

**Proteinkinase C-Isoformen als Regulatoren  
der T-Zell-Rezeptor-induzierten Signaltransduktion  
und Interleukin-2-Genexpression**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Katrin Gorf  
geboren am 11. März 1974 in Langenhagen

2002

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Szamel  
am Institut für Pharmakologie (Leitung: Prof. Dr. K. Resch) der  
Medizinischen Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Straße 1, 30623 Hannover  
durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferentin: Prof. Dr. M. Szamel

Tag der Promotion: 10.06.2002

## ABSTRACT

Electroporation of Jurkat T cells to introduce antisense oligodeoxynucleotides complementary to PKC $\alpha$  and PKC $\beta$  mRNA resulted in significant reduction of the amount of the specific PKC isoenzyme proteins. These cells were used to investigate the function of PKC $\alpha$  and PKC $\beta$  *in vivo*.

First of all, it was noticed that exponential growth of the cells is diminished by reduction of the amount of both, PKC $\alpha$  or PKC $\beta$  protein. Investigating the signalling pathways of TCR/CD28 induced activation, PKC $\alpha$  is involved in regulation of activation of c-Raf-1, MEK-1/2, and ERK-1/2 due to association with c-Raf-1. In addition, PKC $\alpha$  appeared to be an important part of I- $\kappa$ B phosphorylation. PKC $\beta$  is involved in regulation of the ERK and additionally the JNK cascade. Decreased amounts of PKC $\beta$  protein correlated with reduced phosphorylation of c-Raf-1, MEK-1/2, and ERK-1/2, too, and impaired activation of MKK-4 and JNK-1/2. The effects of PKC $\beta$  are possibly provided by direct physical association with c-Raf-1, MEK-1/2, and MEKK-1. Furthermore, PKC $\beta$  is required for I- $\kappa$ B phosphorylation. However, none of the PKC isoenzymes influenced phosphorylation of p38 MAPK or degradation of I- $\kappa$ B.

Most importantly, PKC $\alpha$  and PKC $\beta$  regulated IL-2 gene expression and IL-2 secretion in opposite ways. Upon reduction of PKC $\alpha$  protein, NFAT binding at its distal site within the IL-2 promoter and IL-2 promoter activity are enhanced. The transfected cells displayed higher levels of IL-2 mRNA and increased IL-2 secretion. This indicates that under physiological conditions PKC $\alpha$  may inhibit IL-2 gene expression and secretion. In sharp contrast, reduction of PKC $\beta$  protein led to decreased NFAT binding, IL-2 promoter activity, and IL-2 mRNA level in Jurkat T cells. IL-2 secretion was under detection level.

In summary, both isoenzymes PKC $\alpha$  and PKC $\beta$  are found to be involved in the regulation of TCR/CD28 induced signal transduction finally leading to IL-2 gene expression. They exert their influence in different, sometimes overlapping, sometimes opposing ways possessing specific functions in Jurkat T cells.

key words: antisense – MAPK – Jurkat T cells

## ZUSAMMENFASSUNG

PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN konnten durch Elektroporation in Jurkat T-Zellen eingebracht und die Menge des Zielproteins dadurch deutlich reduziert werden. Die erzielten Effekte wurden analysiert und die Funktion von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  im Umkehrschluß definiert.

PKC $\alpha$  reguliert die ERK-Kaskade – möglicherweise über eine Assoziation mit c-Raf-1. Ihre Anwesenheit ist für die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 erforderlich. PKC $\alpha$  ermöglicht darüber hinaus die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B. PKC $\beta$  ist in die Regulation der ERK- und JNK-Kaskade involviert. Die Phosphorylierung von c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 und die Aktivierung von MKK-4 und JNK-1/2 sind bei Reduktion von PKC $\beta$ -Protein nur eingeschränkt möglich. Die Interaktion mit c-Raf-1, MEK-1/2 und MEKK-1 zeigt mögliche Wirkmechanismen auf. PKC $\beta$  ist ebenfalls für die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B nötig. Keine der beiden PKC-Isoformen beeinflusst die Phosphorylierung der p38 MAPK oder die Degradation des I- $\kappa$ B. In Gegenwart geringerer PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -Proteinmengen zeigen die Jurkat T-Zellen des weiteren nur ein verlangsamtes exponentielles Wachstum.

PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  regulieren die IL-2-Genexpression und IL-2-Sekretion in gegensätzlicher Weise. Unter Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein sind die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor (distal), die IL-2-Promotoraktivität und der IL-2-mRNA-Gehalt erhöht. Darüber hinaus wird mehr IL-2 von den Jurkat T-Zellen sezerniert. Das Isoenzym scheint unter physiologischen Bedingungen einen hemmenden Einfluß auf die genannten Ereignisse zu haben. Bei Verringerung von PKC $\beta$ -Protein hingegen sind NFAT-Bindung, IL-2-Promotoraktivität und IL-2-mRNA-Gehalt erniedrigt und es findet keine IL-2-Sekretion mehr statt.

Die beiden Isoenzyme PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  sind in die Regulation der TZR-induzierten Signaltransduktion und IL-2-Genexpression involviert. Sie üben ihren Einfluß in unterschiedlicher, teilweise gegensätzlicher Weise aus und besitzen spezifische Funktionen in Jurkat T-Zellen.

Schlagwörter: Antisense – MAPK – Jurkat T-Zellen

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>

## **1 EINLEITUNG**

---

1.1 Entstehung und Differenzierung von T-Lymphozyten.....	13
1.2 Mechanismen der T-Zell-Aktivierung.....	14
1.3 Jurkat T-Zellen als Modell.....	23
1.4 Ziel der Arbeit.....	24

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

2.1 Material.....	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.3 Antikörper.....	26
2.1.4 Oligodesoxynukleotide.....	27
2.1.5 Enzyme.....	28
2.1.6 Kits.....	28
2.1.7 Chemikalien und Substrate.....	28
2.1.8 Zellen und Medium.....	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Zellen und Zellkultur.....	30
2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	30
2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit spezifischen Antisense-Oligodesoxynukleotiden.....	31
2.2.2.1 Transfektion von Jurkat T-Zellen.....	32
2.2.2.2 Transfektion von stabil transfizierten Jurkat T-Zellen.....	33
2.2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflußzytometrie im FACS.....	33
2.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Jurkat T-Zellen.....	34
2.2.3 Aktivierung von Jurkat T-Zellen und stabilen Transfektanten.....	35

2.2.4	Herstellung subzellulärer Fraktionen.....	36
2.2.4.1	<i>Gewinnung zytosolischer Proteine</i> .....	36
2.2.4.2	<i>Herstellung kernfreier Lysate</i> .....	36
2.2.5	Immunpräzipitation.....	37
2.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
2.2.8	Proteintransfer auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen .....	40
2.2.9	Immunmarkierung von immobilisierten Proteinen.....	41
2.2.10	Aktivitätsbestimmung der JNK.....	42
2.2.11	Luziferaseaktivitätsbestimmung in stabil transfizierten Jurkat T-Zellen .....	43
2.2.12	Nachweis von spezifischer mRNA aus Jurkat T-Zellen durch PCR-gestützte Techniken .....	44
2.2.12.1	<i>RNA-Isolierung</i> .....	45
2.2.12.2	<i>cDNA-Synthese (RT-PCR)</i> .....	45
2.2.12.3	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i> .....	46
2.2.12.4	<i>Elektrophorese im Agarosegel</i> .....	48
2.2.12.5	<i>Semiquantitative PCR</i> .....	49
2.2.13	Bestimmung der Interleukin-2-Sekretion im ELISA.....	50

### 3 ERGEBNISSE

52

3.1	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) als Instrument spezifischer Inhibitionsstudien.....	52
3.1.1	Durch Elektroporation nehmen Jurkat T-Zellen AS-ODN mit hoher Effizienz auf.....	52
3.1.2	AS-ODN inhibieren spezifisch die Neusynthese ihrer Zielproteine PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ .....	56
3.1.3	Nach Transfektion mit PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN zeigen Jurkat T-Zellen ein verändertes Proliferationsverhalten .....	57
3.2	Die PKC-Isoenzyme $\alpha$ und $\beta$ verändern die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von MAPK-Kaskaden .....	61
3.2.1	Die Reduktion von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ inhibiert die Aktivierung der ERK-Kaskade .....	61
3.2.1.1	<i>... auf der Ebene der MAPK ERK-1 und ERK-2</i> .....	61
3.2.1.2	<i>... auf der Ebene der MAPKK MEK-1/2</i> .....	63
3.2.1.3	<i>... auf der Ebene der MAPKKK c-Raf-1</i> .....	63
3.2.2	Die Phosphorylierung von p38 MAPK bleibt durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN unbeeinflusst.....	64

3.2.3	PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert die Aktivierung der JNK-Kaskade .....	65
3.2.3.1	... auf der Ebene der MAPK JNK .....	65
3.2.3.2	... auf der Ebene der MAPKK MKK-4 .....	66
3.2.4	Zusammenfassung.....	67
3.3	PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ assoziieren mit Vertretern der MAPK-Kaskaden .....	68
3.3.1	PKC $\beta$ assoziiert mit c-Raf-1, MEK-1/2 und MEKK-1 an der Plasmamembran aktivierter Jurkat T-Zellen.....	68
3.3.2	PKC $\alpha$ und c-Raf-1 können koimmunpräzipitiert werden .....	70
3.3.3	Zusammenfassung.....	72
3.4	Die I- $\kappa$ B-Phosphorylierung, nicht aber die I- $\kappa$ B-Degradation, bedarf der Anwesenheit von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ .....	73
3.5	PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ regulieren die Interleukin-2-Genexpression .....	75
3.5.1	PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ bewirken eine veränderte NFAT-Bindung an den Interleukin- 2-Promotor .....	75
3.5.2	Die Aktivität des minimalen Interleukin-2-Promotors wird durch die PKC-Isoenzyme $\alpha$ und $\beta$ modifiziert.....	77
3.5.3	Zusammenfassung.....	78
3.6	PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ beeinflussen die Menge an Interleukin-2-mRNA in der Zelle .....	79
3.6.1	Zusammenfassung.....	84
3.7	Die Interleukin-2-Sekretion unterliegt der Regulation durch PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ .....	85
3.7.1	Zusammenfassung.....	86

---

## **4 DISKUSSION** **87**

4.1	Anwendung der Antisense-Technologie.....	87
4.2	PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ als Regulatoren der MAPK-Kaskaden und NF- $\kappa$ B- Aktivierung.....	92
4.3	Die Funktion von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ in der IL-2-Genexpression und IL-2- Sekretion .....	100

---

## **5 ZUSAMMENFASSUNG** **106**

---

## **LITERATURVERZEICHNIS** **107**

**ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden bei der T-Zell-Aktivierung.....	15
Abbildung 2: Struktur der Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODN).....	31
Abbildung 3: Durch Elektroporation können FITC-markierte AS-ODN gegen PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -mRNA in Jurkat T-Zellen eingebracht werden. ....	53
Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie nach Elektroporation von Jurkat T-Zellen mit FITC-markiertem PKC $\beta$ -AS-ODN.....	55
Abbildung 5: AS-ODN gegen die PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -mRNA inhibieren spezifisch die PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -Proteinneusynthese.....	56
Abbildung 6: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN haben keinen Einfluß auf die Überlebensrate von Jurkat T-Zellen bei der Elektroporation.....	58
Abbildung 7: In Anwesenheit von PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN zeigen Jurkat T-Zellen ein verlangsamtes exponentielles Wachstum.....	59
Abbildung 8: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibieren die Aktivierung der ERK-Kaskade auf allen drei Ebenen.....	62
Abbildung 9: Die Aktivierung von p38 MAPK bleibt durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN unbeeinflusst.....	64
Abbildung 10: Die Aktivierung der JNK-Kaskade wird lediglich durch PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert.....	66
Abbildung 11: PKC $\beta$ assoziiert mit c-Raf-1 und MEK-1/2 an der Plasmamembran stimulierter Jurkat T-Zellen.....	69
Abbildung 12: PKC $\beta$ assoziiert mit MEKK-1 an der Plasmamembran stimulierter Jurkat T-Zellen.....	70
Abbildung 13: PKC $\alpha$ und c-Raf-1 können aus Membranprotein stimulierter Jurkat T-Zellen koimmunpräzipitiert werden.....	71
Abbildung 14: Die Phosphorylierung des I- $\kappa$ B als Teil der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert.....	73
Abbildung 15: Die Anwesenheit von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN ist für die Degradation des I- $\kappa$ B unerheblich.....	74

---

Abbildung 16: PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ verändern die TZR/CD28-induzierte Bindung des Transkriptionsfaktors NFAT an den Interleukin-2-Promotor .....	76
Abbildung 17: Die TZR/CD28-induzierte Transkriptionsaktivität des Interleukin-2-Promotors unterliegt dem Einfluß von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ .....	77
Abbildung 18: Mit Hilfe der PCR können Unterschiede im mRNA-Gehalt der Zellen semiquantitativ ausgewertet werden .....	80
Abbildung 19: Aktivierung von Jurkat T-Zellen über den TZR/CD28 induziert die Synthese von IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA.....	81
Abbildung 20: PKC $\alpha$ -AS-ODN erhöht und PKC $\beta$ -AS-ODN erniedrigt die TZR/CD28-induzierte Synthese der IL-2-mRNA.....	82
Abbildung 21: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibieren die TZR/CD28-induzierte Synthese der IFN- $\gamma$ -mRNA .....	83
Abbildung 22: Die TZR/CD28-induzierte Interleukin-2-Sekretion wird durch PKC $\alpha$ -AS-ODN verstärkt und durch PKC $\beta$ -AS-ODN vollständig gehemmt.....	85
Tabelle 1: Primer und Fragmente bei der PCR .....	47

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Im folgenden Text werden für einige Begriffe englische Fachtermini (*kursiv*) verwendet, wenn deren Übersetzung in der deutschen Fachliteratur unüblich ist. Für die Abkürzung englischer Ausdrücke ist die deutsche Bedeutung in diesem Verzeichnis nur zum Teil angegeben.

AP-1	<i>activating protein-1</i>
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxynukleotid
ATF-2	<i>activating transcription factor-2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDC42	<i>cell-division-cycle protein 42</i>
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
Cot/Tpl	<i>cancer Osaka thyroid/tumor progression locus</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diazylglyzerin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase

---

GTP	Guanosintriphosphat
h. i.	hitzeinaktiviert
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
I- $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I- $\kappa$ B <i>kinase</i>
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KSR	<i>kinase suppressor of Ras</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	MAPK <i>kinase</i>
MAPKKK	MAPKK <i>kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated ERK-activating kinase</i>
MEKK	MEK <i>kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MKK	(= MEK)
MLK	<i>mixed-lineage kinase</i>
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> Reverse Transkriptase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor of <math>\kappa</math>B</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NIK	<i>NF-<math>\kappa</math>B-inducing kinase</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
Oct-1	<i>octamer-binding protein-1</i>
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RPMI	RPMI 1640-Medium + Zusätze
RT	Reverse Transkriptase
SAP-1	SRF <i>accessory protein-1</i> , (SRF = <i>serum response factor</i> )
SDS	<i>sodiumdodecyl sulfate</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-13-phorbolacetat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Entstehung und Differenzierung von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind Teil des spezifischen Immunsystems und verantwortlich für die zelluläre Immunantwort. Aus den hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark entstehen zunächst allgemeine lymphatische Vorläuferzellen, die in den Thymus wandern und dort ausdifferenzieren. Es entstehen sogenannte „doppelt positive“ T-Lymphozyten, die CD4- und CD8-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Ein geringer Teil dieser Zellen exprimiert zusätzlich den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex (TZR/CD3), über den an MHC (*major histocompatibility complex*) gebundene Antigene erkannt werden. Nur die Zellen werden selektiert, die sowohl MHC-Moleküle binden als auch tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen sind. Diese doppelt positiven, TZR/CD3-exprimierenden Zellen verlieren im weiteren Verlauf der Differenzierung einen der beiden Korezeptoren und sind dann entweder CD8- oder CD4-positiv. Zytotoxische Zellen (CD8-positiv) binden MHC-I-Moleküle, T-Helferzellen (CD4-positiv) binden MHC-II-Moleküle. Die Zellen verlassen den Thymus und durchwandern Blut und lymphatische Organe der Peripherie. Sie werden als naiv bezeichnet, da sie noch keinen Kontakt mit Fremdanitgenen hatten.

Die primäre Immunantwort geht mit einer Aktivierung der T-Zellen einher und wird dadurch ausgelöst, daß der T-Lymphozyt auf ein Fremdanitgen trifft, das an den MHC einer antigenpräsentierenden Zelle gebunden ist. Bei den T-Helferzellen sind mit der Aktivierung zwei wesentliche Ereignisse verbunden – die Bildung von Zytokinen und die Expression von Zytokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Aufgrund des Zytokinmusters werden sie in zwei Untergruppen eingeteilt. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren im wesentlichen die Zytokine Interleukin-2, Interferon- $\gamma$  sowie Lymphotoxin. T<sub>H</sub>2-Zellen sind gekennzeichnet durch die vornehmliche Synthese von Interleukin-4, -5 und -13. Über die Zytokine beeinflussen T-Helferzellen andere Zellen des Immunsystems und ermöglichen eine weitreichende Immunantwort. Interleukin-2 wird ausschließlich in T-Lymphozyten gebildet und induziert dort die Synthese seines eigenen Rezeptors.<sup>1,2</sup> Es bildet insofern eine Ausnahme, als daß das Zytokin über den an der Oberfläche exprimierten Interleukin-2-Rezeptor in erster Linie auf die T-Lymphozyten selbst wirkt.<sup>3</sup> Sie erwerben infolge dieser Vorgänge ihre volle Immunfunktion und proliferieren.

## 1.2 Mechanismen der T-Zell-Aktivierung

Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten infolge der Rezeptorbesetzung wird das externe Signal intrazellulär weitergeleitet.<sup>4</sup> Alle damit verbundenen Vorgänge werden gemeinhin unter dem Begriff Signaltransduktion zusammengefaßt und werden hier in den relevanten Zügen beschrieben (Abbildung 1).

Der TZR/CD3-Komplex aktiviert nach Ligandenbindung intrazelluläre Proteintyrosinkinasen. Diese Proteintyrosinkinasen unterliegen einerseits einer Autophosphorylierung und aktivieren andererseits eine Vielzahl von weiteren Proteinen in der Zelle. Enzyme aus der Familie der kleinen G-Proteine gehen in die aktive Form über und geben das Signal an ihre Zielproteine weiter. Ein wichtiges Ereignis ist dabei die Initiierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskaden, die aus hintereinandergeschalteten Proteinkinasen bestehen. Durch das eingehende Signal werden zunächst die MAPKKK phosphoryliert und damit aktiviert. Sie phosphorylieren die Enzyme der nachfolgenden Ebene, die MAPKK. Diese wiederum phosphorylieren die MAPK und das Signal mündet schließlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. In Säugerzellen sind bis dato drei wichtige MAPK-Kaskaden bekannt, die ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*)-, die JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)- und die p38 MAPK-Kaskade.

Weitere wichtige Ereignisse in T-Lymphozyten sind die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear factor of  $\kappa$ B*) und die Aktivierung der Phospholipase C. Die Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diazylglyzerin).<sup>5</sup> IP<sub>3</sub> wird für den intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration verantwortlich gemacht. Über die erhöhte Calciumkonzentration wird die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Sie dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), der dadurch aktiviert wird. DAG ist ein direkter Aktivator der PKC (Proteinkinase C). Diesem Enzym wird eine Schlüsselrolle in der Regulation zahlreicher Prozesse der T-Zell-Aktivierung zugesprochen.<sup>6</sup>

Die aktivierten Transkriptionsfaktoren translozieren in den Zellkern, binden an die Promotoren diverser Gene und induzieren deren Transkription. Die Genexpression von Zytokinen und ihren Rezeptoren steht im Mittelpunkt des Interesses, wobei das IL (Interleukin)-2 in T<sub>H</sub>1-Zellen eine wichtige Rolle einnimmt. Nach seiner Synthese wird IL-2 in Richtung Zellperipherie transportiert und sezerniert.

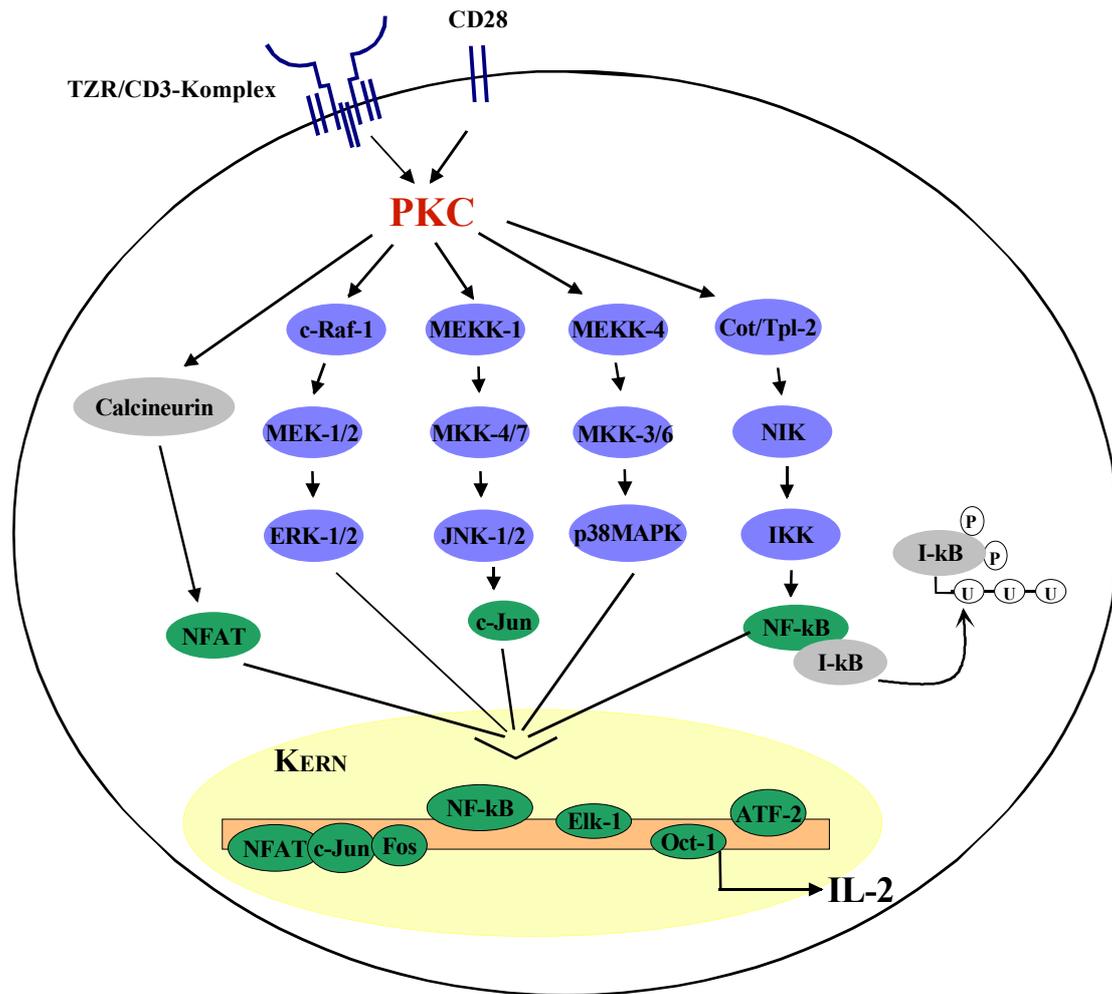


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden bei der T-Zell-Aktivierung

Erläuterungen im Text

Der TZR von naiven T-Lymphozyten besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind und jeweils nur eine kleine zytoplasmatische Domäne tragen. Der CD3-Komplex ist zusammengesetzt aus einer  $\delta$ -, einer  $\gamma$ - und zwei  $\epsilon$ - Ketten, die über Salzbrücken mit dem TZR assoziiert sind, sowie aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften  $\zeta$ -Ketten.

Nach Ligandenbindung an den TZR/CD3-Komplex interagieren die zytoplasmatischen Domänen der CD3-Ketten mit intrazellulären Proteintyrosinkinasen und werden von ihnen phosphoryliert.<sup>7,8</sup> Dadurch können weitere zytoplasmatische Proteine an die CD3-

Ketten binden. Aktivierte GEPs (*GDP/GTP exchange proteins*) bewirken den Austausch von GDP gegen GTP in der Aktivierungsdomäne der kleinen G-Proteine, zu denen p21<sup>ras</sup> (Ras), die Rho-Familie und CDC42 (*cell-division-cycle protein*) zählen, und aktivieren sie dadurch.<sup>9,10</sup>

B7.1 (CD80)- und B7.2 (CD86)-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen dienen als Liganden für den CD28-Korezeptor.<sup>11</sup> Eine Beteiligung dieses Korezeptors besitzt u. a. Relevanz für die T-Zellproliferation, Inhibition der Apoptose und Induktion der Zytokinproduktion.<sup>12,13</sup> Die Signalauslösung allein über den TZR/CD3-Komplex ist unzureichend für die T-Zell-Aktivierung und IL-2-Produktion; sie führt die Zelle in den Zustand der Anergie.<sup>14,15</sup>

Der PKC-Aktivator TPA (12-O-Tetradecanoyl-13-phorbolacetat) kann in Kombination mit dem Calciumionophor Ionomycin die T-Zell-Aktivierung nachahmen.<sup>16</sup>

Die ERK-Kaskade wird durch extrazelluläre Signale wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren ausgelöst. In T-Lymphozyten ist die alleinige Besetzung des TZR für eine Aktivierung ausreichend. Die hauptsächlichen Vertreter der Proteinkinasen sind c-Raf-1 (MAPKKK), MEK (MAPKK) und ERK (MAPK).<sup>17</sup>

Inaktives c-Raf-1 ist als Multiproteinkomplex von 300 bis 500 kDa zunächst im Zytosol lokalisiert und über die phosphorylierten Aminosäuren Ser259 und Ser621 an das dimere Gerüstprotein (*scaffold protein*) 14-3-3 gebunden.<sup>18,19,20</sup> Das kleine G-Protein Ras bindet mit hoher Affinität an zwei Stellen der MAPKKK c-Raf-1.<sup>21</sup> Damit geht eine Dephosphorylierung von c-Raf-1 an Ser259 einher – das verantwortliche Enzym ist möglicherweise die Proteinphosphatase 2A.<sup>22</sup> Gleichzeitig transloziert c-Raf-1 an die Membran.<sup>23</sup> Für die vollständige Aktivierung von c-Raf-1 ist zusätzlich die Phosphorylierung an Ser338 und Tyr341 notwendig.<sup>24</sup> c-Raf-1 kann nun als Ser/Thr-Kinase ihr Substrat, die MEK (*mitogen-activated ERK-activating kinase*), phosphorylieren und aktivieren.<sup>25,26</sup> Durch die Phosphorylierung an Ser259 wird c-Raf-1 wieder inaktiviert.<sup>27</sup> Die Raf-Aktivierung ist tatsächlich noch wesentlich komplexer als hier geschildert. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß sich der Aktivierungsstatus von c-Raf-1 aus einem Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Autoinhibition zusammensetzt. Bisher sind drei Raf-Proteine bekannt, und zwar c-Raf-1, A-Raf und B-Raf.<sup>28,29,30</sup> Alle Raf-Proteine verwenden Ras als Aktivator und MEK als Substrat.<sup>26,31,32,33</sup> Trotzdem sind sie nicht redundant und haben daher verschiedene Funktionen. Als MAPKKK ist das ubiquitär vorkommende c-Raf-1 die dominante Form, obwohl auch MEKK (MEK *kinase*)-1 und MEKK-2 die

MAPKK MEK aktivieren können.<sup>34,35,36</sup> MEKK-1 vermag darüber hinaus an Ras zu binden.<sup>37</sup>

MEK umfaßt eine Familie von Thr/Tyr-Kinasen, wobei an der ERK-Kaskade die Isoformen MEK1 und MEK2 (auch MKK1 und 2 genannt) beteiligt sind. Sie phosphorylieren die MAPK ERK-1 und -2, die entsprechend ihres Molekulargewichts auch als p44 und p42 bezeichnet werden. ERK-1 und -2 sind Ser/Thr-Kinasen, die nach der Aktivierung in den Zellkern translozieren.<sup>38,39</sup> Insgesamt werden den beiden ERK-Isoformen mehr als 50 verschiedene Substrate zugeordnet, darunter beispielsweise die Proteinkinasen MAPKAP (*MAPK-activating protein kinase*)-2/3 und die Transkriptionsfaktoren Elk-1, SAP (*SRF accessory protein*)-1, c-Fos, c-Jun, ATF (*activating transcription factor*)-2 und c-Myc.<sup>40,41,42</sup>

Die JNK-Kaskade wird durch proinflammatorische Zytokine und Streßfaktoren (UV-Bestrahlung, Hitzeschock, Osmoseschock, mechanische Beanspruchung, u. a.) ausgelöst.<sup>43,44</sup> Lediglich in T-Lymphozyten sind zwei Signale erforderlich, die über den TZR und CD28 ausgelöst werden.<sup>45,46,47</sup> CDC42 aus der Rho-Familie der GTPasen oder Rac könnten an der Aktivierung beteiligt sein.<sup>48,49</sup> Als mögliche MAPKKK wurden die Ser/Thr-Kinasen MEKK-1 bis MEKK-4, MLK (*mixed-lineage kinase*)-3 und DLK (*dual leucine zipper kinase*) identifiziert.<sup>36,50,51,52</sup> Das Signal wird über die Phosphorylierung von MKK-4 oder MKK7 weitergeleitet und mündet in der Aktivierung der MAPK-Isoformen JNK-1 und JNK-2.<sup>47,53</sup> Noch im Zytosol wird das namengebende Substrat dieser Enzyme, c-Jun, aktiviert und transloziert in den Kern.<sup>54,55</sup> Weitere Substrate von JNK sind ATF-2, Elk-1 und SAP-1.<sup>41,56,57,58,59</sup> Die JNK-Kaskade spielt, abhängig von der Dauer ihrer Aktivierung, eine wichtige Rolle bei der IL-2-Genexpression, mRNA-Stabilisierung und proapoptotischen Prozessen wie der streßinduzierten Fas-Liganden (CD95)-Expression in Jurkat T-Zellen.<sup>60,61</sup>

Die p38 MAPK-Kaskade wird durch Streßfaktoren (UV-Bestrahlung, Osmoseschock), Lipopolysaccharide und Zytokine (IL-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) ausgelöst.<sup>62,63,68</sup> Wie bei der JNK-Kaskade wird auch hier eine Funktion von CDC42 oder Rac aus der Rho-Familie der GTPasen diskutiert.<sup>64</sup> Ausgehend von den MAPKKK MLK-3 und MEKK-4 verläuft das Signal über die MKK-3, MKK-4 und MKK-6 weiter zur p38 MAPK.<sup>52,51, 65,66</sup> p38 MAPK transloziert in den perinukleären Bereich und aktiviert

die MAPKAPK-2, -3 und -5 und die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und Elk-1.<sup>41,65,67,68</sup> Darüber hinaus phosphoryliert p38 MAPK auch I- $\kappa$ B (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*).<sup>68</sup>

Der Aufbau der MAPK-Kaskaden aus jeweils drei Ebenen vermittelt nicht nur eine Amplifikation des Signals, sondern eröffnet der Zelle auch ein weites Feld an Regulationsmöglichkeiten bezüglich der Kinetik, Dauer und Amplitude des Signals.

Die an der Signalweiterleitung beteiligten Proteinkinasen werden normalerweise in erster Linie einer bestimmten MAPK-Kaskade zugeordnet. Es ist aber zu berücksichtigen, daß aufgrund der geringen Substratspezifität einiger Vertreter zahlreiche Querverbindungen zwischen der ERK-, der JNK- und der p38 MAPK-Kaskade bestehen. MEKK-1 tritt z. B. vornehmlich als MAPKKK in der JNK-Kaskade auf, kann aber auch MEK-1 und -2 (ERK-Kaskade) aktivieren. Gleiches gilt für MEKK-3.

Die MAPK unterliegen einer dualen Phosphorylierung innerhalb sehr ähnlicher Motive. Tyr/Thr-Kinasen phosphorylieren ERK an Thr-Glu-Tyr, JNK an Thr-Pro-Tyr und p38 MAPK an Thr-Gly-Tyr.<sup>69,70,68</sup> So verwundert es nicht, daß MKK-4 beispielsweise sowohl JNK als auch p38 MAPK phosphorylieren kann. Auf der untersten Kaskadenebene existieren besonders viele Überlappungen. ATF-2, Elk-1, NFAT sind Transkriptionsfaktoren, die von mehr als einer MAPK aktiviert werden können. Vor diesem Hintergrund ist es um so erstaunlicher, daß verschiedene extrazelluläre Signale über die gleichen Kaskaden weitergeleitet werden und umgekehrt gleiche extrazelluläre Signale sehr differenziert weitergegeben werden können. Der Zelle steht offensichtlich eine Vielzahl von Möglichkeiten offen, auf das externe Signal zu reagieren. Wovon diese Mechanismen im einzelnen abhängig sind und wie sie konkret ablaufen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch relativ unklar. Ein wichtiger Fortschritt in dieser Richtung war die Entdeckung, daß die Enzyme der MAPK-Kaskaden vermutlich in Form von übergeordneten Strukturen, sogenannten Signalkomplexen, organisiert sind. Diese wurden erstmals für die Hefe beschrieben. Über eine Assoziation mit Gerüstproteinen werden die beteiligten Enzyme in räumliche Nähe zueinander gebracht. Bei MAPK-Kaskaden erleichtert diese Zusammenführung die aufeinanderfolgende Phosphorylierung der Mitglieder und fördert die Schnelligkeit und Effizienz der Signalübertragung. Die Gerüstproteine könnten zudem die präzise Regulation der Signalwege gewährleisten, da sie einen MAPK-Weg abgrenzen und so vor Querverbindungen mit funktionell nicht verwandten Mitgliedern anderer MAPK-Signalmodule schützen können. Der Aktivierungsstatus eines Enzyms könnte zusätzlich

dadurch bestimmt werden, daß sich das Protein – unter Mitwirkung der Gerüstproteine – in einem bestimmten Zellkompartiment aufhält oder vorzugsweise die Tertiärstruktur des aktiven oder inaktiven Zustands einnimmt.

