

1 Einleitung

Die Fähigkeit einer Zelle sich einer verändernden physiologischen Umgebung anzupassen, ist eine wichtige Voraussetzung für die Homöostase von Geweben und Organen und damit für das Überleben von mehrzelligen Organismen. Mehrzellige eukaryontische Organismen bestehen aus multifunktionellen Organen und Zellen, die im Zuge der zellulären Differenzierung entstanden sind. Der Prozess der zellulären Differenzierung beschreibt den allmählichen Erwerb von zelltyp-spezifischen Eigenschaften, die durch extrazelluläre Faktoren und durch Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen hervorgerufen werden. Der Proliferations- und der Differenzierungsstatus einer Zelle werden durch sekretierte Moleküle, Transmembranrezeptoren, intrazelluläre Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren kontrolliert und aufrechterhalten. Die an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligten Moleküle und Mechanismen stehen in enger Verbindung mit der Zellzykluskontrolle.

1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist eine komplexe Folge von Prozessen, die exakt reguliert werden müssen, wenn Zellen proliferieren, differenzieren oder in die Apoptose eintreten. Die Übertragung der genetischen Informationen von einer Zellgeneration zur nächsten erfordert die vollständige und exakte Replikation des Genoms während der S-Phase und die Segregation in zwei neue Tochterzellen während der Mitose (M-Phase). S- und M-Phase sind kritische Stadien, die in einem streng geordneten zyklischen Prozess eine korrekte Duplikation einer Zelle erlauben, ohne dass genetische Abnormalitäten auftreten. In einem normal ablaufenden Zellzyklus folgt nach vollständig beendeter S-Phase die M-Phase. Zwischen der S- und M-Phase gibt es zwei G-Phasen (G1 und G2; gap:Lücke), die gewährleisten sollen, dass vor der DNA-Synthese und vor der Mitose alle notwendigen Faktoren für die Zellteilung und somit für die Tochterzellen vorhanden sind. Im Verlauf von Differenzierungsprozessen nimmt das proliferative Potential der Zellen ab und diese gehen letztendlich in einen ruhenden Zustand über, der als G₀-Phase bezeichnet wird (Pucci et al., 2000).

1.2 Die Regulation des Zellzyklusses

Es gibt eine Vielzahl von Kontrollpunkten, die den Zellzyklus regulieren. Jeweils ein Kontrollpunkt befindet sich an der G₁/S-Phasen-Grenze, in der S-Phase und während der

G₂/M-Phase (MacLachlan et al., 1995). Die Kontrollpunkte beschreiben eine Reihe von regulatorischen Mechanismen, die die Proliferation nur in Anwesenheit von stimulatorischen Signalen, wie Wachstumsfaktoren, erlaubt. Die Kontrollmechanismen sind ebenfalls wirksam, wenn DNA-Schäden auftreten. In diesem Fall wird eine Wachstumsarretierung ausgelöst, der es der Zelle ermöglicht, den Schaden zu reparieren. Nachdem der Schaden beseitigt ist, kann die Proliferation ordnungsgemäß fortgesetzt werden. Kann der Schaden nicht behoben werden, wird die Zelle durch Apoptose eliminiert (Pucci et al., 2000). Fehler bei der Signalgebung für die Apoptose oder Mutationen von Molekülen, die an der Apoptose beteiligt sind, können zu pathologischen Zuständen, z. B. zur Tumorgenese, führen.

Die Progression der eukaryontischen Zellen durch die vier Phasen des Zellzyklusses wird durch die sequentielle Aktivierung oder Inaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs: cyclin-dependent kinase) vermittelt. Die CDK's umfassen eine konservierte Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen (Pucci et al., 2000), deren Kinase-Aktivität von der Anwesenheit aktivierender Cycline abhängig ist. Die Expression der spezifischen Cycline wird in den jeweiligen Phasen moduliert. Die Akkumulation, die Aktivierung und die Degradation der spezifischen Cyclin-CDK-Komplexe sind Schlüsselereignisse innerhalb der verschiedenen Zellzyklus-Phasen.

Die CDKs wiederum werden von zwei CDK-Inhibitor-Familien (auch Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CKIs) genannt) reguliert. Die Vertreter der p21 Familie (p21^{CIP1/WAF1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) und die der INK4 Familie (einschließlich p15 INK4b, p16 INK4a und p19INK4d) sind Induktoren der Zellzyklusarretierung, insbesondere wenn sie in Säugetierzellen überexprimiert sind (Herwig et al., 1997; Morgan et al., 1995). Die Mitglieder der p21 Familie bilden Komplexe mit verschiedenen CDKs, wie CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 und mit Cyclinen, wie A, B, D und E, und entfalten durch Interaktion ihre Wachstumsinhibitorische Wirkung. Die induzierte Expression dieser Inhibitoren bewirkt eine Arretierung der Zellen im G₁-Stadium (Zhang et al., 1994). Der p21^{CIP1/WAF1} vermittelte G₁-Arrest ist oftmals eine Konsequenz von stressreichen Einflüssen. Die Expression von p21^{CIP1/WAF1} wird unter anderem vom p53 Tumor-Suppressor-Protein reguliert, der eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklusses, in der Apoptose, in der Seneszenz und in der Differenzierung übernimmt (Bellamy et al., 1996). p53 ist ein DNA-bindendes Protein, das als Transkriptionsfaktor (Narita et al., 1998) in normalen Zellen auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Durch Ereignisse, die zu DNA-Schäden führen, kommt es zur posttranslational-regulierten Akkumulation von p53 (El-Deiry et al., 1998) und in Folge dessen zum G₁-Arrest durch erhöhte Expression von p21^{CIP1/WAF1}. Die Beziehung von p53 zur Apoptose wird durch

die erhöhte transkriptionelle Expression von proapoptotischen Genen der Bcl-2 Familie, wie Bak und Bax, und Genen der Todesrezeptoren-Familie (FAS/APO1) deutlich (El-Deiry et al., 1998).

1.3 Notwendigkeit der Zellzykluskontrolle für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase

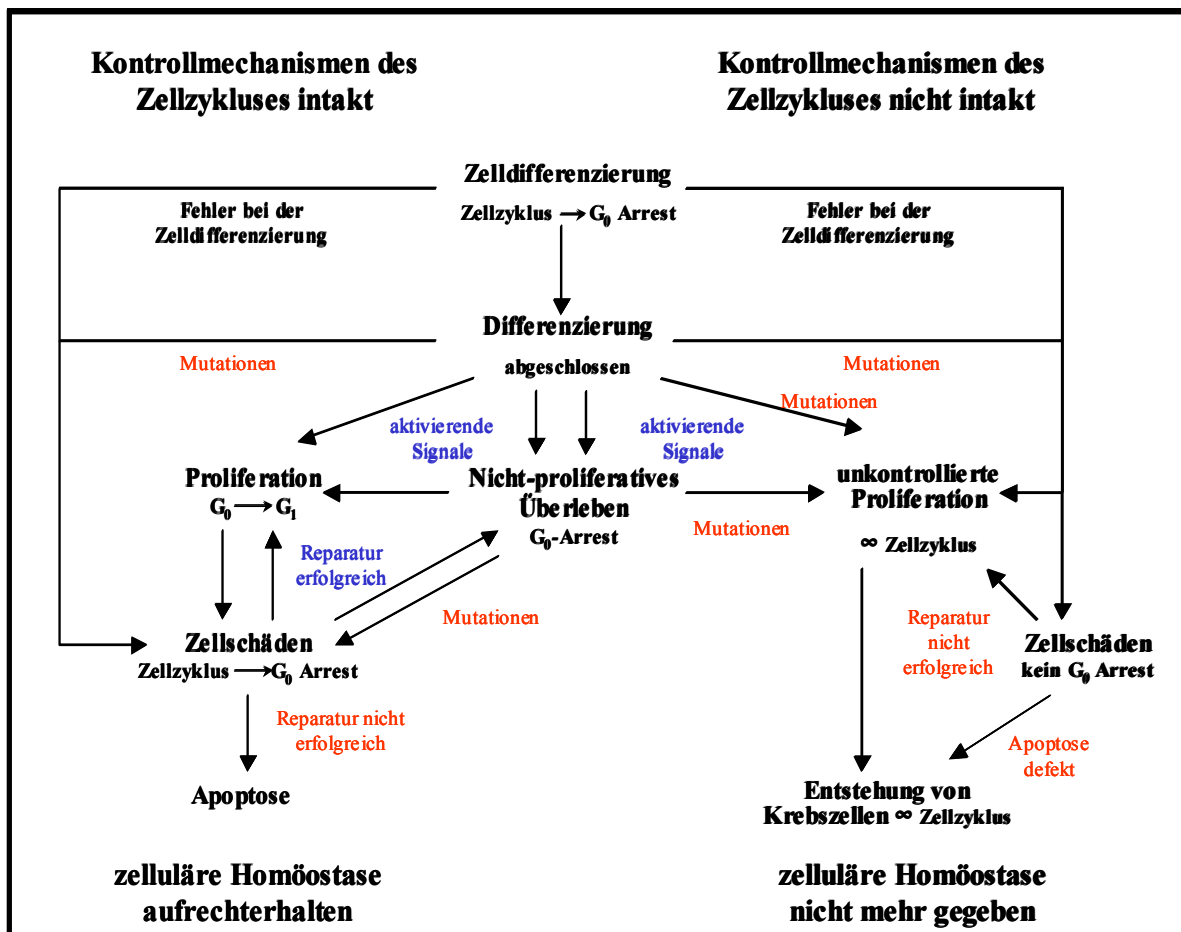


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bedeutung der Zell-Zyklus-Kontrolle für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und die Beziehung zu zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose

