

6 Diskussion

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung der funktionellen Bedeutung der Slfn-Proteine für die Zellzykluskontrolle und für die T-Zellontogenie. Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von neuen Slfn-Proteinen und deren funktionellen Charakterisierung. Um Einsicht in die physiologische Bedeutung der individuellen Slfn-Proteine in der T-Zellontogenie zu erhalten, wurden zunächst Expressionsanalysen von den individuellen Slfn-Genen in T-Zellen, die sich in verschiedenen Entwicklungs- und Aktivierungsstadien befanden, durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein retrovirales Gentransfersystem etabliert. Die Generierung von rekombinanten Slfn-Retroviren erlaubte die Konsequenzen einer transienten oder konstitutiven ektopischen Slfn-Expression (Slfn1, Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10) auf das proliferative Verhalten von transduzierten NIH3T3 Fibroblasten zu studieren. Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen einer transgenen Slfn-Expression (Slfn1, Slfn4 und Slfn8) auf die Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen *in vivo* und *in vitro*. Die phänotypische Charakterisierung der primären und sekundären lymphoiden Organe der Slfn-transgenen Mäuse durch FACS-Analysen sowie die Überprüfung der Funktionalität der peripheren T-Zellen durch Proliferationsanalysen standen dabei im Vordergrund.

6.1 Bedeutung der Slfn-Proteine der dritten Untergruppe für die Zellzykluskontrolle und für die Thymozytenentwicklung

Die Identifizierung und die funktionelle Charakterisierung von neuen Repräsentanten der Slfn-Gen-Familie war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 sind neue Mitglieder dieser Proteinfamilie und wurden durch Sequenzierung von vier Cosmid-Klonen identifiziert. Die vier neuen Slfn-Proteine zeigen untereinander eine extreme Homologie in den primären Aminosäuresequenzen und sie unterscheiden sich von den Slfn-Proteinen der zweiten Untergruppe (Slfn3, Slfn4, Slfn6 und Slfn7) durch eine zusätzliche Proteindomäne am carboxy-terminalen Ende, wodurch diese als eigenständige Untergruppe der Slfn-Protein-Familie klassifiziert werden konnte. Funktionelle Motive innerhalb der Aminosäuresequenzen der neuen Slfn-Proteine konnten im letzten Drittel der Carboxy-terminalen Region gefunden werden. Diese enthält typische Walker-A- und -B-Motive und innerhalb des Walker B-Motivs wurde eine DEAQ-Box identifiziert. Diese funktionellen Motive weisen auf eine potentielle ATP-Bindungsaktivität hin (Fry et al., 1986; Saraste et al.,

1990; Walker et al., 1982). Der Grad der Homologie und der Abstand der aufeinanderfolgenden konservierten Motive, die in den Slfn5-, Slfn8-, Slfn9- und Slfn10-Proteinen präsent sind, zeigen, dass die Slfn-Proteine der dritte Untergruppe zu einer neuen Subfamilie von RNA-abhängigen ATPasen der Helikase-Superfamilie I angehören könnten (del Cruz et al., 1999; Gorbalenya et al., 1993; Linder et al., 2000). RNA-Helikasen erfüllen essentielle Funktionen im RNA-Metabolismus. Als Modulatoren der RNA-Sekundärstrukturen sind diese in Prozessen, wie Gen-spezifische Transkription, pre-mRNA-Prozessierung, RNA-Export, Translationsinitiation oder RNA-Degradierung involviert (Linder et al., 2000; Lueking et al., 1998). mda5, eine Interferon-induzierbare DExH RNA-Helikase, ist beispielsweise an der Regulation der zellulären Differenzierung und an der Apoptose beteiligt (Kang et al., 2002). Die Helikase MCM5 ist regulativ in der Stat1-vermittelten Transkriptionskontrolle involviert (Dafonseca et al., 2001).

Eine Beteiligung der Slfn-Proteine an der negativen Regulation des zellulären Wachstums wurde nach ektopischer Expression von Slfn1, Slfn2 und Slfn3 in Fibroblasten offensichtlich. Eine ektopische Expression von Slfn1 in Fibroblasten verursacht eine Zellzyklusarretierung in der G₁-Phase und eine hohe Expression von Slfn1 korreliert mit einem Proliferationsruhenden Zustand in T-Zellen (Schwarz et al., 1999). Eine retrovirale Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten ist an der ER-Stress-vermittelten Apoptoseinduktion beteiligt. Es gibt einige experimentelle Hinweise die zeigen konnten, dass nicht alle Slfn-Proteine, die ektopisch in Fibroblasten exprimiert werden, eine Wachstums-inhibierende und einen proapoptotische Effekt auslösen oder mit einem ruhenden Zustand von reifen naiven T-Zellen korrelieren. Eine konstitutive oder transiente retrovirale Expression von Slfn4 (Daten nicht gezeigt), Slfn5, Slfn8, Slfn9 und Slfn10 in NIH3T3 Fibroblasten führt zu keiner negativen Beeinträchtigung des zellulären Wachstums oder zur Apoptoseinduktion. Für eine Beteiligung der Slfn-Proteine der dritten Untergruppe an der Regulation der Zellzykluskontrolle gibt es derzeit keine Hinweise.

Ein differentielles Expressionsprofil von allen Repräsentanten der Slfn-Gen-Familie wurde in T-Zellen gefunden, die sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung befanden. Während der Thymozytenentwicklung wurde eine ausgeprägte differentielle Expression für slfn1, slfn2 und slfn4 beobachtet, wobei das Gen-Expressionsniveau der neu identifizierten slfn-Gene (slfn5, slfn8, slfn9 und slfn10) scheinbar unwesentlich fluktuiert. Nach TZR-vermittelter Aktivierung der peripheren T-Zellen wird die Expression von slfn5 und slfn8 in Analogie zu slfn1 herunterreguliert. Die erhöhte Expression von slfn5 und slfn8 korreliert mit dem anti-proliferativen Status in ruhenden T-Zellen. Im

Gegensatz dazu korreliert eine slfn4- und slfn9-Expression nicht mit dem ruhenden Zustand von T-Zellen. In reifen naiven T-Zellen sind beide Gene auf niedrigem Niveau exprimiert. Das Expressionsniveau nimmt in Folge der TZR-vermittelten Aktivierung in den peripheren T-Zellen signifikant zu. Die Expression von slfn3 und slfn10 ist innerhalb der T-Zellentwicklung und -aktivierung kaum verändert. Insofern deutet sich auf Ebene differentieller Genexpression kein zwingender Bezug zu einem aktiven oder einem ruhenden zellulären Zustand an. Die differentielle Regulation der individuellen slfn-Gene innerhalb der T-Zellenentwicklung und die partiell unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der ektopisch exprimierten Slfn-Proteine in NIH3T3 Fibroblasten, besonders von den hoch homologen Slfn-Proteinen der dritten Untergruppe, lässt vermuten, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie unterschiedliche Funktionen in der Regulation des zellulären Wachstums bzw. in der T-Zellontogenie erfüllen.

Um einen ersten Eindruck in die physiologische Bedeutung der Slfn-Proteine der dritten Untergruppe in T-Zellen zu bekommen, wurden Slfn8-transgene Mäuse generiert. Die transgene Slfn8-Expression wird von der hCD2-Kassette kontrolliert, die eine präferentiell T-Zell-spezifische Expression gewährleistet. Die vom humanen CD2-Promotor kontrollierte transgene Slfn8-Expression beginnt im unreifen DN1-DN3-Pro-T-Zellstadium und sichert eine kontinuierliche Slfn8-Expression bis zu den reifen naiven und aktivierten T-Zellen in der Peripherie (de Boer et al., 2003). Die Zellularität des Thymus in den transgenen Mäusen war aufgrund des Entwicklungsblocks im DN3-Stadium signifikant vermindert. Dementsprechend wird die Generation von $CD4^+CD8^-$ - und $CD4^-$ bzw. $CD8^+$ -Thymozyten beeinträchtigt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die proliferative Thymozyten-Expansion, die während des Übergangs vom DN4- zum DP-Stadium greift, durch die transgene Slfn8-Expression beeinflusst wird. Im DN4-Stadium wird eine geringfügige Verminderung der endogenen Slfn8-Expression im Wildtyp-Thymus beobachtet und die erhöhte Slfn8-Expression im transgenen Thymus könnte die Thymozytenproliferation im DP-T-Zellstadium vermindern und dadurch die geringere Zellularität im Thymus der Slfn8-transgenen Mäuse zusätzlich erhöhen. Interessant ist die Beobachtung, dass die proliferative Antwort der Slfn8-transgenen peripheren T-Zellen nach TZR vermittelter Stimulation ex vivo deutlich reduziert war. Die endogene Slfn8-Expression wird nach TZR-vermittelter Aktivierung in T-Zellen herunter reguliert. Die kontinuierliche Expression des transgenen Slfn8-Proteins verändert scheinbar das proliferative Potential von stimulierten T-Zellen. Diese Ergebnisse können andeuten, dass Störungen der fein ausbalancierten Expression von Slfn8 zu Veränderungen in der Physiologie von sich entwickelnden und reifen T-Zellen führen. Aufgrund der

Beobachtung, dass eine ektopische Slfn8-Expression in NIH3T3 Fibroblasten keine phänotypischen Konsequenzen hat, kann angenommen werden, dass die beobachtete antiproliferative Funktion von Slfn8 in den transgenen T-Zellen ein Zelltyp-spezifischer Effekt ist. Zwischen beiden Modellen gibt es einen weiteren Unterschied. NIH3T3 Fibroblasten sind kontinuierlich proliferierende Zellen, während die peripheren T-Zellen für die proliferative Expansion zunächst einer mitogenen Stimulation bedürfen. Durch die TZR-vermittelten Stimulation werden Signalkaskaden initiiert, die für das kontinuierliche Wachstum in Fibroblasten nicht notwendig oder nicht vorhanden sind oder nicht aktiviert werden. Das transgene Slfn8-Protein könnte mit diesen Signalen, die für die Stimulation von CD44⁺CD25⁻-Thymozyten im Pro-T-Zellstadium und von peripheren T-Zellen notwendig sind, interferieren und dadurch deren verminderte Proliferation einleiten.

Welche funktionelle Bedeutung die Slfn-Proteine der dritten Untergruppe in der Kontrolle des Zellzyklusses oder in der T-Zellentwicklung erfüllen, konnte die hier durchgeführten Analysen nicht zeigen. Die differentielle Genexpression von slfn5, slfn8, slfn9 und slfn 10 und die differentielle subzelluläre Lokalisation in transduzierten Fibroblasten, lassen eine komplexe Funktionalität dieser Proteine vermuten. Die mögliche RNA-Helikaseaktivität gibt den Hinweis auf eine Beteiligung der Slfn-Proteine der dritten Untergruppe am RNA-Metabolismus. Weitere Studien sind daher nötig, um die potentielle Helikase-Aktivität und deren funktionelle Bedeutung für den RNA-Metabolismus nachzuweisen.

