

# **Untersuchungen zur reversen Signalübertragung von CD137 in monozytären Zellen**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND  
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Liane Söllner  
aus Batzhausen

2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.10.2001

Promotionskolloquium am: 28.01.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von:  
PD Dr. Charalampos Aslanidis (fakultätsintern)  
PD Dr. Herbert Schwarz

Prüfungsausschuß:  
Vorsitzender: Prof. Dr. Armin Kurtz  
1. Gutachter: PD Dr. Charalampos Aslanidis  
2. Gutachter: PD Dr. Herbert Schwarz  
3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Wirth

# Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis** \_\_\_\_\_ **V**

<b>1 Einleitung</b> _____	<b>1</b>
<b>1.1 TNF Rezeptorfamilie</b> _____	<b>1</b>
<b>1.2 CD137 (4-1BB/ILA)</b> _____	<b>6</b>
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b> _____	<b>13</b>
<b>2 Material und Methoden</b> _____	<b>14</b>
<b>2.1 Material</b> _____	<b>14</b>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien _____	14
2.1.2 Inhibitoren _____	15
2.1.3 Kits _____	17
2.1.4 Antikörper _____	17
2.1.5 Sonstige Immunglobuline _____	18
2.1.6 Enzyme _____	18
2.1.7 Molekulargewichtsstandards _____	18
2.1.8 Sonstiges Material _____	18
2.1.9 Organismen _____	19
2.1.10 Vektoren _____	19
2.1.11 Desoxyoligonukleotide _____	20
2.1.12 Medien, Puffer und Lösungen _____	20
2.1.13 Geräte _____	27
<b>2.2 Methoden</b> _____	<b>29</b>
2.2.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> _____	29
2.2.1.1 Kultivierung und Erhaltung von <i>E. coli</i> _____	29
2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen _____	29
2.2.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> mit doppelsträngiger Plasmid-DNA _____	29
2.2.2 Arbeiten mit Sägerzellen _____	30
2.2.2.1 Kultivierung von Sägerzellen _____	30
2.2.2.2 Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Säger-Zelllinien _____	30

2.2.2.3	Isolierung von humanen Monozyten durch Elutriation	30
2.2.2.4	Isolation von Peritonealexsudatzellen (PEZ) aus der Maus	31
2.2.2.5	Bestimmung der Zellzahl	31
2.2.2.6	Test auf Lebensfähigkeit von Zellen	31
2.2.2.6.1	Trypanblaufärbung	31
2.2.2.6.2	MTT-Test	31
2.2.2.7	<i>In vitro</i> Stimulation von Zellen	32
2.2.2.7.1	Beschichten von Gewebekulturschalen mit Protein	32
2.2.2.7.2	Induktion von Zytokinfreisetzung und Adhärenz	32
2.2.2.7.3	Hemmung von Zytokinfreisetzung und Adhärenz	32
2.2.2.7.4	Induktion und Hemmung von Proteinphosphorylierung	33
2.2.2.7.5	Induktion von Genexpression	33
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.3.1	Arbeiten mit RNA	33
2.2.3.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	33
2.2.3.1.2	Reinigung von RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion	34
2.2.3.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.2.3.1.4	Gelelektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen	35
2.2.3.1.5	Reverse Transkriptase (RT)-Polymerasenkettenreaktion (PCR)	36
2.2.3.2	Arbeiten mit DNA	37
2.2.3.2.1	Polymerasenkettenreaktion (PCR)	37
2.2.3.2.2	Gelelektrophorese von DNA	38
2.2.3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	38
2.2.3.2.4	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	39
2.2.3.2.5	Sequenzierung von DNA	39
2.2.3.3	cDNA-Arraytechnologie	39
2.2.3.3.1	Präparation der RNA	41
2.2.3.3.2	Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden	41
2.2.3.3.3	Hybridisierung der Arrays	42
2.2.3.3.4	Auswertung der Arrays	42
2.2.4	Proteinchemische Methoden	43
2.2.4.1	Herstellung von Zytoplasmaextrakten	43
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44

---

2.2.4.4	Western Blot	45
2.2.4.5	Proteinnachweis auf Western Blots	45
2.2.4.6	Coomassie-Färbung von Proteinen	46
2.2.4.7	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>CD137-induzierte reverse Signalübertragung in Peritonealexudatzellen aus der Maus und humanen THP-1 Zellen</b>	<b>48</b>
3.1.1	CD137-induzierte morphologische Veränderungen und Verstärkung der Adhärenz	48
3.1.2	CD137-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	50
<b>3.2</b>	<b>Induktion von Tyrosinphosphorylierung durch CD137 in monozytären Zellen</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Beteiligung von src-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>53</b>
3.3.1	Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Synthese durch PP1	53
3.3.2	Hemmung der CD137-induzierten morphologischen Veränderungen und Adhärenz durch PP1	55
<b>3.4</b>	<b>Beteiligung der p38 MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>56</b>
3.4.1	CD137-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK	56
3.4.2	Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung durch SB203580	58
<b>3.5</b>	<b>Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2 an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>59</b>
3.5.1	CD137-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2	59
3.5.2	Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Sekretion durch PD98059	61
3.5.3	Hemmung der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch PD98059	62
<b>3.6</b>	<b>Beteiligung von Phosphoinositid 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion in monozytären Zellen</b>	<b>64</b>
3.6.1	Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung durch Wortmannin	64
3.6.2	Hemmung der CD137-induzierten morphologischen Veränderungen und Adhärenz durch Wortmannin	66
3.6.3	Hemmung der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch Wortmannin	67

<b>3.7</b>	<b>Proteinkinase C ist nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt</b>	<b>69</b>
<b>3.8</b>	<b>Hemmung der CD137-induzierten reversen Signalübertragung durch Proteinkinase A</b>	<b>71</b>
<b>3.9</b>	<b>Analyse der CD137 regulierten Genexpression in monozytären Zellen mit Hilfe der cDNA-Arraytechnologie</b>	<b>72</b>
<b>3.10</b>	<b>Expression der CD137 Ligand-mRNA in monozytären Zellen</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>CD137-induzierte reverse Signalübertragung in PEZ aus der Maus und THP-1 Zellen</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Beteiligung von src-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Beteiligung von MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>80</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Beteiligung der p38 MAPK</b>	<b>80</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>Beteiligung von PI 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>Proteinkinase C ist nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt</b>	<b>88</b>
<b>4.6</b>	<b>Hemmung der CD137-induzierten reversen Signalübertragung durch PKA</b>	<b>90</b>
<b>4.7</b>	<b>Analyse der CD137 regulierten Genexpression in monozytären Zellen mit Hilfe der cDNA-Arraytechnologie</b>	<b>91</b>
<b>4.8</b>	<b>CD137 Ligand</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat]
AICD	aktivierungsabhängiger Zelltod
AP-1	<i>activator protein-1</i>
aPKC	atypische PKC
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchromsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-2', 3'-Monophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHO Zellen	<i>Chinese hamster ovary</i> Zellen
Ci	Curie
cPKC	klassische PKC
cpm	<i>counts per minute</i>
DAG	Diazylglyzerin
dATP	Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5-triphosphat
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidin-5-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	<i>Epstein-Barr</i> Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethyldiamin-N, N, N', N'-Tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FKS	fötales Kälberserum
G3PDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])

HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILA	<i>induced by lymphocyte activation</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
MacMARCKS	<i>macrophage-enriched myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTT	(3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK1.1	Oberflächenmarker auf natürlichen Killerzellen einiger Mausstämme
nPKC	neue PKC
OD	optische Dichte
p110	katalytischen Untereinheit der Klasse I <sub>A</sub> PI 3-Kinase
p85	regulatorische Untereinheit der Klasse I <sub>A</sub> PI 3-Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBS-T	Phosphat gepufferte Saline mit 0,05 % (v/v) Tween20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
PDK-1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PEZ	Peritonealexsudatzellen
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Phosphoinositid

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	<i>polymorph nuclear cells</i>
PP1	[4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-( <i>t</i> -butyl) pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin]
PtdIns	Phosphatidylinositol
PVDF	Polyvinyldifluorid
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-cAMPS	zyklisches Adenosin-3` , 5` -Monophosphothioat, Rp-Isomer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RZPD	Ressourcen Zentrum Primärdatenbank
SAC	Suspension von Membranfragmenten formalinfixierter <i>Staphylococcus aureus</i> Bakterien des Stammes Cowan I
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SB203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl) <i>1H</i> -imidazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N` , N`-Tetramethylethylenediamin
Th1-Zellen	Subpopulation der T-Helferzellen
Thr	Threonin
TMB	3, 3` , 5, 5`-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume per volume</i>
VDAC1	<i>voltage-dependent anion channel 1</i>
w/v	<i>weight per volume</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 TNF Rezeptorfamilie

Zytokinrezeptoren lassen sich aufgrund struktureller Homologien in ihren extrazellulären, zytokin/ligandbindenden Domänen in vier Familien – die Interleukinrezeptorfamilie, die Interferonrezeptoren, die TNF Rezeptorfamilie und die Immunglobulinsuperfamilie – untergliedern (Miyajima et al., 1992).

Die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptorfamilie sind glykosylierte Typ-I Transmembranproteine, die in ihren extrazellulären Teilen drei bis sechs Cystein-reiche Domänen von ungefähr 40 Aminosäuren enthalten. Charakteristisch für diese Domänen sind drei Disulfidbrücken, welche durch sechs konservierte Cysteinreste gebildet werden und den Rezeptorketten eine längliche Form verleihen (Mallet & Barclay, 1991; Smith et al., 1994; Armitage, 1994; Lotz et al., 1996; Locksley et al., 2001).

Die Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie werden im wesentlichen von Zellen des Immunsystems exprimiert. Mitglieder dieser Familie finden sich jedoch auch außerhalb des Immunsystems. So z.B. konnten die TNF Rezeptoren I und II in unterschiedlichem Maße auf fast allen Zellarten mit Ausnahme von Erythrozyten nachgewiesen werden (Armitage, 1994; Gruss & Dower, 1995).

Die Liganden für diese Rezeptoren bilden ebenfalls eine eigene Familie, welche als TNF Familie bezeichnet wird. Fast alle Mitglieder dieser Familie werden als glykosylierte Typ-II Transmembranproteine synthetisiert. Lymphotoxin ( $\text{LT}\alpha$ ) ist der einzige bisher bekannte Vertreter, der als sekretorisches Protein gebildet wird. Weitere lösliche Formen, wie die lösliche Form von TNF oder des CD (*cluster of differentiation*) 95 Liganden (Fas Liganden), gehen durch proteolytische Spaltung mittels Metalloproteininasen aus dem jeweiligen membranständigen Protein hervor. Mit Ausnahme von  $\text{LT}\beta$ , welches Heterotrimere mit  $\text{LT}\alpha$  ausbildet, kommen die Mitglieder der TNF Familie als Homotrimere vor, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden. Die monomeren Bestandteile dieser Komplexe bilden ein sog. *jelly-roll*-Sandwichmotiv aus  $\beta$ -Strängen aus (Gruss & Dower, 1995; Lotz et al., 1996; Wallach et al., 1999; Locksley et al., 2001). Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die Mitglieder der TNF Rezeptor- und Ligandfamilien.

Rezeptor	Liganden
TNF Rezeptor I (TNFR1, CD120a, p55-R)	TNF (Cachectin), LT $\alpha_3$ , LT $\alpha_2\beta_1$
TNF Rezeptor II (TNFR2, CD120b, p75)	TNF (Cachectin), LT $\alpha_3$ , LT $\alpha_2\beta_1$
LT $\beta$ Rezeptor (LT $\beta$ R, CD18)	LT $\alpha_1\beta_2$ , LIGHT (HVEM-L), LT $\gamma$
HveA (HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR)	LT $\alpha_3$ , LIGHT (HVEM-L)
CD27 (Tp55, S152)	CD27L (CD70)
CD30 (Ki-1)	CD30L (CD153)
CD40 (p50, Bp50)	CD40L (TRAP, CD154, gp39)
OX40 (CD134)	OX40L (gp34)
CD137 (4-1BB, ILA)	CD137L, 4-1BBL
RANK (TRANCE-R)	RANKL (TRANCE, OPGL, ODF)
OPG (OCIF, TR1)	RANKL (TRANCE, OPGL, ODF), TRAIL (Apo-2L, TL2) ?
CD95 (Fas, APO-1, APT1)	CD95L (FasL, APT1LG1)
DR3 (TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3)	TWEAK (DR3L, APO3L) ?
DR4 (Apo2, TRAILR-1)	TRAIL (Apo-2L, TL2)
DR5 (KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB)	TRAIL (Apo-2L, TL2)
DR6 (TR7)	?
DcR1 (TRAILR3, LIT, TRID)	TRAIL (Apo-2L, TL2)
DcR2 (TRUNDD, TRAILR4)	TRAIL (Apo-2L, TL2)
DcR3	CD95L (FasL, APT1LG1), LIGHT (HVEM-L)
p75 NGFR	NGF ( <i>nerve growth factor</i> )
Troy (Taj)	?
EDAR	EDA-A1
XEDAR (EDA-A2R)	EDA-A2
AITR (GITR)	AITRL (TL6, hGITRL)
TACI (CAML interactor)	APRIL, BLYS (BAFF, THANK, TALL1)
BCMA (BCM)	APRIL, BLYS (BAFF, THANK, TALL1)
RELT	?
?	VEGI (TL1)

**Tab. 1.1: Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie und ihre Liganden** (vervollständigt nach Locksley et al., 2001). Synonyme sind in Klammern dargestellt.