Im Falle der ERK-Kaskade könnte es sich bei einem Gerüstprotein um KSR (*kinase suppressor of Ras*) handeln. KSR bindet konstitutiv an MEK-1, aber erst nach Ras-Aktivierung an c-Raf-1 und ERK.<sup>71,72,73,74,75</sup> Voraussetzung für die Ras-induzierte Bindung ist die Phosphorylierung von KSR an Serin- und Threoninresten durch die aktivierte ERK.<sup>75</sup>

Das mutmaßliche Gerüstprotein der JNK-Kaskade JIP (*JNK interacting protein*)-1 vereinigt MLK-3, MKK-7 und JNK miteinander, interagiert aber nicht mit MKK-3, -4, -6 oder MEK-1.<sup>76</sup>

Bei Untersuchungen zur Genregulation der leichten Kette von Ig (Immunglobulin) $\kappa$  in B-Zellen wurde der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B entdeckt.<sup>77</sup> Es stellte sich heraus, daß NF- $\kappa$ B eine ganze Familie von Faktoren konstituiert, die allesamt eine Rel-Domäne enthalten und eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer, antiapoptotischer und immunologischer Antworten spielen.<sup>78</sup> Später wurde er auch in vielen anderen Zellen wie z. B. Jurkat T-Zellen gefunden.<sup>79</sup> Das NF- $\kappa$ B-Heterodimer ist im Zytosol der ruhenden Zelle mit seinem Inhibitor I- $\kappa$ B assoziiert.<sup>80</sup> Die innerhalb der Rel-Domäne gelegene NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz des Transkriptionsfaktors, die seinen Import in den Zellkern ermöglicht, wird von dem Inhibitor maskiert.<sup>81</sup> Durch die Initiierung mittels zweier eingehender Signale kommt es zur aufeinanderfolgenden Aktivierung der Enzyme Cot/Tpl (*cancer Osaka thyroid/tumor progression locus*)-2, NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) und IKK (*I- $\kappa$ B kinase*).<sup>82,83,84,85</sup> Damit zeigt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung gewisse Parallelen zu den MAPK-Kaskaden. Die drei Isoformen IKK $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sind in einem Signalkomplex von 700 bis 900 kDa formiert.<sup>86,87,88</sup> IKK $\alpha$  und  $\beta$  werden als katalytische Untereinheiten über den TZR/CD28-Stimulus aktiviert, IKK $\gamma$  ist eine essentielle regulatorische Untereinheit. Der CD28-Korezeptor ist maßgeblich an der Aktivierung der IKKs, insbesondere IKK $\beta$ , beteiligt.<sup>89,90</sup> Das Enzym NIK aktiviert vornehmlich IKK $\alpha$ .<sup>91,92</sup> Die IKKs phosphorylieren I- $\kappa$ B $\alpha$  an Ser32 und Ser36 im N-terminalen Bereich, der daraufhin ubiquitiniert und im 26S-Proteasom degradiert wird.<sup>93,94,95,96,97,98</sup> NF- $\kappa$ B unterliegt nun nicht mehr dem Einfluß seines Inhibitors, transloziert in den Zellkern

und bindet an diverse Promotoren.<sup>99</sup> Innerhalb des IL-2-Promotors bindet NF- $\kappa$ B an ein CD28RE (*CD28 responsive element*).<sup>100,101</sup>

MEKK-1 aktiviert als MAPKKK der JNK-Kaskade die IKK $\beta$ .<sup>90,102,103</sup> In überexprimierter Form induziert sie die I- $\kappa$ B-Phosphorylierung und NF- $\kappa$ B-Aktivierung.<sup>104</sup>

Der Transkriptionsfaktor NFAT wurde nach seiner nukleären Lokalisation in aktivierten T-Zellen benannt.<sup>105</sup> Er nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der IL-2-Transkription ein.<sup>106</sup> Bisher wurden die Isoformen NFAT1 (= NFATp oder NFATc2), NFAT2 (= NFATc oder NFAT c1), NFAT3 und NFAT4 entdeckt. Über die Zuordnung von NFAT5 zu den herkömmlichen NFAT-Isoformen besteht noch keine Einigkeit. NFAT1 und NFAT4 sind in T-Zellen konstitutiv exprimiert, NFAT2 ist durch Stimulierung mit TPA/Ionomycin induzierbar.<sup>107,108</sup> Die calciumabhängige Proteinphosphatase Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert NFAT.<sup>109,110</sup> Die Aktivierung und der nukleäre Import von NFAT sind so streng an eine erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle gebunden. Wie bei NF- $\kappa$ B konnten auch bei diesem Transkriptionsfaktor NLS-Sequenzen identifiziert werden, die den nukleären Import regulieren.<sup>111</sup> Möglicherweise ist mit der Aktivierung eine Konformationsänderung des Proteins verbunden, bei der die NLS-Sequenzen demaskiert werden. In NFAT2 wurde zusätzlich eine NES-Sequenz (*nuclear export signal*) gefunden.<sup>112</sup> Aktivierter NFAT transloziert im Komplex mit Calcineurin in den Zellkern und bindet dort an den IL-2-Promotor.<sup>113</sup> Die Deletion der NFAT-Bindungsstelle hemmt die IL-2-Promotoraktivität um 70 bis 95 %.<sup>114</sup> Die Aktivierung von NFAT1 erfordert in Jurkat T-Zellen zwei Signale.<sup>115</sup>

NFAT ist nicht nur das Substrat von Calcineurin. Ser/Thr-Kinasen wie ERK, p38 MAPK und JNK phosphorylieren NFAT und tragen zur Querverbindung der Signalwege bei.<sup>116,117</sup> Die Rephosphorylierung durch die Kinasen wirkt der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung entgegen und verhindert den nukleären Import von NFAT bzw. fördert den Export des bereits translozierten Transkriptionsfaktors.<sup>118</sup> Umgekehrt ist beispielsweise in Abwesenheit von JNK-1 die nukleäre Menge an NFAT2 in ruhenden T-Zellen erhöht.<sup>119</sup>

DAG, neben IP<sub>3</sub> das zweite Produkt aus der Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat, ist wie bereits erwähnt ein direkter Aktivator der Proteinkinase C (PKC), einer

Familie von Ser/Thr-Kinasen. Die PKC-Isoformen werden nach strukturellen und funktionellen Aspekten in drei Gruppen eingeteilt.<sup>120,121</sup> PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$  gehören den calciumabhängigen PKCs (cPKCs) an, die des weiteren DAG oder Phorbolster als Kofaktor benötigen. PKC $\beta$ I und PKC $\beta$ II entstehen durch alternatives Spleißen. PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\eta$ (L) sind als Vertreter der neuen PKCs (nPKCs) zwar calciumunabhängig, aber ebenfalls auf DAG oder Phorbolster angewiesen. Die ursprünglich dieser Gruppe zugeordnete PKC $\mu$  wird mittlerweile separat als PKD bezeichnet.<sup>122</sup> Die Gruppe der atypischen PKCs (aPKCs) mit PKC $\zeta$  und  $\lambda$ ( $\iota$ ) benötigt weder Calcium noch Phorbolster zur Aktivierung.<sup>123</sup>

Die PKC-Isoenzyme haben alle eine recht ähnliche Struktur. Sie sind aufgebaut aus einer C-terminalen katalytischen Region mit ATP-Bindungsstelle und Substratbindungstasche sowie einer N-terminalen regulatorischen Region mit Pseudosubstratmotiv, DAG- bzw. Phorbolsterbindungsort und der Calciumbindungsstelle in cPKCs. TPA vermag als Phorbolster direkt an cPKCs und nPKCs zu binden und sie dadurch zu aktivieren.<sup>124</sup> Da TPA in der Zelle kaum metabolisiert wird, ist seine Wirkung stärker und langanhaltender als die von DAG. Die PKC transloziert nach Aktivierung an die Membran.<sup>125,126,127</sup> Sie greift in zentrale intrazelluläre Prozesse ein. Darunter fallen Zellproliferation und -differenzierung, Zytokinsynthese und -sekretion, IL-2-Rezeptorexpression und Calciumionenfluß.<sup>120,121,128,129</sup>

In Abhängigkeit von Zelltyp und Gewebe werden sehr unterschiedliche PKC-Isoenzyme exprimiert.<sup>130</sup> Neben den kinetischen Eigenschaften variieren auch Substratspezifität und Kompartimentlokalisation. Schon bald wurde deshalb eine individuelle Rolle der einzelnen Isoenzyme vermutet.<sup>115</sup> T-Lymphozyten exprimieren PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  und  $\zeta$ , nicht aber PKC $\gamma$ .<sup>131,132</sup> PKC-Isoenzyme üben einen erheblichen Einfluß auf die T-Zell-Aktivierung aus. Dies kommt u. a. darin zum Ausdruck, daß eine durch anhaltende TPA-Behandlung verursachte PKC-Depletion die T-Zell-Aktivierung verhindert.<sup>127,133</sup> Für PKC $\alpha$  wird eine Funktion in normalen und leukämischen hämatopoietischen Zellen und in der Differenzierung erythroider Zellen diskutiert.<sup>134</sup>

Die Initiierung aller genannten Signalwege resultiert in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an die Promotoren diverser Gene binden und ihre Transkription ermöglichen. Die Genexpression von Interleukin-2 ist eines der zentralen Ereignisse in T<sub>H</sub>1-Zellen. Die Transkription des IL-2-Gens erfordert zwei Signale und wird über den vorge-

lagerten Promotor reguliert. Der humane IL-2-Promotor umspannt ca. 300 Basenpaare und trägt zahlreiche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT, AP (*activating protein*)-1, NF- $\kappa$ B, Oct (*octamer-binding protein*)-1.<sup>114,135</sup> Ihr kooperatives Zusammenspiel ermöglicht die Initiierung der IL-2-Transkription.<sup>136</sup> Zwei hochaffine NFAT-Bindungsstellen wurden an den Positionen -135 und -280 identifiziert. Des Weiteren existieren 3 niedrigaffine NFAT-Bindungsstellen (-45, -90 und -160), von denen die letzte mit einem CD28RE überlappt.<sup>139,137</sup> Daher wird die NFAT-Bindung durch CD28-Stimulation erhöht.<sup>138</sup> Die NFAT-Bindung an die distale Stelle (-280) erfolgt kooperativ mit AP-1.<sup>139</sup> AP-1-ähnliche Faktoren bestehen aus Dimeren von verschiedenen Jun- und Fos-Proteinen, die über sogenannte Leucin-Zipper an DNA-Sequenzbereiche des IL-2-Promotors binden.<sup>140,141,142</sup> Die Transkriptionsfaktoren NFAT und Oct-1 benötigen in der Regel nur ein Signal. Das duale Signal für die IL-2-Expression ist deshalb in der Notwendigkeit anderer Faktoren wie AP-1 und NF- $\kappa$ B begründet.<sup>45,100,143</sup>

Die Stabilität der synthetisierten IL-2-mRNA wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. AREs (*adenosine- or uridine-rich elements*) in der 3'-untranslatierten Region von mRNAs, die durch mehrere Kopien des Pentanukleotids AUUUA gekennzeichnet sind, destabilisieren die mRNA-Transkripte von mehreren Zytokinen. Eine Deletion dieser Region generiert konstitutiv stabile mRNAs.<sup>60,144</sup> Über extrazelluläre Stimuli kann eine mRNA-Stabilisierung induziert werden. Verantwortlich ist eine Sequenz in der 5'-untranslatierten Region. Die Bindung einiger Proteine in dieser Region stabilisiert die mRNA und verlängert ihre Halbwertszeit.<sup>60</sup> Die Beteiligung des Korezeptors CD28 an der T-Zell-Aktivierung trägt im Vergleich zur alleinigen TZR/CD3-Stimulation zur Stabilisierung der IL-2-mRNA bei.<sup>145, 146</sup> TPA und Ionomycin sind ebenfalls imstande, die Halbwertszeit zu verlängern. Das Signal verläuft in beiden Fällen vermutlich über die JNK-Kaskade.<sup>60</sup>

Nach der Translation wird das synthetisierte IL-2 sezerniert. IL-2 induziert bereits zu einem frühen Zeitpunkt die Genexpression des IL-2-Rezeptors. Er besteht aus drei Untereinheiten, die getrennt synthetisiert und erst an der Zelloberfläche zusammengefügt werden. Das sezernierte IL-2 wird vom Rezeptor gebunden und anschließend mit ihm zusammen internalisiert. Zytokinsynthese und Rezeptorexpression sind lediglich transien-

te Ereignisse. Im weiteren Verlauf werden die Gene wieder abgeschaltet und bedürfen einer erneuten Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor.

### 1.3 Jurkat T-Zellen als Modell

Die verwendeten Jurkat T-Zellen entstammen einer humanen leukämischen T-Zelllinie.<sup>147</sup> FACS-Untersuchungen zeigten, daß 96 % der Zellen den TZR/CD3-Komplex exprimieren. Bezüglich ihres Zytokinmusters sind sie vergleichbar mit dem T<sub>H</sub>1-Subtyp.

Jurkat T-Zellen wurden als Modell verwendet, um Vorgänge in aktivierten T-Lymphozyten zu studieren. Im Organismus ist ein Kontakt zwischen T-Lymphozyt und antigentrager antigenpräsentierender Zelle notwendig. Um diese Situation nachzuahmen, wurden gegen den TZR und CD28-Korezeptor gerichtete Antikörper verwendet.

Da sie einer Tumorzelllinie entspringen, handelt es sich bei Jurkat T-Zellen nicht um ruhende Zellen. Sie vermehren sich selbständig unter geeigneten Bedingungen und können daher leicht in Kultur gehalten werden. So stehen jederzeit ausreichende Mengen an Zellen zur Verfügung. Jurkat T-Zellen können durch den Entzug von Wachstumsfaktoren in die Ruhephase dirigiert werden, so daß die Zellpopulation sehr homogen ist.

Aus peripherem Blut isolierte primäre T-Lymphozyten sind ruhende Zellen und proliferieren in der Regel nicht. Aufgrund der geringen Proteinneusynthese sind sie für die Untersuchung der Signaltransduktionsmechanismen unter den gewählten Bedingungen nicht geeignet.

Es bleibt zu erwähnen, daß in Jurkat T-Zellen das Isoenzym PKC $\alpha$  in starkem Maße exprimiert wird und eine vorherrschende Rolle einzunehmen scheint. PKC $\beta$  ist dagegen vermutlich die dominante Form in peripheren T-Lymphozyten.<sup>131</sup> Das verwendete Modell hat also trotz der Ähnlichkeit zu T-Lymphozyten seine Grenzen.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die Entdeckung der MAPK-Kaskaden stellte einen Meilenstein in der Erforschung der Signaltransduktionswege dar. Die PKC wurde bereits 1977 beschrieben und es dauerte nicht lange bis auch ihre Bedeutung für intrazelluläre Prozesse erkannt wurde.<sup>99,135</sup> Die PKC umfaßt eine Familie von Ser/Thr-Kinasen und es mehrten sich Anhaltspunkte dafür, daß mit den Differenzen zwischen den PKC-Isoenzymen auch funktionelle Unterschiede verbunden sein könnten. Zahlreiche Inhibitoren wurden entwickelt, um die Rolle einzelner Isoformen aufzudecken. Lediglich die PKC $\theta$  ist mittlerweile sehr gut charakterisiert.<sup>148</sup> Bei den anderen Isoformen ist noch wesentlich mehr Aufklärungsarbeit zu leisten. Es fehlen vor allem zuverlässige Daten über die intrazellulären Angriffspunkte der PKCs und die konkrete Gestaltung ihrer Wirkmechanismen. Des weiteren besteht bei einzelnen PKC-Isoenzymen Unklarheit über die Gemeinsamkeiten und Differenzen ihrer Funktion in verschiedenen Zellsystemen.

Bei der vorliegenden Arbeit sollte unter weitgehend physiologischen Bedingungen die Funktion von PKC $\alpha$  und  $\beta$  bei der Regulation der Signaltransduktion in Jurkat T-Zellen analysiert werden.

Im Blickfeld stand die Frage, ob die genannten PKC-Isoenzyme an der Aktivierung der MAPK-Kaskaden beteiligt sind und welche der Kaskaden betroffen sind. Durch die Identifizierung von Zielproteinen sollte geklärt werden, ob die PKC-Isoenzyme direkt auf Vertreter der MAPK-Kaskaden oder indirekt über andere zelluläre Proteine wirken. Dadurch gewonnene Hinweise auf die möglicherweise zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sollten weiter überprüft werden.

Da über die MAPK-Kaskaden wichtige Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, lag die Frage nahe, ob PKC-Isoenzyme – abhängig oder unabhängig von den MAPK-Kaskaden – an der Regulation der IL-2-Genexpression als zentralem Ereignis in T-Zellen teilnehmen. Hier sollte geklärt werden, ob ein Einfluß auf Transkriptions-, Translations- oder Sekretionsebene ausgeübt wird.

Den Mittelpunkt des Interesses bildete bei allen genannten Punkten die Frage, inwiefern Differenzen oder Gemeinsamkeiten zwischen den beiden „klassischen“ Isoenzymen PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  bestehen und ob sich daraus spezifische Funktionen in der Zelle ableiten lassen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegel-Dokumentation Gel Doc 1000 (Bio-Rad, München, Deutschland)

Agarosegelkammern ComPhor Mini und Midi (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)

Brutschrank NU 4500 E (Zapf Instruments, Sarstedt, Deutschland)

Einfrierbehälter (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Elektrophoresekammer Z 37,507-1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Elektroporations-Impulsgenerator Typ EPI 2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg)

ELISA-Reader MR 5000 (Dynatech, Denkendorf, Deutschland)

FACScan (BD, Heidelberg, Deutschland)

Filmentwickler Optimax 1170 (Protec, Oberstenfeld, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop Model IMT-2 (Olympus Optical Co., LTD., Tokio, Japan)

Heizblock Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland)

Netzgerät EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

PCR-Gerät RoboCycler Gradient 96 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)

pH-Meter (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland)

Proteintransfer-Apparatur Panther™ Semidry Electroblotter HEP-1  
(OWL Separation Systems, Portsmouth, USA)

Schüttler Typ BellyDancer (Stovall Life Science, Greensboro, USA)

Spektrometer Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Sterilbank Lamin Air HB 2472 (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Tischzentrifuge MC-13 (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Ultraschallgerät Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA)

Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland)

Zentrifuge Zellkultur 4K15 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)  
 ELISA-Mikrotiterplatten MaxiSorb™ (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)  
 FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  
 Filme für Chemilumineszenz Biomax™ ML (Kodak, Rochester, USA)  
 für Fluoreszenz Elite CHROME 160T (Kodak, Rochester, USA)  
 Filterpapiere GB002/004 (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland)  
 Luminometer-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  
 Mikrotiter- und 24-well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)  
 Nitrozellulosemembran Protran 0,2 µm-Poren (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland)  
 Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  
 PVDF-Membran Immobilon™-P, 0,45 µm-Poren (Millipore, Eschborn, Deutschland)  
 Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht und Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
 Zellkulturmaterial (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

### 2.1.3 Antikörper

New England Biolabs (NEB) (Frankfurt, Deutschland)	p38 MAPK, phospho-p38 MAPK, phospho-c-Jun, phospho-ERK-1/2, I-κB, phospho-I-κB, phospho-MKK-4
BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Deutschland)	c-Raf-1, ERK, MEK-1/2, PKCα, PKCβ
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)	anti-Maus Ig Peroxidase (v. Schaf), anti-Kaninchen Ig Peroxidase (v. Affe)
BD PharMingen (Heidelberg, Deutschland)	anti-MEKK-1-Serum

Kaninchenserum und Maus-IgG<sub>2b</sub> als Isotypkontrollen

### 2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) und Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande) synthetisiert. Die Positionen entsprechen den folgenden Datenbank-Registriernummern:

PKC $\alpha$	X52479
PKC $\beta$ I	X06318-M27545
GAPDH	M17851
IL-2	XM_035511
IFN- $\gamma$	NM_000619

#### PCR-Primer

PKC $\alpha$ sense:	5'-CGA CTG TCT GTA GAA ATC TGG-3'
PKC $\alpha$ antisense:	5'-TAC CAT GGT GCA CTC CAC GTC-3'
PKC $\beta$ I sense:	5'-CTG TGG AAC TGA CCC CCA CTG-3'
PKC $\beta$ I antisense:	5'-ATA CTG AAG CAT TTT GGT ATC-3'
GAPDH sense:	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'
GAPDH antisense:	5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'
IL-2 sense:	5'-ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T-3'
IL-2 antisense:	5'-GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C-3'
IFN- $\gamma$ sense:	5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT-3'
IFN- $\gamma$ antisense:	5'-GAT GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT-3'

#### Antisense-Oligodesoxynukleotide

PKC $\alpha$ -mRNA-antisense:	5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
PKC $\beta$ -mRNA-antisense:	5'-CGC AGC CGG GTC AGC-3'

#### RT-PCR-Primer

Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

### 2.1.5 Enzyme

M-MLV RT, inkl. Puffer und DTT (Gibco BRL Life Technologies, Deutschland)

Ribonuklease-Inhibitor RNaseOut (Gibco BRL Life Technologies, Deutschland)

Taq-Polymerase (QBiogene, Heidelberg, Deutschland)

### 2.1.6 Kits

RNA-Isolierung QIAshredder™ (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

RNeasy®Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

ELISA Interleukin-2, human (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Chemilumineszenz SuperSignal® West Pico-Substrate (Pierce, Rockford, USA)

ECL-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschl.)

### 2.1.7 Chemikalien und Substrate

Agarose, Standard (QBiogene, Heidelberg, Deutschland)

BCA™ Reagenz A (Pierce, Rockford, USA)

β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

BSA (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

DNA-Größenmarker, 100 bp-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

dNTPs (QBiogene, Heidelberg, Deutschland)

Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

GSH-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

GST-c-Jun, Aminosäuren 1 - 89 (New England Biolabs (NEB), Frankfurt, Deutschland)

Laemmli-Puffer Roti®-Load, 4 x konzentriert (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

D-Luziferin, freie Säure (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

PCR-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Protein-Größenmarker LMW, prestained (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

## 2.1.8 Zellen und Medium

### Eukaryontische Zellen

Jurkat T-Zellen

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut, Göttingen)

Stabil transfizierte Jurkat T-Zellen mit dem Reporter gen für Luziferase<sup>149</sup> und

\* NFAT-Bindungsstelle des Interleukin-2-Promotors in vierfacher Kopie oder

\* minimalem Interleukin-2-Promotor

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Schraven, Heidelberg)

### Medium

RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, Deutschland) supplementiert mit

Glutamin, Nichtessentielle Aminosäuren, Penicillin, Pyruvat, Streptomycin  
(alle PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)

Fötales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL Life Technologies, Deutschland)  
(0,1 bis 10 %, 30 Minuten bei 56 °C oder 65 °C hitzeinaktiviert)

### Zellaktivierung

TPA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), Ionomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), OKT3<sup>150</sup> (IgG2a), anti-CD28<sup>151</sup> (IgM) (Hybridomazellen zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Schraven, Heidelberg)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellen und Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurden Jurkat T-Zellen und stabile Transfektanten eingesetzt. Die stabil transfizierten Jurkat T-Zellen tragen Plasmide, bei denen entweder der minimale IL-2-Promotor oder vier Kopien der distalen NFAT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors mit dem Reportergen für das Enzym Luziferase verknüpft sind.

Alle Zelllinien wurden in RPMI (*RPMI 1640, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 x nichtessentielle Aminosäuren*) + 10 % FKS bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellchargen wurden nach 20 Passagen gewechselt.

Jurkat T-Zellen wurden für die Versuche im Anfangsstadium des exponentiellen Wachstums bei 3 bis 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml subkultiviert, bei stabil transfizierten Jurkat T-Zellen waren es 1,5 bis 3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml. Die Vitalität der Zellen wurde durch 1:2-Verdünnung eines Aliquots der Zellsuspension mit 0,08 % (w/v) Trypanblau in PBS überprüft. Nekrotische Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop blau.

#### 2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz wurden 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 900 µl eiskaltem FKS aufgenommen. Nach Kühlung auf Eis über ungefähr 5 Minuten wurden 100 µl Dimethylsulfoxid zupipettiert und die Zellen sehr schnell in Einfrierröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden sofort in einen Einfrierbehälter gestellt und über ca. 24 Stunden bei –80 °C belassen. Die Temperatur sank unter diesen Bedingungen um annähernd 1 °C pro Minute. Danach wurden die Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Einfrierröhrchens sehr schnell in der Hand erwärmt und in 50 ml RPMI + 10 % FKS überführt.

## 2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit spezifischen Antisense-Oligodesoxynukleotiden

Eukaryotische Zellen wurden per Elektroporation transient mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) transfiziert. Die verwendeten Oligonukleotide besitzen eine Sequenz komplementär zur messenger-RNA (mRNA) des Zielproteins, so daß es zur Ausbildung von DNA-RNA-Hybriden kommt. Diese verhindern die Translation der mRNA und unterbinden demzufolge die Neusynthese des betroffenen Proteins. Statt einer Phosphatgruppe trägt jedes Nukleotid eine Phosphothioatgruppe.

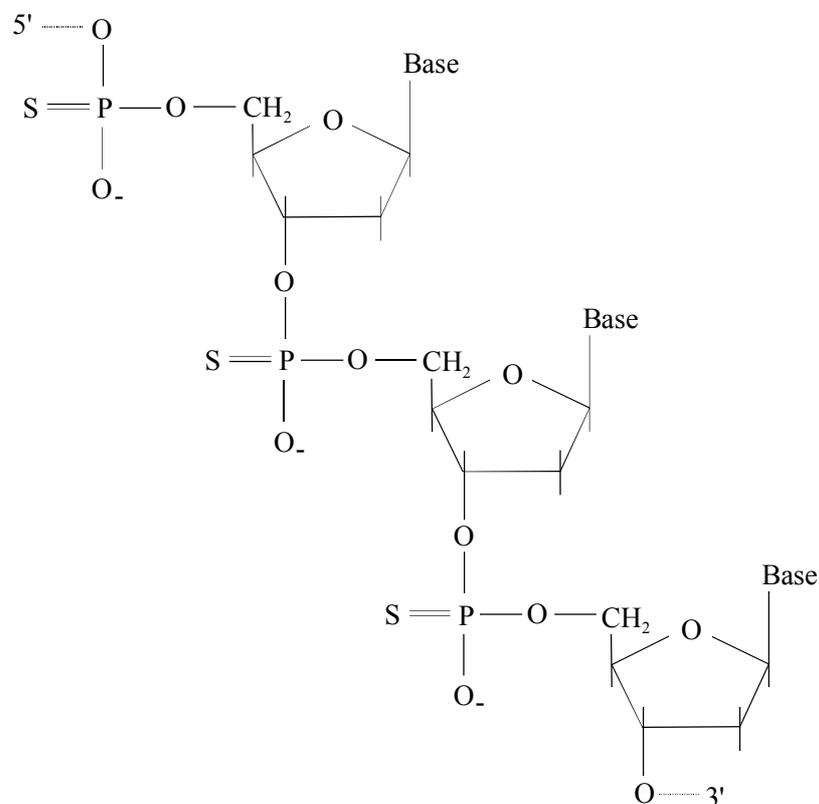


Abbildung 2: Struktur der Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODN)

Die Elektroporation wurde in Gegenwart von FKS durchgeführt, das zuvor 30 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert wurde (gekennzeichnet mit „65 °C h.i.“). Durch diese Behandlung wurden im FKS vorhandene Exonukleasen denaturiert, die eventuell mit der Elektroporation in die Zelle gelangen könnten. Auf diese Weise wurde dem Abbau der Oligonukleotide in der Zelle zusätzlich entgegengewirkt.

Im vorliegenden Fall wurden AS-ODN gegen Proteinkinase C (PKC) -Isoenzyme verwendet. Die endogen vorhandene PKC besitzt eine Halbwertszeit von ca. 24 Stunden. Die Posttransfektionszeit wurde so gewählt, daß einerseits ein nennenswerter Teil des endogenen Proteins abgebaut ist, andererseits aber noch Oligodesoxynukleotide in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden sind. Sie wurde für Jurkat T-Zellen mit 46 bis 50 Stunden gewählt.

### ***2.2.2.1 Transfektion von Jurkat T-Zellen***

Jurkat T-Zellen wurden zweimal in 50 ml raumtemperiertem RPMI 1640 durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur gewaschen. Durch Zugabe von RPMI 1640 mit 1 % FKS (65 °C h. i.) wurde eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 400 µl dieser Zellsuspension, entsprechend  $8 \times 10^6$  Zellen, wurden in sterile 4 mm-Elektroporationsküvetten überführt. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe eines Elektroporation-Impulsgenerators bei 400 Volt über 5 Millisekunden. Die Zellen wurden in Ab- bzw. Anwesenheit von AS-ODN elektroporiert.

Vom PKC $\alpha$ -AS-ODN wurden 68 µg (= 10,6 nmol), vom PKC $\beta$ -AS-ODN 65 µg (= 13,5 nmol) eingesetzt.

Die 400 µl-Ansätze wurden direkt nach der Elektroporation in RPMI + 10 % FKS (65 °C h. i.) überführt. Die Zelldichte wurde auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Nach einer Posttransfektionszeit von 46 bis 50 Stunden wurden die Zellen zwecks Stimulation in RPMI ohne FKS überführt.

### **2.2.2.2 Transfektion von stabil transfizierten Jurkat T-Zellen**

Stabil transfizierte Jurkat T-Zellen wurden wie oben in RPMI 1640 gewaschen. Die Zelldichte in RPMI 1640 zuzüglich 1 % FKS (65 °C h. i.) betrug hier  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. 800 µl Zellsuspension, entsprechend  $8 \times 10^6$  Zellen, wurden in sterile 4 mm-Elektroporationsküvetten überführt. Die Transfektion erfolgte über 5 Millisekunden bei lediglich 350 Volt.

Die Mengen an PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN waren identisch zu den bei den Jurkat T-Zellen verwendeten.

Die 800 µl-Ansätze wurden ebenfalls direkt nach der Elektroporation in RPMI + 10 % FKS (65 °C h. i.) überführt. Die Zelldichte wurde auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml festgelegt und nach einer Posttransfektionszeit von 24 Stunden erneut auf diesen Wert eingestellt. Nach einer Posttransfektionszeit von 34 bis 48 Stunden wurden die Zellen zwecks Stimulation in RPMI ohne FKS überführt.

### **2.2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflußzytometrie im FACS**

Die Verwendung FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierter AS-ODN und die anschließende Analyse der Zellen mittels Durchflußzytometrie im FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) erlaubte die Abschätzung der Transfektionseffizienz. Gleichzeitig konnte der Verbleib der Fluoreszenzmoleküle in den Zellen über den Zeitraum von 48 Stunden nach der Transfektion verfolgt werden.

Bei dieser Methode wird die zu analysierende Zellsuspension über eine Stahlkapillare in die Meßkammer eingebracht. Im Zuge der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt, so daß Aggregate aufgetrennt werden und die Zellen den Analysepunkt einzeln erreichen. Nach Anregung durch einen 15 mW-Argon-Ionen-Laserstrahl bei 488 nm werden die emittierten Signale von einem Detektionssystem empfangen und an den Analysator weitergegeben. Aus der Vorwärtsstreuung des Laserstrahls ist die Zellgröße erkennbar, aus der

Streuung im 90 °-Winkel läßt sich die interne Zellstruktur, d. h. die Granularität, ermitteln. Mit der Durchflußzytometrie ist es möglich, mehr als 10.000 Zellen pro Ansatz im Sekunden- oder unteren Minutenbereich zu analysieren. Damit bestehen entscheidende Vorteile gegenüber der sehr zeitaufwendigen Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop, bei der die Analyse auf 100 bis 200 Zellen pro Ansatz limitiert ist.

Erfolgreich transfizierte Zellen zeichneten sich dadurch aus, daß sie das AS-ODN mit dem daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff FITC aufnahmen. Sie emittierten nach Anregung durch den Laserstrahl grünes Licht mit einem Wellenlängenmaximum von 520 nm.

Zellen wurden analog Kapitel 2.2.2.1 transfiziert. Von den markierten Oligodesoxynukleotiden wurden die gleichen molaren Mengen eingesetzt wie von den nichtmarkierten. Die Zugabe von FITC-PKC $\beta$ -AS-ODN ohne Elektroporation zu einem der Ansätze diente als Maß für unspezifisch aufgenommene Oligodesoxynukleotide. Die Elektroporation mit 44 nmol (= 400  $\mu$ g) FITC-Dextran stellte die Positivkontrolle dar, weil das Molekül eine zu 20-Basen-Oligomeren vergleichbare Größe hat.

Nach Posttransfektionszeiten von 24 und 48 Stunden wurden  $4 \times 10^5$  Zellen aus jedem Ansatz in Reaktionsgefäße überführt und zweimal in PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) + 0,1 % BSA durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 250  $\mu$ l PBS + 0,1 % BSA erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im FACS.

Nach 48 Stunden Posttransfektionszeit wurden die restlichen Zellen wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben lysiert, und die Proteine PKC $\alpha$  sowie PKC $\beta$  über Immunmarkierung nachgewiesen (Kapitel 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.9).

#### **2.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Jurkat T-Zellen**

Jurkat T-Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben transfiziert und zweimal in 10 ml PBS gewaschen.  $4 \times 10^6$  Zellen wurden in 4 ml PBS resuspendiert und 100 bis

1000 µl dieser Suspension wurden in eine 24-well-Platte pipettiert. Zur Fixierung der Zellen wurde die 24-well-Platte 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und das PBS vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Anregung der FITC-markierten AS-ODN erfolgte durch eine Quecksilberlampe und Verwendung eines Filters zwischen 380 und 490 nm. Licht mit Wellenlängen unter 515 nm wurde bei der Betrachtung herausgefiltert.

### 2.2.3 Aktivierung von Jurkat T-Zellen und stabilen Transfektanten

Jurkat T-Zellen und stabile Transfektanten wurden über den TZR/CD3-Komplex und den CD28-Rezeptor (kurz: TZR/CD28) aktiviert.

Die monoklonalen Antikörper OKT3-IgG2a und CD28-IgM wurden aus Zellüberständen der Kultivierung der jeweiligen Hybridome gewonnen. OKT3 wurde mit Protein A-Sepharose über Affinitätschromatographie konzentriert und aufgereinigt.<sup>125</sup> Die finale Konzentration bei der Aktivierung betrug 2,5 µg/ml. αCD28 wurde wie beschrieben eingesetzt.<sup>151</sup> Die dadurch bedingte finale Konzentration von 2 % FKS wurde in den Kontrollen entsprechend angeglichen.

Der an die ε-Kette des TZR/CD3-Komplexes bindende OKT3 und CD28-IgM quervernetzen und aktivieren so Jurkat T-Zellen und ihre stabilen Transfektanten.<sup>152</sup>

Parallel erfolgte in einigen Fällen die Aktivierung mit TPA/Ionomycin (10 bzw. 500 ng/ml) oder mit TPA (2,5 ng/ml)/OKT3/αCD28.

Vor der Aktivierung wurden die Zellen in einer Dichte von 10<sup>6</sup> Zellen pro ml in FKS-reduziertes oder -freies Medium umgesetzt. Erfolgte die Inkubation über Nacht, wurde dem Medium FKS in einer Konzentration von 0,1 % zugesetzt. Elektroporierten Zellen wurde das FKS nach Ablauf der Posttransfektionszeit und vor der Aktivierung gänzlich entzogen, allerdings nur für eine Dauer von 1 bis 2 Stunden.

Die Dauer der Aktivierung stand in Abhängigkeit von der Zielsetzung des Versuches. Ihr Abbruch erfolgte durch Überführung der Zellen auf Eis.

## 2.2.4 Herstellung subzellulärer Fraktionen

### 2.2.4.1 Gewinnung zytosolischer Proteine

Jurkat T-Zellen wurden zur Aufarbeitung zweimal in 50 ml 4 °C kaltem PBS durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 300 x g gewaschen.  $10^7$  Zellen wurden in 100 µl eines hypotonen Puffers (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 µg/ml Leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 400 nM Okadainsäure, pH 7,4) gut resuspendiert. Nach Inkubation über 2 Minuten folgte eine Ultraschallbehandlung mit 3 Impulsen von je 50 Watt.

Nach Zentrifugation über 10 Minuten bei 2.400 x g und 4 °C befanden sich die Kerne im Sediment. Der kernfreie Überstand wurde durch Ultrazentrifugation über 30 Minuten bei 100.000 x g und 4 °C in zytosolische Proteine und Membranpartikel getrennt.

Zytosolische Proteine wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei – 80 °C gelagert.

### 2.2.4.2 Herstellung kernfreier Lysate

Jurkat T-Zellen und stabil transfizierte Zellen wurden wie oben in 4 °C kaltem PBS gewaschen. Pro  $10^7$  Zellen wurden 100 µl Lysepuffer (10 mM TRIS/HCl, 30 mM Natriumpyrophosphat, 50 mM NaCl, 5 mM NaF, 20 mM β-Glyzerophosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 400 nM Okadainsäure, 500 µM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 500 ng/ml Pepstatin, 10 mM para-Nitrophenylphosphat, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100, pH 7,4) zugegeben, resuspendiert und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der Überstand nach 10 Minuten Zentrifugation bei 6.600 x g und 4 °C enthielt die kernfreien Lysate.

Bei dieser Aufarbeitung wurden in der Regel zwei- bis dreifach höhere Proteinkonzentrationen als in den zytosolischen Fraktionen erhalten. Die kernfreien Lysate wurden ebenfalls bei – 80 °C gelagert.

### 2.2.5 Immunpräzipitation

Jurkat T-Zellen wurden für die in den Experimenten angegebenen Zeiten mit der Kombination OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA oder TPA/Ionomycin stimuliert. Es folgte zweimaliges Waschen (300 x g, 5 Minuten) in 50 ml 4 °C kaltem PBS.  $10^7$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l Immunpräzipitationspuffer (50 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g/ml Leupeptin, 20 mM NaF, 400 nM Okadainsäure, pH 7,4) gut resuspendiert. Nach Inkubation über 2 Minuten folgte eine Ultraschallbehandlung mit zweimal 5 Impulsen von je 50 Watt.

Durch Zentrifugation über 10 Minuten bei 2.400 x g und 4 °C wurden kernfreie Überstände gewonnen. Diese wurden einer Ultrazentrifugation über 30 Minuten bei 100.000 x g und 4 °C unterworfen. Die neuerlich erhaltenen Überstände enthielten zytosolisches Protein. Die Membranpartikel im Sediment wurden in 200  $\mu$ l Immunpräzipitationspuffer resuspendiert.

