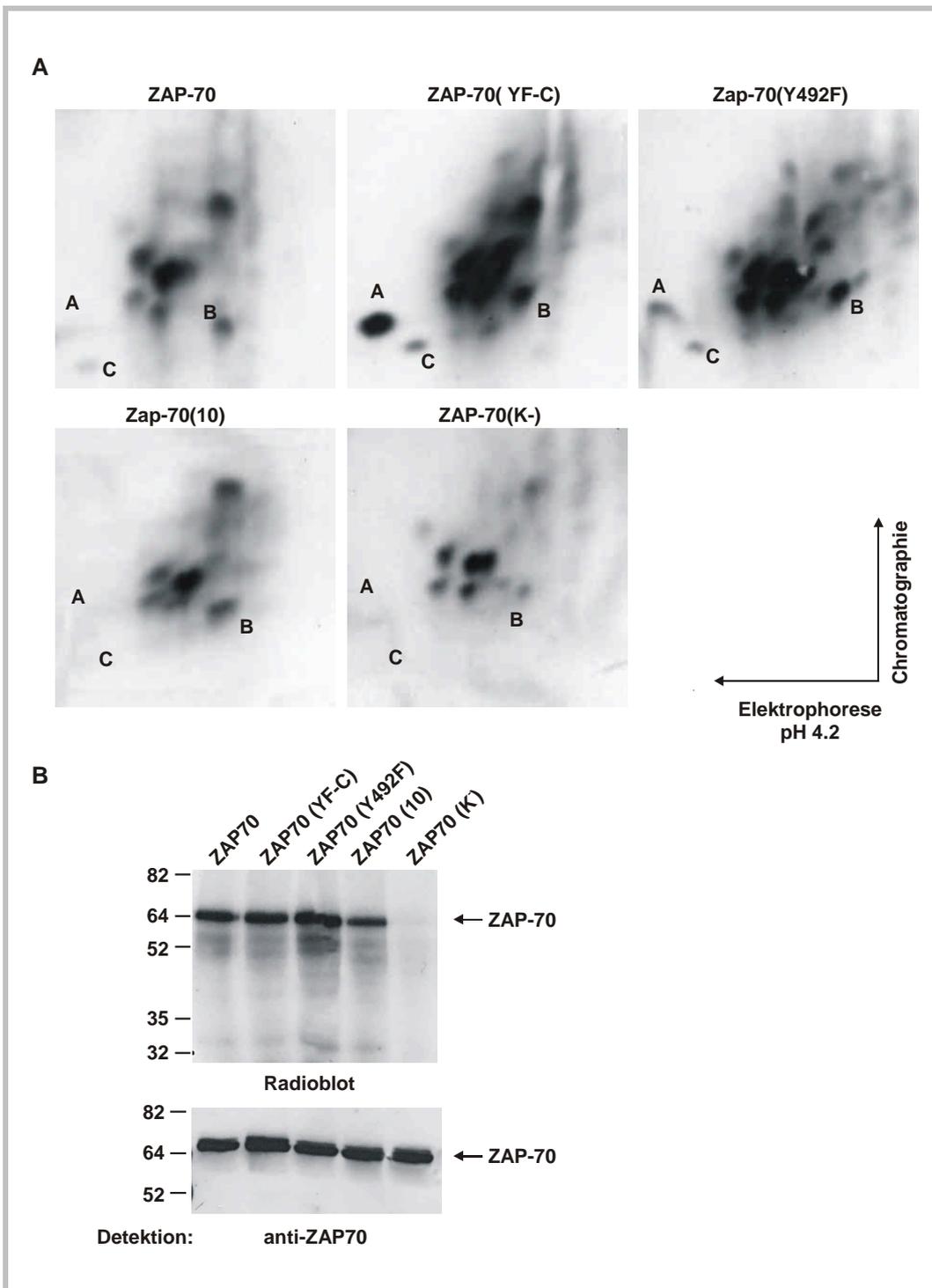


Abbildung 4.8.7: **Die Mutation der Tyrosinreste 597 und 598 zu Phenylalanin führt zu einer Hyperphosphorylierung eines distinkten Peptidfragmentes.**

- A) *In vitro* Peptid-Kartierung von ZAP-70 Konstrukten erfolgte nach Autophosphorylierung der mit der phosphorylierten ζ -Kette assoziierten ZAP-70-Mutanten. Prominente Phosphorylierungssignale sind durch Buchstaben gekennzeichnet
- B) Die Autoradiographie gibt die in einer SDS-PAGE aufgetrennten, *in vitro* autophosphorylierten, ZAP-70 Mutanten an. Zum Auftragen vergleichbarer Proteinmengen in der Peptidkartierung erfolgte die Quantifizierung nach Western Blot mit dem anti-ZAP-70-Antikörper.

5 Diskussion

5.1 *Cytohesin-1 reguliert die Bindung von LFA-1 an ICAM-1*

Im ersten Teil dieser Arbeit ging es darum, die durch β_2 -Integrine vermittelte Adhäsion von Lymphocyten an den Liganden ICAM-1 zu untersuchen. In einer Reihe von Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Bindung der Integrine an ihren Liganden durch eine Vielzahl komplexer intrazellulärer Signaltransduktionswege reguliert wird. Diese wiederum werden durch Zelloberflächenrezeptoren angeschaltet, welche die biologische Funktion von Integrinen in verschiedenen Geweben kontrollieren. Die Bindung von LFA-1 an den Liganden ICAM-1 wird durch viele Faktoren bestimmt. Hierzu zählen die Aktivierung des TCR Komplexes, die Stimulation der Zellen durch Phorbolster (PMA) (Dustin und Springer, 1991) und andere weniger gut definierte Signale, die im Zusammenhang mit der Extravasation der Leukocyten stehen (Picker und Butcher, 1992; Alon *et. al.*, 1994). Untersuchungen von Kolanus *et. al.* (1996) konnten schließlich zeigen, dass die Bindung von LFA-1 zu ICAM-1 durch Cytohesin-1 reguliert werden kann. Durch die Überexpression von Cytohesin-1 wird die Adhäsion von Jurkat LT Zellen an ICAM-1 induziert. Die Bindung von Cytohesin-1 an CD18 induziert in Ca^{2+} -freiem Medium durch EGTA-Komplexierung die Bildung eines Aktivierungs-Epitops (Geiger *et. al.*, 2000). Das Epitop in der α -Untereinheit von Integrinen auf Leukocyten charakterisiert dabei den aktivierten Zustand des Integrins (Dransfield und Hogg; 1989; Dransfield *et. al.*, 1992a/b). Der Antikörper mAb24, der gegen dieses Epitop gerichtet ist, inhibiert dabei aber nicht die LFA-1/ICAM-1 Interaktion, sondern verstärkt diese Interaktion (Dransfield *et. al.*, 1992). Cytohesin-1 führt somit nicht zu einer konformationalen Änderung des LFA-1 Rezeptors, die in einer höheren Affinität des Rezeptors zu ICAM-1 resultiert, sondern aktiviert den gesamten Rezeptorkomplex. Die Bedeutung von Cytohesin-1 als Regulator der Zelladhäsion und der Integrinaktivierung bildeten die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

5.2 *Sec7-Domäne von Cytohesin-1 katalysiert den Guaninnukleotid-Austausch der ADP-Ribosylierungsfaktoren*

Ausgangspunkt der Untersuchungen bildeten Daten, die Cytohesin-1 (Meacci *et. al.*, 1997) und ARNO (Cytohesin-2) (Chardin *et. al.* 1996; Paris *et. al.*, 1997) als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für ARF1 zeigten. Erst in letzter Zeit wurden eine Vielzahl von ARF-GEFs isoliert, die sich sowohl strukturell als auch biochemisch unterscheiden lassen. Ein gemeinsames Merkmal der ARF-GEFs bildet dabei die Sec7-Domäne, die den GDP/GTP Austausch von ARF katalysiert. Diese Vielzahl von ARF-GEFs lassen eine gezielte Regulation und Spezifität des Guanin-Nukleotid-Austauschs von ARFs vermuten. Eine Übersicht wird in Abbildung 5.2.1 gegeben:

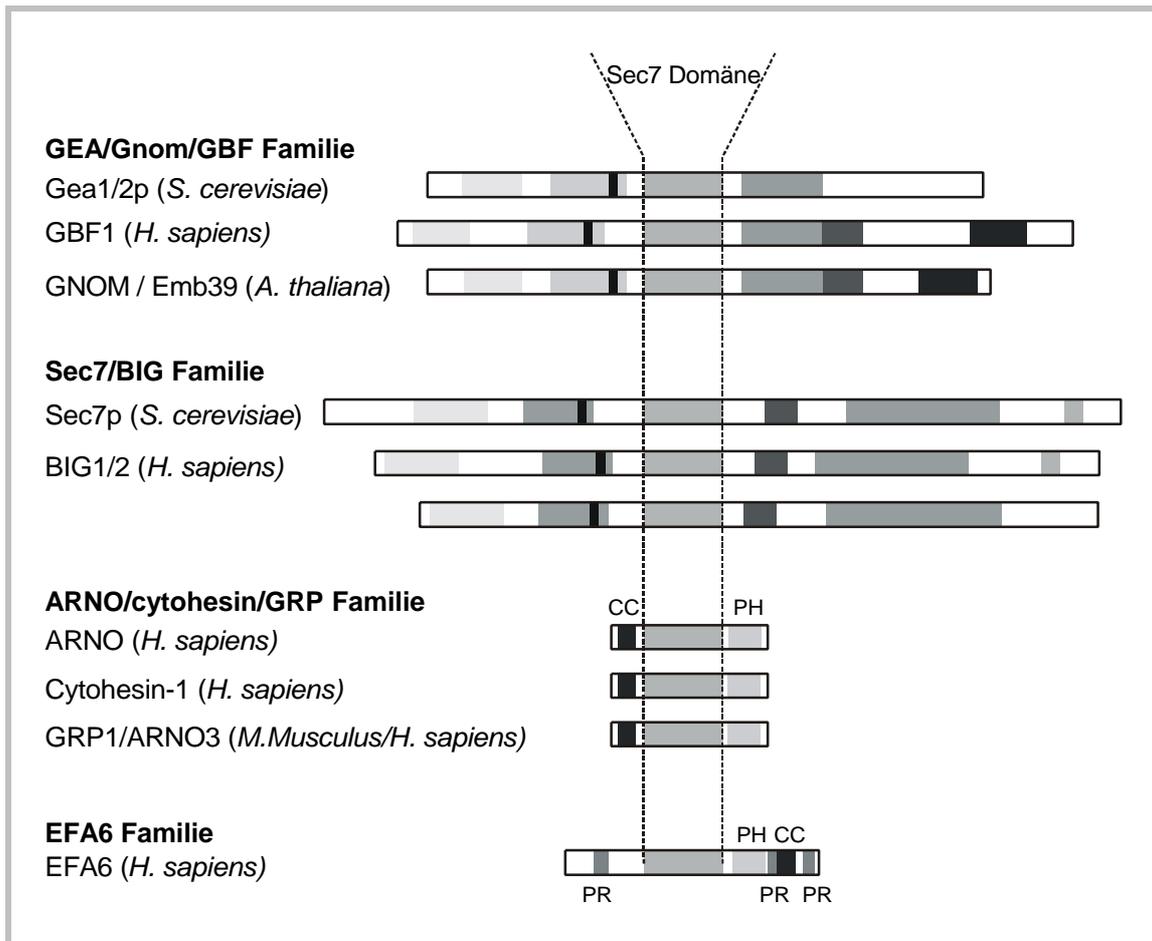


Abbildung 5.2.1: **Übersicht über die bekannten Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEF) der ARF Proteine**

Die Cytohesin-Unterfamilie der ARF-GEFs, bestehend aus Cytohesin-1, ARNO, GRP-1/ARNO3, sowie EFA6 besitzen 77% Sequenzhomologie und teilen sich die Sec7-Domäne. Diese Proteine besitzen weitere funktionale Domänen. Der N-terminale aus ca. 60 Aminosäuren bestehende Bereich bildet eine Coiled-coil Domäne (CC-Domäne), welche die Bildung von Homodimeren vermittelt, wie von Cardin *et. al.* (1996) für ARNO vermutet. Immunpräzipitationsstudien von Ig-Cytohesin-1 bestätigten diese Annahme, da im Western Blot und Silbergel eine ca. 50 kDa große Bande nachgewiesen werden konnte, die auf Grund der Molekulargröße dem endogenen Cytohesin-1 zugeordnet werden kann (Daten nicht gezeigt). Daran schließen sich die Sec7-Domäne (vgl. 5.2.1) sowie die PH Domäne an, deren jeweilige Funktion für die Regulation und Spezifität der ARF-GEF Aktivität im weiteren diskutiert wird. Der C-Terminus beinhaltet eine vierte Domäne, die durch eine Ansammlung basischer Aminosäuren wie Prolin charakterisiert ist. In ARNO und Cytohesin-1 wird dieser basische, prolinreiche Bereich durch die Proteinkinase C (PKC)-Konsensussequenz unterbrochen, die sowohl in ARNO (Frank *et. al.*, 1998, Santy *et. al.*, 1999) als auch in Cytohesin-1 (Henning Dierks, persönliche Mitteilung) *in vivo* phosphoryliert wird. GRP-1 besitzt innerhalb der polybasischen Region keine potentielle Phosphorylierungsstelle. Die Bedeutung dieses Phosphorylierungsereignisses ist unklar. Santy *et. al.* (1999) beschrieben jedoch eine verminderte Affinität von C-terminal phosphoryliertem ARNO an die Plasmamembran. Die Autoren vermuten, dass die negativ geladenen Phosphatreste bzw. deren Substitution durch Glutamat eine Destabilisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen verursachen. Diese Daten stehen im

Widerspruch zu Untersuchungen von Henning Dierks, dass C-terminal phosphoryliertes Cytohesin-1 an den Aminosäureresten Serin-394 und Threonin-395 die Membranassoziation verstärkt. Das Fehlen einer entsprechenden PKC-Konsensussequenz in GRP-1 impliziert eine gezielte Regulation der Cytohesin-Familie durch PKC. Dies unterstützt zudem die Idee, dass die Proteine der Cytohesin-Familie in Signal-Transduktionswegen der PKC, initiiert von extrazellulären Signalen über die Phosphatidylinositolkinase C (PKC), involviert sind (Klarlund *et. al.*, 1997). So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass aktiviertes ARF6 an Signaltransduktionsereignisse beteiligt ist. Dieser Punkt wird in Absatz 5.4 und 5.4.1 ausführlicher diskutiert.

5.2.1 *In vitro* katalysiert die Sec7-Domäne den Guaninnukleotid Austausch von ARF1 und ARF6

Die Spezifität der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 bildete eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit. Die meisten der mit ARF-GEF Funktion isolierten Proteine zeigen Substratspezifität gegenüber der Klasse I ARFs. So war Cytohesin-1 als GEF für ARF1 und ARF3, aber nicht für ARF6 beschrieben worden (Meacci *et. al.*, 1997, Pacheco-Rodriguez *et. al.*, 1998). Andere Daten wiederum zeigten, dass das zu Cytohesin-1 stark homologe Protein ARNO sowohl ein GEF für ARF1 als auch für ARF6 darstellt (Chardin *et.*, 1996; Frank *et. al.*, 1998). In neuester Zeit wurde EFA6 als ein Guaninnukleotid Austauschfaktor von ARF6 beschrieben (Franco *et. al.*, 1999).

Diese widersprüchlichen Aussagen beruhen möglicherweise auf einem unzureichendem System, die Aktivierung des Guaninnukleotid Austausches *in vitro* durch die GEFs zu bestimmen. Ein Ziel dieser Dissertation war es daher, ein System zur Untersuchung der Guaninnukleotid Austauschaktivität von ARF durch Cytohesin-1 zu etablieren und funktionale Unterschiede von Cytohesin-1 auf die verschiedenen ARFs zu determinieren.

Die Sec7-Domäne ist in der Lage als ARF-GEF zu fungieren. So konnte Pacheco-Rodriguez *et. al.* (1998) zeigen, dass sowohl Cytohesin-1 als auch die Sec7-Domäne GEF-Aktivität gegenüber nativen ARF1 und ARF3 besitzt. Cytohesin-1 katalysiert die GTP γ S Bindung an rekombinantes humanes ARF1 (rARF1), ARF3 der Hefe und humanes ARD1 (ein 64-kDa Guaninnukleotid bindendes Protein mit einer C-terminalen ARF Domäne). Im Gegensatz dazu wird durch die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 die Bindung von GTP γ S an rekombinantes unmyristoyliertes ARF 1, 5 und 6; Hefe ARF1, 2 und 3; ARD1; zwei ARD1 Mutanten mit ARF1 Domäne und $[\Delta 1-13]$ ARF1, welches keine N-terminale α -Helix besitzt, katalysiert. Die Spezifität der ARF/GEF Interaktion *in vitro* wird somit nicht durch die molekulare Struktur der Sec7-Domäne determiniert. Wie biochemische Untersuchungen belegen, interagiert die Sec7-Domäne im Kontext des vollständigen Cytohesin-1 *in vitro* mit allen untersuchten ARFs. Dabei kommt es zur Bindung von bakteriell exprimierten und gereinigtem 6xHis Cytohesin-1 an die chimären ARF1.Ig, ARF5.Ig und ARF6.Ig, die an Protein A immobilisiert sind. Die Bindung von Cytohesin-1 an die ARFs korreliert dabei direkt mit der katalytischen Aktivität. So kommt es durch die Interaktion von Cytohesin-1 sowohl mit eukaryontisch exprimierten ARF1 als auch mit ARF6 zum Guaninnukleotid Austausch. Diese katalytische Aktivität wird dabei durch die Sec7-Domäne vermittelt, wie Untersuchungen mit, in der Sec7-Domäne mutierten Variante, Cytohesin-1 (E157K) belegen. Die Sec7-Domänen enthaltenen GEFs besitzen aber auch *in vivo* dem Substrat gegenüber eine gewisse Redundanz. So konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Gea1p teilweise die Funktion von Gea2p übernehmen kann. Die Deletion eines Allels bewirkt lediglich eine

Reduzierung der Zellproliferationsrate, während die Deletion beider Allele letal ist (Peyroche *et al.*, 1996).

In zahlreichen Befunden wurde die ca. 200 Aminosäure umfassende Sec7-Domäne als der relevante katalytische Faktor für den Guaninnukleotid Austausch der ARFs beschrieben (Chardin *et al.*, 1996; Pacheco-Rodriguez *et al.*; 1998, Beraud-Dufour *et al.*, 1998, Betz *et al.*, 1998, Cherfils *et al.*, 1998, Mossessova *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 5.2.1 dargestellt, ist die Sec7-Domäne ein übereinstimmendes Merkmal aller bisher bekannten ARF-GEFs. Die Grundlagen der ARF/Sec7-Domäne Interaktion auf molekularer Ebene wurden durch Kristall- oder NMR-Struktur der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 (Betz *et al.*, 1998), ARNO (Cherfils *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 1998; Mossesova *et al.*, 1998) und Gea2p aufgeklärt (Goldberg *et al.*, 1998).

Das 23 kDa Polypeptid der Sec7-Domäne bildet eine einzige gestreckte Domäne mit den Dimensionen 55 Å x 25 Å x 25 Å. Sie besteht aus 10 α -Helices, die von A – J bezeichnet werden. Die 7 N-terminalen Helices A – G bilden dabei eine rechtsorientierte Superhelix. Die superhelikale Topologie wird durch die Helix H unterbrochen, die zusammen mit den α -Helices I und J ein Ende der Domäne bedecken. Die Sec7-Domäne stellt somit eine kompakte, stabförmige Struktur mit einer einzigen tiefen Oberflächengrube dar. Die Grube wird durch zwei strukturelle Elemente gebildet (Block1 und Block2), die in der dreidimensionalen Struktur in räumlicher Nähe liegen. Der Block1 bildet eine Schleife, welche die α -Helices F und G verbindet. Dieser Bereich ist der am stärksten konservierte Bereich der Sec7-Domänesequenz. Der Block 1 enthält zudem das invariante Glu156, das homolog zu Glu157 in Cytohesin-1 ist. Die Bedeutung dieses Restes wurde erstmals von Shevell *et al.* (1994) gezeigt, da eine Substitution dieses Restes in Lysin zum Funktionsverlust des Allels führt. Die zweite Region (Block 2), die an der Bildung der Grube beteiligt ist, stellt einen zentralen Abschnitt der α -Helix H dar. Block 2 enthält mehrere nach außen gewandte hydrophobe Aminosäuren mit starker Konservierung zwischen den Sec7-Domänen. Der hohe Grad hydrophober Reste an der Oberfläche lassen hier das aktive Zentrum der Sec7-Domäne vermuten. Tatsächlich belegen Mutationsanalysen, dass Block 1 und Block 2 an der Interaktion und katalytischen Aktivität der Sec7-Domäne beteiligt sind. Durch den Austausch essentieller Aminosäuren wie R152V, R152E, G155N, E156K und Q158A im Block 1 sowie M194K im Block 2 von ARNO kommt es zu einer stark verminderten ARF1-GEF Aktivität, wobei die Substitution des Glu156-Restes den stärksten Einfluss hat. Konsistent damit führt die Substitution des homologen Restes Glu157 zu Lysin in Cytohesin-1 zu einer ARF-GEF inaktiven Cytohesin-1(E157K) Variante. Der Glutamatrest E156 (ARNO) bzw. E157 (Cytohesin-1) destabilisiert das β -Phosphat des gebundenen GDPs und ermöglicht dadurch die Dissoziation des GDP (Goldberg, 1998; Cherfils *et al.*, 1998; Mossessova *et al.*, 1998; Betz *et al.*, 1998). Eine Substitution des Glutamats durch Lysin an dieser Position induziert jedoch keine die Bindungsaffinität zu ARF modifizierende konformationelle Änderung des Cytohesin-1, wie die Bindung von Cytohesin-1 (E157K) an ARFs zeigen. Analoge Untersuchungen an ARNO bestätigen dieses Ergebnis und zeigen somit die hohe strukturelle als auch funktionale Homologie der Sec7-Domänen innerhalb der Cytohesin-Familie (Mossessova *et al.*, 1998, Beraud-Dufour, 1998). In den folgenden Abschnitten werden daher die strukturellen Unterschiede der ARFs diskutiert, die eine Spezifität der ARF/GEF-Interaktion vermitteln können.

5.2.2 ARF/Sec7-Interaktion

Hinweise zum molekularen Mechanismus des Guaninnukleotid Austausches durch die Sec7-Domäne lieferten Untersuchungen zur Interaktion der Sec7-Domäne mit ARF1 (Mossessova *et. al.*, 1998). Um den Einfluss der Myristoylierung und der N-terminalen hydrophoben α -Helix von ARF1 zu umgehen wurde dabei eine im N-Terminus um 17 Aminosäure verkürzte ARF1 Variante verwendet. [Δ 1-17]ARF1 bindet GTP, bleibt jedoch in der GTP-gebundenen Form im Cytoplasma (Jones D. H. *et. al.*, 1999; Goldberg, 1999).

Mit der Hydroxyl-Radikal Protein Footprint Methode-Analyse wurden 2 Regionen von [Δ 1-17]ARF1 durch die Interaktion mit deren Sec7-Domäne vom Abbau geschützt. Diese beiden Regionen betrafen die Aminosäuren 41 – 55 und die Aminosäuren 70 – 80. Bemerkenswerterweise sind diese durch die Sec7-Domäne geschützten Aminosäuren im Footprinting in allen 5 menschlichen ARF Proteinen ARF1 – ARF5 vollständig konserviert, während ARF6 in nur 3 der 26 Aminosäuren abweicht. Diese beiden Regionen liegen in der Kristallstruktur von ARF1 eng nebeneinander und gehören zu zwei, als Switch-1 und Switch-2 bezeichneten, strukturellen Elementen. Kristallstrukturuntersuchungen an Ras haben gezeigt, dass Switch-1 (32 – 40) und Switch-2 (60 – 70) in den konformationellen Wechsel zwischen dem GDP- und GTP-gebundenen Zustand stark involviert sind (Schlichting *et. al.*, 1990). Weiterhin haben neuere strukturelle Untersuchungen bestätigt, dass diese Regionen die Bindung von Ras und Rho-Familien GTPasen an ihre jeweiligen GEF vermitteln (Rittinger *et. al.*, 1997; Scheffzek *et. al.*, 1997). Durch Untersuchungen von Goldberg (1998) zur Interaktion von Gea2p, einem Sec7-Domäne enthaltenden Protein in Hefe, mit ARF1 wurde die Funktion dieser strukturellen Elemente aufgeklärt. In der GDP-gebundenen Form liegt die Switch-2-Region ungeordnet vor und bildet nach Bindung von GTP eine geordnete Struktur aus. Switch-1 liegt weit von der Nukleotid-Bundestelle entfernt. Durch die Bindung von GTP kommt es zum Konformationswechsel. Dadurch können das konservierte Threonin in der Switch-1 und das konservierte Glycin in der Switch-2 Region mit der γ -Phosphatgruppe des GTPs interagieren, während diese beiden Regionen an der Bindung von GDP nicht beteiligt sind. Ein weiteres allgemeines Strukturelement, die P-Schleife mit der charakteristischen Sequenz (G x x x G K S/T), vermittelt die Bindung von GDP und GTP. Die Konformation dieser P-Schleife ist dabei vom gebundenen Guaninnukleotid unabhängig. Die Switch-1 und 2 Regionen sowie die P-Schleife vermitteln hauptsächlich die Interaktion von ARF mit dem GEF. Jedoch kommt es durch die Bindung von ARF-GEF zu einer drastischen Konformationsänderung der P-Schleife. Durch die Interaktion des konservierten Glu-Restes (Cytohesin-1: Glu157), der auch als Glutamat-Finger bezeichnet wird (Beraud-Dufour *et. al.*, 1998), mit dem Aminosäurerest Lys30 in der P-Schleife, die Wasserstoffbrücken mit dem β -Phosphatrests des GDP ausbildet und dadurch das GDP stabilisiert (Amor *et. al.*, 1994), wird die Bindung des β -Phosphats verhindert und es kommt zur Dissoziation von GDP (Beraud-Dufour *et. al.*, 1998). Die Switch-2 Region wird in die geordnete Struktur überführt und interagiert extensiv mit dem GEF. Die Switch-1 Region als auch die beiden Switch-1 und Switch-2 verbindenden Stränge gehen von einer ungewöhnlichen β -Faltblattstruktur der GDP-gebundenen Form in eine GTP-gebundene ähnliche Formation über. Dadurch wird die Guaninnukleotid Bindungsstelle für GTP im Lösungsmittel zugänglich. Die Switch-1 Region stabilisiert die Interaktion zwischen der amphipatischen N-terminalen α -Helix und der Membran durch das Behindern der Bindung der α -Helix an eine hydrophobe Tasche in der ARF1 Oberfläche. Die Daten dieser Arbeit ergaben relevante Hinweise, dass die starken strukturellen Unterschiede innerhalb des N-Terminus von ARF1 und ARF6 möglicherweise die Spezifität der ARF7GEF-Interaktion in Gegenwart von Membranlipiden bedingen (vgl. Abschnitt 5.2.3).