Zellen, die sich im Stadium der Differenzierung befinden, vermindern sukzessiv ihre proliferative Potenz, indem sie aus dem Zellzyklus austreten und in der aktiven, ruhenden G₀-Phase arretieren. Nach Beendigung der Differenzierung können die Zellen entweder in diesem Zustand verbleiben oder in Folge eines stimulatorischen Signales das Wachstum initiieren. Innerhalb der Wachstumsphasen können durch endogene oder exogene Faktoren Zellschäden auftreten, die durch die Kontrollmechanismen des Zellzyklusses erkannt und durch die

zellulären Reparaturmechanismen behoben werden. Dazu verlassen die Zellen erneut den Zellzyklus und arretieren in der G₀-Phase. Bei erfolgreicher Reparatur bleiben die Zellen entweder im arretierten Zustand bis ein stimulatorisches Signal erneut das Wachstum induziert, oder die Proliferation wird direkt nach der Schadensbeseitigung fortgesetzt. Sind die Reparaturmechanismen nicht in der Lage den entstandenen Schaden zu beheben, werden die für den Organismus schädlichen oder nicht mehr benötigten Zellen durch Apoptose eliminiert. Durch diese Mechanismen bleibt die funktionelle Integrität von Geweben und Organen in einem mehrzelligen Organismus erhalten

Während und nach der zellulären Differenzierung können exogene Faktoren dazu führen, dass Moleküle, die an den Kontrollmechanismen des Zellzyklusses, der Proliferation, der Reparaturmechanismen und der Apoptose beteiligt sind, physiologisch verändert werden. Diese Mutationen führen oftmals zur Bildung von Zellen, die Defekte in der Proliferations- oder Apoptosekontrolle aufweisen. Beide Defekte verändern nachhaltig das zelluläre Gleichgewicht in komplexen eukaryontischen Organismen und führen zu Krankheiten, die auch den Tod eines Individuums bewirken können. Krebszellen beispielsweise treten aus dem Zell- oder Gewebeverband aus, proliferieren unkontrolliert, bilden eine eigene Autonomie und sind gegenüber wachstums-inhibierenden Substanzen partiell unempfindlich. Das unkontrollierte Zellwachstum stört oder inhibiert die funktionelle Integrität von Organen und Geweben, was zur Folge hat, dass der Organismus sterben kann.

1.4 Das Immunsystem

Das komplexe Immunsystem der Säugetiere besteht aus zellulären und humoralen Komponenten, deren Aufgabe es ist, den eigenen Organismus vor körperfremden Substanzen, wie Toxinen und infektiösen Krankheitserregern, wie Bakterien, Protozoen, Pilzen, Viren und Parasiten, zu schützen. Darüber hinaus kontrolliert das Immunsystem die Abwehr von körpereigenen Zellen, die Defekte in der Proliferationskontrolle aufweisen und zur Bildung von Tumoren befähigt sind. Die Immunologie unterscheidet konzeptionell und mechanistisch zwischen angeborener und erworbener Immunität. Beide Systeme verfügen sowohl über zelluläre als auch über humorale Elemente, die miteinander interagieren und ergänzend zusammenwirken.

1.4.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene, unspezifische Immunität stellt den phylogenetisch älteren Teil des Immunsystems dar. Die Induktion der unspezifischen Immunität, die gegen mikrobielle Erreger und deren Bestandteile gerichtet ist, verläuft sehr schnell, ist jedoch unangepasst und unabhängig von einem früheren Erregerkontakt (Roit, 1993). Ein immunologisches Gedächtnis wird vom angeborenen Immunsystem nicht aufgebaut. Dennoch sind zelluläre und humorale Bestandteile in der Lage, zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ zu unterscheiden. Zelluläre Vertreter der angeborenen Immunität sind Basophile, Eosinophile, Mastzellen, phagozytierende, polymorphkernige, neutrophile Granulozyten und Monozyten, aber auch Makrophagen und natürliche Killerzellen. Sie bilden die erste Verteidigungslinie gegen eine Vielzahl von pathogenen Erregern. Für die Erkennung körperfremder pathogener Organismen werden spezifische Rezeptoren benötigt. Die sogenannten TLRs (toll like receptors) sind evolutionär konservierte Zelloberflächenmoleküle, deren Aufgabe in der Erkennung von spezifischen, mit den Pathogenen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) besteht (Medzhitov et al., 2000). Die PAMPs sind chemisch diverse Produkte mit konservierten Motiven, die von Mikroorganismen produziert werden und eine essentielle Rolle bei deren struktureller Integrität spielen. LPS (Lipopolysaccharide), speziell Lipid A, Peptidoglycane, Lipoproteine, bakterielle DNA und bakterielle Flagellen sind einige Beispiele für PAMPs, die von Bakterien produziert und unter anderem von Makrophagen über einen TLR erkannt werden. Makrophagen und neutrophile Granulozyten phagozytieren den körperfremden Organismus und lösen diesen in seine Bestandteile auf.

Humorale Bestandteile der angeborenen Immunität sind Akute-Phase-Proteine, Enzyme, Zytokine (z.B. Interferone) und die alternative Komplementaktivierung. Deren Funktion besteht in der Agglutinierung von Fremdkörpern und in der Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und von Zellen der spezifischen Immunität zum Ort der Infektion.

1.4.2 Die adaptive Immunität

Die Notwendigkeit von Zell-Zell-Interaktionen und die Anwesenheit von spezifischen exogenen Faktoren (z.B. von Zytokinen) für die Proliferation, für das nicht-proliferative Überleben, für die Apoptoseinduktion und für die Differenzierung von Zellen und somit der Bezug zur Zellzykluskontrolle wird anhand der T-Zellentwicklung und –aktivierung deutlich.

T- und B-Lymphozyten sind zelluläre Komponenten der erworbenen Immunität, die infektiöse, körperfremde Organismen, Partikel und Substanzen zielgerichtet aufspüren, zerstören und gegen diese Antigene ein immunologisches Gedächtnis aufbauen. Die IgM-tetrameren Antikörper, die von differenzierten B-Zellen - den Plasmazellen – sezerniert werden, bilden den humoralen Anteil der adaptiven Immunität. Beide Lymphozytenpopulationen „lernen“ im Zuge der Etablierung der Selbsttoleranz während der frühen Entwicklung zwischen „körpereigenen“ und „körperfremden“ Antigenen zu unterscheiden. Den ersten Kontakt mit verschiedenen körpereigenen Antigenen haben T-Zellen während der Entwicklung im Thymus, wobei B-Zellen schon im Knochenmark (engl. bone marrow) mit körpereigenen Antigenen konfrontiert werden.

1.4.2.1 Die intrathymische Entwicklung und Selektion von T-Zellen

Die intrathymische T-Zellentwicklung ist gekennzeichnet durch Stadien der zunehmenden Differenzierung, der Proliferation und der Ruhe, aber auch durch selektive Phasen, die in Verbindung mit dem programmierten Zelltod oder des zellulären Überlebens stehen. Die Signalgebung durch Zell-Zell-Interaktionen hat für die Differenzierungsprozesse eine ebenso große Bedeutung, wie die Erkennung von essentiellen Zytokinen durch die entsprechenden Rezeptoren. Die verschiedenen Entwicklungsphasen werden dabei durch die Kontrollmechanismen des Zellzyklusses reguliert.