Membranprotein aus jeder Probe wurde mit Immunpräzipitationspuffer auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. 50  $\mu$ l Protein G-Sepharose wurden zupipettiert und 1 Stunde bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation über 1 Minute bei 11.200 x g wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 1  $\mu$ g Antikörper pro mg Protein versetzt und über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden erneut 50  $\mu$ l Protein G-Sepharose dazugegeben und das Ganze für weitere 4 Stunden bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die Protein G-Sepharose wurde fünfmal mit Immunpräzipitationspuffer + 1 % (v/v) Triton X-100 gewaschen (11.200 x g, 1 Minute, Raumtemperatur). Nach einem letzten Waschschrift in Immunpräzipitationspuffer ohne Triton X-100 und Entfernen aller Pufferreste wurde sie in 40  $\mu$ l Laemmli-Puffer aufgenommen. Sepharose und Protein wurden durch Erhitzen auf 95 °C über 5 Minuten und anschließende Zentrifugation (11.200 x g, 1 Minute, Raumtemperatur) getrennt. Das im Überstand erhaltene Protein wurde in einem 10 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe der *Semidry*-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Koimmunpräzipitiertes Protein wurde in der anschließenden Immunmarkierung mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen.

### 2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte kolorimetrisch mit BCA (4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin)-Reagenz in einem  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigen alkalischen System (pH 11,25). Von Peptidbindungen des Proteins sowie den Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin wird  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches daraufhin mit zwei BCA-Molekülen komplexiert. Es resultiert ein Farbumschlag von grün zu violett. Die Farbentwicklung ist stabil und nahezu zeitunabhängig. Für BSA besteht über den Bereich von 0,5 bis 2000  $\mu\text{g/ml}$  ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Extinktion bei 562 nm.

Die Methode mit BCA ist unempfindlich gegenüber den meisten bei einer Probenaufarbeitung verwendeten Pufferbestandteilen. So bleiben Detergenzien auch in Konzentrationen von 1 % ohne Einfluß. Chelate wie EDTA und EGTA dagegen komplexieren  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und minimieren dadurch den Farbumschlag zu violett. Das reduzierende Agens DTT stört ebenfalls. Standards und Proben enthielten daher alle Pufferkomponenten in der gleichen finalen Konzentration, um die genannten Effekte zu egalisieren.

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration sollte lediglich gewährleistet werden, daß für die Versuche aus allen Proben gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Die absoluten Proteinkonzentrationen waren nicht von Interesse, so daß bei der Bestimmung darauf verzichtet werden konnte, störende Substanzen wie Peptide oder Aminosäuren zu entfernen.

Alle Proben wurden vor der Konzentrationsbestimmung 1:10 in  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt. Die BSA-Standards wurden in 1:10-verdünntem Probenpuffer der jeweiligen Aufarbeitungsart angesetzt. Ihre finalen Konzentrationen betragen 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Als Leerwert diente 1:10-verdünnter Probenpuffer.

Dreifachwerte mit 10  $\mu\text{l}$  Probenverdünnung oder Standard wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt. 200  $\mu\text{l}$  einer BCA-Gebrauchslösung aus 50 Teilen BCA-Lösung und 1 Teil  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (4 %) wurden zu allen Proben pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Standardkurve aus der Auftragung Extinktion versus Proteinkonzentration diente der automatisierten Berechnung der Probenkonzentrationen.

### 2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die aus subzellulären Fraktionen gewonnenen Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Sie konnten nach dem Transfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen über eine Immunmarkierung nachgewiesen werden.

Polyacrylamidgele entstehen durch die Vinyl-Polymerisation von Acrylamidmonomeren in lange Ketten und ihre Quervernetzung durch Bisacrylamidmonomere. Das Verhältnis zwischen beiden Substanzen und ihr relativer Anteil am Gesamtvolumen bestimmen physikalische Eigenschaften des Gels wie die Porengröße und die Dichte. Der Zusatz von SDS schafft eine Beziehung zwischen dem apparenten Molekulargewicht der Proteine und ihrer Laufstrecke im Gel: Das negativ geladene SDS-Molekül bindet in Abhängigkeit von der Zahl der Peptidbindungen, aber nahezu unabhängig von der Sequenz, an die Proteine und bestimmt so deren Laufverhalten im Spannungsfeld des Gels. Da nicht nur die Größe des Proteins allein, sondern auch seine Konformation eine Rolle spielt, wird vom apparenten Molekulargewicht gesprochen. Vergleichssubstanzen mit definiertem apparenten Molekulargewicht dienen der Größenbestimmung und damit Identifizierung der untersuchten Proteine. Die Polymerisation wurde durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat initiiert; TEMED diente als Stabilisator der intermediären Radikale.

Acrylamid und Bisacrylamid wurden stets im Verhältnis 37,5:1 eingesetzt. Ihr relativer Anteil am Gesamtvolumen war jeweils umgekehrt proportional zur Größe der untersuchten Proteine und betrug bezüglich des Acrylamids 8, 10 oder 12,5 %. Durch diese variierenden Gelkonzentrationen sollte immer eine optimale Bandenschärfe im untersuchten Molekulargewichtsbereich erreicht werden. Die Gele enthielten zusätzlich Glycerin, jeweils in der gleichen Konzentration wie Acrylamid. Das Trenngel (*Acrylamid, Bisacrylamid, Glycerin, 0,1 % SDS, 0,15 % TEMED, 0,12 % Ammoniumpersulfat, 375 mM TRIS/HCl pH 8,8*) wurde zur Fokussierung des Probenvolumens und damit der Proteinbanden von einem Sammelgel (*5 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 5 % Glycerin, 0,1 % SDS, 0,15 % TEMED, 0,12 % Ammoniumpersulfat, 62,5 mM TRIS/HCl pH 6,8*) überschichtet. Es wurde ein vertikales Gelelektrophorese-System verwendet.

Den Proben eines Versuchsansatzes wurden jeweils definierte Proteinmengen entnommen und mit ddH<sub>2</sub>O auf das gleiche Volumen von mindestens 21 µl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 1/4 Volumen vierfach konzentriertem Laemmli-Puffer bezogen auf das Endvolumen (*final einfache Konzentration*).

Der Laemmli-Puffer enthielt β-Mercaptoethanol und DTT zur Reduktion von Disulfidbrücken zwischen Proteinuntereinheiten. Das ebenfalls enthaltene anionische Detergenz SDS bindet an die denaturierten Polypeptide und liefert die negative Ladung.

Die Proteine wurden für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, 1 Minute bei 11.200 x g zentrifugiert und in die Taschen des SDS-Gels geladen. Der Gellauf wurde in Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS) bei konstanter Stromstärke von 30 Milliampère im Sammelgel und 40 Milliampère im Trenngel oder alternativ bei durchgehend 5 Milliampère über Nacht durchgeführt.

### 2.2.8 Proteintransfer auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes vom Gel auf eine Membran transferiert. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große, so daß die Transferbedingungen auf das gewünschte Protein abgestimmt werden mußten.

Bei der sogenannten *Semidry*-Methode liegen Gel und Membran zwischen puffergetränkten Filterpapieren. Der Aufbau selbst ist nicht von Puffer umgeben, daher der Name *Semidry* („halbtrocken“). Die Spannung wird durch zwei außen angelegte Elektrodenplatten erzeugt. Die negative Ladung des noch immer gebundenen SDS sorgt für die Wanderung der Proteine in Richtung anodisch gelegener Membran. Anschließend können die auf den Membranen immobilisierten Proteine in einer Immunmarkierung nachgewiesen werden.

Der Proteintransfer erfolgte gewöhnlich auf Nitrozellulose-Membranen in einem kontinuierlichen Puffersystem (25 mM TRIS, 192 mM Glyzin, 10 % Methanol). Die Apparatur umfaßte eine aus rostfreiem Stahl gefertigte Kathode und eine aus platinumhülltem Titan bestehende Anode. Die Proteine wurden bei konstanter Stromstärke transferiert. Bei

Nitrozellulose-Membranen wurden 2 Milliampère pro cm<sup>2</sup> Fläche über einen Zeitraum von 60 Minuten angelegt, bei PVDF-Membranen waren es 1,5 Milliampère pro cm<sup>2</sup> über 90 Minuten. Durch die gewählte Ionenstärke des Puffers blieb die Spannung während des Transfers niedrig. Dadurch wurde eine Überhitzung des Systems vermieden, und es war keine externe Kühlung der Apparatur notwendig. PVDF-Membranen zeigten eine größere Bindungskapazität und wurden verwendet, wenn eine verstärkte Sensitivität – d. h. ein höheres Signal-Hintergrund-Verhältnis - obligat war. Aufgrund ihrer Hydrophobizität mußten sie entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt werden.

### 2.2.9 Immunmarkierung von immobilisierten Proteinen

Proteine wurden durch den Transfer auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen immobilisiert und anschließend über spezifische Antikörper nachgewiesen.

Bei diesem Verfahren wurde nach Absättigung unspezifischer Bindungen ein primärer Antikörper eingesetzt, der gegen das gewünschte Protein gerichtet war. An diesen primären Antikörper band im nächsten Schritt ein sekundärer, peroxidasegekoppelter Antikörper. Schließlich wurde in einer Nachweisreaktion ein Substrat zugegeben, das von der Peroxidase umgesetzt wurde und das bei diesem Prozeß Licht definierter Wellenlänge (425 nm) emittierte. Auf Röntgenfilmen wurden die ausgesendeten Lichtsignale sichtbar gemacht.

Nitrozellulose- und PVDF-Membranen wurden nach dem *Semidry*-Transfer 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,6, 5 % Trockenmilch) inkubiert. Dieser und alle folgenden Schritte wurden unter Schütteln durchgeführt. Der Puffer wurde entfernt und es wurde 6 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS-T (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,6) gewaschen. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen unter obigen Bedingungen wurde der sekundäre Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die letzten Waschschrte wurden mit TBS durchgeführt (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, pH 7,6).

Für primäre und sekundäre Antikörper wurden Konzentration und Art des Verdünnungspuffers individuell ausgetestet. Die Herstellerangaben dienten dabei als Richtwerte. Die Lösungen der primären Antikörper wurden mit 5 mM Natriumazid versetzt und mehrmals verwendet, die der sekundären Antikörper wurden nach einmaliger Verwendung verworfen. Der Substratumsatz wurde über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Die Durchführung entsprach den jeweiligen Angaben der Hersteller.

Membranen wurden oftmals zum Nachweis mehrerer verschiedener Proteine verwendet. Die vorhergehenden Antikörperbindungen wurden durch Schütteln der Membran über 15 Minuten bei Raumtemperatur in azidem Puffer (25 mM Glyzin, 1 % SDS, pH 2) gelöst. Bei hochaffinen Protein-Antikörper-Bindungen wurde die Inkubationszeit auf bis zu 60 Minuten verlängert und/oder die Temperatur auf 60 °C erhöht. Nach zweimaligem Waschen über 10 Minuten bei Raumtemperatur in TBS-T, wurde wieder mit dem Blocken unspezifischer Bindungen begonnen.

Die Membranen wurden optional mit Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau-S, 5 % CH<sub>3</sub>COOH) gefärbt, um die Gleichmäßigkeit der Proteinladung zu überprüfen. Die Entfärbung erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.10 Aktivitätsbestimmung der JNK

Die Phosphorylierung des rekombinanten Substrates c-Jun diente als Maß für die Aktivität der JNK. Um von der Phosphorylierung endogenen c-Jun-Proteins abgrenzen zu können, wurde GST (Glutathion S-Transferase)-gekoppeltes rekombinantes c-Jun-Substrat verwendet. Es bindet an GSH (Glutathion)-Sephrose und kann über Zentrifugation von dem löslichen endogenen c-Jun abgetrennt werden. Der Nachweis erfolgte über Immunmarkierung mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes c-Jun.

50 µg zytosolisches Protein aus jeder Probe wurden, wenn möglich, in 25 µl des hypotonen Aufarbeitungspuffers aufgenommen und mit dem gleichen Volumen aus zweifach konzentriertem Kinasepuffer (final 50 mM TRIS/HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6), 1,5 µg

GST-c-Jun und 5  $\mu\text{M}$  ATP versetzt. Bei Proteinkonzentrationen unter 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in einer oder mehreren Proben wurden die 50  $\mu\text{g}$  zytosolisches Protein aller Proben jeweils mit hypotonem Puffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Die Mengen an zweifach konzentriertem Kinasepuffer und ATP wurden in diesem Fall entsprechend angepaßt, während die Menge an GST-c-Jun unverändert blieb. Die Phosphorylierungsreaktion erstreckte sich über 20 Minuten bei 37 °C. Die GSH-Sepharose wurde dreimal in 1 ml Kinasepuffer zuzüglich 1 mM DTT durch Zentrifugation über 1 Minute bei 11.200 x g und Raumtemperatur gewaschen, um Disulfidbrücken zu trennen. 25  $\mu\text{l}$  dieser GSH-Sepharose wurden mit den Proben gemischt und 30 Minuten bei 30 °C und 1200 Umdrehungen pro Minute im Thermomixer geschüttelt, um eine Bindung an das GST-c-Jun zu ermöglichen.

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Proben 1 Minute bei 11.200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die GSH-Sepharose wurde dreimal unter den gleichen Bedingungen mit 250  $\mu\text{l}$  Kinasepuffer zuzüglich 1 % Triton X-100 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden alle Pufferreste entfernt und die GSH-Sepharose zur Abtrennung des c-Jun-Substrates 10 Minuten bei 95 °C in 50  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer erhitzt. 45  $\mu\text{l}$  des Überstandes nach Zentrifugation (1 Minute bei 11.200 x g) wurden in einem 12,5 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe der *Semidry*-Methode auf eine PVDF-Membran transferiert. Phosphoryliertes c-Jun wurde in der sich anschließenden Immunmarkierung mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen.

### **2.2.11 Luziferaseaktivitätsbestimmung in stabil transfizierten Jurkat T-Zellen**

Bei den beiden zur Verfügung stehenden stabil transfizierten Jurkat T-Zellen war ein für das Enzym Luziferase kodierendes Reporter gen entweder mit dem minimalen IL-2-Promotor oder mit der distalen NFAT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors in vierfacher Kopie verknüpft. Die gemessene Luziferaseaktivität war ein Maß für die Transkriptionsaktivität der genannten Promotorsequenzen.

Nach Ablauf der Posttransfektionszeit (Kapitel 2.2.2.2) wurden in Doppelbestimmungen  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in 1,5 ml serumfreiem Medium aufgenommen, in eine 24-well-Platte überführt und 1 Stunde später mit OKT3/ $\alpha$ CD28 oder TPA/Ionomycin aktiviert. Bei den Transfektanten mit minimalem IL-2-Promotor betrug die Posttransfektionszeit ca. 42 Stunden und die Dauer der Aktivierung 6 Stunden, während es bei Zellen mit NFAT-Bindungsstelle ca. 34 Stunden Posttransfektionszeit und 14 Stunden Aktivierung waren.

Die Aktivierung wurde durch Zentrifugation der Zellen bei 300 x g und 4 °C über 5 Minuten und zweimaliges Waschen mit PBS in der 24-well-Platte beendet. Die Zellen wurden durch 15-minütige Inkubation in 100  $\mu$ l Luziferase-Lysepuffer (91,5 mM  $K_2HPO_4$ , 8,5 mM  $KH_2PO_4$ , 500  $\mu$ M PMSF, 2,5  $\mu$ g/ml Leupeptin, 700 ng/ml Pepstain, 0,2 % Triton X-100) bei 4 °C aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 6.600 x g und 4 °C über 10 Minuten abgetrennt. 15  $\mu$ l des Überstandes dienen der sofortigen Messung der Luziferaseaktivität in Luziferasepuffer (20 mM Tricin, 1,07 mM  $(MgCO_3)_4 \times Mg(OH)_2 \times 5 H_2O$ , 2,67 mM  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 100  $\mu$ M EDTA, 33,3 mM DTT, 530  $\mu$ M ATP, 270  $\mu$ M Coenzym A, 460  $\mu$ M D-Luziferin, pH 7,8). Mit Hilfe der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Kapitel 2.2.6 wurden die gemessenen relativen Lichteinheiten auf die Menge eingesetzten Proteins normiert.

### **2.2.12 Nachweis von spezifischer mRNA aus Jurkat T-Zellen durch PCR-gestützte Techniken**

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde durch Verwendung eines Oligo(dT)-Primers gezielt der Anteil an mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, der eine Poly(A)-Sequenz besitzt. Als Enzym diente die RNA-abhängige DNA-Polymerase M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase). Die cDNA wurde anschließend in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Das zwischen zwei spezifischen Amplifikationsprimern gelegene DNA-Teilstück wurde durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) vervielfältigt.<sup>153</sup> Die DNA-

Elektrophorese in einem Agarosegel wurde genutzt, um die Größe der je nach Primerpaar erhaltenen PCR-Produkte zu verifizieren, die Integrität und Qualität der DNA-Proben zu prüfen und schließlich die PCR-Produkte densitometrisch zu quantifizieren.

Wegen des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen mRNA und synthetisierter cDNA sind ausgehend von der Menge der späteren PCR-Produkte Rückschlüsse auf die relative Höhe der mRNA-Expression in den Proben möglich.

### **2.2.12.1 RNA-Isolierung**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden 5 Minuten bei  $300 \times g$  zentrifugiert und sämtlicher Überstand entfernt. Die RNA wurde durch Immobilisierung an einer speziellen Silikamembran (RNeasy RNA-Isolierungskit, QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Mit diesem Verfahren können bis zu  $100 \mu\text{g}$  RNA einer Länge von mehr als 200 Basen isoliert werden. Es kommt nicht zu einer quantitativen Bindung von 5,8 S rRNA, 5 S rRNA, tRNA sowie niedermolekularer mRNA. Die Homogenisierung des Lysats erfolgte unter Zuhilfenahme einer Säule mit biopolymerem Shreddingsystem (QIAshredder™, QIAGEN) laut Herstellerangaben.

Die Gesamt-RNA wurde photometrisch quantifiziert. Bei neutralem pH-Wert und Absorptionwerten von über 0,15 existiert eine lineare Beziehung zwischen Absorption bei 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) und RNA-Konzentration. Bei  $A_{260\text{nm}} = 1$  liegt eine RNA-Konzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  vor. Vor diesem Hintergrund wurden alle Proben 1:100 in ddH<sub>2</sub>O (pH 7) verdünnt und die RNA-Konzentrationen berechnet.

### **2.2.12.2 cDNA-Synthese (RT-PCR)**

Die Synthese der cDNA wurde von der DNA-Polymerase M-MLV RT katalysiert. Das Enzym verwendet einzelsträngige RNA oder DNA als Vorlage und synthetisiert in der Gegenwart eines Primers den komplementären DNA-Strang. Das rekombinante Enzym

stammt aus transfizierten *Escherichia coli*, die Plasmid tragen, das für einen Teil des M-MLV-*pol*-Gens kodiert.<sup>154</sup> Es ist geeignet, Erststrang-cDNA bis zu einer Größe von 7 Kilobasen zu synthetisieren.

Um dem Abbau von RNA vorzubeugen, wurde die Reaktion in Gegenwart eines rekombinanten RNase (Ribonuklease)-Inhibitors durchgeführt. Der verwendete Inhibitor, ein azides Protein mit einem Molekulargewicht von 52 kDa, formt 1:1-Komplexe hoher Bindungsaffinität zu RNasen des Pankreastyps. Er richtet sich gegen RNase A, B und C, beeinflusst dagegen nicht RNase 1, T1, T2, S1-Nuklease und RNase H. Eine Unit (U) RNase-Inhibitor ist definiert als die Menge, die die Aktivität von 5 ng RNase A um 50 % reduziert.

Die cDNA wurde in einem Puffersystem mit 50 mM TRIS/HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM DTT pH 8,3 synthetisiert. Der 20 µl-Reaktionsansatz umfaßte 3 µg Gesamt-RNA, 500 ng Oligo(dT)<sub>12-18</sub> als Primer, 40 U RNase-Inhibitor, je 10 nmol der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 200 U M-MLV RT.

Gesamt-RNA, Primer und Desoxynukleotide wurden für 5 Minuten bei 65 °C erhitzt und die Mischung direkt anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von fünffach konzentriertem Puffer und RNase-Inhibitor wurde zunächst 2 Minuten, nach Zugabe von M-MLV RT weitere 50 Minuten bei 37 °C inkubiert. Erhitzen auf 95 °C für 15 Minuten beendete die Reaktion. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 2 µl der cDNA für die anschließende PCR eingesetzt. Verbleibende Gesamt-RNA und cDNA wurden bei – 80 °C gelagert.

### **2.2.12.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Durch den zyklischen Ablauf definierter Temperaturprofile wird die cDNA in der PCR amplifiziert. Jeder Zyklus umfaßt die drei Schritte Denaturierung, Primeranlagerung („*Annealing*“) und Primerverlängerung („*Elongation*“). Bei dem verwendeten PCR-Gerät wurde die jeweilige Proben temperatur durch Automatisierung der mechanischen Handhabung zwischen verschiedenen temperierten Blöcken erreicht. Darüber hinaus bestand bei diesem Gerät die Möglichkeit, durch Wahl eines Gradienten mehrere verschie-

dene Anlagerungstemperaturen gleichzeitig in einer PCR-Reaktion einzustellen. Die integrierte Deckelheizung machte ein Überschichten der Proben mit Mineralöl überflüssig.

Die Denaturierung bei 94 °C führte zur Auftrennung sämtlicher doppelsträngiger Nukleotidbereiche.

Durch Senkung der Temperatur auf ein Optimum für die Primeranlagerung bildeten sich Hybride zwischen DNA und Oligonukleotiden aus. Als Primer wurden spezifische Sequenzen aus der zu untersuchenden mRNA ausgewählt. Sie umschlossen nicht die gesamte cDNA-Sequenz, sondern nur ein Teilstück von 300 - 600 Basen. Nur dieses Teilstück wurde bei der PCR exponentiell amplifiziert. In Tabelle 1 sind neben der Primersequenz auch die Temperaturen für die Primeranlagerung und die Größe der resultierenden PCR-Fragmente angegeben. Die vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen der kommerziell erworbenen Primer wurden bei Bedarf auf das verwendete Puffersystem umgerechnet.<sup>155</sup>

mRNA	Primer: Sequenz 5'→3'	Datenbank- Registriernummer und Primerposition	Anlage- rungs- temperatur	PCR- Fragment größe
PKC $\alpha$	s: CGA CTG TCT GTA GAA ATC TGG as: TAC CAT GGT GCA CTC CAC GTC	<b>X52479</b> 742-762 1185-1165	58 °C	443
PKC $\beta$ I	s: CTG TGG AAC TGA CCC CCA CTG as: ATA CTG AAG CAT TTT GGT ATC	<b>X06318 M27545</b> 2049-2069 2460-2430	56 °C	401
GAPDH	s: CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA as: TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC	<b>M17851</b> 185-208 782-759	58 °C	598
IL-2	s: ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T as: GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	<b>XM_035511</b> 48-72 505-481	60 °C	457
IFN- $\gamma$	s: ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT as: GAT GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT	<b>NM_000619</b> 109-137 602-577	60 °C	501

**Tabelle 1: Primer und Fragmente bei der PCR**

(s = sense: kodierender Strang; as = antisense: nichtkodierender, zur mRNA komplementärer Strang)

Nach der Primeranlagerung wurde die Temperatur auf 72 °C erhöht – das Optimum für die *Taq*-Polymerase, die mit der Verlängerung (Elongation) der Primer begann. Die verwendete *Taq*-Polymerase ist eine rekombinante thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie besitzt neben der 5'→3'-Polymerase-Aktivität eine 5'→3', aber keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. An das 3'-OH-Ende der Primer wurden die zugesetzten Mononukleotide entsprechend der komplementären DNA-Sequenz angefügt. Die *Taq*-Polymerase überdauert aufgrund ihrer Hitzestabilität die Denaturierung bei 94 °C in jedem Zyklus, so daß nur eine einmalige Zugabe zu Beginn der PCR erforderlich war. Bei 95 °C beträgt die Halbwertszeit der Enzymaktivität 40 Minuten. Die maximale Synthesegeschwindigkeit beläuft sich bei 72 °C auf 4000 Nukleotide pro Minute.

Am Ende des Elongationsschrittes liegen alle DNA-Moleküle als Doppelstränge vor. Sie werden beim Denaturierungsschritt des nächsten Zyklus wieder getrennt, usw.

Der verwendete Puffer enthielt 10 mM TRIS/HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,8 % Nonidet P40 bei einem pH-Wert von 8,8. Die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM wurde empirisch bestimmt. Der 50 µl-Reaktionsansatz umfaßte 2 µl der unter 2.2.12.2 hergestellten cDNA, je 10 pmol der beiden Amplifikationsprimer sense und antisense, je 10 nmol der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 1 U *Taq*-Polymerase. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt über 5 Minuten bei 94 °C. Jeder der darauffolgenden 30 Zyklen bestand aus 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute Anlagerung (Temperaturen siehe Tabelle 1) und 1 Minute Elongation bei 72 °C. Optional wurde die Elongation weitere 10 Minuten bei 72 °C fortgeführt, um sämtliche PCR-Produkte durch die *Taq*-Polymerase zu vervollständigen.

#### **2.2.12.4 Elektrophorese im Agarosegel**

Die DNA-Elektrophorese wurde genutzt, um die Größe der erhaltenen PCR-Produkte zu verifizieren. Gleichzeitig kann durch die Darstellung im Elektrophoresegel die Integrität und Qualität der DNA-Proben überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen. Der dem Gel zugesetzte Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, diente ihrer Sichtbarmachung. Er wird

durch UV-Bestrahlung bei 312 nm angeregt und bei einem Absorptionsmaximum von 516 bis 518 nm nachgewiesen.<sup>156</sup>

Die Proben des PCR-Laufes wurden mit entsprechenden Volumina eines sechsfach konzentrierten DNA-Auftragspuffers (50 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und in einem horizontalen Agarosegel (1,7 % (w/v) Standard-Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 40 mM TRIS/CH<sub>3</sub>COOH, 1 mM EDTA, pH 8) aufgetrennt. Kommerziell erhältliche Größenmarker dienen der Identifizierung der PCR-Fragmente.

Der Geldokumentation diene das GelDoc1000-System von Bio-Rad mit Transilluminator, Kamera und Auswertesoftware. Wie in Kapitel 2.2.12.3 erwähnt, wird in der PCR nicht die gesamte cDNA amplifiziert, sondern nur das zwischen den beiden Amplifikationsprimern gelegene Teilstück. Der Abstand der beiden Primer voneinander und ihre Länge summiert sich zur Größe des PCR-Fragments. Diese ist in Tabelle 1 für die gewählten Primer angegeben.

### **2.2.12.5 Semiquantitative PCR**

Jeder synthetisierte DNA-Strang dient im nächsten Zyklus selbst als Matrize. Die Zahl der PCR-Fragmente steigt somit streng exponentiell an. Theoretisch kann aufgrund dieser Korrelation in einer quantitativen Analyse von der Zahl der final vorhandenen PCR-Fragmente auf die ursprüngliche Menge an cDNA und damit an mRNA geschlossen werden. Es ist jedoch zu beachten, daß das exponentielle Wachstum gegen Ende der PCR in einen Sättigungsbereich gelangt, somit kein strenger Zusammenhang mehr zwischen der Zahl der PCR-Fragmente und der mRNA-Moleküle besteht. Dafür gibt es mehrere Gründe:

Nur bei einer – in der Praxis nicht vorhandenen – hundertprozentigen Ausbeute in jedem Zyklus wird die Zahl der PCR-Fragmente wirklich verdoppelt. Nach ca. 30 Zyklen kommt es daneben zu einer Hybridisierung der PCR-Fragmente untereinander. Diese Reaktion tritt somit in Konkurrenz zu der gewünschten Anlagerung der Primer an die PCR-Fragmente. Der molare Überschuß an PCR-Fragmenten bewirkt darüber hinaus, daß die Enzymmenge zum begrenzenden Faktor wird. Gleichzeitig sinkt die Enzymakti-

vität in jedem Zyklus, und nach 40 Minuten bei 95 °C sind - wie oben erwähnt - nur noch 50 % der Aktivität vorhanden. Folglich ist meist nur eine semiquantitative Auswertung von PCR-Ergebnissen möglich und die Zahl der Zyklen sollte nach Meinung vieler Autoren 30 nicht übersteigen. Bei einer geringen Ausgangszahl von cDNA-Molekülen ist die Amplifizierung in der PCR allerdings über diese Zyklenzahl hinaus noch exponentiell.<sup>157</sup>

Zu Beginn der Arbeiten wurde getestet, bei welchen Zyklenzahlen eine quantitative Analyse der PCR möglich ist, ohne in den Sättigungsbereich der PCR zu gelangen (vgl. Kapitel 3.6).

### 2.2.13 Bestimmung der Interleukin-2-Sekretion im ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist eine Methode zur spezifischen und sensitiven Bestimmung von Antigenkonzentrationen, die sich auf die Verwendung enzymkonjugierter Antikörper stützt.

Die spezifische Detektion und Quantifizierung von löslichen Zytokinen erfolgt häufig über den sogenannten „Sandwich“-ELISA. Das Prinzip stellt sich wie folgt dar: Zunächst werden gegen das Zytokin gerichtete Antikörper (*capture antibody*) nichtkovalent auf eine Mikrowellplatte adsorbiert. Diese immobilisierten Antikörper binden die löslichen Zytokinmoleküle (IL-2) der zugegebenen Probe. Ein biotinylierter Antikörper (*detection antibody*) erkennt das derart gebundene Zytokin über ein anderes Epitop und wird über seinen Biotinrest mit einem Streptavidin-Peroxidase-gekoppelten Antikörper verbunden. Die Peroxidase setzt in einer Farbreaktion ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltiges Substrat um. Nach Beendigung der Reaktion wird die Extinktion bei 450 nm gemessen und die Zytokinkonzentration anhand der mitgeführten Standards berechnet.

10<sup>6</sup> Jurkat T-Zellen wurden in Doppelbestimmung nach Ablauf der Posttransfektionszeit in 1 ml Medium + 2 % FKS aufgenommen. Nach dem Überführen der Ansätze in eine 24-well-Platte schloß sich eine Zellaktivierung über 16 Stunden mit OKT3/CD28 oder TPA/Ionomycin in den üblichen Konzentrationen an. Die Zellüberstände wurden danach durch Zentrifugation bei 300 x g über 5 Minuten gewonnen und ihre IL-2-Konzentration

im ELISA bestimmt. Der ELISA wurde in einer 96-well-Platte nach Herstellervorschrift durchgeführt. Der Standard wurde wie die Proben in Medium + 2 % FKS angesetzt.

### 3 ERGEBNISSE

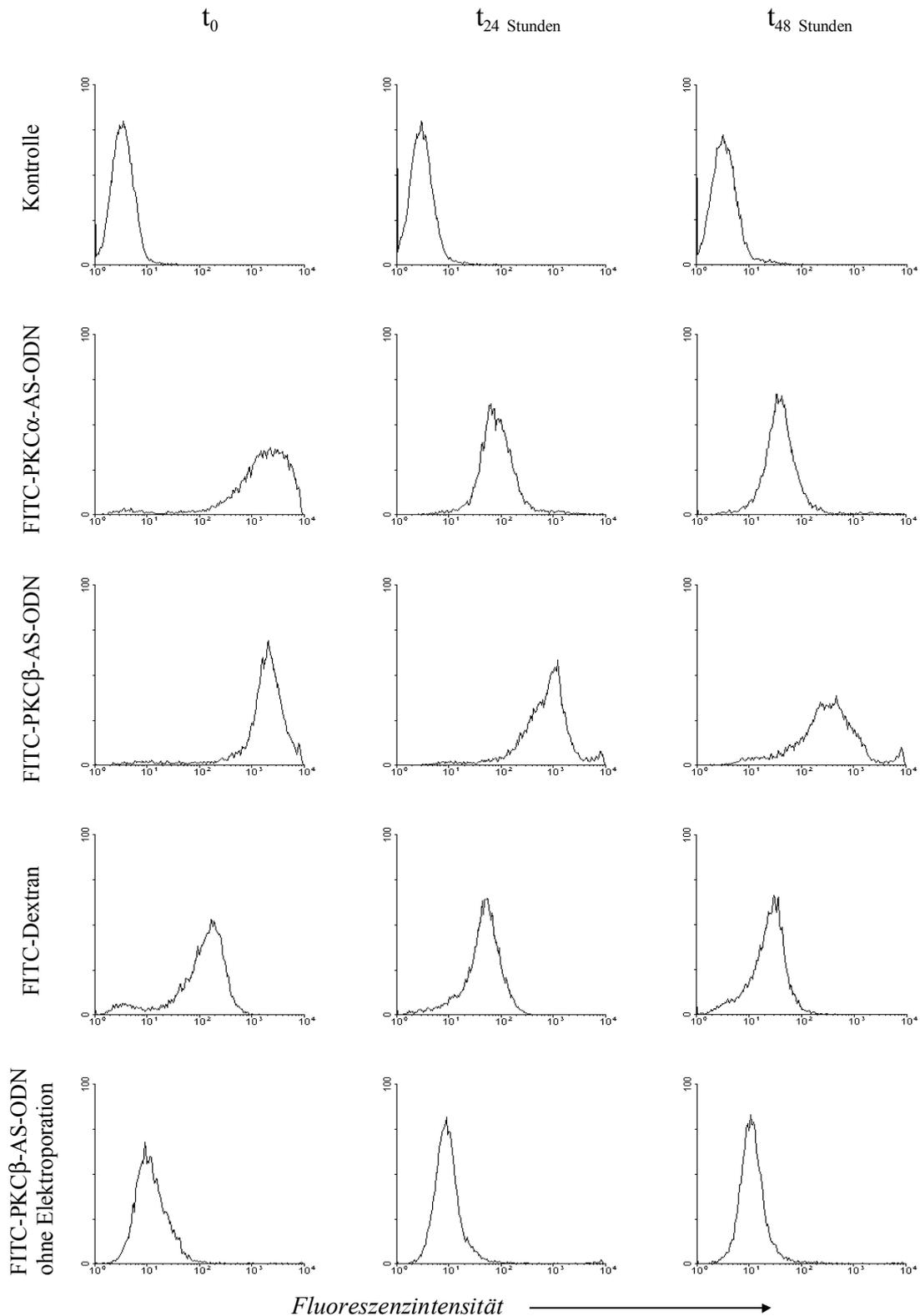
#### 3.1 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) als Instrument spezifischer Inhibitionsstudien

##### 3.1.1 Durch Elektroporation nehmen Jurkat T-Zellen AS-ODN mit hoher Effizienz auf

Jurkat T-Zellen sind Suspensionszellen und wurden mittels Elektroporation transfiziert. Die Elektroporationsbedingungen wurden zunächst unter Verwendung von FITC-Dextran getestet, da dieses Molekül eine vergleichbare Größe zu 20 Basen-Oligodesoxynukleotiden hat. Die erfolgreich transfizierten Zellen konnten anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert werden. Unter den in Kapitel 2.2.2.1 gewählten Bedingungen lag die Transfektionseffizienz mit FITC-Dextran bei bis zu 90 % (vgl. Abbildung 3) und der Anteil toter Zellen im FACS bei 5 bis 10 %.

Die Ergebnisse sollten durch Verwendung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) verifiziert werden, die am 5'-Ende ein FITC tragen. Diese Oligodesoxynukleotide entsprachen in Sequenz und Länge den nichtmarkierten AS-ODN gegen die PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -mRNA (Kapitel 2.2.2.1). FITC-bedingte Veränderungen der Moleküle bezüglich Größe und Ladung wurden vernachlässigt. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS, und zwar direkt nach der Elektroporation sowie 24 und 48 Stunden später. Als Ergebnis sind in Abbildung 3 die relativen Zellzahlen gegen den Logarithmus der Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Abbildung 3 zeigt anhand der Messungen bei  $t = 0$ , daß FITC-markierte PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN mittels Elektroporation in Jurkat T-Zellen eingebracht werden konnten. Aus dem Grad der Kurvenverschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten wird ersichtlich, daß der relative Anteil fluoreszenzpositiver Zellen bei beiden AS-ODN gleich hoch war.



**Abbildung 3: Durch Elektroporation können FITC-markierte AS-ODN gegen PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -mRNA in Jurkat T-Zellen eingebracht werden.**

Jurkat T-Zellen wurden 5 Millisekunden bei 400 Volt elektroporiert. Diese Transfektion erfolgte in Gegenwart von 10,6 nmol PKC $\alpha$ -AS-ODN, 13,5 nmol PKC $\beta$ -AS-ODN oder 44 nmol Dextran; alle jeweils markiert mit FITC. Zu den angegebenen Zeiten wurde mit den Zellen laut Kapitel 2.2.2.3 weiterverfahren und der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen im FACS gemessen.

