

## 1 Einleitung

### 1.1 Medizinische Relevanz der Erforschung der Signalübertragung in Immunzellen

Durch die Erforschung der Signalweiterleitung in menschlichen Zellen konnten bedeutende Fortschritte für das therapeutische Vermögen der modernen Medizin erzielt werden. Das zunehmende Verständnis der molekularen Basis der Signalverarbeitung ermöglicht das Verständnis pathologischer Prozesse. Es können Pharmaka entwickelt werden, die gezielt bestimmte Proteine der Signaltransduktionskaskaden beeinflussen und dadurch positiv in Pathomechanismen eingreifen (O'Neill, 2006).

Wie die intensive Forschung der vergangenen Jahre gezeigt hat, müssen einige der großen Herausforderungen der Medizin wie Krebs, Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen mit immunologischen Prozessen im menschlichen Körper in Zusammenhang gebracht werden (O'Neill, 2006). Gerade diese immunologische Sicht auf die Mechanismen der Krankheitsentstehung hat interessante therapierelevante Ideen hervorgebracht. Das Verständnis der molekularen Grundlagen der Immunologie ermöglicht die Fortentwicklung der Immuntherapie gegen Infektionskrankheiten aber auch gegen Krebs (Pardoll, 2002).

Die Erforschung der Rolle von Proteinen, die in Signaltransduktionsprozesse in T Lymphozyten involviert sind, hat bereits zur Entwicklung von Pharmaka geführt, die in den Verlauf von Krankheiten wie Psoriasis, Multipler Sklerose oder Rheumatoider Arthritis eingreifen (O'Neill, 2006; Bissonnette et al., 2006; Lehle et al., 2005; Dancey, 2005).

Die Phosphatase Calcineurin in T Lymphozyten ist das Zielprotein für verschiedene Pharmaka, wie Cyclosporin (Lee and Park, 2006), FK506 oder ISA247. Diese Pharmaka hemmen Calcineurin indem sie an Immunosuppressiva binden und dieser Pharmakon-Immunophilinkomplex mit Calcineurin wechselwirkt (Schreiber and Crabtree, 1992). In der Folge kommt es zur Inhibition der Interleukin-2 Produktion und dadurch zu einem immunsuppressiven Effekt. Dabei konnte Cyclosporin in der Transplantationsmedizin mit außerordentlichem Erfolg eingesetzt werden (Kiani et al., 2000). Die Calcineurininhibitoren werden inzwischen aber auch in der Therapie von Krankheiten mit deutlichen autoimmunen Komponenten, wie Psoriasis, angewandt (O'Neill, 2006).

Der Sphingosine- 1- Phosphatase Rezeptor wird durch das Pharmakon FTY20 auf T-Lymphozyten herunterreguliert (Chiba et al., 2006). Dies führt zu einer eingeschränkten Auswanderung von T Zellen aus den sekundären lymphoiden Organen. Die Applikation von

FTY20 konnte die Entzündung des Zentralen Nervensystems in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose reduzieren (Fujino et al., 2003). In einer Phase II –Studie konnte gezeigt werden, das FTY720 die Rate akuter Entzündungsschübe bei Multiple-Sklerose Patienten um 50% reduzieren konnte (Medical News Today 2005).

Ein Protein aus der Familie der PI3K-regulierten Proteinkinasen, mTOR, ist der Angriffspunkt das Pharmakons Rapamycin (Young and Nickerson-Nutter, 2005). MTOR leitet in der Signaltransduktion von T-Zellen Signale weiter, die zur Interleukin-2 Produktion in aktivierten T-Zellen führen. Rapamycin führt zu einer Hemmung der IL-2 Ausschüttung und der T-Zell-Proliferation (Ghosh et al., 2002). Rapamycin und seine Analoga Everolimus und Temsirolimus werden dazu eingesetzt, die Abstossung von transplantierten Organen zu verhindern und werden in Phase II- Studien auf ihre Wirkung auf den Verlauf von Rheumatoider Arthritis und multipler Sklerose getestet (Dancey, 2005;Lehle et al., 2005;O'Neill, 2006).

## 1.2 Immunmechanismen

Das Immunsystem ist ein komplexes System von verschiedenen Zellen. Nach klassischer Vorstellung besteht seine Aufgabe darin, körperfremde von körpereigenen Substanzen zu unterscheiden und dabei die körperfremden Substanzen anzugreifen und zu zerstören.