6.2 Bedeutung von Slfn1 in der Zellzykluskontrolle

Im Rahmen dieser Arbeit sollten molekulare Mechanismen identifiziert werden, die die Slfn1-vermittelte Wachstumsarretierung in der G₁-Phase des Zellzyklusses erklären können. Durch die Generierung von rekombinanten Retroviren konnte das slfn1-Gen stabil in das Genom von transduzierten NIH3T3 Fibroblasten integriert werden. Der retrovirale Promotor induziert eine konstitutive und intensive ektopische Slfn1-Expression in den Fibroblasten und erlaubte die Auswirkungen des retroviral exprimierten Slfn1-Proteins auf das zelluläre Wachstum zu studieren. Die retrovirale Expression von Slfn1 in den transduzierten NIH3T3 Fibroblasten inhibierte nicht nur das zelluläre Wachstum, sondern induzierte auch Apoptose. In den Studien von Schwarz et al., 1999, in denen die Slfn1-Expression durch einen konditional-aktiven Promotor reguliert wurde, konnte lediglich eine Proliferations-inhibierende Aktivität des Slfn1-Proteins in Fibroblasten und keine Apoptoseinduktion beobachtet werden (Schwarz et al., 1999). Der Unterschied mag in einem Dosis-abhängigen Effekt begründet sein. Wahrscheinlich ist das Slfn1-Expressionsniveau in den Fibroblasten durch den retroviralen

Promotor deutlich höher als die Slfn1-Expression in den Fibroblasten, die durch den konditional-aktiven Promotor generiert wird und initiiert dadurch die Apoptoseinduktion in den retroviral transduzierten Zellen.

Durch Transkriptom- und durch quantitative PCR-Analysen von retroviral Slfn1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten wurde eine erhöhte Expression von Genen festgestellt, die in der Regulation und in der Induktion der ER-Stressantwort, in der UPR und in der Apoptose involviert sind. Die konzentrierte differentielle Regulation einer Vielzahl von Genen ist kongruent mit der Induktion einer ER-Stressreaktion. Dies gilt insbesondere für folgende Gene: CA-VI (Carbonic-Anhydrase 6), Gadd45a, Gadd153 (CHOP), Osi, Ndr1, B7-1, IEX1, IF1203, IF1202b, IF1202a, VEGFc, BiP, p21^{CIP/WAF}, Osteopontin, LON, c-myc, IF1204, Nfil3, MDRLA, STAF, Mdu1, SLUG, GDF15 und ATF4. Dementsprechend stellt die Initiation der ER-Stressantwort einen möglichen Mechanismus dar, der die antiproliferative und die proapoptotische Kapazität des retroviralen Slfn1-Proteins in den transduzierten Fibroblasten erklärt.

Das ER ist ein zytosolisches Kompartiment, in dem Proteine und Lipide synthetisiert und modifiziert werden (Zong et al., 2003). Aufgrund der hohen Proteinkonzentration sind Chaperon-Proteine innerhalb des ERs präsent. Diese Chaperone erleichtern die Proteinfaltung und verhindern während des Faltungsprozesses die Bildung von Proteinaggregaten. Als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli, die zu Störungen der ER-Funktion führen, wie eine Ca²⁺-Depletion des ER-Lumens, eine Inhibition der Asparagin-Glykosylierung, eine Reduktion von Disulfidbrückenbindungen oder eine Überexpression von sekretorischen oder zytoplasmatisch-aggregierenden Proteinen, werden Proteine nicht oder falsch gefaltet, was wiederum zur Akkumulation und zur Bildung von Proteinaggregaten innerhalb des ERs führt (Zong et al., 2003). Diese Umstände leiten die sogenannte ungefaltete Proteinantwort (UPR) ein, welches zu einer Reduktion der Proteinsynthese führt. Sind die Zellen, die mit der UPR konfrontiert werden, nicht in der Lage adaptiv auf die veränderten Bedingungen im ER zu reagieren, induziert die ER-Stressantwort den apoptotischen Zelltod (Kaufman et al., 1999). Die ER-Stress-induzierte Apoptose ist assoziiert mit der zunehmenden Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie CHOP oder Xbp-1, und mit der Phosphorylierung von eIF-2 α , was zu einer Wachstumsinhibition führt (Kaufman et al., 1999). Eukaryontische Zellen reagieren auf die Anwesenheit von ungefalteten Proteinen mit einer zunehmenden transkriptionellen Expression von Genen, die z.B. ER-spezifische Chaperon-Proteine kodieren. Das BiP-Protein ist ein Repräsentant der Chaperon-Proteinfamilie, das in Folge der UPR transkriptionell aktiviert wird und im ER dem ER-Stress entgegenwirkt, indem es die

Proteinfaltung unterstützt (Kaufman et al., 2002). Die transkriptionelle Expression des BiP-Genes erfordert eine vom ER-Lumen ausgehende Signaltransduktion zum Nukleus. Das Stresssignal wird durch sogenannte Stress-Sensor-Proteine weitergeleitet. IRE1- α ist eines dieser Stress-Sensor-Proteine, das eine Kinase und Endoribonuklease-Aktivität besitzt und die Expression von Genen der ungefalteten Protein-Antwort reguliert (Calfon et al., 2002). In Folge der erhöhten Akkumulation von ungefalteten Proteinen oligomerisieren diese Proteine zu IRE1-IRE1-Komplexen und aktivieren sich selbst durch Autophosphorylierung. Dieser aktive IRE1-Komplex entfernt durch Endoribonuklease-Aktivität ein Intron aus der mRNA des Transkriptionsfaktors XBP-1 (X-Box binding Protein 1) (Lee et al., 2000; Ruegsegger et al., 2001; Tirasophon et al., 2000; Yoshida et al., 2001). Durch die Prozessierung der XBP-1 mRNA wird das aktive XBP-1-Protein translatiert, welches vom Cytosol in den Nukleus transloziert (Shamu et al., 1996) und dort die transkriptionelle Genexpression von z.B. BiP oder CHOP induziert (Lee et al., 2003) (Abb.50).

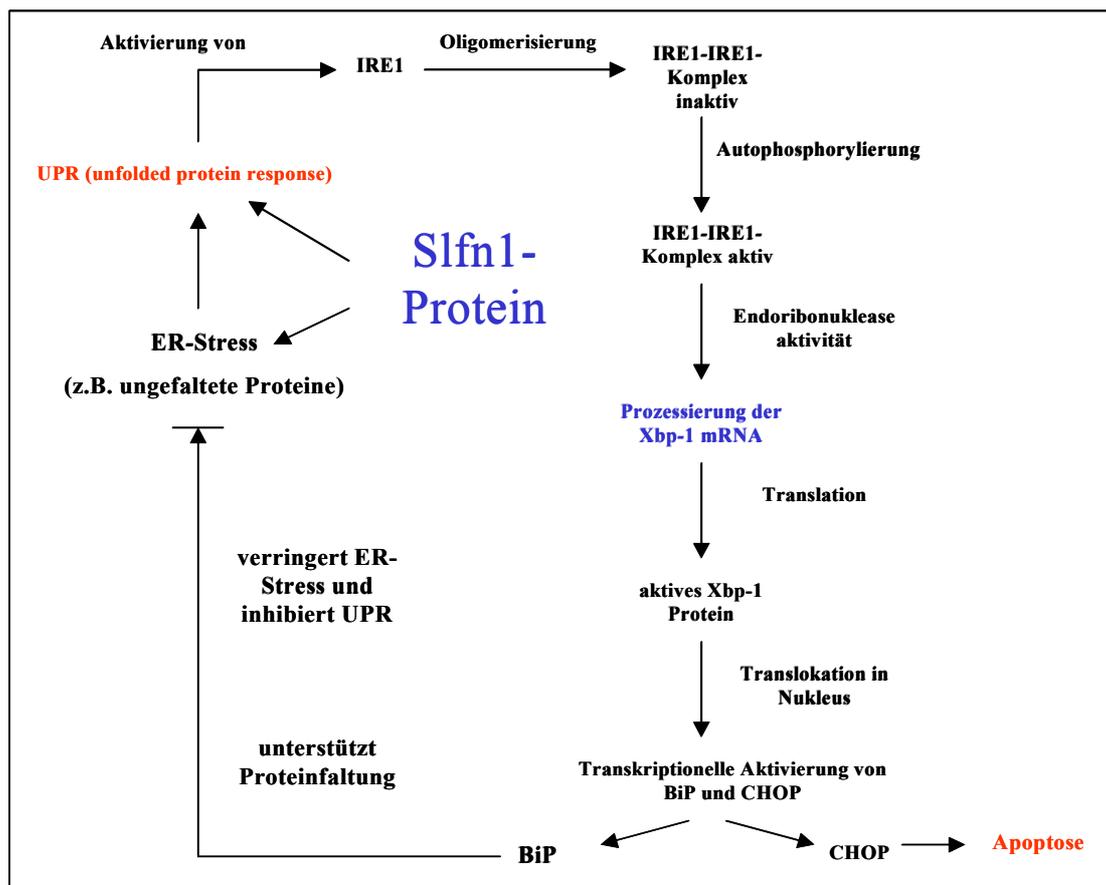


Abb. 50: Möglicher Mechanismus der Slfn1-induzierten ER-Stressreaktion und der ungefalteten Proteinantwort (UPR)

Durch die retrovirale Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten wird diese XBP-1 mRNA-Prozessierung und die Genexpression von CHOP und BiP initiiert, was die Vermutung nahe legt, dass ein IRE1/XBP1-abhängiger Mechanismus, die Slfn1-induzierte UPR einleitet (Abb. 50). In den kontinuierlich proliferierenden NIH3T3 Fibroblasten ist Slfn1 endogen nicht exprimiert. Eine Überexpression von Slfn1 durch die retrovirale Expression, induziert durch den konstitutiv aktiven retroviralen Promotor, könnte eine einfache Erklärung sein, warum in den transduzierten Fibroblasten die ER-Stressantwort ausgelöst wird. Das Slfn1-Protein, das am amino-terminalen Bereich um 27 Aminosäuren kürzer ist, wird wesentlich stärker in den Fibroblasten exprimiert und induziert keine Wachstumsarretierung, Apoptose oder ER-Stress. Die retrovirale Expression der 27 Aminosäuren des amino-terminalen Bereiches von Slfn1 in NIH3T3 Fibroblasten oder von Slfn1-Proteinen, denen am carboxy-terminalen Ende Aminosäuren deletiert wurden, haben ebenfalls keinen anti-proliferativen bzw. proapoptotischen Effekt in Fibroblasten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass nur das vollständige retroviral exprimierte Slfn1-Protein (Slfn1-Protein mit dem kompletten amino- und carboxy-terminalen Bereich) in Fibroblasten die antiproliferative und proapoptotische Wirkung besitzt. Eine mögliche Assoziation des Slfn1-Proteins mit dem ER wurde bisher nicht analysiert. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass Slfn1 seine Funktion in Verbindung mit dem ER erfüllt und dass aufgrund der Überexpression in den Fibroblasten die funktionelle Integrität des ERs beeinträchtigt wird und dies zur ER-Stress-Antwort mit anschliessender Apoptose führt.

Gadd45 α , p38, CHOP, CarbAnh6, Mitglieder der Bcl2-Familie, p21^{CIP/WAF}, p53, Caspasen und c-myc sind einige Faktoren, die an der Regulation des ER-Stresses, an der Zellzykluskontrolle und der Apoptoseinduktion beteiligt sind und die durch das retrovirale Slfn1-Protein in den transduzierten Fibroblasten zunehmend exprimiert und/oder aktiviert werden. Diese regulatorischen Elemente sind in der Lage partiell physisch miteinander zu interagieren oder sich transkriptionell oder posttranskriptionell zu aktivieren und dadurch eine Zellzyklusarretierung und Apoptose zu induzieren.