Aufgrund kristallographischer Daten (Banner et al., 1993) wurde lange Zeit angenommen, daß eine Signalübertragung durch Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie durch die Ligand-vermittelte Trimerisierung der monomeren Rezeptorketten ausgelöst wird. Neuere Untersuchungen an TNF Rezeptor I und II sowie an CD95, CD40 und DR4 zeigen jedoch, daß diese Rezeptoren auch in Abwesenheit eines Liganden bereits als oligomerer, möglicherweise trimerer, Komplex auf der Oberfläche der Zelle vorliegen. Vermittelt wird die Ausbildung dieser Komplexe durch eine extrazelluläre, N-terminale Domäne, die als PLAD (*pre-ligand assembly domain*) bezeichnet wird und von der Ligand-Bindungsdomäne verschieden ist. Diese Domäne ist rezeptorspezifisch und ermöglicht somit nur die Ausbildung von homotypischen, nicht jedoch von gemischten Komplexen. Die PLAD-vermittelte Komplexbildung scheint Voraussetzung für eine wirkungsvolle Bindung des Liganden zu sein. Die Auslösung einer Signalkaskade erfolgt dann möglicherweise durch eine Ligand-vermittelte Konformationsänderung und eine damit verbundene engere Zusammenlagerung der zytoplasmatischen Domänen der Rezeptorketten bzw. durch Multimerisierung von bereits bestehenden Rezeptorkomplexen (Papoff et al., 1999; Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000).

TNF Rezeptoren lassen sich anhand ihrer zytoplasmatischen Domänen in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe, zu der TNF Rezeptor I, CD95, DR4 sowie DR5 und DR6 gehören, enthält in ihrem zytoplasmatischen Teil eine sog. *death domain* (DD). Nach Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zur Ausbildung homophiler Wechselwirkungen zwischen den DDs der Rezeptoren und den DDs von zytoplasmatischen Adaptorproteinen. So bindet der TNF Rezeptor I über seine DD an TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) und CD95 tritt in Wechselwirkung mit FADD (*Fas-associated death domain*). FADD wiederum bindet über seine N-terminale *death effector domain* (DED) an die DEDs von Caspase-8/FLICE bzw. Caspase-10/FLICE2, wodurch schließlich die apoptotische Kaskade proteolytischer Spaltungen in Gang gesetzt wird. Auch die Aktivierung des TNF Rezeptors I kann über die Rekrutierung von FADD an TRADD Apoptose (programmierten Zelltod) auslösen. Über Wechselwirkung von TRADD mit TRAF (*TNF receptor-associated factor*) 2 und RIP (*receptor-interacting protein*) kann jedoch auch Genexpression induziert werden.

Eine zweite Gruppe, der die meisten Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie angehören, besitzt keine DDs. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Rekrutierung von TRAFs. Bislang sind sechs verschiedene TRAFs beschrieben, denen u.a. eine C-terminale TRAF-Domäne gemein ist. Momentan am besten untersucht ist TRAF 2, für welches nicht nur Wechselwirkungen mit einer Reihe von TNF Rezeptoren ohne DD, wie z.B. TNF Rezeptor II, CD27, CD30, CD40, Ox40 oder CD137, sondern auch mit intrazellulären Proteinen, wie z. B. mit anti-apoptotischen Faktoren, wie den cIAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*)-1 und -2, mit Mitgliedern der MAPK (mitogenaktivierten

Proteinkinase) Familie oder mit Proteinen, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor kappa B*) steuern, nachgewiesen werden konnten (Überblick bei Wajant & Scheurich, 2001; Locksley et al., 2001).

Die Mitglieder der TNF Rezeptor- und Ligandfamilien vermitteln ein breites Spektrum an immunregulatorischen Funktionen. So haben einige Vertreter dieser Familien einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung und Struktur lymphoider Organe und die Ausbildung des erworbenen Immunsystems, wobei hier dem LT $\alpha$ , dem LT $\beta$  (LT $\alpha_1\beta_2$ ) bzw. dem LT $\beta$  Rezeptor (DeTogni et al., 1994; Futterer et al., 1998; Koni et al., 1997; Endres et al., 1999; Fu & Chaplin, 1999) sowie TNF bzw. dem TNF Rezeptor I (Pasparakis et al., 1996; Le Hir et al., 1996) und RANK (*receptor activator of NF-κB*) bzw. dem RANK Ligand (Dougall et al., 1999; Kong et al., 1999; Kim et al., 2000) eine besondere Bedeutung zukommt.

Durch Untersuchungen an TNF- bzw. TNF Rezeptor-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung zwischen TNF und den TNF Rezeptoren I und II nach lokaler Freisetzung des Zytokins eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller und viraler Infektionen spielt (Pasparakis et al., 1996; Rothe et al., 1993; Pfeffer et al., 1993; Ruby et al., 1997). Auch bietet das Fehlen des TNF Rezeptors I Schutz in Schockmodellen, wie Experimente mit TNF Rezeptor I-defizienten Mäusen zeigten. (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993).

Eine Schlüsselrolle bei der T-Zell abhängigen B-Zellantwort kommt CD40 zu. Dies konnte sowohl an Patienten mit Hyper-IgM (Immunglobulin M)-Syndrom, die Mutationen im CD40 Liganden aufweisen, als auch an Mäusen mit inaktiviertem CD40 oder CD40 Ligand gezeigt werden (Noelle et al., 1992; Banchereau et al., 1994; Allen et al., 1993; Aruffo et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Fuleihan et al., 1993; Korthäuer et al., 1993; Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994; van Kooten und Banchereau, 1996).

Die Vernetzung von CD95 auf der Oberfläche von Zellen führt zur Induktion von Apoptose, was diesen Rezeptor zu einem wichtigen Mediator der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität macht. Auch spielt CD95 in Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Homöostase und Toleranz, wie man aus der Auswirkung von Mutationen in den Genen von CD95 oder CD95 Ligand ersehen kann. Solche Mutationen sind die Ursache für den lymphoproliferativen (*lpr*) Phänotyp in der Maus und ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) im Menschen (Sneller et al., 1992; Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Dhein et al., 1995; Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995; Lenardo et al., 1999)

Für die TNF und NGF Rezeptoren, so wie für CD27, CD30, CD95 und CD137 wurden lösliche Formen nachgewiesen (Kohno et al., 1990; Zupan et al., 1989; Hintzen et al., 1991; Pizzolo et al., 1990; Cheng et al., 1994; Cascino et al., 1995; Setareh et al., 1995; Michel et al., 1998). Diese werden entweder, wie im Falle von TNF Rezeptor I, TNF Rezeptor II, CD27, CD30, CD40 und CD95, durch proteolytische Spaltung der Membranform über Metalloproteininasen (zusammengefaßt in Gruss & Dower, 1995) oder, wie im Falle von CD137 und CD95, durch alternatives *splicing* (Goodwin et al., 1993; Cheng et al., 1994; Cascino et al., 1995; Setareh et al., 1995; Michel et al., 1998) gebildet. Für mehrere lösliche Rezeptoren wurde eine antagonistische Wirkung durch Neutralisierung der Ligandmoleküle beschrieben (Bertini et al., 1993; Cascino et al., 1996). So konnte für lösliches CD95 eine dosisabhängige Hemmung der durch membranständiges CD95 induzierten Apoptose *in vitro* gezeigt werden (Cascino et al., 1995).