Auf Grund der molekularen Wechselwirkungen kann vermutet werden, dass die Affinität von Cytohesin-1 zu den ARFs von dem gebundenen Guaninnukleotid reguliert wird. Zudem besitzt ARF6_{GDP} zu ARF1_{GDP} auf Grund der Unterschiede im N-Terminus eine um 2-5Å abweichende Kristallstruktur in der Switch-Region (Menetrey J, *et. al.*, 2000). *In vitro* Interaktionsanalysen von bakteriell exprimierten Cytohesin-1 mit den immobilisierten ARF.Ig Chimären ergaben, dass Cytohesin-1 sowohl mit ARF_{GDP} als auch mit ARF_{GTP} wechselwirken kann, wobei die GTP-gebundene Form von ARF1 und ARF6 jeweils höhere Bindungsaffinität zu Cytohesin-1 besaß als die GDP-gebundene Form. Eine Erklärung der Unterschiede der Bindungsaffinitäts von Cytohesin-1 zu ARF1, ARF1 (T31N) und ARF1 (Q71L) bzw. ARF6, ARF6 (T27N) und ARF6 (Q67L) (vgl. Abbildung) kann durch ein Modell der molekularen Ereignisse während der Guaninnukleotid Austauschreaktion gegeben werden (Abbildung 5.2.2). ARF1 bzw ARF6 bilden mit Cytohesin-1 einen ARF/GEF Komplex (B) mit niederer Affinität. GDP dissoziiert von diesem initialen Komplex ab (C) und es entsteht ein hochaffiner binärer Komplex (D). Dieses Intermediat akkumuliert nicht in der Zelle, da die Konzentration von GTP relativ zu GDP höher und somit schnell GTP gebunden wird. Unter *in vitro* Bedingungen dagegen ist die Konzentration der Guanin-Nukleotide zu gering, um die leere Guaninnukleotid Bindestelle zu besetzen und die Reaktion läuft nur bis zum binären Komplex (D) (Paris *et. al.*, 1997). Cytohesin-1 bildet sowohl mit der GDP-gebundenen Form (ARF1 (T31N); ARF6 (T27N)) als auch mit der GTP-gebundenen Form (ARF1 (Q71L); ARF6 (Q67L)) Komplexe (B bzw. F). Auf Grund der reversiblen Gleichgewichtsreaktion kann es zur Destabilisierung des gebundenen Nukleotids kommen und das Gleichgewicht zum hochaffinen binären Komplex (D) verschoben werden (B? D; F? D). Durch den Überschuss von GTP γ S in der *in vitro* durchgeführten Guaninnukleotid Austauschreaktion kann es zur Einlagerung dieses Nukleotids wie bei ARF1 (Q71L) beobachtet kommen. Die verminderte Affinität von Cytohesin-1 zur GDP-gebundenen Form ARF1 (T31N) und ARF6 (T27N) kann durch die Substitution des hoch konservierten Threonin T31 (ARF1) bzw T27 (ARF6) in der Switch-1 bedingt sein. Die Switch-1 Region ist hauptsächlich an der Bindung des GEF beteiligt. Durch Substitution konservierter kritischer Aminosäuren kann es zur Modifizierung der Bindungsaffinität kommen. Jedoch gibt es auch Daten aus einem Two-Hybrid-Screen Experiment, dass Cytohesin-1 die konstitutiv GTP-gebundene Form von ARP (ARPQ79L) (ADP-ribosylation factor-related Protein) mit höherer Affinität bindet als konstitutiv GDP-gebundenes ARP (Schürmann *et. al.*, 1999). Dies wird möglicherweise durch die Substitution des Glutaminrestes zu Leucin verursacht. In der Zelle kommt es nach der Bindung von GTP zur Isomerisierung des Komplexes GEF/ ARF/GTP (F), um die β - und γ -Phosphatgruppen des GTPs zu binden. Dadurch wird die Dissoziation des GEFs initiiert, wobei das Gleichgewicht durch den Überschuss an GTP und die Interaktion von ARF_{GTP} mit Effektorproteinen nach (F) verschoben wird. Das Reaktionsschema impliziert, dass das Nukleotid-freie ARF, in der Zelle wahrscheinlich nicht existiert. Der GEF erfüllt somit zwei Funktionen: er destabilisiert die starke Interaktion von GDP und stabilisiert das Nukleotid-freie G-Protein.

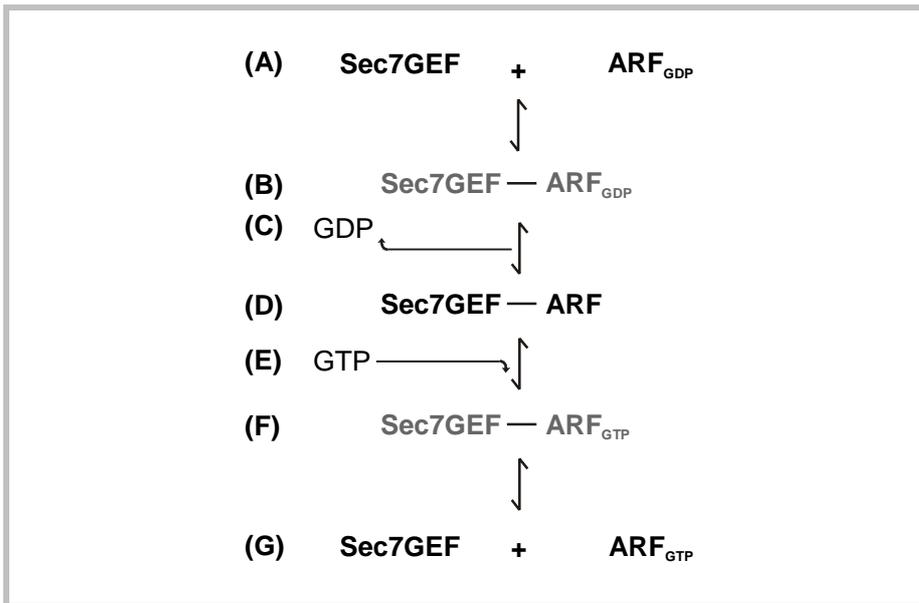


Abbildung 5.2.2: **Modell der Guaninnukleotid Austauschreaktion von ARF durch einen Sec7-Domäne enthaltenden GEF**

5.2.3 Myristoylierung hat Einfluss auf die induzierte GTP Bindung von ARF-Proteinen

5.2.3.1 Myristoylierung von ARF6

Wegen der starken Sequenzkonservierung der direkt miteinander interagierenden Regionen der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 und der ARFs, erfolgt die Spezifizierung der Interaktion auf molekularer Ebene möglicherweise durch Bereiche, die nicht direkt in die Interaktion der Proteine involviert sind (Klarlund *et al.*, 1997; Mossessova, 1998). Daten, die mit der N-terminal verkürzten Mutante $[\Delta 1-13]\text{ARF1}$ erhalten wurden, lassen darauf schließen, dass die N-Termini der ARFs eine wichtige funktionale Rolle besitzen (Kahn *et al.*, 1992; Mossessova *et al.*, 1998). Wie oben erwähnt induziert die Switch-1 Region eine konformationelle Änderung des N-Terminus, der inhibitorisch den Guaninnukleotid Austausch beeinflussen kann (siehe 5.2.2). Die folgenden diskutierten Daten dagegen suggerieren, dass umgekehrt auch der N-Terminus an der Modulation der für den GDP/GTP-Austausch relevanten Bereiche beteiligt ist. So wurde in dieser Arbeit die korrekte N-terminale Modifizierung durch N-Myristoyltransferasen als ein wichtiger Faktor für die Funktion der ARFs erkannt. Alle ARF Proteine enthalten N-terminal die Myristoylierungskonsensussequenz M-G-x-x-x-S/T (Glomset *et al.*, 1994).

Der mit bakteriell exprimierten und aufgereinigtem ARF1 und ARF6 Proteinen durchgeführte *in vitro* Guaninnukleotid Austausch zeigte, dass Cytohesin-1 nur ARF1 gegenüber katalytische Aktivität besitzt. Diese scheinbare Spezifität der katalytischen Aktivität von Cytohesin-1 ist auf die fehlende Myristoylierung von ARF6 in dem verwendeten bakteriellen Expressionssystem zurückzuführen. Durch die Koexpression der N-Myristoyltransferase Nmt1p (*S. cerevisiae*) in *E. coli* kommt es zu einer effizienten Myristoylierung von ARF1, wie die SDS-PAGE Analyse zeigt. Myristoyliertes ARF1 besitzt dabei eine höhere Mobilität als unmyristoyliertes ARF1 und zeigt daher distinkte, voneinander unterscheidbare Banden. Der Nachweis des Myristoylierungsereignisses mittels SDS von ARF1 und

Lck wurde schon von Lodge *et. al.* (1997) und Nadler *et. al.* (1993) beschrieben. ARF6 dagegen wird in dem selben System nur unzureichend myristoyliert, wie das Fehlen einer zweiten Bande mit höherer Mobilität zeigt. Dies ist auf die Substratspezifität von Nmt1p zurückzuführen. Das initiierte Methionin wird durch die Methion-Aminopeptidase während der Translation entfernt und das Glycin wird zur N-terminalen Aminosäure. Jedoch werden nicht alle Proteine mit einem N-terminalen Glycin myristoyliert, da die Fähigkeit von NMT1p erkannt zu werden, von den nachfolgenden Aminosäuren abhängt. So ist an der Position nach dem Glycin nur eine begrenzte Anzahl von Aminosäuren, im allgemeinen ungeladene Aminosäuren (Ala, Ser, Gln, Val, Gly, Leu), erlaubt. Peptide mit großen hydrophoben Resten (Phe, Tyr) werden von Nmt1p erkannt, aber nicht umgesetzt, während negativ geladene Reste (Asp, Glu) nach Glycin von Nmt1p nicht erkannt werden. Peptide mit positiv geladenen Resten (Lys, Arg, His) an dieser Position sind entweder schlechte Substrate für Nmt1p oder werden gar nicht umgesetzt (Towler *et. al.*, 1987; Towler *et. al.*, 1988). ARF6 besitzt an dieser Position den positiv geladenen Rest Lysin und stellt somit ein unzureichendes Substrat der Nmt1p dar. ARF1 dagegen besitzt den ungeladenen Leucinrest und wird von Nmt1p erkannt und umgesetzt. Unter *in vitro* Bedingungen wurde weder Cytohesin-1 noch ARNO als Guaninnukleotid Austauschfaktor für rekombinantes ARF6 erkannt (Meacci *et. al.*, 1997, Pacheco-Rodriguez *et. al.*, 1998). Hinweise, dass ARNO, EFA6 und in neuesten Untersuchungen Cytohesin-1 GEFs für ARF6 darstellen, wurden unter *in vivo* Bedingungen durch funktionale Untersuchungen erhalten (Frank *et. al.*, 1998; Caumont *et. al.*, 2000; Franco *et.*, 1999). Langille *et. al.* (1999) gelang es zu zeigen, dass ARF6 sowohl *in vivo* als auch rekombinantes ARF6 *in vitro* als Substrat von GRP-1 umgesetzt wird.

Die gewonnenen Daten lassen somit vermuten, dass durch die möglicherweise inkorrekte Modifikation von ARF6 im bakteriellen Expressionssystem die Ergebnisse dieser Studien beeinträchtigt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten mit eukaryontisch exprimierten ARFs zeigen, dass sowohl ARF1 als auch ARF6 von Cytohesin-1 *in vitro* erkannt und umgesetzt werden. Diese Daten lassen vermuten eine wichtige Rolle der N-terminalen Myristoylierung und einer möglichen Interaktion mit Membranlipiden bei der Cytohesin-1 vermittelten Guaninnukleotid Austauschreaktion (vgl. Abschnitt 4.6.5). Diese Ergebnisse bestätigen, dass ARF6 in eukaryontischen Zellen wie T-Zellen und COS Zellen myristoyliert wird, jedoch nicht von der Nmt1p aus *S. cerevisiae* umgesetzt werden.

5.2.3.2 Lokalisation und Funktion sind von der Myristoylierung abhängig

Die Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF Proteinen wird möglicherweise durch die Lokalisierung der Proteine *in vivo* spezifiziert. Die kotranslationale Modifikation von Proteinen mit Myristat besitzt entscheidenden Einfluss sowohl auf die korrekte Lokalisierung in distinkten Zellkompartimenten als auch auf die Funktion (Wilcox *et. al.*, 1987; Boutin, 1997). Die Mutation des Glycinrestes an Position 2 von ARF1 (*S. cerevisiae*) resultiert in einem Funktionsverlust (Kahn *et. al.*, 1995). Die Lokalisierung der ARF Proteine wird durch den Myristatrest relevant beeinflusst. Durch die Substitution des Glycinrestes an Position 2 durch Alanin entstehen myristoylierungsdefiziente ARF Varianten, die zu den myristoylierten ARF Proteinen eine distinkte Zelllokalisierung besitzen. Unmyristoylierte Proteine wie ARF1 (G2A) und ARF6 (G2A) liegen delokalisiert im Cytoplasma vor. Die Delokalisierung erfolgt nicht zelltypspezifisch, sondern kann sowohl in Jurkat LT- als auch COS-Zellen beobachtet werden. Die Myristoylierung dagegen bewirkt die Rekrutierung der Proteine in Zellkompartimente, die für endogenes ARF1 bzw ARF6 beschrieben werden (Peters *et. al.*, 1995; Radhakrishna und Donaldson, 1997; Song *et. al.*, 1998; D'Souza-Schorey *et. al.*, 1995). Jedoch ist die distinkte Lokalisierung der ARF Proteine nicht auf die Modifikation alleine zurückzuführen, da myristoyliertes ARF1 zu anderen Zellkompartimenten als ARF6 rekrutiert wird. Die N-terminale Modifikation der ARFs stellt somit nur

einen coregulatorischen Einfluss dar, wobei die genaue Lokalisierung durch die Struktur der ARFs determiniert wird. Dies lässt auf einen möglichen regulatorischen Einfluss des N-Terminus auf die Membranassoziation wie auch auf den gerichteten Proteintransport schließen. So konnte durch Substitution des N-terminalen Bereiches von ARF6 durch den N-Terminus von ARF1 die Lokalisierung des daraus resultierenden Hybridproteins ARF6_1N beeinflusst werden, wobei das Expressionsmuster von ARF6_1N und ARF1 sehr hohe Ähnlichkeit besaßen (eigene Daten nicht gezeigt, Al-Awar *et. al.*; 2000). Der genaue Mechanismus, wie der gerichtete Proteintransport myristoylierter Proteine in der Zelle erfolgt, bleibt jedoch unklar. Eine Möglichkeit bietet die Regulation des gerichteten Proteintransports durch Phosphatidylinositole (vgl. 5.2.4.1).

5.2.3.3 Die Membranaffinität ist abhängig vom gebundenen Guanin-Nukleotid

Neben der Myristoylierung ist auch das gebundene Guaninnukleotid entscheidend für die Membranaffinität. Mit der Katalyse des GDP/GTP Austausches korreliert ein Wechsel der Interaktion von ARF Proteinen mit den Membranen. So zeigten die konstitutiv GDP-gebundenen Varianten ARF1 (T31N) und ARF6 (T27N) ein zu ARF1 und ARF6 distinktes Expressionsmuster. Die GDP-gebundenen Formen lokalisieren diffus in der Zelle und besitzen eine geringere Membranaffinität (Franco *et. al.*, 1995, Antonny *et. al.*, 1997) (vgl. Abbildung 4.6.3). Dagegen kommt es durch die Bindung von GTP bei den Varianten ARF1 (Q71L) und ARF6 (Q67L) zur Membranlokalisierung.

Einblick in den molekularen Mechanismus der Membranassoziation der ARF Proteine konnten durch neuere Untersuchungen gewonnen werden. In der GDP-gebundenen Form wird die N-terminale α -Helix in einer hydrophoben Tasche auf der Oberfläche von ARF1 verborgen (Amor *et. al.*, 1994; Greasley *et. al.*, 1995), während in der GTP-gebundene Form die hydrophobe Tasche eliminiert und die N-terminale Helix für die Membraninteraktion vollständig verfügbar ist (Antonny *et. al.*, 1997, Losonczi and Prestegard, 1998, Goldberg, 1998). Nach dem stark vereinfachten Modell von Serafini *et. al.* (1991) liegt ARF1_{GDP} im Cytosol vor. Durch die Interaktion von ARF1 mit den GEFs kommt es zur Konversion von der GDP- zur GTP-gebundenen Form. Dadurch wird eine konformationale Änderung des N-Terminus bewirkt, durch welche die Myristoylgruppe zugänglich für Membraninteraktionen wird. Dieses Modell wird auf Grund seiner Analogie zu dem „Ca²⁺-Myristoyl“ Schaltermodell des Proteins Recoverin (Zozulya *et. al.*, 1992) als „Myristoyl-GTP-Wechsel“ bezeichnet.

Ein Teil des unmyristoylierten ARF1 (G2A) und ARF6 (G2A) ist jedoch in der Membranfraktion lokalisiert. Dies impliziert, dass die Membranassoziiierung nicht ausschließlich über den Myristoylrest erfolgt. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Interaktion von ARF1 mit der Membran nicht nur über die Myristoylgruppe erfolgt, sondern auch eine Protein/Lipid-Interaktion beteiligt ist. So bindet nicht-myristoyliertes ARF_{GTP,S} stark an Phospholipide, während ARF_{GDP} nur schwach mit Phospholipiden assoziiert ist (Franco *et. al.*, 1995; Antonny *et. al.*, 1997; Losonczi und Prestegard, 1998). Die hoch konservierten N-terminalen hydrophoben Aminosäurereste der α -Helix von ARF1 sind dabei vermutlich in die GTP-abhängige, reversible Assoziation des Proteins mit der Membran involviert. NMR-Untersuchungen an sowohl myristoylierten als auch unmyristoylierten Peptidfragmenten des N-Terminus von ARF1 ergaben jeweils eine α -helikale Struktur der Peptide in einer Lipidumgebung. Die Membranassoziation wird somit durch eine Kombination aus der Interaktion der Myristatketten und der Proteinoberfläche mit den Lipiden verursacht (Losonczi *et. al.*, 2000).

5.2.3.4 Die Interaktion von ARF mit Membranen ist für ihre Aktivierung wichtig

Beraud-Dufour *et al.* (1999) zeigten, dass die Interaktion von ARF1 mit Membranlipiden für die Katalyse der GDP Dissoziation durch ARNO als GEF notwendig ist. Diese Daten von Beraud-Dufour *et al.* (1999) unterstützen die Idee, dass die Interaktion der N-terminalen Helix von ARF1 mit Membranlipiden ein frühes Ereignis in der Sec7-Domäne katalysierten Guaninnukleotid Austauschreaktion darstellt und für alle weiteren nachfolgenden Schritte einschließlich der Destabilisierung von GDP durch den Glutamatfinger der Sec7-Domäne notwendig sind.

So wird von Pacheco-Rodriguez *et al.* (1999) postuliert, dass ARF_{GDP} zuerst mit Membranen assoziieren muss, um vom GEF erkannt zu werden. Kristalluntersuchungen der Interaktion von ARF1 mit der Sec7-Domäne von Gea2p zeigen, dass ARF in der inaktiven Form nicht mit der Bindungsstelle des GEF interagieren kann. Daher muss ARF erst eine Konformationsänderung durchlaufen, die für lösliches ARF energetisch ungünstig ist, aber durch die Assoziation mit Membranlipiden stabilisiert wird. Dem N-terminalen Bereich der ARFs kommt für die Membranrekrutierung und Regulation des Guaninnukleotid Austauschs eine entscheidende Rolle zu. So konnten Pacheco-Rodriguez *et al.* (1999) zeigen, dass der N-Terminus von ARF1 in die Regulation der GDP/GTP Austauschreaktion involviert ist. Die um 17 Aminosäure verkürzte Variante [Δ 1-17]ARF1 besitzt eine höhere GTP Bindungsrate als myristoyliertes Wildtyp ARF1 in Abwesenheit von Membranlipiden (Hong *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1995; Kahn *et al.*, 1992). Die Daten von Pacheco-Rodriguez *et al.* (1999) lassen vermuten, dass der N-Terminus als GDP Dissoziationsinhibitor im Cytoplasma in Gegenwart von Cytohesin-1 funktioniert. Erst durch die Myristoylierung und der damit verbundenen Membranassoziation werden die ARFs durch dadurch bedingte Konformationsänderung zugänglich für die GEFs. Im Falle von ARF1 und ARF6 bedeutet dies, dass durch die Modifikation durch den Myristoylrest eine Interaktion von ARF6 mit Cytohesin-1 erst ermöglicht wird. Die physiologische Bedeutung der Myristoylierung könnte somit ein Regulationsmechanismus der ARF/GEF Interaktion sei, da die Myristoylierung notwendig für die biologische Aktivität ist (Donaldson und Klausner, 1994, D'Souza-Schorey und Stahl, 1995). Unmyristoyliertes und somit unspezifisch im Cytoplasma lokalisiertes ARF wird von Cytohesin-1 nur in geringem Maß als Substrat erkannt. Dadurch wird gewährleistet, dass der Guaninnukleotid Austausch und die Aktivierung der ARFs erst auf zelluläre Signale hin nach Membranrekrutierung erfolgt (Abbildung 5.2.3).

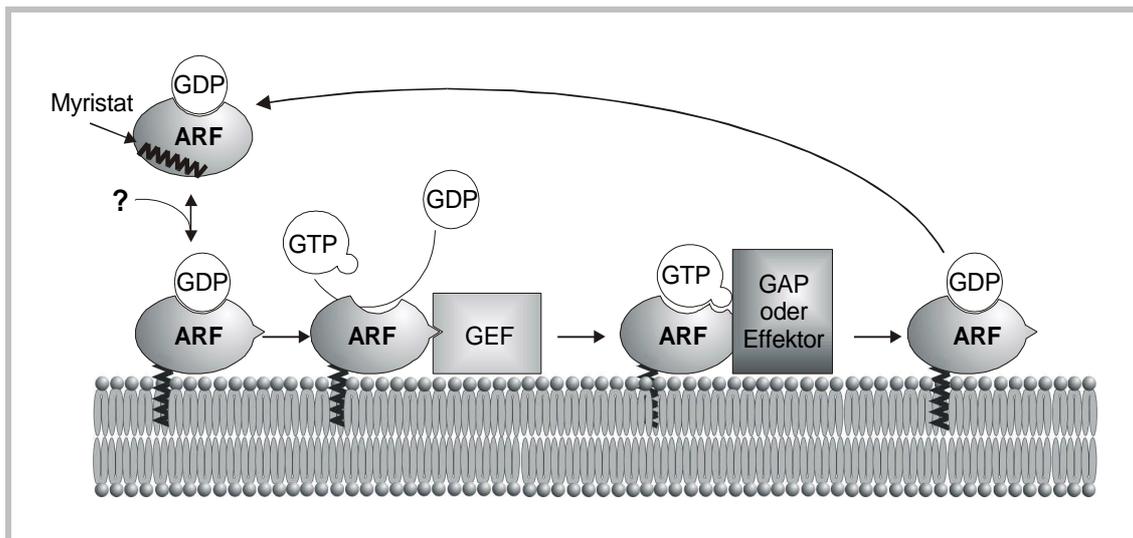


Abbildung 5.2.3: **Die ARF/GEF-Interaktion erfolgt an der Membran**

Damit im Widerspruch stehen die eigenen Daten der *in vitro* Guaninnukleotid Austauschreaktion. Eine Katalyse des GDP/GTP Austausches erfolgt auch in Liposomen-freien Medium. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion der ARFs mit Lipiden keine notwendige Voraussetzung für die Aktivität *in vitro* ist. Jedoch kann in unserem System nicht ausgeschlossen werden, dass die immunpräzipitierten ARF.Ig Proteine aus lysierten Zellen mit dem nichtionischen Detergens TritonX-100 Membranreste über den N-terminalen Abschnitt gebunden haben, welche die Anwesenheit von Membranen mimiken können. Möglicherweise sind ARF1 und ARF6 mit Lipid-Rafts (vgl Abschnitt 1.1) assoziiert, die gegenüber einer TritonX-100 Behandlung unsensibel sind. Lipid-Rafts werden als kostimulatorische Struktur der T-Zellaktivierung nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes diskutiert (Moran und Miceli, 1998; Viola *et. al.*, 1999; Harder und Simons, 1999). Dies stellt eine interessante Möglichkeit dar, da Integrine an der Ausbildung der Lipid-Rafts beteiligt sind (Grakoui *et. al.*, 1999), die möglicherweise über den CD18-Anteil mit Cytohesin-1 interagieren und so ARF Proteine in die Lipid-Rafts rekrutieren. Dies würde bedeuten, dass ARF Proteine bei der T-Zell Aktivierung eine Rolle spielen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass aktiviertes ARF6 kostimulatorisch zur Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes wirkt. Dieser Punkt wird in Abschnitt 5.4.1 genauer diskutiert.

5.2.4 Die Regulation des Guaninnukleotid Austausches durch Lipid-modifizierende Proteine

Die Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes resultiert in einer Aktivierung Lipid-modifizierender Enzyme. Im folgenden Abschnitt soll daher die Regulation des Guanin-Nukleotid-Austauschs durch Membranlipide in der Zelle diskutiert werden.

5.2.4.1 Lipide beeinflussen die Proteininteraktion und Aktivität der ARF Proteine

In mehreren Studien war gezeigt worden, dass die Membranassoziation von Cytohesin-1 (Nagel *et. al.*, 1998), ARNO (Venkateswarlu *et. al.*, 1998a) und GRP-1 (Venkateswarlu *et. al.*, 1998b) durch Signale, die zur Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI(3)-Kinase) führen, reguliert wird. In allen Fällen konnte durch die Inhibition der PI(3)-Kinase durch Wortmannin (Arcaro und Wymann; 1993;

Yano *et al.*; 1993) die Membranrekrutierung verhindert werden. Die Stimulation der PI(3)-Kinase führt zur Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃, welcher als membranständiger Botenstoff dient. PtdIns(4,5)P₂ wird durch Phosphorylierung des Inosit-Rests von Phosphatidylinosit (PtdIns) in 4'- und 5'-Stellung durch spezifische Kinasen gebildet (Übersicht Kimberley *et al.*; 1999). In einer weiteren Reaktion kann das PtdIns(4,5)P₂ von der Phospholipase C gespalten werden, wobei die beiden löslichen sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet werden. Beide Verbindungen besitzen Signalcharakter, die weitere Reaktionsketten aktivieren können. Ins(1,4,5)-P₃ aktiviert die Freisetzung von Ca²⁺, während Diacylglycerol primär über die Stimulierung der Proteinkinase C wirkt (Berridge and Irvine, 1989; Berridge, 1993).