Gadd45 α :

Das Gadd45 α -Gen beispielsweise kodiert ein Protein, das eine wichtige Rolle in der negativen Wachstumskontrolle und in der Apoptose spielt (Zhang et al., 1999). Die Genexpression von Gadd45 α wird effizient durch genotoxischen und nicht-genotoxischen Stress in verschiedenen Zelllinien in einem p53-abhängigen oder unabhängigen Mechanismus induziert (Fornace et al., 1988; Kastan et al., 1992; Fornace et al., 1989; Selvakumaran et al.,

1994; Kearsy et al., 1995). Das Gadd45 α -Protein kann direkt mit anderen Wachstumsregulierenden Proteinen, z.B. mit p21^{CIP/WAF} und mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) interagieren und bewirkt durch diese Assoziation eine Suppression des zellulären Wachstums (Kearsy et al., 1995; Smith et al., 1994; Vairapandi et al., 1996). Weitere Studien konnten belegen, dass durch die Assoziation von Gadd45 α mit Cdc2 die Interaktion zwischen Cdc2 an dem CyclinB1 unterbrochen wird und dies die Arretierung der Zellen im G₂/M-Stadium des Zellzyklusses einleitet (Zhan et al., 1999). Die Initiation von ER-Stress durch genotoxische Reagentien bewirkt ebenfalls eine zunehmende Expression von Gadd45 α , welches den apoptotischen Zelltod initiiert (Sheikh et al., 1999). Diese Beobachtung zeigen deutlich, dass es eine direkte Korrelation zwischen der zunehmenden Gadd45 α -Expression und der Wachstumsinhibition und der Apoptose-Induktion gibt. Neueste Studien konnten belegen, dass die Gadd45 α -induzierte Apoptose durch die Aktivierung von JNK und/oder p38-MAPK-Signalwege vermittelt wird (Takegawa et al., 1998; Harkin et al., 1999).

p38-MAPK and JNK-Signaltransduktionwege:

Beide Kinasen, JNK und p38-MAPK, sind wichtige Komponenten der MAPK-Signalkaskade, die eine vermittelnde Funktion in der zellulären Antwort auf genotoxischen (UV- und γ -Strahlung) und nicht-genotoxischen Stress (osmotischer Stress) und folgend in der Apoptoseinduktion übernehmen (Kyriakis et al., 1996; Karin et al., 1998; Davis et al., 1999). Die Aktivierung von JNK und p38-MAPK ist abhängig von der Phosphorylierung durch MAPKK, welche zunächst ebenfalls durch eine vorgeschaltete MAPKKK ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert wird (Kyriakis et al., 1996; Karin et al., 1998). Die Aktivität dieser Kinase (MAPKKK) ist wiederum abhängig von der Phosphorylierung durch MTK1 (MEKK1), von der gezeigt werden konnte, dass sie sowohl JNK und p38-MAPK aktivieren kann (Gerwins et al., 1997; Takegawa et al., 1997). Takekawa und Saito haben in ihren Studien belegen können, dass Gadd45 α physisch mit MTK1 interagieren kann, und dass durch diese Interaktion die MTK1-Kinase aktiviert wird (Takegawa et al., 1998). Die Slfn1-induzierte Apoptose in NIH3T3 Fibroblasten konnte durch den Einsatz des p38-MAPK-Inhibitors (SB203580) signifikant reduziert werden. Dementsprechend ist der p38-MAPK-Signalweg in der Slfn1-vermittelten Apoptoseinduktion involviert. Die aktivierte p38-MAPK-Kinase ist unter anderem an der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, z.B. von Gadd153 (CHOP) beteiligt (Wang et al., 1996).

CHOP (Gadd153):

Die Expression des CHOP-Gens (C/EBP homologous protein-10; Gadd153) wird effizient durch Stress im Endoplasmatischen Retikulum induziert und das CHOP-Protein gilt als potenter Vermittler, sowohl für die Apoptoseinduktion als auch für die Inhibition des zellulären Wachstums. Die Überexpression von CHOP in verschiedenen zellulären Modellsystemen führt zum Zellzyklusarrest (Zhan et al., 1994). Eine Mikroinjektion von CHOP in NIH3T3 Zellen oder eine vektorielle Überexpression in Hep 3B-Zellen induziert einen Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklusses (Barone et al., 1994; Kim et al., 2002). Das CHOP-Protein unterzieht sich der Stress-induzierten Phosphorylierung durch die p38-MAPKinase. Durch die Phosphorylierung interagiert CHOP mit dem C/EBP-Protein, was in Folge der Dimerisierung zu einer zunehmenden transkriptionellen Aktivität des CHOP-C/EBP-Komplexes führt (Wang et al., 1996). Das CHOP-C/EBP-Heterodimer bindet z.B. direkt am Promotor der Carboanhydrase-6 und erhöht drastisch deren Genexpression (Sok et al., 1999). Im Fall der retroviral Slfn1-exprimierenden Fibroblasten konnte eine signifikant erhöhte Gen-Expression sowohl von CHOP als auch von der Carboanhydrase-6 festgestellt werden. Dies deutet die Möglichkeit an, dass die Carboanhydrase-6 eine bedeutende Komponente in der Vermittlung der Slfn1-induzierten Apoptose sein könnte. Carboanhydrasen katalysieren die reversible Hydratation von CO₂ zu H₂CO₃ (Tashian et al., 1989). Innerhalb von Zellen, in denen die Produktion von CO₂ stattfindet, kommt es unter spezifischen Bedingungen zur Dissoziation von H₂CO₃ in H⁺ und HCO₃⁻, wodurch der intrazelluläre pH-Wert erniedrigt wird (Sok et al., 1999). Die Porenformierung in den Membranen verschiedener intrazellulärer Kompartimente vermittelt durch den proapoptotischen Regulator Bax ist pH-Wert abhängig und führt in den Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom C, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Die Aktivität von Bax in Membranen Poren zu bilden, erhöht sich mit der Abnahme des pH-Wertes (Antonsson et al., 1997).

Bcl-2-Familie:

Die Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine essentielle Rolle in der Regulation der Apoptose. Die regulative Wirkung der Bcl-2 Mitglieder für den apoptotischen Prozess wird durch zwei charakteristische Merkmale bestimmt: 1. Die pro- und antiapoptotischen Mitglieder bilden Homo- und Heterodimere, interagieren miteinander und das jeweilige Verhältnis der Komplexe stellt eine regulative Ebene dar. 2. Die Bcl-2 Proteine besitzen die Fähigkeit sich als integrale Membranproteine in verschiedene Kompartimente zu integrieren und sich somit

regulativ an der Funktionalität von Organellen zu beteiligen. Innerhalb der Mitglieder der Bcl-2 Familie wird zwischen proapoptotischen (Bax, Bak, Bim) und antiapoptotischen Proteinen (Bcl-2, Bcl-X_L) unterschieden (Gross et al., 1999). Die Protein-Protein-Interaktion und das Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie spielt eine wichtige Rolle für das zelluläre Überleben oder für die Apoptoseinduktion (Kelekar et al., 1997). Ändert sich das Verhältnis zu Gunsten der proapoptotischen Mitglieder wird die Apoptose induziert. Ist das Verhältnis dahingegen ausbalanciert, können die Zellen überleben. Die Aktivierung des proapoptotischen Bax-Moleküls ist von der subzellulären Translokation und vom Dimerisationsgrad abhängig. In normalen vitalen Zellen liegt Bax in monomerer Form im Zytosol oder in Verbindung mit verschiedenen Membranen von anderen intrazellulären Kompartimenten vor (Zong et al., 2003). Nach einem apoptotischen Stimulus wechselt Bax die Lokalisation vom Zytoplasma ins Mitochondrium und bildet als integrales Membranprotein Homodimere (Wolter et al 1997), die aus bis zu 30 Monomeren Einheiten bestehen können (Tan et al. 1999). Die Oligomerisierung von Bax hat zur Folge, dass Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt wird. Die Freisetzung von Cytochrom C bewirkt den Verlust der funktionellen Integrität der Mitochondrien und die Aktivierung des Caspase-9 abhängigen Apoptoseweges (Jimbo et al., 2003; Morishima et al., 2002).

Das proapoptotische Bax-Protein scheint in der Slfn1-induzierten Apoptose eine besondere Rolle zu übernehmen. Durch quantitative PCR-Analysen konnte eine drastische Erhöhung der Bax-Genexpression innerhalb von 48h nach Beginn der Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten beobachtet werden. Durch die erhöhte transkriptionelle Expression von Bax könnte das Verhältnis zwischen anti- und proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie zu Gunsten der zuletzt genannten ändern. Dementsprechend ist Bax ein möglicher Regulator der Slfn1-induzierten Apoptose. Die Studien von El-Deiry et al. konnten belegen, dass die transkriptionelle Expression von Bax in einem p53-abhängigen Mechanismus unter zellulären Stressbedingungen initiiert werden kann (El-Deiry et al., 1998). Die ER-Lokalisation der beiden proapoptotischen Bax- und Bak-Proteine und deren Aktivierung in Folge von ER-Stress (Zong et al., 2003) offeriert einen weiteren möglichen Mechanismus, wie das Slfn1-Protein die Apoptose vermitteln könnte. Die am ER lokalisierten Bax- und Bak-Proteine könnten durch das retrovirale Slfn1-Protein direkt oder indirekt aktiviert werden und ähnlich wie in den Mitochondrien die Freisetzung von apoptogenen Faktoren aus dem ER-Lumen in das Cytosol initiieren und in Folge dessen die Apoptose induzieren. Die ER-spezifische Expression von Bak in Bak^{-/-}Bax^{-/-}-defizienten Mäusen initiiert beispielsweise die Freisetzung

von Ca^{2+} und von anderen Faktoren aus dem ER-Lumen in das Cytosol, wodurch die ER-spezifische Apoptose eingeleitet wird (Zong et al., 2003). Besonders interessant ist die Beobachtung, dass die Prozessierung der Caspase12, die spezifisch mit dem ER assoziiert ist (Nakagawa et al., 2000), von der Aktivität der ER-lokalisierten Bax- und Bak-Proteine abhängig ist (Zong et al., 2003).