Für mehrere Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie, wie CD40 (Cayabyab et al., 1994; van Essen et al., 1995; Blair et al., 2000), CD30 (Wiley et al., 1996), CD27 (Lens et al., 1999), CD95 (Suzuki & Fink, 1998; 2000), OX40 (Stüber et al., 1995) und CD137 (Langstein et al., 1998) gibt es Hinweise auf eine bidirektionelle Signalübertragung. Demzufolge senden nicht nur die Rezeptoren, sondern auch die ebenfalls membranständigen Liganden ein Signal in die Zelle, auf der sie exprimiert werden.

So konnte gezeigt werden, daß die reverse Signaltransduktion durch den CD40 Liganden bei verschiedenen immunologischen Prozessen, wie Zytokinproduktion, Kostimulation von T-Zellen und der Ausbildung von Keimzentren eine Rolle spielt (van Essen et al., 1995).

Die Vernetzung des OX40 Liganden auf aktivierten B-Lymphozyten aus Mausmilzen führt zu einer Steigerung der Proliferation und der Immunglobulinsynthese dieser Zellen (Stüber et al., 1995).

In neutrophilen Granulozyten wird durch Vernetzung des CD30 Liganden über einen monoklonalen Antikörper oder ein CD30-Fc Fusionsprotein die Synthese von Interleukin (IL)-8 angeregt. Außerdem übermittelt der CD30 Ligand ein kostimulatorisches Signal an T-Lymphozyten (Wiley et al., 1996).

Auch konnte gezeigt werden, daß die reverse Signalübertragung durch den CD27 Liganden (CD70) in einer B-Zellsubpopulation Proliferation induziert. Dieser Effekt kann durch Vernetzung von CD40 gesteigert werden, während er durch IL-4 gehemmt wird (Lens et al., 1999).

Zytotoxische T-Lymphozyten brauchen, um optimal proliferieren zu können, ein kostimulatorisches Signal durch den CD95 Liganden (Suzuki und Fink, 1998; 2000).

Schließlich führt die Vernetzung des RANK Liganden über ein RANK-Fc Fusionsprotein zu einer verstärkten Freisetzung von IFN (Interferon)- $\gamma$  aus aktivierten, nicht jedoch aus ruhenden CD4 $^{+}$  T-Zellen aus der Maus. Dabei kommt es zu einer Aktivierung der p38 MAPK (Chen et al., 2001).

## 1.2 CD137 (4-1BB/ILA)

Das humane Gen *induced by lymphocyte activation* (ILA) und das homologe 4-1BB aus der Maus wurden bei der Suche nach induzierbaren Rezeptoren auf aktivierten T-Lymphozyten entdeckt (Kwon et al., 1987; Kwon & Weissman, 1989; Schwarz et al., 1993; Alderson et al., 1994). 1996 wurden sie unter der Bezeichnung CD137 zusammengefaßt (Kishimoto et al., 1996).

In der Maus ist das Gen für CD137 auf Chromosom 4 lokalisiert. Es umfaßt etwa 13 kb und setzt sich aus 10 Exonen und neun Introns zusammen. Die ersten beiden Exone kodieren für zwei 5'-nicht-translatierte Regionen (UTR), welche abwechselnd transkribiert werden. Die letzten acht Exone kodieren für das CD137 Protein (Kwon & Weissman, 1989; Kwon et al., 1994). Das humane Gen befindet sich auf Chromosom 1p36 in der Nachbarschaft mehrerer Gene, die für andere Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie kodieren. Mutationen in diesem Bereich stehen in Zusammenhang mit mehreren malignen Erkrankungen (Schwarz et al., 1997).

Sowohl das humane CD137 als auch das homologe Protein aus der Maus ist, wie die anderen Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie, ein Typ-I Transmembranprotein. Das humane Protein besteht aus 255, das Homologe aus der Maus aus 256 Aminosäuren, wobei die Aminosäuresequenzen zu 60 % identisch sind (Vinay & Kwon, 1998). Das Molekulargewicht errechnet sich für humanes CD137 zu 28 kDa, für das Homologe aus der Maus zu 25 kDa. Tatsächlich beträgt es jedoch für das humane Protein 35 kDa und für das Homologe aus der Maus 30 kDa. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf posttranskriptionale Glykosylierung zurückzuführen (Pollok et al., 1993; Schwarz et al., 1993; Vinay & Kwon, 1998). So enthält humanes CD137 in seiner extrazellulären Domäne zwei Stellen für N-Glykosylierung (Schwarz et al., 1993), das Homologe aus der Maus hingegen mehrere potentielle Stellen für O-Glykosylierung (Pollok et al., 1993). Außerdem enthält die Ligand-Bindungsdomäne des humanen Proteins drei, die des Homologen aus der Maus vier der für die Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie typischen Cystein-reichen Sequenzen (Schwarz et al., 1993; Kwon et al., 1994). In der zytoplasmatischen Domäne finden sich fünf Sequenzmotive, darunter eine potentielle Ick-Bindungsdomäne und zwei saure Aminosäuresequenzen, die zwischen Mensch und Maus konserviert sind. (Vinay & Kwon, 1998). Pollok et al. (1993) konnten zeigen, daß das CD137

Protein aus der Maus sowohl als Monomer als auch als Dimer mit einem Molekulargewicht von 55 kDa auf der Oberfläche von T-Zellen vorliegt.

In der Maus konnten zwei verschiedene mRNA-Isoformen für CD137 mit 1,5 kb und 2,4 kb nachgewiesen werden. Die kleinere Form stellt dabei eine *splice*-Variante dar, die durch Deletion von Exon 8 entsteht und daher keinen kodierenden Bereich für eine Transmembrandomäne enthält. Auch für humanes CD137 wurden mehrere mRNA-Isoformen beschrieben. So konnten in aktivierte T-Zellen drei *splice*-Formen mit 4,4 kb, 4,0 kb und 1,8 kb nachgewiesen werden. Ähnlich wie für Maus-CD137 wurden auch für das humane Homologe *splice*-Varianten gefunden, die nicht für eine Transmembrandomäne kodieren. Lösliches CD137 kommt verstärkt in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis vor (Michel et al., 1998). Auch korreliert die Menge an löslichem CD137 mit dem aktivierungsabhängigen Zelltod (AICD) in T-Lymphozyten (Michel & Schwarz, 2000). In Chondrozyten findet man drei weitere mRNA-Isoformen mit 3,2 kb, 1,5 kb und 1,2 kb (Schwarz et al., 1995).