Ende der 1950er Jahre wurde von F.M. Burnet eine fundamentale Theorie zur Funktionsweise des Immunsystems entwickelt. Nach dieser Theorie nimmt der B Lymphozyt eine zentrale Rolle in der Immunantwort ein. Jeder B Lymphozyt exprimiert Oberflächenrezeptoren derselben, einzigartigen Spezifität gegen fremde Substanzen. Die Erkennung einer fremden Substanz durch einen B Lymphozytenrezeptor initiiert eine Signalkaskade, die eine Immunantwort hervorruft. B Lymphozyten die auf körpereigene Substanzen reagieren, werden sehr früh im Leben eines Organismus eliminiert (Burnet, 1962;Matzinger, 2002;Smith, 2004).

Das Burnet- Modell wurde 1969 modifiziert, nachdem beobachtet wurde, daß aktivierte B Lymphozyten hypermutieren und dadurch Zellen mit Rezeptoren potentiell autoimmuner Spezifität und Reaktivität entstehen können (Bretscher and Cohn, 1970). Da Autoimmunität jedoch ein vergleichsweise seltenes Ereignis ist, schlugen Bretscher und Cohn die Notwendigkeit einer zweiten, helfenden Zelle zur Aktivierung des Immunsystems vor. Danach sterben alle B-Lymphozyten die Antigen erkennen (Signal 1), wenn sie nicht ein zweites Signal einer helfenden Zelle erhalten. Diese zweite, helfende Zellen wurde später als der T-Lymphozyt identifiziert.

In einem 1975 von Lafferty und Cunningham vorgeschlagenen Modell wird der T Lymphozyt in den Mittelpunkt gestellt und eine weitere Zellart, die stimulierende, antigenpräsentierende Zelle, eingeführt. Danach nimmt die antigenpräsentierende Zelle körperfremdes Antigen auf, prozessiert es und präsentiert es auf ihrer Oberfläche dem T Lymphozyten. Zur Aktivierung des T Lymphozyten ist auch hier ein zweites Signal notwendig, das ebenfalls durch die antigenpräsentierende Zelle vermittelt werden kann (Lafferty and Cunningham, 1975).

Die Entdeckung von Mustererkennungsrezeptoren auf Makrophagen und anderen Immunzellen führte zu einer weiteren Modifikation bestehender immunologischer Konzepte durch Charles Janeway jr. Ende der 1980er Jahre. Die Mustererkennungsrezeptoren erkennen konservierte molekulare Muster, die in Mikroben enthalten sind. Dadurch sind Makrophagen in der Lage, eindringende Mikroben sofort zu erkennen und zu zerstören. Diese sofortige Reaktion ist Teil der sogenannten angeborenen Immunität. Die genetische Information für die Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität ist im Genom fixiert und wurde über einen langen evolutionären Zeitraum selektiert. Demgegenüber wird ein anderer Teil der Körperabwehr als adaptive, erworbene Immunität bezeichnet. Sie wird von Rezeptoren vermittelt, die auf Lymphozyten exprimiert werden und deren spezifische Sequenz erst durch genetische Rekombination von Gensegmenten in somatischen Zellen entstehen. Dadurch kann ein sehr großes Spektrum verschiedenster molekularer Strukturen erkannt werden. Im Gegensatz zur sofortigen Reaktion der angeborenen Immunität (0-96 Stunden), setzt die adaptive Immunantwort erst spät ein (ab 96 Stunden), da sich die zunächst selten vorkommenden spezifischen B- und T-Zellen erst durch klonale Expansion vermehren müssen. Tritt allerdings derselbe Erreger, der schon einmal eine adaptive Immunantwort ausgelöst hat, nochmals in den Organismus ein, kann eine deutlich schnellere und wirksamere Reaktion der adaptiven Immunität hervorgerufen werden (immunologisches Gedächtnis). Zwischen angeborener und erworbener Immunität bestehen enge Beziehungen. So nehmen zum Beispiel Makrophagen Mikroben nicht nur auf, um sie zu zerstören. Sie prozessieren die aufgenommenen Mikroben auch und präsentieren mikrobielle Peptide mit Hilfe ihrer MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Die Aktivierung der Mustererkennungsrezeptoren auf Makrophagen durch Mikroben führt zudem zu einer Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie (CD80, CD86). Damit können Makrophagen zwei Signale- MHC-Peptid-Komplex und kostimulatorische Moleküle- auf ihrer Oberfläche präsentieren, die zur Aktivierung von spezifischen T-Zellen führen und damit die erworbene Immunität initiieren (Janeway, Jr.,

1992;Janeway, Jr., 2001).