Die hochaffine Membranbindung von Cytohesin-1, ARNO und GRP-1 wird durch die PH Domäne und der carboxyterminalen Domäne reguliert (Klarlund *et al.*, 1998; Chardin *et al.*, 1996; Radhakrishna *et al.*, 1996; Nagel *et al.*, 1998; Dierks persönliche Mitteilung). So bindet die PH Domäne von ARNO PtdIns(4,5)P₂ (Venkateswarlu *et al.*, 1998a), während die PH Domäne von Cytohesin-1 PtdIns(3,4,5)P₃ mit höherer Affinität als PtdIns(4,5)P₂ binden (Nagel *et al.*, 1998a, Nagel *et al.*, 1998b). Dies lässt vermuten, dass die Rekrutierung der GEFs durch gezielte Veränderung der Membranlipide nach zellulären Signalen die Aktivierung der ARFs initiiert (vgl. Abbildung 5.2.3). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass die Aktivierung der ARFs auf der Ebene der Membranlipide reguliert werden kann (vgl. Abbildung 5.2.4). Obwohl der Guaninnukleotid-Austausch sowohl von ARF1 als auch von ARF6 in Gegenwart von Membranlipiden durch Cytohesin-1 gleichermaßen katalysiert wird, erfolgt eine Regulation dieser Reaktion durch PtdIns(4,5)P₂. Die Interaktion und katalytische Aktivität von Cytohesin-1 gegenüber ARF6 wird durch PtdIns(4,5)P₂ inhibiert, während sie auf ARF1 stimulierend wirkt. Noch dramatischer wirkt sich dieser Effekt durch die Verwendung von PtdIns(3,4,5)P₃ auf den Austausch von GDP zu GTP bei den einzelnen ARFs aus. So wurde die Aktivität von ARF1 durch PtdIns(3,4,5)P₃ gesteigert, während die Guaninnukleotid-Austauschaktivität von ARF6 fast vollständig inhibiert wurde. Konsistent damit sind Daten, nach denen Cytohesin-3 (GRP-1) den Guaninnukleotid-Austausch in Gegenwart von PtdIns(3,4,5)P₃ von ARF1 und ARF5, aber nicht von ARF6 steigert (Klarlund *et al.*, 1998). Dabei konnte ein unspezifischer Effekt durch die Verwendung von Liposomen mit verschiedenen Anteilen der Phospholipide ausgeschlossen werden. Die Phosphoinositole scheinen dabei jedoch nicht direkt die katalytische Aktivität der ARF-GEFs zu steuern. So ist bekannt, dass die Guaninnukleotid-Austauschaktivität von myristoyliertem ARF1 von ARNO in Gegenwart von PtdIns(4,5)P₂ stimuliert wird. Jedoch besitzt PtdIns(4,5)P₂ keinen Einfluss auf den von ARNO katalysierten GDP/GTP Austausch von ARF1 mit einer Deletion der 17 N-terminalen Aminosäuren. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung der Phosphatidylinositole an die PH Domäne keine Steigerung der katalytischen Aktivität von ARNO bzw. Cytohesin-1 bewirken, sondern möglicherweise die ARF/GEF-Interaktion verstärkt.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die zentralen Aminosäuren 140 – 181 von ARF1 wichtig für den von Cytohesin-1 katalysierten Guaninnukleotid-Austausch sind. In der Kristallstruktur von ARF_{GDP} (Greasely *et al.*, 1994; Greasely *et al.*, 1995; Amor *et al.*, 1994) zeigte sich, dass die N- und C-terminalen Helices zusammen parallel auf der Moleküloberfläche liegen. Beide Regionen sind in die Membranbindung involviert (Randazzo, 1997a/b). Unterschiede zwischen den ARF Sequenzen sind nahe des C-Terminus am größten (vgl. Abbildung 4.2.1). Diese Variabilität dient möglicherweise als eine Grundlage für die gezielte Protein/Protein Interaktion und für die Rekrutierung der Proteine in intrazelluläre Kompartimente. Sehr wenig ist über die Funktion des C-Terminus bekannt, jedoch wurden Arg-178 und Lys-181 als kritische Reste der Bindung von PtdIns(4,5)P₂ erkannt (Randazzo, 1997). Im N-Terminus sind die Aminosäurereste Lys-15 und Lys-16 an der Interaktion mit

PtdIns(4,5)P₂ beteiligt. Die Aminosäurereste Lys-15 und Lys-16 sind in allen humanen ARFs konserviert, wobei die einzige Ausnahme dabei ARF6 bildet (vgl. Abbildung 4.2.1, mit „*“ markiert). ARF6 besitzt im analogen Bereich die Aminosäuren Asn-11 und Lys-12. Zudem enthält der verkürzte C-Terminus keine den kritischen Aminosäurereste Arg-178 und Lys-181 analogen Aminosäuren für die PtdIns(4,5)P₂-Bindung. Auf Grund dieser strukturellen Unterschiede von ARF1 und ARF6 lässt sich ableiten, dass ARF6 durch Phosphatidylinositole auf molekularer Ebene nach anderen Mechanismen reguliert wird als ARF1.

5.2.4.2 Die Initiation der ARF-Aktivierung

PtdIns(4,5)P₂ besitzt neben seiner Funktion als Vorläufermolekül für Ins(1,4,5)P₃ und DAG, durch die von Phospholipase C katalysierte Spaltung nach agonistenabhängiger Stimulation (vgl. Abbildung 5.2.5), weitere Funktionen. So kann PtdIns(4,5)P₂ nicht nur als Substrat für Phospholipasen sondern auch für Phosphoinositidkinasen dienen und dadurch weitere sekundäre Lipid Signalmoleküle generieren, die in Signalwegen impliziert sind. In den meisten Zellen wird der PtdIns(4,5)P₂-Spiegel nach Stimulation durch einen Agonisten nicht merklich erhöht. Jedoch kommt es durch die Rekrutierung der Lipidkinasen in spezifische Zellkompartimente zu einer örtlichen Erhöhung der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration (vgl. Abschnitt 5.2.4.3). In diesem Zusammenhang interessant ist die Frage, wie es zur initialen Bindung und Aktivierung der ARF-GEFs kommt. Die Phosphoinositole spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der verschiedenen Proteine und sind dadurch in die Regulation des gerichteten Vesikeltransportes involviert. Es ist wahrscheinlich, dass die ARFs an die Membran durch ionische Interaktion mit PtdIns(4,5)P₂ oder anderen Lipiden und einer anschließenden Insertion des N-terminalen Myristatrestes in die Membran binden. Eine Rekrutierung der ARFs durch die GEFs in die Membran wird durch Daten widerlegt, die zeigen, dass eine Aktivierung der ARFs in Gegenwart von Trypsin-behandelten Golgi-Membranen (Randazzo *et. al.*, 1993) oder Phospholipid-Vesikeln (Franco *et. al.*, 1995) erfolgt.

Vielmehr werden die ARFs durch noch unverstandene Mechanismen an die Membran rekrutiert. Dort erfolgt durch die Bindung der ARFs an die Membranen eine konformationale Änderung, die eine Aktivierung und somit Interaktion mit dem GEF erlaubt (vgl. Abbildung 5.2.4 A). Dies erfordert möglicherweise den Kontakt des GEFs mit anderen Proteinen. Als ein dafür potentiell Kandidatenmolekül wurde die Interaktion von CD18 mit Cytohesin-1 auf den Guaninnukleotid-Austausch von ARF6 untersucht. Die Daten dieser Untersuchungen (Abbildung 4.6.14) zeigen, dass der durch Cytohesin-1 katalysierte Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 durch CD18 inhibiert werden kann. Für die Inhibition des Cytohesin-1 vermittelten GDP/GTP-Austausches der ARFs konnte dabei der N-terminale Bereich der cytoplasmatischen Domäne identifiziert werden. Der C-terminale cytoplasmatische Bereich nimmt keinen Einfluss auf diese Reaktion. Die Kompetition der ARF/Cytohesin-1 Interaktion ist auf eine Inhibition der spezifischen Bindung zurückzuführen, da Cytohesin-1 in Anwesenheit von CD18 nicht mit ARF1 und ARF6 interagieren kann. Konsistent damit sind Untersuchungen von Christiane Geiger im Rahmen ihrer Dissertation zur direkten CD18/Cytohesin-1 Interaktion durch Mutationsanalysen der cytoplasmatischen Domäne von CD18. Durch Mutation des membranproximalen Aminosäuretripletts WKA zu TRG an Position 723 bis 725 kommt es zu einer CD18 Variante, die nicht mehr mit Cytohesin-1 interagieren kann. Die Expression der Mutante CD18(WKA 723-725 TRG) stellt zwar, wie die Expression von CD18-Wildtyp, die Oberflächenexpression von LFA-1 in den CD18 defizienten SK-β2.7 Zellen wieder her, jedoch kann durch Cytohesin-1 nach Expression von CD18(WKA 723-725 TRG) keine Adäsion an ICAM-1 vermittelt werden (Geiger *et. al.*, 2000).

Durch die Verwendung von Cytohesin-1 (E157K) wurde gezeigt, dass der Glutamat-Finger der Sec7-Domäne an der Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18 nicht beteiligt ist. So interagiert sowohl Wildtyp als auch Cytohesin-1 (E157) mit den ARFs. Diese Interaktion wird spezifisch von dem membranproximalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne inhibiert. Nach Punktmutation der ersten 3 Aminosäuren WKA zu TRK erfolgte keine Inhibition der ARF/Cytohesin-1 Interaktion. Dies ist kongruent zu analogen Untersuchungen von Christiane Geiger im Rahmen ihrer Dissertation. Christiane Geiger konnte in dem „Two-Hybrid“ System zeigen, dass durch die Substitution der Aminosäurereste WKA zu TRG CD18 nicht mehr mit Cytohesin-1 interagieren kann. Nach der Expression dieser CD18(WKA -TRG)-Variante erfolgt keine Adhäsion von CD18 defizienten Zellen an ICAM-1, während die Adhäsion nach Expression von Wildtyp-CD18 rekonstituiert werden kann. Zudem bedeutet dies, dass eine Interaktion von CD18 mit Cytohesin-1 unabhängig von der Bindung des Cytohesin-1 und der damit bedingten Aktivierung von ARF erfolgt. Dies ist kongruent mit der Tatsache, dass CD18 die Interaktion von Cytohesin-1 mit der GDP wie der GTP-Form von ARF6 inhibiert. Daher muss gefolgert werden, dass die Interaktion von Cytohesin-1 an CD18 bzw an ARF unabhängige Ereignisse darstellen. Unklar dabei bleibt jedoch die Frage, wie diese beiden Interaktionen reguliert werden. Mögliche Regulationsmechanismen stellen die unabhängige Rekrutierung von ARF und Cytohesin-1 an die Plasmamembran durch Phospholipide und andere Proteine dar.

Nach den oben diskutierten Modellen (Abbildung 5.2.3 und Abbildung 5.2.4) erfüllen die Phosphatidylinositole PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ zwei Aufgaben. Erstens dienen sie dazu, die Membranbindung und konformationale Änderung der ARFs zu induzieren und zweitens erfolgt die Rekrutierung der GEFs über Phosphatidylinositole. Ungeklärt dabei ist jedoch die Frage, wie es zur initialen Erhöhung der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration kommt. Als ein mögliches Modell dabei wird die unspezifische Membranassoziation von ARF_{GDP} und eine basale Nukleotid-Austauschrate diskutiert (Goldberg, 1999). Für die Funktion des aktivierten ARFs ist die Hydrolyse des GTPs entscheidend, die durch die ARF-GAPs reguliert wird. Nach diesem Modell beeinflussen somit Regulatoren der Lipid-modifizierenden Enzyme bzw. deren Lokalisation in der Zelle die Aktivität der GEFs und GAPs von ARF. Alternativ dazu könnte ein Membranprotein als hochaffine Bindungsstelle für die ARF-GEFs dienen und somit die Interaktion in der Zelle mit ARF definieren. Lipid-modifizierende Proteine könnten dann die Rate des Guanin-Nukleotid-Austauschs beeinflussen und somit die Aktivität der ARFs, aber würden keinen Einfluss auf den Zellbereich haben, in dem die Aktivierung erfolgt.

5.2.4.3 Die ARFs werden zu distinkten Membrankompartimenten dirigiert und erfüllen verschiedene Aufgaben

In diesem Zusammenhang stellt sich daher die Frage, wie die Rekrutierung der ARFs in die verschiedenen Membrankompartimente, wie der Golgimembran oder cytoplasmatische Membran, erfolgt und welche Funktion sie dort übernehmen. Eine wichtige Komponente der gerichteten Rekrutierung der ARFs in die entsprechenden Membrankompartimente stellt der N-terminale Myristatrest dar (siehe Abbildung 4.6.4). Unmyristoyliertes ARF1 und ARF6 lokalisieren unspezifisch im Cytoplasma. Jedoch stellt die Myristoylierung nur ein notwendiges, aber nicht ausreichendes Ereignis für den gerichteten Transport der ARFs in der Zelle dar. Durch die Myristoylierung erfolgt die Rekrutierung der ARF Proteine in distinkte Zellkompartimente. So konnte mit dem chimären ARF1-Ig eine Lokalisierung im Golgi-Komplex gezeigt werden, während ARF6-Ig überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert ist. Für ARF1 wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass es im Golgi-Komplex lokalisiert ist (Stearns *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1993; Donaldson und Klausner, 1994; Peters *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu lokalisiert ARF6 in der Zellperipherie und wandert in einer

Guaninnukleotid abhängigen Weise zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten (D-Souza-Schorey *et. al.*, 1995; Peters *et. al.*, 1995). ARF6 wurde dabei als Regulator des Membranverkehrs, der Membran- und Cytoskelettumgestaltung erkannt (Radhakrishna *et. al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et. al.*, 1997; Song *et. al.*, 1998), ARF1 dagegen ist an der Vesikelbildung am Golgi beteiligt. Die Rekrutierung der ARFs zu den jeweiligen Kompartimenten wird möglicherweise durch den N-Terminus determiniert, da eine N-terminal verkürzte Variante [Δ 1-17]ARF1 unspezifisch im Cytoplasma lokalisiert (Kahn *et. al.*, 1992; Randazzo *et. al.*, 1994). Möglicherweise bewirkt die Myristoylierung eine Konformation, die eine Interaktion der ARFs mit Proteinen oder Membranlipiden in spezifischer Art und Weise ermöglicht. Jedoch ist es nach den bisher veröffentlichten Daten unwahrscheinlich, dass die Rekrutierung der ARFs über einen spezifischen GEF erfolgt (Randazzo *et. al.*, 1995; Franco *et. al.*, 1996; Paris *et. al.*, 1997). Zudem wird diskutiert, ob eine Interaktion von ARF mit dem GEF erst nach Bindung an die Membran erfolgen kann (Franco *et. al.*, 1996; Paris *et. al.*, 1997; Goldberg, 1998). Jedoch könnten die Daten dieser Arbeit auch so interpretiert werden, dass Cytohesin-1 sowohl mit cytoplasmatisch lokalisiertem ARF als auch mit membrangebundenen ARF wechselwirken kann und somit die Rekrutierung der ARFs an die Membran ermöglichen. So bindet Cytohesin-1 unter Bedingungen, in denen *in vitro* ein Guaninnukleotid-Austausch stattfindet, mit indifferenten Affinität an die ARFs aller drei Klassen. Die fehlende Spezifität der Sec7-Domänen enthaltenden GEFs jedoch machen einen solchen Mechanismus erst in Gegenwart eines weiteren spezifischen Signals sinnvoll. Die genaue Natur dieses Signals ist noch unklar, auch wenn die Lipidzusammensetzung der Membranen eine Rolle dabei spielen dürften. Der molekulare Aufbau einer Membran determinieren die Funktion dieses Membranbereiches. So werden die Integrine durch Erhöhung des Cholesterinanteils in spezifische Membranbereiche, den Lipid-Rafts, dirigiert.

Die genaue Lokalisierung der GEFs Cytohesin-1, ARNO und GRP-1 ist noch unklar. So wird Cytohesin-1 als cytoplasmatisches Protein nach Aktivierung der PI(3)-Kinase spezifisch an die Plasmamembran rekrutiert, wobei die PH-Domäne als essentieller Faktor erkannt wurde. Die PH-Domäne von Cytohesin-1 bindet dabei PtdIns(3,4,5)P₃. Durch Überexpression der PH-Domäne kann die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 inhibiert werden, während die Überexpression der PH-Domäne der Bruton's Kinase keinen Effekt hat (Nagel *et. al.*, 1998). Zudem konnte eine Kolo-kalisierung von Cytohesin-1 mit LFA-1 gezeigt werden (Geiger *et. al.*, 2000). Jedoch wurde auch gezeigt, dass die CC-Domäne die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Golgi-Membran steuert (Lee und Pohajdak, 2000). Möglicherweise wird Cytohesin-1 in verschiedene Zellkompartimente rekrutiert, wo es die Aktivität der in diesem Kompartiment lokalisierten ARFs in einer lipidabhängigen Weise reguliert.

5.2.5 Die Regulation der ARF-Aktivität in der Zelle

Anhand der gewonnenen und gerade diskutierten Daten lässt sich ein funktionales Modell (Abbildung 5.2.4) entwerfen, wie die Aktivität von Cytohesin-1 und ARF1 bzw. ARF6 durch die Zusammensetzung der Membran reguliert werden kann. Durch die Aktivierung der Phosphatidylinositolkinasen wie der PI(3)-Kinase kommt es zu einer lokalen Erhöhung der Phosphatidylinositolkonzentration (PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃) in der Plasmamembran. Über die PH-Domäne erfolgt die Rekrutierung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Cytohesin-1 an die Membran. Die Rekrutierung der ARFs an die Membran erfolgt über den Myristoylrest an die Membran (vgl. Abbildung 5.2.3), wobei die Rolle der Interaktion der ARFs mit Phosphatidylinositolen bzw. mit

dem GEFs für die Membranrekrutierung noch unklar sind. An der Membran kann es wegen konformationeller Änderungen zu einer Wechselwirkung der beiden Proteine kommen und die GDP Dissoziation durch Cytohesin-1 katalysiert werden. Die Phosphatidylinositole könnten zudem molekulare Umlagerungen induzieren, welche die GDP Abspaltung erleichtern bzw. die Proteinwechselwirkung begünstigen. Dieser Regulationsmechanismus kann für ARF1 in Betracht gezogen werden (positive Regulation, Abbildung 5.2.4 A). Die durch Phosphatidylinositol bewirkte Inhibition des Guanin-Nukleotid-Austausches von ARF6 kann demnach auf zwei Mechanismen beruhen (Abbildung 5.2.4 B und C). Zum einen könnte durch die Bindung von Phosphatidylinositol an die PH-Domäne von Cytohesin-1 eine strukturelle Änderung der Sec7-Domäne bewirkt werden, so dass das katalytische Zentrum nicht mehr mit ARF6 wechselwirken kann. Auf Grund der Interaktionsanalysen in Gegenwart von phosphatidylinositolhaltigen Vesikeln von Cytohesin-1 mit ARF6 erscheint jedoch der in Abbildung 5.2.4 B dargestellte negative Regulationsmechanismus für die Inhibition des GDP/GTP-Austausches von ARF6 nach Bindung des $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ irrelevant. Vielmehr könnte durch die Assoziation von ARF6 über den C-Terminus mit $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ eine Konformation induziert werden (vgl. Abschnitt 5.2.4.1), in der die GDP Dissoziation nur sehr langsam erfolgen kann (Abbildung 5.2.4)

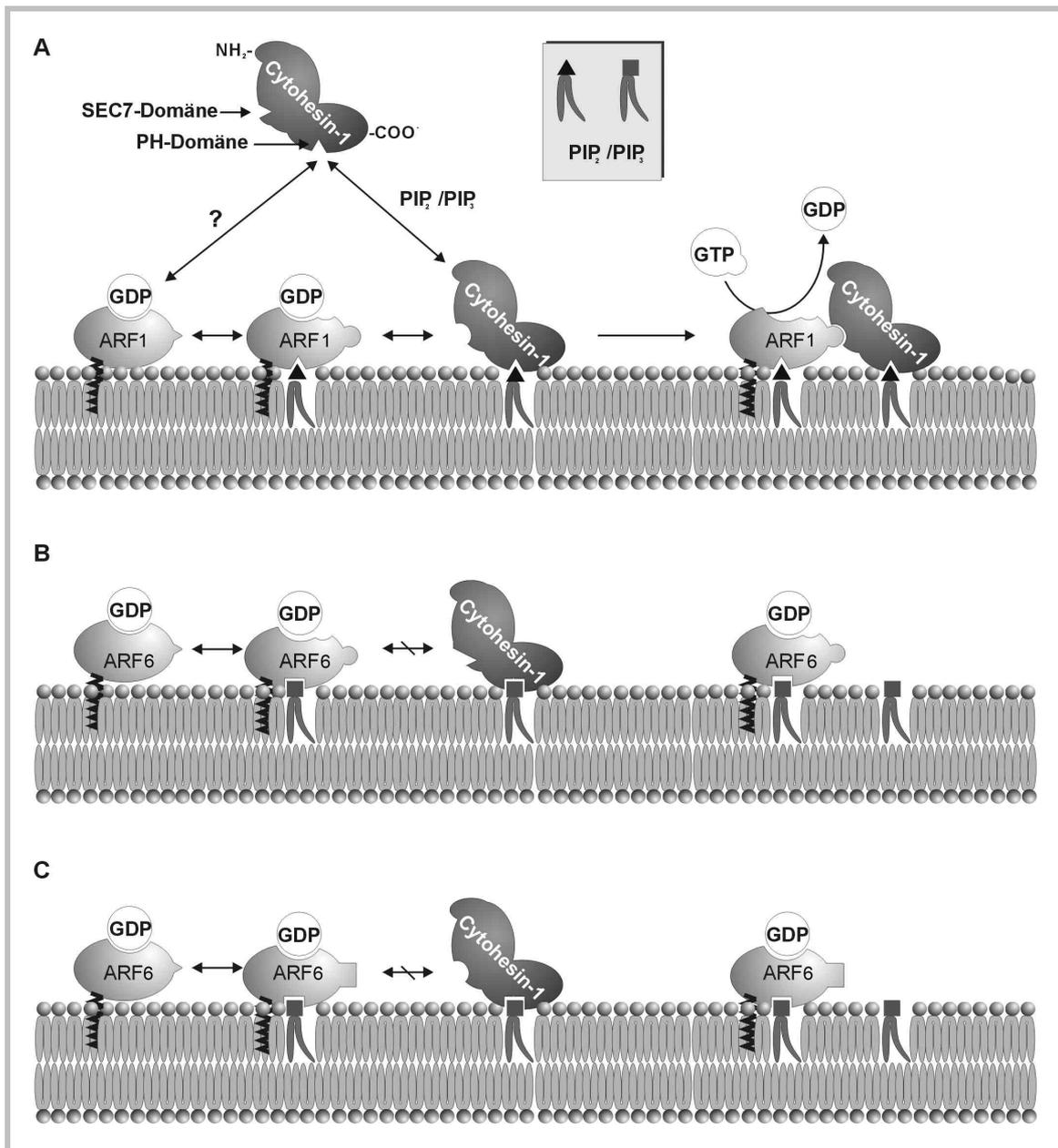


Abbildung 5.2.4: **Modell der Regulation der GDP/GTP-Austauschaktivität von ARF durch Cytohesin-1 und Phosphatidylinositole**

- A) **positive Regulation:** Phosphatidylinositole PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂) bzw. PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) rekrutieren Cytohesin-1 an die Membran durch Bindung an die PH-Domäne. Durch die Bindung des Phosphatidylinositols wird eine konformationelle Änderung in der Sec7-Domäne induziert. Die Bindung von Phosphatidylinositol an ARF bewirkt eine molekulare Umlagerung, welche die Dissoziation von GDP sowie die Bindung von GTP erleichtert und eine optimale Interaktion mit dem membranassoziierten Cytohesin-1 ermöglicht. Dadurch wird der effiziente GDP/GTP-Austausch ermöglicht.
- B) **negative Regulation (1):** Durch die Bindung eines Phosphatidylinositolphosphats durch die PH-Domäne kommt es zu einer konformationellen Änderung der Sec7-Domäne, so daß diese nicht mit membrangebundenem, phosphatidylinositolassoziiertem ARF6 interagieren kann.
- C) **negative Regulation (2):** Durch die Assoziation von ARF6 mit Phosphatidylinositolen wird die Dissoziation des GDP nicht begünstigt und die dadurch induzierte Konformation kann nicht mit Cytohesin-1 wechselwirken.

In diesem Zusammenhang führte die Entdeckung einer neuen Klasse von Lipid modifizierenden Enzymen, den PI(4)P-5-Kinasen, als Effektorproteine der ARFs (Honda *et. al.*, 1999; Godi *et. al.*, 1999; Jones D. *et. al.*, 1999) im letzten Jahr zu einer aufregenden Entwicklung auf diesem Gebiet. Alle ARFs in der GTP-gebundenen Form können *in vitro* die PI(4)P-5-Kinasen aktivieren, wobei PtdIns(4,5)P₂ gebildet wird. Dadurch ergibt sich folgendes Modell der Regulation zahlreicher Enzyme durch die ARFs (Abbildung 5.2.5):

PtdIns(4,5)P₂ ist als Membranlipid eukaryontischer Zellen an der Regulation vieler wichtiger zellulärer Prozesse einschließlich der T-Zell-Aktivierung, der Organisation des Cytoskeletts, des Vesikeltransports und der Blutplättchenaktivierung beteiligt (Übersicht Toker, 1998). PtdIns(4,5)P₂ kann dabei die Aktivität einzelner Enzyme direkt modulieren. So aktiviert PtdIns(4,5)P₂ die Phospholipasen PLD1 und PLD2 *in vitro* (Licovitch *et. al.*, 1994; Exton, 1997; Morris *et. al.*, 1996; Singer *et. al.*, 1997). Die Katalyse der Phospholipid Hydrolyse durch PLD erzeugt Phosphatidylsäure (PtdOH) und wird durch eine Reihe von Agonisten stimuliert.