T-Zellen entstehen aus unreifen Vorläuferzellen, die aus der fötalen Leber oder dem postnatalen Knochenmark in den Thymus wandern. Die intrathymische Entwicklung von einer Vorläuferzelle zu einer reifen T-Zelle ist kein autonomer Prozess. Vielmehr benötigen Vorläufer-T-Zellen Signale von nicht hämatopoietischen Stromazellen, z. B. von Thymus-spezifischen Epithelzellen und mesenchymalen Fibroblasten (Peschon et al., 1994; von Freuden-Jeffry et al., 1995; Anderson et al., 2001). Die intrathymische Differenzierung ist durch eine zeitlich koordinierte Expression von Zelloberflächenproteinen auf den Thymozyten, einschliesslich CD4, CD8, CD44 und CD25, charakterisiert (Godfrey et al., 1993). Frühe Vorläufer-T-Zellen (Pro-T-Zellen) exprimieren weder den CD4 noch den CD8 Korezeptor und werden daher als doppelt negative (DN) Pro-T-Zellen bezeichnet. Die differentiellen Expressionen von CD25 und CD44 charakterisiert die sequentielle Entwicklung im Pro-T-Zellstadium durch vier distinkte Subpopulationen (DN1, DN2, DN3 und DN4).

Die Vorläufer-T-Zellen gelangen durch die Verbindung zwischen Cortex und Medulla in den Thymus. Während der Wanderung durch den Cortex differenzieren die Pro-T-Zellen vom DN1 (CD44⁺/CD25⁻) zum DN2 (CD25⁺CD44⁺) T-Zellstadium und migrieren zur subcapsularen Zone (Lind et al., 2001). Die Proliferation der frühen Thymozyten ist dabei von einem Signal abhängig, das vom IL-7 Rezeptor nach Bindung des entsprechenden Zytokins IL-7 generiert wird. Die α - bzw. β -TZR-Gene liegen in dieser Pro-T-Zellphase in Keimbahn-Konfiguration vor. Erst während des Überganges vom DN2 zum DN3 Stadium (CD44⁻/CD25⁺) werden die γ -, δ - und β -TZR-Gene in einem somatischen Rekombinationsprozess (Capone et al., 1998) unter Beteiligung von aktiven RAG1- und RAG2-Proteinen rearrangiert. Innerhalb dieser Phase wird die Proliferation der Pro-Thymozyten durch die Wachstums-inhibitorische Wirkung des p53-Suppressor-Proteins kontrolliert. In Folge von Doppelstrangbrüchen, die durch den somatischen Rekombinationsprozess der TZR- β -Gene entstanden sind, wird p53 durch Phosphorylierungsreaktionen aktiviert (Jacks et al., 1996). Thymozyten, die die β -TZR-Gene rearrangieren, verringern zunächst die Proliferation (Penit et al., 1995; Hoffman et al., 1996), was zur Aktivierung von p53 führt und wodurch die Wachstumsarretierung der Pro-T-Zellen eingeleitet wird. Pro-T-Zellen, die aufgrund einer fehlgesteuerten oder unzureichenden Rekombination der β -TZR-Gene keinen funktionellen Pro-TZR exprimieren und somit kein Signal über diesen generieren können, werden durch Apoptose in Folge einer weiteren Akkumulation von p53 deletiert (Haks et al., 1999). Die erfolgreich rearrangierten β -TZR-Gene werden exprimiert und bilden zusammen mit der pT α -Kette (pro-TZR- α -Kette) den funktionellen Pro-TZR. Die Signalgebung über den Pro-TZR-CD3-Komplex inaktiviert den p53-Transkriptionsfaktor durch Dephosphorylierung und induziert den Eingang in eine proliferative Phase, die mit der Differenzierung der Pro-T-Zellen vom DN3- zum DN4-Stadium (CD25⁻CD44⁻) einhergeht (Haks et al., 1999) und schließlich zur Entstehung von unreifen cortikalen DP-Thymozyten (CD4⁺CD8⁺) führt. In dieser Phase der Entwicklung wird die proliferative T-Zellexpansion erneut inhibiert, um die α -TZR-Gene durch die aktiven RAG-Proteine zu rearrangieren (Petrie et al., 1993). Die Expression aller notwendigen Komponenten für einen funktionellen TZR, wie die α - und β -TZR-Ketten, ermöglichen die Selektion auf der Basis der Antigenrezeptorspezifität. Durch positive und negative Selektion werden die T-Zellen eliminiert, die keinen funktionellen TZR exprimieren und somit keine Interaktion mit den eigenen MHC-Komplexen eingehen können oder deren TZR eine Autoreaktivität für eigene Peptide aufweist. T-Zellen, die beide selektiven Phasen überleben, verringern entweder die Expression des CD4- oder des CD8-

Korezeptors und verlassen den Thymus als $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. Diese migrieren als reife naive T-Lymphozyten in die sekundären peripheren lymphatischen Organe.

1.4.2.2 Die extrathymische Differenzierung von $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten

In den peripheren lymphatischen Organen wird zwischen reifen naiven $\alpha\beta$ -T-Zellen, aktivierten T-Zellen mit spezifischer Effektorfunktion und Gedächtnis-T-Zellen unterschieden. Die reifen naiven $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten sind bis zum spezifischen Antigenkontakt im G_0 -Stadium des Zellzyklusses arretiert. Die Aufrechterhaltung des ruhenden Zustandes ist ein aktiv regulierter Prozess, der weiterhin noch unverstanden ist. Die Zell-Zell-Interaktion, die Sekretion von Zytokinen und deren Erkennung durch spezifische Rezeptoren erzeugen notwendige Signale für die Aktivierung, Proliferation und damit für die Etablierung der Effektorfunktionen von T-Zellen und stehen mit der Zellzykluskontrolle in Verbindung.

1.4.2.2.1 Antigenpräsentation

B-Zellrezeptoren können Antigene direkt in löslicher Form erkennen (Raulet et al. 1989), während $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren die Präsentation von Peptidfragmenten in Assoziation mit MHC-Komplexen (major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitäts-komplex) bedürfen. Der MHC-Komplex nimmt eine zentrale Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen und der Selbsttoleranz im Zuge der negativen Selektion ein (Schwarz et al., 2002). Die Funktion der MHC-Komplexe für die Selbsttoleranz wird durch die intrathymische T-Zellentwicklung deutlich, wo die T-Zellen, die den eigenen MHC-Komplex mit dem TZR erkennen können, negativ selektiert werden. Die Bedeutung der MHC-Komplexe in der Immunabwehr liegt in der Präsentation von „Fremd-Peptiden“. Die MHC-Moleküle können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Die MHC-Klasse-I-Moleküle sind auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren endogene Peptide, die von den $CD8^+$ -T-Zellen in Komplex mit MHC-Klasse-I erkannt werden (Rammensee et al. 1996; Reizis et al., 1997). Endogene Peptide können von intrazellulären Bakterien stammen oder von viralen Proteinen, die nach Infektion endogen synthetisiert werden (Morrison et al., 1986). MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie beispielsweise von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und thymischen Epithelzellen, exprimiert und präsentieren den $CD4^+$ -T-Zellen Peptide, die ausgehend von extrazellulären Proteinen generiert werden. Fremdorganismen werden durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (B-Zellen, Makrophagen), Phagozytose (Makrophagen) oder durch

Pinozytose (allen Zellen) von APZs aufgenommen und in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten der Zelle degradiert. Die Peptide der degradierten Proteinen werden in Verbindung mit dem MHC-II-Komplex zur Zelloberfläche transportiert und dadurch CD4⁺-T-Zellen präsentiert.

1.4.2.2 Antigenerkennung durch den TZR

Antigene, die von den APZ über den MHC-Komplexen präsentiert werden, werden über die hoch variablen Regionen des TZR erkannt. Jede T-Zelle in der Peripherie exprimiert einen klon-typischen TZR, der in der Regel nur ein Epitop eines Antigens spezifisch erkennt. Um der in der Natur vorkommenden Vielfalt an Antigenen entgegenwirken zu können, müssen dementsprechend viele spezifische TZR generiert werden. Die hohe TZR-Spezifität für ein bestimmtes Antigen wird durch die variablen Regionen der TZR-Ketten definiert. Der TZR ist ein membranständiges Polypeptid-Heterodimer (Bentley et al., 1996), bestehend aus einer α - und β -Kette, die über Disulfidbrückenbindungen verbunden sind. Die Gene der α - und β -TZR-Ketten bestehen aus mehreren Regionen für die im Genom unterschiedliche Gensegmente existieren. Die α - und γ -Ketten werden von V-, J- und C-Gensegmenten und die der β - und δ -Ketten von V, D, J und C-Gensegmenten kodiert. Die enorme Diversität des TZR von bis zu 10^{15} theoretisch möglichen Spezifitäten (Davis et al., 1988) entsteht unter anderem während der intrathymische Entwicklung durch die somatische Rekombination von V-, D-, J- und C-Segmenten (Whetsell et al., 1991; Wessel, 2002). Der TZR ist darüber hinaus mit dem CD3-Komplex (γ , δ , ϵ) und einem zytoplasmatisch gerichtetem ζ -Homodimer bzw. einem ζ/η -Heterodimer assoziiert (Weiss et al., 1991). Während der Antigenerkennung wird die Bindung des TZRs zum jeweiligen MHC-Komplex durch die Bindung von einem der beiden Korezeptoren CD8 (zytotoxische T-Zellen) bzw. CD4 (Helfer-T-Zellen) unterstützt. Der CD4-Korezeptor unterstützt die Bindung der CD4⁺-T-Zelle an die APZ durch Interaktion mit dem MHC-II-Komplex. Der CD8-Korezeptor interagiert mit dem MHC-I-Komplex und unterstützt dadurch die Bindung der CD8⁺-T-Zelle an den APZ. Nach Erkennung des spezifischen Antigens durch den TZR, wird über den CD3-Komplex und die Ketten der ζ -Heterodimere ein intrazelluläres Signal initiiert, welches zur Aktivierung der T-Zelle führt und in Folge dessen den Prozess der klonalen Expansion einleitet.