Obwohl das immunologische Modell von Janeway die komplexe Realität der Immunantwort differenzierter beschreibt als ältere Modelle, kann es noch nicht alle immunologischen Phänomene widerspruchsfrei integrieren. Als ein Beispiel wird in der Literatur die Autoimmunität angeführt (Matzinger, 2002). Nach dem sogenannten „Gefahrenmodell“ („Danger Model“) wird die Qualität der Signale, die antigenpräsentierende Zellen aktivieren können, nicht allein auf infektiöse Partikel beschränkt. Es wird eine Vielzahl unterschiedlicher „Gefahren- oder Alarmsignale“ angenommen, die unter anderem von geschädigten körpereigenen Zellen ausgesandt werden. Als körpereigene Alarmsignale konnten unter anderem Säugetier-DNA, Hitzeschockproteine, Interferon  $\alpha$ , Interleukin 1 $\beta$  oder Hyaluron (entsteht, wenn Blutgefäße beschädigt werden) identifiziert werden (Gallucci and Matzinger, 2001;Ishii et al., 2001;Matzinger, 2002).

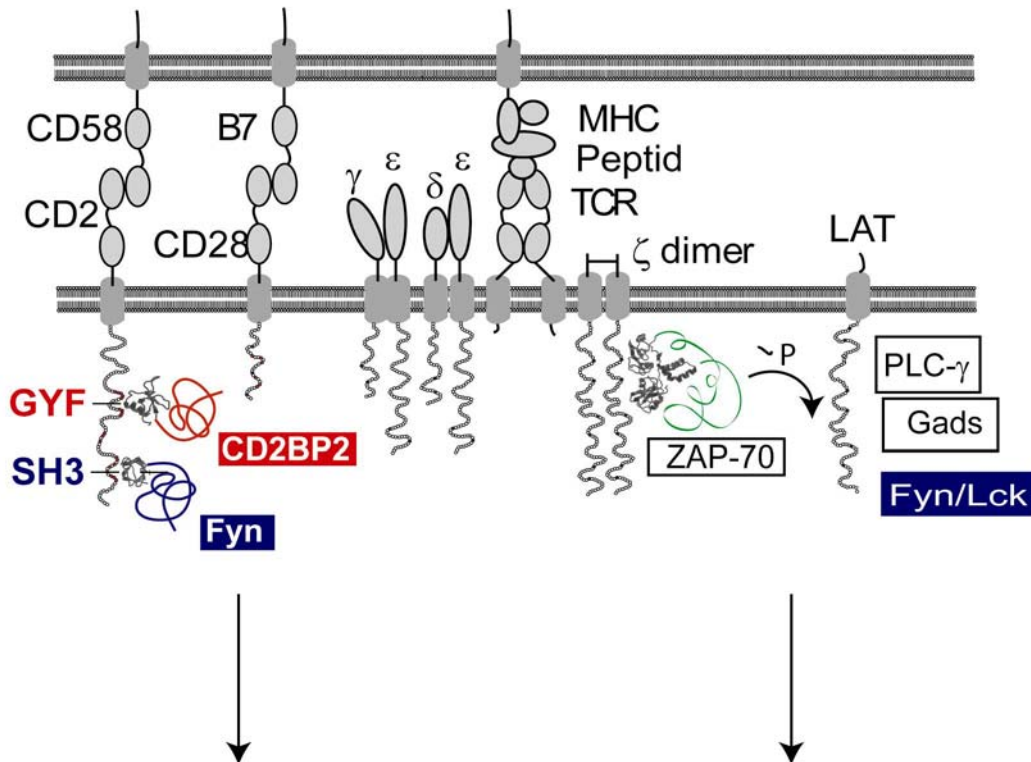
Auch bezüglich der Spezifität des T-Zell-Rezeptors befinden sich die Modelle in einer Entwicklung. Zunächst wurde für den T-Zell-Rezeptor eine sehr hohe Spezifität angenommen, da man mit Hilfe einzelner Antigene T Zellklone isolieren konnte, die durch Kontrollantigene nicht aktiviert werden konnten (Wucherpfennig, 2004). Durch strukturelle Studien, die die Interaktionen von Peptiden in MHC-Komplexen mit T-Zellrezeptoren genauer charakterisierten, wurde die sehr hohe Spezifität der T-Zellrezeptor- Antigenerkennung jedoch in Frage gestellt. Zunächst wurde durch massenspektrometrische Studien herausgefunden, daß ein einziges MHC-Molekül eine sehr große Zahl diverser Peptide binden kann (Chicz et al., 1993;Hunt et al., 1992). Es zeigte im Folgenden, daß die Spezifität der T-Zellrezeptorerkennung von MHC-gebundenen Peptiden lediglich eine kleine Anzahl konstanter Aminosäuren erfordert. So wurde für T-Zellklone, die spezifisch das Myelin-Basische Protein (MBP) erkennen, gezeigt, daß lediglich 3 Aminosäuren für eine relevante TCR- Erkennung notwendig sind (Wucherpfennig et al., 1994;Wucherpfennig and Strominger, 1995). Auf der Grundlage solcher Befunde wurde das Konzept der T-Zellrezeptor-Kreuzreaktivität entwickelt (Wucherpfennig, 2004), daß durch eine größere Zahl an Studien für humane und murine T-Zellen unterstützt wird (Bhardwaj et al., 1993;Brehm et al., 2002;Evavold et al., 1995;Grogan et al., 1999;Hagerty and Allen, 1995;Hemmer et al., 1997;Loftus et al., 1996;Misko et al., 1999). Als eine mögliche Bedeutung der T-Zellrezeptor-Kreuzreaktivität wird angenommen, daß auf diese Weise das Immunsystem eines Individuums auf bis dahin neue und unbekannte Pathogene schnell und mit einer ausreichenden Anzahl von T-Zellen reagieren kann (Wucherpfennig 2004).