In der Maus konnte die Expression von CD137 in T-Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin oder mit immobilisiertem anti-CD3 sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Kwon et al., 1989; Pollok et al., 1993). Bei Aktivierung mit anti-CD3 ist die mRNA dabei nach 3 h detektierbar (Kwon et al., 1987). Auf der Zelloberfläche kann der Rezeptor nach mehreren Stunden nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins steigt langsam an und erreicht nach etwa 60 h ein Maximum (Pollok et al., 1993). Sie hängt von der Dichte der Zellen ab und kann bei niedriger Zellkonzentration durch Zugabe von IL-2, IL-4 oder löslichem CD28 gesteigert werden (Pollok et al., 1995). Außer auf aktivierten T-Zellen wurde CD137 auch auf der Oberfläche von aktivierte NK1.1 Zellen aus der Maus nachgewiesen. Daneben konnte die mRNA für CD137 auch in Makrophagen, 3T3 Fibroblasten und Epithelzellen (Setareh et al., 1995) sowie in Mikroglia-Zellen (Pauly, 2000) detektiert werden.

Auch humanes CD137 wird aktivierungsabhängig von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert. Auf T-Lymphozyten kann CD137 ebenfalls durch anti-CD3 sowie Phytohämagglutinin (PHA) und PMA induziert werden. In Monozyten wird die Expression von CD137 durch Lipopolysaccharid (LPS), IL-1 $\beta$  und PMA stimuliert. B-Lymphozyten schließlich exprimieren CD137 nach Stimulation mit anti-Ig Antikörpern oder PMA, wohingegen EBV (*Epstein-Barr* Virus)-transformierte B-Zelllinien konstitutiv CD137 mRNA synthetisieren (Schwarz et al., 1995). Auch konnte CD137 immunhistochemisch auf follikulären dendritischen Zellen (FDC) nachgewiesen werden (Pauly, 2000). In Mikroglia-Zellen schließlich konnte für die mRNA konstitutive und für das Protein aktivierungsabhängige Expression gezeigt werden (Pauly, 2000). Daneben wurde Ex-

pression von humanem CD137 auch für Zellen außerhalb des Immunsystems beschrieben. So konnte die mRNA für CD137 in Epithel- und Hepatomzellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  detektiert werden (Schwarz et al., 1995). In immunhistochemischen Untersuchungen konnte CD137 Protein vergleichsweise häufig in den Blutgefäßen maligner Tumoren nachgewiesen werden. Das Protein wird dabei meist sowohl auf den Endothelzellen als auch auf der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert, wohingegen in benignen Tumoren CD137-positive Gefäße nur vereinzelt detektiert werden (Broll et al., 2001). Auch in Schnitten von entzündlichem Gewebe konnten CD137-positive Gefäße detektiert werden und in den Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskulatur kann die mRNA für den Rezeptor durch proinflammatorische Zytokine induziert werden (Becke et al., eingereicht). Boussaud et al. (1998) konnten CD137 Protein auf den Endothelzellen der Lungenkapillaren, nicht jedoch auf alveolaren Makrophagen nachweisen. In Chondrozyten schließlich wird die Expression von CD137 Protein durch IL-1 $\beta$ , TNF, LIF, IFN- $\gamma$  und LPS stimuliert (von Kempis et al., 1997).

Sowohl für die zytoplasmatische Domäne des humanen CD137 als auch für die des Homologen aus der Maus konnte Wechselwirkung mit TRAF 1 und 2 nachgewiesen werden (Arch & Thompson, 1998; Jang et al., 1998; Saoulli et al., 1998). Die zytoplasmatische Domäne des humanen Rezeptors bindet außerdem an TRAF 3 (Jang et al., 1998). Diese Wechselwirkungen werden durch konservierte saure Regionen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CD137 vermittelt (Arch & Thompson, 1998; Jang et al., 1998). Die Vernetzung von CD137 führt außerdem zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welche durch eine dominant-negative Form von TRAF 2 und der NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK) gehemmt werden kann (Arch & Thompson, 1998; Jang et al., 1998). Cannons et al. (1999; 2000) und Kim et al. (2000) konnten weiter zeigen, daß Vernetzung von CD137 in Mauszellen zur Rekrutierung der *apoptosis-signal-regulating kinase 1* (ASK1) durch TRAF 2 führt. Dies hat die Aktivierung der *c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinases* (JNK/SAPK) bzw. der p38 MAPK zur Folge (Cannons et al., 1999; 2000; Kim et al., 2000). Schließlich konnte für das CD137 Protein aus der Maus Wechselwirkung mit der T-Zell-spezifischen Proteintyrosinkinase p56<sup>lck1</sup> nachgewiesen werden. Die Bindung dieser Kinase wird durch die Konsensussequenz (Cys-Arg-Cys-Pro) in der intrazellulären Domäne von CD137 vermittelt (Kim et al., 1993).

Sowohl für das humane CD137 als auch für das Homologe aus der Maus ist ein Ligand beschrieben (Goodwin et al., 1993; Pollok et al., 1994; Alderson et al., 1994). Bei beiden Molekülen handelt es sich um Typ-II Transmembranproteine, welche Homologien zu Mitgliedern der TNF Familie aufweisen. Während man jedoch bei anderen Mitgliedern dieser Familie zwischen verschiedenen Arten Homologien von 70 – 80 % findet (Gruss & Dower, 1995), weisen der humane CD137 Ligand,

welcher 254 Aminosäuren umfaßt (Alderson et al., 1994), und der Ligand aus der Maus, der aus 309 Aminosäuren besteht (Goodwin et al., 1993), auf Aminosäureebene nur 36 % Identität auf (Alderson et al., 1994). So enthält der humane Ligand eine Domäne mit mehreren Serin- und Prolinresten für eine potentielle O-Glykosylierung, jedoch keine N-Glykosylierungsstellen (Alderson et al., 1994). Die extrazelluläre Domäne des CD137 Liganden aus der Maus dagegen weist neben einem Bereich mit einer hohen Dichte an Serin-, Threonin- und Prolinresten, der auf eine mögliche O-Glykosylierung hindeutet, drei potentielle Stellen für N-Glykosylierung auf. Aus der Aminosäuresequenz errechnet sich für den CD137 Liganden aus der Maus ein Molekulargewicht von 34 kDa. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) Analysen unter reduzierenden Bedingungen ergaben jedoch ein tatsächliches Molekulargewich von etwa 50 kDa, was darauf schließen läßt, daß das Protein an mindestens einer dieser Stellen glykosyliert ist. Das Molekulargewicht von etwa 97 kDa, das sich aus SDS-PAGE Analysen unter nichtreduzierenden Bedingungen ergibt, deutet außerdem darauf hin, daß dieser Ligand auf der Zelloberfläche als Homodimer vorliegt, dessen Monomere über Disulfidbrücken verknüpft sind (Goodwin et al., 1993). Das Gen für den humanen Liganden liegt auf Chromosom 19p3.3, dasjenige für den CD137 Liganden aus der Maus ist auf Chromosom 17 lokalisiert (Goodwin et al., 1993; Alderson et al., 1994). Für das CD137 Protein aus der Maus konnte zusätzlich Wechselwirkung mit extrazellulären Matrixproteinen, v.a. Fibronectin und Laminin, nachgewiesen werden (Chalupny et al., 1992; Loo et al., 1997).