1.4.2.2.3 T-Zellaktivierung

Die Aktivierung, die Proliferation und das Überleben von T-Zellen in der Peripherie werden durch variable extrazelluläre Faktoren, wie Zytokine, MHC-Antigen-Komplexe und kostimulatorische Liganden reguliert. Für die T-Zellaktivierung ist ein Signal notwendig, das durch die Interaktion zwischen den Antigen-spezifischen TZR und den Peptid-präsentierenden MHC-Komplexen generiert und über den CD3-Komplex intrazellulär weitergeleitet wird. Die intrazelluläre Signalgebung wird durch biochemische Prozesse, z. B. durch Phosphorylierungen und durch Dephosphorylierungen von Fyn-, Lck- und Zap70-Kinasen gesteuert, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT, NF- κ B oder AP-1 führen (Medema et al., 1999). Die Transkriptionsfaktoren sind ihrerseits für eine erhöhte transkriptionellen Expression von IL-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R) verantwortlich. Die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors (CD25) sind wichtige Voraussetzungen für die Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und das Überleben von antigen-stimulierten T-Zellen. Der IL-2-Rezeptor (CD25) wird unter anderem während der frühen T-Zellentwicklung im DN2 und DN3-Stadium exprimiert. Im Verlauf der T-Zellreifung wird die IL-2 Rezeptorexpression wieder herunterreguliert und in Folge der T-Zellaktivierung erneut an der Zelloberfläche exprimiert. Durch die Bindung von IL-2 am eigenen IL-2-Rezeptor wird die Produktion von IL-2 weiter gefördert, was das Signal für die T-Zellaktivierung verstärkt.

Für die vollständige T-Zellaktivierung und -differenzierung ist nicht nur die Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den TZR erforderlich, sondern auch eine Kostimulation, die durch die Interaktion von akzessorischen Molekülen der APZ und deren korrespondierenden Rezeptoren auf den T-Lymphozyten vermittelt wird. Eine unvollständige Aktivierung induziert bei den T-Zellen einen Zustand der Anergie, der in manchen Fällen auch zur Apoptose führen kann (Rudd et al., 1996). Die Anergie beschreibt einen physiologischen Zustand der T-Zelle, der in Folge der Antigenerkennung kein hinreichendes, intrazelluläres Signal generiert, welches nicht zur Proliferation, zur Differenzierung und zur Zytokinsekretion führt. CD28 ist ein kostimulatorisches Molekül, das auf den meisten peripheren naiven T-Zellen exprimiert wird. Der CD28-Korezeptor interagiert mit den Glykoproteinen B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86), die auf antigenpräsentierenden Zellen, z. B. auf aktivierten B-Zellen, IFN- γ -stimulierten Monozyten (B7.1), Makrophagen und dendritischen Zellen (B7.2), zu finden sind. Das kostimulatorische Signal vom CD28-Korezeptor in Verbindung mit dem Signal vom aktivierten TZR/CD3-Komplex induziert einen synergischen Effekt. Als Konsequenz der kostimulierten Aktivierung beginnen die

arretierten, naiven T-Zellen mit der massiven Proliferation, ein Prozess der als klonale Expansion verstanden wird, und anschließend mit der Differenzierung zu Effektor-T-Zellen. Nach Aktivierung und Differenzierung wird in der Peripherie, basierend auf der Expression von CD4 und CD8, zwischen zwei funktionell unterschiedlichen Effektor-T-Zellpopulationen unterschieden. CD4⁺-T-Zellen besitzen innerhalb der humoralen und zellvermittelten Immunantwort eine charakteristische Helferfunktion (Kisielow et al., 1975). Bei den CD4⁺-T-Zellen handelt es sich um keine homogene Zellpopulation. Die Analyse des Lymphokinspektrums, das von differenzierten CD4⁺-T-Zellen produziert wird, führte zu Unterscheidung von funktionell differenten Helfer-T-Zellsubpopulationen (Th) (Mosmann et al., 1986). Die als Th1-Zellen bezeichneten CD4-T-Lymphozyten produzieren vorwiegend IL-2, IFN γ und TNF β , während die Th2-T-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sekretieren. Ein intermediäres Muster an Lymphokinen, wie IL-2, IFN γ und IL4, wird von den Th0 T-Zellen produziert (Kamogawa et al., 1993). Beide T-Lymphozytenpopulationen, Th1- und Th2-Zellen, sind funktionell durch die differentielle Zytokinsekretion an der Regulation der zellulären Immunität und Antikörperproduktion beteiligt. Zellen des Th1-Typs werden auch als inflammatorische Zellen bezeichnet und führen nach Aktivierung primär zu einer zellvermittelten Immunantwort. IL-2 beispielsweise fördert das Wachstum von B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen, während IFN γ die Differenzierung von B-Zellen einleitet und die Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen induziert. Überwiegen Th2-Zellen im Verlauf der Immunreaktion führt dies zu einer humoral geprägten Immunantwort. IL-4 und IL-5, welche von aktivierten Th2-Zellen produziert werden, aktivieren ihrerseits B-Zellen, fördern deren Differenzierung und induzieren entweder eine IgE-Antwort (IL-4) oder die IgA-Synthese (IL-5). IL-4 ist darüber hinaus für die Differenzierung zu Th2-Zellen und für deren Überleben notwendig (Johansson-Lindbom et al., 2002). CD8⁺-T-Zellen haben in der Effektorphase die Funktion als zytotoxische T-Lymphozyten und sind in der Antigenerkennung MHC-Klasse-I restringiert. Die CD8⁺-Effektorzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von körpereigenen Zellen, die aufgrund von Infektionen mit intrazellulären Bakterien und Viren geschädigt sind. Zellen, die durch toxische Agenzien geschädigt werden und bösartige entartete Tumorzellen sind ebenfalls das Ziel der zytolytischen Aktivität von CD8⁺-Lymphozyten. Die zytolytische Aktivität wird entweder durch die Freisetzung von Perforin, Poren-bildende Proteine, zusammen mit Granzym-Molekülen (van den Broek et al., 1996; Jensen et al., 1998; Kagi et al., 1994) oder durch die Interaktion des Fas-Liganden mit dem entsprechenden Fas-Rezeptor auf den Zielzellen vermittelt (Rouvier et al., 1993).