---

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Modelle von der Funktionsweise des Immunsystems einer intensiven Entwicklung unterliegen. Einerseits wird darauf fokussiert, daß das Immunsystem zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ unterscheidet (Burnet, 1962; Janeway, Jr., 1992; Janeway, Jr., 2001). Dabei wird die Spezifität dieser Reaktion nicht allein durch T-Zellrezeptoren getragen, zumal diese einen gewissen Grad an Kreuzreaktivität mit verschiedenen Antigenen aufweisen (Wucherpfennig 2004). Neuerdings gibt es jedoch auch Modelle, die andere Parameter für eine Immunantwort in den Vordergrund stellen. Danach senden auch geschädigte körpereigene Zellen Alarmsignale, die das Immunsystem aktivieren (Matzinger 2002).

## 1.3 Interaktion von T Zelle und antigenpräsentierender Zelle

## Antigen-präsentierende Zelle



Zytokin-Produktion,  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss, Integrin-Adhäsion

## T-Zelle

**Abbildung 1-1 Interaktion von antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle.** Gezeigt sind einige wichtige Schlüsselproteine, die die Signalweiterleitung ermöglichen, unter anderen die Oberflächenrezeptoren MHC-Peptidkomplex/ T-Zellrezeptor, B7/CD28, CD58/CD2 und die intrazellulären Proteine CD2BP2, Fyn und Lck.

Die Interaktion von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle (APC) ist ein komplexer Prozeß, der nicht allein durch die Wechselwirkung von MHC-Komplex und T-Zellrezeptor getragen wird, zumal diese Wechselwirkung vergleichsweise schwach und transient ist (Davis et al., 1998a; Friedl and Storim, 2004; Friedl et al., 2005; Grakoui et al., 1999; Lyons et al., 1996). Zusätzliche Kontakte zwischen APC und T-Zelle werden durch sogenannte akzessorische

Moleküle herstellt (Grakoui et al., 1999;Huppa and Davis, 2003). Die akkzessorischen Moleküle vermitteln unter anderem die Zelladhäsion zwischen APC und T Zelle (van Seventer et al., 1991;Dustin, 2001). Wenn zum Beispiel naive T Zellen antigenpräsentierende Zellen nach einem spezifischen Peptid-MHC Komplex absuchen, wird die dafür notwendige Zelladhäsion durch akkzessorische Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie wie LFA-1 (Ganpule et al., 1997) oder CD2 (Tibaldi et al., 2002;Moingeon et al., 1989b) unterstützt. Wenn dann die naive T Zelle einen spezifischen Peptid-MHC- Liganden erkennt, wird durch eine Konformationsänderung von LFA-1 die Affinität zu seinen Liganden ICAM-1 und ICAM-2 erhöht. Dadurch wird die Assoziation von APC und T-Zelle stabilisiert und kann mehrere Tage erhalten bleiben (Ganpule et al., 1997;Grakoui et al., 1999;Gunzer et al., 2000).

Neben der Stabilisierung der Zelladhäsion zwischen APC und T-Zelle können akkzessorische Moleküle jedoch auch selbst Signale weiterleiten (Meuer et al., 1984). Nach dem Zwei-Signal-Konzept (Bretscher, 1999) wird die optimale Aktivierung der antigen-spezifischen T-Zelle erst erreicht, wenn neben dem MHC-TCR-Signal (Signal 1) noch ein zweites Signal ausgelöst wird. Dieses zweite Signal wird ebenfalls durch akkzessorische (kostimulatorische) Moleküle vermittelt, wobei diese funktionelle Rolle bisher am besten für Rezeptoren der B7-CD28 Superfamilie beschrieben ist (Sharpe and Freeman, 2002).