Die mRNA für den Liganden aus der Maus konnte in aktivierten, nicht jedoch in unstimulierten T-Zellen, in LPS-aktivierten Knochenmarks-Makrophagen, in der Zelllinie F4, die vom Stroma des Thymus stammt, sowie in der prä-B-Zelllinie Abl1.1, nicht jedoch in reifen B-Zellen, die mit LPS und Dextran stimuliert worden waren, nachgewiesen werden (Goodwin et al., 1993). Die Expression von humanem CD137 Ligand konnte auf Ebene der mRNA ebenfalls in aktivierten T-Zellen, in der monozytären Zelllinie THP-1 und in der Zelllinie MO-7E sowie in der EBV-transformierten B-Zelllinie MP-1 gezeigt werden (Alderson et al., 1994). Auch konnte die mRNA für den Liganden in ruhenden, primären B-Zellen detektiert werden (Pauly, 2000). Daneben findet sich mRNA für den CD137 Liganden im Gehirn, in der Plazenta, in der Lunge, im Skelettmuskel und in der Niere, wohingegen sie im Herz, in der Leber oder im Pankreas nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar ist (Alderson et al., 1994). Salih et al. (2000) schließlich konnten konstitutive Expression des CD137 Liganden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in verschiedenen Karzinom-Zelllinien und in primären Tumorzellen zeigen.

CD137 ist ein kostimulatorisches Molekül für T-Zellen. Dies geht aus mehreren *in vitro* Experimenten sowohl mit T-Zellen aus der Maus als auch mit humanen T-Zellen hervor. So kann durch

Vernetzung von CD137 über monoklonale Antikörper die anti-CD3-induzierte Proliferation von T-Zellen gesteigert werden (Pollok et al., 1993; Alderson et al., 1994; Schwarz et al., 1996; Vinay & Kwon, 1998). In ähnlicher Weise wird durch Kokultur mit CD137 Ligand-tragenden Zellen die Proliferation von T-Lymphozyten, welche mit einer suboptimalen Konzentration an PHA aktiviert wurden, verstärkt (Goodwin et al., 1993; Alderson et al., 1994; Vinay & Kwon, 1998). Zudem kann durch CD137 Ligand-tragende Zellen zusammen mit löslichem anti-CD3 bzw. durch eine lösliche Form des CD137 Liganden, der mit anti-CD137 koimmobilisiert wurde, die Produktion von IL-2 in ruhenden T-Zellen aus der Maus induziert werden (Hurtado et al., 1995; Saoulli et al., 1998).

Experimente mit Zellen aus CD28-defizienten Mäusen deuten darauf hin, daß die Kostimulation durch CD137 unabhängig von CD28 erfolgt (Chu et al., 1997; DeBenedette et al., 1997; Saoulli et al., 1998; Cannons et al., 2001). Bei einem starken Signal durch den T-Zellrezeptor ist CD137 im Hinblick auf die Kostimulation ruhender T-Lymphozyten ähnlich potent wie CD28. Ist der Stimulus durch den T-Zellrezeptor hingegen schwach, so liefert CD28 ein potenteres Signal an die ruhenden T-Zellen (Saoulli et al., 1998). Einige Daten lassen vermuten, daß CD137 v.a. bei der Aufrechterhaltung einer Immunantwort im Anschluß an ein kostimulatorisches Signal durch CD28 wichtig ist (Vinay & Kwon, 1998). So konnten Hurtado et al. (1997) zeigen, daß monoklonale Antikörper gegen CD137 *in vitro* einen starken, kostimulatorischen Effekt auf voraktivierte T-Lymphozyten aus der Maus ausüben und dem AICD der T-Zellen entgegenwirken. Außerdem ergaben Experimente mit humanen T-Lymphozyten, daß ein durch CD137 übertragenes, kostimulatorisches Signal v.a. dann zu tragen kommt, wenn eine Zelle bereits mehrmals mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert wurde, da die CD28-vermittelte T-Zellaktivierung bei wiederholter Stimulierung rasch nachläßt (Kim et al., 1998). Es gibt jedoch auch verschiedene Hinweise darauf, daß für eine optimale T-Zellantwort sowohl ein kostimulatorisches Signal durch CD28 als auch durch CD137 notwendig ist (Hurtado et al., 1995; Melero et al., 1998 a; Guinn et al., 1999).

Mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, daß CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch CD137 ein stärkeres kostimulatorisches Signal erfahren als CD4<sup>+</sup> T-Zellen. So proliferieren gereinigte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Maus auf ein kostimulatorisches Signal durch CD137 stärker als CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Shuford et al., 1997; Tan et al., 2000a). Diese *in vitro* Daten werden durch die Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen *in vivo* gestützt. So konnte gezeigt werden, daß monoklonale Antikörper gegen CD137 *in vivo* eine Verstärkung der zytotoxischen T-Zellantwort bei der *graft-versus-host-disease* (GVHD) und eine raschere Abstoßung von Herz- und Hauttransplantaten bewirken (Shuford et al., 1997). Damit in Übereinstimmung konnten Tan et al. (2000a) nachweisen, daß bei der Immunantwort gegen Alloantigenen in T-Zellen sowohl CD137 als auch der CD137 Liganden induziert werden,

wobei der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die CD137 exprimieren größer ist als der entsprechende Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch führen monoklonale Antikörper gegen CD137 *in vivo* zu einer deutlichen Verlängerung des Überlebens von Superantigen-aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Takahashi et al., 1999), welche nicht mit einer Erhöhung der bcl-2 Expression verbunden ist (Takahashi et al., 2001). CD137 Ligand-defiziente Mäuse zeigen nach Virusbelastung bzw. Immunisierung mit Viruspeptid eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle verringerte zytotoxische T-Zellantwort (DeBenedette et al., 1999; Tan et al., 1999; 2000b), welche bei gleichzeitigem Fehlen eines Signals durch CD28 weiter reduziert ist (DeBenedette et al., 1999; Tan et al., 2000b).

Andere Untersuchungen deuten dagegen darauf hin, daß CD137 gleichermaßen bei der Stimulierung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle spielt. So konnten Blazar et al. (2001) im Gegensatz zu Shuford et al. (1997) und Tan et al. (2000a) zeigen, daß CD137 in der Maus in annähernd gleichem Maße die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Alloreaktivität reguliert. Aus vergleichenden Untersuchungen von Cannons et al. (2001) geht hervor, daß ein kostimulatorisches Signal durch CD137 Ligand-tragende Zellen sowohl eine Steigerung der Proliferation und Verstärkung der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch eine Erhöhung der Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zell bewirkt. In ähnlicher Weise führen *mixed lymphocyte reactions* (MLRs) mit gereinigten CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Maus und CD137 Ligand-tragenden B-Lymphomzellen sowohl im Falle der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Zytokinproduktion und zur Verlängerung des Überlebens. Das gleiche Ergebnis bezüglich Zytokinexpression lieferten Experimente, in denen die gereinigten T-Zellpopulationen mit immobilisiertem anti-CD3 und ebenfalls immobilisiertem CD137 Ligand stimuliert wurden (Cannons et al., 2001). Schließlich konnte bereits früher gezeigt werden, daß CD137 *in vitro* die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Richtung Th1-Zellen fördert (Kim et al., 1998).