Zudem können die ARFs aller drei Klassen direkt PLD aktivieren (Hammond *et. al.*, 1997; Sung *et. al.*, 1999; Brown *et. al.*, 1995; Kim J.H. *et. al.*, 1998). Dabei ist myristoyliertes ARF effizienter als unmyristoyliertes ARF (Massenburg *et. al.*; 1994; Brown *et. al.*, 1995). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Rolle der Membranassoziation für die Aktivität der ARF Proteine. Interessanterweise wurde die ARF-vermittelte PLD Aktivität im Golgi, Nukleus, Cytosol und der Plasma Membran gefunden, was auf die Beteiligung verschiedener ARFs schließen lässt (Ktistakis *et. al.*, 1995; Siddiqi *et. al.*, 1995; Provost *et. al.*, 1996; Takahashi *et. al.*, 1996; Whatmore *et. al.*, 1996; Banno *et. al.*, 1997; Exton, 1999; Hodgkin *et. al.*, 2000). Für die Aktivierung der PLDs durch die ARFs wurde ein 36kDa und 50 kDa cytosolischer Faktor als notwendig erkannt. Es gibt Hinweise, dass der 36kDa Faktor der G_{M2} Aktivator der β -Hexamidase A ist. Der 50 kDa Faktor ist noch unbekannt, könnte aber einem GEF der Cytohesin Familie zugeordnet werden. PLD1 wird außerdem durch PtdIns(3,4,5)P₃ aktiviert. Da ARF1 durch PtdIns(3,4,5)P₃ in Gegenwart von Cytohesin-1 aktiviert wird, entsteht dadurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Ein weiterer positiver Rückkopplungsmechanismus besteht darin, dass PLD durch PtdIns(4,5)P₂ und aktiviertes ARF stimuliert, Phosphatidylsäuren erzeugen und diese wiederum die PI(4)P 5-Kinase und PLD stimulieren (Tuscher *et. al.*, 1997; Licovitch und Cantley; 1995; Fensome *et. al.*; 1996). Die Aktivierung der ARFs wird durch Stimulierung der ARF GAPs bei hohen Konzentrationen PtdIns(4,5)P₂ unterbrochen (Randazzo *et. al.*, 1997). Die Inhibition der ARF6 Guaninnukleotid-Austauschaktivität durch PtdIns(4,5)P₂ legen auf der anderen Seite jedoch einen Regulationsmechanismus nahe, der zu einer unmittelbaren Inaktivierung von ARF6 führt. Dies kann bedeuten, dass die Aktivierung von ARF6 ein kritisches Ereignis für die Zelle darstellt, dass nur unter kontrollierten Bedingungen abläuft. Daher hat die Zelle Schutzmechanismen entwickelt, die Aktivierung von ARF6 durch Phosphatidylinositole zu regulieren.

Eine weitere Regulation der ARF-Aktivierung kann über die Proteinkinase C (PKC) erfolgen. Die Aktivität von PKC wird durch DAG gesteuert. DAG wird nach Stimulation der PLC oder der PtdOH Hydrolase gebildet. Durch PKC-vermittelte Phosphorylierung wird zudem die Aktivität von PLD reguliert. PLD haben keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, besitzen aber eine Domäne mit schwacher Homologie zur PH Domäne, über die möglicherweise die gerichtete Membranlokalisierung erfolgt. PKC phosphoryliert Cytohesin-1 und ARNO an der C-terminalen PKC-Konsensussequenz innerhalb der polybasischen Region. Nach den Daten von Santy *et. al.* (1999) kommt es durch die Phosphorylierung von ARNO durch die PKC an dem Aminosäurerest Ser392 in dieser Region zu einem elektrostatischen Wechsel, der die Bindung von ARNO auf Grund der negativen Ladung an die

Membran inhibiert und damit eine Dissoziation von der Membran bewirkt. Dies ist widersprüchlich zu den Studien von Nagel *et. al.* (1998), in denen die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 nach Stimulation der PKC durch PMA gesteigert wird. Daten von Henning Dierks in unserem Labor belegen, dass durch PMA endogenes Cytohesin-1 phosphoryliert wird und die Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch PKC die Membranassoziation von Cytohesin-1 bewirkt. Das Fehlen einer entsprechenden PKC-Konsensussequenz in GRP-1 impliziert, dass GRP-1 durch andere Mechanismen als Cytohesin-1 oder ARNO reguliert wird. Zusammengefasst können diese Daten so interpretiert werden, dass die Aktivität von Cytohesin-1 und ARNO durch PLC oder der PtdOH Hydrolase reguliert werden kann. Somit besitzt die Zelle spezifische Regulationsmechanismen, um die Aktivität von ARF1 und ARF6 gezielt zu regulieren. Durch diesen Mechanismus wird impliziert, dass ARF1 und ARF6 innerhalb der Zelle in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind, die durch lipidmodifizierende Enzyme reguliert werden. Da alle ARFs die PI(4)P5-Kinase stimulieren können, ist diese lipidmodulierende Funktion möglicherweise eine generelle Konsequenz der ARF Aktivierung.

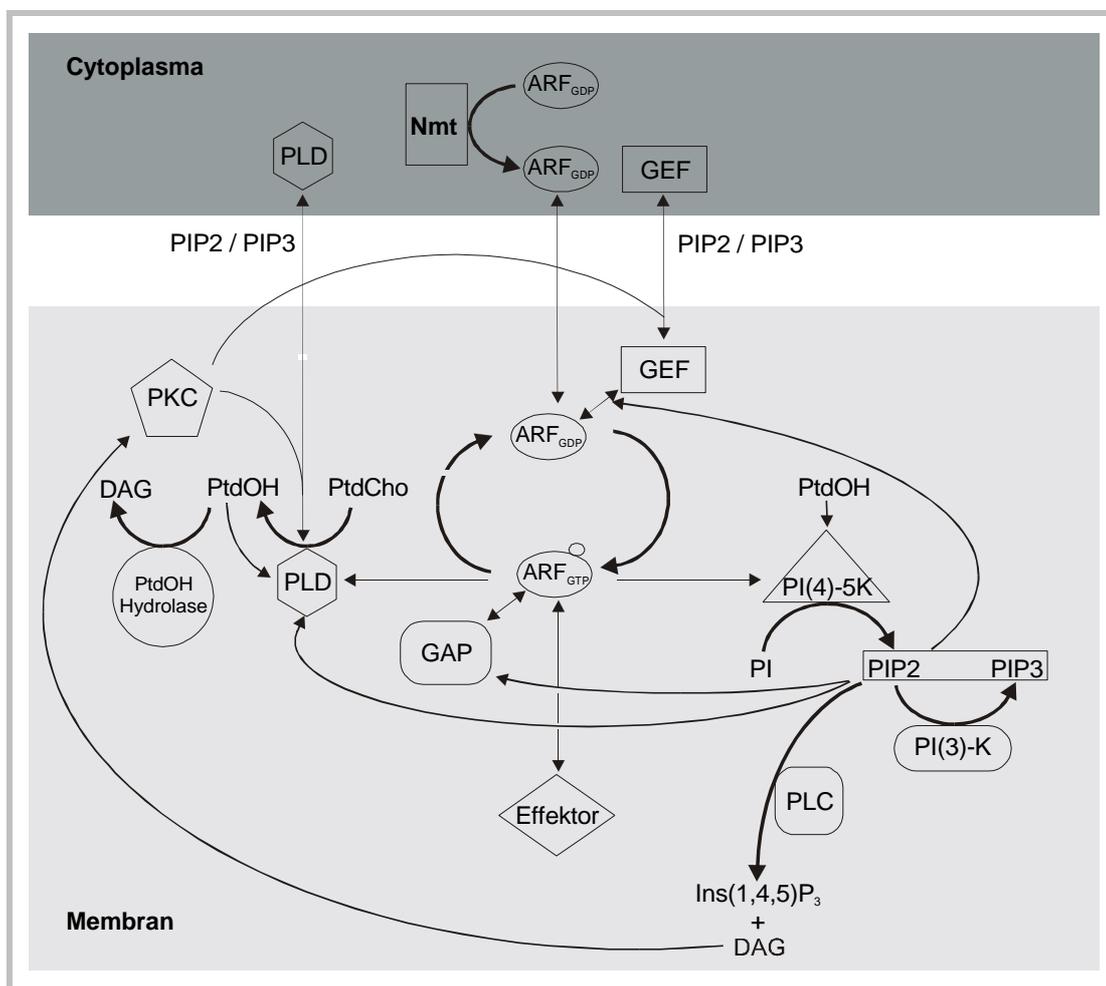


Abbildung 5.2.5 **Modell zur Regulation der ARF/GEF Interaktion und Aktivität**

Der Guaninnukleotid-Austausch der ARF wird durch Phosphatidylinositol reguliert, wobei die Synthese der Phosphatidylinositol wiederum von ARF reguliert werden können. ARF_{GTP} aktiviert Phospholipase D (PLD) und induziert die Synthese von Ptd(Ins(4,5)P₂) (PIP₂). Ptd(Ins(4,5)P₂) nimmt Einfluss auf die Aktivität zahlreicher Proteine wie dem GTPase aktivierenden Protein (GAP), der Phospholipase C (PLC) und der Phospholipase D (PLD) sowie auf die vom Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) katalysierte Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion. Die Produkte dieser Enzyme wiederum sind an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt, die auch die Aktivität der ARFs steuern.

Abkürzungen: PtdOH-Phosphatidsäure, PtdCho-Phosphatidylcholin, PI(3)-K-Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI-Phosphatidylinositol, PKC-Protein Tyrosinkinase C,

5.3 *Cytohesin-1 reguliert b_2 -Integrin vermittelte Adhäsion sowohl durch Interaktion mit LFA-1 als auch ARF-GEF Funktion*

Unsere Daten im bisherigem Umfeld der Untersuchungen haben gezeigt, dass Cytohesin-1 als GEF für ARF Proteine fungieren kann. Jedoch bleibt unklar, welche Bedeutung die Aktivierung von ARF Proteinen, die normalerweise in die Regulation des intrazellulären Membrantransportes eingebunden sind, für die Funktion von Cytohesin-1 besitzt. So konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 die Aktivierung von LFA-1 induziert. Untersuchungen in unserem Labor ergaben Hinweise, dass Cytohesin-1 die Interaktion von LFA-1/ICAM-1 über einen dualen Mechanismus reguliert. Die Bindung von Cytohesin-1 an die CD18-Kette von LFA-1 induziert die Aktivierung von LFA-1. Die physiologische Relevanz ist durch die spezifische Kolo-kalisierung von endogenem Cytohesin-1 mit CD18 nach Quervernetzung durch anti-CD18 Antikörper gezeigt worden, während CD29 nicht mit Cytohesin-1 kolo-kalisiert (Geiger *et al.*, 2000). Diese ist dabei auf die direkte Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1 zurückzuführen. Die Mutation der Cytohesin-1-Bindungsstelle in der CD18-Kette resultiert in einem starken Defekt in der Integrin Aktivierung, die jedoch nicht auf konformationelle Änderungen zurückzuführen sind. So kann mutiertes LFA-1 weiterhin durch bivalente Kationen aktiviert werden (Dransfield *et al.*, 1992; Tominaga *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 2000). Durch die Überexpression von Cytohesin-1 wird die Bildung des mAb24 Epitops induziert. Signifikanterweise wird auch durch die Mutante Cytohesin-1(E157K) die Bindung des mAb24 Antikörpers an LFA-1 erhöht (Geiger *et al.*, 2000). Diese Daten implizieren, dass die GEF Funktion von Cytohesin-1 nicht für die Induktion des mAb24 Epitops notwendig ist. Jedoch wird durch die Mutante Cytohesin-1(E157K), die *in vitro* keine ARF-GEF Funktion besitzt, die Zelladhäsion vollständig inhibiert. Während jedoch für die Aktivierung der Integrine die ARF-GEF Funktion von Cytohesin-1 keine Rolle spielt, ist sie für die Zelladhäsion von großer Bedeutung. Die Aktivierung der ARFs stellt somit ein essentielles Ereignis in der Zelladhäsion dar.

Dabei häufen sich die Hinweise, dass die Zusammenlagerung der LFA-1 Rezeptoren nicht nur die Zell-Zell Adhäsion verstärken, sondern auch eine notwendige Voraussetzung für die LFA-1 Aktivierung und Ligandenbindung darstellt. Das Cytoskelett ist dabei direkt an der dynamischen Regulation des Adhäsionsvermögens von LFA-1 involviert. So bindet der cytoplasmatische Abschnitt von CD18 an die cytoskelettalen Proteine α -Actinin, Talin, Vinculin und Filamin (Sampath *et al.*, 1998). Die funktionale Relevanz dieser Interaktionen ergibt sich durch die Tatsache, dass Mutationen in der vermutlichen α -Actinin und Talin Bindungsstelle zu einer reduzierten Ausbildung des fokalen Adhäsionskomplexes führt (Lyman *et al.*, 1997). Die Lösung vom Actin-Gerüst erhöht die laterale Bewegungsfreiheit und führt zur Zusammenlagerung von LFA-1. Diese dienen als Gerüst für die erneute Bindung an das Cytoskelett und rekrutieren cytoplasmatische Moleküle, um einen funktionalen Komplex mit hoher Avidität zu bilden. Dieser Komplex ist zudem in der Lage Signale vom Liganden-gebundenen Integrin in das Innere der Zelle zu leiten. Das Zusammenlagern der Integrine wird möglicherweise durch Effektoren reguliert, welche die Aktin-Polymerisation, Aktin-Myosin Kontraktion oder die Aktin-Membran Interaktion modifizieren. Cytohesin-1 induziert dabei die Ausbreitung der Zelle auf immobilisiertem ICAM-1 als Zellsubstrat, während Cytohesin-1(E157K) ein Ausbreiten der Zelle verhindert. Dies ist möglicherweise auf das Actingerüst modifizierende Ereignisse zurückzuführen. Durch die Überexpression von Cytohesin-1 oder Cytohesin-1(E157K) kommt es zur Umorganisation des zellulären F-Actins (Wolfgang Nagel, persönliche Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass die ARF-GEF Funktion von Cytohesin-1 für die Umstrukturierung des Actin Cytoskeletts benötigt wird. Allerdings besitzen weder konstitutiv aktive als auch dominant negative Formen von

ARF1 und ARF6 Einfluss auf die Cytohesin-1 vermittelte T-Zell Adhäsion an LFA-1 (Daten nicht gezeigt). Jedoch war gezeigt worden, dass ARF1 und ARF6 Ereignisse steuern, die an der Regulation des Actin-Cytoskeletts beteiligt sind. So vermittelt ARF1 die Rekrutierung von Paxillin in den fokalen Adhäsionskomplex (Norman *et. al.*, 1998), während ARF6 für die Ausbildung von Membraneinstülpungen benötigt wird (Radhakrishna *et. al.*, 1999). Die Expression von ARF1 und ARF6 sowohl in der konstitutiv aktiven als auch in der dominant negativen Form ergeben keine morphologisch sichtbare Reorganisation des Actin-Cytoskeletts in Jurkat LT-Zellen. Diese Daten wurden jedoch nach Stimulierung des TCR-Komplexes durch CD3-spezifische Antikörper erhalten. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Reorganisation des Actin-Cytoskeletts durch Signale initiiert wird, die von aktivierten Integrinen ausgelöst werden (siehe unten). Das Unvermögen von ARF1 und ARF6, die Zelladhäsion zu regulieren, ist möglicherweise jedoch darauf zurückzuführen, dass andere ARF oder ARF-verwandte Proteine, wie ARL oder ARD, involviert sind.

Dennoch kann folgendes Modell diskutiert werden. Durch die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 erfolgt die Interaktion von Cytohesin-1 mit LFA-1. Dadurch wird eine Aktivierung des LFA-Komplexes induziert, die eine initiale Bindung von LFA-1 an ICAM-1 ermöglichen. Durch die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran kommt es zur Aktivierung membranassoziierter ARFs, die möglicherweise wie oben diskutiert spontan mit der Membran assoziieren. Die Affinitätsunterschiede der Interaktionen von Cytohesin-1 mit CD18 und Cytohesin-1 mit ARFs erlauben möglicherweise die zeitweilige Interaktion von Cytohesin-1 mit ARF. So erfolgte die spezifische Inhibition der Cytohesin-1 /ARF Interaktion erst durch einen 500-fachen molaren Überschuss an CD18. Dies lässt vermuten, dass in Gegenwart membranassoziierter ARFs die GDP-Dissoziation durch Cytohesin-1 katalysiert werden kann. Durch das aktivierte ARF werden Signale ausgelöst, die eine Zunahme der Avidität des LFA-1 Komplexes durch Reorganisation des Actin Cytoskeletts oder Regulation des gerichteten Vesikeltransportes induzieren. Zudem könnte durch aktiviertes ARF eine PI(4)-5-Kinase aktiviert werden und somit die PtdIns(4,5)P₂-Konzentration in unmittelbarer Nähe des Adhäsionskomplexes erhöht werden. Durch die PI(3)-Kinase erfolgt die Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃. Dies wiederum könnte zu einer Rekrutierung weiterer Cytohesin-1 Proteine über die PH Domäne in den Adhäsionskomplex und damit zur Aktivierung weiterer ARFs führen. PtdIns(4,5)P₂ bewirkt dabei konformationelle Änderungen in Vinculin, die zu einer Entfaltung des Proteins führen. Damit werden Bindungsstellen für Talin und Actin zugänglich und somit die Ausbildung von Adhäsionskomplexen ermöglicht (Johnson und Craig, 1994; Gilmore und Burridge, 1996). Somit entsteht ein Rückkopplungsmechanismus, der zur Aggregation vieler LFA-1 Komplexe in einem definierten Membranabschnitt und zur Ausbildung eines Adhäsionskomplexes führt. Die Phospholipide könnten dabei modulierende Funktion auf die Guaninnukleotid-Austauschaktivität besitzen und einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus bilden (vgl. Abbildung 5.2.4 und Abbildung 5.2.5). Das Zusammenlagern von LFA-1 Komplexen bewirkt eine positive Modulation der Avidität in deren Folge es zur Erhöhung der Zell-Zell-Kontaktstärke kommt. Eine Involvierung von ARF6 in die Regulation der Zelladhäsion kann nach neuesten Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivierung von PI(3)-Kinase sowohl zur Membranrekrutierung von Cytohesin-1 (Nagel *et.*, 1998) als auch zur Aktivierung von ARF6 führt (Venkateswarlu und Cullen, 2000). Zudem führt eine Überexpression von Cytohesin-1 zur Aktivierung von ARF6. Die Spezifität der Regulation der Zelladhäsion wird dabei durch die Tatsache unterstrichen, dass ARNO keine Zelladhäsion induzieren kann (Geiger *et. al.*, 2000).

5.4 Mögliche Regulation der Integrinfunktion durch ARF

Integrine wie LFA-1 setzen Zell-Zellkontakte in intrazelluläre Signalübertragungsprozesse um, wobei sie mit dem antigengebundenen TCR Komplex kostimulatorisch auf die Aktivierung der T-Zellen wirken. So ist die Interaktion des Integrins LFA-1 mit dem Liganden ICAM-1,-2 und -3 wichtig für die Aktivierung von T-Zellen (Sedwick *et al.*, 1999; Wulfing und Davis, 1998). Die Liganden der Integrin-Rezeptoren sind in der Regel multivalent und ihre Bindung führt zu einer Quervernetzung und zu einem Zusammenlagern („Clustering“) der Integrin-Rezeptoren. Die Besetzung der Ligandenbindungsstelle der Integrine und das laterale Zusammenlagern der Integrine initiiert nicht nur Adhäsion und cytoskelettale Reorganisation durch die direkte Interaktion der Integrine mit anderen Proteinen, sondern aktiviert auch intrazelluläre Signalwege, welche die Zell-Migration, Polarität, Wachstum; Differenzierung und Genexpression regulieren (Cary *et al.*, 1999; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Integrine besitzen jedoch in ihrer cytoplasmatischen Domäne keine enzymatische Aktivität. Dennoch werden nach dem Zusammenlagern und der Aktivierung der Integrine zelluläre Signale wie Tyrosin-Phosphorylierung, sowie die Stimulierung der Proteinkinase C und die Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Dies führt letztlich zur Induktion der Cytokine wie IL-2 (Edgington *et al.*, 1993). Es gibt zahlreiche Daten, dass G-Proteine der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 die Aktivität der Integrine regulieren, da Rho GTPasen und Integrin-vermittelte Adhäsion teilweise durch die gleichen Stimuli reguliert werden (Shattil *et al.*, 1998). Die Adhäsion und Aggregation von Lymphozyten kann durch Botulinum C3, das Rho durch ADP-Ribosylierung inaktiviert, blockiert werden (Tominaga, *et al.*, 1993; Laudanna *et al.*, 1996). Die initiale Besetzung einer kleinen Zahl von Integrin-Molekülen mit dem Liganden und die dadurch initiierte Zelladhäsion führt zu einer schnellen Aktivierung von Cdc42 und Rac. Es gibt Hinweise, dass Cdc42 in die Integrin-vermittelte Aktivierung der PI(3)-Kinase, der Proteinkinasen Akt und ACK und der Mitogen-aktivierten Kinase (MAP Kinase) impliziert ist (Clark *et al.*, 1998). Rac ist an der Integrin-vermittelten Aktivierung von MAP und JNK (Dolfi *et al.*, 1998) und Rho an der Aktivierung der MAP Kinase (Renshaw *et al.*, 1996), der Proteintyrosin Kinase FAK („focal adhesion kinase“) (Barry *et al.*, 1994) und der PtdIns(4)-5-Kinase (Chong *et al.*, 1994) beteiligt. Die GEFs und GAPs, die die Aktivierung dieser GTPasen durch Integrine kontrollieren, sind unbekannt. Jedoch konnte Vav1, einem GEF von Rac, der in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, eine Funktion in Integrin-Signalwegen zugeordnet werden. Vav wird teilweise durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste reguliert, welche die GEF Aktivität stimulieren (Crespo *et al.*, 1997). Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion steigert die Tyrosin-Phosphorylierung von Vav in verschiedenen Zelltypen (Yron *et al.*, 1999; Cichowski *et al.*, 1996; Gotoh *et al.*, 1997). Die Tyrosin-Phosphorylierung erfolgt dabei wahrscheinlich durch Syk. Vav1 und Syk induzieren kooperativ die Bildung von Lamellipodien und Filopodien und die Aktivierung von JNK durch die Aktivierung von Rac (Miranti *et al.*, 1998). Daran sind die Proteine P130^{cas} und Crk beteiligt, die auf noch unbekanntem Weg zur Aktivierung von DOCK180 als Rac-Gef führen (Klemke *et al.*, 1998; Cheresch *et al.*, 1999; Kijokawa *et al.*, 1998; Shattil *et al.*, 1998). Der Mechanismus der Signaltransduktion ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Die Integrine assoziieren nach Zusammenlagerung mit einer Vielzahl von Proteinen, die unter anderem die fokalen Adhäsionspunkte ausbilden. Dies sind Multiproteinkomplexe, die auf cytosolischer Seite spezifische Kontakte zwischen Integrinen, Proteinen der intrazellulären Matrix sowie Actinfilamenten herstellen. Cytohesin-1 interagiert dabei auch mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18. Es wurde daher vermutet, dass ARF Proteine, die mit Cytohesin-1 interagieren, an der Aktivierung stimulierter T-Zellen beteiligt sind.

5.4.1 ARF6 stimuliert den IL-2-Promotor

Die Überexpression von ARF6 (Q67L) wirkt verstärkend auf die IL-2-Produktion nach Stimulation des TCR Komplexes. Dieser Effekt ist spezifisch für ARF6. So konnte durch die Überexpression von konstitutiv aktivem ARF1 die IL-2-Produktion weder nach PMA-Stimulation noch nach gleichzeitiger Stimulation des TCR Komplexes gesteigert werden. Die Quervernetzung von CD3 durch OKT3 als CD3-spezifischen Antikörpers, resultiert in einer Aktivierung des gesamten TCR Komplexes und führt zur Stimulation der IL-2-Produktion. Die Aktivierung wird durch die Stimulation der TCR-gekoppelten Protein Tyrosin Kinase (PTKs) der Src und Syk Familie initiiert, die weitere zelluläre Substrate phosphorylieren (Weiss und Littman, 1994). In Folge dessen kommt es zur Rekrutierung und Ausbildung membraner Signalkomplexe, die verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. Die Signale gelangen in den Nukleus, wo sie ein definiertes genetisches Programm starten. Interleukin-2 wird von den aktivierten T-Zellen als autokriner Wachstumsfaktor gebildet. Die Expression von Interleukin-2 wird dabei durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- κ B, NF-AT und Oct, die am IL-2-Promotor binden, induziert (Crabtree *et. al.*, 1994; Jain *et. al.*, 1995; Karin *et. al.*, 1997). Die Verwendung eines NF-AT Reporterkonstruktes zeigte jedoch keine Aktivierung nach Expression von konstitutiv aktiven ARF6 (Daten nicht gezeigt). Somit erfolgt die Aktivierung der IL-2-Produktion durch ARF6 (Q67L) wahrscheinlich nicht über NF-AT.

AP-1 bezeichnet eine Familie bestehend aus Homo- und Heterodimeren von Jun (V-Jun, c-Jun, JunB, JunD), Fos (v-Fos, c-FOS, FosB, Fra1, Fra2) und ATF („activating transkription factor“; ATF2, ATF3/LRF1, B-TF) Proteinen (Übersicht Karin *et. al.*, 1997). Die Regulation der AP-1 Aktivität ist komplex und wird sowohl durch transkriptionale als auch post-transkriptionelle Ereignisse gesteuert. PMA und damit die Aktivierung von der T-Zell spezifischen Proteinkinase PKC ζ , einer Ca²⁺-unabhängigen Serin/Threonin PKC; resultiert in einer Aktivierung von AP-1. Baier-Bitterlich *et. al.* (1996) konnten zeigen, dass nach Überexpression von PKC ζ durch Stimulierung der Zellen mit einem anti-CD3 Antikörper und PMA die IL-2-Produktion deutlich gesteigert wird.

Eine Steigerung der IL-2-Produktion kann aber auch durch Überexpression der konstitutiv aktiven Mutante ARF6 (Q67L) und PMA-Behandlung ohne Stimulation des TCR-Komplexes erreicht werden (Abbildung 4.7.1). Diese Daten suggerieren, dass ARF6 möglicherweise eine Stimulierung der PKC ζ induzierten Signalwege bewirkt, in dem es kostimulatorische Signale wie vom aktivierten TCR/CD3-Komplex auslösen kann. Auf Grund des fehlenden dominant negativen Effekts der GDP-gebundenen Variante ARF6 (T27N) könnte es sich dabei um Signalereignisse handeln, die positiv modulierend die Signalkaskade des TCR/CD3-Komplexes steuern. Die Fähigkeit von ARF6, die PKC ζ -vermittelten Signalwege zu aktivieren, stellt somit einen kritischen Punkt in dieser Überlegung dar. Mehrere Gruppen demonstrierten unabhängig voneinander, dass PKC ζ , aber keine andere PKC Isoform JNK, in einer T-Zell spezifischen Weise aktiviert (Avraham *et. al.*; 1998; Ghaffari-Tabrizi *et. al.*, 1999). JNK aktiviert c-Jun durch Phosphorylierung der beiden Serin-Reste Ser63 und Ser73 und erhöht damit die Stabilität von c-Jun (Karin *et. al.*, 1997). PKC ζ aktiviert dabei die unmittelbare MAP Kinase SEK1 (MKKK4), die JNK phosphoryliert und aktiviert (Avraham *et. al.*, 1998). Diese Daten belegen, dass JNK eine zentrale Stellung in der Signaltransduktion aktivierter T-Zellen zu AP-1 einnimmt. Durch den gegen Ser/Thr-phosphoryliertes JNK1 und JNK2 gerichtete Antikörper konnte jedoch gezeigt werden, dass durch ARF6 nach PMA-Stimulation keine Aktivierung der JNK durch Kinasen wie SEK1 erfolgt. Obwohl es wenig Zweifel an der selektiven Stimulierung der JNK Aktivität durch Sek1 in T-Zellen gibt, ist die physiologische Relevanz dieses Signalweges weniger klar, da periphere T-Zellen aus PKC ζ -defizienten Mäusen zwar eine TCR/CD28-vermittelte Aktivierung der JNK zeigen, aber

defekt in der AP-1 Aktivierung sind. Diese läßt eine wichtige, aber dennoch nicht-redundante Rolle von PKC ϵ in der Aktivierung von AP-1 vermuten.