Caspasen:

Im Fall einer sehr starken und langanhaltenden ER-Stressinduktion wird in den gestressten Zellen ein evolutionär-konserviertes Caspase-abhängiges Apoptoseprogramm induziert, welches einhergeht mit einer vorangehenden Wachstumsinhibition (Perez-Sala et al., 1995). Die *in vitro* Analysen zeigten, dass die Slfn1-induzierte Apoptose durch aktive Caspasen vermittelt wird. Welche Caspase-Kaskade durch das retrovirale Slfn1-Protein in NIH3T3 Fibroblasten induziert wird, konnte bisher nicht eindeutig bestimmt werden. Eine Beteiligung von Caspase12 ist jedoch aus zwei Gründen wahrscheinlich. 1. Die Caspase 12 ist als einzige Caspase mit dem ER-Kompartiment assoziiert (Zong et al., 2003). 2. Im Fall einer irreversiblen ER-Stressantwort wird die Apoptose durch einen Caspase12-abhängigen Mechanismus eingeleitet (Nakagawa et al., 2000b). In den vergangenen Jahren zeigten eine Reihe von Studien die Existenz eines neuen apoptotischen Regulationsweges bei dem Caspase 12 als Initiatorcaspase fungiert (Nakagawa and Yuan et al., 2000a; Nakagawa et al., 2000b). Die Aktivierung von Caspase 12 ist das Resultat von Störungen in den Funktionen des ERs, welches beispielsweise durch ER-Stress oder toxischen Substanzen induziert wird. Die Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Substanzen, die die Funktion des ERs stören, wie mit Tunicamycin, ein Inhibitor der Protein-Glykosylierung oder Thapsigargin, ein Inhibitor der ER-spezifischen Calcium ATPase oder BrefeldinA, ein Inhibitor des ER-Golgi-Transports, führen zur Caspase12-vermittelten Apoptoseinduktion. Die prozessierte Caspase 12 ihrerseits aktiviert die Pro-Caspase 9, die wiederum die apoptotische Kaskade über Caspase 3 initiiert. Die Caspase9 Aktivierung ist in diesem Fall unabhängig von der Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom Cs (Nakagawa et al., 2000b; Reimertz et al., 2003). Eine stress-vermittelte Aktivierung von Caspase-12 im ER wird auch durch eine vermehrte Akkumulation und Anhäufung von nicht- oder falsch-gefalteten Proteinen induziert (Pucci et al., 2000).

p21^{CIP/WAF} und die Id-Gene:

Die Bedeutung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors, p21^{CIP/WAF}, in der Slfn1-vermittelten Wachstumsarretierung wird durch die signifikant zunehmende Expression in Slfn1-transduzierten Fibroblasten deutlich. Unter stressreichen Bedingungen, so auch im Fall von ER-Stress, wird der Zellzyklusarrest in der G₁-Phase durch die spezifische Aktivierung von p21^{CIP/WAF} CKI in einem p53-abhängigen Mechanismus induziert (Bellamy et al., 1996). p21 kann durch Interaktion die Aktivität von multiplen CDK's, z.B. von Cyclin D/CDK4 oder von CDK6 sowie von Cyclin E/CDK2, inhibieren, die Transition von der G₁ zur S-Phase unterbinden und dadurch die Wachstumsarretierung auslösen (El-Deiry et al., 1998). Eine Überexpression von p21^{CIP/WAF} führt zur Blockierung des Zellzyklusses in der G₁- oder G₂/S-Phase (Nioulescu et al., 1998; Ogryzko et al., 1997). Durch die direkte Interaktion mit PCNA kann p21^{CIP/WAF} die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase δ blockieren und somit das zelluläre Wachstum unterdrücken (Waga et al., 1994). p21^{CIP/WAF} ist ebenfalls in der Lage Apoptose in p53-abhängiger oder –unabhängiger Weise zu induzieren (Andrei et al., 2002; Wang et al., 2000). Eine Überexpression von p21^{CIP/WAF} in p53-defizienzen humanen Hep3B Hepatoma-Zelllinien resultiert in einer Induktion der Bax-Genexpression, was das Verhältnis von Bcl-2 und Bax moduliert und in Folge dessen die Apoptose einleitet (Kang et al., 1999). Eine Vielzahl von anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. von Sp1, p300, CEBP β , ID-Gene und von STATs, sind ebenfalls an der transkriptionellen Regulation des p21-Gens, unabhängig von p53, beteiligt (Bellido et al., 1995; Biggs et al., 1996; Chinery et al., 1997; Mutoh et al., 1998; Norton et al., 2000).

Die verringerte Expression der vier ID-Gene (ID1-ID4) in retroviral Slfn1-exprimierenden Fibroblasten offeriert einen weiteren Mechanismus, wie das Slfn1-Protein seine antiproliferative Aktivität in einem p21-abhängigen und p53-unabhängigen Reaktionsweg vermitteln könnte. Die ID-Proteine gehören zur Familie der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, die als positive Regulatoren des Zellwachstums agieren und deren Funktionalität für den Eintritt in den Zellzyklus notwendig ist. In ruhenden Zellen sind die ID-Gene auf niedrigem bis nicht nachweisbarem Niveau exprimiert. In Folge der mitogenen Stimulation, so auch in Fibroblasten, wird die ID-Genexpression induziert. Die aktivierten ID-Proteine (ID2 und ID4) interagieren mit dem pRB-Protein (Retinoblastoma Proteine), welches vom repressiven pRB-E2F-Transkriptionsfaktorkomplex dissoziiert. Durch die Dissoziation von pRB-Proteins wird der E2F-Transkriptionsfaktor aktiviert und initiiert die Expression von Genen, die für die Progression durch die S-Phase des Zellzyklusses benötigt werden (Iavarone et al., 1994; Lasorella et al., 1996; Norton et al., 2000). Die verringerte Expression der ID-

Gene, wie sie in den retroviral Slfn1-exprimierenden Fibroblasten nachgewiesen wurde, würde zum Verlust der ID-Proteine führen und die Dissoziation des pRB-Proteins vom E2F-Protein unterbinden und dementsprechend die Wachstumsarretierung auslösen. Ein weiterer Transkriptionsfaktor E2A, ebenfalls ein Helix-Loop-Helix-Protein, bildet Homodimere, die zur transkriptionellen Aktivierung des p21-Genes notwendig sind. Durch die Interaktion der ID-Proteine (ID1) mit dem E2A-Protein wird die Initiation der p21-Genexpression inhibiert (Norton et al., 2000). Die Slfn1-vermittelte Verminderung der ID-Genexpression könnte die Dimerisierung des E2A-Transkriptionsfaktors fördern und dadurch die erhöhte Genexpression von p21^{CIP/WAF} induzieren, welches die Wachstumsarretierung durch die Inaktivierung der CDKs auslöst.

p53-Tumorsuppressorprotein:

Die erhöhte Genexpression des p53 Tumorsuppressorproteins in Slfn1-exprimierenden Fibroblasten gibt einen weiteren Hinweis auf einen p53-abhängigen Mechanismus der Slfn1-vermittelten Wachstumsarretierung und Apoptoseinitiation. Das p53-Protein ist auf niedrigem Niveau in normalen Zellen exprimiert. Jedoch erhöht sich die p53-Expression, wenn die DNA durch toxische Reagentien oder durch ionisierende Strahlung (UV- und γ -Strahlung) beschädigt wird oder wenn onkogen wirkende Proteine (Myc, Ras) aktiviert oder überexprimiert werden (El-Deiry et al., 1998; Pucci et al., 2000). Die Aktivierung von p53 in Folge von DNA-Schäden induziert entweder den Zellzyklusarrest und/oder den apoptotischen Zelltod (Vogelstein et al., 2000). p53 ist aber auch in Seneszenz- und Differenzierungsprozessen, sowie in der ER-Stressantwort involviert. Der zytostatische Effekt von p53 wird durch die transkriptionelle Aktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21^{CIP/WAF} und der apoptotische Effekt durch die transkriptionelle und posttranskriptionelle Aktivierung von PUMA, Bax, Fas/APO1, Killer und PIG3 vermittelt (Vousden et al., 2002; El-Deiry et al., 1998). Eine Überexpression von p53 in verschiedenen Maus- und Ratten-Zelllinien inhibiert nicht nur den Eintritt in den Zellzyklus in der G₁-Phase sondern auch die Mitose, was eine Arretierung der Zellen in die G₂/M-Phase einleitet (Agarwal et al., 1995). Das aktive p53-Protein ist aber auch in der Lage mit Transkriptionsfaktoren, z.B. mit TFIID, der in DNA-Reparaturmechanismen involviert ist, zu interagieren und dadurch die Apoptose zu induzieren (Wang et al., 1996).

Die Funktion von p53 in der Slfn1-induzierten Wachstumsarretierung und Apoptose ist bisher nicht eindeutig verstanden. Es gibt einige Indizien, die sowohl für aber auch gegen eine Beteiligung des p53-Proteins sprechen. Die Wachstumsarretierung von Slfn1-exprimierenden

NIH3T3 Fibroblasten in der G₁-Phase des Zellzyklusses und die anschließende Induktion der Apoptose, die erhöhte transkriptionelle Expression von p53 selbst und von Genen, die wiederum durch p53 transkriptionell reguliert werden, z. B. p21^{CIP/WAF}, Bax, Gadd45a, IEX1 oder DUSP2, befürworten eine Beteiligung des p53-Tumorsuppressor-Proteins als Regulator an der Slfn1-induzierten Wachstumsinhibition und Apoptoseinduktion. Für einen p53-abhängigen Reaktionsweg spricht insbesondere die verstärkte Expression von DUSP2/PAC1 (Dual Specific Phosphatase2/Phosphatase of activated cells), welche in den Slfn1-exprimierenden Fibroblasten auf transkriptionellem Niveau durch quantitative PCR- jedoch nicht in den Array-Analysen nachgewiesen werden konnte und ein direktes Zielgen von p53 ist. Während der Apoptose bindet p53 an eine palindromischen Sequenz des PAC1-Promotors und aktiviert die Transkription von PAC1 (Yin et al., 2003). Die PAC1-Expression wird spezifisch durch oxidativen Stress induziert und das PAC1-Protein inaktiviert durch Dephosphorylierung die ERK1/2-Kinasen (extracellular signal-regulated Kinase 1/2), welches wiederum die Inhibition des zellulären Wachstum induziert (Yin et al., 2003). IEX1 (immediate early response gene X-1) gehört zur Familie der Stress-induzierbaren Proteinen, dass durch p53 aber auch durch anderen Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, transkriptionell induziert werden kann. Eine Überexpression von IEX1 erhöht die Sensitivität von Zellen gegenüber der Apoptose (Wu et al., 2003).

Kritisch ist jedoch zu betrachten, dass die erhöhte p53-Expression in den transduzierten Fibroblasten erst signifikant 36h und 48h nach Beginn der Slfn1-Expression zu beobachten war, während die Wachstumsinhibition schon bereits nach 24h nachgewiesen werden konnte. Interessant ist auch die Beobachtung, dass das mdm2-Gen auch in der frühen Phase der Slfn1-Expression induziert wird. mdm2 ist ein negativer Regulator von p53 (Pucci et al., 2000; Erhardt et al., 1997) und könnte die unveränderte p53-Expression in der frühen Phase der Slfn1-vermittelten Wachstumsarretierung in den transduzierten Fibroblasten erklären. Das aktive p53-Protein wird in Folge von apoptotischen Stimuli posttranskriptionell modifiziert und dadurch stabilisiert, und eben diese Stabilisierung konnte in den Slfn1-exprimierenden Fibroblasten durch Western-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden (Daten wurden nicht gezeigt.). Eine Stabilisierung des p53-Proteins wurde jedoch auch nicht in Staurosporin-behandelten Zellen beobachtet, wo p53 in seiner aktiven, stabilisierten Form vorliegen sollte. Dieser Befund deutet auf ein experimentelles Problem hin.

c-Myc:

Eine erhöhte Genexpression von c-Myc konnte in den Slfn1-transduzierten Fibroblasten beobachtet werden und zeigt dadurch dass c-Myc auch ein möglicher Mediator des Slfn1-vermittelten ER-Stresses und der Apoptose sein könnte. In den Studien von Lee et al., 2003 konnte eine direkte Beziehung zwischen einer Tunicamycin-induzierter ER-Stressantwort und einer verstärkten transkriptionellen Expression von c-Myc beobachtet werden (Lee et al., 2003). c-Myc gehört zur Familie der Myc-Transkriptionsfaktoren und ist befähigt die Gen-Expression entweder zu aktivieren oder zu unterbinden (Vennstrom et al. 1982; Cole et al., 1999). Cdc25a und p53 sind solche Zielgene, die durch c-Myc transkriptionell reguliert werden (Galaktionov et al., 1996). Das c-Myc-Protein hat eine duale Funktion in der Regulation der Wachstumskontrolle. Einerseits ist c-Myc ein wichtiger positiver Regulator der Zellzyklusprogression, andererseits hat es eine Apoptose-induzierende Wirkung. Eine konstitutive Überexpression von c-Myc kann Apoptose in CHO-Zellen (Wurm et al., 1986) in Fibroblasten (Evan et al., 1992) und myeloiden 32D-Zellen (Askew et al., 1991) induzieren.