Durch die Elektroporation mit FITC-PKC $\beta$ -AS-ODN entstand eine sehr homogene, fluoreszenzpositive Zellpopulation, erkennbar an der eng begrenzten Kurve mit ausgeprägtem Maximum. Die FITC-markierten PKC $\alpha$ -AS-ODN verteilten sich etwas inhomogener über die Zellpopulation, da die Kurve eine etwas breitere Basis hat. Die Menge an AS-ODN-Molekülen war demnach nicht in allen Zellen identisch.

In PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN-behandelten Zellen waren noch nach 48 Stunden FITC-markierte ODN in ausreichender Menge vorhanden, um die Fluoreszenzintensitäten gegenüber den Kontrollzellen deutlich zu erhöhen. Aus den Messungen nach 24 und 48 Stunden wird klar, daß der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen mit der Zeit sank, und zwar nach Elektroporation mit PKC $\alpha$ -AS-ODN schneller und in stärkerem Maße als nach Elektroporation mit PKC $\beta$ -AS-ODN.

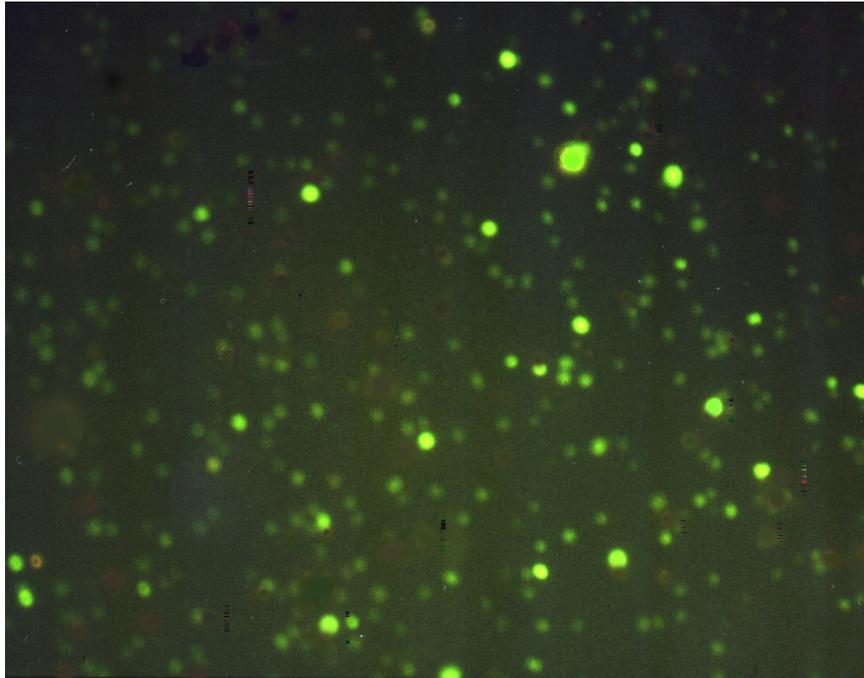
Um Einflüsse zu erfassen, die auf den Eigenschaften der AS-ODN beruhen, wurden Jurkat T-Zellen mit FITC-Dextran elektroporiert. Die Verschiebung der Kurve zu höheren Fluoreszenzintensitäten ist weniger stark ausgebildet, d. h. es wurden weniger Fluoreszenzmoleküle pro Zelle aufgenommen. Die Verteilung der Fluoreszenzmoleküle über die Zellpopulation war homogen und unterlag in dieser Zeit keinen wesentlichen Veränderungen.

In einer weiteren Kontrolle wurden den Zellen FITC-markierte PKC $\beta$ -AS-ODN zugefügt, ohne sie einer Elektroporation zu unterziehen. Auf diese Weise sollte der Anteil an unspezifisch aufgenommenen Oligodesoxynukleotiden bestimmt werden. Sowohl direkt nach der Elektroporation als auch 24 und 48 Stunden später war der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen erhöht. Der Grad der Kurvenverschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten war dabei unabhängig von der Zeit immer gleich hoch.

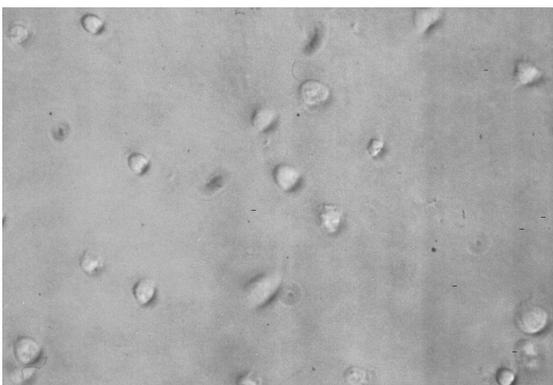
In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Aufnahmen A (10x-Objektiv) und C (20x-Objektiv) zeigen Jurkat T-Zellen direkt nach der Transfektion mit FITC-markiertem PKC $\beta$ -AS-ODN. Das Absorptionsmaximum von FITC liegt bei 488 nm, das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 518 nm. Die Fluoreszenzanregung erfolgte über einen Bereich von 400 bis 490 nm unter Verwendung eines Exzitationsfilters. Um für die Aufnahmen ausschließlich emittiertes Licht zu erfassen, wurde

ein Barrierefilter verwendet, der Licht mit Wellenlängen unter 515 nm absorbiert. Anhand der Grünabstufungen in Teil A wird deutlich, daß die Zellen sehr unterschiedliche Mengen an AS-ODN-Molekülen aufgenommen haben. Aufnahme B zeigt denselben Bildausschnitt wie C im Durchlicht.

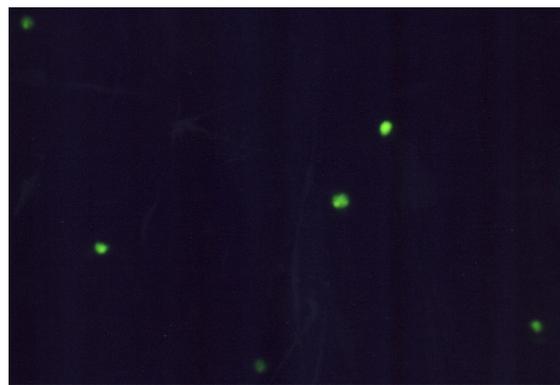
A.



B.



C.



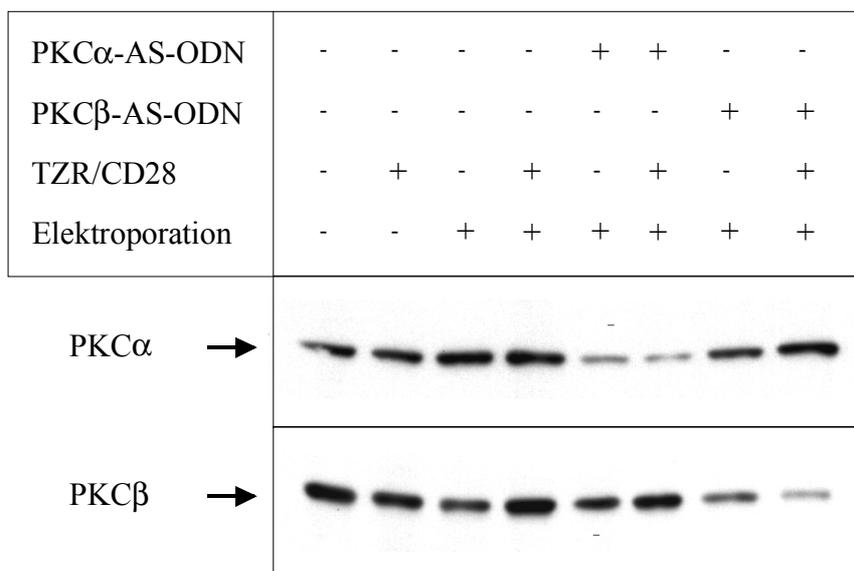
**Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie nach Elektroporation von Jurkat T-Zellen mit FITC-markiertem PKC $\beta$ -AS-ODN**

Jurkat T-Zellen wurden direkt nach der Elektroporation mit FITC-markiertem PKC $\beta$ -AS-ODN mikroskopiert. Fluoreszenzanregung erfolgte bei 400 bis 490 nm. Licht unter 515 nm wurde für die Erfassung der Fluoreszenzemission herausgefiltert. Für die Aufnahmen wurde ein 10x-Objektiv (A.) bzw. 20x-Objektiv (C.) verwendet. Teil B ist eine Durchlichtaufnahme von C.

### 3.1.2 AS-ODN inhibieren spezifisch die Neusynthese ihrer Zielproteine PKC $\alpha$ und PKC $\beta$

Aus der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen fehlenden Neusynthese und dem fortschreitenden Abbau endogenen Zielproteins resultiert eine Gesamtabnahme der Proteinmenge, die über immunologische Verfahren sichtbar gemacht werden sollte.

In jedem Experiment wurde nach 48 Stunden ein Teil des zytosolischen Proteins bzw. der kernfreien Lysate zum Nachweis der PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  verwendet. Stellvertretend für alle Experimente zeigt Abbildung 5 die Abnahme der Proteinmenge von PKC $\alpha$  bzw. PKC $\beta$  bei Verwendung der jeweiligen AS-ODN.



**Abbildung 5: AS-ODN gegen die PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -mRNA inhibieren spezifisch die PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -Proteinneusynthese**

20 bis 50 $\mu$ g zytosolisches Protein oder kernfreie Lysate aus jeder Aufarbeitung elektroporierter Jurkat T-Zellen wurden für den Nachweis der PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  verwendet. Entsprechend den verschiedenen Fragestellungen der Versuche wurden die Stimulationszeiten sehr unterschiedlich gewählt. Die Proteine wurden über 8 %-SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und für die immunologische Markierung eingesetzt. Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch.

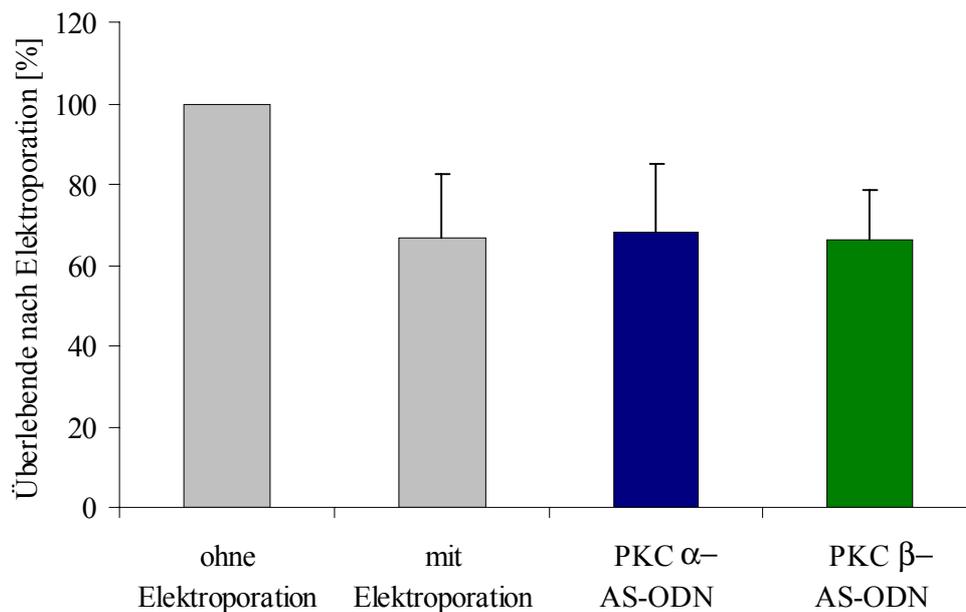
Zunächst wurde eine Immunmarkierung mit einem Antikörper gegen PKC $\alpha$  durchgeführt. Nur in den Proben, die mit PKC $\alpha$ -AS-ODN behandelt wurden, kam es zu einer Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein (Banden 5 und 6). Die Proteinmenge blieb durch PKC $\beta$ -AS-ODN unbeeinflusst (Banden 7 und 8).

Dieselbe Membran wurde anschließend mit einem Antikörper gegen PKC $\beta$  markiert. Durch die Behandlung mit PKC $\beta$ -AS-ODN wurde die Proteinmenge deutlich reduziert (Banden 7 und 8), wobei der Effekt auf die stimulierte Probe etwas stärker ist. Die Gegenwart von PKC $\alpha$ -AS-ODN bewirkte keine Veränderungen (Banden 5 und 6).

Bei der Darstellung aller nun folgenden Ergebnisse muß beachtet werden, daß die beschriebenen Effekte auf der Verringerung von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ -Protein durch die Behandlung der Zellen mit AS-ODN beruhen. Aus der Reduktion des jeweiligen Isoenzymes lassen sich im Umkehrschluß Aussagen über seine Rolle in der Zelle treffen.

### **3.1.3 Nach Transfektion mit PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN zeigen Jurkat T-Zellen ein verändertes Proliferationsverhalten**

Unmittelbar nach der Transfektion wurden die Zellen in allen Experimenten gezählt, um die Überlebensrate zu bestimmen. Als Bezugswert diente die vor der Elektroporation eingesetzte Zellzahl. Aus Abbildung 6 geht hervor, daß die durchschnittliche Überlebensrate nach Elektroporation ca. 65 % betrug - unabhängig von der Gegenwart der AS-ODN. Die Standardabweichung lag bei 14 bis 17 %.



**Abbildung 6: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN haben keinen Einfluß auf die Überlebensrate von Jurkat T-Zellen bei der Elektroporation**

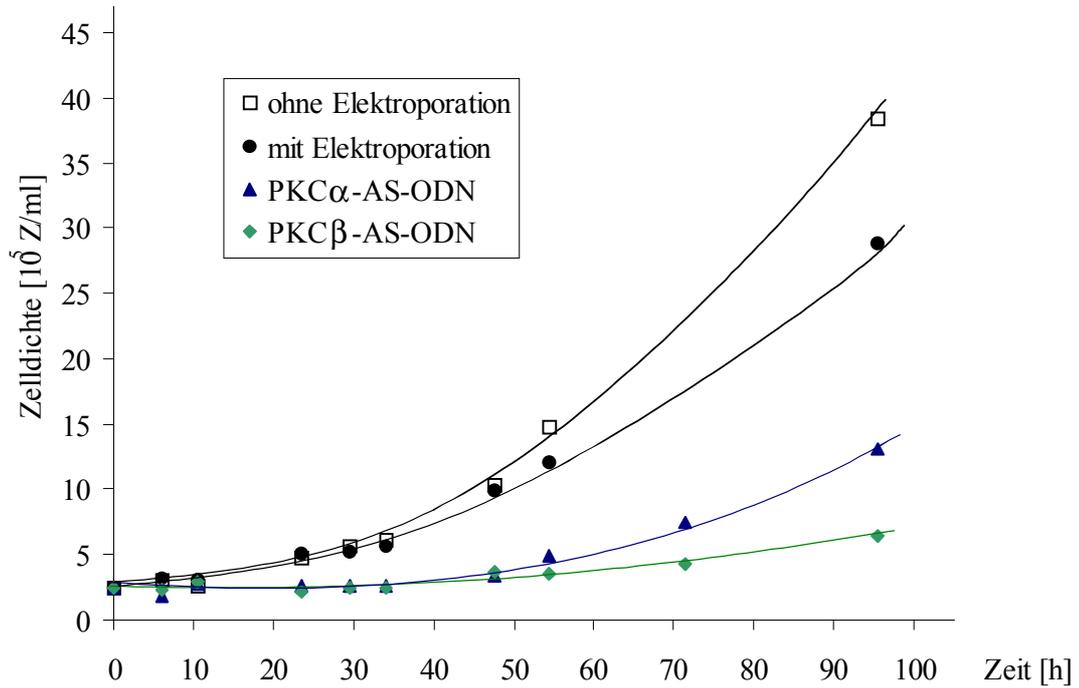
Die Zellen wurden direkt nach der Elektroporation ( $t = 0$ ) gezählt, um die prozentuale Überlebensrate (inklusive Standardabweichung) gegenüber den nichtelektroporierten Zellen ( $\equiv 100\%$ ) zu berechnen.

Ogleich die AS-ODN direkt nach der Elektroporation keinen Einfluß auf die Überlebensrate hatten, unterschieden sich die Zellzahlen in ihrer An- und Abwesenheit 48 Stunden später in signifikantem Ausmaß.

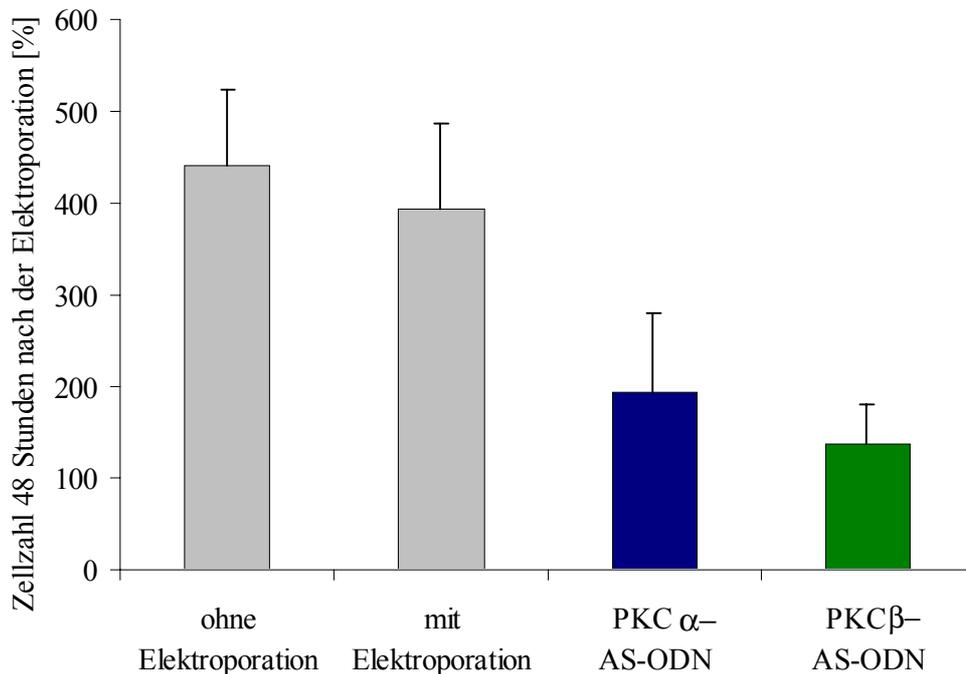
Zunächst wurden die Zelldichten in einzelnen Versuchen über einen Zeitraum von knapp 100 Stunden verfolgt (Abbildung 7A). Nichteletroporierte Zellen verdoppelten sich in knapp 24 Stunden. Bei elektroporierten Zellen fand sich der gleiche exponentielle Anstieg, der lediglich etwas zeitverzögert eintrat. In Anwesenheit von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN verlangsamte sich das exponentielle Wachstum in starkem Maße. Die Zelldichten verblieben auf einem nahezu konstanten Niveau. Erst nach ca. 60 Stunden stellte sich wieder die ursprüngliche Geschwindigkeit des exponentiellen Wachstums ein.

Abbildung 7B faßt die Ergebnisse aller Experimente zusammen. Bei allen elektroporierten Zellen wurde bereits berücksichtigt, daß nur 65 % die Transfektion überlebt haben. Der jeweilige Wert bei  $t = 0$  wurde folglich gleich 100 % gesetzt.

A.



B.



**Abbildung 7: In Anwesenheit von PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN zeigen Jurkat T-Zellen ein verlangsamttes exponentielles Wachstum**

**A:** Nach Elektroporation wurden die Zelldichten in Einzelversuchen über einen Zeitraum von knapp 100 Stunden bestimmt. Gezeigt ist ein Experiment (repräsentativ für  $n = 5$ ).

**B:** Nach 48 Stunden Posttransfektionszeit wurden die absoluten Zellzahlen aus allen Experimenten ( $n = 31$ ) bestimmt und auf die Werte direkt nach der Elektroporation ( $t = 0$ ) bezogen.

Weitere Erläuterungen siehe Text.

Ohne Elektroporation verdoppeln sich Jurkat T-Zellen in etwas weniger als 24 Stunden. 48 Stunden später ist demnach mehr als ein Vierfaches des Ausgangswertes von 100 % erreicht - nach Abbildung 7B sind es ca. 440 % (s = 83). Bei den elektroporierten Zellen kommt es innerhalb von 48 Stunden zu einer knappen Vervierfachung der Zellzahlen (390 %, s = 93). In Gegenwart von PKC $\alpha$ -AS-ODN steigt die Zellzahl innerhalb von 48 Stunden lediglich auf 190 % (s = 87) des Ausgangswertes, beim PKC $\beta$ -AS-ODN sind es sogar nur 140 % (s = 44).

## 3.2 Die PKC-Isoenzyme $\alpha$ und $\beta$ verändern die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von MAPK-Kaskaden

Die MAPK-Kaskaden tragen zu einem der zentralen Ereignisse in T-Lymphozyten, der IL-2-Synthese, bei. Wie in der Einleitung beschrieben, existieren in Säugerzellen drei wichtige MAPK-Kaskaden. Es handelt sich um die ERK-Kaskade, die p38 MAPK-Kaskade und die JNK-Kaskade, jeweils benannt nach den Vertretern der MAPK-Ebene.

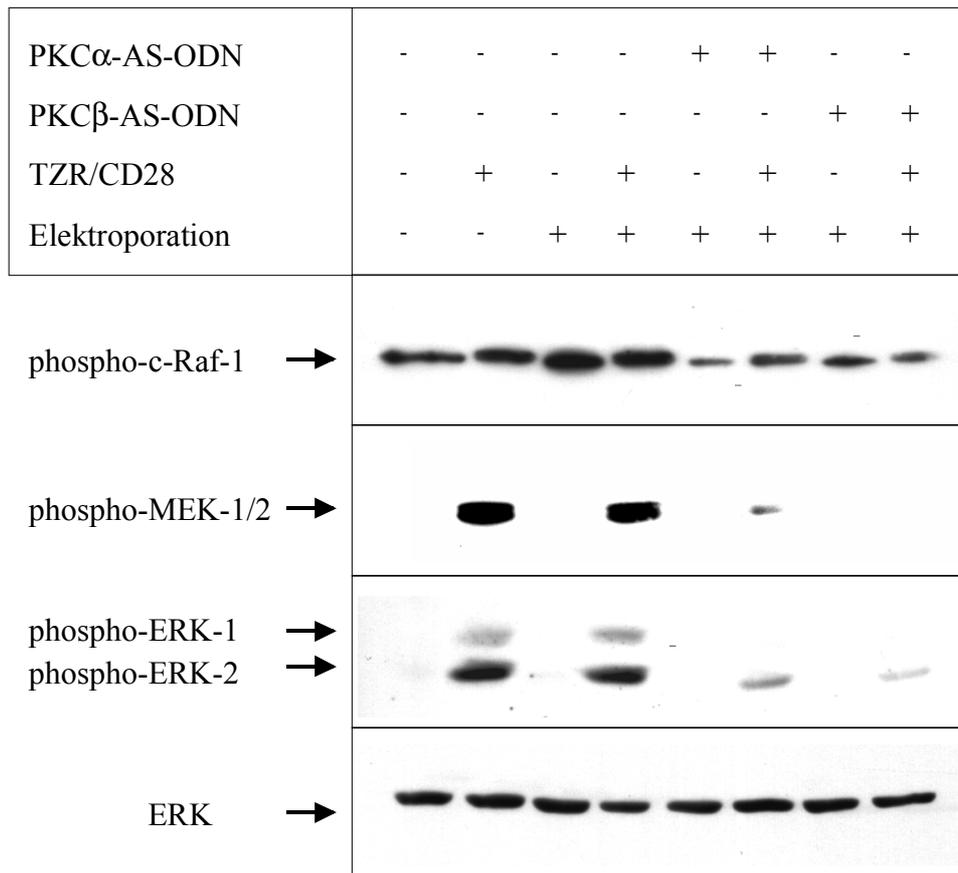
Aus der Literatur ergeben sich Anhaltspunkte dafür, daß PKC-Isoenzyme in die Regulation der MAPK-vermittelten IL-2-Synthese von T-Lymphozyten involviert sein könnten. Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob und wie sich die Elektroporation der Jurkat T-Zellen mit PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN auf die TZR/CD28-induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskaden auswirkt.

### 3.2.1 Die Reduktion von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ inhibiert die Aktivierung der ERK-Kaskade ...

#### 3.2.1.1 ... auf der Ebene der MAPK ERK-1 und ERK-2

Die ERK-Kaskade wird in Jurkat T-Zellen durch Kostimulation über den TZR/CD3-Komplex und CD28 aktiviert. Die damit einhergehende Phosphorylierung der ERK diente im vorliegenden Fall als Maß für die Aktivierung auf der MAPK-Ebene.

Abbildung 8 zeigt, daß die Stimulation mit einer Kombination aus OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern eine starke Phosphorylierung der Isoenzyme ERK-1 und ERK-2 zur Folge hatte - unabhängig davon, ob die Zellen zuvor elektroporiert wurden oder nicht (Banden 2 und 4).



**Abbildung 8: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibieren die Aktivierung der ERK-Kaskade auf allen drei Ebenen**

Jurkat T-Zellen wurden 48 Stunden nach der Elektroporation für 15 Minuten über den TZR/CD28 stimuliert. 40  $\mu$ g Protein der kernfreien Lysate wurden nach Auftrennung im 10 %-SDS-Gel für den Nachweis von phospho-ERK-1/2 eingesetzt und die Nitrozellulose-Membran anschließend noch für eine Immunmarkierung von ERK verwendet. 50  $\mu$ g zytosolisches Protein wurden für den Nachweis von phospho-MEK1/2 (12,5 %-SDS-Gel) und 50  $\mu$ g kernfreie Lysate für den Nachweis von phospho-c-Raf-1 (8 %-SDS-Gel) eingesetzt.

Der Einsatz von PKC $\alpha$ -AS-ODN inhibierte die OKT3/ $\alpha$ CD28-induzierte Phosphorylierung beider Isoformen (Bande 6). Bei phospho-ERK-1 wurde nahezu das Niveau der nichtstimulierten Probe erreicht. PKC $\beta$ -AS-ODN reduzierte ebenfalls die Phosphorylierung beider Isoformen. Der Effekt auf die ERK-2 war noch ausgeprägter als beim PKC $\alpha$ -AS-ODN (Bande 8). Weder die beiden AS-ODN noch die Elektroporation an sich wirkten sich auf nichtstimulierte Zellen aus (Banden 1, 3, 5 und 7).

Mit dem Einsatz eines vom Phosphorylierungszustand unabhängigen Antikörpers konnte gezeigt werden, daß die Menge an ERK-Protein in allen Proben identisch war.

In Abbildung 7A wurde gezeigt, daß die Zellzahlen von AS-ODN-behandelten Proben sehr niedrig waren. Um auszuschließen, daß ein Teil der AS-ODN-induzierten Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung durch diese niedrigen Zelldichten bedingt war, wurden auch elektroporierte Zellen während der Posttransfektionszeit bei vergleichbar niedrigen Zelldichten kultiviert. Es konnte kein Unterschied zwischen den elektroporierten Proben mit üblicher und niedriger Zelldichte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf eine Egalisierung der Zelldichten während der Experimente verzichtet.

### **3.2.1.2 ... auf der Ebene der MAPKK MEK-1/2**

Die beiden MAPKK-Isoformen MEK-1 und MEK-2 sind als Kinasen für die Phosphorylierung der ERK-1 und ERK-2 verantwortlich. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  auch auf die Aktivierung dieser Kinasen modulierend einwirken könnten. Als Maß der MEK-1/2-Aktivierung diente auch auf dieser Ebene die Phosphorylierung, die mit einem entsprechenden Antikörper nachgewiesen wurde. Durch die Stimulation über den TZR/CD3-Komplex in Kombination mit CD28 wurde die Phosphorylierung von MEK-1/2 induziert (Abbildung 8, Bande 2 und 4). Der Einsatz von PKC $\beta$ -AS-ODN inhibierte die MEK-1/2-Aktivierung vollständig (Bande 8). Bei Verwendung von PKC $\alpha$ -AS-ODN wurde nur wenig Protein phosphoryliert (Bande 6).

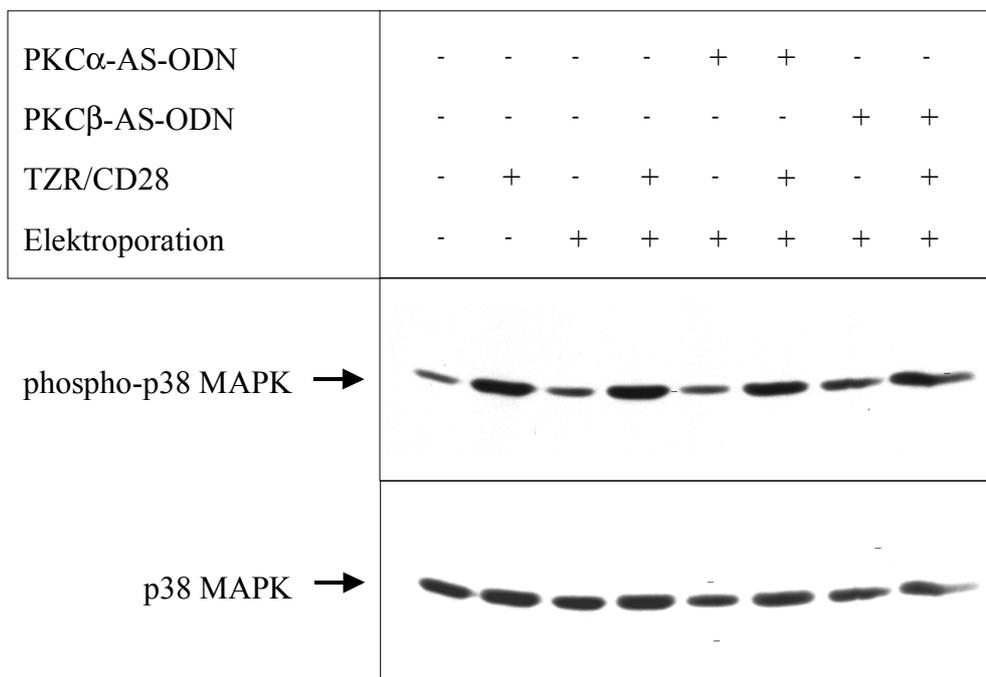
### **3.2.1.3 ... auf der Ebene der MAPKKK c-Raf-1**

c-Raf-1 katalysiert als MAPKKK die Aktivierung von MEK-1/2. Das Protein liegt in der nichtstimulierten Zelle bereits in phosphorylierter Form im Zytosol vor. Kostimulation durch OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörper induziert eine Hyperphosphorylierung von c-Raf-1 mit gleichzeitiger Verankerung in der Membran. Es wurden kernfreie Überstände zur Untersuchung herangezogen, um zytosolische und Membrananteile von c-Raf-1 erfassen zu können. Die Hyperphosphorylierung geht mit einer Erhöhung des apparenten Molekulargewichts einher, die sich – wie in Abbildung 8 zu sehen – als Bandenverschiebung im SDS-Gel manifestiert (vgl. Bande 1 und Bande 2). Die Menge an hyperphosphoryliertem

c-Raf-1 nahm durch die Behandlung mit PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN ab (Banden 6 und 8). Gleichzeitig sank durch die AS-ODN auch der Anteil an phosphoryliertem Protein in nichtstimulierten Zellen (Banden 5 und 7).

### 3.2.2 Die Phosphorylierung von p38 MAPK bleibt durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN unbeeinflusst

Durch Kostimulation über den TZR/CD3-Komplex und CD28 wird in Jurkat T-Zellen auch die p38 MAPK-Kaskade aktiviert. Die Phosphorylierung der p38 MAPK sollte - analog zur ERK-Kaskade - als Maß für die Aktivierung auf MAPK-Ebene herangezogen werden.



**Abbildung 9: Die Aktivierung von p38 MAPK bleibt durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN unbeeinflusst**

48 Stunden nach der Elektroporation wurden Jurkat T-Zellen für 15 Minuten mit OKT3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert. 100  $\mu$ g kernfreie Lysate wurden nach Auftrennung im 12,5 %-SDS-Gel für den Nachweis von phospho-p38 MAPK eingesetzt. Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend für den Nachweis von p38 MAPK verwendet.

OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörper induzierten in den Zellen die Phosphorylierung von p38 MAPK (Abbildung 9, Bande 2). Die Elektroporation selbst hatte keinen Einfluß (Bande 4). Weder PKC $\alpha$ - noch PKC $\beta$ -AS-ODN veränderten die OKT3/ $\alpha$ CD28-induzierte Aktivierung der p38 MAPK (Banden 6 und 8).

Durchgängig ist eine geringfügige Phosphorylierung der p38 MAPK auch in nichtstimulierten Proben zu sehen (Abbildung 9, Banden 1, 3, 5 und 7). Sie scheint nach Transfektion mit AS-ODN etwas stärker zu sein.

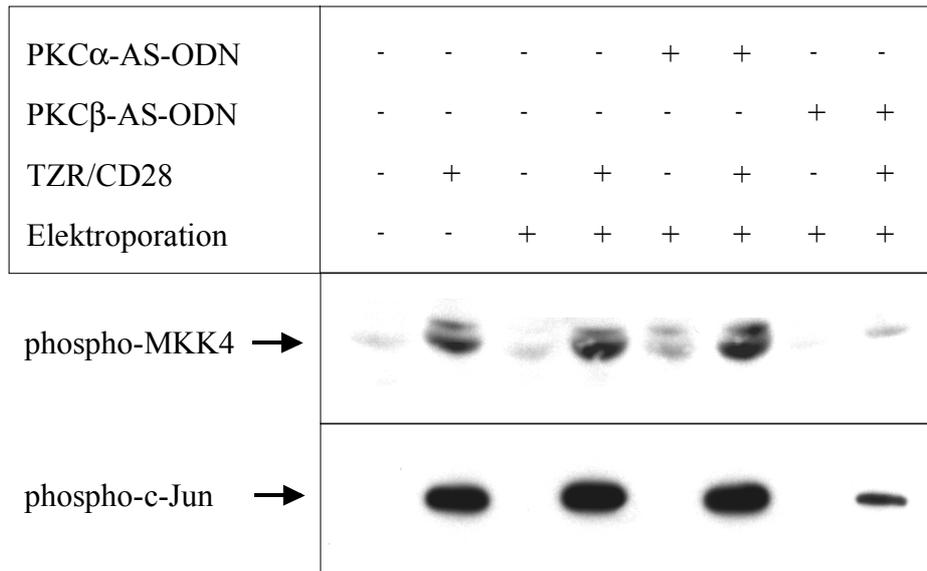
In einer zweiten Immunmarkierung wurde ein Antikörper eingesetzt, der an p38 MAPK unabhängig von dessen Phosphorylierungszustand band. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Menge an p38 MAPK-Protein in allen Proben vergleichbar war.

### **3.2.3 PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert die Aktivierung der JNK-Kaskade ...**

#### **3.2.3.1 ... auf der Ebene der MAPK JNK**

Der dritte wichtige MAPK-Signalweg, die JNK-Kaskade, kann ebenfalls durch Kostimulation über den TZR/CD3-Komplex und CD28 ausgelöst werden. Die Aktivität der endogenen JNK wurde danach bemessen, in welchem Umfang sie in einem *in vitro*-Versuch das rekombinante GST-gekoppelte Substrat c-Jun phosphorylierte. Phosphoryliertes c-Jun wurde über eine anschließende Immunmarkierung nachgewiesen.

Durch Aktivierung der Jurkat T-Zellen mit OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern wurde rekombinantes c-Jun-Substrat in starkem Maße phosphoryliert (Abbildung 10, Bande 2), d. h., die endogene JNK zeichnete sich durch eine sehr hohe Aktivität aus. Vorherige Transfektion der Zellen mit PKC $\alpha$ -AS-ODN hatte keine Auswirkung auf die TZR/CD28-induzierte JNK-Aktivierung (Bande 4). Die Anwesenheit von PKC $\beta$ -AS-ODN hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der c-Jun-Phosphorylierung (Bande 6).