Die Aktivierung der JNK in T-Zellen erfordert die Kombination der TCR und CD28 Signale, die durch PMA und Ca²⁺ Ionophor umgangen werden können. Dies impliziert, dass die Aktivierung der IL-2-Produktion auch über Ca²⁺-abhängige Ereignisse verlaufen kann. Su *et al.* (1994) zeigten, dass die Aktivierung der JNK von dem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle abhängt. Die Funktion der JNK Aktivierung kann daher durch andere Ca²⁺-abhängige PKC Isoformen oder PKC-unabhängige Wege kompensiert werden. Im Gegensatz zu JNK werden durch einige PKC Isoformen nicht-selektiv andere Mitglieder der MAP Kinase Familie wie z.B. Erk aktiviert (Werlen *et al.*, 1998). Jedoch zeigte sich, dass weder ARF1 noch ARF6 sowohl in der konstitutiv aktiven als auch dominant negativen Form den Ca²⁺-Einstrom in die Zelle nach PMA-Stimulation steigern können (Daten nicht gezeigt). Calcineurin, eine Ca²⁺-abhängige Serin/Threonin Phosphatase dephosphoryliert den cytosolischen Transkriptionsfaktor NF-AT und bewirkt dadurch die Translokation vom Cytosol in den Nukleus, wo er die Transkription verschiedener Gene, unter anderem auch IL-2, aktiviert (Rao *et al.*, 1997; Crabtree *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 1995; Avraham *et al.*, 1998; Werlen *et al.*, 1998; Ghaffari-Tabrizi *et al.*, 1999). Da ARF6 keine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration induziert, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass ARF6 die IL-2-Produktion in dem verwendeten Transkriptionssystem nicht über NF-AT aktiviert.

In neuesten Untersuchungen wurde die Rolle von JNK in der IL-2-Produktion in Frage gestellt, da auch T-Zellen von genetisch defizienten JNK1 und JNK2 Mäusen nach TCR/CD28 Stimulation eine erhöhte IL-2-Produktion zeigten (Dong *et al.*, 2000). Zudem exprimieren naive T-Zellen keine detektierbaren Mengen von JNK. Die JNK Expression wird jedoch nach Stimulation der Zellen heraufreguliert (Weiss *et al.*, 2000). Diese Daten suggerieren, dass JNK sowie möglicherweise die selektive Aktivierung durch PKC ϵ eine wichtigere Rolle in der Aktivierung von Memory T-Zellen oder der Aufrechterhaltung der JNK Aktivität in Effektor T-Zellen spielen. Auf Grund dieser Daten kann die ARF6-vermittelte Aktivierung der IL-2-Produktion möglicherweise über AP-1 als relevanten Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung über alternative Signalwege an JNK vorbei verläuft, erfolgen.

Ein weiteres Ziel der TCR/CD28 Kostimulation stellt neben der JNK der NF- κ B Transkriptionsfaktor Komplex (Su *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1995) und das CD28 „Response Element“ (RE) im IL-2-Promotor dar, der kooperativ NF- κ B und AP-1 binden kann (Fraser *et al.*, 1991; Verweij *et al.*, 1991; Iacobelli *et al.*, 1999).

In unstimulierten Zellen besteht NF- κ B aus einem cytoplasmatischen Komplex aus Homo- und Heterodimeren Rel-verwandter Proteine, die an I κ B, einer Protein Familie inhibitorischer Proteine, gebunden sind. Die Rho-GTPasen sind an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt (Sulciner *et al.*, 1996; Perona *et al.*, 1997). Sie vermitteln die Phosphorylierung von I κ B und bewirken dadurch die Translokation des Dimers in den Nukleus. Der genaue Mechanismus der Rho-GTPasen vermittelten Aktivierung von NF- κ B ist jedoch unklar.

Daher wurde untersucht, ob die Signalfunktion von aktiviertem ARF6 mit den Signalwegen über die GTPasen RhoA, Rac-1 und Cdc42 interferieren. Dabei zeigte sich, dass die konstitutiv aktiven GTPasen RhoA (CA) und Rac-1 (CA) alleine keine Erhöhung der IL-2 Promotoraktivität verglichen mit den dominant negativen Mutanten RhoA (DN) und Rac-1 (DN) weder nach PMA-Stimulation noch nach zusätzlicher TCR Aktivierung durch anti-CD3 Antikörper bewirken. Über die Aktivierung der JNK durch Rac und Rho liegen keine gesicherten Daten über den Mechanismus in der Zelle vor. So aktiviert Rac JNK in COS und HeLa Zellen, während Rho als Aktivator der JNK in der

Nierenzelllinie 293T beschrieben wurde (Seger und Krebs, 1995; Teramoto *et al.*, 1996). Möglicherweise sind an der Aktivierung der JNK in diesen Zellen spezifische GAPs beteiligt, die eine zelltypspezifische Aktivierung der JNK induzieren. Damit konsistent sind Daten, dass dominant negatives Rac und Rho keinen Einfluss auf die TCR-vermittelte Aktivierung der IL-2-Produktion nehmen. Zudem inhibieren die dominant negativen Formen von Rac und Rho nicht die von ARF6 (Q67L) induzierte Aktivierung des IL-2-Promotors und zeigen damit, dass sie alleine in weiteren möglichen aktivierenden Signalwegen der IL-2-Produktion keine Rolle spielen. Jedoch kommt es durch die transiente Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 (CA) nach PMA Stimulation zu einer Steigerung der IL-2 Promotoraktivität um den Faktor 3-4 gegenüber der GDP-gebundenen Form Cdc42 (DN). Auch nach dem Stimulieren der T-Zellen durch Aktivierung des TCR-Komplexes wird die IL-2 Promotoraktivität durch Cdc42 (CA) im Gegensatz zur Mutante Cdc42 (DN) gesteigert. Konstitutiv aktives Cdc42 benötigt somit für die Aktivierung der IL-2-Produktion kein kostimulatorisches Signal vom TCR/CD3-Komplex in Jurkat LT-Zellen, wirkt aber synergistisch zu diesem. Dies ist konsistent damit, dass die Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 in Zellen ohne TCR wie COS, HeLa und NIH-3T3 Zellen in einer Stimulation der JNK und der reaktivierenden Kinase p38RK Aktivität resultiert (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Seger und Krebs, 1995). Diese Daten können so gedeutet werden, dass aktiviertes Cdc42 nach PMA-Behandlung, die in einer Aktivierung der PKC θ resultiert, Signalwege -über PKC θ in den Nukleus- induzieren können. Damit zeigen Cdc42 und ARF6 in der konstitutiv aktiven Form den gleichen stimulierenden Einfluss auf die IL-2-Produktion nach PMA-Stimulation von Jurkat-Zellen. Die Aktivierung des IL-2-Promotors durch Cdc42 wirkt zudem synergistisch mit ARF6_{GTP}. Diese Daten suggerieren, dass ARF6 möglicherweise die Aktivierung von Cdc42 induzieren kann. Da ARF6 (T27N) die von Cdc42 induzierte IL-2-Produktion sowohl nach PMA als auch nach PMA/OKT3 nicht inhibieren kann, könnte die Aktivierung von Cdc42 durch aktiviertes ARF6 kostimulatorisch zu TCR-vermittelten Signalen erfolgen. Jedoch zeigt die Aktivierung des IL-2-Promotors durch ARF6 (Q67L) in Gegenwart des dominant negativen Cdc42, dass die IL-2-Produktion von aktiviertem ARF6 durch einen zum Cdc42 induzierten parallel verlaufenden Signalweg gesteigert werden kann. Jedoch geben diese Daten keinen genauen Aufschluss darüber, ob ARF6 eine Aktivierung von Cdc42 induzieren kann.

Daher wurde untersucht, ob ARF6 die Aktivierung eines Rho GTPasen GEFs vermittelt. GEF Spezifität für die GTPasen Rac, Rho und Cdc42 besitzt Vav1, das nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Crespo *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997). Die TCR-Stimulation induziert die Tyrosin-Phosphorylierung des 95 kDa Protoonkogen Vav1 neben weiteren intrazellulärer Proteinen. Vav1 ist für die T-Zell Entwicklung und Aktivierung wichtig (Cantrell, 1998; Deckert *et al.*, 1996). Die Vav Funktion ist notwendig für die Aktivierung der MAP Kinase Erk und der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ -B und für die intakte Ca²⁺-Mobilisierung (Fischer *et al.*, 1998). Vav wird für die T-Zell Entwicklung und Antigen-Rezeptor vermittelte T-Zell Aktivierung benötigt (Fisher *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997). Zudem spielt es eine wichtige Rolle in der Zusammenlagerung der TCR nach Stimulation und der Reorganisation des Actin Cytoskeletts (Fischer *et al.*, 1998). Die Überexpression von konstitutiv aktivem Vav1 in Jurkat LT Zellen steigert die IL-2-Produktion nach PMA-Behandlung. Die Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes wirkt synergistisch auf die IL-2-Promotorstimulation zu aktiviertem Vav1. Diese Daten sind konsistent mit Untersuchungen von Deckert *et al.* (1996), die eine Aktivierung transkriptionaler Elemente im IL-2-Gen nach Stimulierung des TCR/CD3-Komplexes durch anti-CD3 Antikörper nachwies. ARF6 kann die Aktivierung des IL-2-Promotors in Gegenwart von konstitutiv aktivem Vav1 nach PMA-Stimulation steigern. Jedoch zeigt auch hier die dominant negative Form von Vav1 keinen inhibitorischen Einfluss auf die ARF6 (Q67L) vermittelte

IL-2-Promotoraktivierung. Diese Daten zeigen, wie schon die Untersuchungen zur Wechselwirkungen der ARF- und Rho-GTPasen, dass das Aktivierungspotential von ARF6 auf den IL-2-Promotor nicht über die Rho-GTPasen manifestiert ist. Die Beteiligung der Rho GTPasen an der TCR Signaltransduktion sowie der Mechanismus der Aktivierung der Rho GTPasen durch Vav1 ist unklar. Neuere Studien haben gezeigt, dass die GEF-Domäne für Rho GTPasen, nicht ausschließlich an der T-Zellaktivierung impliziert sind. So kann eine GEF-defekte Mutante von Vav1 noch NF-AT aktivieren (Kuhne *et. al.*, 2000). Diese Studie suggeriert, dass andere Domänen als die GEF Domäne an den TCR Signalen, die zur Aktivierung von NF-AT führen, beteiligt sein können und dass somit eine Aktivierung des IL-2-Promotors in hämatopoetischen Zellen auf vielfältige Art erfolgen kann. Die Daten dieser Studie können zudem die Aktivierung der IL-2-Produktion durch Vav1 in Gegenwart von dominant negativen Rho GTPasen Rac, Rho und Cdc42 erklären. Während konstitutiv aktive Rho GTPasen synergistisch mit Vav1 wirken, bewirkt möglicherweise die Interaktion von Vav1 mit dominant negativen Rho GTPasen die Signal gebende Funktion. Jedoch wird dafür die Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes als kostimulatorisches Signal benötigt, während konstitutiv aktives Vav1 und die Rho GTPasen autonom die IL-2-Transkription induzieren.

In Lymphozyten wird die Ras Funktion in der Regulation von AP-1 und NF-AT durch die Rho Familien GTPase Rac vermittelt. In Fibroblasten bindet PI(3)-K direkt an aktiviertes Ras und stellt eine Verknüpfung zum Rac-1 Signalweg, durch den das cortikale Actin Cytoskelett und die Zell Transformation kontrolliert wird. Jedoch wird PI(3)-K weder benötigt noch ist sie alleine ausreichend für eine Ras induzierte und durch Rac regulierte Antwort durch Transkriptionsfaktoren in T Zellen. Nach bestehender Ansicht stellt PI(3)K zwar ein molekulares Bindeglied zwischen Ras und Rac in einigen Zelllinien dar, jedoch kann Ras unabhängig von PI(3)-K den Rac-1 regulierten Signalweg in T Zellen auslösen. Der molekulare Mechanismus, wie Ras und Rac GTPasen miteinander in der Cytokin Genregulation in Lymphozyten verknüpft sind, ist noch unbekannt.

5.4.2 Die Regulation der Signaltransduktion durch den gerichteten Vesikeltransport

Die Liganden-vermittelte Endocytose ist charakteristischerweise eine frühe Antwort in Signalwegen, die durch verschiedene Gruppen von Oberflächenrezeptoren, wie (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Rezeptor Thyrosin Kinasen (RTK) und Cytokin Rezeptoren angeschaltet wird (Ferguson *et. al.*, 1996, Seaman *et. al.*, 1996). Die Liganden-vermittelte Endocytose hat wenigstens 2 Funktionen. Zuerst dient sie dazu das Signal der aktivierten Zelloberflächenrezeptors durch Entkoppeln der Rezeptoren von membranverankerten Signalmolekülen zu terminieren. Als Beispiel kann hier der ErbB RTK EGFR genannt werden. Durch den Liganden wird die Dimerisierung induziert. Nach dem Binden des Liganden (Hormone, Neuropeptide, Wachstumsfaktoren usw.) an den jeweiligen Zelloberflächen Rezeptor, wandert der aktivierte Rezeptor gezielt zu Clathrin-bedeckten Membraneinstülpungen. Durch eine Vielzahl bis jetzt noch nicht verstandener, stark regulierter biochemischer Vorgänge bilden sich daraus die Clathrin-bedeckten Vesikeln. Während des gerichteten Transportes durch nacheinander geschaltete endosomale Kompartimente, werden die Proteine modifiziert und für die weitere Expression an der Zelloberfläche wieder aufbereitet. Von dort können sie dann einen weiteren Zyklus durchlaufen. Zweitens wird durch die Endocytose der Rezeptor in das passende zelluläre Umgebung plaziert um dort mit weiteren nachgeschalteten Signalmolekülen interagieren zu können (Rothenberg, 1996; Luton *et. al.*, 1997). So wird durch den internalisierten β_2 adrenergen Rezeptor (β_2 AR) und durch den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR die Kinasen ERK1/2 aktiviert.

Es gibt Hinweise darauf, dass ARF6 im Membran Recycling involviert ist. Beobachtungen von D'Souza-Schrey *et al.* (1995) in CHO Zellen zeigen, dass sowohl ARF6 als auch ARF6 (Q67L) die Internalisierung von Transferrin inhibieren, während ARF6 (T27N) die Rückführung des Transferrin Rezeptors an die Plasmamembran inhibiert. Jedoch erfolgt die Internalisierung des TCR/CD3-Komplexes in Jurkat LT-Zellen nicht durch ARF6 vermittelte Vorgänge. Die Endocytose des TCR/CD3-Komplexes wird durch konstitutiv aktives bzw. dominant negatives ARF6 nicht moduliert. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch ARF6 (Q67L) der weitere Vesikeltransport beeinflusst wird. ARF6 (Q67L) bzw. ARF6 (T27N) inhibieren den gerichteten Vesikeltransport. Möglicherweise bewirkt konstitutiv aktives ARF6 die Fixierung des TCR/CD3 in distinkten Vesikelkompartimenten, in denen der TCR/CD3-Komplex die Aktivierung von Signalen induzieren kann. Dies könnte bedeuten, dass die Hydrolyse von ARF6_{GTP} durch die GAPs ein kritisches Ereignis bei der Terminierung des intrazellulären Signals reguliert.

Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion von GTP-gebundenen ARF6 in den Zellkern ist weiterhin unklar. Die Einführung überexprimierter konstitutiver Formen von GTPasen verursachen im allgemeinen eine Vielzahl zellulärer Antworten, die möglicherweise nicht die normale biologische Funktion der GTPasen reflektieren. Eine interessante Möglichkeit ist, dass GTPasen und ihre regulatorischen Proteine spezifische Funktionen dadurch kontrollieren können, dass sie in verschiedenen subzellulären Ansammlungen, die durch verschiedenen Ereignisse innerhalb der selben Zelle reguliert werden, verschiedene Funktionen erfüllen. Daher ist es wichtig, Methoden zur Verfügung zu haben, welche die Detektion der endogenen GTPasen sowie deren Regulatoren erlauben. Dies kann durch die Verwendung spezifische Antikörper oder durch den Einsatz von Fusionsproteinen mit einem GFP oder Ig-Anteil erfolgen. Ein weiterer Vorteil der verwendeten Ig-Fusionsproteine besteht darin, die GTPasen quantitativ aus Zellfraktionen zu isolieren und Untersuchungen zur Aktivität der jeweiligen Proteinpopulation *in vivo* durchführen zu können.

5.5 T-Zell Aktivierung und ZAP-70

Neben ARF6 wurde in Zusammenarbeit mit Lutz Zeitlmann eine Mutante der Proteintyrosinkinase ZAP-70 als Aktivator der IL-2-Produktion in T-Zellen erkannt (Zeitlmann *et al.*, 1998). Durch die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 zu Phenylalanin entsteht eine konstitutiv aktive Mutante, die in T-Zellen die Stimulation des IL-2-Promotors induziert (Zeitlmann *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der C-terminalen Tyrosinreste 597 und 598 in Bezug auf die Regulation der ZAP-70 Aktivität untersucht. Daneben stellte die funktionale Bedeutung der Bindung an die ζ -Kette für die Aktivität von ZAP-70 eine zentrale Frage.

ZAP-70 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell Signaltransduktion (Übersicht: Bolen, 1995; Howe und Weiss, 1995; DeFranco, 1995). Während der T-Zell Aktivierung bindet ZAP-70 an konservierte Motive der ζ -Kette sowie der γ , δ , und ϵ -Untereinheit des CD3-Komplexes, die als Immunrezeptortyrosin aktivierendes Motiv oder ITAM bezeichnet werden. Das ITAM Motiv wird nach Stimulation des TCR/CD3-Komplexes an Tyrosinresten phosphoryliert. Die Phosphorylierung der ITAMs stellt einen notwendigen Schritt in der Rekrutierung der ZAP-70-Kinase an den aktivierten TCR/CD3-Komplex dar. Dabei erfolgt die Phosphorylierung der ITAMs durch Ick nach Antigen vermittelter Stimulation des TCR/CD3-Komplexes (Cantrell, 1998). ZAP-70 bindet an ITAMs über die SH2-Domäne. Der Bindung an die ITAMs folgt die Phosphorylierung und Aktivierung von ZAP-70. Die katalytische Aktivität von ZAP-70 kann durch Modifikation spezifischer Tyrosinreste reguliert werden. Noch

immer wird kontrovers diskutiert, ob die Bindung an ITAMs unmittelbaren Einfluss auf die Aktivierung der Kinasefunktion von ZAP-70 hat, etwa über intramolekulare strukturelle Änderungen (LoGrasso *et al.*, 1996; Neumeister *et al.*, 1995; Magistrelli *et al.*, 1999; Visco *et al.*, 2000). Es gibt Daten, dass die Membranassoziiierung von ZAP-70 einen notwendigen Schritt in der Signaltransduktion darstellt. Durch die Quervernetzung transmembraner Fusionsproteine von ZAP-70 kommt es zur zellulären Aktivierung, die unabhängig von der Phosphorylierung der ITAMs ist (Kolanus *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1996). Jedoch ist die Aktivierung von der Koaggregation mit scr-Tyrosinkinasen abhängig (Kolanus *et al.*, 1993). Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung von ZAP-70 nicht durch Autophosphorylierung sondern auch durch Transphosphorylierungsvorgänge reguliert wird.

5.5.1.1 Die Kinaseaktivität wird durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten reguliert

Die Phosphorylierung distinkter Tyrosinreste reguliert dabei sowohl die Aktivierung als auch Inhibierung von ZAP-70. Die drei Tyrosinreste Tyr-292, -492 und -493 wurden als Phosphorylierungsstellen nach Bindung des Antigens an den T-Zell-Rezeptor erkannt (Watts *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995; Wange *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 1996; Mege *et al.*, 1996). Die Reste Tyr-492 und -493 liegen in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne von humanem ZAP-70. Die Substitution des Tyrosinrestes 492 führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer kinasehyperaktiven ZAP-70-Mutante. Die Überexpression von ZAP-70(Y492F) in Jurkat LT-Zellen resultiert in einer gesteigerten Phosphorylierung des exogenen Proteins. *In vitro* zeigt, partiell gereinigtes, an phosphoryliertes ζ -gebundenes, ZAP-70(Y492F) eine 5-fach gesteigerte Kinaseaktivität gegenüber exogenem Substrat wie Sam68 (Wange *et al.*, 1995). Der benachbarte Tyrosinrest Tyr-493 wird überwiegend von scr-Kinasen phosphoryliert und besitzt vermutlich positiv regulatorische Funktion, da dessen Mutation zu Phenylalanin in der Doppelmutante ZAP-70(YY492/493FF) in einer Kinaseaktivität reduzierten ZAP-70-Variante resultiert. Im Hinblick auf die gegenläufigen Effekte der Phosphorylierung der Tyrosinreste -492 und -493 ergibt sich daraus die Möglichkeit eines regulatorischen Kreislaufes, welcher zunächst bei Phosphorylierung von Tyr-493 zur Stimulation der ZAP-70 Kinaseaktivität und bei der weitergehenden, zeitverzögerten Phosphorylierung von Tyr-492 zur Inaktivierung von ZAP-70 führt (Chan *et al.*, 1995; Wange *et al.*, 1995). Als eine weitere wichtige Aminosäure, die direkt die Kinaseaktivität von ZAP-70 modifiziert, wurde der Lysinrest 369 in der ATP-bindenden Untereinheit der Kinasedomäne erkannt (Quian *et al.*, 1996). Die Substitution dieses Aminosäurerestes zu Glycin bei ZAP-70(K-) wirkt vollständig inhibierend auf die Kinaseaktivität der ZAP-70-Mutante.

Die Tyrosinreste 597 und 598 dagegen modulieren nicht nur die katalytische Aktivität von ZAP-70 *in vitro*, sondern sind auch an der Signaltransduktion, die in der Stimulierung des IL-2-Promotors endet, beteiligt. Beide Tyrosine sind in den syk-Kinasen evolutiv konserviert (vgl. Abbildung 4.8.1) und lassen somit eine wichtige regulatorische Funktion vermuten. Erste funktionale Hinweise dieser Tyrosinreste wurden von Lutz Zeitlmann erbracht, in dem er zeigen konnte, dass die Überexpression von ZAP-70(YF-C) die Aktivierung des NF-AT-Promotorelements und somit die Aktivierung des IL-2-Promotors induziert. *In vitro* bewirkt die Substitution der Tyrosinreste 597 und 598 eine moderate Steigerung der Phosphotransferaseaktivität gegenüber exogenem Substrat um den Faktor 1,4. Das aktivierende Potential der ZAP-70(YF-C)-Mutante kann nicht auf die gesteigerte *in vitro* Kinaseaktivität dieser Mutante zurückgeführt werden, da ZAP-70(Y492F) eine, gegenüber ZAP-70(YF-C) um den Faktor 2-3 gesteigerte Phosphotransferaseaktivität auf exogenes Substrat besitzt, aber dennoch keine Stimulation des IL-2-Promotors induziert. Die Hyperphosphorylierung eines spezifischen

Peptidfragmentes (vgl. Abbildung 4.8.7, Peptid „B“) bei den Mutanten ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) korreliert eng mit einer gesteigerten Kinaseaktivität der jeweiligen Mutanten, jedoch nicht mit der Fähigkeit Signale in den Zellkern zu leiten. Die Phosphorylierung dieses unidentifizierten Tyrosinrestes stellt somit ein charakteristisches Ereignis der phosphotransferasehyperaktiver ZAP-70-Kinasen dar. Unklar dabei ist, ob die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes die Aktivierung der Kinase induziert. Als eine mögliche Aminosäure könnte daher Tyr-493 betrachtet werden. Die erhöhte Kinaseaktivität führt jedoch zur Phosphorylierung zahlreicher Tyrosinreste, so dass eine unspezifische Phosphorylierung weiterer Tyrosine nicht ausgeschlossen werden kann.

5.5.1.2 Die Tyrosine 597 und 598 regulieren die Phosphorylierung diverser zellulärer Proteine

Die Expression von ZAP-70(YF-C) in Jurkat LT-Zellen induzierte die Hyperphosphorylierung diverser zellulärer Proteine, insbesondere von Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von 21-23 kD, 36-38 kD, 56 kD, 70-80 kD, 95 kD und 150 kD. Mögliche Kandidaten für diese Phosphoproteine, nämlich SLP-76, p36-38 LAT und p95 vav, sind potentielle Substrate von ZAP-70. Möglicherweise wird das T-Zell aktivierende Potential der ZAP-70(YF-C)-Mutante durch die erhöhte Kinaseaktivität gegenüber dem Adapterprotein SLP-76 vermittelt (Wardenburg *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 1997; Raab *et al.*, 1997). SLP-76 assoziiert mit Grb2 sowie Vav und wird nach Ligation des T-Zell-Rezeptors schnell phosphoryliert (Wardenburg *et al.*, 1996; Tuosto *et al.*, 1996). Die Überexpression von SLP-76 resultiert wie auch die Überexpression von ZAP-70(YF-C) in einer deutlichen Steigerung der TCR-stimulierten IL-2- und NF-AT- Promotoraktivität. Durch die Phosphorylierung von SLP-76 durch ZAP-70 sowie durch die Interaktion des Adapterproteins SLP-76 mit Vav und Grb2 ist ZAP-70 an der Signalübertragung des TCR auf den JNK und Ras Signalweg beteiligt (Cantrell, 1996; Wu *et al.*, 1996). Bei dem hochmolekularen Phosphoprotein p150 könnte es sich um PLC γ handeln, deren Aktivität über Tyrosinphosphorylierung reguliert werden kann (Kim H.K. *et al.*, 1991). Während PLC γ von p72-Syk sowie von src- und Tec-Kinasen direkt phosphoryliert zu werden scheint, ist bislang nicht geklärt, ob PLC- γ ein direktes Substrat von ZAP-70 darstellt (Law *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999). Lutz Zeitlmann konnte darüber hinaus noch zeigen, dass p21-23, dessen mögliche Identität mit unterschiedlich phosphorylierten Formen der TCR- ζ Kette im folgenden Abschnitt diskutiert wird, ein konsistent nachweisbares, intensiv tyrosinphosphoryliertes Substrat nach ZAP-70(YF-C) Expression ist. Diese Phosphorylierungsereignisse können nicht auf die erhöhte Kinaseaktivität von ZAP-70(YF-C) zurückgeführt werden, da ZAP-70(Y492F), das *in vitro* eine höhere Phosphotransferaseaktivität besitzt, nicht das selbe Phosphorylierungsmuster in Jurkat LT-Zellen induzieren kann. Offenbar sind die durch ZAP-70(YF-C) vermittelten Phosphorylierungsereignisse durch weitere Regulationsmechanismen verursacht. So wird für die Ausprägung des konstitutiv aktiven Phänotyps von ZAP-70(YF-C) eine zumindest basale Aktivität der src-Kinase lck benötigt, da die Expression in JCAM1 Zellen keinerlei funktionalen Effekt besitzt (Zeitlmann, Dissertation 2000). Es kann jedoch nicht unterschieden werden, welche Phosphorylierungsereignisse direkt auf die Aktivität von ZAP-70(YF-C) zurückzuführen sind oder aus dem Zusammenwirken von ZAP-70 und lck resultieren. Darüber hinaus scheint der Phosphotyrosingehalt von ZAP-70(YF-C) höher als der anderer ZAP-70 Varianten zu sein (vgl. Abbildung 4.8.2 und Abbildung 4.8.7). Die Fähigkeit von ZAP-70 sich selbst zu phosphorylieren wird durch Bindung an phosphoryliertes ITAM über die beiden SH2-Domänen gesteigert (Neumeister *et al.*, 1995, LoGrasso *et al.*, 1996).