CD137 spielt eine wichtige Rolle bei der Eliminierung auch gering immunogener Tumoren sowie bei der Aufrechterhaltung einer langanhaltenden Tumorimmunität. Dies geht aus Experimenten hervor, in denen Mäuse mit etablierten Tumoren mit monoklonalen Antikörpern gegen CD137 behandelt wurden (Melero et al., 1997; Kim et al., 2001). Die Wirksamkeit der Antikörper hängt dabei von der Art und Lokalisation der Tumoren ab (Kim et al., 2001). Eine ähnliche antitumorale Wirkung zeigen gentherapeutische Ansätze, in denen das Gen für den CD137 Liganden in Tumorzellen eingeschleust wurde (Melero et al., 1998a; Guinn et al., 1999; Xiang, 1999; Mogi et al., 2000). Für eine optimale Immunantwort gegen die Tumoren ist hierbei jedoch zusätzlich ein kostimulatorisches Signal durch CD28 erforderlich (Melero et al., 1998 a; Guinn et al., 1999). Sowohl die systemische Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen CD137 als auch die Injektion des Gens für den CD137

Liganden in die Tumorzellen erhöhen zudem die Wirksamkeit einer Gentherapie mit IL-12 in Mäusen mit disseminierte Kolonkarzinommetastasen (Chen et al., 2000; Martinet et al., 2000). Vermittelt werden die antitumorale Effekte v.a. durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Wie aus Depletionsstudien *in vivo* hervorgeht, sind auch NK1.1-Zellen an diesem Prozeß beteiligt, vermutlich jedoch nicht als Effektoren der zytotoxischen Antwort (Melero et al., 1998b; Martinet et al., 2000; Chen et al., 2000). Monoklonale Antikörper gegen CD137 übermitteln außerdem ein kostimulatorisches Signal an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Melero et al., 1997; Kim et al., 2001).

Wie für mehrere andere Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie, gibt es auch für CD137 Hinweise auf eine bidirektionelle Signalübertragung. So erhalten anti-μ-aktivierte Milzzellen aus der Maus durch CD137-transfizierte Zellen ein kostimulatorisches Signal für die Proliferation (Pollok et al., 1994). Verschiedene humane Tumor-Zelllinien werden durch Zugabe von löslichem CD137-Fc zur Produktion von IL-8 angeregt (Salih et al., 2000). Dagegen wird die Proliferation von anti-CD3-stimulierten, humanen T-Lymphozyten durch CD137-exprimierende CHO Zellen (*Chinese hamster ovary* Zellen) bzw. immobilisiertes CD137-Fc Fusionsprotein gehemmt. Zudem konnte gezeigt werden, daß die CD137-tragenden CHO Zellen in den T-Zellen Apoptose induzieren (Schwarz et al., 1996). Im Gegensatz dazu erhöht immobilisiertes CD137 die Proliferation und die Immunglobulinsekretion von anti-CD40/IL-4 bzw. SAC-aktivierten humanen B-Zellen (Pauly, 2000). Auch konnte gezeigt werden, daß humane Monozyten durch immobilisiertes CD137 aktiviert werden. So induziert CD137 in diesen Zellen die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF, die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in aktivierte Monozyten wird dagegen reduziert. Auch die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf diesen Zellen wird reguliert. So wird die Expression von ICAM (*intercellular adhesion molecule*, CD54) erhöht, wohingegen die Expression von CD16 (Fcγ-Rezeptor III) verringert wird. Immobilisiertes CD137 fördert außerdem die Adhärenz der Monozyten (Langstein et al., 1998). Auch führt es zu einer Verlängerung des Überlebens dieser Zellen. Dies ist vor allem auf die Induktion von M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und zu einem geringeren Ausmaß von GM-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) und IL-3 zurückzuführen (Langstein & Schwarz, 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, daß immobilisiertes CD137 Protein primäre, humane Monozyten zur Proliferation anregt (Langstein et al., 1999). Schließlich fördert immobilisiertes CD137 oder CD137, welches auf der Oberfläche von Spheroïden exprimiert wird, die Wanderung dieser Zellen *in vitro* bzw. in die Spheroïde (Becke et al., eingereicht). Sowohl für die Effekte auf die humanen T-Zellen als auch auf die Monozyten ist dabei die Immobilisierung von CD137-Fc oder die Vernetzung von löslichem CD137-Fc durch einen Sekundärantikörper (anti-Fc) essentiell.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Bisher ist nichts über den Mechanismus der reversen Signalübertragung von CD137 bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die reverse Signaltransduktion in monozytären Zellen untersucht werden. Dazu sollte getestet werden, ob die durch CD137 bewirkten Aktivitäten durch spezifische Hemmstoffe der Signaltransduktion gehemmt werden können. In Ergänzung dazu sollte die Regulation der Aktivität bekannter Signaltransduktionsmoleküle nach Stimulation dieser Zellen mit CD137 Protein gemessen werden. Parallel dazu sollte mittels der cDNA-Arraytechnologie die CD137 regulierte Genexpression untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden die verwendeten Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

ε-Amino-n-Capronsäure	Sigma, Deisenhofen
[α- <sup>32</sup> P]dATP, 10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[α- <sup>32</sup> P]dCTP, 10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim
ABTS-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung 19:1, 40 %	Bio-Rad, München
Agar	Behrens, Hamburg
Agarose Ultra Pure <sup>TM</sup>	GibcoBRL, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Calbiochem, Bad Soden
APS	IBI, New Haven, USA
Aqua-Roti®-Phenol pH 4,5 - 5	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DTT	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
ExpressHyb <sup>TM</sup> Hybridisierlösung	Clontech, Heidelberg
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
FKS (Fötale Kälberserum) 40G9480K	GibcoBRL, Karlsruhe
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim

Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hexanukleotide	Roche Diagnostics, Mannheim
Lachssperma-DNA	Stratagene, Heidelberg
Leibovitz's L-15 Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
Leupeptin	Calbiochem, Bad Soden
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, Deisenhofen
Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O	Sigma, Deisenhofen
NaF	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholinsäure	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
PBS	Biochrom, Berlin
pd(N) <sub>6</sub> Random Hexamer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Panbiotech, Aidenbach
Pepton	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Quickszint 212	Zinsser Analytic, Frankfurt
RNAzol <sup>TM</sup> B	AMS, Bioggio-Lugano, Schweiz
Roti <sup>®</sup> -Phenol pH 7,5 - 8	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Panbiotech, Aidenbach
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
TEMED	IBI, New Haven, USA
Transfer-RNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Xylencyanol	Polysciences, Northampton, GB

## 2.1.2 Inhibitoren

Inhibitoren wurden in lyophilisierter Form erworben. Vor jedem Gebrauch wurde eine frische Stammlösung angesetzt. Verdünnungsreihen wurden in PBS, im Falle von PD98059 in einer Lö-

sung von 6,6 mg/ml BSA in PBS, welche jeweils frisch angesetzt worden war, erstellt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Hemmstoffe.