Die geringfügig zunehmenden Expressionen von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie, von mdm2, dem negativen Regulator von p53 und von Faktoren, die sowohl für die Zellproliferation als auch für die Apoptoseinduktion notwendig sind, z. B. IEX1 und c-Myc, weisen darauf hin, dass die Slfn1-exprimierenden Fibroblasten versuchen, dem ER-Stress, der Wachstumsinhibition und dem apoptotischen Zelltod entgegenzuwirken. Diese Kontrollmechanismen sind jedoch nicht in der Lage, den durch das retrovirale Slfn1-Protein induzierten proapoptotischen Effekt zu kompensieren. Die Abbildung 51 stellt zusammenfassend die Beziehung zwischen der Slfn1-vermittelten ER-Stressantwort, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose dar und kennzeichnet die wichtigsten Gene und Proteine, die durch die ektopische Slfn1-Expression in NIH3T3 Fibroblasten initiiert wurden.

Der genaue Mechanismus, wie das retrovirale Slfn1-Protein in NIH3T3 Fibroblasten ER-Stress induziert, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Die Slfn1-vermittelte Proliferationsinhibition und die Apoptoseinduktion ist die Konsequenz einer UPR-vermittelten ER-Stressantwort. Weitere Studien sind daher notwendig, um mögliche Interaktionspartner von Slfn1 zu identifizieren und dadurch zu klären, warum eine Überexpression von Slfn1 zu einer ER-Stress-vermittelten Apoptoseinduktion führt.

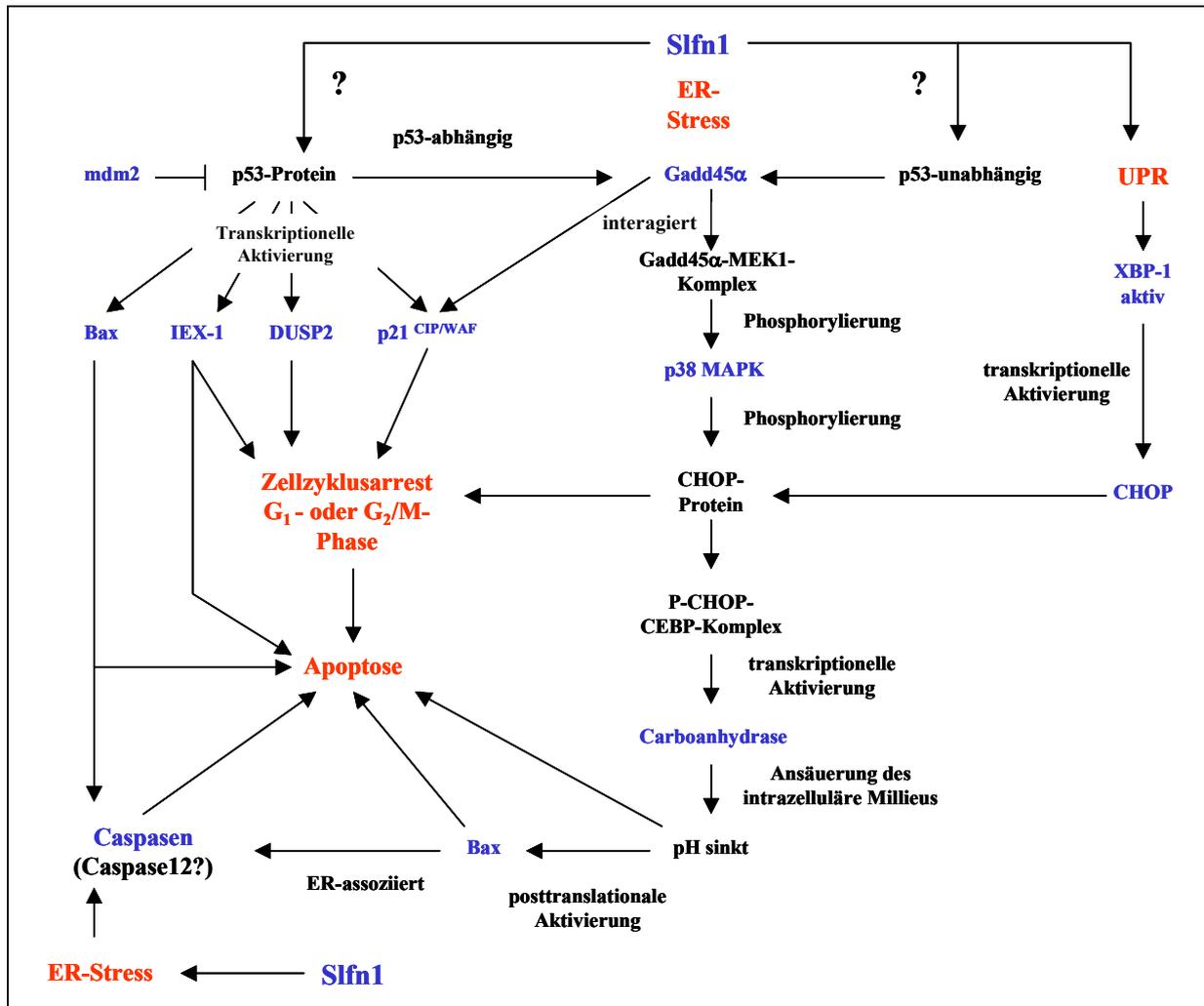


Abb. 51: Mögliche Mechanismen der Slfn1-vermittelten ER-Stress-Antwort und die Verbindung zum Zellzyklus und zur Apoptose

Rot kennzeichnet die zellulären Prozess, die durch das retrovirale Slfn1-Protein in NIH3T3 Fibroblasten induziert werden. Blau kennzeichnet die regulatorischen Elemente, die in den Slfn1-transduzierten Fibroblasten verstärkt aktiviert, exprimiert und nachgewiesen wurden.

6.3 Bedeutung von Slfn1 für die T-Zellentwicklung

Die Entwicklung und die Funktion von T- und B-Lymphozyten wird durch Signaltransduktionswege reguliert, an denen spezifische Zelloberflächenrezeptoren, intrazelluläre Signalmoleküle und nukleäre Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Weissmann et al., 1994; Weiss et al., 1994; Janeway et al., 1994; Clevers et al., 1996; Fischer et al., 1998). Die differentielle Expression der verschiedenen Mitglieder der Slfn-Gen-Familie in T-Zellen, die sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung und Aktivierung befinden, zeigte, dass diese Proteinfamilie wahrscheinlich unterschiedliche regulatorische Funktionen innerhalb der T-Zellontogenie erfüllt. Aufgrund der hohen Expression von Slfn1 in reifen naiven T-Zellen

und dessen negative transkriptionelle Regulation in aktivierten T-Zellen wurde angenommen, dass Slfn1 eine notwendige Komponente für die Aufrechterhaltung des aktiven ruhenden Zustandes sein könnte. Eine Slfn1-Defizienz hat jedoch keinen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung (Schwarz et al., 1999). Die thymische Zellularität in den Slfn1-defizienten Mäusen ist gegenüber der Thymozytenzellzahl in den Wildtypkontrolltieren unverändert (Schwarz et al., 1999). Demzufolge ist das Slfn1-Protein für die T-Zellontogenie und für die Aufrechthaltung des ruhenden Zustands nicht essentiell. Eine transgene vorrangig T-Zell-spezifische Slfn1-Expression führt nicht nur zu einer intrathymischen Blockierung der T-Zellentwicklung im DN3-Pro-T-Zell-Stadium, sondern auch zu einer Verminderung der Proliferation und zur verstärkten Apoptose der Thymozyten (Schwarz et al., 1999).

6.3.1 Konsequenzen der transgenen Expression von Slfn1 während der frühen Phase der T-Zellentwicklung

Im Fokus dieser Arbeit stand des Weiteren die Identifizierung von möglichen molekularen Mechanismen, die die antiproliferative und proapoptotische Wirkung des transgenen Slfn1-Proteins in den CD25⁺CD44⁻-Thymozyten und die damit verbundene Inhibition der T-Zellentwicklung im Pro-T-Zellstadium erklären können. Um dieser Aufgabenstellung zu begegnen, wurden Slfn1-transgene Mäuse generiert. Die vom hCD2-Promotor kontrollierte transgene Slfn1-Expression beginnt im DN1-DN3-Stadium der Thymozytenentwicklung, in dem das endogene Slfn1-Protein nicht exprimiert ist. In Übereinstimmung mit den von Schwarz et al., 1999 etablierten Slfn1-transgenen Mäusen konnte ebenfalls eine Akkumulation von Thymozyten im DN3-Stadium und damit eine signifikante Reduktion der thymischen Zellularität gefunden werden. Um der Frage nachzugehen, ob durch das transgene Slfn1-Protein, Gene reguliert werden, die in Verbindung mit der ER-Stressantwort, der Zellzykluskontrolle oder der Apoptose stehen, wurden Microarray-Transkriptomanalysen und quantitativen PCR-Analysen mit den CD25⁺CD44⁻-Thymozyten von Slfn1-transgenen Mäusen und Wildtypkontrolltieren durchgeführt. Eine veränderte Genexpression konnte in den Slfn1-transgenen Thymozyten (CD25⁺CD44⁻) nicht detektiert werden. Der exakte molekulare Mechanismus, wie das transgene Slfn1-Protein die Blockierung der T-Zellentwicklung induziert und mit welchen Molekülen Slfn1 interagiert, bleibt weiterhin unbeantwortet. Möglicherweise interferiert das transgene Slfn1-Protein mit Komponenten des Pro-TZRs oder mit Molekülen, die an der Signaltransduktion vom Pro-TZR-Komplex zum Nukleus beteiligt sind.