5.5.1.3 Die Phosphorylierung der ζ -Kette wird durch ZAP-70 vermittelt

Die Expression der konstitutiv aktiven ZAP-70 Variante YF-C resultiert bei Jurkat T-Zellen in einer Hyperphosphorylierung von Proteinen mit 21 und 23 kD (Zeitlmann *et al.*, 1998). Die TCR- ζ Kette war auf Grund der in der Literatur beschriebenen Größe ein offensichtlicher Kandidat für beide Proteinbanden im anti-Phosphotyrosin Westernblot. Differentielle Phosphorylierung der ζ -Kette an Tyrosinresten der drei ITAMs ist verantwortlich für das unterschiedliche Laufverhalten in denaturierender Gelelektrophorese (Kersh *et al.*, 1998). Interessanterweise korreliert der Phosphorylierungsgrad der ζ -Kette eng mit dem aktivierenden Potential einer T-Zell-Rezeptor Stimulation durch ein Peptidantigen. Während die Stimulation mit einem Liganden geringer Affinität zu einer unvollständigen Phosphorylierung der ζ -Kette zur p21 Form führt, resultiert die Stimulation mit dem agonistischen, mitogenen TCR Liganden in der extensiven Phosphorylierung der ζ -Kette zur p23 Form (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994; Madrenas *et al.*, 1995). Der Mechanismus dieser differentiellen Phosphorylierung kann als unterschiedlich effiziente Rekrutierung von CD4-assoziierten p56-lck Molekülen in die Proximität des TCR Komplexes interpretiert werden (Madrenas *et al.*, 1997). Die differentiell phosphorylierten TCR- ζ Ketten könnten alternative intrazelluläre Liganden aufweisen, welche stimulatorische oder inhibitorische Signaltransduktion zur Folge haben (Kersh *et al.*, 1999; Love und Shores, 2000). Da die p21 Form hauptsächlich monophosphorylierte ITAMs enthält, die p23 Form hingegen an beiden Tyrosinresten phosphoryliert zu sein scheint, sollte nur die p23 Isoform beide SH2-Domänen von ZAP-70 binden können. Möglicherweise bewirkt somit erst dieser Komplex aus p23- ζ und ZAP-70 eine effiziente Aktivierung von stimulatorischen Signaltransduktionskaskaden (Kersh *et al.*, 1998). Die Induktion der p23 Form der TCR- ζ Kette nach Expression von ZAP-70(YF-C) würde demzufolge in Einklang mit der zu beobachtenden konstitutiven Stimulation von NF-AT Elementen stehen (Zeitlmann *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben starke Hinweise, dass die ζ -Kette direkt als Substrat der Phosphotransferaseaktivität von ZAP-70 dient. Durch die Überexpression der ζ -Chimären kommt es in Jurkat LT-Zellen zur konstitutiven Phosphorylierung des ζ -Anteils und somit zur Assoziation der ZAP-70-Mutanten. Die Phosphorylierung der ITAMs durch lck wird durch ZAP-70 gesteigert, wobei die Kinaseaktivität von ZAP-70 keine Rolle spielt (Ashe *et al.*; 1999). van Oers *et al.* (1998) konnten zeigen, dass in peripheren T-Zellen und Thymocyten ITAM-Motive phosphoryliert vorliegen, wobei ZAP-70 bereits an die phosphorylierten ζ -Ketten gebunden, aber noch nicht aktiviert ist. Durch die Quervernetzung der transmembranen chimären sIg-Zeta Proteine zeigt sich ein differenzierteres Phosphorylierungsmuster sowohl der ζ -Kette als auch der ZAP-70-Mutanten (Abbildung 4.8.3 B). Offenbar induziert die Zusammenlagerung der ζ -Kettenanteile die Rekrutierung von Phosphatasen in den Komplex und vermittelt dadurch die gezielte Phosphorylierung der in diesem Komplex assoziierten Proteine. Dadurch kommt es zur Dephosphorylierung der kinaseinaktiven ZAP-70-Mutanten, während die kinaseaktiven ZAP-70-Mutanten weiterhin phosphoryliert vorliegen. ZAP-70(YF-C) induziert eine gesteigerte Phosphorylierung der ζ -Kette sowie eine damit verbundene Erhöhung von ζ -assoziiertem ZAP-70(YF-C) im Gegensatz zu nativem ZAP-70. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von ZAP-70 durch eine Wechselwirkung von Phosphatasen und Kinasen reguliert wird. Die Aktivierung von ZAP-70 in Mastzellen benötigt nach Bindung an phosphoryliertes ITAM die Phosphatase CD45 (Zhang und Siraganian, 1999).

Als die wesentliche Kinasen, welche nach TCR-Stimulation durch Antigen Erkennung Tyrosinreste in den ITAMs der TCR- ζ Kette phosphorylieren können, wurden die src-Kinasen p56-lck und p59-fyn erkannt (Iwashima *et al.*, 1994; van Leeuwen und Samelson, 1999). Indizien für alternative Kinasen der

ITAMs sind zwar von mehreren Autoren beobachtet worden, jedoch wurden bislang die ITAMs der ζ -Kette nie als direkte Substrate von ZAP-70 impliziert (Chu *et al.*, 1996; Sunder-Plassmann *et al.*, 1997; Pao und Cambier, 1997; Ashe *et al.*, 1999). Zudem ist die katalytische Aktivität von ZAP-70 gegenüber Tyrosinresten der ITAMs *in vitro* nur sehr gering (Daten nicht gezeigt; Isakov *et al.*, 1996). In COS-7m-Zellen erfolgte die vollständige Phosphorylierung der ζ -Kette konstitutiv durch koexprimiertes Ick. Die Wechselwirkung mit T-Zell spezifischen Kinasen und Phosphatasen wurde durch die Verwendung der COS-7m-Zelllinie ausgeschlossen. Dabei zeigte sich, dass in COS-Zellen durch die kinaseaktiven Varianten ZAP-70, ZAP-70(YF-C) und ZAP-70(Y492F) die Phosphorylierung der ζ -Kette erfolgt, während die kinaseinaktiven Mutanten keine Phosphorylierung der ζ -Kette verursachten. Damit konnte eindeutig geschlossen werden, dass ZAP-70 die ζ -Kette ohne Unterstützung von Ick modifizieren kann. Hinweise auf die vollständige Phosphorylierung der ζ -Kette ergeben sich daraus, dass die kinaseaktiven ZAP-70-Mutanten mit der ζ -Kette in Koimmunpräzipitationsstudien assoziierten. Die Bindung an diphosphoryliertes ITAM ist dabei stärker als an monophosphoryliertes ITAM (Zenner *et al.*, 1996; Osman *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu zeigten Zoller *et al.* (1997), dass die Koexpression von ZAP-70 mit dem ITAM-enthaltenden Rezeptor CD8 in COS-Zellen nicht zur Aktivierung von ZAP-70 und zur Phosphorylierung des ITAM-Motivs führt. Dies ist möglicherweise auf den unterschiedlichen Kontext der ITAM-Sequenzen in der CD8-Kette und der ζ -Kette zurückzuführen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zur Phosphorylierung der ζ -Kette durch ZAP-70 sowie die von Lutz Zeitlmann beschriebene Phosphorylierung als auch Koimmunpräzipitation mit ZAP-70(YF-C) zeigen deutlich, dass ZAP-70(YF-C) die ζ -Kette phosphorylieren kann und dass die Phosphorylierung an der Aktivierung der T-Zellen nach Expression von ZAP-70(YF-C) eine wichtige Rolle spielt. Die verstärkte Phosphorylierung von ζ bei Expression von ZAP-70(YF-C) ist möglicherweise sowohl auf die erhöhte Kinaseaktivität dieser Mutante als auch auf den schützenden Einfluss der vermehrten Bindung von ZAP-70(YF-C) an die ζ -Kette zu erklären. So bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration der SH2-Domäne von ZAP-70 einen Schutz phosphorylierter ζ -Ketten vor zellulären Tyrosinphosphatasen (Quian *et al.*, 1996; Mege *et al.*, 1996). Zudem bleibt unklar, ob ZAP-70(YF-C) verstärkt Ick rekrutieren kann und so indirekt die Phosphorylierung der ζ -Kette fördert. Das Postulat, dass die erhöhte Aktivität der ZAP-70(YF-C) auf die verstärkte Bindung an phosphoryliertes ζ zurückzuführen ist, konnte jedoch durch die Interaktionsanalyse der ZAP-70-Varianten mit dem in COS-Zellen durch Ick phosphorylierten sIg-Zeta-Konstrukt widerlegt werden. Die Affinität von ZAP-70 wird durch die Phosphorylierung der ζ -Kette determiniert und ist unabhängig von der Phosphorylierung des ZAP-70 (vgl. Abbildung 4.8.5).

5.5.1.4 Die Tyrosine 597 und 598 inhibieren die Phosphorylierung distinkter Tyrosinreste

Auf Grund der hier diskutierten Daten, zusammen mit den Ergebnissen von Lutz Zeitlmann, kann nicht eindeutig geschlossen werden, welche Mechanismen den konstitutiv aktiven Phänotyp verursachen. Zusammengefasst lassen die oben diskutierten Daten schließen, dass ZAP-70(YF-C) an der Phosphorylierung der ζ -Kette beteiligt ist. Es ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung der TCR ζ -Kette entscheidenden Anteil an der Vermittlung des konstitutiv aktiven Phänotyps der ZAP-70(YF-C) Variante hat. So besitzt ZAP-70(YF-C) keine funktionale Aktivität in T3.5 Jurkat T-Zellen, die keine TCR-Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren (Lutz Zeitlmann, Dissertation; 2000). Dabei kann durch die regulatorischen Tyrosinreste 597 und 598 eine Aktivierung der Kinaseaktivität induziert werden. Die gewonnenen *in vitro* Daten zur Kinaseaktivität der ZAP-70(YF-C) Variante lassen

allerdings vermuten, dass die erhöhte Kinaseaktivität den aktivierenden Phänotyp nicht entscheidend determiniert. Vielmehr muss gefolgert werden, dass durch die Substitution der C-terminalen Tyrosine 597 und 598 die Phosphorylierung regulatorischer Tyrosinreste ermöglicht wird. Die durchgeführte *in vitro*-Phosphopeptidkartierung zeigte die Hyperphosphorylierung eines spezifischen Peptidfragmentes (Abbildung 4.8.7: Peptid A), das jedoch nicht näher charakterisiert wurde. Die Phosphorylierung dieses Peptides wird durch die Substitution der C-terminalen Aminosäuren Tyrosin 597 und 598 induziert. Diese Daten implizieren, dass diese Tyrosinreste inhibitorisch auf die Phosphorylierung des Peptides A wirken. Die funktionale konstitutive Aktivität der ZAP-70(YF-C) Mutante kann daher auf zwei möglichen Mechanismen beruhen. Zum einen kann durch die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste die Kinaseaktivität reguliert werden (vgl. Abschnitt 5.5.1.1), zum anderen kann sie die Bindung weiterer regulatorischer Proteine ermöglichen.

Neueste Studien zu ZAP-70 haben gezeigt, dass der Domäne zwischen der carboxyterminalen SH2 und der Kinasedomäne, auch Interdomäne 2 genannt, besondere funktionale Aktivität zukommt. Der Aminosäurerest Tyrosin 319 in dieser Domäne wurde als eine induzierbare Phosphorylierungsstelle beschrieben (Di Bartolo *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). Die Mutation dieser Aminosäure zu Phenylalanin resultiert in einer dominant negativen Variante von ZAP-70 auf die von NF-AT abhängige Transkription und IL-2-Produktion (Di Bartolo *et al.*, 1999). Kontrovers dagegen sind die Daten zur katalytischen Aktivität nach Mutation des Aminosäurerestes Tyrosin-319. Williams *et al.* (1999) beobachteten keine Veränderung der Phosphotransferaseaktivität während DiBartolo *et al.* (1999) eine Reduktion der Kinaseaktivität von 60-70% auf exogenes Substrat beschrieben. Neben dem Tyrosinrest 319 werden zudem noch die Tyrosinreste Y292 und Y315 in der Interdomäne B phosphoryliert. Jedoch resultiert die Phosphorylierung von Tyr-292 in einer negativen Regulation der ZAP-70 Funktion. Wu *et al.* (1997) konnten zeigen, dass der Tyrosinrest 315 eine mögliche Vav-Bindungsstelle darstellt und an der Aktivierung der T-Zellen beteiligt ist. Die Substitution dieses Tyrosinrestes resultiert in einer Inaktivierung von ZAP-70 in der T-Zell Stimulierung und verursacht zudem noch die Reduktion der Tyrosinphosphorylierung von ZAP-70, Vav, Slp-76 und Shc. Die Vav-Bindungsstelle Y315 vermittelt möglicherweise nach Phosphorylierung die IL-2-Aktivierung der ZAP-70(YF-C) Variante.

6 Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die durch das β_2 -Integrin LFA-1 vermittelte Adhäsion von Lymphocyten an den Liganden ICAM-1. Die Bindung von LFA-1 an den Liganden ICAM-1 wird durch viele Faktoren bestimmt. Hierzu zählen die Aktivierung des TCR Komplexes, die Stimulation der Zellen durch Phorbolster und andere weniger gut definierte Signale, die im Zusammenhang mit der Extravasation der Leukocyten stehen. Untersuchungen von Kolanus *et. al.* (1996) konnten schließlich zeigen, dass die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 durch Cytohesin-1 reguliert wird. Durch die Überexpression von Cytohesin-1 wird die Adhäsion von Jurkat LT Zellen an ICAM-1 induziert. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Cytohesin-1 als Regulator der Zelladhäsion und der Integrinaktivierung untersucht. Ausgangspunkt der durchgeführten Untersuchungen bildeten Daten, welche die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für die G-Proteine aus der Klasse der ARF-Familie identifizierten. In dieser Arbeit wurde daher der von Cytohesin-1 katalysierte GDP/GTP-Austausch der monomeren ARF Proteine untersucht. Die zentrale Fragestellung für die physiologische Relevanz bildete die Spezifität der ARF/Cytohesin-1 Interaktion. Hierfür erwies sich die Verwendung eines Untersuchungssystems, bei dem bakteriell exprimierte rekombinante Proteine verwendet wurden, als unzureichend. Eine korrekte Modifikation von ARF6 konnte in Bakterien nicht erzielt werden, da die N-Myristoyltransferase der *Saccharomyces cerevisiae* ARF6 nicht als Substrat erkennt. Für die biologische Aktivität der ARFs stellt die korrekte Modifizierung des N-Terminus durch die Addition eines Myristat-Restes eine notwendige Voraussetzung dar. Es wurde daher ein System etabliert, die Funktion und Aktivität von G-Proteinen *in vivo* untersuchen zu können. Die ARFs wurden als C-terminale Fusionsproteine mit dem menschlichen ImmunglobulinG-Anteil bzw. dem grün-fluoreszierenden GFP-Protein in eukaryontischen Zellen wie T-Zelllinien oder Cos7-Zellen exprimiert und so eine unzureichende Prozessierung und Modifizierung der zu untersuchenden ARFs vermieden. Es konnte mit den aus der Zelle immunpräzipitierten chimären IgG-Fusionsproteinen gezeigt werden, dass Cytohesin-1 die Dissoziation von GDP sowohl von ARF1 als auch ARF6 katalysieren kann. Die Substitution des Glutamats157 zu Lysin in der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 resultiert in der katalyseinaktiven Variante Cytohesin-1(E157K). Somit steigert die Sec7-Domäne von Cytohesin-1 den GDP/GTP-Umsatz der ARFs, besitzt aber gegenüber den ARFs aus den drei Klassen keine Spezifität. Die Interaktion der ARFs mit Cytohesin-1 erfolgt dabei über die Sec7-Domäne, wobei der Glutamatreist 157 keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität nimmt und somit nur an der Katalyse der GDP-Freisetzung beteiligt ist. Für die durch die Sec7-Domäne im Kontext des gesamten Cytohesin-1 Proteins katalysierte GDP-Dissoziation ist die Myristoylierung der ARFs entscheidend. Daneben determiniert die Myristoylierung sowie die N-terminale Aminosäuresequenz die zelluläre Lokalisation der ARFs. Durch Mutation der N-Termini von ARF1 und ARF6, die in myristoylierungsdefizienten Mutanten resultiert, bleiben die ARFs diffus und unspezifisch im Cytoplasma lokalisiert. Durch die Myristoylierung dagegen wird ARF1 und ARF6 zu distinkten Zellkompartimenten dirigiert. Die genaue Lokalisierung der ARFs wird darüber hinaus durch das gebundene Guaninnukleotid bestimmt. In der GDP-gebundenen Form liegen ARF1 und ARF6 überwiegend im Cytoplasma vor, während die GTP- Formen an Membranen gebunden sind. Somit durchlaufen ARF1 und ARF6 einen Zyklus zwischen der membrangebundenen, aktiven Form und der cytosolischen, inaktiven Form. Die Assoziation erfolgt dabei gerichtet mit distinktem Membrankompartimenten, die sich von ARF1 und ARF6 unterscheiden. ARF1 ist mit intrazellulären Membrankompartimenten assoziiert, die dem Golgi sowie endosomalen Vesikeln zugeordnet werden

können. ARF6 dagegen ist ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert. Da Cytohesin-1 in die Cytoplasmamembran durch die Phosphatidylinositolprodukte PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ der Phosphatidylinositol-3 Kinase rekrutiert wird, stellte ARF6 auf Grund der zellulären Lokalisierung ein potentiell Kandidatenprotein für die katalytische Aktivität der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 dar. Es zeigte sich jedoch, dass der Guaninnukleotid-Austausch von ARF1 und ARF6 durch Phosphatidylinositole modifiziert wird. So steigert Cytohesin-1 den GDP/GTP-Austausch von ARF1 in Gegenwart von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃. Die GDP-Dissoziation bzw. die Bindung von GTP wird durch Phosphatidylinositole drastisch reduziert. Diese Daten zeigen, dass ARF6 nach Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran durch PtdIns(4,5)P₂ bzw. PtdIns(3,4,5)P₃ kein Substrat für die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 *in vivo* darstellt. Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass Cytohesin-1 den Guaninnukleotid-Austausch sowohl von ARF1 und ARF6 katalysiert, die Spezifität der katalytischen Aktivität durch Phosphatidylinositole sowie durch die zelluläre Lokalisierung der Proteine reguliert wird. Die Zelle besitzt somit auf mehreren Ebenen die Möglichkeit, die Aktivität der ARFs *in vivo* gezielt zu regulieren. Die Aktivierung der ARFs stellt für die Zelle ein kritisches Ereignis dar. So konnte gezeigt werden, dass ARF6_{GTP} an der Stimulierung der T-Zellen beteiligt ist, da nach PMA-Behandlung der Zellen die Transkription des autokrinen Wachstumsfaktors Interleukin-2 induziert wird. Somit besitzen die ARFs neben ihrer Rolle als Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransportes weitere Funktionen. Die Bedeutung der T-Zell aktivierenden Funktion von ARF6 ist unklar. ARF6 ist nicht an der direkten Signalübertragung des antigenstimulierten TCR/CD3-Komplexes beteiligt, da weder durch die dominant negative Mutante ARF6 (T27N) noch durch eine konstitutiv aktive Mutante ARF6 (Q67L) die Signaltransduktion des TCR moduliert wird. ARF6 ist weder an der Aktivierung von Vav noch an den bekannten Signaltransduktionswegen der Rho-GTPasen in aktivierten T-Zellen beteiligt. Die Stimulation des IL-2-Promotors durch konstitutiv aktives ARF6 stellt somit einen weiteren aktivierenden Signalmechanismus in stimulierten T-Zellen dar, der unabhängig vom Signaltransduktionsweg des stimulierten TCR/CD3-Komplexes funktioniert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit Lutz Zeitlmann ein weiterer Aspekt der T-Zell-Aktivierung untersucht. Die in syk-Kinasen stark konservierten Tyrosinreste 597 und 598 wurden als kritische Autophosphorylierungsstellen erkannt, die eine wichtige regulatorische Funktion besitzen. Die Substitution dieser Aminosäuren führt zu einer konstitutiv aktiven ZAP-70 Variante ZAP-70(YF-C), welche die Interleukin-2 Expression in Jurkat LT Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT induziert. Die biologische Aktivität wird nicht durch eine verstärkte Rekrutierung an phosphorylierte ITAM-Motive der ζ-Kette bewirkt. Biochemische Untersuchungen zeigten indes, dass diese beiden Tyrosinreste an der Regulation der Kinaseaktivität *in vivo* beteiligt sind, da die Expression von ZAP-70(YF-C) die Phosphorylierung zahlreicher Proteine induziert. *In vitro* dagegen zeigt ZAP-70(YF-C) nur eine moderate Steigerung der Kinaseaktivität. Jedoch konnte nach Autophosphorylierung von ZAP-70(YF-C) die Hyperphosphorylierung von Tyrosinresten durch eine zweidimensionale Phosphopetidkartierung gezeigt werden. Damit stellt die Phosphorylierung der Tyrosinreste 597 und 598 ein kritisches Ereignis dar, dass negativ regulatorisch die physiologische Aktivität von ZAP-70 bestimmt.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N.N. & Donaldson, J.G.** (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant [In Process Citation]. *Mol. Cell Biol.* **Aug 20**(16), 5998-6007.
- Allen, W.E., Zicha, D., Ridley, A.J. & Jones, G.E.** (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* **141**, 1147-1157.
- Alon, R., Rossiter, H., Wang, X., Springer, T.A. & Kupper, T.S.** (1994). Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow. *J. Cell Biol.* **127**, 1485-1495.
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. & Ringe, D.** (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708.
- Andre, P., Boretto, J., Hueber, A.O., Regnier-Vigouroux, A., Gorvel, J.P., Ferrier, P. & Chavrier, P.** (1997). A dominant-negative mutant of the Rab5 GTPase enhances T cell signaling by interfering with TCR down-modulation in transgenic mice. *J. Immunol.* **159**, 5253-5263.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. & Chabre, M.** (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-4684.
- Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M. & Cassel, D.** (1997). Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* **272**, 30848-30851.
- Arcaro, A. & Wymann, M.P.** (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* **296**, 297-301.
- Arnaout, M.A.** (1990). Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol. Rev.* **114**, 145-180.
- Ashe, J.M., Wiest, D.L., Abe, R. & Singer, A.** (1999). ZAP-70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T cell receptor signaling motifs (ITAMs) in immature CD4(+)8(+) thymocytes with limiting p56(lck). *J. Exp. Med.* **189**, 1163-1168.
- Aversa, G., Chang, C.C., Carballido, J.M., Cocks, B.G. & de Vries, J.E.** (1997). Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive. *J. Immunol.* **158**, 4036-4044.
- Avraham, A., Jung, S., Samuels, Y., Seger, R. & Ben-Neriah, Y.** (1998). Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2320-2330.
- Azzi, A., Boscoboinik, D. & Hensey, C.** (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* **208**, 547-557.
- Bachmann, M.F., McCall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W. & Ohashi, P.S.** (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity*. **7**, 549-557.

- Baier-Bitterlich, G., Uberall, F., Bauer, B., Fresser, F., Wachter, H., Grunicke, H., Utermann, G., Altman, A. & Baier, G.** (1996). Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1842-1850.
- Balch, W.E., Kahn, R.A. & Schwaninger, R.** (1992). ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **267**, 13053-13061.
- Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Oshima, H., Morikawa, A., Yoshida, S. & Nozawa, Y.** (1997). Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. Increases of ARF-dependent PLD activity in regenerating liver cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 5208-5213.
- Barry, S.T. & Critchley, D.R.** (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J. Cell Sci.* **107**, 2033-2045.
- Bennett, V. & Gilligan, D.M.** (1993). The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 27-66.
- Bentley, G.A. & Mariuzza, R.A.** (1996). The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 563-590.
- Beraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. & Antonny, B.** (1999). Dual interaction of ADP ribosylation factor 1 with Sec7 domain and with lipid membranes during catalysis of guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **274**, 37629-37636.
- Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J. & Antonny, B.** (1998). A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J.* **17**, 3651-3659.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F.** (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205.
- Berridge, M.J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Berton, G., Fumagalli, L., Laudanna, C. & Sorio, C.** (1994). Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *J. Cell Biol.* **126**, 1111-1121.
- Betz, S.F., Schnuchel, A., Wang, H., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Lipsky, B.P., Harris, E.A.S., Staunton, D.E. & Fesik, S.W.** (1998). Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7909-7914.
- Bimboim, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523
- Bobak, D.A., Nightingale, M.S., Murtagh, J.J., Price, S.R., Moss, J. & Vaughan, M.** (1989). Molecular cloning, characterization, and expression of human ADP-ribosylation factors: two guanine nucleotide-dependent activators of cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6101-6105.

- Boguski, M.S. & McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- Bolen, J.B.** (1995). Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 306-311.
- Boutin, J.A.** (1997). Myristoylation. *Cell Signal.* **9**, 15-35.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, H.A. & Sternweis, P.C.** (1995). Stimulation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor. *Methods Enzymol.* **257**, 313-324.
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. & Sternweis, P.C.** (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity [see comments]. *Cell* **75**, 1137-1144.
- Burnett, W.N.** (1981). „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- Bustelo, X.R.** (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell Biol.* **20**(5), 1461-1477.
- Bustelo, X.R., Suen, K.L., Leftheris, K., Meyers, C.A. & Barbacid, M.** (1994). Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene* **9**, 2405-2413.
- Buyon, J.P., Slade, S.G., Reibman, J., Abramson, S.B., Philips, M.R., Weissmann, G. & Winchester, R.** (1990). Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions. *J. Immunol.* **144**, 191-197.
- Cai, T.Q. & Wright, S.D.** (1996). Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J. Exp. Med.* **184**, 1213-1223.
- Cantrell, D.** (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 259-274.
- Cantrell, D.** (1998). Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr. Biol.* **8**, R535-8.
- Cantrell, D.** (1998). The real LAT steps forward. *Trends. Cell Biol.* **8**, 180-182.
- Carraway, K.L. & Carraway, C.A.** (1989). Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 147-171.
- Cary, L.A., Han, D.C. & Guan, J.L.** (1999). Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol. Histopathol.* **14**, 1001-1009.
- Casadaban, M.J. & Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207.
- Caumont, A.S., Galas, M.C., Vitale, N., Aunis, D. & Bader, M.F.** (1998). Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **273**, 1373-1379.