**Abbildung 10: Die Aktivierung der JNK-Kaskade wird lediglich durch PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert**

Jurkat T-Zellen wurden nach 48 Stunden Posttransfektionszeit für 20 Minuten über den TZR/CD28 stimuliert. 50  $\mu$ g zytosolisches Protein wurden in einem *in vitro*-Versuch zur Bestimmung der JNK-Aktivität eingesetzt; als Substrat diente GST-c-Jun (siehe Kapitel 2.2.10). Für den Nachweis von phospho-MKK-4 wurden 100  $\mu$ g zytosolisches Protein verwendet, im 12,5 %-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Phosphoryliertes GST-c-Jun und phospho-MKK-4 wurden jeweils in einer Immunmarkierung nachgewiesen.

### 3.2.3.2 ... auf der Ebene der MAPKK MKK-4

MKK-4 phosphoryliert und aktiviert als MAPKK die JNK. Vergleichbar mit der Situation bei der ERK-Kaskade lag es auch hier nahe, eine Regulation der JNK-Kaskade durch die PKC $\beta$  bereits auf der Ebene der MAPKK zu vermuten. Eingesetzt wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierte Form von MKK-4.

Kostimulation über den TZR/CD3-Komplex und CD28 mündete in der Phosphorylierung der MKK-4 (Bande 2). Wie vermutet, zeigt Abbildung 10, daß PKC $\beta$ -AS-ODN die TZR/CD28-induzierte Phosphorylierung der MKK-4 komplett hemmte (Bande 8). Das AS-ODN übte seinen Einfluß demnach nicht nur auf der MAPK-Ebene, sondern bereits

eine Ebene oberhalb, auf die MAPKK, aus. Übereinstimmend mit den Ergebnissen bei der JNK-Aktivität hatte der Einsatz von PKC $\alpha$ -AS-ODN keinerlei Auswirkungen auf die MKK-4-Phosphorylierung (Bande 6).

### 3.2.4 Zusammenfassung

PKC-Isoenzyme verändern die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von MAPK-Kaskaden in Jurkat T-Zellen. Im Ergebnis kann nicht nur zwischen der Wirkung der PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  differenziert werden, sondern auch zwischen den betroffenen MAPK-Kaskaden ERK, p38 MAPK und JNK mit ihren einzelnen Vertretern.

PKC $\beta$  ist in die TZR/CD28-vermittelte Initiierung der ERK- und der JNK-Kaskade involviert. Ohne das Enzym ist die Phosphorylierung von c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 ebenso wenig möglich wie die Aktivierung von MKK-4 und JNK. PKC $\alpha$  hingegen wird nur für die Aktivierung von Vertretern der ERK-Kaskade – namentlich c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 - gebraucht. Auf die JNK-Kaskade hat sie keinen Einfluß.

Keine der beiden PKC-Isoformen spielt eine Rolle bei der Aktivierung der p38 MAPK-Kaskade.

### 3.3 PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ assoziieren mit Vertretern der MAPK-Kaskaden

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  für die TZR/CD28-induzierte Aktivierung der ERK-Kaskade notwendig sind und PKC $\beta$  darüber hinaus in die Regulation der JNK-Kaskade involviert ist. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß PKC-Isoenzyme ihren Einfluß über physikalische Interaktionen mit Vertretern der MAPK-Kaskaden ausüben.

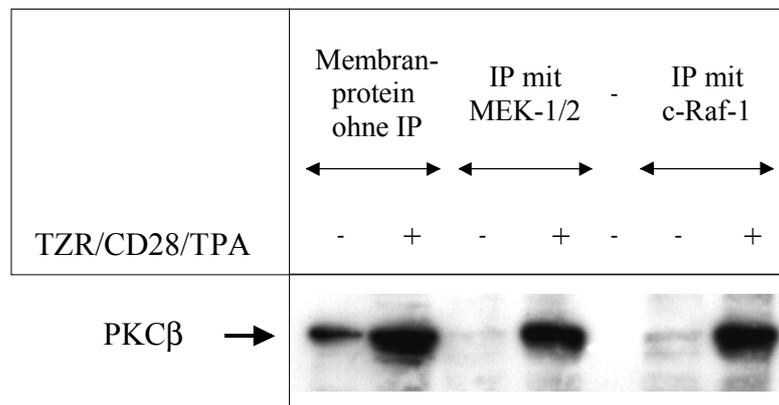
Die Aktivierung von Jurkat T-Zellen löst eine Translokation von PKC-Isoenzymen an die Membran aus, die durch die Zugabe schon geringer Mengen TPA (2,5 ng/ml) verstärkt werden kann. Dieser Sachverhalt wurde für Immunpräzipitationsstudien genutzt, in denen nach möglichen Assoziationspartnern von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  gesucht wurde. In den mit verschiedenen Antikörpern präzipitierten Proben sollten die PKC-Isoenzyme über Immunmarkierungen nachgewiesen werden.

#### 3.3.1 PKC $\beta$ assoziiert mit c-Raf-1, MEK-1/2 und MEKK-1 an der Plasmamembran aktivierter Jurkat T-Zellen

Bei den in Abbildung 11 dargestellten Proben wurden Jurkat T-Zellen 15 Minuten mit OKT3-/ $\alpha$ CD28-Antikörpern und geringen Mengen TPA aktiviert. Das nach Kapitel 2.2.5 gewonnene Membranprotein wurde mit Antikörpern gegen c-Raf-1 oder MEK-1/2 immunpräzipitiert oder direkt auf ein 10 %-SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde PKC $\beta$  in einer Immunmarkierung nachgewiesen.

Abbildung 11 zeigt, daß PKC $\beta$  nach T-Zell-Aktivierung an die Membran translozierte („Membranprotein ohne IP“). Durch die Immunpräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern wurden MEK-1/2 oder c-Raf-1 gebunden und mit ihnen wurden alle assoziierten Proteine isoliert. PKC $\beta$  ließ sich im Membranprotein stimulierter Zellen nachweisen,

wenn bei der Immunpräzipitation Antikörper gegen MEK-1/2 oder c-Raf-1 eingesetzt wurden. Das PKC-Isoenzym war folglich mit diesen beiden Proteinen assoziiert. In den Immunpräzipitaten der nichtstimulierten Zellen konnte kein PKC $\beta$  nachgewiesen werden.



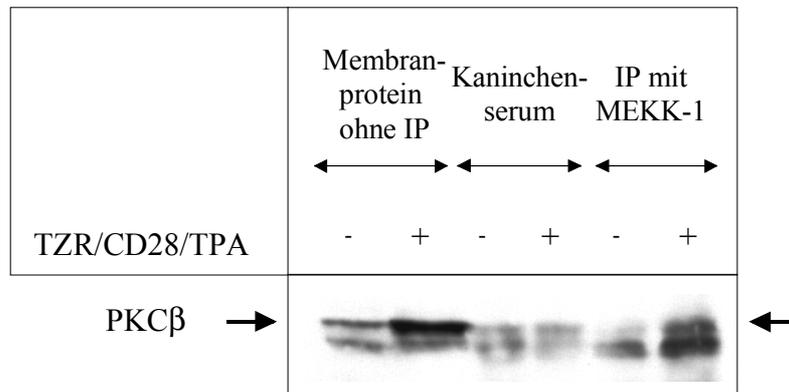
**Abbildung 11: PKC $\beta$  assoziiert mit c-Raf-1 und MEK-1/2 an der Plasmamembran stimulierter Jurkat T-Zellen**

Jurkat T-Zellen wurden nicht stimuliert oder 15 Minuten mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA aktiviert. 500  $\mu$ g Membranprotein wurden mit Antikörpern gegen MEK-1/2 oder c-Raf-1 immunpräzipitiert und in einem 10 %-SDS-Gel aufgetrennt. Parallel wurden 50  $\mu$ g Membranprotein ohne Immunpräzipitation aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und eine Immunmarkierung mit Antikörpern gegen PKC $\beta$  durchgeführt.

MEKK-1 ist der Vertreter der MAPKKK innerhalb der JNK-Kaskade. Aus Abbildung 10 ging hervor, daß PKC $\beta$  die Aktivierung dieses Signalweges reguliert. Es wurde auch hier die Möglichkeit einer Assoziation zwischen PKC $\beta$  und MEKK-1 als Regulationsmechanismus in Erwägung gezogen.

Membranprotein von (nicht-)stimulierten Jurkat T-Zellen wurde mit Antiserum gegen MEKK-1 immunpräzipitiert oder direkt auf ein 8 %-SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde PKC $\beta$  in einer immunologischen Markierung nachgewiesen.

PKC $\beta$  translozierte nach Stimulation an die Membran (Abbildung 12, „Membranprotein ohne IP“). Wurde zuvor mit MEKK-1 immunpräzipitiert, konnte PKC $\beta$  ebenfalls in stimulierten Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: PKC $\beta$  assoziiert mit MEKK-1 an der Plasmamembran stimulierter Jurkat T-Zellen**

Jurkat T-Zellen wurden 8 Minuten mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA stimuliert. 1 mg Membranprotein wurde mit Kaninchenserum gegen MEKK-1 immunpräzipitiert und auf einem 8 %-SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde PKC $\beta$  in einer Immunmarkierung nachgewiesen. Bei den Proben ohne Immunpräzipitation wurden 50  $\mu$ g Membranprotein eingesetzt.

Als Kontrolle wurde Membranprotein analog zur Immunpräzipitation mit Kaninchenserum inkubiert.

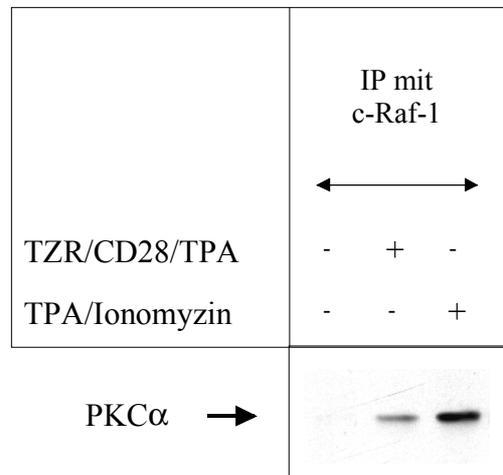
### 3.3.2 PKC $\alpha$ und c-Raf-1 können koimmunpräzipitiert werden

Abbildung 13 zeigt Versuche, in denen Jurkat T-Zellen mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA bzw. TPA/Ionomycin aktiviert wurden.

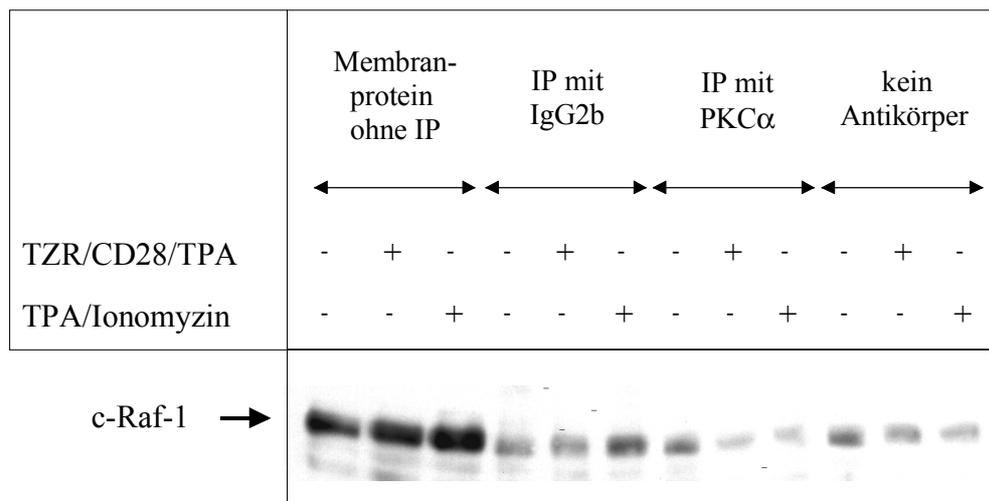
Das Membranprotein wurde in Teil A mit Antikörpern gegen c-Raf-1 präzipitiert und PKC $\alpha$  in einer Immunmarkierung nachgewiesen. Nach Aktivierung der Zellen mit

TPA/Ionomycin oder OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA konnte PKC $\alpha$  zusammen mit c-Raf-1 aus Membranprotein koimmunpräzipitiert werden.

A.



B.



**Abbildung 13: PKC $\alpha$  und c-Raf-1 können aus Membranprotein stimulierter Jurkat T-Zellen koimmunpräzipitiert werden**

Nach Aktivierung der Jurkat T-Zellen mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA über 4 Minuten wurde Membranprotein mit den angegebenen Antikörpern präzipitiert und auf ein 8 %-SDS-Gel aufgetragen. Es folgte Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran und Immunmarkierung mit PKC $\alpha$ - (Teil A) oder c-Raf-1-Antikörpern (Teil B). Parallel wurden 50  $\mu$ g Membranprotein ohne Immunpräzipitation aufgetragen.

In Teil B von Abbildung 13 wurde mit Antikörpern gegen PKC $\alpha$  präzipitiert und c-Raf-1 in der Immunmarkierung nachgewiesen. c-Raf-1 konnte in allen nichtstimulierten und stimulierten Proben nachgewiesen werden.

Nach Aktivierung der Zellen, vor allem mit TPA/Ionomycin, erscheint die Bande im Gel etwas breiter („Membranprotein ohne IP“). Dies deutet auf eine Hyperphosphorylierung von c-Raf-1 und die damit einhergehende Erhöhung des apparenten Molekulargewichts hin.

Durch die Verwendung von PKC $\alpha$ -Antikörpern konnten c-Raf-1 und PKC $\alpha$  kopräzipitiert werden. Die Erhöhung des apparenten Molekulargewichts von c-Raf-1 in den stimulierten Proben ist hier besonders deutlich.

Zur Kontrolle wurde Membranprotein mit einem isotypspezifischen Antikörper präzipitiert. Die c-Raf-1-Menge ist nach TPA/Ionomycin-Stimulation deutlich erhöht. Analog zur Immunpräzipitation wurde Membranprotein mitgeführt, dem kein Antikörper zugesetzt wurde, das aber wie üblich mit Protein G-Sepharose inkubiert wurde. Auch in diesen Proben konnte c-Raf-1 nachgewiesen werden.

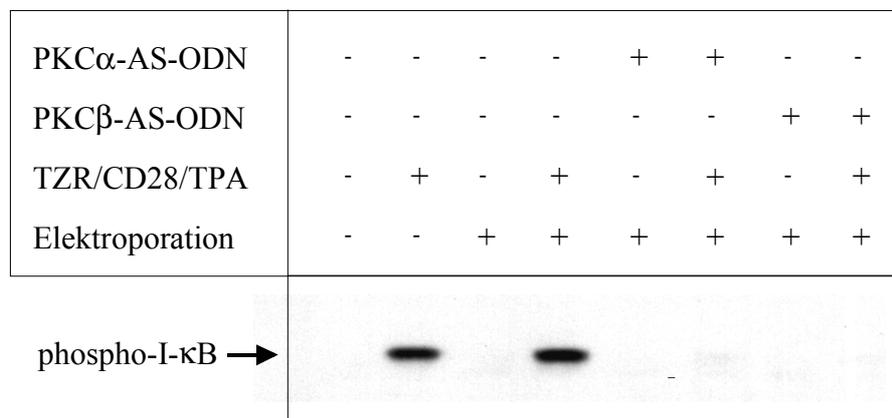
### 3.3.3 Zusammenfassung

PKC $\beta$  kann nach Aktivierung von Jurkat T-Zellen mit verschiedenen Proteinen der MAPK-Kaskaden kopräzipitiert werden. Im Falle der ERK-Kaskade ist PKC $\beta$  mit c-Raf-1 und MEK-1/2 assoziiert und im Falle der JNK-Kaskade mit MEKK-1.

PKC $\alpha$  ist nach Stimulation mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA oder TPA/Ionomycin in den Immunpräzipitaten von c-Raf-1, einem Vertreter der ERK-Kaskade, zu finden. Durch Verwendung von PKC $\alpha$ -Antikörpern können c-Raf-1 und PKC $\alpha$  ebenfalls kopräzipitiert werden.

### 3.4 Die I- $\kappa$ B-Phosphorylierung, nicht aber die I- $\kappa$ B-Degradation, bedarf der Anwesenheit von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Signalweg in Jurkat T-Zellen. In nichtstimulierten Zellen liegt NF- $\kappa$ B komplexiert mit seinem Inhibitor I- $\kappa$ B im Zytosol vor. Durch Stimulation über den TZR/CD3-Komplex und CD28 kommt es zunächst zur Aktivierung der IKK, die I- $\kappa$ B phosphorylieren. Diese Phosphorylierung ist das Signal für die sich anschließende Polyubiquitinierung von I- $\kappa$ B und den darauffolgenden Abbau des Proteins im Proteasom. NF- $\kappa$ B liegt nun in aktiver Form vor und transloziert in den Kern, um an entsprechende Bindungsstellen in den Promotoren von Genen zu binden. Um den Einfluß der AS-ODN gegen die PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  zu untersuchen, wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierte Form des I- $\kappa$ B verwendet.



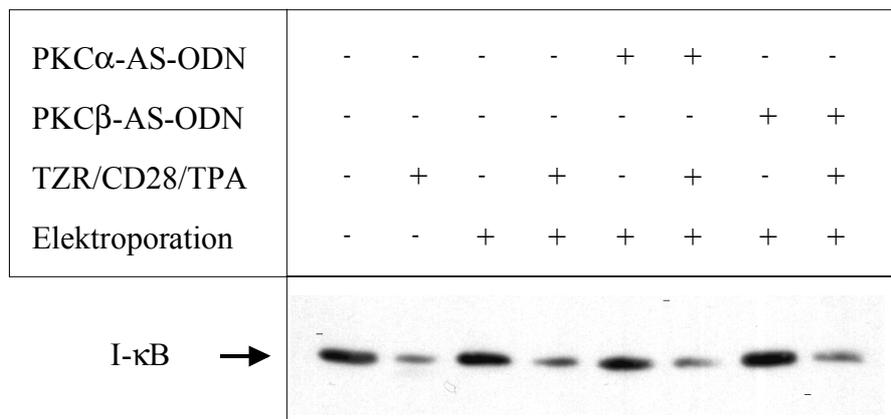
**Abbildung 14: Die Phosphorylierung des I- $\kappa$ B als Teil der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird durch PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibiert**

Jurkat T-Zellen wurden 48 Stunden nach der Elektroporation für 10 Minuten mit OKT3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern und TPA (2,5 ng/ml) stimuliert. 50  $\mu$ g kernfreie Lysate wurden in einem 12,5 %-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und phosphorylierter I- $\kappa$ B mit einem spezifischen Antikörper in der Immunmarkierung nachgewiesen.

Zur Signalverstärkung wurde neben OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern auch TPA in geringen Konzentrationen (2,5 ng/ml) zugesetzt. Abbildung 14 zeigt, daß es im Zuge dieser Stimulation zu einer starken Phosphorylierung des I- $\kappa$ B kam (Bande 2). Die Elektropo-

ration an sich hatte keine Veränderung zur Folge (Bande 4). Bei vorheriger Transfektion der Zellen mit PKC $\alpha$ -AS-ODN lag die Menge an phosphoryliertem I- $\kappa$ B in der Immunmarkierung unter der Nachweisgrenze (Bande 6). In Anwesenheit von PKC $\beta$ -AS-ODN (Bande 8) ergab sich das gleiche Bild: es konnte kein phosphorylierter I- $\kappa$ B detektiert werden.

Durch die Verwendung eines vom Phosphorylierungsstatus unabhängigen Antikörpers konnte die Degradation des I- $\kappa$ B beobachtet werden (Abbildung 15). Die Aktivierung der Zellen über TZR/CD28/TPA induzierte innerhalb von 40 Minuten den Abbau des I- $\kappa$ B, der sich als deutliche Signalreduktion in der Immunmarkierung manifestierte (Banden 2 und 4). Die Gegenwart von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN schien unerheblich zu sein, da sich das Ausmaß der induzierten I- $\kappa$ B-Degradation nicht veränderte (Banden 6 und 8).



**Abbildung 15: Die Anwesenheit von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN ist für die Degradation des I- $\kappa$ B unerheblich**

Transfizierte Jurkat T-Zellen wurden nach 48 Stunden mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA stimuliert. 50  $\mu$ g kernfreie Lysate wurden in einem 12,5 %-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und I- $\kappa$ B mit einem spezifischen Antikörper in der Immunmarkierung nachgewiesen.

Zusammenfassend ergeben die Daten, daß zwar die Phosphorylierung, aber nicht die Degradation des I- $\kappa$ B durch die Anwesenheit von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN verhindert wird.

### 3.5 PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ regulieren die Interleukin-2-Genexpression

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, daß PKC-Isoenzyme die Aktivierung von MAPK-Kaskaden und die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B regulieren. Diese Signalwege aktivieren Transkriptionsfaktoren, die sich an Bindungsstellen in den Promotoren diverser Gene anlagern.

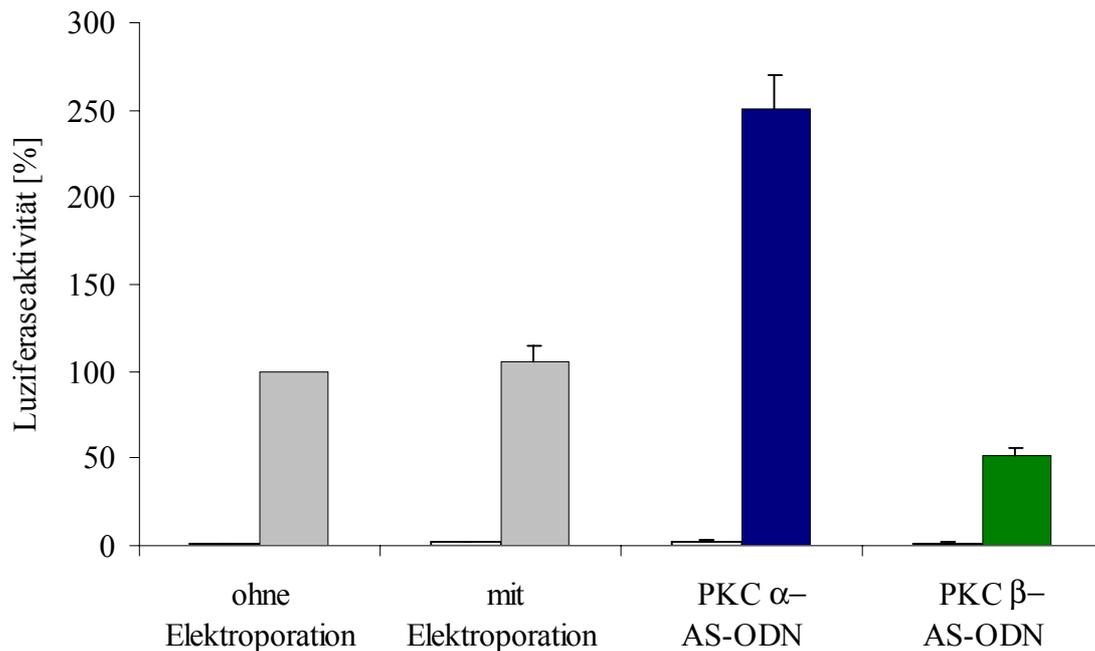
Im folgenden wurde geprüft, inwieweit sich eine Beteiligung der PKC-Isoenzyme an der Regulation der Interleukin-2-Genexpression nachweisen läßt. Dabei wurden die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor und die IL-2-Promotoraktivität untersucht.

#### **3.5.1 PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ bewirken eine veränderte NFAT-Bindung an den Interleukin-2-Promotor**

Für die Untersuchungen stand eine stabil transfizierte Jurkat T-Zelllinie zur Verfügung, bei der 4 Kopien der distalen NFAT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors mit dem Reportergen für das Enzym Luziferase verknüpft sind (vgl. Kapitel 2.2.11).

Diese Zellen wurden mit PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN elektroporiert und über den TZR/CD28 stimuliert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität in kernfreien Lysaten bestimmt.

Die Aktivierung der stabil transfizierten Zellen über den TZR/CD3-Komplex und CD28 führte zu einer Induktion der NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor. Die gemessene Luziferaseaktivität lag im Mittel um das 50-fache höher als in der nichtstimulierten Kontrolle. Die stimulierte Kontrolle wurde in Abbildung 16 gleich 100 % gesetzt. Die Elektroporation allein zeigte keine Auswirkungen auf die NFAT-Bindung: weder in nichtstimulierten noch in aktivierten Zellen änderten sich die Luziferaseaktivitäten.



**Abbildung 16: PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  verändern die TZR/CD28-induzierte Bindung des Transkriptionsfaktors NFAT an den Interleukin-2-Promotor**

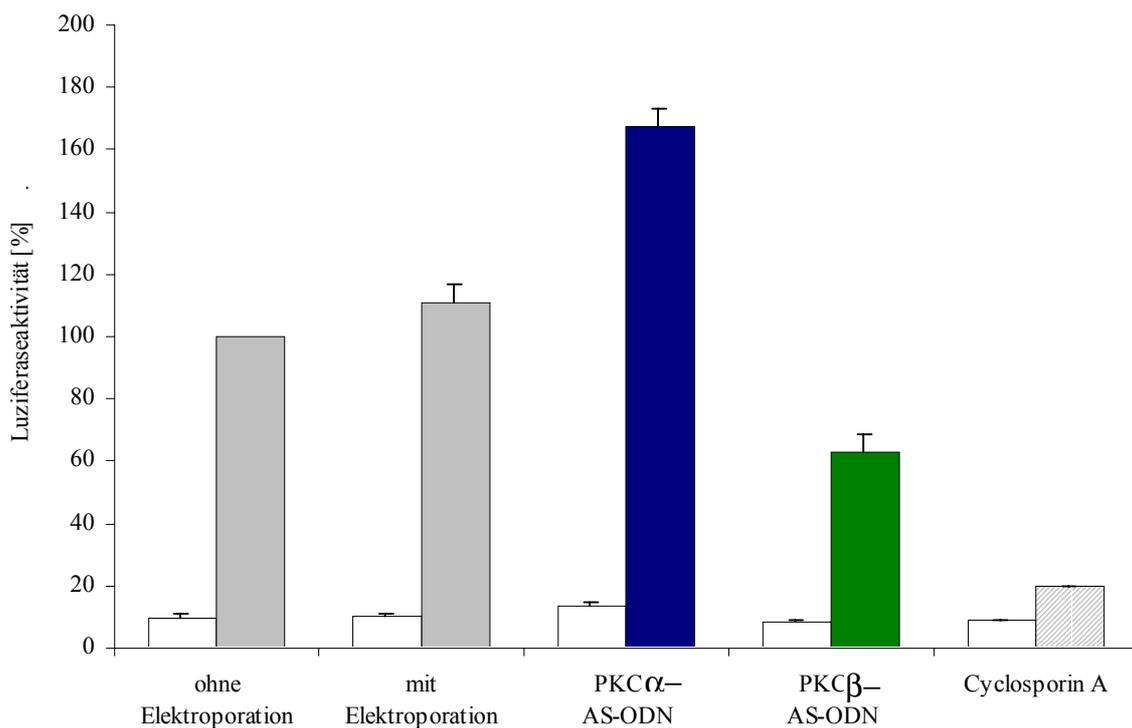
Der Untersuchung dienten stabil transfizierte Jurkat T-Zellen, bei denen 4 Kopien der distalen NFAT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors mit dem Reporter gen für das Enzym Luziferase verknüpft sind. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -AS-ODN elektroporiert, und nach 34 Stunden über den TZR/CD28 stimuliert. Die als relative Lichteinheiten gemessene Luziferaseaktivität wurde auf die eingesetzte Proteinmenge normiert und in % der stimulierten, nichtelektroporierten Kontrolle (inklusive Standardabweichungen) dargestellt.

Durch die Gegenwart von PKC $\alpha$ -AS-ODN bei der Elektroporation und die anschließende Aktivierung der Zellen wurde die Induktion der NFAT-Bindung verstärkt. Die Luziferaseaktivitäten erhöhten sich gegenüber der stimulierten Kontrolle auf 250 % (s = 19). Genau entgegengesetzt wirkte sich die Behandlung mit PKC $\beta$ -AS-ODN aus. Die TZR/CD28-induzierte NFAT-Bindung wurde auf 50 % (s = 5) der stimulierten Kontrolle reduziert. Die Werte in den nichtstimulierten Zellen blieben bei beiden AS-ODN unverändert niedrig.

### 3.5.2 Die Aktivität des minimalen Interleukin-2-Promotors wird durch die PKC-Isoenzyme $\alpha$ und $\beta$ modifiziert

In einer anderen Linie stabil transfizierter Jurkat T-Zellen ist der minimale IL-2-Promotor mit dem Luziferase-Reportergen verknüpft. Neben NFAT und NF- $\kappa$ B binden dort noch weitere Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des IL-2-Gens beteiligt sind (vgl. Einleitung). Ihr kooperatives Zusammenspiel bestimmt die Transkriptionsaktivität des Promotors.

Durch die Stimulation mit OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern wird der IL-2-Promotor in den Zellen aktiviert. Ausgehend von der nichtstimulierten Kontrolle stieg die Luziferaseaktivität auf das 10- bis 15-fache an und wurde in Abbildung 17 gleich 100 % gesetzt.



**Abbildung 17: Die TZR/CD28-induzierte Transkriptionsaktivität des Interleukin-2-Promotors unterliegt dem Einfluß von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$**

Stabil transfizierte Jurkat T-Zellen mit einer Verknüpfung aus minimalem IL-2-Promotor und Reportergen für das Enzym Luziferase wurden in An- und Abwesenheit von AS-ODN elektroporiert. Nach 42 Stunden wurden die Zellen über den TZR/CD28 aktiviert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die eingesetzte Proteinmenge normiert und in % der stimulierten, nichtelektroporierten Kontrolle (inklusive Standardabweichungen) angegeben.

Die Elektroporation allein hatte keinen Effekt. Transfektion mit PKC $\alpha$ -AS-ODN bewirkte eine moderate Erhöhung der IL-2-Promotoraktivität auf 170 % (s = 6). PKC $\beta$ -AS-ODN dagegen hemmte die Promotoraktivität auf ca. 60 % (s = 6). Damit bestehen hinsichtlich beider AS-ODN deutliche Parallelen zu den in Kapitel 3.5.1 dargestellten Veränderungen der NFAT-Bindung.

Cyclosporin A, das durch Inhibition von Calcineurin die Dephosphorylierung und Translokation von NFAT in den Kern verhindert, unterdrückte in einer Konzentration von 200 ng/ml die TZR/CD28-induzierte IL-2-Promotoraktivität nahezu auf Kontrollniveau.

### **3.5.3 Zusammenfassung**

In Gegenwart reduzierter Mengen PKC $\alpha$ -Protein ist die TZR/CD28-induzierte NFAT-Bindung an die distale Stelle des IL-2-Promotors erhöht und die IL-2-Promotoraktivität steigt.

Reduzierte Mengen an PKC $\beta$  bewirken dagegen eine Senkung der TZR/CD28-induzierten NFAT-Bindung und IL-2-Promotoraktivität.

### 3.6 PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ beeinflussen die Menge an Interleukin-2-mRNA in der Zelle

Die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor und die IL-2-Promotoraktivität werden durch die beiden PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  reguliert. Es wurde folglich erwartet, daß auch die Synthese der IL-2-mRNA davon unmittelbar betroffen ist.

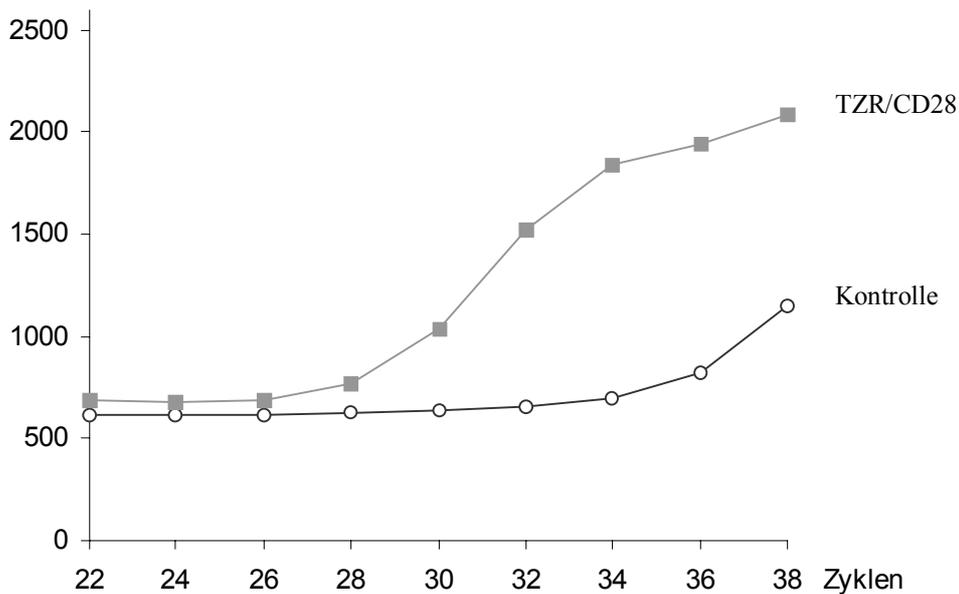
Wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben, wurde Gesamt-RNA mit einer Mindestlänge von 200 Basen isoliert und cDNA selektiv aus mRNA mit Poly(A)-Sequenz synthetisiert. Unter Verwendung spezifischer Primer wurde in einer PCR die cDNA von IL-2-, IFN (Interferon)- $\gamma$ - und GAPDH-mRNA amplifiziert und quantifiziert.

Streng genommen wird unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht die mRNA-Synthese betrachtet, sondern der mRNA-Gehalt der Zelle. Dieser ergibt sich aus dem Gleichgewicht zwischen mRNA-Synthese und -Abbau. Jurkat T-Zellen wurden über den TZR/CD3-Komplex und CD28 aktiviert. In nichtstimulierten Zellen konnte keine IL-2- oder IFN- $\gamma$ -mRNA detektiert werden. Durch Aktivierung der Zellen wurde die mRNA-Synthese induziert und dominierte gegenüber dem mRNA-Abbau. Daher ist im folgenden von Induktion der mRNA-Synthese die Rede, obwohl nach wie vor lediglich der mRNA-Gehalt gemessen wurde. Anders verhielt es sich bei der konstitutiv exprimierten GAPDH-mRNA. Ihre Menge in der Zelle stand nicht unter dem Einfluß der T-Zellaktivierung und diente daher der Normierung der Proben.

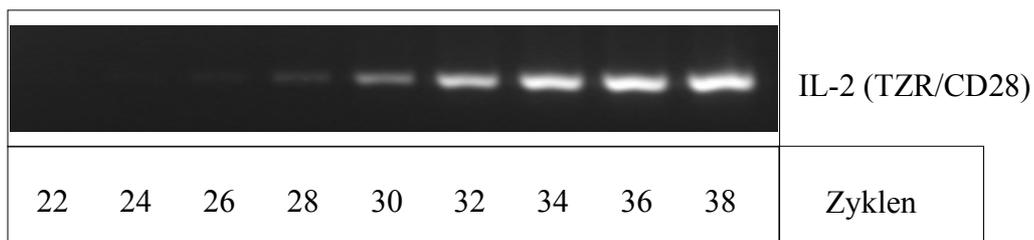
Im folgenden wird nur von mRNA gesprochen, obwohl in den ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen natürlich nicht die mRNA selbst, sondern amplifizierte Fragmente der cDNA nachgewiesen wurden.

Zu Beginn der Arbeiten sollte getestet werden, inwieweit das angewendete System in der Lage ist, Veränderungen des mRNA-Gehalts in der Zelle widerzuspiegeln. Jurkat T-Zellen wurden 3 Stunden mit OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert und auf ihren IL-2-mRNA-Gehalt untersucht. Nach den in Abbildung 18 angegebenen Zyklenzahlen wurde die PCR beendet und die erhaltenen PCR-Fragmente im Agarosegel densitometrisch quantifiziert.

A.



B.