#### 1.4 CD2

Das akkzessorische (kostimulatorische) Molekül CD2 vereint zwei mögliche Funktionen eines akkzessorischen Moleküls. Es ist sowohl an der interzellulären Adhäsion (Wilkins et al., 2003) als auch an der Signaltransduktion beteiligt (Meuer et al., 1984) und stellt einen entscheidenden Regulator der Immunantwort dar (Lin et al., 1998). In CD2 Maus-Knockout Modellen konnte gezeigt werden, daß CD2 im Zusammenspiel mit CD28 und LFA-1 die Schwelle für Signale senkt, die zur Aktivierung von T-Zellen führen (Bachmann et al., 1999;Green et al., 2000). CD2 wird auf praktisch allen T-Zellen, Thymozyten und Natürlichen Killer- Zellen exprimiert (Moingeon et al., 1989a). Es interagiert mit seinen extrazellulären Liganden CD58 und CD48 mit unterschiedlicher Affinität. Die Affinität von CD2 und CD58 liegt zwischen 2 und 20  $\mu\text{M}$  (Davis et al., 1998b), die Affinität von CD2 und CD48 lediglich zwischen 10 und bis zu mehr als 1000  $\mu\text{M}$  (Arulanandam et al., 1993). Dabei werden CD58 und CD48 auf hämatopoetischen Zellen (zum Beispiel CD58 auf Makrophagen und CD48 auf B Zellen) aber auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen (zum Beispiel CD58 auf Fibroblasten und CD48 auf Endothelzellen)

exprimiert (Tangye 2000).

CD2, CD58 und CD48 gehören zur CD2- Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie von Zelloberflächenrezeptoren. Sie bilden zwei prominente extrazelluläre Domänen aus: eine N-terminale, variable V- Domäne und eine membran-proximale, konstante C2- Domäne. Im Gegensatz zur variablen V-Domäne weist die konstante C2-Domäne Disulfidbrücken innerhalb einer Kette auf (Tangye et al., 2000). An der Interaktion von CD2 mit CD58 sind jeweils die N-terminalen, variablen Immunglobulin V- Domänen beteiligt (Davis et al., 1998b; Richardson et al., 1988; Wang et al., 1999). Neben der relativ geringen Affinität ist die CD2-CD58 Interaktion durch eine hohe Assoziations – und Dissoziationsrate ( $k_{on}$  beziehungsweise  $k_{off}$ ) gekennzeichnet (Wang and Reinherz, 2000). Die dynamische Interaktion von CD2 und CD58 wird auch dadurch unterstützt, dass zwischen beiden Rezeptoren weniger eine Komplementarität hinsichtlich ihrer Form als vielmehr ihrer elektrischen Ladung besteht. Dabei trägt die Ladungskomplementarität zur schnellen Bindungsrate von CD2 und CD58 bei, während das Vorhandensein einiger hydrophober Interaktionen dann die schnelle Lösung beider Bindungspartner voneinander unterstützt (Wang and Reinherz, 2000).

Eine Reihe spezifischer Beiträge zur Funktion von T-Zellen sind für CD2 experimentell gezeigt worden: (I) Es kann den T-Zell/ APC-Kontakt bereits vor TCR-Erkennung initiieren (Koyasu et al., 1990; Moingeon et al., 1989b) und unterstützt die physikalische Interaktion von T Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (Selvaraj et al., 1987; Moingeon et al., 1989a), (II) es verstärkt die T-Zell Aktivierung (Koyasu et al., 1990) und die Antwort aktivierter T-Zellen auf IL-12 (Gollob et al., 1996) , (III) es kann die T-Zell-Anergie umkehren (Boussiotis et al., 1994) und (IV) es ist an zytoskelettalen Umbauprozessen beteiligt (Dustin et al., 1998; Eibert et al., 2004).

### **1.5 CD2 als Signaltransduktor für T Zell Effektorfunktionen**

CD2 kann intrazellulär Signale weiterleiten. Diese Signale beeinflussen unter anderen den intrazellulären Kalzium-Fluss, die Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Substrate (zum Beispiel CD3 $\zeta$ ) oder die Proliferation der T-Zellen (Tangye et al., 2000). Überdies sind CD2-Signale an der Oberflächenexpression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 (Green et al., 2000; Sasada et al., 2002) und der Produktion der Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und IL-10 beteiligt (Meuer et al., 1984; Schwarz et al., 1995; Wakkach et al., 2001):

Die Stimulation von Lymphknotenzellen von CD2/CD28 Knockout- Mäusen führte zu einer



verminderten Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 (Green et al., 2000). T Zellen aus Lymphknoten von CD2 Knockout- Mäusen mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor für ein bestimmtes Peptid zeigten nach Stimulation mit diesem Peptid im unteren Konzentrationsbereich des Peptides geringere Anteile CD69 positiver Zellen als vergleichbare T Zellen von CD2 +/+ Mäusen (Sasada et al., 2002).

Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, das über CD2 Signale weitergeleitet werden, die zu einer IL-2 Antwort der T-Zelle führen oder zumindest beitragen. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt (Holter et al., 1996). Unter anderen konnte auch gezeigt werden, daß die Stimulation primärer humaner T Zellen mit einer Kombination stimulierender CD2 Antikörper zu einer IL-2 Ausschüttung führt (Eibert et al., 2004).