- Cavenagh, M.M., Whitney, J.A., Carroll, K., Zhang Cj, Boman, A.L., Rosenwald, A.G., Mellman, I. & Kahn, R.A.** (1996). Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **271**, 21767-21774.
- Chambers, C.A. & Allison, J.P.** (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 396-404.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R. & Kurosaki, T.** (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* **14**, 2499-2508.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L. & Chabre, M.** (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-484.
- Chen, E.Y., Seeburg, P.H.,** (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170
- Cheresh, D.A., Leng, J. & Klemke, R.L.** (1999). Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* **146**, 1107-1116.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antonny, B. & Chardin, P.** (1998). Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* **392**, 101-105.
- Chien, Y.H., Jores, R. & Crowley, M.P.** (1996). Recognition by gamma/delta T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 511-532.
- Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M. & Schwartz, M.A.** (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**, 507-513.
- Chu, D.H., Spits, H., Peyron, J.F., Rowley, R.B., Bolen, J.B. & Weiss, A.** (1996). The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *EMBO J.* **15**, 6251-6261.
- Chu, N.R., DeBenedette, M.A., Stiernholm, B.J., Barber, B.H. & Watts, T.H.** (1997). Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and. *J. Immunol.* **158**, 3081-3089.
- Cichowski, K., Brugge, J.S. & Brass, L.F.** (1996). Thrombin receptor activation and integrin engagement stimulate tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in platelets. *J. Biol. Chem.* **271**, 7544-7550.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M. & Hynes, R.O.** (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* **142**, 573-586.
- Clipstone, N.A. & Crabtree, G.R.** (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-697.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O. & Hsuan, J.J.** (1994). Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* **263**, 523-526.

- Coppolino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S. & Wilkins, J.** (1995). Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J. Biol. Chem.* **270**, 23132-23138.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J.S.** (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146.
- Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., Gosselin, M., Owen, L.R., Rudd, C.E. & Gutierrez-Ramos, J.C.** (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-. *Immunity*. 2000. Jul;13(1):95-105. **13**, 95-105.
- Crabtree, G.R. & Clipstone, N.A.** (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **63:1045-83**, 1045-1083.
- Crespo, P., Bustelo, X.R., Aaronson, D.S., Coso, O.A., Lopez-Barahona, M., Barbacid, M. & Gutkind, J.S.** (1996). Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav. *Oncogene* **13**, 455-460.
- da Silva, A.J., Raab, M., Li, Z. & Rudd, C.E.** (1997). TcR zeta/CD3 signal transduction in T-cells: downstream signalling via ZAP-70, SLP-76 and FYB. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 361-366.
- Dascher, C. & Balch, W.E.** (1994). Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **269**, 1437-1448.
- DeBenedette, M.A., Shahinian, A., Mak, T.W. & Watts, T.H.** (1997). Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J. Immunol.* **158**, 551-559.
- Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T. & Altman, A.** (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity*. **5**, 591-604.
- Dedhar, S. & Hannigan, G.E.** (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 657-669.
- Dedhar, S.** (1994). Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? *Trends. Biochem. Sci.* **19**, 269-271.
- DeFranco, A.L.** (1995). Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 163-175.
- Di Bartolo, V., Mege, D., Germain, V., Pelosi, M., Dufour, E., Michel, F., Magistrelli, G., Isacchi, A. & Acuto, O.** (1999). Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 6285-6294.
- Dohlman, H.G., Goldsmith, P., Spiegel, A.M. & Thorner, J.** (1993). Pheromone action regulates G-protein alpha-subunit myristoylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9688-9692.
- Dolfi, F., Garcia-Guzman, M., Ojaniemi, M., Nakamura, H., Matsuda, M. & Vuori, K.** (1998). The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15394-15399.

- Donaldson, J.G. & Klausner, R.D.** (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 527-532.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A. & Klausner, R.D.** (1992). ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6408-6412.
- Donaldson, J.G., Finazzi, D. & Klausner, R.D.** (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-352.
- Dong, C., Yang, D.D., Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Xu, J., Davis, R.J. & Flavell, R.A.** (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **2000**, May. 4:405(6782):91-4. **405**, 91-94.
- Dotto, G.P., Horiuchi, K. & Zinder, N.D.** (1982). Initiation and termination of phage f1 plus-strand synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7122-7126.
- Dransfield, I. & Hogg, N.** (1989). Regulated expression of Mg²⁺ binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits. *EMBO J.* **8**, 3759-3765.
- Dransfield, I., Cabanas, C., Barrett, J. & Hogg, N.** (1992). Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J. Cell Biol.* **116**, 1527-1535.
- Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A. & Hogg, N.** (1992). Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* **116**, 219-226.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. & Stahl, P.D.** (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**, 1175-1178.
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V.W., Yang, C., Stahl, P.D. & Peters, P.J.** (1998). ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J. Cell Biol.* **140**, 603-616.
- Duncan, B.K., Rockstroh, P.A., Warner, H.R.** (1978). Escherichia coli K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. *J. Bacteriol.* **134**, 1039-1045
- Dustin, M.L. & Shaw, A.S.** (1999). Costimulation: building an immunological synapse [comment]. *Science* **283**, 649-650.
- Dustin, M.L. & Springer, T.A.** (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624.
- Dustin, M.L. & Springer, T.A.** (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* **9:27-66**, 27-66.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. & Springer, T.A.** (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245-254.
- Exton, J.H.** (1997). New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **272**, 15579-15582.
- Exton, J.H.** (1999). Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**, 121-133.

- Fallman, M., Gullberg, M., Hellberg, C. & Andersson, T.** (1992). Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2656-2663.
- Fan, S.T., Brian, A.A., Lollo, B.A., Mackman, N., Shen, N.L. & Edgington, T.S.** (1993). CD11a/CD18 (LFA-1) integrin engagement enhances biosynthesis of early cytokines by activated T cells. *Cell Immunol.* **148**, 48-59.
- Fensome, A., Cunningham, E., Prosser, S., Tan, S.K., Swigart, P., Thomas, G., Hsuan, J. & Cockcroft, S.** (1996). ARF and P115 restore GTP gamma S-stimulated protein secretion from cytosol-depleted HL60 cells by promoting PIP2 synthesis. *Curr. Biol.* **6**, 730-738.
- Ferguson, S.S., Downey, W.E., 3rd, Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L. & Caron, M.G.** (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**, 363-366.
- Finco, T.S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L.E. & Weiss, A.** (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity.* **9**, 617-626.
- Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A. & Penninger, J.M.** (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* **8**, 554-562.
- Fischer, K.D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. & Guidos, C.** (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature* **374**, 474-477.
- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. & Chavrier, P.** (1998). ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9926-9931.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S.** (1993). Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids. *J. Biol. Chem.* **268**, 24531-24534.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S.** (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337-1341.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S.** (1996). Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 1573-1578.
- Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P.** (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J.* **18**, 1480-1491.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H. & Casanova, J.E.** (1998). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J. Biol. Chem.* **273**, 23-27.

- Frank, S.R., Hatfield, J.C. & Casanova, J.E.** (1998). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3133-3146.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. & Toker, A.** (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate [see comments]. *Science* **275**, 665-668.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. & Tsichlis, P.N.** (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727-736.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. & Weiss, A.** (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* **251**, 313-316.
- Frech, M., Darden, T.A., Pedersen, L.G., Foley, C.K., Charifson, P.S., Anderson, M.W. & Wittinghofer, A.** (1994). Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* **33**, 3237-3244.
- Fuortes, M., Jin, W.W. & Nathan, C.** (1994). Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* **127**, 1477-1483.
- Garnotel, R., Monboisse, J.C., Randoux, A., Haye, B. & Borel, J.P.** (1995). The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. Role of calcium signaling and tyrosine phosphorylation of LFA 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 27495-27503.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S. & Kolanus, W.** (2000). Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J.* **19**, 2525-2536.
- Ghaffari-Tabrizi, N., Bauer, B., Villunger, A., Baier-Bitterlich, G., Altman, A., Utermann, G., Uberall, F. & Baier, G.** (1999). Protein kinase C θ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 132-142.
- Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E.** (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032.
- Giang, D.K. & Cravatt, B.F.** (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2238-2242.
- Giang, D.K. & Cravatt, B.F.** (1998). A second mammalian N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273**, 6595-6598.
- Gilmore, A.P. & Burridge, K.** (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* **381**, 531-535.
- Glomset, J.A. & Farnsworth, C.C.** (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10:181-205**, 181-205.
- Glover, C.J. & Felsted, R.L.** (1995). Identification and characterization of multiple forms of bovine brain N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 23226-23233.

- Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. & De Matteis, M.A.** (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex [see comments]. *Nat. Cell Biol.* **1**, 280-287.
- Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-248.
- Goldberg, J.** (1999). Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893-902.
- Gomez, J., Gonzalez, A., Martinez-A, C. & Rebollo, A.** (1998). IL-2-induced cellular events. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 185-220.
- Gotoh, A., Takahira, H., Geahlen, R.L. & Broxmeyer, H.E.** (1997). Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells. *Cell Growth Differ.* **8**, 721-729.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. & Dustin, M.L.** (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation [see comments]. *Science* **285**, 221-227.
- Greasley, S., Jhoti, H., Fensome, A.C., Cockcroft, S., Thomas, G.M. & Bax, B.** (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on ADP-ribosylation factor 1. *J. Mol. Biol.* **244**, 651-653.
- Greasley, S.E., Jhoti, H., Teahan, C., Solari, R., Fensome, A., Thomas, G.M., Cockcroft, S. & Bax, B.** (1995). The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 797-806.
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A. & Morris, A.J.** (1997). Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868.
- Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R.D., Khosravi-Far, R., Westwick, J.K., Der, C.J. & Broek, D.** (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1346-1353.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C. & Dedhar, S.** (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91-96.
- Harder, T. & Simons, K.** (1999). Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored. *Eur. J. Immunol.* **29**, 556-562.

- Harder, T. & Simons, K.** (1999). Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 556-562.
- Harlan, J.E., Yoon, H.S., Hajduk, P.J. & Fesik, S.W.** (1995). Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **34**, 9859-9864.
- Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M. & Taniguchi, T.** (1989). Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor. *Science* **244**, 551-556.
- Hato, T., Pampori, N. & Shattil, S.J.** (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. *J. Cell Biol.* **141**, 1685-1695.
- Haun, R.S., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M.** (1993). Effect of myristoylation on GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to Golgi. *J. Biol. Chem.* **268**, 7064-7068.
- Hellberg, C., Eierman, D., Sjolander, A. & Andersson, T.** (1995). The Ca²⁺ signaling capacity of the beta 2-integrin on HL60-granulocytic cells is abrogated following phosphorylation of its CD18-chain: relation to impaired protein tyrosine phosphorylation. *Exp. Cell Res.* **217**, 140-148.
- Hibbs, M.L., Jakes, S., Stacker, S.A., Wallace, R.W. & Springer, T.A.** (1991). The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J. Exp. Med.* **174**, 1227-1238.
- Hibbs, M.L., Xu, H., Stacker, S.A. & Springer, T.A.** (1991). Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* **251**, 1611-1613.
- Higgins, L.M., McDonald, S.A., Whittle, N., Crockett, N., Shields, J.G. & MacDonald, T.T.** (1999). Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory. *J. Immunol.* **162**, 486-493.
- Hirai, M., Kusuda, J. & Hashimoto, K.** (1996). Assignment of human ADP ribosylation factor (ARF) genes ARF1 and ARF3 to chromosomes 1q42 and 12q13, respectively. *Genomics* **34**, 263-265.
- Hochhauser, S.J., Weiss, B.** (1978). Escherichia coli mutants deficient in deoxyuridine triphosphatase. *J. Bacteriol.* **134**, 157-166.
- Hodgkin, M.N., Masson, M.R., Powner, D., Saqib, K.M., Ponting, C.P. & Wakelam, M.J.** (2000). Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr. Biol.* *2000. Jan. 13;10(1):43-6.* **10**, 43-46.
- Holmes, D.S. & Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. & Kanaho, Y.** (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-532.

- Hong, J.X., Haun, R.S., Tsai, S.C., Moss, J. & Vaughan, M.** (1994). Effect of ADP-ribosylation factor amino-terminal deletions on its GTP-dependent stimulation of cholera toxin activity [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jun 10;269(23): 16519]. *J. Biol. Chem.* **269**, 9743-9745.
- Hong, J.X., Zhang, X., Moss, J. & Vaughan, M.** (1995). Isolation of an amino-terminal deleted recombinant ADP-ribosylation factor 1 in an activated nucleotide-free state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3056-3059.
- Hosaka, M., Toda, K., Takatsu, H., Torii, S., Murakami, K. & Nakayama, K.** (1996). Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 813-819.
- Howe, L.R. & Weiss, A.** (1995). Multiple kinases mediate T-cell-receptor signaling. *Trends. Biochem. Sci.* **20**, 59-64.
- Huby, R.D.J., Iwashima, M., Weiss, A. & Ley, S.C.** (1997). ZAP-70 protein tyrosine kinase is constitutively targeted to the. *J. Cell Biol.* **137**, 1639-1649.
- Hurtado, J.C., Kim, Y.J. & Kwon, B.S.** (1997). Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic. *J. Immunol.* **158**, 2600-2609.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. & Kroczeck, R.A.** (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and. *Nature* **397**, 263-266.
- Iacobelli, M., Rohwer, F., Shanahan, P., Quiroz, J.A. & McGuire, K.L.** (1999). IL-2-mediated cell cycle progression and inhibition of apoptosis does not require NF-kappa B or activating protein-1 activation in primary human T cells. *J. Immunol.* **162**, 3308-3315.
- Isakov, N., Wange, R.L., Watts, J.D., Aebersold, R. & Samelson, L.E.** (1996). Purification and characterization of human ZAP-70 protein-tyrosine kinase from a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* **271**, 15753-15761.
- Ish Horowicz, D.,** Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res.* **9**, 2989-2998
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C. & Weiss, A.** (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic. *Science* **263**, 1136-1139.
- Jain, J., Loh, C. & Rao, A.** (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333-342.
- Jensen, F.C., Giradi, A.J., Gilden, R.V., Koprowski, H.** (1964). Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 53-59
- Johnson, R.P. & Craig, S.W.** (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 12611-12619.
- Jones, D., Bax, B. & Cockcroft, S.** (1999). ADP-ribosylation factor GTPases in signal transduction and membrane traffic: independent functions? *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 642-647.

- Jones, D.H., Bax, B., Fensome, A. & Cockcroft, S.** (1999). ADP ribosylation factor 1 mutants identify a phospholipase D effector region and reveal that phospholipase D participates in lysosomal secretion but is not sufficient for recruitment of coatomer I. *Biochem. J.* **341**, 185-192.
- Jou, T.S., Schneeberger, E.E. & Nelson, W.J.** (1998). Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J. Cell Biol.* **142**, 101-115.
- Kahn, R.A. & Gilman, A.G.** (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 7906-7911.
- Kahn, R.A., Clark, J., Rulka, C., Stearns, T., Zhang, C.J., Randazzo, P.A., Terui, T. & Cavenagh, M.** (1995). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ARF1. *J. Biol. Chem.* **270**, 143-150.
- Kahn, R.A., Kern, F.G., Clark, J., Gelmann, E.P. & Rulka, C.** (1991). Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 2606-2614.
- Kahn, R.A., Randazzo, P., Serafini, T., Weiss, O., Rulka, C., Clark, J., Amherdt, M., Roller, P., Orci, L. & Rothman, J.E.** (1992). The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J. Biol. Chem.* **267**, 13039-13046.
- Kanner, S.B., Grosmaire, L.S., Ledbetter, J.A. & Damle, N.K.** (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7099-7103.
- Karin, M., Liu Zg & Zandi, E.** (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-246.
- Kassner, P.D., Kawaguchi, S. & Hemler, M.E.** (1994). Minimum alpha chain cytoplasmic tail sequence needed to support integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* **269**, 19859-19867.
- Kawaguchi, S. & Hemler, M.E.** (1993). Role of the alpha subunit cytoplasmic domain in regulation of adhesive activity mediated by the integrin VLA-2. *J. Biol. Chem.* **268**, 16279-16285.
- Kersh, E.N., Kersh, G.J. & Allen, P.M.** (1999). Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J. Exp. Med.* **190**, 1627-1636.
- Kersh, E.N., Shaw, A.S. & Allen, P.M.** (1998). Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation [see comments]. *Science* **281**, 572-575.
- Kim, H.K., Kim, J.W., Zilberstein, A., Margolis, B., Kim, J.G., Schlessinger, J. & Rhee, S.G.** (1991). PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* **65**, 435-441.
- Kim, H.S.** (1999). Assignment of the human ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) gene to chromosome 7q22.1 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**, 94
- Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G. & Ryu, S.H.** (1998). Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett.* **430**, 231-235.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H. & Matsuda, M.** (1998). Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 24479-24484.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A. & Czech, M.P.** (1997). Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains [see comments]. *Science* **275**, 1927-1930.
-

-
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. & Czech, M.P.** (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 1859-1862.
- Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K. & Cheresch, D.A.** (1998). CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J. Cell Biol.* **140**, 961-972.
- Knorr, T., Nagel, W. & Kolanus, W.** (2000). Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system [In Process Citation]. *Eur. J. Biochem.* 2000. Jun;267(12):3784-91. **267**, 3784-3791.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. & Seed, B.** (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**, 233-242.
- Kolanus, W., Romeo, C. & Seed, B.** (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* **74**, 171-183.
- Kong, G., Dalton, M., Wardenburg, J.B., Straus, D., Kurosaki, T. & Chan, A.C.** (1996). Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5026-5035.
- Konrad, E.B., Lehman, I.R.** (1975). Novel mutants of Escherichia coli that accumulate very small DNA replicative intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 2150-2154
- Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Stemweis, P.C. & Roth, M.G.** (1995). Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4952-4956.
- Kuhne, M.R., Ku, G. & Weiss, A.** (2000). A guanine nucleotide exchange factor-independent function of Vav1 in transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 2000. Jan. 21;275(3):2185-90. **275**, 2185-2190.
- Kunkel, T.A** (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 488-492
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D., Zakour, R.A. (1987).** Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, J.H., Horvath, G., Li, Y. & Tan, T.H.** (1995). Mechanisms of enhanced nuclear translocation of the transcription factors c-Rel and NF-kappa B by CD28 costimulation in human T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **766:220-3**, 220-223.
- Landis, R.C., Bennett, R.I. & Hogg, N.** (1993). A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. *J. Cell Biol.* **120**, 1519-1527.
- Langille, S.E., Patki, V., Klarlund, J.K., Buxton, J.M., Holik, J.J., Chawla, A., Corvera, S. & Czech, M.P.** (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J. Biol. Chem.* **274**, 27099-27104.
-

- Laudanna, C., Campbell, J.J. & Butcher, E.C.** (1996). Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983.
- Law, C.L., Chandran, K.A., Sidorenko, S.P. & Clark, E.A.** (1996). Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1305-1315.
- Lee, C.M., Haun, R.S., Tsai, S.C., Moss, J. & Vaughan, M.** (1992). Characterization of the human gene encoding ADP-ribosylation factor 1, a guanine nucleotide-binding activator of cholera toxin. *J. Biol. Chem.* **267**, 9028-9034.
- Lee, S.Y. & Pohajdak, B.** (2000). N-terminal targeting of guanine nucleotide exchange factors (GEF) for ADP ribosylation factors (ARF) to the golgi [In Process Citation]. *J. Cell Sci.* 2000. Jun;113. (Pt. 11):1883-9. **113**, 1883-1889.
- Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M.** (1998). Pleckstrin homology domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **228:39-74**, 39-74.
- Lens, S.M., Baars, P.A., Hooibrink, B., van Oers, M.H. & van Lier, R.A.** (1997). Antigen-presenting cell-derived signals determine expression levels of CD70 on primed T cells. *Immunology* **90**, 38-45.
- Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H.Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B. & Bluestone, J.A.** (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of. *Immunity*. **5**, 285-293.
- Lenzen, C., Cool, R.H., Prinz, H., Kuhlmann, J. & Wittinghofer, A.** (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* **37**, 7420-7430.
- Lindahl, T.** (1974). An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 3649-3653
- Ling, V., Wu, P.W., Finnerty, H.F., Bean, K.M., Spaulding, V., Fouser, L.A., Leonard, J.P., Hunter, S.E., Zollner, R., Thomas, J.L., Miyashiro, J.S., Jacobs, K.A. & Collins, M.** (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol.* 2000. Feb. 15;164(4):1653-7. **164**, 1653-1657.
- Liscovitch, M. & Cantley, L.C.** (1994). Lipid second messengers. *Cell* **77**, 329-334.
- Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C.S. & Cantley, L.C.** (1994). Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406.
- Liu, L. & Pohajdak, B.** (1992). Cloning and sequencing of a human cDNA from cytolytic NK/T cells with homology to yeast SEC7. *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 75-78.
- Lodge, J.K., Jackson-Machelski, E., Devadas, B., Zupec, M.E., Getman, D.P., Kishore, N., Freeman, S.K., McWherter, C.A., Sikorski, J.A. & Gordon, J.I.** (1997). N-myristoylation of Arf proteins in Candida albicans: an in vivo assay for evaluating antifungal inhibitors of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Microbiology*. **143**, 357-366.
- LoGrasso, P.V., Hawkins, J., Frank, L.J., Wisniewski, D. & Marcy, A.** (1996). Mechanism of activation for Zap-70 catalytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12165-12170.

- Lopata, M.A., Cleveland, D.W. & Sollner-Webb, B.** (1984). High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5707-5717.
- Losonczi, J.A. & Prestegard, J.H.** (1998). Nuclear magnetic resonance characterization of the myristoylated, N-terminal fragment of ADP-ribosylation factor 1 in a magnetically oriented membrane array. *Biochemistry* **37**, 706-716.
- Losonczi, J.A., Tian, F. & Prestegard, J.H.** (2000). Nuclear magnetic resonance studies of the N-terminal fragment of adenosine diphosphate ribosylation factor 1 in micelles and bicelles: influence of N-myristoylation. *Biochemistry* *2000. Apr. 4;39(13):3804-16.* **39**, 3804-3816.
- Lowell, C.A., Fumagalli, L. & Berton, G.** (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* **133**, 895-910.
- Lub, M., van Kooyk, Y. & Figdor, C.G.** (1995). Ins and outs of LFA-1. *Immunol. Today* **16**, 479-483.
- Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. & Jan, Y.N.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802.
- Luton, F., Bufeme, M., Legendre, V., Chauvet, E., Boyer, C. & Schmitt-Verhulst, A.M.** (1997). Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J. Immunol.* **158**, 4162-4170.
- Luton, F., Legendre, V., Gorvel, J.P., Schmitt-Verhulst, A.M. & Boyer, C.** (1997). Tyrosine and serine protein kinase activities associated with ligand-induced internalized TCR/CD3 complexes. *J. Immunol.* **158**, 3140-3147.
- Lyman, S., Gilmore, A., Burridge, K., Gidwitz, S. & White, G.C., 2nd.** (1997). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants. *J. Biol. Chem.* **272**, 22538-22547.
- Mackett, M., Smith, G.L. & Moss, B.** (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7415-7419.
- Madrenas, J., Chau, L.A., Smith, J., Bluestone, J.A. & Germain, R.N.** (1997). The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J. Exp. Med.* **185**, 219-229.
- Madrenas, J., Wange, R.L., Wang, J.L., Isakov, N., Samelson, L.E. & Germain, R.N.** (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists [see comments]. *Science* **267**, 515-518.
- Magistrelli, G., Bosotti, R., Valsasina, B., Visco, C., Perego, R., Toma, S., Acuto, O. & Isacchi, A.** (1999). Role of the Src homology 2 domains and interdomain regions in ZAP-70 phosphorylation and enzymatic activity. *Eur. J. Biochem.* **266**, 1166-1173.
- Malissen, B. & Malissen, M.** (1996). Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 383-393.

- Massenburg, D., Han, J.S., Liyanage, M., Patton, W.A., Rhee, S.G., Moss, J. & Vaughan, M.** (1994). Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11718-11722.
- McGilvray, I.D., Lu, Z., Wei, A.C., Dackiw, A.P., Marshall, J.C., Kapus, A., Levy, G. & Rotstein, O.D.** (1998). Murine hepatitis virus strain 3 induces the macrophage prothrombinase fgl-2 through p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 32222-32229.
- McGuire, R.E., Daiger, S.P. & Green, E.D.** (1997). Localization and characterization of the human ADP-ribosylation factor 5 (ARF5) gene. *Genomics* **41**, 481-484.
- Meacci, E., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M.** (1997). Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1745-1748.
- Mege, D., Di Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F. & Acuto, O.** (1996). Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 32644-32652.
- Menetrey, J., Macia, E., Pasqualato, S., Franco, M. & Cherfils, J.** (2000). Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, Jun;7(6):466-9. **7**, 466-469.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. & Karin, M.** (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157.
- Miranti, C.K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J.S. & Shattil, S.J.** (1998). Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr. Biol.* **8**, 1289-1299.
- Miranti, C.K., Ohno, S. & Brugge, J.S.** (1999). Protein kinase C regulates integrin-induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc. *J. Biol. Chem.* **274**, 10571-10581.
- Mishima, K., Price, S.R., Nightingale, M.S., Kousvelari, E., Moss, J. & Vaughan, M.** (1992). Regulation of ADP-ribosylation factor (ARF) expression. Cross-species conservation of the developmental and tissue-specific alternative polyadenylation of ARF 4 mRNA. *J. Biol. Chem.* **267**, 24109-24116.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. & Yamada, K.M.** (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol.* **131**, 791-805.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A.** (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in. *Nature* **395**, 82-86.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. & Kupfer, A.** (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell. *Nature* **385**, 83-86.
- Moran, M. & Miceli, M.C.** (1998). Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*. **9**, 787-796.