**Abbildung 18: Mit Hilfe der PCR können Unterschiede im mRNA-Gehalt der Zellen semiquantitativ ausgewertet werden**

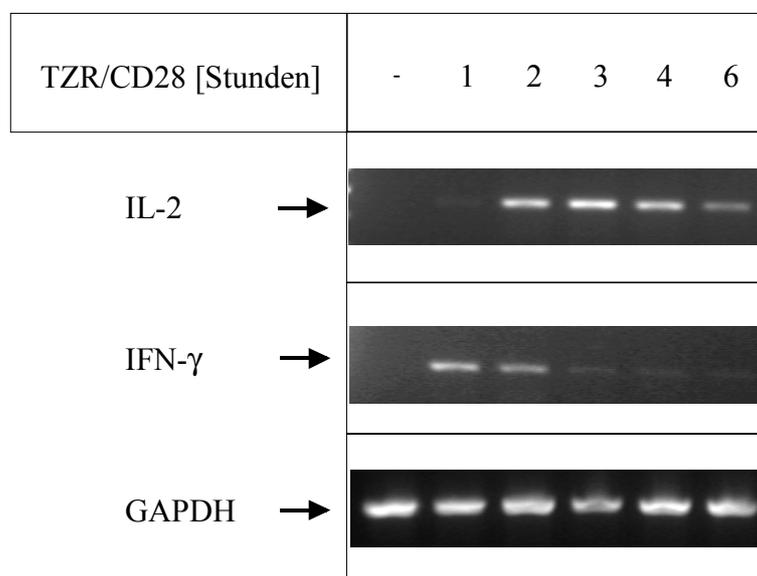
Jurkat T-Zellen wurden 3 Stunden über den TZR/CD28 aktiviert. Es folgten RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Die PCR mit spezifischen Primern der IL-2-mRNA wurde nach den angegebenen Zyklenzahlen beendet und die PCR-Fragmente quantifiziert. Teil A zeigt die densitometrische Auswertung. In Teil B ist das dazugehörige UV-Bild der PCR-Fragmente zu sehen.

In den nichtstimulierten Zellen konnte bis zum 34. PCR-Zyklus ein gleichmäßiger Anstieg in der Signalintensität beobachtet werden. In den stimulierten Zellen war über diesen kontinuierlichen Anstieg hinaus nach 28 Zyklen eine Erhöhung des Signals festzustellen, die bis zum 32. Zyklus exponentiell verlief. Mit Zyklus 34 war der Sättigungsbereich der PCR erreicht. Dort konnte nicht mehr von der Zahl der in der PCR amplifizierten Fragmente auf die ursprünglich vorhandene Menge der mRNA in der Zelle geschlossen werden.

Für die semiquantitative Wertung wurde eine Zyklenzahl von 30 gewählt. Bei dieser Zyklenzahl reichten die Signalunterschiede zwischen stimulierten und nichtstimulierten Zellen für eine Bewertung aus, ohne daß das Risiko bestand, in den Sättigungsbereich der PCR zu gelangen.

Die Aktivierung über den TZR/CD3-Komplex und CD28 induzierte in Jurkat T-Zellen bereits nach 2 Stunden die Synthese von IL-2-mRNA (Abbildung 19). Nach 3 Stunden hatte das Signal seine maximale Intensität erreicht. Nach 4 Stunden war immer noch ein deutliches Signal vorhanden während nach 6 Stunden Aktivierung nur noch eine wesentlich geringere mRNA-Menge in der Zelle vorhanden war.

Die Synthese von IFN- $\gamma$ -mRNA wurde schon nach einer Stunde Stimulation induziert. Nach 2 Stunden war das Signal bereits schwächer und nach 3 Stunden konnte keine IFN- $\gamma$ -mRNA mehr nachgewiesen werden. Insgesamt war die Menge der amplifizierten IFN- $\gamma$ -Fragmente unter den gleichen Versuchsbedingungen sehr viel geringer als die der IL-2-Fragmente.

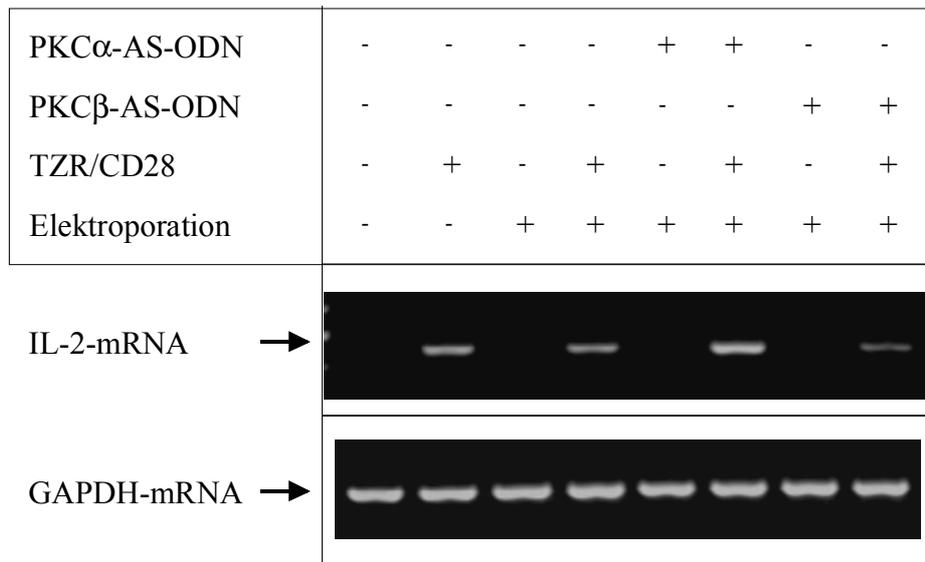


**Abbildung 19: Aktivierung von Jurkat T-Zellen über den TZR/CD28 induziert die Synthese von IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA**

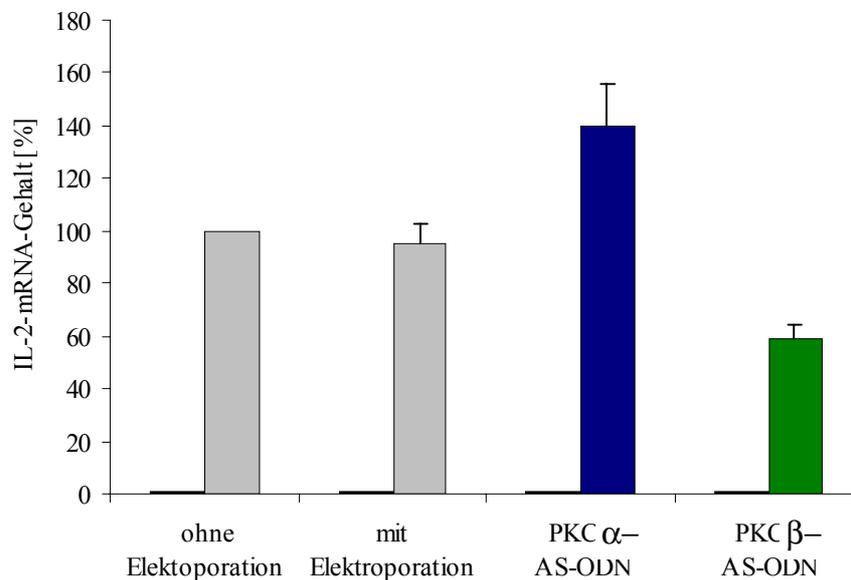
Jurkat T-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume stimuliert. Nach Kapitel 2.2.12 erfolgten RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und semiquantitative PCR. Die mit Hilfe spezifischer Primer (IL-2, IFN- $\gamma$  und GAPDH) in 30 Zyklen amplifizierte Fragmente wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und densitometrisch quantifiziert. GAPDH-mRNA diente der Normierung.

Abbildung 20 A bestätigt, daß die Aktivierung von Jurkat T-Zellen über den TZR/CD28 zur Synthese von IL-2-mRNA führte (Bande 2). Elektroporation in Abwesenheit von AS-ODN rief die gleiche Induktion hervor (Bande 4). In den nichtstimulierten Kontrollen konnte keine IL-2-mRNA nachgewiesen werden (Banden 1, 3, 5 und 7).

A.



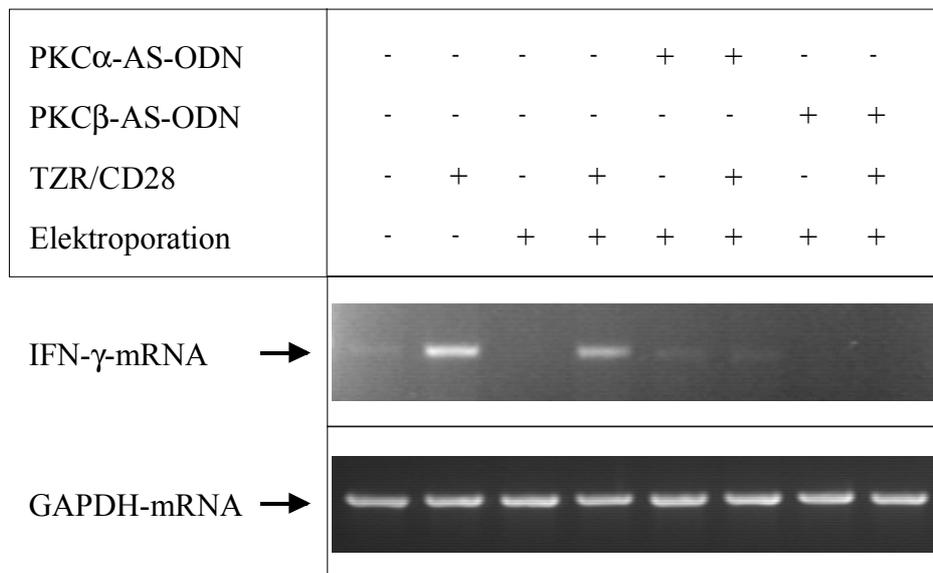
B.



**Abbildung 20: PKC $\alpha$ -AS-ODN erhöht und PKC $\beta$ -AS-ODN erniedrigt die TZR/CD28-induzierte Synthese der IL-2-mRNA**

Die TZR/CD28-induzierte IL-2-mRNA-Synthese wurde auf den Einfluß von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  hin untersucht. Jurkat T-Zellen wurden mit AS-ODN elektroporiert und nach 48 Stunden Posttransfektionszeit für jeweils 3 Stunden aktiviert. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR wurden laut Kapitel 2.2.12 durchgeführt. Teil A zeigt das UV-Bild eines exemplarischen Versuches. Teil B der Abbildung berechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten. Die stimulierte Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt.

PKC $\alpha$ -AS-ODN erhöht die Menge an synthetisierter bzw. in der Zelle befindlicher IL-2-mRNA (Bande 6). Aus der semiquantitativen Analyse (Abbildung 20 A) des Anstiegs ergab sich ein Faktor von 1,4 in Bezug auf die stimulierte Kontrolle. Dies korreliert mit den Ergebnissen der IL-2-Promotoraktivität. PKC $\beta$ -AS-ODN dagegen erniedrigt die Menge an IL-2-mRNA in der Zelle (Bande 8) - ebenfalls übereinstimmend mit den Daten der IL-2-Promotoraktivität. Gegenüber der stimulierten Kontrolle ergab sich eine mittlere Reduktion auf ca. 60 %.



**Abbildung 21: PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN inhibieren die TZR/CD28-induzierte Synthese der IFN- $\gamma$ -mRNA**

Jurkat T-Zellen wurden in Gegenwart von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -AS-ODN elektroporiert und 48 Stunden nach der Transfektion für 1 Stunde über den TZR/CD28 aktiviert. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR mit spezifischen Primern der IFN- $\gamma$  und GAPDH-mRNA wurden laut Kapitel 2.2.12 durchgeführt. Das gezeigte UV-Bild steht für drei unabhängige Versuche.

Im Vergleich zur IL-2-mRNA sollte auch der Gehalt an IFN- $\gamma$ -mRNA in der Zelle erfaßt werden. Abbildung 21 zeigt, daß die einstündige Aktivierung von Jurkat T-Zellen über den TZR/CD28 zur Synthese von IFN- $\gamma$ -mRNA führte (Bande 2). Die Elektroporation allein hatte darauf keinen Einfluß (Bande 4). Sowohl PKC $\alpha$ - als auch PKC $\beta$ -AS-ODN inhibierten die Induktion der IFN- $\gamma$ -mRNA (Banden 6 und 8). Die Menge an IFN- $\gamma$ -mRNA lag in diesen Proben ebenso unter der Nachweisgrenze wie in den nicht-stimulierten Kontrollen (Banden 1, 3, 5 und 7).

### **3.6.1 Zusammenfassung**

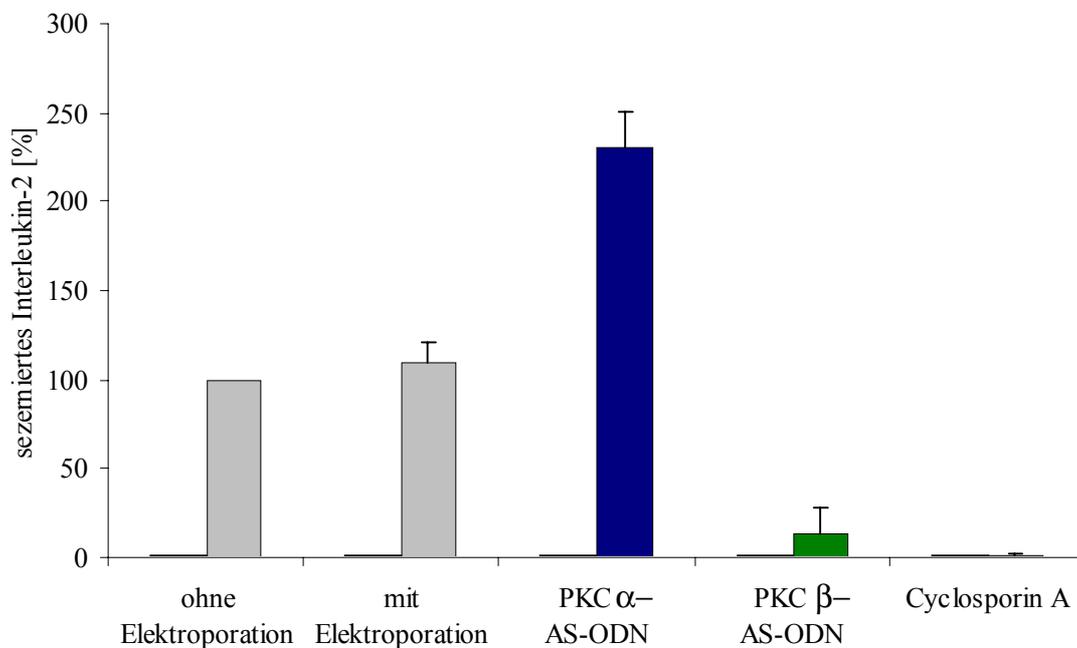
Der TZR/CD28-induzierte Anstieg des IL-2-mRNA-Gehalts ist bei einer Verringerung von PKC $\alpha$ -Protein moderat erhöht und bei einer Verringerung von PKC $\beta$ -Protein erniedrigt.

Die TZR/CD28-induzierte Synthese von IFN- $\gamma$ -mRNA wird dagegen durch die Reduktion beider PKC-Isoenzyme inhibiert.

### 3.7 Die Interleukin-2-Sekretion unterliegt der Regulation durch PKC $\alpha$ und PKC $\beta$

Nach der Betrachtung der IL-2-Promotoraktivität und der IL-2-mRNA-Synthese wurde zum Abschluß die Sekretion des Zytokins IL-2 untersucht.

Jurkat T-Zellen wurden wie üblich über den TZR/CD28 aktiviert und die Menge an sezerniertem IL-2 in einem sogenannten „Sandwich“-ELISA quantifiziert (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Die TZR/CD28-induzierte Interleukin-2-Sekretion wird durch PKC $\alpha$ -AS-ODN verstärkt und durch PKC $\beta$ -AS-ODN vollständig gehemmt**

Jurkat T-Zellen wurden 12 Stunden mit OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern stimuliert. Die IL-2-Menge im Zellüberstand wurde im ELISA gegen einen Standard von rekombinanten humanen IL-2 gemessen. Die IL-2-Konzentration der stimulierten, nichtelektroporierten Probe ( $\approx$  30 pg/ml) wurde als 100 % definiert. Das gezeigte Ergebnis steht für 5 unabhängige Experimente.

Eine Stimulation der Zellen über 12 Stunden induzierte die Sekretion von 30 pg/ml IL-2, unabhängig davon, ob zuvor elektroporiert wurde oder nicht. PKC $\alpha$ -AS-ODN verursachte eine Erhöhung der IL-2-Sekretion um mehr als das Doppelte (230 % mit  $s = 20$ ).

In Gegenwart von PKC $\beta$ -AS-ODN lag die Menge an IL-2 im Zellüberstand in 4 von 5 Experimenten unter der Nachweisgrenze. Diese vollständige Inhibierung der IL-2-Sekretion ließ sich auch erzielen, wenn die Zellen parallel zur Stimulation mit 200 ng/ml Cyclosporin A inkubiert wurden. Unter Berücksichtigung des fünften Experiments, bei dem die sezernierte IL-2-Menge 67 % des Ausgangswertes erreichte, ergab sich ein Mittelwert von 13 % mit  $s = 15$ .

### 3.7.1 Zusammenfassung

Eine Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein in der Zelle steigert die TZR/CD28-induzierte IL-2-Sekretion.

In Gegenwart von PKC $\beta$ -AS-ODN liegt die Menge an IL-2 im Zellüberstand ebenso unter der Nachweisgrenze wie bei Inkubation mit 200 ng/ml Cyclosporin A.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Anwendung der Antisense-Technologie

Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten über den TZR/CD3-Komplex und CD28 wird eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die das externe Signal intrazellulär weiterleiten. Proteinkinase C-Isoenzymen wird eine zentrale Rolle innerhalb dieses Geschehens zugesprochen. Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, sollte gezielt die Funktion einzelner PKC-Isoenzyme beleuchtet werden. Die grundsätzliche Schwierigkeit solcher Untersuchungen ist die Wahl geeigneter Mittel, um *de facto* spezifisch zu arbeiten.

Um die Rolle von Enzymen in einer Zelle zu untersuchen, werden gewöhnlich Inhibitoren eingesetzt. Die durch den Inhibitor erzielten Effekte werden analysiert und die Funktion des Enzyms im Umkehrschluß definiert. Herkömmliche Inhibitoren haben jedoch nur allzu oft den Nachteil, daß sie nicht spezifisch genug sind.<sup>158</sup> PKC-Inhibitoren beispielsweise wirken zwar mitunter recht gezielt auf einzelne PKC-Isoenzyme oder Isoenzymgruppen, der Effekt ist aber konzentrationsabhängig und die Substanzen haben eine geringe therapeutische Breite. Wird die notwendige intrazelluläre Konzentration nicht optimal erreicht, wirkt sich der Inhibitor auch auf andere Isoformen oder sogar andere Enzyme aus. Das hängt damit zusammen, daß derartige Inhibitoren meist strukturgebunden wirken und sich funktionell verschiedene Enzyme in den für den Inhibitor relevanten Bereichen sehr ähneln können. Oft kann gar nicht eingeschätzt werden, auf welche Palette von Enzymen in der Zelle sich ein Inhibitor möglicherweise auswirkt.

Die vorliegend verwendete Methode arbeitet nach einem völlig anderen Prinzip. Hier werden Antisense-Oligodesoxynukleotide (AS-ODN) in die Zelle hineingeschleust. Sie haben eine komplementäre Struktur zur mRNA des betroffenen Zielproteins. Es werden Hybride zwischen AS-ODN und mRNA gebildet, die die anschließende Translation verhindern. Mehrere Mechanismen wurden vorgeschlagen.<sup>159</sup> Dazu zählen die Inhibierung von Prä-mRNA-Prozessierungsschritten wie dem Anhängen der Cap-Struktur, der Polyadenylierung oder dem Spleißen. Möglicherweise verhindern sterische Effekte die Bindung von Translationsfaktoren. Denkbar wäre auch ein verminderter Transport vom

Kern zum Ribosom oder eine reduzierte mRNA-Bindung an das Ribosom. Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Antisense-Wirkung scheint allerdings die Induktion der RNase H-vermittelten Spaltung doppelsträngiger mRNA-Bereiche zu sein.<sup>170</sup> Hintergrund ist, daß doppelsträngige RNA oft viraler Herkunft ist und die Zelle sich auf diese Weise vor der Synthese viraler Proteine schützt.

Die Verwendung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden wurde 1978 erstmals beschrieben und bildet die Grundlage der Antisense-Therapie.<sup>160,161</sup> Die Sequenz der AS-ODN kann sehr spezifisch gewählt werden. Eventuelle Sequenzähnlichkeiten von mRNAs können in einer Datenbank überprüft werden. Der Effekt ist konzentrationsabhängig.<sup>162</sup> Je nach Menge der eingesetzten ODN kann die Translation der gesamten mRNA unterbunden werden. Durch den Einbau von Phosphothioatresten in jedes Nukleotid des Oligomers (Abbildung 2) wird die Affinität zur mRNA und der Widerstand gegenüber intrazellulären Endonukleasen erhöht.<sup>163,164</sup> Die Transfektionsbedingungen wurden empirisch ermittelt, da auch Zelltyp, Kulturbedingungen, Oligomersequenz und -länge sowie die Temperatur Einfluß auf die Effizienz der AS-ODN-Aufnahme nehmen.<sup>165, 166</sup>

Durch Elektroporation können die recht kleinen Oligomere mit hoher Effizienz in die Zellen eingebracht werden. Aufgrund der hohen Aufreinigung sind toxische Effekte durch die AS-ODN selbst eher selten. Die Antisense-Technologie hat damit auf der Hand liegende Vorteile gegenüber herkömmlichen Inhibitoren. Des weiteren stellt sie eine echte Alternative zu Klonierungen dar, bei denen beispielsweise dominant negative Mutanten eines Enzyms hergestellt werden. Es entfällt eine zeitintensive Herstellung stabiler Transfektanten und die anschließende Charakterisierung der Klone. Die verwendeten AS-ODN sind zudem um ein Vielfaches kleiner als Plasmide und die Transfektionseffizienzen entsprechend höher. Die zeitlich eng begrenzte Wirkung der AS-ODN ist dagegen ein Nachteil. Sie kommt dadurch zustande, daß einerseits mit fortschreitender Zeit zwar endogenes Zielprotein abgebaut wird, andererseits aber die Konzentration an AS-ODN durch intrazellulären Abbau sinkt.<sup>163</sup> Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die transfizierten Zellen lange vor der Untersuchung einer artifiziellen Situation ausgesetzt waren, in der ihnen innerhalb von 48 Stunden die konstitutiv exprimierte PKC $\alpha$  bzw. PKC $\beta$  entzogen wurde.

Die FACS-Untersuchungen (Abbildung 3) zeigen, daß PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN durch Elektroporation mit gleicher Effizienz in Jurkat T-Zellen eingebracht werden kön-

nen. 24 und 48 Stunden nach der Transfektion zeigen sich dagegen erste Unterscheide. Die Menge an PKC $\alpha$ -AS-ODN in der Zelle nimmt schneller und in stärkerem Maße ab. Ein möglicher Grund wäre, daß PKC $\alpha$ -AS-ODN sequenzbedingt leichter durch zelluläre Nukleasen abgebaut oder aber auch schneller aus der Zelle herausgeschleust werden kann. Es könnten auch insbesondere die Zellen absterben, die höhere Mengen an PKC $\alpha$ -AS-ODN tragen, da das PKC $\alpha$ -Isoenzym eine vorherrschende Rolle in Jurkat T-Zellen einnimmt.<sup>132</sup> Dafür würde auch sprechen, daß sich das Verteilungsprofil der Fluoreszenzintensität unter diesen Zellen innerhalb von 24 Stunden wesentlich ändert. An dem zum Zeitpunkt  $t = 0$  vorhandenen Plateau zu erkennen, tragen die Zellen unterschiedliche Mengen an Fluoreszenzmolekülen. Das ausgeprägte Maximum nach 24 Stunden zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt nur noch wenige Zellen eine vom Mittel abweichende Fluoreszenzintensität haben und die Zellpopulation somit wesentlich homogener geworden ist. Gleichzeitig verschiebt sich die Kurve zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten hin. Folglich verkleinert sich vornehmlich der Anteil der Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität.

Daß die Menge an PKC $\alpha$ -AS-ODN schneller und in stärkerem Maße abnimmt, spiegelt sich auch im Proliferationsverhalten der Jurkat T-Zellen wider (Abbildung 7A+B). Zellen mit AS-ODN zeigen ein verlangsamtes exponentielles Wachstum verglichen mit den Kontrollzellen. Dieser Effekt ist bei vorheriger Elektroporation mit PKC $\alpha$ -AS-ODN deutlich ausgeprägter als bei PKC $\beta$ -AS-ODN, vermutlich, weil die Zellen laut Abbildung 3 eine geringere Menge an AS-ODN tragen. Abbildung 6 verdeutlicht, daß die Unterschiede im Proliferationsverhalten auf die Wirkung der AS-ODN über die Zeit zurückzuführen sind und nicht auf die Elektroporation selbst.

Die Elektroporation mit FITC-Dextran wurde dazu herangezogen, die auf den Eigenschaften der AS-ODN beruhenden Einflüsse zu erfassen. Die Verschiebung der Fluoreszenzintensität ist direkt nach der Elektroporation bei FITC-Dextran um einiges geringer. Die verschiedenen Transfektionseffizienzen könnten durch unterschiedliche Ladung, Osmolarität und Molekülstruktur bedingt sein. Der Abbau von FITC-Dextran, als Abnahme der Fluoreszenzintensität sichtbar, ist dagegen mit dem der AS-ODN vergleichbar.

Ohne Elektroporation kommt es zu keiner nennenswerten Aufnahme von FITC-markierten PKC $\beta$ -AS-ODN in die Zellen (Abbildung 3). Der Anteil fluoreszenzpositiver Zellen bleibt zudem über 48 Stunden konstant. Es wurde erwartet, daß auch hier intrazelluläre Enzymsysteme die AS-ODN abbauen bzw. herausschleusen und daß die Fluoreszenzintensität dadurch mit der Zeit abnimmt. Dies ist offensichtlich nicht der Fall und

spricht dafür, daß es sich nicht um aufgenommene AS-ODN handelt. Es wird vielmehr vermutet, daß die FITC-Moleküle lediglich außen an die Zellen adsorbieren und auch durch die Waschprozedur nicht entfernt werden konnten.<sup>167</sup> Ihr Anteil an der Fluoreszenzintensität wird in allen Proben und zu allen Zeiten als gleich hoch postuliert. Daß bereits zum Zeitpunkt  $t = 0$  fluoreszenzpositive Zellen vorhanden sind, ist ein weiterer Hinweis. Es ist recht unwahrscheinlich, daß die AS-ODN so schnell unspezifisch in die Zelle aufgenommen werden können. Ohne Elektroporation verursachten die AS-ODN zudem keinerlei Effekte in den Zellen (Daten nicht gezeigt). In der Literatur finden sich einige Beispiele, bei denen AS-ODN ohne Transfektion – vermutlich durch Endozytose – in Zellen aufgenommen wurden. Die extrazellulären Konzentrationen lagen in diesen Fällen um ein Vielfaches höher. Der Prozeß wurde als energie- und temperaturabhängig beschrieben.<sup>166</sup> Die Aufnahme ohne Transfektion ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von AS-ODN in der Antisense-Therapie.

Abbildung 5 macht deutlich, daß mit Hilfe der Antisense-Technologie die Menge des Zielproteins deutlich reduziert werden kann. Auch bei Enzymen mit sehr ähnlichen Sequenzen - wie es bei PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  der Fall ist - kann eine Neusynthese demnach spezifisch unterbunden werden. Trotz dieser Spezifität der AS-ODN muß beachtet werden, daß immunologische Verfahren nur bedingt zum Nachweis der jeweiligen Proteine geeignet sind. Das hat zwei hauptsächliche Gründe: Wegen des endogen noch vorhandenen Proteins und seiner Halbwertszeit von 24 Stunden kann innerhalb des gewählten Zeitrahmens von 48 Stunden keine Reduktion der Proteinmenge auf Null erfolgen.<sup>168,169</sup> Die eingesetzten Antikörper erkennen des weiteren ihre Zielproteine über Epitope, so daß es leicht zu Kreuzreaktionen kommen kann. Der Antikörper gegen PKC $\alpha$  bindet beispielsweise auch an die strukturell sehr ähnliche Isoform PKC $\beta$ . Obwohl die AS-ODN also sehr spezifisch wirken, da sie sich an der Sequenz orientieren, kann dieser spezifische Effekt immunologisch nur eingeschränkt nachgewiesen werden.

Es wurde versucht, auf mRNA-Ebene den Nachweis zu erbringen, daß die AS-ODN nicht nur in die Zelle hineingeschleust werden, sondern tatsächlich Hybride mit der mRNA ausbilden und so zur Inhibierung der Proteinneusynthese führen. Durch die doppelsträngigen RNA-Bereiche sollte die RNase H aktiviert und die Degradation der PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -mRNA induziert werden. In einer nach Kapitel 2.2.12 durchgeführten

PCR mit spezifischen Primern der PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -mRNA war allerdings keine Reduktion des mRNA-Gehalts erkennbar. Es wurde vermutet, daß Jurkat T-Zellen RNA/DNA-Hybride eventuell nicht in detektierbarem Maße abbauen. Ein anderer Grund könnte der Zeitpunkt sein, zu dem der mRNA-Gehalt überprüft wurde. Das Maximum der mRNA-Reduktion ist laut Literatur zwischen 12 und 24 Stunden Posttransfektionszeit anzusiedeln. Nach 48 Stunden hat die mRNA-Menge oft bereits wieder ursprüngliche Werte angenommen, da zu diesem Zeitpunkt schon ein großer Teil der AS-ODN abgebaut ist und somit keine Hybride mehr gebildet werden.<sup>170</sup> Die RNA-Isolierung wurde im vorliegenden Fall parallel zur Aufarbeitung der Zellen, also erst nach 48 Stunden Posttransfektionszeit, durchgeführt.

Bei Verwendung von Plasmiden, die eine Kopie des korrespondierenden Gens in Antisense-Orientierung tragen, konnte – vermutlich wegen der höheren Zahl an Antisense-RNA-Molekülen und der kontinuierlichen Transkriptionsaktivität – eine Reduktion der mRNA mittels Northernblot nachgewiesen werden.<sup>171</sup>

Die Immunmarkierung der PKC-Isoenzyme hat sich nicht in jedem Experiment als Nachweis für eine tatsächliche Reduktion der Proteinmengen in den Zellen bewährt. Aus Abbildung 7A geht aber hervor, daß Jurkat T-Zellen unter der Wirkung von PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN ein verlangsamtes exponentielles Wachstum zeigen. Die Zellzahlen erhöhen sich innerhalb von 48 Stunden kaum. Nach mehr als 50 Stunden steigt die Geschwindigkeit des exponentiellen Wachstums auf die ursprünglichen Werte an. Die Zellzahlen nach 48 Stunden wurden daher als weiteres Indiz für die erfolgreiche Transfektion mit AS-ODN hinzugezogen. Durch die Elektroporation selbst wird das exponentielle Wachstum der Zellen nur geringfügig eingeschränkt. Es handelt sich vermutlich lediglich um eine leichte zeitliche Verzögerung des Wachstums. Diese wird darin begründet sein, daß mit der Elektroporation viele Substanzen in die Zelle hineingelangen, die in den ersten Stunden wieder aus der Zelle herausgeschleust werden.

Auch in anderen Zellen findet sich ein vermindertes Zellwachstum nach Reduktion von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -Protein.<sup>172, 173</sup> Durch chronische Gabe von Phorbolestern kann die Menge an PKC-Isoenzymen in Jurkat T-Zellen gesenkt werden, was ebenfalls zu einem verlangsamten Zellwachstum führt.<sup>174</sup> Das hier verwendete PKC $\alpha$ -AS-ODN findet darüber hinaus unter dem Namen ISIS 3521 (ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, USA) klinische Anwendung bei Tumorpatienten. Die Ergebnisse der klinischen Studien unterstüt-

zen die Vermutung, daß die Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein ein deutlich vermindertes Zellwachstum verursacht.<sup>175,176</sup>

## 4.2 PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ als Regulatoren der MAPK-Kaskaden und NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Innerhalb der ERK-Kaskade wurde die Aktivierung der MAPK ERK-1/2 als erstes betrachtet, da durch den Aufbau der MAPK-Kaskaden in Form von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen eine deutliche Signalverstärkung zu abwärts gelegenen Ebenen erwartet wird. Diese Amplifizierung kommt dadurch zustande, daß jedes Molekül einer Ebene mehrere Moleküle der nachfolgenden Ebene aktivieren kann (Multiplikatorfunktion).

Die Aktivierung der T-Zellen im Modell sollte sich möglichst weitgehend an der physiologischen Situation orientieren. Mit der Stimulation durch OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörper konnten ERK-1/2 phosphoryliert und damit aktiviert werden, während ohne Stimulation kein phospho-ERK-1/2 detektierbar war (Abbildung 8). Die Verwendung der Antikörper stellte sich somit als geeignetes Mittel zur Nachahmung der Besetzung des TZR/CD3-Komplexes und CD28-Korezeptors dar. Die Anwesenheit beider PKC-AS-ODN führte zur Verminderung der ERK-Phosphorylierung. Im Umkehrschluß kann davon ausgegangen werden, daß PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  für die Aktivierung von ERK-1/2 in Jurkat T-Zellen notwendig sind. PKC $\beta$  könnte bei genauer Betrachtung einen minimal stärkeren Effekt auf ERK-2 ausüben.

Auf der der ERK übergeordneten Ebene zeigt sich das gleiche Bild: PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  sind für die Aktivierung der MAPKK-Isoformen MEK1 und MEK2 notwendig, da in der Gegenwart der AS-ODN eine verminderte Phosphorylierung stattfindet. PKC $\beta$  hat auch hier einen etwas stärkeren Effekt. Die beiden Isoformen MEK1 und MEK2 lassen sich wegen ihrer ähnlichen Molekulargewichte von 45 und 46 kDa optisch kaum voneinander unterscheiden.<sup>177</sup> Ergänzend sei zu erwähnen, daß konstitutiv aktive Mutanten der PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  laut Literatur in der Lage sind, ERK-2 und MEK-1 in Gegenwart von TPA zu aktivieren.<sup>178</sup>

Zur Vervollständigung der Daten wurde schließlich die Ebene der MAPKKK c-Raf-1 betrachtet. c-Raf-1 liegt bereits in inaktiver Form phosphoryliert vor und wird im Zuge der Stimulation und damit der Aktivierung hyperphosphoryliert. Die dadurch bedingte Erhöhung des apparenten Molekulargewichts ist im SDS-Gel sichtbar. In Gegenwart der AS-ODN findet die Hyperphosphorylierung von c-Raf-1 nur eingeschränkt statt. Auffällig ist, daß auch in nichtstimulierten Zellen die Menge an phosphoryliertem c-Raf-1 geringer ist. PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  könnten demnach nicht nur für die TZR/CD28-induzierte Hyperphosphorylierung, sondern auch für die konstitutive Phosphorylierung von c-Raf-1 verantwortlich sein.

PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  haben auf alle Ebenen der ERK-Kaskade eine übereinstimmende Wirkung. Es ist zwar denkbar, wird aber für unwahrscheinlich gehalten, daß die beiden Enzyme auf jeder Ebene neu ihren Effekt ausüben. Es handelt sich vermutlich eher um einen Eingriff auf oder oberhalb der MAPKKK-Ebene, der sich auf alle nachfolgenden Ebenen auswirkt. Da PKCs selbst Kinasen sind, könnte es sich hier um einen direkten Einfluß auf c-Raf-1 handeln. In NIH3T3-Zellen wurde eine Phosphorylierung von c-Raf-1 an Ser259 und Ser499 durch die PKC $\alpha$  beschrieben.<sup>179,180,181</sup> In der Literatur finden sich Hinweise darauf, daß die c-Raf-1-Phosphorylierung an Ser259 die funktionelle Interaktion zwischen c-Raf-1 und MEK reguliert.<sup>179</sup> Unter AS-ODN-Behandlung wird c-Raf-1 nur vermindert aktiviert. Folglich ist auch die Assoziation mit MEK eingeschränkt, so daß MEK ebenfalls eine verminderte Aktivierung zeigen sollte. Dies ist in Anwesenheit der AS-ODN tatsächlich der Fall. Die geringere MEK-Aktivierung kann also sowohl mit einem direkten als auch mit einem indirekten Einfluß der PKCs erklärt werden. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, daß c-Raf-1 und auch Ras Proto-Onkogene sind. In der Beeinflussung dieser Proteine durch PKC $\alpha$  und  $\beta$  könnte das veränderte Proliferationsverhalten von Jurkat T-Zellen unter Antisense-Behandlung begründet sein. Die vorliegenden Ergebnisse schließen somit nicht aus, daß – wie bereits von einigen Autoren vorgeschlagen – die Regulation durch PKCs zusätzlich oberhalb von Ras einsetzt.<sup>182,183,184,185</sup>

Bei der p38 MAPK-Kaskade wurde die Aktivierung der p38 MAPK ebenfalls vorrangig untersucht. Weder PKC $\alpha$ - noch PKC $\beta$ -AS-ODN veränderten die TZR/CD28-induzierte p38 MAPK-Phosphorylierung (Abbildung 9). Daraus läßt sich ableiten, daß keines der beiden PKC-Isoenzyme in die Regulation dieses Signalweges involviert ist. Die geringe Menge an phosphorylierter p38 MAPK in nichtstimulierten Proben könnte auf die Auslö-

sung eines Streßsignals in den Zellen – beispielsweise durch mechanische Beanspruchung während der Versuchsdurchführung – zurückzuführen sein.