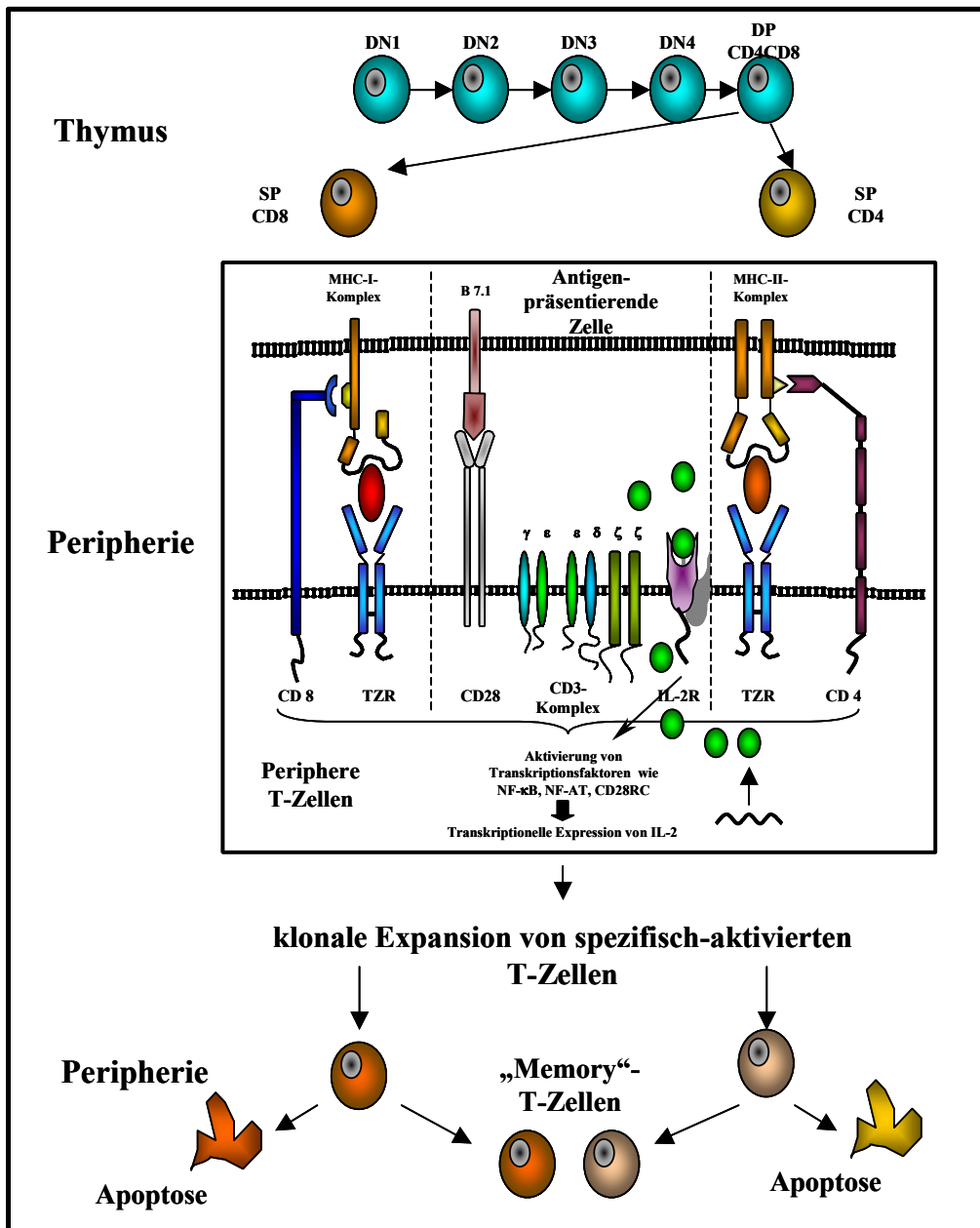


Abb. 2: Darstellung der verschiedenen Phasen der T-Zellentwicklung und die an der T-Zellaktivierung beteiligten Oberflächenmoleküle

Die sich im Thymus entwickelnden T-Zellen differenzieren zu reifen naiven $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -T-Zellen. Diese T-Zellen migrieren in die peripheren lymphatischen Organe, wo sie auf Fremdpeptide treffen, die von den jeweiligen MHC-Komplexen präsentiert werden. Die Erkennung des Fremdpeptides durch den antigenspezifischen TZR und die Interaktion der jeweiligen Korezeptoren, CD4 bzw. CD8, mit den MHC-Komplexen initiieren Signale, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Diese aktivieren ihrerseits die transkriptionelle Expression von IL-2, dessen Proteinprodukt von der T-Zelle zunächst sekretiert und dann vom eigenen IL-2-Rezeptor erkannt wird. Die Signale über den IL-2-Rezeptor und über den TZR/CD3-Komplex initiieren die Aktivierung und die klonale Expansion der Antigen-spezifischen T-Zellen. Kostimulatorische Signal über den CD28-Rezeptor erhöhen die IL-2-Sekretion und aktivieren die T-Zellen vollständig. Nach der Neutralisierung der spezifischen Antigene differenzieren einige aktivierte T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen („Memory“-T-Zellen), die im Verlauf der sekundären Infektion mit dem gleichem Antigen erneut beginnen zu proliferieren. Viele der aktivierten T-Zellen erfahren keine weitere Differenzierung, sondern werden durch Apoptose deletiert.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der adaptiven Immunität besteht in der Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses nach primärem Antigenkontakt. Aktivierte und differenzierte CD4⁺-Helfer-T-Zellen und zytotoxische CD8⁺-T-Zellen sind während und nach der Neutralisierung des Pathogenes in der Lage, sogenannte Gedächtniszellen („Memory“ Zellen) zu bilden. Gedächtnis-T-Zellen sind langlebige, über ein Antigen aktivierte T-Zellen, die nach erneutem spezifischem Antigenkontakt eine hohe Reaktivität aufweisen und erneut in die klonale Expansion eintreten. Vor dem sekundären Antigenkontakt sind die Gedächtniszellen in der G₀-Phase des Zellzyklusses arretiert. Im Verlauf der sekundären Immunantwort benötigen die Gedächtniszellen weniger stringente Bedingungen für die Aktivierung als naive T-Zellen. Beispielsweise werden naive T-Helferzellen nur von dendritischen Zellen aktiviert, während die Proliferation der „Memory“-T-Zellen auch durch Makrophagen und B-Zellen induziert werden kann (Jenkins et al., 1992).

1.5 Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein genetisch-regulierter aktiver Prozess, der für Wachstum, Differenzierung und Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems essentiell ist (Jacobson et al., 1997). Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, die Veränderungen in der Morphologie von Lebergeweben nach Eliminierung lebensnotwendiger Wachstumsfaktoren beobachteten (Kerr et al., 1972). Apoptose und Nekrose unterscheiden sich in morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten. Die Morphologie von apoptotischen Zellen ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Blasenbildung von Plasmamembranen („membran blebbing“), Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Degradierung des Zytoskeletts, Verlust der Membransymmetrie und -integrität, DNA-Fragmentierung und durch die Exposition von Phosphatidylserin auf der Plasmamembranaussenseite (Ellis et al., 1991). Aus biochemischer Sicht werden während der Apoptose vor allem katabolische Enzyme, z.B. Nukleasen und Proteasen, aktiviert, die die zuvor beschriebenen morphologischen Veränderungen bewirken.

1.5.1 Bedeutung der Apoptose in der Entwicklung und Funktion des Immunsystems

Die Regulation des zellulären Überlebens und des zellulären Todes ist ein kritischer Schritt für die Funktion des Immunsystems der Säugetiere. Die Apoptose im Immunsystem dient vorrangig der Beseitigung von unnötigen, potentiell pathologischen oder autoreaktiven Zellen, aber auch von aktivierten Lymphozyten, die während der Immunantwort generiert wurden

und nach der Immunantwort nicht mehr benötigt werden (Marsden et al., 2003). In den verschiedenen Entwicklungsphasen von T- und B-Zellen spielen unterschiedliche apoptotische Mechanismen bei der Deletion von nicht mehr erforderlichen Zellen eine entscheidende Rolle.

1.5.1.1 Rolle der Apoptose in der B-Zellentwicklung

Für die Generierung der Diversität des B-Zell- und T-Zell-Repertoires spielt die Apoptose eine essentielle Rolle. In der frühen B-Zell-Ontogenie werden insbesondere die B-Zellen durch Apoptose eliminiert, die keinen funktionellen Immunglobulinrezeptor synthetisieren können (Krammer et al., 1994; Melchers et al., 1993 und Melchers et al., 1994).

Im Knochenmark im frühen Pro-B-Zellstadium ($B220^+/CD43^+$) werden die B-Zellen durch Apoptose eliminiert, die keinen IL-7-Rezeptor exprimieren und daher kein Überlebenssignal durch Bindung von IL-7 generieren können oder die aufgrund einer fehlerhaften Zusammensetzung der IgH Kette keinen funktionellen Pro-BZR exprimieren (Marsden et al., 2003). B-Zellen, die den Pro-BZR erfolgreich an der Zelloberfläche exprimieren, entwickeln sich weiter zu Pro-B-Zellen ($B220^+/CD43^-$). B-Zellen in diesem Entwicklungsstadium erfahren eine somatische Umordnung der IgL-Gene. Durch die produktive V-J Rekombination kommt es zur Expression des BZR, bestehend aus der schweren IgM Kette und den beiden leichten Ig κ und Ig λ Ketten. Kann keine leichte Ig λ -Kette produziert werden, sterben die Zellen durch Apoptose. Zellen, die über den funktionellen BZR ein Überlebenssignal weiterleiten können, entwickeln sich zu unreifen B-Zellen ($B220^+/sIgM^+$). In diesem Entwicklungsstadium werden unreife B-Zellen, die eine Autoreaktivität durch Bindung von Autoantigenen an das Oberflächen-IgM zeigen, durch Apoptose klonal deletiert (negative Selektion) (Hartley et al., 1993). Die Differenzierung von einer kurzlebigen unreifen zu einer langlebigen reifen B-Zelle erfordert ein Signal, das über den BAFF Rezeptor und den entsprechenden TNF-verwandten Zytokin BAFF generiert wird (Laabi et al., 2000). Kann ein entsprechendes Signal nicht aufgebaut werden, stirbt die Zelle durch Apoptose. BAFF kann die Differenzierung und das Überleben der B-Zellen durch erhöhte Expression von Bcl-2 vermitteln.