TZR- β -Selektion:

Die Spezifität der adaptiven Immunantwort ist abhängig von der klonalen Expression eines funktionellen TZR auf den T-Lymphozyten. Ein selektiver Mechanismus, der die funktionelle Expression des TZR reguliert, ereignet sich während der Lymphozytenentwicklung auf dem Niveau des TZR- β -Rearrangements. Die Kontrolle der Expression eines funktionellen Pro-TZR-Komplexes repräsentiert einen wichtigen Kontrollpunkt in der T-Zelldifferenzierung. Thymozyten, die unfähig sind eine funktionelle TZR- β -Kette oder einen kompletten TZR-Komplex (TZR- β -Kette, pT α -Kette, CD3-Signalmolekül) an der Zelloberfläche zu generieren, werden in der Weiterentwicklung zu reifen naiven T-Zellen im DN3-Stadium inhibiert und durch Apoptose eliminiert (Michie et al., 2002). Die T-Zellentwicklung in RAG-1- und RAG-2- defizienten Mäusen ist im DN3-Stadium inhibiert, weil keine Rearrangierung der TZR- β -Gene initiiert werden kann (Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1992) und demzufolge keine Expression der TZR- β -Kette an der Zelloberfläche stattfindet. Die V(D)J-Genrekombination ist in den Thymozyten der SCID-Mäuse (severe combined immune deficiency) ebenfalls inhibiert und induziert einerseits einen Stop der Thymozytenreifung im DN3-Stadium und andererseits wird die Lebensspanne dieser Zellen signifikant vermindert (Rothenberg et al., 1993; Shortman et al., 1996; Godfrey et al., 1993; Penit et al., 1995). Gendefiziente Mausmodelle haben gezeigt, dass auch die CD3 ϵ - und CD3 γ -Untereinheiten des CD3-Komplexes für die Transition von DN zum DP-Thymozytenstadium unentbehrlich sind (Malissen et al., 1995; Haks et al., 1998; Malissen et al., 1999; Andouin et al., 1998). Eine CD3 δ -Defizienz induziert in der $\alpha\beta$ -T-Zellentwicklung eine Arretierung der Thymozyten im DN3-Stadium (Dave et al., 1997). Nicht nur die Synthese der funktionellen Komponenten des Pro-TZR, sondern auch deren Expression an der Zelloberfläche ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Differenzierung und für die Proliferation der Thymozyten. Die Thymozytenentwicklung ist in β -TZR^{-/-}-KO-Mäusen ebenfalls im DN3-Stadium inhibiert. Die Expression einer TZR- β -Kette in β -TZR^{-/-}-KO-Mäusen, welche aufgrund einer artifiziellen Mutation in der Aminosäuresequenz jedoch nicht von ER an der Zelloberfläche transportiert wird, kann die Blockierung der Thymozytenentwicklung nicht kompensieren (O'Shea et al., 1997). Eine Beeinflussung der V(D)J-Rekombinationsmaschinerie oder von Komponenten des Pro-TZR-Komplexes durch das transgene Slfn1-Protein ist zunächst auszuschließen, weil die Funktionalität der wenigen peripheren T-Zellen nach ex vivo Stimulation oder durch Infektionsstudien nachgewiesen werden konnte und demzufolge ein funktioneller TZR-Komplex exprimiert sein muss.

Signaltransduktionskomplexe:

Die TZR- β -Selektion ist nicht nur von der Formierung des Pro-TZR-Komplexes abhängig, sondern auch von Signalkomplexen, die mit der Zellmembran assoziiert sind und die die vom Pro-TZR ausgehenden Signale intrazellulär weiterleiten. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass auch der Verlust von Genprodukten, die nicht direkt mit dem Pro-TZR-Komplex assoziiert sind, zu einer Inhibition der Thymozytenentwicklung im DN-Stadium, zur Verminderung der Thymozytenproliferation und zur Apoptoseinduktion führen kann. Eine Deletion der Tyrosinkinase Lck (p56^{Lck}) führt zu einer Akkumulation der Thymozyten im DN3-Stadium der T-Zellentwicklung. Dadurch wurde gezeigt, dass die Lck-Kinase nach der Pro-TZR-Formierung ein essentieller Vermittler für die Signalgebung der β -Selektion ist (Molina et al., 1992). Thymozyten von RAG-defizienten Mäusen, die eine transgene, konstitutiv aktive Form der Lck-Kinase (Lck^{F505}), der Ras GTPase (Ras^{V12}) oder der cRaf-1 Serin-/Threoninkinase exprimieren, proliferieren und entwickeln sich zu CD4⁺CD8⁺-Thymozyten (Mombearns et al., 1994; Gartner et al., 1999; Iritani et al., 1999; Swat et al., 1996). Diese Daten unterstützen die Annahme einer Beteiligung von Lck aber auch von Ras und Raf am Prozess der β -Selektion. Es ist durchaus möglich, dass die transgenen Slfn1-Expression, die Aktivität oder die Expression der hier beschriebenen Kinasen beeinträchtigt und dadurch die Blockierung der Thymozytenentwicklung einleitet.

Einige Mitglieder der MAPK-Signalkaskade, wie JNK und p38-MAPK, spielen ebenfalls eine zentrale Rolle in der Signalvermittlung der β -Selektion. Beispielsweise die p38-MAPK ist essentiell für die negative Regulation der Transition vom DN zum DP-Stadium. Eine erhöhte Aktivität der p38-MAPK resultiert in einer verminderten Generation von DP-Thymozyten und zeigt dadurch, dass die Inaktivierung dieses Signalweges für die Differenzierung der frühen Thymozyten essentiell ist (Rincon et al., 1998; Diehl et al., 2000). Eine konstitutive Aktivierung von p38 induziert eine verstärkte Apoptose von CD8⁺-T-Zellen (Merritt et al., 2000) und die Thymozytenentwicklung ist im DN3-Stadium arretiert (Diehl et al., 2000). Die in vitro durchgeführten Analysen mit retroviral Slfn1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten zeigten, dass die p38-MAPK an der Slfn1-induzierten Wachstumsarretierung und Apoptoseinduktion involviert ist. Möglicherweise führt die transgene Slfn1-Expression in den frühen Stadien der T-Zellentwicklung zu einer verstärkten Expression und Aktivierung der p38-MAPK und induziert demzufolge den T-Zellentwicklungsblock und die Apoptose.

Die Rho-Familie der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine/GTPasen übernimmt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Thymozytenentwicklung und teilweise auch innerhalb der β -Selektion. Die transgene Expression einer konstitutiv-aktiven Form von Rac-1 (Rac-1^{L61}) in RAG-defizienten Mäuse resultiert in der Generation von DP-Thymozyten und zeigt dadurch, dass Rac-1 die Proliferation und Differenzierung der Pro-T-Zellen in der Abwesenheit eines Pro-TZR-Komplexes vermitteln kann (Gomez et al., 2000). Auch die Rho-GTPase übernimmt eine wichtige Funktion für die Regulation der Thymozytenproliferation und für das Überleben der Thymozyten in der frühen Phase der Entwicklung (Galandrini et al., 1997; Henning et al., 1997; Henning et al., 1998). Eine Rho-Defizienz führt beispielsweise zur verstärkten Apoptose der DN-Thymozyten. Die Apoptoseinduktion ist jedoch abhängig vom p53-Tumorsuppressorprotein. Eine kombinierte Defizienz von p53 und der Rho-GTPase resultiert wiederum in einer signifikanten Inhibition der Apoptose (Costello et al., 2000). Eine Erhöhung des zellulären Überlebens der DN3-Thymozyten von CD3 $\gamma^{-/-}$, RAG $^{-/-}$ oder SCID-Mäusen wurde beobachtet, wenn gleichzeitig eine p53-Defizienz vorlag. Zusätzlich differenzieren diese DN-Thymozyten zu DP-Thymozyten und zeigen damit, dass es ein p53-abhängigen Kontrollpunkt in den Pro-T-Zellen gibt, der eine frühzeitige Differenzierung von frühreifen Thymozyten vor der Expression des TZR-Komplexes inhibiert (Jiang et al., 1996; Guidos et al., 1996; Haks et al., 1999). Eine Beteiligung von p53 an der Slfn1-vermittelten Wachstums- und Differenzierungsarretierung sowie an der Apoptoseinduktion ist auszuschließen, weil der gefundene Slfn1-Phänotyp durch die p53-Defizienz nicht kompensiert werden konnte. Die Thymozyten der p53 $^{-/-}$ Slfn1 $^{+/-}$ -transgenen Mäuse waren weiterhin im CD25⁺CD44⁻-Pro-T-Zellstadium arretiert und die Zellularität in den primären und sekundären lymphoiden Organen waren ebenfalls signifikant vermindert.

Transkriptionsfaktoren:

Transkriptionsfaktoren übernehmen eine wichtige Funktion in der Kontrolle der β -Selektion. Die vollständigen Formierung eines funktionellen Pro-TZR-Komplexes und die einwandfreie Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden durch diesen, führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Zielgenen kontrollieren, welche wiederum Bestandteile der Regulation der β -Selektionskontrollpunkte sind (Michie et al., 2002). Die E-Proteine sind eine Klasse von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der T-Zellentwicklung beteiligt sind. Die Familie der E-Proteine gehört zur Klasse der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsaktivatoren (Helix-Loop-Helix:HLH), die als Homo- oder Heterodimere mit anderen HLH-Proteinen interagieren und an E-Box-Motive binden. Die E-Box-Motive

sind regulatorische Sequenzen, die in einer Vielzahl von Genen gefunden wurden, einschliesslich in CD4-, pT α -, TZR- α und TZR- β -Enhancer-Elementen (Massari et al., 2000). Drei Gene sind für die Kodierung von E-Proteinen in Säugetierzellen, E2A (kodiert E12 und E47), HEB und E2-2, verantwortlich. Eine gezielte Deletion von E47 reduziert die Zellularität des Thymus und hat Auswirkungen auf die Thymozytenentwicklung in verschiedenen Stadien vor der Initiation der TZR- β -Rearrangierung (Bain et al., 1997). Eine Deletion von E2A in RAG^{-/-}-Mäusen resultiert in der Generation von DP-Thymozyten und in einer Erhöhung der thymischen Zellularität. Dementsprechend ist E2A für die Inhibition der T-Zelldifferenzierung im DN3-Stadium in Abwesenheit eines Pro-TZR-Komplexes verantwortlich. Eine Überexpression von E2A resultiert in einer Wachstumsarretierung und Apoptose und zeigt dadurch eine negative Funktion von E2A in Zellen, die keinen funktionellen Pro-TZR-Komplex generieren können (Engel et al., 2001; Engel et al., 1999). Die DNA-Bindungsaktivität von E2A und HEB wird negativ von den ID-Proteinen reguliert, welche ebenfalls HLH-Proteine sind, die die DNA-Bindungsaktivität inhibieren (Benezra et al., 1990). Eine Überexpression von ID3 in lymphoiden Vorläufer-Lymphozytenpopulationen induziert eine Blockierung der T- und der NK-Zellentwicklung (Heemskerk et al., 1997), ein Phänotyp der nur partiell dem in den Slfn1-transgenen Mäusen vorgefundenen entspricht. Die Transkriptom-Analysen von Slfn1-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten zeigten, dass die vier Repräsentanten der ID-Proteinfamilie (ID1-ID4) im Verlauf der retroviralen Slfn1-Expression signifikant negativ reguliert werden. Dennoch ist eine Beeinflussung der ID-Proteine durch die transgene Slfn1-Expression nicht auszuschliessen aber doch eher unwahrscheinlich. Würde eine transgene Slfn1-Expression in Thymozyten zu einer Verminderung der Genexpression von verschiedenen ID-Genen führen, so müssten Ähnlichkeiten im Phänotyp zwischen einer ID-defizienten Maus und einer transgenen Slfn1-Maus auftreten. Es gibt eine Vielzahl von phänotypischen Eigenschaften, die in den Slfn1-transgenen Mäusen gefunden wurden, die jedoch nicht mit dem Phänotyp von beispielsweise ID-defizienten Mäusen korrelieren. Die NK-Zellentwicklung und deren Funktion ist beispielsweise in ID2^{-/-}-Mäusen deutlich reduziert (Yokota et al., 1999), während eine Id1-Defizienz zu keinen Abnormalitäten in der lymphozytären Entwicklung führt (Norton et al., 2000). Eine transgene Slfn1-Expression beeinträchtigt jedoch nicht die NK-Zellentwicklung und hat signifikante Auswirkungen auf die lymphozytären Entwicklung

Die durch das Slfn1-Protein induzierte ER-Stressreaktion in NIH3T3 Fibroblasten könnte ein Mechanismus sein, der in den Slfn1-transgenen Thymozyten den Entwicklungsblock und die

Apoptose induziert. Eine erhöhte Expression von ER-Stress- und Apoptose-relevanten Genen konnte aufgrund der phagozytären Eliminierung, der frühzeitig apoptotischen Thymozyten nicht nachgewiesen werden. Gegen eine ER-Stressinduktion durch das transgene Slfn1-Protein spricht des Weiteren, dass die Xbp-1 mRNA in den transgenen Thymozyten in nicht-prozessierter Form vorliegt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die ektopische Expression des Slfn1-Proteins in den transgenen Thymozyten wahrscheinlich andere Mechanismen und Reaktionswege beeinflusst, die zur Inhibition der T-Zellentwicklung führen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien lassen bisher keinen exakten molekularen Mechanismus erkennen, wie das transgene Slfn1-Protein, die Ontogenie der Thymozyten im DN3-Stadium inhibiert, die Apoptose induziert oder welche funktionellen Komponenten des TZR-Komplexes, der Signaltransduktionskaskaden und welche Transkriptionsfaktoren durch das Transgen beeinträchtigt werden. Es sind daher weitere Analysen notwendig, um den Slfn1-vermittelten Entwicklungsblock der Thymozyten zu verstehen.