Über CD2 werden auch Signale weitergeleitet, die zu einer Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  und IL-10 führen (Bullens et al., 2001;Schwarz et al., 1995). Die Stimulation von humanen peripheren Blutzellen mit einer Kombination stimulierender CD2-Antikörper führte zu einer im ELISA messbaren Ausschüttung von IFN $\gamma$  und IL-10 (Schwarz et al., 1995). In einem anderen Testsystem wurde der humane CD2-Ligand CD58 in einer Mastozytom-Maus-Zell-Linie überexprimiert. Gereinigte humane T Zellen wurden in Anwesenheit von löslichem CD3 Antikörper mit den CD58 exprimierenden Zellen kokultiviert. Dadurch wurden die T-Zellen stimuliert und die Ausschüttung von IFN $\gamma$  und IL-10 konnte per ELISA gemessen werden (Bullens et al., 2001).

## **1.6 Molekulare Grundlagen der intrazellulären Weiterleitung der CD2 Signale**

Zur intrazellulären Weiterleitung seiner Signale interagiert der CD2-Rezeptor über seine intrazelluläre Domäne mit bestimmten Proteinen, wie Fyn (Fukai et al., 2000;Gassmann et al., 1994;Lin et al., 1998), Lck (Bell et al., 1992;Bell et al., 1996), CD2AP(Dustin et al., 1998) ,Itk (King et al., 1998) oder auch CD2BP1 (Li et al., 1998) und CD2BP2 (Nishizawa 1998). Ein besonderes Merkmal der zytoplasmatischen Domäne von CD2 ist die Akkumulation prolinreicher Sequenzen (Sewell et al., 1986). Dabei sind prolinreiche Aminosäuremotive für Protein-Protein-Interaktionen von besonderer Bedeutung. Ein membranproximaler Abschnitt auf dem zytoplasmatischen Teil von CD2 ist für die Weiterleitung des IL-2 Signals essentiell und enthält die prolinreichen Sequenzen PPPGHR zweimal. Er erstreckt sich zwischen den Aminosäurepositionen 253 und 287 und leitet Signale weiter, die schließlich zur Ausschüttung

von Interleukin-2 führen (Chang et al., 1989; Chang et al., 1990; Hahn and Bierer, 1993). Verschiedene Trunktionsmutanten des humanen CD2 Moleküls wurden in einer Maus-Hybridom-T-Zell-Linie überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD2 in Anwesenheit von PMA stimuliert und die produzierte IL-2 Menge im ELISA gemessen. Trunkation des zytoplasmatischen Schwanzes von CD2 von der Position 287 in C-terminaler Richtung abwärts beeinflusste die IL-2 Antwort nicht. Wurde jedoch bereits ab der Position 253 trunziert, kam die IL-2 Antwort vollständig zum Erliegen (Chang et al., 1989). Dies bewies, daß die von Fyn und CD2BP2 erkannten PPPGHR-Sequenzen für die IL-2 Antwort entscheidend sind.

## 1.7 Fyn

Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, daß die src-Protein-Tyrosin-Kinase Fyn mit der zytoplasmatischen Domäne von CD2 interagiert (Beyers et al., 1992; Freund et al., 2002; Fukai et al., 2000; Gassmann et al., 1994; Lin et al., 1998). Unter anderem konnten CD2 und Fyn aus Lysaten von peripheren T Zellen koimmunopräzipitiert werden. Dabei stieg die Menge an kopräzipitiertem Fyn nach CD2 Stimulation deutlich an. Die Interaktion von Fyn mit CD2 wird durch die SH3-Domäne von Fyn vermittelt (Lin et al., 1998). Eine physikalische Interaktion zwischen FynSH3 und dem zytoplasmatischen Schwanz von CD2 wurde auch durch NMR-Experimente untermauert, in denen nachgewiesen werden konnte, dass der zytoplasmatische Schwanz von CD2 mit FynSH3 *in vitro* einen Komplex bildet (Freund et al., 2002).

Überdies wurden erste Experimente unternommen, die die funktionelle Bedeutung der CD2- Fyn Interaktion charakterisieren. Dabei konnte an T Zellen von Fyn Knockout- Mäusen, die das humane CD2-Transgen exprimierten (hCD2tg Fyn<sup>-/-</sup> Mäuse), nach CD2 Stimulation ein Proliferationsdefekt nachgewiesen werden. Nach alleiniger Stimulation über CD3 oder der kombinierten Stimulation über CD2 und ein Kalziumionophor konnte der Proliferationsdefekt nicht beobachtet werden. Der Proliferationsdefekt wurde auf einen Defekt in der CD2 stimulierten IL-2 Ausschüttung zurückgeführt (Fukai et al., 2000), da IL-2 als wichtiger Stimulus für die autokrine Proliferation von T Zellen gilt (Malek and Bayer, 2004).