Auch in den peripheren lymphatischen Organen ist die Apoptose ein gegenwärtiger Prozess. Das langzeitliche Überleben von reifen B-Zellen erfordert die konstitutive Expression des BZR. Reife und nicht aktivierte B-Zellen ($B220^+/sIgM^+/sIgD^+$), die keinen BZR mehr exprimieren oder B-Lymphozyten, die autoreaktiven Eigenschaften besitzen, werden

apoptotisch deletiert. Aktivierte B-Zellblasten, die durch Hypermutation einen BZR mit geringer Affinität aufweisen, unterliegen dem gleichen Prozess. Die produktive Aktivierung von B-Zellen führt zur Proliferation und Differenzierung von Antikörper-sekretierenden Plasmazellen. Für das Überleben von aktivierten B-Zellen ist ein Signal vom BZR und ein kostimulatorisches Signal, wie es beispielsweise von T-Helfer-Zellen, Makrophagen oder die von diesen Zellen sezernierten Zytokinen generiert wird, notwendig. Kann dieses Überlebenssignal nicht generiert werden, sterben die Plasmazellen durch Apoptose. Die Überexpression von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wie beispielsweise Bcl-2 oder Bcl-X_L, kann innerhalb der verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung Apoptose inhibieren.

1.5.1.2 Rolle der Apoptose in der T-Zellentwicklung

Innerhalb der T-Zellentwicklung wird, ähnlich wie bei der B-Zellentwicklung, die Funktionalität und Autoreaktivität des T-Zellrezeptors (TZR) getestet. Demzufolge sind apoptotische Prozesse besonders in den Phasen der T-Zellentwicklung zu finden, in denen die Gene für den TZR rearrangiert werden und in denen die Spezifität des TZR geprüft wird. Die Neuordnung der TZR-Ketten-Gene beginnt im Thymus zwischen dem DN2- (CD25⁺CD44⁺) und dem DN3-Stadium (CD25⁺CD44⁻). Das Proteinprodukt der rearrangierten TZR-β-Gene wird zusammen mit der pTα-Kette und dem CD3-Signalmolekül als Pro-TZR exprimiert. Dieser Oberflächenproteinkomplex initiiert ein Signal, welches die Progression der T-Zellen vom DN3 in den DN4 Stadium der T-Zellentwicklung erlaubt. Vorläufer-T-Zellen des DN1- und des DN2-Stadiums, die kein IL-7-Rezeptor vermitteltes Signal generieren oder Vorläufer-T-Zellen im DN3 Stadium, die keinen funktionellen Pro-TZR exprimieren und damit kein Überlebenssignal generieren können, werden durch Apoptose deletiert (Kabra et al., 2001; Newton et al., 2000). An der Apoptoseinduktion ist ebenfalls das p53 Tumorsuppressorprotein beteiligt (Bogue et al., 1996; Guidos et al., 1996; Jiang et al., 1996). Im DP Thymozytenstadium (CD4⁺CD8⁺) erfolgt die Rekombination die TZR-α-Gene. Die Expression der TZR α- und β-Ketten ermöglicht die Selektion der T-Zellen auf Basis der eigenen Antigen-Rezeptor-Spezifität. Die TZR-Ligation während der positiven Selektion fördert das Überleben und die Differenzierung der Thymozyten durch die erhöhte Expression von Bcl-2 (Groves et al., 1997). Thymozyten die eine potentielle Autoreaktivität für eigene Peptide aufweisen, werden durch negative Selektion apoptotisch deletiert. Der Fas-Rezeptor-vermittelte Reaktionsweg ist während der negativen Selektion nicht erforderlich (Newton et

al., 1998). Die Proteine der Bcl-2 Familie übernehmen eine regulative Rolle für die Apoptoseinduktion. Das proapoptotische BH3 Molekül Bim initiiert in autoreaktiven T-Zellen den programmierten Zelltod und wird dabei von antiapoptotischen Molekülen, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, kontrolliert (Bouillet et al., 2002).

In den peripheren lymphatischen Organen ist die Expression von Bcl-2 für das Überleben von reifen T-Zellen notwendig (Veis et al., 1993; Nakayama et al., 1994). Zytokine wie IL-4, IL-6 und IL-7 unterstützen das Überleben von reifen, arretierten T-Zellen, indem sie die Expression von antiapoptotischen Bcl-2 Mitgliedern, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, fördern (Teague et al., 1997). Die Interaktion des TZR mit dem MHC-Komplex ist ebenfalls für das Langzeitüberleben von reifen T-Zellen in vivo unentbehrlich (Kirberg et al., 1997). Im Gegensatz zu arretierten T-Zellen benötigen über Antigen-stimulierte aktive T-Zellen andere Signale für ihr Überleben. Aktivierte T-Zellen produzieren IL-2 und sowohl das Überleben der T-Lymphozyten als auch die Proliferation sind in Folge dessen vom IL-2-Signal aber auch von anderen Zytokinen abhängig (Vella et al., 1998). Im Fall einer verringerten Verfügbarkeit von IL-2 wird in aktivierten T-Lymphozyten ein apoptotisches Signal erzeugt, welches vom proapoptotischen Molekül Bim vermittelt wird (Bouillet et al., 1999).

Wiederholte TZR-Stimulation sensibilisiert aktivierte T-Zellen für die Apoptose, ein Prozess der als Aktivierungs-induzierter Zelltod (activation-induced cell death: AICD) bezeichnet wird. In diesen Zellen wird die Apoptose durch erhöhte Expression von Fas und FasL induziert (Alderson et al., 1995). Nach Aktivierung werden T-Zellen zunächst resistent gegenüber dem FasL-induzierten Tod. Nach einigen Tagen erhöht sich deren Sensitivität erneut (Ju et al., 1995). Um eine Immunpathologische Reaktion zu verhindern, werden diese T-Zellen durch zwei Mechanismen eliminiert: 1. durch AICD bei wiederholter TZR-Stimulation durch die Antigen-präsentierenden Zellen oder 2. durch die Reduktion der Zytokinkonzentration, welche für das Überleben der aktivierten T-Zellen notwendig sind. Für den zweiten Mechanismus ist das proapoptotische Bim-Protein erforderlich (Bouillet et al., 1999).