6.3.2 Konsequenzen einer transgenen Slfn1-Expression in peripheren T-Zellen

In den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse wurden aufgrund der Inhibition der T-Zellentwicklung deutlich geringere absolute Zellzahlen nachgewiesen. Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren waren die absoluten Zellzahlen der peripheren T-Zellen drastisch vermindert. Der relative Anteil von CD8⁺-T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten nahm überproportional zu, wodurch sich das Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen umkehrte. Auffällig war des Weiteren die erhöhte Akkumulation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die in der Milz und in den Lymphknoten den Slfn1-transgenen Mäusen in einem aktivierten oder Gedächtnis-ähnlichen Zustand vorlagen, ohne dass zuvor ein Antigenkontakt stattfand.

Das nachfolgende Modell der homöostatischen Proliferation liefert eine mögliche Erklärung, warum in den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse ein erhöhter Anteil von aktivierten und Gedächtnis-ähnlichen T-Zellen vorkommt. Durch homöostatische Mechanismen wird die Anzahl von T-Lymphozyten im Organismus auf einem konstanten Niveau gehalten (Freitas et al., 1993; Bell et al., 1997; Goldrath et al., 1999; Surh et al., 2000). Im Rahmen der Immunantwort werden T-Zellen aktiviert. Diese expandieren klonal und differenzieren zu Effektorzellen. Nach Neutralisierung des Antigens sterben die meisten expandierten Effektor-T-Zellen durch Apoptose und nur eine kleine Fraktion von Zellen

überlebt als langlebige Gedächtnis-T-Zellen (Ge et al., 2002). Reife naive T-Zellen haben aber auch die Kapazität zu einer spontanen und umfassenden Proliferation nach Transfer in Immundefizienten Mäusen (Tanchot et al., 1997). Innerhalb des Prozesses der homöostatisch-vermittelten Proliferation können aus reifen naiven T-Zellen auch ohne vorherigen Antigenkontakt T-Zellen mit einem zeitweilig Gedächtnis-ähnlichen oder aktivierten Phänotyp entstehen. Diese homöostatisch-vermittelte Proliferation von T-Zellen erfolgt, wenn eine kleine Anzahl von reifen naiven T-Zellen adoptiv in T-Zell-defiziente Mäuse, z.B. in SCID-, in RAG-defiziente oder in bestrahlte Mäusen, transferiert werden (Bell et al., 1987; Rocha et al., 1989). Goldrath und Kollegen konnten die homöostatische Proliferation und in Folge dessen die Entstehung von Zellen mit Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp in RAG-defizienten Mäusen nach adoptiven Transfer von naiven OT-1 T-Zellen nachweisen (Goldrath et al., 2000). Die konventionell über Antigen aktivierten T-Zellen exprimieren an der Zelloberfläche den Aktivierungsmarker CD44 und vermindern die Expression von CD62L. T-Zellen, die durch den homöostatisch-vermittelten Prozess aktiviert werden, exprimieren ebenfalls CD44, jedoch bleibt die CD62L-Expression erhalten (Goldrath et al., 1999; Muranski et al., 2000; Murali-Krishna et al., 2000). Im Vergleich zu den konventionell aktivierten T-Zellen erfolgt die erhöhte Expression von CD44 in homöostatisch aktivierten T-Zellen langsamer und benötigt mehrfache Zyklen der Zellteilung bis die T-Zellen CD44 im hohen Maße exprimieren (Cho et al., 2000; Murali-Krishna et al., 2000). Die Aktivierung der naiven T-Zellen durch homöostatische Stimulation ist nicht assoziiert mit der erhöhten Regulation von akuten Aktivierungsmarkern, wie CD25 und CD69 (Oehen et al., 1999; Ernst et al., 1999; Goldrath et al., 1999; Kieper et al., 1999; Muranski et al., 2000). Dieser Phänotyp konnte auch in den Slfn1-exprimierenden peripheren T-Zellen beobachtet werden. Die Hälfte der CD8⁺-T-Zellen in der Slfn1-transgenen Milz der Linie 1 waren CD44⁺CD62⁺, die weder CD69 noch CD25 exprimierten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass Gedächtnis-ähnliche T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäuse wahrscheinlich durch einen Prozess der homöostatischen Proliferation expandieren. Auffällig war des Weiteren, dass der relative Anteil von T-Zellen mit Gedächtnis-ähnlichem Phänotyp in den peripheren lymphoiden Organen der Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 1 signifikant höher waren als in den transgenen Mäusen der Linie 10. Dies kann damit erklärt werden, dass durch die erhöhte transgene Slfn1-Expression in der transgenen Mauslinie 1 weniger T-Zellen in die peripheren lymphoiden Organe migrieren und somit der Anteil homöostatisch expandierter Zellen höher ist.

Die homöostatische Proliferation von naiven T-Zellen erfolgt auf polyklonalem Niveau und ist kein autonomer Prozess, sondern erfordert den Kontakt mit den eigenen MHC/Peptid-Komplexen in der Peripherie und die Stimulation durch das Zytokin IL-7 (Viret et al., 1999; Kieper et al., 1999; Ernst et al., 1999; Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). Konventionell und homöostatisch aktivierte T-Zellen unterscheiden sich in einigen weiteren funktionellen Eigenschaften. T-Zellen, die sich der homöostatischen Proliferation unterziehen, besitzen eine Effektorfunktion. Naive CD8⁺-T-Zellen können keine zytotoxische Lymphozytenaktivität (ZTL) vermitteln oder IFN γ sekretieren, wenn sie nicht zuvor stimuliert wurden. Die homöostatisch aktivierten CD8⁺-T-Zellen haben direkt nach ex vivo Stimulation mit Fremddantigen eine zytolytische Effektorfunktion und produzieren verstärkt IFN γ (Goldrath et al., 1999; Murali-Krishna et al., 2000; Cho et al., 2000). Die homöostatische Proliferation ist nicht auf naive T-Zellen limitiert. Auch Gedächtnis-T-Zellen können sich dem Prozess der homöostatischen Aktivierung in T-Zell-defizienten Mauslinien in einem MHC-unabhängigen Mechanismus unterziehen (Murali-Krishna et al., 1999). Die Entstehung von aktivierten bzw. Gedächtnis-ähnlichen T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten von Slfn1-transgenen Mäusen könnte auch die hyperproliferative Aktivität und die deutlich höhere und unverzüglichere Produktion von IL-2 und IFN γ der Lymphknoten-T-Zellen nach TZR-vermittelter Stimulation erklären.

Die relative Erhöhung der CD8⁺-T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen von Slfn1-transgenen Mäusen könnte durch einen Thymus-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus in Kombination mit der homöostatischen Proliferation entstanden sein. Der Thymus-abhängige Mechanismus könnte mit einem höheren Export von reifen naiven CD8⁺-T-Zellen aus dem Thymus zusammenhängen. Dementsprechend migrieren mehr CD8⁺- als CD4⁺-T-Zellen in die peripheren lymphoiden Organe, die in Folge der homöostatischen Aktivierung verstärkt in den Gedächtnis-ähnlichen Zustand konvertieren, proliferieren und somit das Verhältnis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen verändern. Bei einem Thymus-unabhängigen Mechanismus ist anzunehmen, dass genauso wenig CD4⁺- wie CD8⁺-T-Zellen in die Peripherie migrieren. In den sekundären lymphoiden Organen werden mehr naive CD8⁺- als CD4⁺-T-Zellen durch den homöostatischen Mechanismus aktiviert und bilden dementsprechend verstärkt den Gedächtnis-T-Zell-ähnlichen Phänotyp.

Weitere Faktoren beeinflussen die Verhältnisse von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im Thymus und in den sekundären lymphoiden Organen. Die Kinasen der Tec-Familie, z.B. Rlk und Itk (IL-2 induzierbare T-Zellkinase), sind für das homöostatische Verhältnis von CD4⁺- und

CD8⁺-T-Zellen im Thymus und in der Peripherie notwendig. Signifikant mehr CD8⁺-T-Zellen wurden im Thymus und eine Verminderung der Verhältnisse von CD4:CD8-T-Zellen im Thymus und in der Peripherie von *Itk*^{-/-}- und *Rlk*^{-/-}*Itk*^{-/-}-Mäusen beobachtet (Liao et al., 1995; Liu et al., 1998; Schaeffer et al., 1999; Schaeffer et al., 2000; Lucas et al., 2002). Einen Anstieg von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die einen aktivierten und Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp (erhöhte Expression von CD44) haben, wurde in *Itk*-defizienten Mäuse nachgewiesen (Miller et al., 2002). Eine negative Beeinträchtigung von *Itk* oder *Rtk* durch das transgene *Slfn1*-Protein ist eher unwahrscheinlich, weil sich das Verhältnis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nur in der Peripherie und nicht im Thymus der *Slfn1*-transgenen Mäuse verringert.

Auch IL-7 kann das Verhältnis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie beeinflussen. Die *in vivo* Verabreichung von IL-7 ist verbunden mit einem Anstieg der T-Zellzahl, insbesondere mit einer Erhöhung von CD8⁺-T-Zellen, was das Verhältnis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie verändert (Morrissey et al., 1991; Faltynek et al., 1992; Komschlies et al., 1994). Die T-Zellen von IL-7 behandelten Mäusen erwerben eine erhöhte funktionelle Kapazität und proliferieren verstärkt. Jedoch wird die Aktivität von beiden T-Zellpopulationen gesteigert. Die erhöhte basale Proliferation, die durch IL-7 induziert wird, ist wahrscheinlich mehr auf die homöostatische Proliferation als auf die aktivierte Proliferation zurückzuführen (Geiselhart et al., 2001). Kieper und Mitarbeiter konnten durch Überexpression von IL-7 ebenfalls die Generation von CD8⁺-T-Zellen mit diesem Gedächtnis-Phänotyp feststellen (Kieper et al., 2002). Eine überproportionale Verfügbarkeit von IL-7 könnte auch in den peripheren lymphoiden Organen der *Slfn1*-transgenen Mäusen vorliegen und dementsprechend die homöostatische Proliferation der CD8⁺-T-Zellen effizienter induzieren als in den CD4⁺-T-Zellen.