## 1.8 CD2BP1 und CD2BP2

Die Proteine CD2BP1 (Li 1998) und CD2BP2 (Nishizawa 1998) wurden durch Yeast Two Hybrid Screens einer T-Zell cDNA Bibliothek als CD2 Interaktionspartner charakterisiert.

CD2BP1 wird überwiegend in hämatopoetischen Geweben wie der Milz und peripheren Leukozyten exprimiert, sehr geringe Expression kann im Thymus, dem Dünndarm, der Lunge und der Plazenta beobachtet werden. Gegenüber ruhenden T Zellen steigt die CD2BP1 Expression in aktivierten T Zellen an (Li 1998).

Die Interaktion von CD2BP1 und CD2 konnte auch durch Kopräzipitationsstudien untermauert werden. Dabei zeigte sich, daß die Koimmunpräzipitation von CD2BP1 und CD2 vom Vorhandensein der zytoplasmatischen Domäne von CD2 abhängt. In Lokalisationsstudien wurde beobachtet, daß CD2BP1 und CD2 nach CD2 Stimulation in Clustern an der Zellmembran humaner T Zellen kolokalisieren (Li 1998).

Bezüglich der funktionellen Rolle von CD2BP1 konnte gezeigt werden, daß es durch Interaktionen mit dem Wiskott- Aldrich Syndrom Protein (WASp) beziehungsweise der Phosphatase PTP-PEST Signale weiterleitet, die zur Modulation des Aktinzytoskeletts der Zelle führen (Badour et al., 2003; Badour et al., 2004). Zudem gibt es Hinweise, daß CD2BP1 an der Weiterleitung von CD2 Signalen beteiligt ist, die zur Aktivierung von T Zellen beitragen und zu bestimmten Zytokinantworten führen. Maus-T-Zellen, die transgen humanes CD2 exprimierten und in denen humanes CD2BP1 überexprimiert wurde, zeigten nach CD2- Stimulation eine deutlich geringere Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 als Zellen in denen humanes CD2BP1 nicht überexprimiert wurde (zum Beispiel 48 % zu 91 %). Die Überexpression einer CD2BP1-Trunkationsmutante ohne C-terminale SH3-Domäne (Trunkation ab Prolin 279) beeinträchtigte die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 hingegen kaum (zum Beispiel 83 % zu 91 %). Zudem war nach Stimulation mit CD2-Antikörpern in CD2BP1 überexprimierenden Zellen der Anteil IL-2 und IFN $\gamma$  positiver Zellen in der Zytokindurchflußzytometrie deutlich geringer als in Zellen ohne CD2BP1-Überexpression. Dieser Unterschied war von der Assoziation der Phosphatase PTP-PEST mit CD2BP1 abhängig und konnte nach ausschließlich antigenspezifischer Stimulation über den T-Zellrezeptor nicht beobachtet werden. Auch wenn die T Zellen über den physiologischen CD2- Liganden CD58 stimuliert wurden, zeigten die CD2BP1 überexprimierenden Zellen einen geringeren Anteil IL-2 positiver Zellen in der Zytokindurchflußzytometrie als Zellen, in denen CD2BP1 nicht überexprimiert wurde (Yang 2006).

Auch das CD2 Bindungsvermögen von CD2BP2 konnte über das Hefesystem hinaus in Überexpressions- und Kopräzipitationsstudien mit verschiedenen Zell-Linien wie COS7 oder Jurkat nachgewiesen werden (Nishizawa 1998). Interessanterweise konnte als Bindungsregion für CD2BP2 an CD2 genau der Bereich eingegrenzt werden, von dem in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß er für die Weiterleitung von IL-2 Signalen verantwortlich ist (Chang 1989, Chang 1990) und die beiden prolinreichen Sequenzen PPPGHR enthält (Nishizawa 1998). Dieser Befund war die Grundlage für die Hypothese, daß CD2BP2 an der Weiterleitung von IL-2 Signalen beteiligt sein könnte. Erste Experimente, die diese Hypothese stützen, wurden unternommen. Dazu wurden Jurkat-Zellen mit einem C-terminalen Fragment von CD2BP2 (Aminosäuren 225-341) überexprimiert und mit CD2 Antikörpern stimuliert. Im Vergleich zu Jurkatzellen, die lediglich mit dem leeren Überexpressionsvektor transfiziert worden waren, zeigten die CD2BP2 überexprimierenden Jurkatzellen nach CD2-Stimulation eine auf 150-200 % gestiegene IL-2 Antwort (Nishizawa 1998).