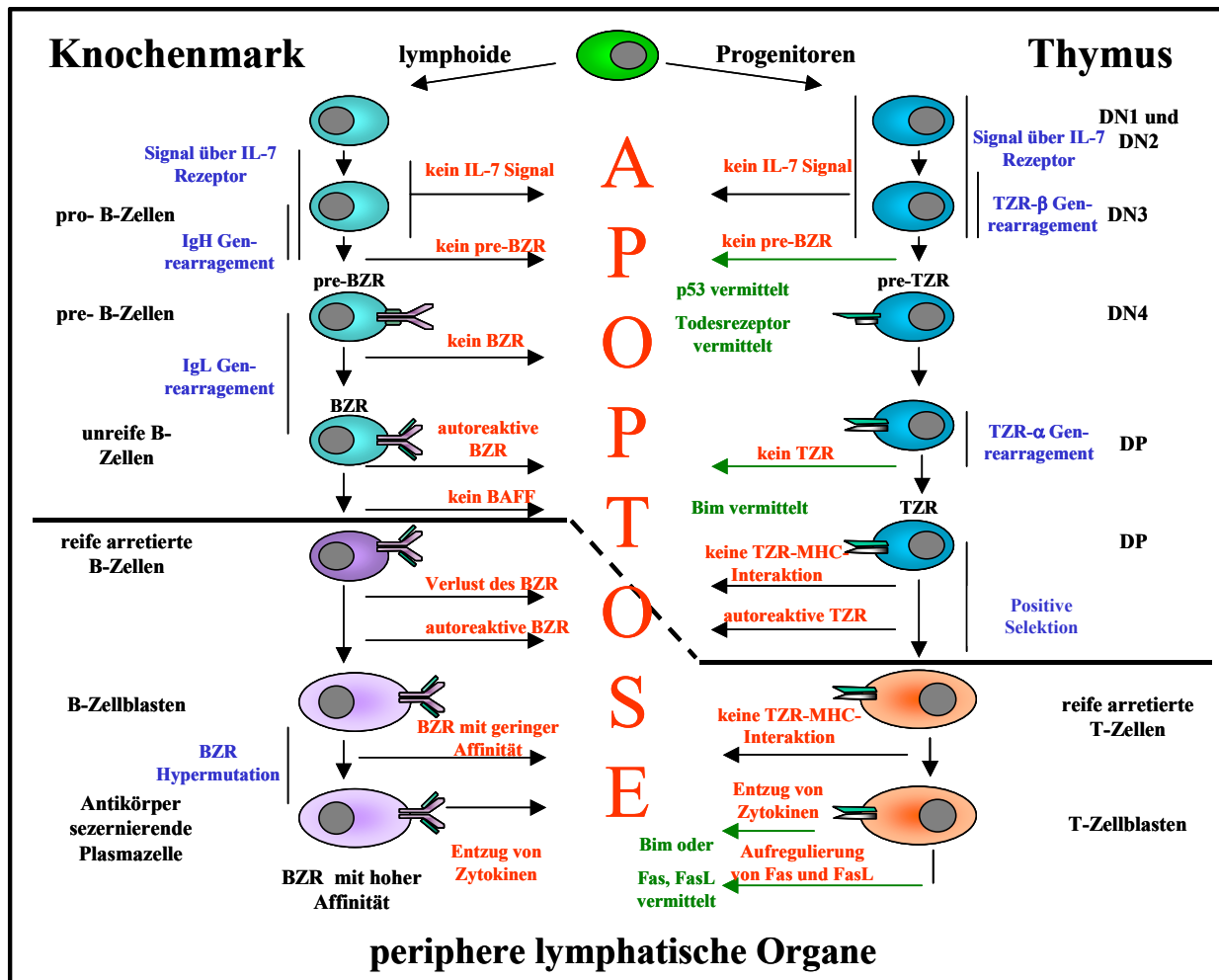


Abb. 3: Apoptotische Ereignisse während der Entwicklung und Aktivierung von B- und T-Zellen

In der frühen Phase der T- und der B- Zellentwicklung ist das Überleben beider Vorläuferzellpopulationen vom IL7 Signal abhängig. Kann ein entsprechendes Signal nicht generiert werden, wird Apoptose induziert. Die Neuordnung der Gene für den BZR und für den TZR wird begleitet von einem proliferativen Stop. Beim Test der Funktionalität beider Rezeptortypen werden die Zellen durch Apoptose eliminiert, die eine potentielle Autoreaktivität gegen eigene Antigene aufweisen oder die keine Interaktion mit Oberflächenproteinen eingehen können, die die potentiellen B- und T- Zellen als körpereigene Zellen ausweisen. Die Interaktion der T-Zelle zum MHC-I-Komplex und die Expression eines BAFF-Rezeptors auf den B-Zellen sind dabei wichtige Voraussetzungen für das Überleben beider Lymphozytenpopulationen. In den peripheren lymphatischen Organen werden die B- Zellen durch Apoptose deletiert, die keinen oder einen autoreaktiven BZR exprimieren. In Folge einer Hypermutation des BZR wird die Affinität zu spezifischen Antigenen vermindert, was zur Folge hat, dass die Zellen durch Apoptose deletiert werden. Auch periphere T-Zellen, die nach der Reifung keine weitere Interaktion mit den MHC-Komplexen eingehen können, werden durch Apoptose beseitigt. Nachdem die Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden B-Zellblasten oder zu aktivierten T-Zellblasten abgeschlossen ist, ist das Überleben der beiden Lymphozytenpopulationen von der Anwesenheit von Zytokinen abhängig. Ein Entzug dieser Zytokine bedeutet in den meisten Fällen den apoptotischen Zelltod.

1.6 Die Slfn-Protein-Familie

Anhand der Beschreibung der Entwicklungsschritte von T-Zellen wurde bereits dargestellt, dass deren Differenzierung, Aktivierung und Proliferation in enger Verbindung zur Zellzykluskontrolle steht. Dem induzierten Zelltod, der Apoptose, kommt innerhalb der verschiedenen Phasen der T-Zelldifferenzierung und der T-Zellaktivierung eine wichtige regulierende Funktion für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und für die Eliminierung von nicht funktionellen lymphatischen Zellen zu.

Die kürzlich neu identifizierte Schlafen-Proteinfamilie (Slfn) scheint eine wichtige Rolle innerhalb der Ontogenese von lymphoiden und myeloiden Zellen des Immunsystems und für die Kontrolle des Zellzyklusses zu spielen. Zu dieser Proteinfamilie gehören bisher sechs Mitglieder, die sich basierend auf der Größe in zwei distinkte Gruppen unterteilen lassen. Slfn1 und Slfn2 sind mit jeweils zwei hoch homologen Proteindomänen Repräsentanten der ersten Untergruppe. Mitglieder der zweiten Gruppe sind Slfn3, Slfn4, Slfn6 und Slfn7, die im Vergleich zur ersten Gruppe eine zusätzliche carboxy-terminale Protein-Domäne besitzen. Die primär abgeleitete Proteinsequenz von jedem der Slfn-Mitglieder hat keine charakteristische Ähnlichkeit zu anderen Proteinen. Auffällig ist jedoch die Homologie zu den invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: inverted terminal repeats) von Viren wie, Vaccinia, Variola und Kuhpocken, (Schwarz et al., 1999) aber auch von Kamelpocken-Viren (Gubser et al., 2002).

Hinweis auf eine regulative Beteiligung an der Zellzykluskontrolle ergab sich nach ektopischer Slfn1-Expression in Fibroblasten. Slfn1 inhibiert durch einen bisher unbekanntem Mechanismus das zelluläre Wachstum durch Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklusses. Auch Slfn2 und Slfn3 wirken anti-proliferativ, wenn sie in Fibroblasten ektopisch exprimiert werden (Schwarz et al., 1999).

Eine Beteiligung an den komplexen Regulationsprozessen innerhalb der T-Zellontogenie liegt aufgrund des Expressionsprofils einzelner Slfn-Gene nahe. Die Slfn-Gene sind primär in den lymphatischen Organen, wie Thymus, Lymphknoten und Milz exprimiert (Schwarz et al., 1999). Ein differentielles Expressionsniveau von Slfn1 wurde in TZR $\alpha\beta^+$ versus TZR $\gamma\delta^+$ intraepithelialen Lymphozyten (IELs) gefunden, wobei die Bedeutung dieser differentiellen Expression bisher nicht verstanden ist (Shires et al., 2001). Eine differentielle Regulation der Slfn-Gene wurde innerhalb der T-Zellentwicklung gefunden. Im Fall von Slfn1 konnte eine 100fach höhere und im Fall von Slfn2 eine 5-10fach höhere Expression in positiv selektierten CD4⁺- und CD8⁺-reifen naiven T-Zellen beobachtet werden. Die Slfn-Proteine scheinen ebenfalls eine einflussreiche Funktion im Rahmen der Homöostase peripherer T-Zellen oder

deren Aktivierung auszuüben. Reife naive T-Zellen exprimieren Slfn1 und Slfn2, deren Expression nach T-Zellaktivierung stark negativ reguliert wird. Im Gegensatz dazu werden Slfn3, Slfn4, Slfn6 und Slfn7 nach T-Zell-Aktivierung stark hochreguliert. Eine starke Expression von Slfn1 und Slfn2 korreliert mit der Einnahme eines ruhenden zellulären Zustandes, was eine aktive regulatorische Beteiligung dieser Proteine an homöostatischen Prozessen andeuten könnte (Schwarz et al., 1999).

In transgenen Mäusen, die Slfn1 in der frühen Phase der T-Zellentwicklung exprimieren, wird die potentielle Bedeutung für die T-Zellentwicklung deutlich. Der Thymus der transgenen Mäuse zeigt eine signifikante Verminderung der Zellularität, welches auf eine Blockierung der T-Zellentwicklung im DN3-Stadium ($CD3^+CD4^+CD8^-CD44^+CD25^+$) zurückzuführen ist. Darüber hinaus wurde im Thymus der transgenen Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl von apoptotischen Thymozyten beobachtet (Schwarz et al., 1999).

Die mögliche Beteiligung der Slfn-Proteine an der Regulation des Zellzyklusses wird deutlich durch: 1.) den zytostatischen Effekt in transfizierten Fibroblasten; 2.) die Reduktion der Slfn1 und Slfn2-Expression nach induzierter T-Zellproliferation; 3.) den Verlust der Slfn1 und Slfn2-Expression in langlebigen T-Zelltumoren und -klonen und 4.) durch die Reduktion der thymischen Zellularität in Slfn1-transgenen Mäusen. Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, dass die Slfn-Proteine neben anderen potentiellen Funktionen auch direkt oder indirekt auf Elemente der Zellzykluskontrolle einwirken könnten. (Schwarz et al., 1999).