Ein weiterer Befund zeigte, dass die *Slfn1*-transgenen Lymphknoten-T-Zellen *ex vivo* ohne mitogene Stimulation wesentlich schneller den apoptotischen Zelltod induzieren als die peripheren T-Zellen der Wildtypkontrolle. In den Studien von Cho et al., 1999 wurde von Memory-T-Zellen *ex vivo* ebenfalls eine verstärkte Tendenz zur Apoptoseinduktion festgestellt (Cho et al., 1999). Der erhöhte absolute und relative Anteil von Gedächtnis-ähnlichen T-Zellen in den peripheren lymphoiden Organen der *Slfn1*-transgenen Mäuse könnte der Grund für das schnellere Sterben der T-Zellen *ex vivo* sein.

Die T-Zellsituation in den peripheren lymphoiden Organen der *Slfn1*-transgenen Mäuse ist dem einer T-Zell-defizienten Maus ähnlich. Das folgende Modell bietet eine Möglichkeit den gefundenen Phänotyp für die *Slfn1*-transgenen Mäusen zu erklären. Die transgene *Slfn1*-

Expression in der frühen Phase der T-Zellontogenie führt aufgrund des Differenzierungsblocks im DN3-Stadium zur Entstehung von nur wenigen reifen naiven CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Diese werden aus dem Thymus exportiert und migrieren in die peripheren lymphoiden Organen, wo aufgrund der geringen Zelldichte ein Überangebot an Platz oder von positiven Wachstumsfaktoren, z. B. von Zytokinen, vorliegt. Durch die gegebenen Bedingungen werden die peripheren T-Zellen, präferentiell die CD8⁺-T-Zellen, homöostatisch stimuliert, was zur Ausprägung eines Memory-ähnlichen Phänotyps (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) führt. Diese T-Zellen sind aufgrund des prä-aktivierten Zustandes in der Lage nach TZR-vermittelter Stimulation verstärkt zu proliferieren und im Vergleich zu den Wildtyp-T-Zellen signifikant mehr IL-2 und IFN γ zu produzieren.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Befunde, dass das Slfn1-Protein keine generelle anti-proliferative Aktivität besitzt. Des Weiteren wird angenommen, dass die Etablierung des Memory-ähnlichen Phänotyps der peripheren T-Zellen in den Slfn1-transgenen Mäusen weniger durch eine spezifische Funktion des Slfn1-Proteins vermittelt wird, sondern eher auf dem Prozess der homöostatischen Proliferation zurückzuführen ist.

6.3.3 Konsequenzen einer transgenen Slfn-Expression in B- und NKT-Zellen.

Nur in Slfn1-transgenen Tieren, nicht aber in Slfn4- und Slfn8-transgenen Mäusen, wurde eine Auswirkung auf andere lymphoide Zellkompartimente bzw. T-Zellsubpopulationen festgestellt. Die signifikante Verminderung der absoluten und relativen Anteile von reifen B-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten der Slfn1-transgenen Mäuse deuten auf eine Inhibition der B-Zelldifferenzierung hin. In welchem Stadium die B-Zellentwicklung durch das Slfn1-Transgen beeinträchtigt wird, ist bisher nicht beschrieben. Einige Studien konnten zeigen, dass das murine CD2 auch auf B-Zellen exprimiert ist (Altevogt et al., 1989; Duplay et al., 1989; Yagita et al., 1989; Sen et al., 1989). Die Expression der humanen CD2-Kassette wurde in verschiedenen transgenen Maus-Modellen in Pro-B-Zellstadium aber auch in reifen B-Zellen beschrieben (de Boer et al., 2003; Young et al., 1994). Dementsprechend ist anzunehmen, dass die durch den hCD2-Promotor kontrollierte transgene Slfn1-Expression auch im Pro-B-Zellstadium beginnt und möglicherweise die B-Zelldifferenzierung in diesem Stadium der Entwicklung inhibiert.

Auch die Ontogenie und die Funktion der B-Zellen ist abhängig von Signaltransduktionswege, die von spezifischen Zelloberflächenrezeptoren, von Signaltransduktionsmolekülen, von nuklearen Transkriptionsfaktoren und von Genen, die durch diese reguliert werden, kontrolliert wird. Die Differenzierung der Pro-B-Zellen zu

unreifen und reifen B-Zellen erfordert die Expression eines Pro-BZRs ($\lambda 5$ und VpreB) und die Signalgebung durch diesen, welches zu einer transienten Phase der zellulären Proliferation und zur Entwicklung von unreifen B-Zellen führt. Ein wichtiges Differenzierungsereignis ist die V_HDJ_H Rekombination, an denen wiederum die Rag-Gene beteiligt sind. SCID, BLNK, I γ β , IL-7, IL-2R β , $\lambda 5$, VpreB1/2, Btk und Tec, sind Gene, die ebenfalls für die frühe B-Zellentwicklung notwendig sind. Die Transkriptionsfaktoren Sox-4, E2A, EBF, Pax5 und IRF4/8 übernehmen eine wichtige Funktion für die Signaltransduktion und damit auch für die B-Zelldifferenzierung (Bartholdy et al., 2003). Der Verlust oder die Überexpression von einem oder mehreren Vertretern dieser Proteinfamilien induziert eine Inhibition der B-Zelldifferenzierung in verschiedenen Stadien der Entwicklung (Bartholdy et al., 2003). Die transgene Slfn1-Expression im Pro-B-Zellstadium könnte Komponenten, die für die Formierung des Pro-BZR-Komplexes notwendig sind oder Moleküle, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, beeinträchtigen. In Folge dessen wird die Inhibition der B-Zelldifferenzierung eingeleitet, der zum Verlust von reifen B-Zellen in der Peripherie von Slfn1-transgenen Mäusen führt. Weitere Studien sind daher notwendig, um die molekularen Mechanismen, die durch das transgene Slfn1-Protein in der B-Zellentwicklung beeinflusst werden, zu identifizieren.

Die transgene Expression von Slfn1, Slfn4 und Slfn8 hat keinen Einfluss auf die NK-Zellentwicklung. Der relative Anteil von NK-Zellen in der Milz von Slfn1-, Slfn4- und Slfn8-transgenen Mäusen ist in allen etablierten Mauslinien im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren unverändert. Eine Aktivität der hCD2-Kassette in NK-Zellen konnte bisher nicht nachgewiesen werden, so dass die Möglichkeit besteht, dass das Slfn1-Transgen in NK-Zellen nicht exprimiert ist und die Entwicklung daher nicht beeinflusst wird. Ein weiterer Grund warum die transgenen Slfn-Proteine nicht in NK-Zellen exprimiert sein könnten, besteht in der Thymus-unabhängigen NK-Zellentwicklung. Die NK-Zellentwicklung trennt sich von der T-Zellentwicklung noch vor dem Erreichen des DN-T-Zellstadiums, so dass die Expression der hCD2-Kassette in den NK-Zellen nicht mehr greift. Es gibt bisher keine Hinweise auf eine endogene Slfn-Expression in NK-Zellen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass eine transgene Slfn-Expression keinen Einfluss auf die Entwicklung hat. Weitere Studien sind daher nötig, um zu prüfen, ob die individuellen endogenen und die transgenen Slfn-Gene in NK-Zellen exprimiert sind und ob die Funktion dieser Zellpopulation durch die transgene Slfn1-Expression beeinflusst wird.

NKT- und T-Zellen entwickeln sich aus den gleichen Vorläufer-T-Zellen. Die Ontogenie der NKT-Zellen trennt sich von der Entwicklung der T-Zellen im $CD4^+CD8^+$ -T-Zellstadium

(Coles et al., 2000). Daher kann angenommen werden, dass die hCD2-Kassette und damit auch das Slfn1-Transgen in den NKT-Zellen exprimiert ist und deren Entwicklung nachhaltig beeinflusst wird. Der signifikant geringere relative Anteil von $CD4^+NK1.1^+$ -NKT-Zellen in der Leber von Slfn1-transgenen Mäusen bestätigten diese Vermutung.

Die durchgeführten Infektionsstudien mit Listerien (*Listeria monocytogenes*) in den Slfn1-transgenen Mäusen zeigten jedoch, dass der Verlust der $CD4^+NK1.1^+$ -NKT-Zellen in der Leber keinen negativen Effekt auf den Infektionsverlauf hatte. Im Gegenteil, die Verminderung dieser Zellpopulation führten zur wesentlich effizienteren Neutralisierung der Listerien Bakterien in der Leber. Die bakterielle Belastung war in der Leber der Slfn1-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Lebern der Wildtypkontrolltieren signifikant niedriger. Eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Listerien-Infektion konnte auch in C57BL/6-Mäusen beobachtet werden, die nach Behandlung mit einem anti-NK1.1-Antikörper keine NK- und NKT-Zellen mehr hatten (Teixeira et al., 1994).

6.3.4 Die Rolle von Slfn4 in der Zellzykluskontrolle und in der T-Zellentwicklung

Über die Bedeutung des Slfn4-Proteins in der Regulation des Zellzyklusses und in der T-Zellontogenie ist bisher wenig bekannt und auch die durchgeführten ex vivo und in vitro Analysen geben keinen Hinweis über die funktionelle Signifikanz dieses Mitglieds der Slfn-Protein-Familie. Endogen ist Slfn4 zunehmend in unreifen DN-Thymozyten (DN1- und DN2-Thymozytenstadium) exprimiert und im Vergleich zu Slfn1 nimmt die Slfn4-Expression in unreifen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Thymozyten und in den ruhenden peripheren T-Zellen deutlich ab. Die zunehmende Expression von Slfn4 in aktivierten T-Zellen lässt eine Wachstumsfördernde Aktivität vermuten. Eine ektopische Slfn4-Expression in NIH3T3 Fibroblasten hat jedoch weder einen negativen noch einen positiven Effekt auf das zelluläre Wachstum. Dementsprechend ist eine Beteiligung von Slfn4 an der Zellzyklusregulation nicht offensichtlich. Die durch den CD2-Promotor kontrollierte transgene Slfn4-Expression hat keine Auswirkungen auf die intrathymische T-Zellentwicklung und -differenzierung. Die Zellularität im Thymus der Slfn1-transgenen Mäuse und im Thymus der Wildtypiere sind nicht signifikant verschieden. Die konstitutive transgene Slfn4-Expression hat in den Phasen der intrathymischen T-Zellentwicklung, wo das endogene Slfn4-Protein nicht exprimiert ist, demzufolge scheinbar keinen Einfluss auf das proliferative Verhalten der Thymozyten. Die proliferative Kapazität der peripheren Lymphknoten-T-Zellen ist nach TZR-vermittelter Stimulation im Vergleich zu den T-Zellen der Wildtypkontrolle deutlich geringer. Ob das

transgene Slfn4-Protein durch Interaktion mit Komponenten der Zellzykluskontrolle die T-Zellproliferation vermindert, muss durch weiterführende Analysen geklärt werden.