Die aufwärts gelegenen Proteinkinasen wurden aus zweierlei Gründen nicht betrachtet. Zum einen wird wegen der Multiplikatorfunktion auf höheren Ebenen eine schwächere Wirkung erwartet als bei der MAPK. Hier ist aber schon kein Effekt auszumachen. Zum anderen zeigen einige MAPKK wie MKK-4 eine geringere Substratspezifität, so daß es zu Querverbindungen mit anderen Kaskaden kommen kann. Ein eventueller Effekt auf MAPKK- Ebene könnte wegen der Querverbindungen daher nicht uneingeschränkt der p38 MAPK-Kaskade zugeordnet werden.

Beim dritten Signalweg (Abbildung 10) wurde zunächst die Aktivität der MAPK JNK analysiert. Die Aktivitätsbestimmung wurde zum Schutz des Experimentators nicht mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt, sondern bestand aus einer Kombination von nichtradioaktivem *in vitro*-Versuch und Immunmarkierung. PKC $\beta$  hat offensichtlich einen maßgeblichen Einfluß auf die JNK-Aktivität, da die c-Jun-Phosphorylierung unter reduzierten PKC $\beta$ -Proteinmengen stark verringert ist. Es darf vorausgesetzt werden, daß davon auch die Aktivierung der JNK betroffen ist. Analog führt die Überexpression von PKC $\beta$ I in COS-7-Zellen zu einer erhöhten JNK-Aktivität.<sup>186</sup> Interessanterweise hat die Behandlung mit PKC $\alpha$ -AS-ODN auf diese Kaskade in Jurkat T-Zellen keine Konsequenzen.

Das gleiche Resultat findet sich auf der übergeordneten Ebene bei der MKK-4-Aktivierung. Mit der Reduktion von PKC $\beta$ -Protein ist die Phosphorylierung von MKK-4 erheblich herabgesetzt, während die Reduktion von PKC $\alpha$  irrelevant ist. Die beiden PKC-Isoenzyme wirken auf diese Kaskade demnach nicht übereinstimmend. PKC $\alpha$  bleibt trotz seiner vorherrschenden Rolle in der Jurkat T-Zelle zumindest auf der JNK-Kaskade ohne Wirkung. Die MAPKK MKK-4 verwendet JNK und p38 MAPK als Substrat. Da keines der beiden PKC-Isoenzyme die p38 MAPK-Phosphorylierung reguliert, wird die Veränderung der MKK-4-Aktivierung nur der JNK-Kaskade zuzuordnen sein.

Auf Ebene der MAPKKK wurde eine mögliche Beteiligung der PKC-Isoenzyme nicht untersucht. Anders als bei der ERK-Kaskade, wo hauptsächlich c-Raf-1 als MAPKKK in Erscheinung tritt, können der JNK-Kaskade mehrere Kinasen (MEKK-1 bis MEKK-4, MLK-3 und DLK) zugeordnet werden. Gleichzeitig regulieren diese Kinasen auch Enzyme der ERK- und der p38 MAPK-Kaskade. Durch diese Querverbindungen können

mögliche Effekte durch PKC $\alpha$  oder PKC $\beta$  der JNK-Kaskade nicht eindeutig zugeordnet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß PKC $\alpha$  und  $\beta$  nicht unspezifisch alle MAPK-Kaskaden regulieren.

PKC $\alpha$  hat auf allen Ebenen der ERK-Kaskade (c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2) denselben Effekt. Gleichermäßen verhält es sich bei der PKC $\beta$ . PKC $\beta$  hat noch dazu dieselbe Wirkung auf die MKK-4-Aktivierung und die JNK-Aktivität. Daher wurde vermutet, daß der Einfluß der PKC-Isoenzyme nicht auf jeder Kaskadenebene neu, sondern einmalig auf die bzw. oberhalb der MAPKKK ausgeübt wird.<sup>178</sup>

PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN wirken in unterschiedlicher Weise auf die Aktivierung der JNK-Kaskade. Dies demonstriert die Spezifität der angewendeten Antisense-Technologie.

Die PKC-Isoenzyme haben eine Halbwertszeit von ca. 24 Stunden. 48 Stunden nach der Transfektion mit AS-ODN sollte die Proteinmenge demnach nur noch ein Viertel des Ausgangswertes betragen. Die Verwendung der AS-ODN zeigt, daß die Reduktion der Proteinmenge auf ein Viertel für eine komplette Hemmung von Signalwegen ausreichen kann. Sinkt die Gesamtmenge an PKC-Protein also unter einen bestimmten Schwellenwert, ist die Regulation der Signalwege nicht mehr gewährleistet. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß nicht das gesamte Protein, sondern nur ein Teil, für die Regulation der MAPK-Kaskaden verantwortlich ist. Denn in einem solchen Fall sinkt bei einer Reduktion der gesamten PKC-Proteinmenge auch der für die Regulation der Signalwege genutzte Teil schneller unter den kritischen Schwellenwert. Das restliche PKC-Protein könnte entweder für die Abwicklung anderer Prozesse genutzt werden oder auch zeitlich kurz hintereinandergeschaltete Signalinitiierungen ermöglichen.

Übertragen auf die Immunpräzipitation bedeutet dies, daß auch nur ein geringer Teil des PKC-Proteins an die Membran zu translozieren braucht, um externe Signale intern weiterzuleiten. Um mögliche Assoziationen dennoch nachweisen zu können, wurden der Kombination aus OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern geringe Mengen TPA (2,5 ng/ml) zugesetzt. TPA bindet direkt an PKC-Isoenzyme und fördert deren Translokation an die Membran.<sup>124</sup> Im Gegensatz zu DAG wird es in der Zelle nicht metabolisiert, so daß das

initiierte Signal verstärkt wird und länger anhält. Demnach verbleibt die PKC über einen längeren Zeitraum an der Membran und kann über Isolierung der Membranfraktion erfaßt werden. Durch die T-Zell-Aktivierung mit TPA und Ionomycin wird die Signalstärke weiter gesteigert. Stets wurde bei Verwendung von OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA oder TPA/Ionomycin die Aktivierung mit OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern vergleichend hinzugezogen.

Durch OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA über 15 Minuten translozierte PKC $\beta$  nachweislich an die Plasmamembran von Jurkat T-Zellen (Abbildung 11). Zusammen mit dem PKC-Isoenzym konnten auch die MAPKKK c-Raf-1 und die MAPKK MEK-1 und/oder MEK-2 in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Da bei der Immunpräzipitation ein Antikörper verwendet wurde, der die beiden Isoformen MEK-1 und MEK-2 erkennt, konnte nicht differenziert werden, ob PKC $\beta$  lediglich mit einem der beiden Proteine oder mit beiden assoziierte. In nichtstimulierten Zellen ist PKC $\beta$  im Zytosol lokalisiert und deshalb nicht in den Immunpräzipitaten zu finden. Anhand dieser Daten läßt sich ableiten, daß PKC-Isoenzym und Proteinkinasen durch die Stimulation aktiviert werden, zur Plasmamembran translozieren und dort assoziieren. In der Literatur finden sich einige Hinweise auf ähnliche Komplexbildungen. Sie könnten der schnelleren Signalweiterleitung dienen, da die Enzyme in räumliche Nähe zueinander gerückt werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß neben PKC $\beta$ , c-Raf-1 und MEK-1/2 noch weitere Proteine im Komplex anwesend sind, nach denen nur nicht gesucht wurde. Denkbar wäre, daß sich im Zuge der Aktivierung - oder auch schon vorher - übergeordnete Strukturen bilden, in die auch die ERK miteinbezogen ist (vgl. Kapitel 1.2, Seite 18). MEK-1/2 wurde nicht in einer Immunmarkierung nachgewiesen, da sich das Molekulargewicht mit dem der leichten Immunglobulinkette deckt.

Auch nach 8 Minuten Stimulation mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA war bereits eine Translokation von PKC $\beta$  an die Plasmamembran zu beobachten (Abbildung 12).

Nach Immunpräzipitation mit MEKK-1-Antiserum konnte PKC $\beta$  in den stimulierten Proben nachgewiesen werden. Auch diese beiden Proteine sind offensichtlich nach einer Aktivierung der Jurkat T-Zellen an der Plasmamembran assoziiert.

Versuche mit Antiseren sind nicht eindeutig verwertbar, da andere darin enthaltene Immunglobuline in erheblichem Maß zur Bindung von PKC $\beta$  beitragen und so den Ein-

druck erwecken könnten, daß es sich um eine spezifische Assoziationen zwischen MEKK-1-Antikörpern und PKC-Isoenzymen handelt. Allerdings finden sich auch in der Literatur Hinweise auf eine direkte Interaktion von PKC $\beta$  mit MEKK-1, und zwar bei der Regulation der JNK-Kaskade in humanen myeloiden leukämischen Zellen.<sup>187</sup> Darüber hinaus konnte PKC $\beta$  nicht in mit normalem Kaninchenserum behandelten Proben nachgewiesen werden.

Bei PKC $\alpha$  gab es ungleich größere Schwierigkeiten, das Protein an der Membran zu isolieren. Möglicherweise ist die physikalische Bindung von PKC $\alpha$  an die Membran schwächer als bei PKC $\beta$ . Denkbar wäre auch, daß die zur Signalregulierung verwendete Proteinmenge bei PKC $\alpha$  geringer ist als bei PKC $\beta$ . In einer Kinetik wurde zudem deutlich, daß PKC $\alpha$  bereits nach 4 Minuten an die Membran translozierte, dort kurze Zeit später aber schon nicht mehr nachweisbar war. Daß PKC $\alpha$  wesentlich schneller an die Membran transloziert und dort im Gegensatz zu PKC $\beta$  nur kurzfristig verbleibt, wurde bereits beschrieben.<sup>125,188</sup> Doch auch nach einer Verkürzung der Stimulationszeit war die PKC $\alpha$ -Menge an der Membran noch relativ gering. Daher wurde eine Stimulation mit TPA/Ionomyzin vergleichend hinzugezogen. Hier ist die Signalstärke von vornherein höher und es kann in Kauf genommen werden, daß nur ein geringerer Teil des Proteins durch das Versuchsprozedere isoliert wird.

Zunächst wurde Membranprotein mit einem Antikörper gegen c-Raf-1 inkubiert und PKC $\alpha$  in einer Immunmarkierung nachgewiesen (Abbildung 13A). Es wird deutlich, daß PKC $\alpha$  nur nach Aktivierung der Jurkat T-Zellen in den c-Raf-1-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden kann. Unter Stimulation mit TPA/Ionomyzin ist eine wesentlich höhere Proteinmenge detektierbar als bei Verwendung von OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß PKC $\alpha$  nach Aktivierung an die Plasmamembran transloziert und dort mit c-Raf-1 assoziiert.

Abbildung 13B zeigt die Immunpräzipitation mit einem PKC $\alpha$ -Antikörper und Nachweis von c-Raf-1. c-Raf-1 kann im Membranprotein von Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden und wird nach Aktivierung mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA oder TPA/Ionomyzin hyperphosphoryliert („Membranprotein ohne IP“).

c-Raf-1 findet sich in geringer Menge auch in den PKC $\alpha$ -Immunpräzipitaten. Die beiden Proteine c-Raf-1 und PKC $\alpha$  könnten folglich an der Plasmamembran assoziiert sein. Die

in diesen Proben sehr deutliche Erhöhung des apparenten Molekulargewichts nach Stimulation weist auf c-Raf-1 in hyperphosphorylierter Form hin.

Nicht erwartet wurde, daß c-Raf-1 auch ohne Zugabe eines Antikörpers oder nach Inkubation mit einem isotypspezifischen Antikörper und anschließendem Zusatz von Protein G-Sepharose im Membranprotein gefunden wurde. Vermutlich handelt es sich in beiden Fällen um durch Protein G-Sepharose unspezifisch gebundenes c-Raf-1. Auffällig ist, daß nach Stimulation keine Erhöhung des apparenten Molekulargewichts im SDS-Gel erkennbar ist. Es handelt sich hier lediglich um die inaktive Proteinform und nicht um hyperphosphoryliertes c-Raf-1.

Der PKC $\alpha$ -Antikörper kopräzipitiert nach Stimulation hingegen vornehmlich die aktive Form von c-Raf-1.

Einschränkend muß bei allen Immunpräzipitationen bedacht werden, daß die aufgearbeiteten Membranfragmente auch so groß gewesen sein könnten, daß die betrachteten Proteine gemeinsam über jeweils einen Antikörper isoliert werden konnten, obwohl zwischen ihnen keine direkte physikalische Interaktion besteht. Eine endgültige Aussage über die Interaktion zwischen den genannten Proteinen kann erst getroffen werden, wenn andere Methoden wie beispielsweise das „*two-hybrid-System*“ hinzugezogen werden.<sup>189</sup>

Die Assoziation der beiden PKC-Isoenzyme  $\alpha$  und  $\beta$  mit den untersuchten Proteinen ist nach den vorliegenden Ergebnissen ein denkbarer Mechanismus, über den sie ihren regulierenden Einfluß auf die MAPK-Kaskaden ausüben können.

Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung stellt ein wichtiges Ereignis in T-Lymphozyten dar und sollte ebenfalls auf einen möglichen Einfluß durch die PKC-Isoenzyme hin untersucht werden. Zur Charakterisierung wurden die Phosphorylierung und Degradation des I- $\kappa$ B herangezogen.

Aus Abbildung 14 wird deutlich, daß in Jurkat T-Zellen I- $\kappa$ B im Zuge der Stimulation mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA phosphoryliert wird. Keine Phosphorylierung des I- $\kappa$ B findet hingegen statt, wenn die Zellen mit AS-ODN behandelt wurden. Sowohl PKC $\alpha$  als auch PKC $\beta$  sind folglich für die TZR/CD28/TPA-induzierte Phosphorylierung des I- $\kappa$ B notwendig. Vermutlich handelt es sich nicht um einen direkten Einfluß der PKC-Isoenzyme auf den I- $\kappa$ B, sondern um eine Aktivierung der I- $\kappa$ B-Kinasen, die dann ihrerseits in der Lage sind, den I- $\kappa$ B zu phosphorylieren.

Es wurde erwartet, daß sich dieser Einfluß auch bei der Degradation des I- $\kappa$ B bemerkbar macht. Durch Stimulation der Kontrollzellen mit OKT3/ $\alpha$ CD28/TPA sank die Menge nachweisbaren I- $\kappa$ Bs deutlich – ein Hinweis auf die Degradation des Proteins (Abbildung 15). Weder die Behandlung mit PKC $\alpha$ - noch mit PKC $\beta$ -AS-ODN bewirkte eine diesbezügliche Veränderung. Es existiert folglich eine Diskrepanz zwischen der Wirkung der PKC-Isoenzyme auf die I- $\kappa$ B-Phosphorylierung und die I- $\kappa$ B-Degradation.

Dies ist insofern überraschend, als daß die Initiierung der I- $\kappa$ B-Degradation offensichtlich nicht in allen Fällen an die Phosphorylierung geknüpft ist. So ist die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B allein auch nicht für die Freisetzung des Inhibitors aus dem Komplex mit NF- $\kappa$ B und damit für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausreichend.<sup>190,191</sup> PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  tragen zwar zur TZR/CD28/TPA-initiierten Phosphorylierung des I- $\kappa$ B bei; für seine Degradation scheinen aber andere Enzyme verantwortlich zu sein. In den AS-ODN-behandelten Zellen könnte die Degradation trotz fehlender Phosphorylierung durch parallele Wege ausgelöst werden. Mit dem fehlenden Einfluß der PKC $\alpha$  auf die TZR/CD28/TPA-induzierte I- $\kappa$ B-Degradation harmoniert, daß laut Literatur eine konstitutiv aktive Mutante der PKC $\alpha$  allein nicht in der Lage war, die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Jurkat T-Zellen zu induzieren.<sup>115</sup> In Jurkat T-Zellen wird indes die PKC $\theta$  als hauptverantwortliche Isoform für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung angesehen. Eine konstitutiv aktive Mutante der PKC $\theta$  aktiviert die IKK $\beta$  direkt, also parallel zum klassischen Weg über Cot/Tpl und NIK<sup>192,193</sup>

Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist darüber hinaus weitaus komplexer als allgemein angenommen. So können die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 auch völlig unabhängig vom IKK/I- $\kappa$ B-Signalweg phosphoryliert und aktiviert werden.<sup>194</sup> Konvergenzen zwischen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und den MAPK-Kaskaden sind vor allem im Hinblick auf die Regulation durch PKC-Isoenzyme nicht ausgeschlossen.<sup>115</sup> Es findet offensichtlich auch nicht nur eine Translokation von NF- $\kappa$ B statt, sondern I- $\kappa$ B, IKKs und andere phosphorylierende Enzyme können gleichermaßen zwischen zytosolischem und Kernkompartiment hin- und herwechseln.<sup>195,196</sup>

### 4.3 Die Funktion von PKC $\alpha$ und PKC $\beta$ in der IL-2-Genexpression und IL-2-Sekretion

Bisher wurde dargestellt, in welchem Umfang PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  Einfluß auf die Signaltransduktionskaskaden in Jurkat T-Zellen nehmen und über welche Mechanismen sie ihre Wirkung ausüben könnten. Alle beschriebenen Signalwege münden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine Initiierung der Genexpression ermöglichen. In einem weiteren Schritt stellt sich nun die Frage, welchen Zweck die PKCs in bezug auf die funktionellen Aspekte in T-Lymphozyten erfüllen. Die im Mittelpunkt des Interesses stehende IL-2-Genexpression läßt sich auf Ebene der Transkription, Translation und Sekretion untersuchen, wobei die Übergänge teilweise fließend sind. Das gewählte Modell ist zur Nachahmung der physiologischen Situation geeignet, da durch die Kombination aus OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern die IL-2-Genexpression bezüglich aller genannten Teilbereiche induziert werden konnte.

Auf Transkriptionsebene wurden zwei Aspekte betrachtet; die Bindung des Transkriptionsfaktors NFAT und die Aktivität des minimalen IL-2-Promotors, die sich aus dem kooperativen Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren ergibt.

Die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor wird durch den Entzug von PKC $\alpha$ -Protein gefördert (Abbildung 16). Dieses PKC-Isoenzym scheint in Jurkat T-Zellen einen hemmenden Einfluß auf die Bindung von NFAT zu haben, der durch die AS-ODN-Behandlung aufgehoben wird. PKC $\beta$  hingegen trägt zur TZR/CD28-induzierten NFAT-Bindung bei, da verringerte Proteinmengen eine Reduktion der Bindung zur Folge haben.

Die gleiche Modifikation findet sich bei Betrachtung der IL-2-Promotoraktivität (Abbildung 17). Die Reduktion von PKC $\alpha$  fördert die Transkriptionsaktivität, die von PKC $\beta$  reduziert sie. Möglicherweise ist die unter AS-ODN-Behandlung veränderte NFAT-Bindung ursächlich für die Veränderung der IL-2-Promotoraktivität. Die Regulation der IL-2-Promotoraktivität durch die PKC-Isoenzyme ist weniger ausgeprägt als die NFAT-Bindung – vermutlich, weil für die Aktivität des minimalen IL-2-Promotors nicht nur die Bindung von NFAT, sondern auch die Anwesenheit zusätzlicher Transkriptions-

faktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 und Oct-1 erforderlich ist. Über die Regulation von c-Jun könnte PKC $\beta$  auch einen Einfluß auf die Aktivierung von AP-1 haben.

Cyclosporin A verhindert die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von NFAT. Dadurch werden die Translokation des Transkriptionsfaktors und seine Bindung an den IL-2-Promotor gehemmt. Die Eignung des vorliegend verwendeten Modells wird dadurch bekräftigt, daß Cyclosporin A wie in der Literatur beschrieben, die IL-2-Promotoraktivität hemmt.<sup>197,198</sup> Des weiteren spiegelt sich in der Stärke der Cyclosporin A-Wirkung wider, welches Ausmaß die verhinderte NFAT-Bindung auf die IL-2-Promotoraktivität annimmt.

Die Funktion der PKC-Isoenzyme auf Transkriptionsebene sollte durch Bestimmung des mRNA-Gehalts näher charakterisiert werden. Über den TZR/CD28 werden induzierbare Gene wie IL-2 oder IFN- $\gamma$  aktiviert und die entsprechende mRNA synthetisiert (Abbildung 19).<sup>135</sup> Die Synthese nimmt gegenüber dem unveränderten Abbau überhand, so daß von dem mRNA-Gehalt in der Zelle auf die Induktion des betroffenen Gens geschlossen werden konnte. Die Kinetik der TZR/CD28-induzierten mRNA-Synthese ist sowohl bei IFN- $\gamma$  als auch bei IL-2 mit Angaben aus der Literatur vergleichbar.<sup>145</sup> Aus Abbildung 18 wird deutlich, daß mit der PCR-gestützten Methode quantitative Unterschiede in der Expression erfaßt werden konnten. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die Anwendung der semiquantitativen RT-PCR unter ähnlichen Fragestellungen.<sup>60,172,201</sup>

Ein weiterer Punkt untermauert die Zuverlässigkeit des verwendeten Systems: Durch die spezifische Wahl der Primer bei der PCR konnte zwischen den beiden alternativen Spleißformen PKC $\beta$ I und PKC $\beta$ II unterschieden werden. Es stellte sich heraus, daß wie in der Literatur beschrieben lediglich das Isoenzym PKC $\beta$ I in den Jurkat T-Zellen nachgewiesen werden konnte.<sup>131</sup> PKC $\beta$ II konnte selbst nach 40 PCR-Zyklen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion der Zellen mit AS-ODN tangiert nicht die mRNA-Synthese, sondern schlägt sich im Abbau nieder. Durch die Hybridbildung zwischen AS-ODN und mRNA wird die RNase H aktiviert und die mRNA degradiert.<sup>170,199</sup> Dies betrifft natürlich nur die spezifische Ziel-mRNA von PKC $\alpha$  oder PKC $\beta$ , nicht aber die mRNA von IL-2, IFN- $\gamma$  oder GAPDH. Die Degradation von PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -mRNA als Zeichen der Gegenwart von AS-ODN konnte vermutlich aufgrund des zu spät gelegenen Zeitpunkts in der

Praxis nicht beobachtet werden (siehe Seite 91). Veränderungen in der Menge von IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA sind dagegen nicht auf die Hybridbildung mit den AS-ODN zurückzuführen, sondern allem Anschein nach allein auf die Reduktion der PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -Proteinmenge. Diese Veränderungen im mRNA-Gehalt von IL-2 und IFN- $\gamma$  – seien es nun Zunahmen oder Abnahmen – können auf Modifikationen in der mRNA-Synthese, im mRNA-Abbau oder beiden beruhen.

In Gegenwart von PKC $\beta$ -AS-ODN ist die IL-2-mRNA-Menge reduziert (Abbildung 20). Bei flüchtiger Betrachtung des Sachverhalts scheint es sich um eine verminderte IL-2-mRNA-Synthese zu handeln, die durch das Fehlen von PKC $\beta$  zustande kommt. PKC $\beta$  könnte folglich unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Induktion der mRNA-Synthese einnehmen. Gleichmaßen ist es aber denkbar, daß der IL-2-mRNA-Abbau bei Reduktion des PKC-Isoenzym verstärkt ist. PKC $\beta$  könnte in der Zelle direkt oder indirekt zur Stabilisierung der mRNA beitragen und deren Degradation verhindern. Für die JNK-Kaskade wurde bereits ein stabilisierender Effekt auf die IL-2-mRNA von TZR/CD28-aktivierten Jurkat T-Zellen beschrieben. Wird die Aktivierung der JNK-Kaskade verhindert, sinkt die mRNA-Halbwertszeit wieder auf das Niveau der nichtstimulierten Kontrolle.<sup>60</sup> In Kapitel 3.2.3.1 wurde gezeigt, daß die Reduktion von PKC $\beta$  eine verminderte TZR/CD28-induzierte Aktivierung der JNK-Kaskade nach sich zieht. Dadurch bleibt vermutlich auch die stabilisierende Wirkung auf die IL-2-mRNA aus und der mRNA-Gehalt ist in Gegenwart von PKC $\beta$ -AS-ODN deutlich niedriger. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Reduktion von PKC $\beta$ -Protein bereits Auswirkungen auf die Transkription hat, also auf ein vor der IL-2-mRNA-Synthese liegendes Ereignis. Vermutlich beeinflussen PKC $\beta$ -regulierte Enzyme sowohl die Induktion der mRNA-Synthese als auch die mRNA-Stabilisierung. Anzumerken ist, daß durch die Transkription zuerst eine Prä-mRNA gebildet wird. Sie unterliegt einer nukleären Prozessierung und dem anschließenden Transport aus dem Kern. Auch hier sind denkbare Ansatzpunkte der PKC $\beta$ -Regulation.

Für die Wirkung von PKC $\alpha$ -AS-ODN gelten analoge Überlegungen. Der IL-2-mRNA-Gehalt ist in diesem Fall erhöht. PKC $\alpha$  könnte unter physiologischen Bedingungen die mRNA-Synthese erhöhen und/oder den -Abbau erniedrigen. Hinsichtlich der Transkriptionsebene finden sich erneut deutliche Übereinstimmungen.

Cyclosporin A verhindert die TZR/CD28-induzierte Synthese der IL-2-mRNA vollständig.

Die Wirkung der PKC-AS-ODN auf die TZR/CD28-induzierte Synthese der IFN- $\gamma$ -mRNA sollte lediglich vergleichend hinzugezogen werden (Abbildung 21). Das IFN- $\gamma$ -Gen wird wie das IL-2-Gen von einem NFAT- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotor kontrolliert.<sup>200</sup> Der partielle Entzug von PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -Protein senkt den Gehalt an IFN- $\gamma$ -mRNA. Die Ergebnisse zeigen, daß unter Verwendung der PCR-Primer Veränderungen im IL-2- und IFN- $\gamma$ -mRNA-Gehalt spezifisch nachgewiesen werden können.

Die Regulation der JNK-Kaskade könnte eines der Schlüsselereignisse sein, über das die PKC $\beta$  sowohl IL-2-Genexpression als auch IL-2-Synthese beeinflusst. Mehrfach wurde in der Literatur gezeigt, daß die Initiierung der JNK-Kaskade maßgeblich zur vollständigen T-Zell-Aktivierung und Induktion des IL-2-Gens beiträgt. Eine Beeinträchtigung der JNK-Aktivierung durch die Verwendung von dominant negativen Mutanten der MAPKKK MEKK-1 in Jurkat T-Zellen führte – ähnlich wie hier beschrieben – zu einer signifikanten Reduktion von NFAT-Bindung, IL-2-Promotoraktivität und IL-2-mRNA-Synthese.<sup>201</sup> Eine verminderte CD3/CD28-vermittelte IL-2-Produktion ist in MKK-4-defizienten T-Lymphozyten zu beobachten.<sup>202</sup> JNK selbst wird eine Rolle bei der Regulation der Ubiquitinierung von c-Jun und anderen Transkriptionsfaktoren zugesprochen. c-Jun hat eine kurze Halbwertszeit, da es rasch durch einen Ubiquitin-vermittelten Prozeß im Proteasom degradiert wird. Nach ihrer Aktivierung induziert JNK die Phosphorylierung von c-Jun und verhindert dadurch dessen Ubiquitinierung und Abbau. Die Akkumulation des c-Jun-Proteins trägt zu einer erhöhten JNK-stimulierten AP-1-Transkriptionsaktivität bei, die unerlässlich für eine erhöhte IL-2-Promotoraktivität ist.<sup>203</sup>

Im letzten Abschnitt wurde die Funktion der PKC-Isoenzyme im Hinblick auf die Sekretion von IL-2 untersucht. Im Anschluß an die Transkription und mRNA-Prozessierung wird das kodierte Protein IL-2 synthetisiert, in Richtung Zellperipherie transportiert und schließlich sezerniert. Um festzustellen, ob sich die Regulation seitens PKC $\alpha$  und  $\beta$  durch diese Kette von Ereignissen hindurch bemerkbar macht, wurde die IL-2-Sekretion unter dem Einfluß der AS-ODN gemessen.

Der Nachweis von IL-2 mittels „Sandwich“-ELISA ist außerordentlich spezifisch, da gegen zwei Epitope gerichtete Antikörper verwendet werden. Die Zellaktivierung über den TZR/CD28 resultierte bei  $10^6$  eingesetzten Zellen in der Sekretion von 30 pg IL-2 pro ml Zellüberstand. Mit der Kombination aus OKT3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern plus

TPA konnten im Zellüberstand IL-2-Konzentrationen von bis zu 400 pg/ml nachgewiesen werden. Der TZR/CD28-induzierten IL-2-Sekretion wurde für die vorliegenden Untersuchungen dennoch der Vorzug gegeben, weil sie sich näher an der physiologischen Situation orientiert.

Unter Reduktion von PKC $\beta$ -Protein kann kein IL-2 im Zellüberstand detektiert werden (Abbildung 22). Es findet offensichtlich keine IL-2-Sekretion statt. Werden die Daten auf Transkriptionsebene (Promotoraktivität und mRNA-Gehalt) berücksichtigt, sollte es sich lediglich um eine Reduktion, nicht aber um eine komplette Hemmung der IL-2-Sekretion handeln. Daß die Effekte dennoch so stark sind, läßt den Schluß zu, daß PKC $\beta$  über die Regulation der Transkription hinaus möglicherweise auch auf Transportvorgänge oder die IL-2-Sekretion Einfluß nehmen kann.<sup>204</sup> Untersuchungen in PBLs (periphere Blutlymphozyten) stützen die mit PKC $\beta$ -AS-ODN gewonnenen Ergebnisse: Dort wurden gegen PKC-Isoenzyme gerichtete Antikörper mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht. Die Bindung zwischen Antikörpern und PKC $\beta$ -Protein verursachte eine Reduktion der IL-2-Synthese und -Sekretion.<sup>125,173</sup> Eine Depletion beider PKC-Isoenzyme (PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ ) durch chronische TPA-Behandlung (250 ng/ml) verhinderte die IL-2-Synthese in Jurkat T-Zellen.<sup>174</sup>

Transfektion in Gegenwart von PKC $\alpha$ -AS-ODN steigerte die TZR/CD28-induzierte IL-2-Sekretion auf mehr als das Doppelte. Der Effekt ist im Vergleich zu den Daten auf Transkriptionsebene stärker ausgeprägt. Auch hier deutet sich die Möglichkeit an, daß PKC $\alpha$  zusätzlich in die Regulation der sich anschließenden Prozesse involviert ist.

Es wird ersichtlich, daß die PKC-Isoenzyme in die Regulation der IL-2-Genexpression involviert sind. Eine Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein fördert die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor und die IL-2-Transkriptionsaktivität; der mRNA-Gehalt und die IL-2-Sekretion sind erhöht. Ein reduzierter PKC $\beta$ -Gehalt wirkt sich gegenteilig aus: NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor, IL-2-Transkriptionsaktivität und mRNA-Gehalt sind erniedrigt, während keine IL-2-Sekretion mehr nachgewiesen werden kann. Weder bei PKC $\alpha$ - noch bei PKC $\beta$ -defizienten Mäusen liegen Daten zu der Aktivierung, Proliferation oder IL-2-Genexpression von T-Lymphozyten vor.<sup>205,206</sup>

Die Daten legen nahe, daß die Wirkung der beiden PKC-Isoenzyme sehr komplex ist und sich nicht allein auf die Regulation der Transkription oder eines anderen Abschnitts der

IL-2-Genexpression beschränkt. Vielmehr scheint es in der Zelle mehrere Angriffsorte für die Einflußnahme von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  zu geben. Gerade bei der PKC $\beta$  wird vermutet, daß die funktionellen Aspekte zusätzlich auf eine Regulation der JNK-Kaskade zurückzuführen sind.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

PKC $\alpha$ - und PKC $\beta$ -AS-ODN konnten durch Elektroporation in Jurkat T-Zellen eingebracht und die Menge des Zielproteins dadurch deutlich reduziert werden. Die erzielten Effekte wurden analysiert und die Funktion von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  im Umkehrschluß definiert.

PKC $\alpha$  reguliert die ERK-Kaskade – möglicherweise über eine Assoziation mit c-Raf-1. Ihre Anwesenheit ist für die TZR/CD28-induzierte Aktivierung von c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 erforderlich. PKC $\alpha$  ermöglicht darüber hinaus die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B. PKC $\beta$  ist in die Regulation der ERK- und JNK-Kaskade involviert. Die Phosphorylierung von c-Raf-1, MEK-1/2 und ERK-1/2 und die Aktivierung von MKK-4 und JNK-1/2 sind bei Reduktion von PKC $\beta$ -Protein nur eingeschränkt möglich. Die Interaktion mit c-Raf-1, MEK-1/2 und MEKK-1 zeigt mögliche Wirkmechanismen auf. PKC $\beta$  ist ebenfalls für die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B nötig. Keine der beiden PKC-Isoformen beeinflusst die Phosphorylierung der p38 MAPK oder die Degradation des I- $\kappa$ B. In Gegenwart geringerer PKC $\alpha$ - oder PKC $\beta$ -Proteinmengen zeigen die Jurkat T-Zellen des weiteren nur ein verlangsamtes exponentielles Wachstum.

PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  regulieren die IL-2-Genexpression und IL-2-Sekretion in gegensätzlicher Weise. Unter Reduktion von PKC $\alpha$ -Protein sind die NFAT-Bindung an den IL-2-Promotor (distal), die IL-2-Promotoraktivität und der IL-2-mRNA-Gehalt erhöht. Darüber hinaus wird mehr IL-2 von den Jurkat T-Zellen sezerniert. Das Isoenzym scheint unter physiologischen Bedingungen einen hemmenden Einfluß auf die genannten Ereignisse zu haben. Bei Verringerung von PKC $\beta$ -Protein hingegen sind NFAT-Bindung, IL-2-Promotoraktivität und IL-2-mRNA-Gehalt erniedrigt und es findet keine IL-2-Sekretion mehr statt.

Die beiden Isoenzyme PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  sind in die Regulation der TZR-induzierten Signaltransduktion und IL-2-Genexpression involviert. Sie üben ihren Einfluß in unterschiedlicher, teilweise gegensätzlicher Weise aus und besitzen spezifische Funktionen in Jurkat T-Zellen.