-
- Morris, J.C., Ping-Sheng, L., Zhai, H.X., Shen, T.Y. & Mensa-Wilmot, K.** (1996). Phosphatidylinositol phospholipase C is activated allosterically by the aminoglycoside G418. 2-deoxy-2-fluoro-scylo-inositol-1-O-dodecylphosphonate and its analogs inhibit glycosylphosphatidylinositol phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 15468-15477.
- Mossessova, E., Gulbis, J.M. & Goldberg, J.** (1998). Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* **92**, 415-423.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.,** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **183**, 1937-1943
- Nadler, M.J., Harrison, M.L., Ashendel, C.L., Cassady, J.M. & Geahlen, R.L.** (1993). Treatment of T cells with 2-hydroxymyristic acid inhibits the myristoylation and alters the stability of p56lck. *Biochemistry* **32**, 9250-9255.
- Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. & Kolanus, W.** (1998). The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1981-1994.
- Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J. & Kolanus, W.** (1998). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 14853-14861.
- Nakamura, Y., Russell, S.M., Mess, S.A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S. & Leonard, W.J.** (1994). Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain. *Nature* **369**, 330-333.
- Nelson, B.H., Lord, J.D. & Greenberg, P.D.** (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* **369**, 333-336.
- Neumeister, E.N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A.C. & Shaw, A.S.** (1995). Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3171-3178.
- Neumeister, E.N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A.C. & Shaw, A.S.** (1995). Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3171-3178.
- Nishizuka, Y.** (1984). Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**, 1365-1370.
- Norman, J.C., Jones, D., Barry, S.T., Holt, M.R., Cockcroft, S. & Critchley, D.R.** (1998). ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **143**, 1981-1995.
- Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A.** (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272.
- Ortlepp, S., Stephens, P.E., Hogg, N., Figdor, C.G. & Robinson, M.K.** (1995). Antibodies that activate beta 2 integrins can generate different ligand binding states. *Eur. J. Immunol.* **25**, 637-643.
- Osman, N., Lucas, S. & Cantrell, D.** (1995). The role of tyrosine phosphorylation in the interaction of cellular tyrosine kinases with the T cell receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2863-2869.
-

- O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H.** (1994). Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.* **124**, 1047-1059.
- Pacheco-Rodriguez, G., Meacci, E., Vitale, N., Moss, J. & Vaughan, M.** (1998). Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 26543-26548.
- Pacheco-Rodriguez, G., Patton, W.A., Adamik, R., Yoo, H.S., Lee, F.J., Zhang, G.F., Moss, J. & Vaughan, M.** (1999). Structural elements of ADP-ribosylation factor 1 required for functional interaction with cytohesin-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 12438-12444.
- Panicali, D. & Paoletti, E.** (1982). Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4927-4931.
- Pao, L.I. & Cambier, J.C.** (1997). Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45- B cells. *J. Immunol.* **158**, 2663-2669.
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M. & Chardin, P.** (1997). Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J. Biol. Chem.* **272**, 22221-22226.
- Pavalko, F.M. & LaRoche, S.M.** (1993). Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J. Immunol.* **151**, 3795-3807.
- Peng, Z.G., Calvert, I., Clark, J., Helman, L., Kahn, R. & Kung, H.F.** (1989). Molecular cloning, sequence analysis and mRNA expression of human ADP-ribosylation factor. *Biofactors* **2**, 45-49.
- Perez-Villar, J.J. & Kanner, S.B.** (1999). Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. *J. Immunol.* **163**, 6435-6441.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. & Lacal, J.C.** (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**, 463-475.
- Peter, K. & O'Toole, T.E.** (1995). Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J. Exp. Med.* **181**, 315-326.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G. & Klausner, R.D.** (1995). Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J. Cell Biol.* **128**, 1003-1017.
- Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C.L.** (1996). Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**, 479-481.
- Picker, L.J. & Butcher, E.C.** (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:561-91, 561-591.
- Provost, J.J., Fudge, J., Israelit, S., Siddiqi, A.R. & Exton, J.H.** (1996). Tissue-specific distribution and subcellular distribution of phospholipase D in rat: evidence for distinct RhoA- and ADP-ribosylation factor (ARF)-regulated isoenzymes. *Biochem. J.* **319**, 285-291.

-
- Qian, D., Mollenauer, M.N. & Weiss, A.** (1996). Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* **183**, 611-620.
- Raab, M., da Silva, A.J., Findell, P.R. & Rudd, C.E.** (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity*. **6**, 155-164.
- Radhakrishna, H. & Donaldson, J.G.** (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J. Cell Biol.* **139**, 49-61.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. & Donaldson, J.G.** (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J. Cell Sci.* **112**, 855-866.
- Rameh, L.E., Arvidsson Ak, Carraway, K.L., 3rd, Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., Wang, D.S., Chen, C.S. & Cantley, L.C.** (1997). A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 22059-22066.
- Randazzo, P.A.** (1997). Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 7688-7692.
- Randazzo, P.A.** (1997). Resolution of two ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating proteins from rat liver. *Biochem. J.* **324**, 413-419.
- Randazzo, P.A., Yang, Y.C., Rulka, C. & Kahn, R.A.** (1993). Activation of ADP-ribosylation factor by Golgi membranes. Evidence for a brefeldin A- and protease-sensitive activating factor on Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **268**, 9555-9563.
- Rao, A., Luo, C. & Hogan, P.G.** (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:707-47, 707-747.
- Renshaw, M.W., Toksoz, D. & Schwartz, M.A.** (1996). Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 21691-21694.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. & Gamblin, S.J.** (1997). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue [see comments]. *Nature* **389**, 758-762.
- Rodriguez-Fernandez, J.L., Gomez, M., Luque, A., Hogg, N., Sanchez-Madrid, F. & Cabanas, C.** (1999). The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1891-1907.
- Rothenberg, E.V.** (1996). How T cells count [comment]. *Science* **273**, 78-79.
- Rothenberg, M.E., Ownbey, R., Mehlhop, P.D., Loiselle, P.M., van de Rijn, M., Bonventre, J.V., Oettgen, H.C., Leder, P. & Luster, A.D.** (1996). Eotaxin triggers eosinophil-selective chemotaxis and calcium flux via a distinct receptor and induces pulmonary eosinophilia in the presence of interleukin 5 in mice. *Mol. Med.* **2**, 334-348.
- Rudnick, D.A., Johnson, R.L. & Gordon, J.I.** (1992). Studies of the catalytic activities and substrate specificities of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-coenzyme A: protein N-myristoyltransferase deletion mutants and human/yeast Nmt chimeras in *Escherichia coli* and *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23852-23861.
-

- Rudnick, D.A., Rocque, W.J., McWherter, C.A., Toth, M.V., Jackson-Machelski, E. & Gordon, J.I.** (1993). Use of photoactivatable peptide substrates of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase (Nmt1p) to characterize a myristoyl-CoA-Nmt1p-peptide ternary complex and to provide evidence for an ordered reaction mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1087-1091.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Soffel, S., Scharf, S., Higuchi, R. Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.,** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Salomon, B. & Bluestone, J.A.** (1998). LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J. Immunol.* **161**, 5138-5142.
- Sambrook, J., Fritsch, E.f., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Sampath, R., Gallagher, P.J. & Pavalko, F.M.** (1998). Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* **273**, 33588-33594.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
- Santy, L.C., Frank, S.R., Hatfield, J.C. & Casanova, J.E.** (1999). Regulation of ARNO nucleotide exchange by a PH domain electrostatic switch. *Curr. Biol.* **9**, 1173-1176.
- Saoulli, K., Lee, S.Y., Cannons, J.L., Yeh, W.C., Santana, A., Goldstein, M.D., Bangia, N., DeBenedette, M.A., Mak, T.W., Choi, Y. & Watts, T.H.** (1998). CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells. *J. Exp. Med.* **187**, 1849-1862.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A.** (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants [see comments]. *Science* **277**, 333-338.
- Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F. & Petsko, G.A.** (1990). Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis [see comments]. *Nature* **345**, 309-315.
- Schurmann, A., Schmidt, M., Asmus, M., Bayer, S., Fliegert, F., Kolling, S., Massmann, S., Schilf, C., Subauste, M.C., Voss, M., Jakobs, K.H. & Joost, H.G.** (1999). The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **274**, 9744-9751.
- Seaman, M.N., Burd, C.G. & Emr, S.D.** (1996). Receptor signalling and the regulation of endocytic membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 549-556.

-
- Sedwick, C.E., Morgan, M.M., Jusino, L., Cannon, J.L., Miller, J. & Burkhardt, J.K.** (1999). TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J. Immunol.* **162**, 1367-1375.
- Seed, B.** (1987). An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane Protein homologous to ist receptor CD2. *Nature* **329**, 840-842
- Seger, R. & Krebs, E.G.** (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. & Rothman, J.E.** (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-253.
- Shattil, S.J., Kashiwagi, H. & Pampori, N.** (1998). Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* **91**, 2645-2657.
- Shattil, S.J., O'Toole, T., Eigenthaler, M., Thon, V., Williams, M., Babior, B.M. & Ginsberg, M.H.** (1995). Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J. Cell Biol.* **131**, 807-816.
- Shevell, D.E., Leu, W.M., Gillmor, C.S., Xia, G., Feldmann, K.A. & Chua, N.H.** (1994). EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in Arabidopsis and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* **77**, 1051-1062.
- Shimizu, Y. & Hunt, S.W., 3rd.** (1996). Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol. Today* **17**, 565-573.
- Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Horgan, K.J. & Shaw, S.** (1990). Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol. Rev.* **114:109-43**, 109-143.
- Siddiqi, A.R., Smith, J.L., Ross, A.H., Qiu, R.G., Symons, M. & Exton, J.H.** (1995). Regulation of phospholipase D in HL60 cells. Evidence for a cytosolic phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**, 8466-8473.
- Singer, W.D., Brown, H.A. & Sternweis, P.C.** (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* **66:475-509**, 475-509.
- Sloan-Lancaster, J., Shaw, A.S., Rothbard, J.B. & Allen, P.M.** (1994). Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy [see comments]. *Cell* **79**, 913-922.
- Song, J., Khachikian, Z., Radhakrishna, H. & Donaldson, J.G.** (1998). Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading. *J. Cell Sci.* **111**, 2257-2267.
- Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein, D. & Kahn, R.A.** (1990). ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1238-1242.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185:60-89**, 60-89.
-

- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. & Ben-Neriah, Y.** (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**, 727-736.
- Su, Y.W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G.A., Reth, M. & Wienands, J.** (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3702-3711.
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Goldschmidt-Clermont, P. & Finkel, T.** (1996). rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 7115-7121.
- Sunder-Plassmann, R., Lialios, F., Madsen, M., Koyasu, S. & Reinherz, E.L.** (1997). Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3zeta-ITAM are functionally distinct. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2001-2009.
- Sung, T.C., Zhang, Y., Morris, A.J. & Frohman, M.A.** (1999). Structural analysis of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 3659-3666.
- Sussman, D.J. & Milman, G.** (1984). Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell Biol.* **4**, 1641-1643.
- Szoka, F., Jr. & Papahadjopoulos, D.** (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4194-4198.
- Takahashi, K., Tago, K., Okano, H., Ohya, Y., Katada, T. & Kanaho, Y.** (1996). Augmentation by calmodulin of ADP-ribosylation factor-stimulated phospholipase D activity in permeabilized rabbit peritoneal neutrophils. *J. Immunol.* **156**, 1229-1234.
- Teal, S.B., Hsu, V.W., Peters, P.J., Klausner, R.D. & Donaldson, J.G.** (1994). An activating mutation in ARF1 stabilizes coatamer binding to Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3135-3138.
- Telemenakis, I., Benseler, F., Stenius, K., Sudhof, T.C. & Brose, N.** (1997). Rat homologues of yeast sec7p. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 143-149.
- Teramoto, H., Crespo, P., Coso, O.A., Igishi, T., Xu, N. & Gutkind, J.S.** (1996). The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 25731-25734.
- Terui, T., Kahn, R.A. & Randazzo, P.A.** (1994). Effects of acid phospholipids on nucleotide exchange properties of ADP-ribosylation factor 1. Evidence for specific interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **269**, 28130-28135.
- Thornhill, M.H., Wellicome, S.M., Mahiouz, D.L., Lanchbury, J.S., Kyan-Aung, U. & Haskard, D.O.** (1991). Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J. Immunol.* **146**, 592-598.
- Toker, A.** (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 254-261.

-
- Tominaga, T., Sugie, K., Hirata, M., Morii, N., Fukata, J., Uchida, A., Imura, H. & Narumiya, S.** (1993). Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP-ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J. Cell Biol.* **120**, 1529-1537.
- Tominaga, Y., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K., Horiuchi, T. & Takashi, T.** (1998). Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.* **161**, 4016-4022.
- Towbin, H., Staehelin, T. Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354
- Towler, D.A., Adams, S.P., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L. & Gordon, J.I.** (1987). Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Nov;84(21):7523]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2708-2712.
- Towler, D.A., Adams, S.P., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L. & Gordon, J.I.** (1988). Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities. *J. Biol. Chem.* **263**, 1784-1790.
- Towler, D.A., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Adams, S.P. & Glaser, L.** (1987). Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. *J. Biol. Chem.* **262**, 1030-1036.
- Towler, D.A., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Adams, S.P. & Glaser, L.** (1987). Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. *J. Biol. Chem.* **262**, 1030-1036.
- Tsai, S.C., Noda, M., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M.** (1987). Enhancement of cholera toxin ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19-kDa membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5139-5142.
- Tsuchiya, M., Price, S.R., Tsai, S.C., Moss, J. & Vaughan, M.** (1991). Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 2772-2777.
- Tuosto, L., Michel, F. & Acuto, O.** (1996). p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1161-1166.
- Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R. & Tybulewicz, V.L.** (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity.* **7**, 451-460.
- Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R. & Tybulewicz, V.L.** (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity.* **7**, 451-460.
- Tuscher, O., Lorra, C., Bouma, B., Wirtz, K.W. & Huttner, W.B.** (1997). Cooperativity of phosphatidylinositol transfer protein and phospholipase D in secretory vesicle formation from the TGN--phosphoinositides as a common denominator? *FEBS Lett.* **419**, 271-275.
-

- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A.** (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes [see comments]. *Nature* **375**, 148-151.
- Valmu, L., Autero, M., Siljander, P., Patarroyo, M. & Gahmberg, C.G.** (1991). Phosphorylation of the beta-subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2857-2862.
- Valmu, L., Fagerholm, S., Suila, H. & Gahmberg, C.G.** (1999). The cytoskeletal association of CD11/CD18 leukocyte integrins in phorbol ester-activated cells correlates with CD18 phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2107-2118.
- Valmu, L., Hilden, T.J., van Willigen, G. & Gahmberg, C.G.** (1999). Characterization of beta2 (CD18) integrin phosphorylation in phorbol ester-activated T lymphocytes. *Biochem. J.* **339**, 119-125.
- van Kooyk, Y., Weder, P., Hogervorst, F., Verhoeven, A.J., van Seventer, G., te Velde, A.A., Borst, J., Keizer, G.D. & Figdor, C.G.** (1991). Activation of LFA-1 through a Ca²⁺(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J. Cell Biol.* **112**, 345-354.
- van Leeuwen, J.E. & Samelson, L.E.** (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 242-248.
- van Oers, N.S., Love, P.E., Shores, E.W. & Weiss, A.** (1998). Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs. *J. Immunol.* **160**, 163-170.
- Vasudevan, C., Han, W., Tan, Y., Nie, Y., Li, D., Shome, K., Watkins, S.C., Levitan, E.S. & Romero, G.** (1998). The distribution and translocation of the G protein ADP-ribosylation factor 1 in live cells is determined by its GTPase activity. *J. Cell Sci.* **111**, 1277-1285.
- Venkateswarlu, K. & Cullen, P.J.** (2000). Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.* **2000. Feb. 1;345(Pt. 3):719-724.** **345**, 719-724.
- Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Oatey, P.B., Tavare, J.M. & Cullen, P.J.** (1998). Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* **335**, 139-146.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M. & Cullen, P.J.** (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr. Biol.* **8**, 463-466.
- Verweij, C.L., Geerts, M. & Aarden, L.A.** (1991). Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF- κ B-like response element. *J. Biol. Chem.* **266**, 14179-14182.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. & Lanzavecchia, A.** (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains [see comments]. *Science* **283**, 680-682.
- Visco, C., Magistrelli, G., Bosotti, R., Perego, R., Rusconi, L., Toma, S., Zamai, M., Acuto, O. & Isacchi, A.** (2000). Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* **2000. Mar. 14;39(10):2784-91.** **39**, 2784-2791.
- Wallace, R.B., Miyada, C.G.** (1987). Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol.* **152**, 432-442
-

-
- Wang, H.M. & Smith, K.A.** (1987). The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J. Exp. Med.* **166**, 1055-1069.
- Wange, R.L. & Samelson, L.E.** (1996). Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity*, **5**, 197-205.
- Wange, R.L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J.D., Aebersold, R. & Samelson, L.E.** (1995). Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **270**, 18730-18733.
- Wange, R.L., Guitian, R., Isakov, N., Watts, J.D., Aebersold, R. & Samelson, L.E.** (1995). Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **270**, 18730-18733.
- Wardenburg, J.B., Fu, C., Jackman, J.K., Flotow, H., Wilkinson, S.E., Williams, D.H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A.C. & Findell, P.R.** (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**, 19641-19644.
- Watts, J.D., Affolter, M., Krebs, D.L., Wange, R.L., Samelson, L.E. & Aebersold, R.** (1994). Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **269**, 29520-29529.
- Watts, T.H. & DeBenedette, M.A.** (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 286-293.
- Weiss, A. & Littman, D.R.** (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274.
- Weiss, A. & Stobo, J.D.** (1984). Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J. Exp. Med.* **160**, 1284-1299.
- Weiss, L., Whitmarsh, A.J., Yang, D.D., Rincon, M., Davis, R.J. & Flavell, R.A.** (2000). Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. *J. Exp. Med.* **200**, Jan. 3;191(1):139-46. **191**, 139-146.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y. & Karin, M.** (1998). Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J.* **17**, 3101-3111.
- Whatmore, J., Morgan, C.P., Cunningham, E., Collison, K.S., Willison, K.R. & Cockcroft, S.** (1996). ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells. *Biochem. J.* **320**, 785-794.
- Whatmore, J., Morgan, C.P., Cunningham, E., Collison, K.S., Willison, K.R. & Cockcroft, S.** (1996). ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells. *Biochem. J.* **320**, 785-794.
- Wilcox, C., Hu, J.S. & Olson, E.N.** (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* **238**, 1275-1278.
- Williams, B.L., Irvin, B.J., Sutor, S.L., Chini, C.C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A.C. & Abraham, R.T.** (1999). Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. *EMBO J.* **18**, 1832-1844.
-

- Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A. & Weiss, A.** (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity*. **4**, 593-602.
- Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T. & Weiss, A.** (1997). The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* **185**, 1877-1882.
- Wulfing, C. & Davis, M.M.** (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* **282**, 2266-2269.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. & Seed, B.** (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*. **8**, 723-732.
- Yamasaki, S., Takamatsu, M. & Iwashima, M.** (1996). The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. *Mol. Cell Biol.* **16**, 7151-7160.
- Yan, S.R. & Berton, G.** (1996). Regulation of Src family tyrosine kinase activities in adherent human neutrophils. Evidence that reactive oxygen intermediates produced by adherent neutrophils increase the activity of the p58c-fgr and p53/56lyn tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 23464-23471.
- Yan, S.R. & Novak, M.J.** (1999). Beta2 integrin-dependent phosphorylation of protein-tyrosine kinase Pyk2 stimulated by tumor necrosis factor alpha and fMLP in human neutrophils adherent to fibrinogen. *FEBS Lett.* **451**, 33-38.
- Yan, S.R., Huang, M. & Berton, G.** (1997). Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J. Immunol.* **158**, 1902-1910.
- Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. & Matsuda, Y.** (1993). Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25846-25856.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G.S., Hui, A., McCabe, S.M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C.L., Van, G. & Mak, T.W.** (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* **402**, 827-832.
- Yron, I., Deckert, M., Reff, M.E., Munshi, A., Schwartz, M.A. & Altman, A.** (1999). Integrin-dependent tyrosine phosphorylation and growth regulation by Vav. *Cell Adhes. Commun.* **7**, 1-11.
- Damle, N.K., Klussman, K. & Aruffo, A.** (1992). Intercellular adhesion molecule-2, a second counter-receptor for CD11a/CD18 (leukocyte function-associated antigen-1), provides a costimulatory signal for T-cell receptor-initiated activation of human T cells. *J. Immunol.* **148**, 665-671.
- Kanner, S.B., Grosmaire, L.S., Ledbetter, J.A. & Damle, N.K.** (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7099-7103.
- Tabassam, F.H., Umehara, H., Huang, J.Y., Gouda, S., Kono, T., Okazaki, T., van Seventer, J.M. & Domae, N.** (1999). Beta2-integrin, LFA-1, and TCR/CD3 synergistically induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125(FAK)) in PHA-activated T cells. *Cell Immunol.* **193**, 179-184.
- Tsai, S.C., Adamik, R., Haun, R.S., Moss, J. & Vaughan, M.** (1993). Effects of brefeldin A and accessory proteins on association of ADP-ribosylation factors 1, 3, and 5 with Golgi. *J. Biol. Chem.* **268**, 10820-10825.
-

- Van Seventer, G.A., Bonvini, E., Yamada, H., Conti, A., Stringfellow, S., June, C.H. & Shaw, S.** (1992). Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4⁺ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca²⁺ levels. *J. Immunol.* **149**, 3872-3880.
- Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P. & Kolanus, W.** (1998). T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **273**, 15445-15452.
- Zenner, G., Vorherr, T., Mustelin, T. & Burn, P.** (1996). Differential and multiple binding of signal transducing molecules to the ITAMs of the TCR-zeta chain. *J. Cell Biochem.* **63**, 94-103.
- Zhang, C.J., Rosenwald, A.G., Willingham, M.C., Skuntz, S., Clark, J. & Kahn, R.A.** (1994). Expression of a dominant allele of human ARF1 inhibits membrane traffic in vivo. *J. Cell Biol.* **124**, 289-300.
- Zhang, G.F., Patton, W.A., Lee, F.J., Liyanage, M., Han, J.S., Rhee, S.G., Moss, J. & Vaughan, M.** (1995). Different ARF domains are required for the activation of cholera toxin and phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**, 21-24.
- Zhang, J. & Siraganian, R.P.** (1999). CD45 is essential for Fc epsilon RI signaling by ZAP70, but not Syk, in Syk-negative mast cells. *J. Immunol.* **163**, 2508-2516.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. & Samelson, L.E.** (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor. *Cell* **92**, 83-92.
- Zheng, L., Sjolander, A., Eckerdal, J. & Andersson, T.** (1996). Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8431-8436.
- Zoller, K.E., MacNeil, I.A. & Brugge, J.S.** (1997). Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J. Immunol.* **158**, 1650-1659.
- Zozulya, S. & Stryer, L.** (1992). Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11569-11573.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

8.1.1 Allgemein

(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
³² P	Phosphor-Isotop der relativen Masse 32
A	Ampere
AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zellen (antigene presenting cell)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphate
b	Basen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphate
Bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Zelloberflächenmarke (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
COS	CV1 Origin SV40 (SV40 transformierte Affennierenzelllinie CV1)
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocytes)
CTP	Cytosin-5'-Triphosphate
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEAE	Diethylamonoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (fluorescence-activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	G-Protein austauschender Faktor (G-protein exchange factor)
GEP	G-Protein austauschendes Protein (G-protein exchange protein)
GTP	Guanosin-5'-Triphosphate
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
Il-2	Interleukin-2
inkl.	inklusive
IP3	Inositol (1,4,5)-Triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalctosid
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatormotiv
Kan	Kanamycin
Konz.	Konzentration
LB	Luria-Boveri
LMP	erniedrigter Schmelzpunkt (low melting point)
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOI	multiplicity of infectoin
MPA	Mycophenolsäure (mycophenolic acid)
mRNA	Messenger-RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NP40	Nichtionisches Detergenz P40
nt	Nukleotid
ü/N	über Nacht
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gebufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PtdIns(3,4,5)P ₃ (PIP ₃)	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
PtdIns(4,5)P ₂ (PIP ₂)	Phosphatidylinositol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

PMA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TCR	T-Zell Receptor (T cell receptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin
TTP	Thymin-5'-Triphosphate
u.a.	unter anderem
UTR	Nicht-translatierte Region (untranslated region)
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche

8.1.2 Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	counts per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)
d	Dalton, Einheit für Proteinmasse
Fd	Farad
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
M	Molarität (Einheit mol/l)
min	Minute
mol	Mol (=Stoffmenge; SI-Basiseinheit)
OD	optische Dichte
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde (SI-Basiseinheit)
U	Unit(s) (Einheit von Enzymaktivitäten)
V	Volt
W	Watt (Si-Basiseinheit)

8.1.3 Vorsätze

k	Kilo	(= 10 ³)
c	Zenti	(= 10 ²)
m	Milli	(= 10 ⁻³)
μ	Micro	(= 10 ⁻⁶)
n	Nano	(= 10 ⁻⁹)
p	Pico	(= 10 ⁻¹²)

8.1.4 Abkürzungen der Nucleoside bzw. Nucleotide

A	Adenin bzw. Adenosin
C	Cytosin bzw. Cytidin
G	Guanin bzw. Guanosin
T	Thymin bzw. Thymidin

8.1.5 Abkürzungen der Aminosäuren

	<i>Drei-Buchstaben-Code</i>	<i>Ein-Buchstaben-Code</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9 Lebenslauf

Zur Person

Thomas Knorr
Diplom-Biologe
geboren am 16.03.1968 in Pegnitz
Verheiratet

Schulausbildung

09 / 1974 - 03 / 1975	Grundschule Pegnitz
03 / 1975 - 07 / 1978	Grundschule Münchberg
09 / 1978 - 05 / 1987	Gymnasium Münchberg (math.-nat. Zweig)

Wehrdienst

07 / 1987 – 09 / 1988	Grundwehrdienst in Baumholder und Bayreuth
-----------------------	--

Studium

10 / 1988 - 03 / 1991	Studium der Chemie (Dipl.) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
05 / 1991 - 07 / 1995	Studium der Biologie (Dipl.) an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Schwerpunkte: Genetik, Biochemie Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Expression des menschlichen <i>hMSH2</i> -Gens in mutierter und Wildtyp-Form in eukaryontischen Zelllinien.“ Abschluß: Diplom-Biologe Univ., Note: „1.2 = sehr gut“

Promotion

seit 2 / 1996	Promotion am Genzentrum der Ludwig-Maximilian-Universität München in der Arbeitsgruppe von Dr. Waldemar Kolanus Thema: Biochemische und funktionale Untersuchungen zur Regulation von ADP-Ribosylierungsfaktoren und Proteintyrosinkinase in der Aktivierung von Lymphocyten
---------------	--

Publikationen

1. **Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P., Kolanus, W.** (1998). T cell activation by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70 (1998). *J Biol Chem.* **273**(25), 15445-52
2. **Knorr, T., Nagel, W., Kolanus, W.** (2000). Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of Cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur J Biochem.* **267**(12), 3784-3791
3. **Gawaz, M., Besta, F., Ylänne, J., Knorr, T., Dierks, H. and Kolanus, W.** (2001). Differential regulation of cell surface expression and internalization of the β_3 integrin A isoform by the β_3 -endonexin pathway *J. Cell Sci.*, **114**(Pt 6): 1101-1113
4. **Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Böhm, T., Knorr, T., Jackson, C.L., Kolanus, W. and Famulok, M.** (2000). Specific RNA-aptamer based inhibition of cytohesin-family guanine-nucleotide exchange factors for ADP-ribosylation factors. (submitted)
5. **Kliche, S., Nagel, W., Atzler, C., Knorr, T., Koszinowski, U., Kolanus, W. and Haas, J.** (2000). Cellular Transformation by Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Kaposin A is mediated through Cytohesin-1. (submitted)