1.7 Arbeitshypothese

Ein zentrales Problem der T-Zellimmunologie besteht in der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die proliferative und ruhende Phasen von sich entwickelnden Thymozyten oder auch peripheren reifen T-Zellen determinieren. Aber auch die Identifizierung der Mechanismen, wie periphere naive T-Zellen bis zur Aktivierung in einem aktiven Wachstums-arretierten Zustand verbleiben, sind von zentraler Bedeutung für das Verständnis der spezifischen T-Zell-vermittelten Immunität und für die Beziehung zwischen der Zellzykluskontrolle und der T-Zellentwicklung. Die kürzlich identifizierten Mitglieder der Slfn-Protein-Familie stehen in enger Beziehung zur Regulation des Zellzyklusses und übernehmen wahrscheinlich eine bedeutende Funktion in der T-Zellontogenie. Das Gründungsmitglied Slfn1 ist unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Phasen der T-Zellentwicklung und -aktivierung differentiell reguliert. Durch in vitro und in vivo Modellsystemen konnte demonstriert werden, dass eine ektopische Slfn1-Expression einen

antiproliferativen Zustand der Zellen induziert (Schwarz et al., 1999). Diese Befunde werfen jedoch vielfältige Fragen auf.

- 1.) Sind Slfn1 oder andere Repräsentanten dieser Proteinfamilie für die Aufrechterhaltung des ruhenden zellulären Zustandes notwendig, und wenn ja, welche molekularen Mechanismen sind an einer aktiven Wachstumsarretierung beteiligt?
- 2.) Welche für die T-Zellentwicklung und T-Zellaktivierung relevanten Moleküle und Reaktionswege werden durch die ektopische Slfn1-Expression beeinflusst?
- 3.) Welchen Effekt hat Slfn1 auf das Überleben und das proliferative Verhalten von peripheren T-Zellen?
- 4.) Wie wird die T-Zellentwicklung und -aktivierung durch eine ektopische Expression durch andere Slfn-Mitglieder beeinflusst?

Zwei Modellsysteme sollen etabliert werden, um einerseits zu prüfen, ob die Slfn-Proteine eine funktionelle Komponente für die Aufrechterhaltung des ruhenden zellulären Zustandes sind und andererseits welche molekularen Reaktionswege beeinflusst werden. Durch Etablierung eines retroviralen Gentransfersystems sollte in vitro die Möglichkeit bestehen, die Slfn-Gene in das Genom von entsprechenden Zielzellen, wie beispielsweise in Fibroblasten, stabil zu integrieren und dadurch eine konstitutive Expression zu induzieren. Durch die retrovirale Expression sollte man gegebenenfalls im Stande sein, den durch Slfn1-induzierten arretierten zellulären Zustand zu generieren und mit diesen Zellen in Folge weiterführende Analysen durchzuführen. Dadurch könnten eventuell molekulare Mechanismen offen gelegt werden, die nicht nur die funktionelle Bedeutung von Slfn1 klären, sondern auch Einblicke geben, wie Slfn1 den antiproliferativen Zustand der Zellen induziert. Die anti-proliferative Funktion der Slfn1-exprimierenden Fibroblasten ist wahrscheinlich auch auf eine veränderte Expression von bestimmten Genen zurückzuführen, die in enger Beziehung zur Wachstumskontrolle und zur Zellzyklusregulation stehen könnten. Durch Transkriptom-Analysen, z. B. durch Microarray- und quantitative PCR-Analysen, sollen Gene identifiziert werden, die in Folge der retroviralen Slfn1-Expression in transduzierten Fibroblasten reguliert werden.

DNA-Sequenzanalysen zeigten, dass Slfn1 über zwei putative Translationsinitiationskodons (Kozak-Sequenzen) verfügt (Schwarz et al., 1999). Welche der beiden Kozak-Sequenzen für die Translationsinitiation des funktionellen Slfn1-Proteins genutzt wird, ist bisher nicht definiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob beide Varianten des Slfn1-Proteins (vollständige Slfn1-Protein und/oder das am amino-terminalen Bereich um 27 Aminosäuren

kürzere Slfn1-Protein) eine anti-proliferative Aktivität besitzen. Durch die retrovirale Expression beider Slfn1-Proteinvarianten in transduzierten NIH3T3 Fibroblasten sollte die Möglichkeit bestehen, die Wachstums-inhibierende Wirkung von einem oder beiden Slfn1-Proteinen nachzuweisen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von neuen Slfn-Proteinen. Ein Hinweis auf die Existenz von weiteren Repräsentanten dieser Proteinfamilie wurde durch vorangegangene Sequenzanalysen gefunden. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen im amino-terminalen Bereich eine signifikante Homologie zu den bereits beschriebenen Slfn3- und Slfn4-Proteinen. Charakteristisch ist des Weiteren die Existenz einer zusätzlich am carboxy-terminalen Bereich befindlichen vierten Proteindomäne. Durch die Charakterisierung der vollständigen primären Aminosäuresequenzen könnten gegebenenfalls Strukturen oder Motive identifiziert werden, die Rückschlüsse auf die potentielle Funktion der neuen Slfn-Proteine zulassen. Um diese Charakterisierungen durchführen zu können, müssen initiell die vollständigen cDNA-Sequenzen generiert werden. Durch Sequenzierung von Cosmid-Klonen, die potentielle genomische Sequenzen von neuen Slfn-Proteinen enthalten, soll die genomische Konfiguration und damit die translatierten Exons dieser Proteine näher beschrieben werden. Die Identifizierung der genomischen Konfiguration der neuen Slfn-Proteine gestattet die komplette cDNA zu amplifizieren und diese in entsprechende retrovirale Plasmide zu klonieren, mit denen anschließend retrovirale Partikel generiert werden können. Aufgrund der hochgradigen Homologien der Aminosäuresequenzen im amino-terminalen Bereich zwischen den neu identifizierten und den bereits bekannten Slfn-Proteinen sind Isofunktionalitäten nicht auszuschließen. Doch welche Funktion diese generell oder in Bezug zur Zellzykluskontrolle und zur Wachstumsregulation erfüllen, ist bisher nicht bekannt. In Analogie zu Slfn1 soll das proliferative Verhalten von transduzierten Fibroblasten, die die neuen Slfn-Proteine retroviral exprimieren, eingehender untersucht werden. Durch Wachstumsanalysen von konstitutiv Slfn-exprimierenden Fibroblasten soll festgestellt werden, ob eine Verbindung zur Zellzykluskontrolle besteht.

Über die subzelluläre Verteilung der Slfn-Proteine ist bisher nichts bekannt. Unter Verwendung von Expressionsvektoren, die die cDNAs von verschiedenen slfn-Genen enthalten, sollen die Slfn-Proteine nach Transfektion in Fibroblasten fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden und damit den Ort der Proteinfunktion aufdecken.

In einem zweiten Modellsystem soll die Bedeutung der Slfn-Proteine für die Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen studiert werden. Aus den bisherigen Analysen

geht hervor, dass eine ektopische T-Zell-spezifische Slfn1-Expression die T-Zellentwicklung inhibiert und Apoptose durch einen bisher nicht charakterisierten Mechanismus induziert. Der nachgewiesene T-Zellentwicklungsblock im DN3 Stadium in Slfn1-transgenen Mäusen könnte sich eventuell nachteilig auf: 1. die Reifung der T-Zellen im Thymus, 2. die zelluläre Homöostase in den peripheren lymphatischen Organen und 3. das Überleben, die Aktivierung und das proliferative Wachstum von reifen naiven T-Zellen vor und nach entsprechender Stimulation auswirken. Eine Möglichkeit diesen Hypothesen experimentell nachzugehen, besteht in der Etablierung eines transgenen Mausmodells mit T-zellspezifischer Slfn-Expression. Unter Verwendung von Slfn-transgenen Mäusen, die T-Zell-spezifisch entweder Slfn1, Slfn4 oder Slfn8 exprimieren, könnten Wachstums- und Proliferationsanalysen von peripheren T-Zellen weitergehende Einblicke in die Funktion der Slfn-Proteine geben.

Frühere Analysen belegen, dass die bisher bekannten Slfn-Gene während der T-Zellentwicklung und T-Zellaktivierung differentiell reguliert werden. Doch welche Bedeutung die neu identifizierten Slfn-Proteine für die intrathymische T-Zellontogenie haben und wie diese in den peripheren T-Zellen nach TZR-vermittelter Aktivierung reguliert werden, ist bisher nicht beschrieben. Möglicherweise gibt das Gen-Expressionsprofil der neuen Slfn-Mitglieder einen Hinweis auf die Bedeutung der Slfn-Proteine in der T-Zellentwicklung. Durch RNA-Expressionsanalysen von T-Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung und Aktivierung befinden, könnte zunächst ein Überblick über die differentielle Regulation der Slfn-Gene gewonnen werden.