In seinem C-terminalen Bereich weist das Protein CD2BP2 die GYF-Domäne auf, die unter anderem durch das charakteristische Tripeptid Glycin- Tyrosin- Phenylalanin gekennzeichnet ist und in den meisten eukaryotischen Genomen vorkommt (Kofler and Freund 2005, Freund 2002, Freund 1999). Der räumlich strukturierte Teil der GYF-Domäne zeigt eine  $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  Topologie, wobei sich die  $\beta$ -Stränge antiparallel anordnen. Die  $\alpha$ -Helix ordnet sich abgeneigt zur  $\beta$ -Faltblattstruktur an und ermöglicht es so den Seitenketten aromatischer Aminosäuren zwischen  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblattstrukturen plaziert zu sein. Die Bindungsregion der GYF-Domäne an ein Peptid, das die CD2-Bindungsregion mit den doppelten PPPGHR- Motiven enthält, ist durch eine hydrophobe Tasche ausgezeichnet. Es wurde gezeigt, daß die Proline des CD2-Peptides hierbei mit dieser molekularen Oberfläche des konservierten Bindungsmotivs der GYF-Domäne interagierten (Freund 1999, Freund 2002). Obwohl die isolierte GYF- Domäne in Lösung als Monomer auftritt, werden für das gesamte CD2BP2- Protein sogenannte „Coil-Strukturen“ vorhergesagt. Sie könnten die Ausbildung von Dimeren oder Oligomeren ermöglichen, die zur Bindungsverstärkung von CD2BP2 mit seinen Bindungspartnern führen könnte (Freund 2002, Kofler and Freund 2005).

Neben einer möglichen T-Zell spezifischen Funktion ist CD2BP2 in weitere zelluläre Prozesse involviert. Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Protein CD2BP2 mit dem Protein U5-52K identisch ist (Hartmuth et al., 2002). U5-52K ist Bestandteil des Spliceosomes. Lokalisationsstudien zeigten überexprimiertes CD2BP2/U5-52K hauptsächlich im Zellkern von

---

Jurkatzellen und HeLa-Zellen. Mit Hilfe eines CD2BP2/U5-52K-spezifischen Heteroantiserums konnte auch endogen exprimiertes CD2BP2/U5-52K hauptsächlich im Zellkern von HeLa Zellen lokalisiert werden (Laggerbauer 2005).

## 1.9 Herleitung der Fragestellung

Die Erforschung der zellulären Signalweiterleitung hat bereits zu bedeutenden Fortentwicklungen therapeutischer Möglichkeiten in der Medizin geführt. Dabei hat die immunologische Sicht auf die Pathogenese wichtiger Krankheitsgruppen wie Krebs, Infektionskrankheiten oder Autoimmunerkrankungen interessante therapeutische Ansätze hervorgebracht. Die Erforschung der Signaltransduktionsprozesse in T Lymphozyten hat unter anderem zur Entwicklung einer Reihe wertvoller Pharmaka geführt, die zum Beispiel in der Transplantationsmedizin oder zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten Anwendung finden (Pardoll 2002, O'Neill 2006).

Der Oberflächenrezeptor CD2 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Die molekularen Grundlagen seiner intrazellulären Signalweiterleitung werden erforscht. In diesem Zusammenhang sind Proteine identifiziert worden, die mit dem zytoplasmatischen Schwanz von CD2 interagieren können. Unter ihnen befindet sich das Protein CD2BP2. Erste funktionelle Untersuchungen führten zu der Hypothese, daß CD2BP2 CD2-Signale weiterleitet, die eine Interleukin-2 Antwort des T Lymphozyten auslösen. Allerdings wurde für diese Untersuchungen lediglich ein Fragment von CD2BP2 in der Tumorzelllinie Jurkat überexprimiert. Daher ist es unklar, ob diese Daten auch die physiologischen Verhältnisse in primären, peripheren T Lymphozyten widerspiegeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Rolle von CD2BP2 in primären, peripheren T Lymphozyten zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere die Hypothese überprüft werden, daß CD2BP2 an Signalwegen zur CD2-vermittelten Interleukin 2 Ausschüttung beteiligt ist. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob CD2BP2 in weitere CD2-vermittelte Signalwege involviert ist, die zur Heraufregulation des Lymphozytenaktivierungsmarkers CD69 und der Zytokine Interferon  $\gamma$  und Interleukin 10 führen.

Mit Hilfe der RNAi-Technik wurden CD2BP2-defiziente primäre menschliche T-Lymphozyten erzeugt. Es wurde untersucht, ob die CD2BP2-defizienten T Zellen einen funktionellen Defekt CD2- vermittelter Zytokinantworten aufwiesen. Dabei wurden die Zytokinantworten mit Hilfe von ELISA und Durchflußzytometrie charakterisiert.