**LITERATURVERZEICHNIS**

- <sup>1</sup> DEPPER JM, LEONARD WJ, DROGULA C, KRÖNKE M, WALDMANN TA, GREENE WC. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;**82**:4230-4234
- <sup>2</sup> SMITH KA, CANTRELL DA. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;**82**:864-868
- <sup>3</sup> MEUER SC, HUSSEY RE, CANTRELL DA, HODGDON JC, SCHLOSSMAN SF, SMITH KA, REINHERZ EL. Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;**81**:1509-1513
- <sup>4</sup> reviewed in RAO A, AVNI O. Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br Med Bull* 2000;**56**:969-984
- <sup>5</sup> TAYLOR MV, METCALFE JC, HESKETH TR, SMITH GA, MOORE JP. Mitogens increase phosphorylation of phosphoinositides in thymocytes. *Nature* 1984;**312**:462-465
- <sup>6</sup> reviewed in RON D, KAZANIETZ MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 1999;**13**:1658-1676
- <sup>7</sup> CANTRELL D, DAVIES AA, LONDEI M, FELDMAN M, CRUMPTON MJ. Association of phosphorylation of the T3 antigen with immune activation of T lymphocytes. *Nature* 1987;**325**:540-542
- <sup>8</sup> WEISSMAN AM, ROSS P, LUONG ET, GARCIA-MORALES P, JELACHICH ML, BIDDISON WE, KLAUSNER RD, SAMELSON LE. Tyrosine phosphorylation of the human T cell antigen receptor  $\zeta$ -chain: activation via CD3 but not CD2. *J Immunol* 1988;**141**:3532-3536
- <sup>9</sup> TAKAI Y, KAIBUCHI K, KIKUCHI A, KAWATA M, SASAKI T, YAMAMOTO T. Transforming and c-fos promoter/enhancer-stimulating activities of a GDP/GTP exchange protein for small GTP-binding proteins. *Princess Takamatsu Symp* 1991;**22**:197-204
- <sup>10</sup> DOWNWARD J, GRAVES JD, WARNE PH, RAYTER S, CANTRELL DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 1990;**346**:719-723
- <sup>11</sup> NUNES JA, TRUNEH A, OLIVE D, CANTRELL DA. Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J Biol Chem* 1996;**271**:1591-1598
- <sup>12</sup> TURKA LA, LEDBETTER JA, LEE K, JUNE CH, THOMPSON CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3<sup>+</sup> mature thymocytes. *J Immunol* 1990;**144**:1646-1653
- <sup>13</sup> BOISE LH, MINN AJ, NOEL PJ, JUNE CH, ACCAVITTI MA, LINDSTEN T, THOMPSON CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995;**3**:87-98
- <sup>14</sup> WALKER LS, ABBAS AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature Rev Immunol* 2002;**2**:11-19

- 15 APPLEMAN LJ, TZACHANIS D, GRADER-BECK T, VAN PUIJENBROEK AA, BOUSSIOTIS VA. Helper T cell anergy: from biochemistry to cancer pathophysiology and therapeutics. *J Mol Med* 2001;**78**:673-683
- 16 TRUNEH A, ALBERT F, GOLSTEIN P, SCHMITT-VERHULST AM. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 1985;**313**:318-320
- 17 reviewed in KOLCH W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;**351**:289-305
- 18 WARTMANN M, DAVIS RJ. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* 1994;**269**:6695-6701
- 19 LI S, JANOSCH P, TANJI M, ROSENFELD GC, WAYMIRE JC, MISCHAK H, KOLCH W, SEDIVY JM. Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J* 1995;**14**:685-696
- 20 MUSLIN AJ, TANNER JW, ALLEN PM, SHAW AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996;**84**:889-897
- 21 BRTVA TR, DRUGAN JK, GHOSH S, TERRELL RS, CAMPBELL-BURK, BELL RM, DER CJ. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* 1995;**270**:9809-9812
- 22 ABRAHAM D, PODAR K, PACHER M, KUBICEK M, WELZEL N, HEMMINGS BA, DILWORTH SM, MISCHAK H, KOLCH W, BACCARINI M. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 2000;**275**:22300-22304
- 23 LEEVERS SJ, PATERSON HF, MARSHALL CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 1994;**369**:411-414
- 24 MASON CS, SPRINGER CJ, COOPER RG, SUPERTI-FURGA G, MARSHALL CJ, MARAIS R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 1999;**18**:2137-2148
- 25 ZHENG CF, GUAN KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 1994;**13**:1123-1131
- 26 KYRIAKIS JM, APP H, ZHANG XF, BANERJEE P, BRAUTIGAN DL, RAPP UR, AVRUCH J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992;**358**:417-421
- 27 ZIMMERMANN S, MOELLING K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999;**286**:1741-1744
- 28 FORCE T, BONVENTRE JV, HEIDECKER G, RAPP U, AVRUCH J, KYRIAKIS JM. Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:1270-1274
- 29 EYCHENE A, DUSANTER-FOURT I, BARNIER JV, PAPIN C, CHARON M, GISSELBRECHT S, CALOTHY G. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 1995;**10**:1159-1165
- 30 HULEIHEL M, GOLDSBOROUGH M, CLEVELAND J, GUNNELL M, BONNER T, RAPP UR. Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol Cell Biol* 1986;**6**:2655-2662

- <sup>31</sup> VOJTEK AB, HOLLENBERG SM, COOPER JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993;**74**:205-214
- <sup>32</sup> WU X, NOH SJ, ZHOU G, DIXON JE, GUAN KL. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:3265-3271
- <sup>33</sup> PAPIN C, EYCHENE A, BRUNET A, PAGES G, POUYSSEGUR J, CALOTHY G, BARNIER JV. B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene* 1995;**10**:1647-1651
- <sup>34</sup> XU S, ROBBINS D, FROST J, DANG A, LANGE-CARTER C, COBB MH. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:6808-6812
- <sup>35</sup> LANGE-CARTER CA, PLEIMAN CM, GARDNER AM, BLUMER KJ, JOHNSON GL. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 1993;**260**:315-319
- <sup>36</sup> BLANK JL, GERWINS P, ELLIOTT EM, SATHER S, JOHNSON GL. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. *J Biol Chem* 1996;**271**:5361-5368
- <sup>37</sup> RUSSELL M, LANGE-CARTER CA, JOHNSON GL. Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J Biol Chem* 1995;**270**:11757-11760
- <sup>38</sup> KHOKHLATCHEV AV, CANAGARAJAH B, WILSBACHER J, ROBINSON M, ATKINSON M, GOLDSMITH E, COBB MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 1998;**93**:605-615
- <sup>39</sup> CHEN RH, SARNECKI C, BLENIS J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992;**12**:915-927
- <sup>40</sup> GILLE H, KORTENJANN M, THOMAE O, MOOMAW C, SLAUGHTER C, COBB MH, SHAW PE. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 1995;**14**:951-962
- <sup>41</sup> YANG SH, WHITMARSH AJ, DAVIS RJ, SHARROCKS AD. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 1998;**17**:1740-1749
- <sup>42</sup> reviewed in LEWIS TS, SHAPIRO PS, AHN NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998;**74**:49-139
- <sup>43</sup> reviewed in DONG C, DAVIS RJ, FLAVELL RA. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J Clin Immunol* 2001;**21**:253-257
- <sup>44</sup> KYRIAKIS JM, BANERJEE P, NIKOLAKAKI E, DAI T, RUBIE EA, AHMAD MF, AVRUCH J, WOODGETT JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;**369**:156-160
- <sup>45</sup> SU B, JACINTO E, HIBI M, KALLUNKI T, KARIN M, BEN-NERIAH Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994;**77**:727-736

- <sup>46</sup> FRASER JD, NEWTON ME, WEISS A. CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J Exp Med* 1992;**175**:1131-1134
- <sup>47</sup> AVRAHAM A, JUNG S, SAMUELS Y, SEGER R, BEN-NERIAH Y. Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;**28**:2320-2330
- <sup>48</sup> MINDEN A, LIN A, CLARET FX, ABO A, KARIN M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995;**81**:1147-1157
- <sup>49</sup> FANGER GR, JOHNSON NL, JOHNSON GL. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J* 1997;**16**:4961-4972
- <sup>50</sup> MINDEN A, LIN A, MCMAHON M, LANGE-CARTER C, DÉRIJARD B, DAVIS RJ, JOHNSON GL, KARIN M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994;**266**:1719-1723
- <sup>51</sup> TAKEKAWA M, POSAS F, SAITO H. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J* 1997;**16**:4973-4982
- <sup>52</sup> TIBBLES LA, ING YL, KIEFER F, CHAN J, ISCOVE N, WOODGETT JR, LASSAM NJ. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J* 1996;**15**:7026-7035
- <sup>53</sup> FLEMING Y, ARMSTRONG CG, MORRICE N, PATERSON A, GOEDERT M, COHEN P. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* 2000;**352**:145-154
- <sup>54</sup> ADLER V, POLOTSKAYA A, WAGNER F, KRAFT AS. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* 1992;**267**:17001-17005
- <sup>55</sup> MINDEN A, LIN A, SMEAL T, DÉRIJARD B, COBB M, DAVIS R, KARIN M. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:6683-6688
- <sup>56</sup> ABDEL-HAFIZ HA, HEASLEY LE, KYRIAKIS JM, AVRUCH J, KROLL DJ, JOHNSON GL, HOEFFLER JP. Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol Endocrinol* 1992;**6**:2079-2089
- <sup>57</sup> GUPTA S, CAMPBELL D, DÉRIJARD B, DAVIS RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995;**267**:389-393
- <sup>58</sup> CAVIGELLI M, DOLFI F, CLARET F, KARIN M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 1995;**14**:5957-5964
- <sup>59</sup> GILLE H, STRAHL T, SHAW PE. Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr Biol* 1995;**5**:1191-1200
- <sup>60</sup> CHEN C-Y, GATTO-KONCZAK F, WU Z, KARIN M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway. *Science* 1998;**280**:1945-1949

- <sup>61</sup> FARIS M, KOKOT N, LATINIS K, KASIBHATLA S, GREEN DR, KORETZKY GA, NEL A. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J Immunol* 1998;**160**:134-144
- <sup>62</sup> reviewed in OBATA T, BROWN GE, YAFFE MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 2000;**28**:N67-N77
- <sup>63</sup> HAN J, LEE JD, BIBBS L, ULEVITCH RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;**265**:808-811
- <sup>64</sup> ZHANG S, HAN J, SELLS MA, CHERNOFF J, KNAUS UG, ULEVITCH RJ, BOKOCH GM. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 1995;**270**:23934-23936
- <sup>65</sup> DÉRIJARD B, RAINGEAUD J, BARRETT T, WU IH, HAN J, ULEVITCH RJ, DAVIS RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;**267**:682-685
- <sup>66</sup> RAINGEAUD J, WHITMARSH AJ, BARRETT T, DÉRIJARD B, DAVIS RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:1247-1255
- <sup>67</sup> ROUSE J, COHEN P, TRIGON S, MORANGE M, ALONSO-LLAMAZARES A, ZAMANILLO D, HUNT T, NEBREDA AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;**78**:1027-1037
- <sup>68</sup> RAINGEAUD J, GUPTA S, ROGERS JS, DICKENS M, HAN J, ULEVITCH RJ, DAVIS RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;**270**:7420-7426
- <sup>69</sup> PAYNE DM, ROSSOMANDO AJ, MARTINO P, ERICKSON AK, HER JH, SHABANOWITZ J, HUNT DF, WEBER MJ, STURGILL TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991;**10**:885-892
- <sup>70</sup> DÉRIJARD B, HIBI M, WU IH, BARRETT T, SU B, DENG T, KARIN M, DAVIS RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;**76**:1025-1037
- <sup>71</sup> DENOUEL-GALY A, DOUVILLE EM, WARNE PH, PAPIN C, LAUGIER D, CALOTHY G, DOWNWARD J, EYCHÈNE A. Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* 1997;**8**:46-55
- <sup>72</sup> YU W, FANTL WJ, HARROWE G, WILLIAMS LT. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* 1997;**8**:56-64
- <sup>73</sup> MICHAUD NR, THERRIEN M, CACACE A, EDSALL LC, SPIEGEL S, RUBIN GM, MORRISON DK. KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:12792-12796
- <sup>74</sup> XING H, KORNFELD K, MUSLIN AJ. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol* 1997;**7**:294-300

- <sup>75</sup> CACACE AM, MICHAUD NR, THERRIEN M, MATHES K, COPELAND T, RUBIN GM, MORRISON DK. Identification of constitutive and Ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR Overexpression. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:229-240
- <sup>76</sup> WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, TOURNIER C, YASUDA J, DAVIS RJ. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP Kinase activation. *Science* 1998;**281**:1671-1674
- <sup>77</sup> SEN R, BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;**46**:705-716
- <sup>78</sup> reviewed in KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:621-663
- <sup>79</sup> SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;**47**:921-928
- <sup>80</sup> BAEUERLE PA, BALTIMORE D. I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Science* 1988;**242**:540-546
- <sup>81</sup> BEG AA, RUBEN SM, SCHEINMAN RI, HASKILL S, ROSEN CA, BALDWIN AS. I $\kappa$ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- $\kappa$ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992;**6**:1899-1913
- <sup>82</sup> LIN X, CUNNINGHAM ET, MU Y, GELEZIUNAS R, GREENE WC. The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF- $\kappa$ B acting through the NF- $\kappa$ B-inducing kinase and I $\kappa$ B kinases. *Immunity* 1999;**10**:271-280
- <sup>83</sup> TSATSANIS C, PATRIOTIS C, TSICHLIS PN. Tpl-2 induces IL-2 expression in T-cell lines by triggering multiple signaling pathways that activate NFAT and NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 1998;**17**:2609-2618
- <sup>84</sup> MALININ NL, BOLDIN MP, KOVALENKO AV, WALLACH D. MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997;**385**:540-544
- <sup>85</sup> DIDONATO JA, HAYAKAWA M, ROTHWARF DM, ZANDI E, KARIN M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1997;**388**:548-554
- <sup>86</sup> KRAPPMANN D, HATADA EN, TEGETHOFF S, LI J, KLIPPEL A, GIESE K, BAEUERLE PA, SCHEIDEREIT C. The I $\kappa$ B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK $\gamma$  but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem* 2000;**275**:29779-29787
- <sup>87</sup> ZANDI E, ROTHWARF DM, DELHASE M, HAYAKAWA M, KARIN M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1997;**91**:243-252
- <sup>88</sup> ROTHWARF DM, ZANDE E, NATOLI G, KARIN M. IKK- $\gamma$  is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* 1998;**395**:297-300
- <sup>89</sup> HARHAJ EW, SUN S. I $\kappa$ B kinases serve as a target of CD28 signaling. *J Biol Chem* 1998;**273**:25185-25190

- <sup>90</sup> KEMPIAK SJ, HIURA TS, NEL AE. The jun kinase cascade is responsible for activating the CD28 response element of the IL-2 promoter: proof of cross-talk with the I $\kappa$ B kinase cascade. *J Immunol* 1999;**162**:3176-3187
- <sup>91</sup> WORONICZ JD, GAO X, CAO Z, ROTHE M, GOEDEL DV. I $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and NIK. *Science* 1997;**278**:866-869
- <sup>92</sup> LING L, CAO Z, GOEDEL DV. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK- $\alpha$  by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3792-3797
- <sup>93</sup> RÉGNIER CH, SONG HY, GAO X, GOEDEL DV, CAO Z, ROTHE M. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* 1997;**90**:373-383
- <sup>94</sup> TRAENCKNER EB, PAHL HL, HENKEL T, SCHMIDT KN, WILK S, BAEUERLE PA. Phosphorylation of human I $\kappa$ B- $\alpha$  on serines 32 and 36 controls I $\kappa$ B- $\alpha$  proteolysis and NF- $\kappa$ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 1995;**14**:2876-2883
- <sup>95</sup> SCHERER DC, BROCKMAN JA, CHEN Z, MANIATIS T, BALLARD DW. Signal-induced degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:11259-11263
- <sup>96</sup> TRAENCKNER EB, BAEUERLE PA. Appearance of apparently ubiquitin-conjugated I $\kappa$ B- $\alpha$  during its phosphorylation-induced degradation in intact cells. *J Cell Sci Suppl* 1995;**19**:79-84
- <sup>97</sup> DIDONATO J, MERCURIO F, ROSETTE C, WULI J, SUYANG H, GHOSH S, KARIN M. Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:1295-1304
- <sup>98</sup> CHEN Z, HAGLER J, PALOMBELLA VJ, MELANDRI F, SCHERER D, BALLARD D, MANIATIS T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995;**9**:1586-1597
- <sup>99</sup> TAKAI Y, KISHIMOTO A, INOUE M, NISHIZUKA Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 1977;**252**:7603-7609
- <sup>100</sup> HOYOS B, BALLARD DW, BOHNLEIN E, SIEKEVITZ M, GREENE WC. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 1989;**244**:457-460
- <sup>101</sup> LAI J, HORVATH G, SUBLESKI J, BRUDER J, GHOSH P, TAN T. RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:4260-4271
- <sup>102</sup> NAKANO H, SHINDO M, SAKON S, NISHINAKA S, MIHARA M, YAGITA H, OKUMURA K. Differential regulation of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  and  $\beta$  by two upstream kinases, NF- $\kappa$ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3537-3542
- <sup>103</sup> TUOSTO L, COSTANZO A, GUIDO F, MARINARI B, VOSSIO S, MORETTI F, LEVRERO M, PICCOLELLA E. Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 regulates T cell receptor- and CD28-mediated signaling events which lead to NF- $\kappa$ B activation. *Eur J Immunol* 2000;**30**:2445-2454

- <sup>104</sup> LEE FS, HAGLER J, CHEN ZJ, MANIATIS T. Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997;**88**:213-222
- <sup>105</sup> SHAW JP, UTZ PJ, DURAND DB, TOOLE JJ, EMMEL EA, CRABTREE GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988;**241**:202-205
- <sup>106</sup> reviewed in HORSLEY V, PAVLATH GK. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 2002;**156**:771-774
- <sup>107</sup> AMASAKI Y, MASUDA ES, IMAMURA R, ARAI K, ARAI N. Distinct NFAT family proteins are involved in the nuclear NFAT-DNA binding complexes from human thymocyte subsets. *J Immunol* 1998;**160**:2324-2333
- <sup>108</sup> NORTHROP JP, HO SN, CHEN L, THOMAS DJ, TIMMERMAN LA, NOLAN GP, ADMON A, CRABTREE GR. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 1994;**369**:497-502
- <sup>109</sup> JAIN J, MCCAFFREY PG, MINER Z, KERPPOLA TK, LAMBERT JN, VERDINE GL, CURRAN T, RAO A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993;**365**:352-355
- <sup>110</sup> CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;**357**:695-697
- <sup>111</sup> BEALS CR, CLIPSTONE NA, HO SN, CRABTREE GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 1997;**11**:824-834
- <sup>112</sup> KLEMM JD, BEALS CR, CRABTREE GR. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol* 1997;**7**:638-644
- <sup>113</sup> SHIBASAKI F, PRICE ER, MILAN D, MC KEON F. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 1996;**382**:370-373
- <sup>114</sup> FUJITA T, SHIBUYA H, OHASHI T, YAMANISHI K, TANIGUCHI T. Regulation of human interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell* 1986;**46**:401-405
- <sup>115</sup> GENOT EM, PARKER PJ, CANTRELL DA. Analysis of the role of protein kinase C- $\alpha$ , - $\epsilon$ , and - $\zeta$  in T cell activation. *J Biol Chem* 1995;**270**:9833-9839
- <sup>116</sup> SERFLING E, BERBERICH-SIEBELT F, CHUVPILLO S, JANKEVICS E, KLEIN-HESSLING S, TWARDZIK T, AVOTS A. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000;**1498**:1-18
- <sup>117</sup> PORTER CM, HAVENS MA, CLIPSTONE NA. Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem* 2000;**275**:3543-3551
- <sup>118</sup> CHOW C-W, RINCÓN M, CAVANAGH J, DICKENS M, DAVIS RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997;**278**:1638-1641
- <sup>119</sup> DONG C, YANG DD, WYSK M, WHITMARSH AJ, DAVIS RJ, FLAVELL RA. Defective T cell differentiation in the absence of *Jnk1*. *Science* 1998;**282**:2092-2095

- <sup>120</sup> NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;**258**:607-614
- <sup>121</sup> NISHIZUKA Y, NAKAMURA S. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;**Suppl 1**:S202-S203
- <sup>122</sup> VALVERDE AM, SINNETT-SMITH J, VAN LINT J, ROZENGURT E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:8572-8576
- <sup>123</sup> SELBIE LA, SCHMITZ-PEIFFER C, SHENG Y, BIDEN TJ. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 1993;**268**:24296-24302
- <sup>124</sup> CASTAGNA M, TAKAI Y, KAIBUCHI K, SANO K, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982;**257**:7847-7851
- <sup>125</sup> SZAMEL M, APPEL A, SCHWINZER R, RESCH K. Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR. *J Immunol* 1998;**160**:2207-2214
- <sup>126</sup> NEL AE, BOUIC P, LATTANZE GR, STEVENSON HC, MILLER P, DIRIENZO W, STEFANI-NI GF, GALBRAITH RM. Reaction of T lymphocytes with anti-T3 induces translocation of C-kinase activity to the membrane and specific substrate phosphorylation. *J Immunol* 1987;**138**:3519-3524
- <sup>127</sup> TSUTSUMI A, KUBO M, FUJII H, FREIRE-MOAR J, TURCK CW, RANSOM JT. Regulation of protein kinase C isoform proteins in phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells. *J Immunol* 1993;**150**:1746-1754
- <sup>128</sup> IOANNIDES CG, FREEDMAN RS, LISKAMP RM, WARD NE, O'BRIAN CA. Inhibition of IL-2 receptor induction and IL-2 production in the human leukemic cell line Jurkat by a novel peptide inhibitor of protein kinase C. *Cell Immunol* 1990;**131**:242-252
- <sup>129</sup> FARRAR WL, RUSCETTI FW. Association of protein kinase C activation with IL 2 receptor expression. *J Immunol* 1986;**136**:1266-1273
- <sup>130</sup> KORETZKY GA, WAHI M, NEWTON ME, WEISS A. Heterogeneity of protein kinase C isoenzyme gene expression in human T cell lines. *J Immunol* 1989;**143**:1692-1695
- <sup>131</sup> SHEARMAN MS, BERRY N, ODA T, ASE K, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y. Isolation of protein kinase C subspecies from a preparation of human T lymphocytes. *FEBS Lett* 1988;**234**:387-391
- <sup>132</sup> LUCAS S, MARAIS R, GRAVES JD, ALEXANDER D, PARKER P, CANTRELL DA. Heterogeneity of protein kinase C expression and regulation in T lymphocytes. *FEBS Lett* 1990;**260**:53-56
- <sup>133</sup> SANO S, KIYOTAKI C, TATSUMI Y, FUJIWARA H, HAMAOKA T. Cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness induced by prolonged treatment with immobilized anti-CD3 antibody. Association of impairment of cytolytic activity with temporary depletion of intracellular protein kinase C. *J Immunol* 1989;**143**:2797-2805
- <sup>134</sup> HOCEVAR BA, MORROW DM, TYKOCINSKI ML, FIELDS AP. Protein kinase C iso-types in human erythroleukemia cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 1992;**101**: 671-679

- <sup>135</sup> ULLMAN KS, NORTHROP JP, VERWEIJ CL, CRABTREE GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 1990;**8**:421-452
- <sup>136</sup> GARRITY PA, CHEN D, ROTHENBERG EV, WOLD BJ. Interleukin-2 transcription is regulated *in vivo* at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:2159-2169
- <sup>137</sup> FRASER JD, IRVING BA, CRABTREE GR, WEISS A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991;**251**:313-316
- <sup>138</sup> SIEFKEN R, KLEIN-HEBLING S, SERFLING E, KURRLE R, SCHWINZER R. A CD28-associated signaling pathway leading to cytokine gene transcription and T cell proliferation without TCR engagement. *J Immunol* 1998;**161**:1645-1651
- <sup>139</sup> ROONEY JW, SUN YL, GLIMCHER LH, HOEY T. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:6299-6310
- <sup>140</sup> SASSONE-CORSI P, RANSONE LJ, LAMPH WW, VERMA IM. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 1988; **336**:692-695
- <sup>141</sup> CHIU R, BOYLE WJ, MEEK J, SMEAL T, HUNTER T, KARIN M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; **54**:541-552
- <sup>142</sup> MCGUIRE KL, IACOBELLI M. Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J Immunol* 1997;**159**:1319-1327
- <sup>143</sup> JUNG S, YARON A, ALKALAY I, HATZUBAI A, AVRAHAM A, BEN-NERIAH Y. Costimulation requirement for AP-1 and NF- $\kappa$ B transcription factor activation in T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1995;**766**:245-252
- <sup>144</sup> SHAW G, KAMEN R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986;**46**:659-667
- <sup>145</sup> LINDSTEIN T, JUNE CH, LEDBETTER JA, STELLA G, THOMPSON CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989;**244**:339-343
- <sup>146</sup> RAGHEB JA, DEEN M, SCHWARTZ RH. CD28-mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA. *J Immunol* 1999;**163**: 120-129
- <sup>147</sup> GILLIS S, WATSON J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 1980;**152**:1709-1719
- <sup>148</sup> reviewed in ALTMAN A, ISAKOV N, BAIER G. Protein kinase C $\theta$ : a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunology Today* 2000;**21**:567-573
- <sup>149</sup> DURAND DB, SHAW JP, BUSH MR, REPLOGLE RE, BELAGAJE R, CRABTREE GR. Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* 1988;**8**:1715-1724

- <sup>150</sup> VAN WAUWE JP, DE MEY JR, GOOSSENS JG. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol* 1980;**124**:2708-2713
- <sup>151</sup> BRDICKA T, PAVLISTOVA D, LEO A, BRUYNS E, KORINEK V, ANGELISOVA P, SCHERER J, SHEVCHENKO A, HILGERT I, CERNY J, DRBAL K, KURAMITSU Y, KORNACKER B, HOREJSI V, SCHRAVEN B. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 2000;**191**:1591-1604
- <sup>152</sup> BAROJA ML, LORRE K, VAN VAECK F, CEUPPENS JL. The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens. *Cell Immunol* 1989;**120**:205-217
- <sup>153</sup> SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;**239**:487-491
- <sup>154</sup> KOTEWICZ ML, D'ALESSIO JM, DRIFTMIER KM, BLODGETT KP, GERARD GF. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 1985;**35**:249-258
- <sup>155</sup> RYCHLIK W, SPENCER WJ, RHOADS RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1990;**18**:6409-6412
- <sup>156</sup> WARING MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* 1965;**13**:269-282
- <sup>157</sup> KOHOUT TA, ROGERS TB. Use of a PCR-based method to characterize protein kinase C isoform expression in cardiac cells. *Am J Physiol* 1993;**264**:C1350-C1359
- <sup>158</sup> HOFMANN J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J* 1997;**11**:649-669
- <sup>159</sup> CROOKE ST. Advances in understanding the pharmacological properties of antisense oligonucleotides. *Adv Pharmacol* 1996;**40**:1-49
- <sup>160</sup> ZAMECNIK PC, STEPHENSON ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;**75**:280-284
- <sup>161</sup> MARWICK C. First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *J Am Med Ass* 1998;**280**:871
- <sup>162</sup> CROOKE ST. Basic principles of antisense therapeutics. In: Agrawal S, Crooke ST, eds. *Antisense Research and Application*. Springer-Verlag: New York 1998:1-50
- <sup>163</sup> HOKE GD, DRAPER K, FREIER SM, GONZALEZ C, DRIVER VB, ZOUNES MC, ECKER DJ. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:5743-5748
- <sup>164</sup> MCKAY RA, MIRAGLIA LJ, CUMMINS LL, OWENS SR, SASMOR H, DEAN NM. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- $\alpha$  expression. *J Biol Chem* 1999;**274**:1715-1722

- <sup>165</sup> CROOKE RM, GRAHAM MJ, COOKE ME, CROOKE ST. *In vitro* pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**275**:462-473
- <sup>166</sup> GAO WY, STORM C, EGAN W, CHENG YC. Cellular pharmacology of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells. *Mol Pharmacol* 1993;**43**:45-50
- <sup>167</sup> CROOKE ST. Therapeutic applications of oligonucleotides. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1992;**32**:329-376
- <sup>168</sup> BALLESTER R, ROSEN OM. Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH<sub>3</sub> cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 1985;**260**:15194-15199
- <sup>169</sup> BORNER C, EPPENBERGER U, WYSS R, FABBRO D. Continuous synthesis of two protein-kinase-C-related proteins after down-regulation by phorbol esters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:2110-2114
- <sup>170</sup> DEAN NM, MCKAY R, CONDON TP, BENNETT CF. Inhibition of protein kinase C- $\alpha$  expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J Biol Chem* 1994;**269**:16416-16424
- <sup>171</sup> LÓPEZ-LAGO MA, FREIRE-MOAR J, BARJA P. Inhibition of protein kinase C $\alpha$  expression by antisense RNA in transfected Jurkat cells. *Eur J Immunol* 1999;**29**:466-476
- <sup>172</sup> ZHANG X, WEN J, ALETTA JM, RUBIN RP. Inhibition of expression of PKC- $\alpha$  by antisense mRNA is associated with diminished cell growth and inhibition of amylase secretion by AR4-2J cells. *Exp Cell Res* 1997;**233**:225-231
- <sup>173</sup> SZAMEL M, BARTELS F, RESCH K. Cyclosporin A inhibits T cell receptor-induced interleukin-2 synthesis of human T lymphocytes by selectively preventing a transmembrane signal transduction pathway leading to sustained activation of a protein kinase C isoenzyme, protein kinase C- $\beta$ . *Eur J Immunol* 1993;**23**:3072-3081
- <sup>174</sup> ISAKOV N, MCMAHON P, ALTMAN A. Selective post-transcriptional down-regulation of protein kinase C isoenzymes in leukemic T cells chronically treated with phorbol ester. *J Biol Chem* 1990;**265**:2091-2097
- <sup>175</sup> NEMUNAITIS J, HOLMLUND JT, KRAYNAK M, RICHARDS D, BRUCE J, OGNOSKIE N, KWONG TJ, GEARY R, DORR A, VON HOFF D, ECKHARDT SG. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C- $\alpha$ , in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1999;**17**:3586-3595
- <sup>176</sup> TAMM I, DORKEN B, HARTMANN G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 2001;**358**:489-497
- <sup>177</sup> ZHENG CF, GUAN KL. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 1993;**268**:11435-11439
- <sup>178</sup> SCHÖNWASSER DC, MARAIS RM, MARSHALL J, PARKER PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:790-798

- <sup>179</sup> KOLCH W, HEIDECKER G, KOCHS G, HUMMEL R, VAHIDI H, MISCHAK H, FINKENZELER G, MARME D, RAPP UR. Protein kinase C  $\alpha$  activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993;**364**:249-252
- <sup>180</sup> CARROLL MP, MAY WS. Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1994;**269**:1249-1256
- <sup>181</sup> CAI H, SMOLA U, WIXLER V, EISENMANN-TAPPE I, DIAZ-MECO MT, MOSCAT J, RAPP U, COOPER GM. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 1997;**17**:732-741
- <sup>182</sup> RAYTER SI, WOODROW M, LUCAS SC, CANTRELL DA, DOWNWARD J. p21<sup>ras</sup> mediates control of IL-2 gene promoter function in T cell activation. *EMBO J* 1992;**11**:4549-4556
- <sup>183</sup> WILLIAMS DH, WOODROW M, CANTRELL DA, MURRAY EJ. Protein kinase C is not a downstream effector of p21ras in activated T cells. *Eur J Immunol* 1995;**25**:42-47
- <sup>184</sup> OHTSUKA T, KAZIRO Y, SATOH T. Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1310**:223-232
- <sup>185</sup> MUTHUSAY N, LEIDEN JM. A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement. *J Biol Chem* 1998;**273**:22841-22847
- <sup>186</sup> KAWAKAMI Y, KITaura J, HARTMAN SE, LOWELL CA, SIRAGANIAN RP, KAWAKAMI T. Regulation of protein kinase C $\beta$ 1 by two protein-tyrosine kinases, Btk and Syk. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:7423-7428
- <sup>187</sup> KANEKI M, KHARBANDA S, PANDEY P, YOSHIDA K, TAKEKAWA M, LIOU J, STONE R, KUFÉ D. Functional role for protein kinase C $\beta$  as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:461-470
- <sup>188</sup> SZAMEL M, LEUFGEN H, KURRLE R, RESCH K. Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995;**1235**:33-42
- <sup>189</sup> FIELDS S, SONG O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;**340**:245-246
- <sup>190</sup> FINCO TS, BEG AA, BALDWIN AS. Inducible phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  is not sufficient for its dissociation from NF- $\kappa$ B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:11884-11888
- <sup>191</sup> DiDONATO JA, MERCURIO F, KARIN M. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 1995;**15**: 1302-1311
- <sup>192</sup> COUDRONNIERE N, VILLALBA M, ENGLUND N, ALTMAN A. NF- $\kappa$ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C- $\theta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:3394-3399

- <sup>193</sup> LIN X, O'MAHONY A, MU Y, GELEZIUNAS R, GREENE WC. Protein kinase C- $\theta$  participates in NF- $\kappa$ B activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of I $\kappa$ B kinase  $\beta$ . *Mol Cell Biol* 2000;**20**:2933-2940
- <sup>194</sup> SCHMITZ ML, BACHER S, KRACHT M. I $\kappa$ B-independent control of NF- $\kappa$ B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* 2001;**26**:186-190
- <sup>195</sup> CARLOTTI F, DOWER SK, QWARNSTROM EE. Dynamic shuttling of nuclear factor  $\kappa$ B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem* 2000;**275**:41028-41034
- <sup>196</sup> BIRBACH A, GOLD P, BINDER BR, HOFER E, DE MARTIN R, SCHMID JA. Signaling molecules of the NF- $\kappa$ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2002;**277**:10842-10851
- <sup>197</sup> ELLIOTT JF, LIN Y, MIZEL SB, BLEACKLEY RC, HARNISH DG, PAETKAU V. Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science* 1984;**226**:1439-1441
- <sup>198</sup> KRÖNKE M, LEONARD WJ, DEPPER JM, ARYA SK, WONG-STAAAL F, GALLO RC, WALDMANN TA, GREENE WC. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;**81**:5214-5218
- <sup>199</sup> WALDER RY, WALDER JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:5011-5015
- <sup>200</sup> FRASER JD, WEISS A. Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28. *Mol Cell Biol* 1992;**12**:4357-4363
- <sup>201</sup> FARIS M, KOKOT N, LEE L, NEL AE. Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogenactivated protein kinase kinase kinase in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:27366-27373
- <sup>202</sup> NISHINA H, BACHMANN M, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, KOZIERADZKI I, FISCHER KD, ODERMATT B, WAKEHAM A, SHAHINIAN A, TAKIMOTO H, BERNSTEIN A, MAK TW, WOODGETT JR, OHASHI PS, PENNINGER JM. Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 1997;**186**:941-953
- <sup>203</sup> FUCHS SY, DOLAN L, DAVIS RJ, RONAI Z. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 1996;**13**:1531-1535
- <sup>204</sup> LONG A, KELLEHER D, LYNCH S, VOLKOV Y. Cutting edge: protein kinase C $\beta$  expression is critical for export of IL-2 from T cells. *J Immunol* 2001;**167**:636-640
- <sup>205</sup> LEITGES M, SCHMEDT C, GUINAMARD R, DAVOUST J, SCHAAL S, STABEL S, TARAKHOVSKY A. Immunodeficiency in protein kinase C $\beta$ -deficient mice. *Science* 1996;**273**:788-791
- <sup>206</sup> LEITGES M, PLOMANN M, STANDAERT ML, BANDYOPADHYAY G, SAJAN MP, KANOY Y, FARESE RV. Knockout of PKC $\alpha$  enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 2002;**16**:847-858

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung.  
Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für das Referat meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Marta Szamel für die Möglichkeit, diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Betreuung und das Korreferat meiner Arbeit. Sehr geschätzt habe ich die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und den Freiraum für eigene Ideen und Kreativität.

Frau Dr. U. Dreikhausen danke ich für alle Unterstützung bei meiner Arbeit.

Marina Golombek und Dorothea Bouillon-Ludwig danke ich nicht nur für die hervorragende Zusammenarbeit, sondern mehr noch für die ausgezeichnete Atmosphäre und alle persönlichen Begegnungen, die das tägliche Arbeiten zur Freude gemacht haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie danke ich für die stete Hilfsbereitschaft; insbesondere Barbara Obst für die kritischen Anmerkungen zu dem Manuskript und David Holzberg für die vielen Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.

Besonders danken möchte ich meinen Studienkollegen Urte Scheele und Christoph Kalthoff für die gemeinsamen Abende und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Desgleichen danke ich meiner Familie und allen Freunden für die reiche Unterstützung in allen Lebensbereichen.

Diese Arbeit widme ich meiner Schwester Claudia, für die sich der Dank nicht in Worten ausdrücken läßt.

## Lebenslauf

**Name:** Katrin Gorf  
**geboren am:** 11.03.1974, Langenhagen

### Ausbildung:

1980 – 1984            Grundschule Alemann, Hannover  
1984 – 1986            Orientierungsstufe Büssingweg, Hannover  
1986 – 1988            Gymnasium Lutherschule, Hannover  
1988 – 1993            Gymnasium Schillerschule, Hannover  
12.05.1993            Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1993 – 1994            Freiwilliges Ökologisches Jahr

1994 – 1999            Universität Hannover  
                             Studiengang: Biochemie  
                             Hauptfach: Biochemie  
                             Nebenfächer: Biophysikalische Chemie, Pharmakologie  
                             Diplomarbeit im Institut für Pharmakologie der  
                             Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. M. Szamel)

01.11.1999            Diplom im Fach Biochemie

1999 – 2002            Dissertation im Institut für Pharmakologie der  
                             Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. M. Szamel)  
                             Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von  
                             regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“, DFG  
                             Hauptfach: Biochemie  
                             Nebenfach: Pharmakologie

10.06.2002            mündliche Doktorprüfung