Inhibitor	Struktur	hemmt	gelöst in	Firma
Cheleritri-chlorid		PKC	80 % DMSO, 20 % H <sub>2</sub> O	Calbiochem, Bad Soden
PD98059		MEK1/2	DMSO	Alexis, Grünberg
PP1		Tyrosinkinasen der src-Familie	DMSO	Alexis, Grünberg
RP-cAMPS		PKA	H <sub>2</sub> O	Calbiochem, Bad Soden
SB203580		p38 MAPK	DMSO	Alexis, Grünberg
Wortmannin		PI 3-Kinasen	Methanol	Alexis, Grünberg

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren.

### 2.1.3 Kits

Atlas™ Human cDNA Expression Array I	Clontech, Heidelberg
BCA Protein Assay Kit	Pierce, München
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Duo Set Maus-IL-6 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
DuoSet Human-IL-8 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Milenia Human-IL-8 ELISA	DPC Biermann, Bad Nauheim
Nowa Western Blot Detection Kit	EnerGene, Regensburg
NUCLEIC <i>dotMETRIC</i> ™ Kit	Geno Technology, St. Louis, USA
NUCLEOBOND® DNA-Präparations Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech, Heidelberg

### 2.1.4 Antikörper

Anti-Phosphotyrosin-Antikörper, Maus IgG <sub>2b</sub> , monoklonal (4G10)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)-Antikörper, Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)-Antikörper, Maus, monoklonal (E10)	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-p38 MAPK-Antikörper, Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-p44/42 MAPK-Antikörper, Kaninchen, polyklonal	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-gekoppeltes Kaninchen anti-Maus Antiserum	Dako Diagnostica, Hamburg
HRP-gekoppeltes Schwein anti-Kaninchen Antiserum	Dako Diagnostica, Hamburg

## 2.1.5 Sonstige Immunglobuline

Human-IgG, Fc-Fragment

CD137-Fc (Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne von humanem CD137 und dem Fc-Fragment von humanem IgG1)

4-1BB-Fc (Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne von Maus-CD137 und dem Fc-Fragment von humanem IgG1)

Accurate Chemical & Scientific Corp, Westbury, USA

CD137-Fc wurde freundlicherweise von Frau Daniela Drenkard und Frau Margarethe Wittmann (Institut für Pathologie, Klinikum der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Alternativ wurde das Protein von der Firma An-cell (Laeuflingen, Schweiz) bezogen.

Immunex Corporation, Seattle, USA

## 2.1.6 Enzyme

Klenow-Fragment

Restriktionsendonukleasen

RNase A

RNase-freie DNase I

RNase-Inhibitor

SUPERSCRIPT™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase

Taq-Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim

GibcoBRL, Karlsruhe

Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.1.7 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandard II

DNA-Längenstandard X

Full Range Rainbow™ Proteinstandard

SeaBlue™ Proteinstandard

Roche Diagnostics, Mannheim

Roche Diagnostics, Mannheim

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Novex, Frankfurt

## 2.1.8 Sonstiges Material

10 ml-Einmal-Pipetten

BioMax MR Röntgenfilm

CHROMA-SPIN-200 DEPC-H<sub>2</sub>O Säulchen

Bibby Sterilin Ltd, Stone, England

Eastman Kodak, Rochester, USA

Clontech, Heidelberg

Einmalartikel für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Sterilfilter	Millipore, Eschborn
ELISA-Platten (Falcon® 353912)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Filme Agfapan APX 100	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gewebekulturplatten	Costar, Corning, USA
Human HL-60 cDNA-Array	RZPD, Berlin
Hyperfilm ECL™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Multi®-Ecoflex®, Pipettenspitzen 0,5 – 200 µl, rund	Roth, Karlsruhe
Mikroküvetten	Hellma, Müllheim
NICK Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nitrozellulose-Transfermembran (Hybond™ ECL™)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Parafilm® "M"	American National Can, Chicago, USA
Polyallomer-Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
PVDF-Transfermembran (Hybond™ -P)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rundbodenröhrchen (Falcon® 352051)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Whatman 3MM Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg

## 2.1.9 Organismen

### *E. coli*-Stamm:

XL-1 blue            recA⁻ (recA1, lca⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, su-pE44, relA1, {F⁻ proAB, lacI, lacZΔM15, Tn10})            Stratagene, Heidelberg

### Säugerzelllinie:

THP-1            humane, akute, monozytäre Leukämie            ATCC Nr. 45503

## 2.1.10 Vektoren

pcDNA3::4-1BBL (KI12)            J Michel, Regensburg

Plasmide (pSPORT1; GibcoBRL, Karlsruhe) mit Fragmenten von Genen, die in den Arrays als differentiell exprimiert identifiziert wurden            RZPD, Berlin

## 2.1.11 Desoxyoligonukleotide

Desoxyoligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Nach dem Lösen in H<sub>2</sub>O wurden sie bei -20°C gelagert.

### Primer für die PCR:

hILA-Lig-sen	5` -GTT TCA CTT GCG CTG CAC CTG CAG CCA CTG-3`
hILA-Lig-as	5` -GGC TCT AGA TAT CAA GGT CCA ACT TGG GGA AGG-3`
G3PDH-sense	5` -TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3`
G3PDH-antisense	5` -ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3`
4-1BB-L-SEN	5` -ACC AAG CTT ATG GAC CAG CAC ACA CTT GA-3`
4-1BB-L-AS	5` -AAG GCG GCC GCT CAT TCC CAT GGG TTG TCG G-3`
β-Aktin-for	5` -TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT G-3`
β-Aktin-rev	5` -CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3`

### Primer für die DNA-Sequenzierung:

pSPORT1-forward	5` -GAA GAG CTA TGA CGT CGC ATG C-3`
pSPORT1-reverse	5` -CGA CTC ACT ATA GGG AAA GCT GG-3`

## 2.1.12 Medien, Puffer und Lösungen

Zur Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurde ultrafiltriertes Wasser verwendet. Puffer und Lösungen für Arbeiten mit RNA wurden DEPC-behandelt.

### Medien und Lösungen für *E. coli*:

LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
Ampicillin-Stammlösung (1000 x)	Zur Herstellung von Kulturplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt.  50 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O

$\varphi$ -Medium

20 g/l Trypton  
 5 g/l Hefeextrakt  
 4 g/l MgSO<sub>4</sub>  
 10 mM KCl  
 mit KOH auf pH 7,6 eingestellt

TfBI-Lösung

100 mM RbCl<sub>2</sub>  
 50 mM MnCl<sub>2</sub>  
 30 mM KOAc  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15 % Glyzerin  
 mit 0,2 M HOAc auf pH 5,8 eingestellt

TfBII-Lösung

10 mM MOPS pH 7,0  
 10 mM RbCl<sub>2</sub>  
 75 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15 % Glyzerin

### Medien und Puffer für Säugerzellkulturen:

RPMI 1640

(Moore et al., 1967)

RPMI 1640 wurde als Pulver bezogen und in H<sub>2</sub>O gelöst.

Der pH-Wert wurde mit NaHCO<sub>3</sub> auf 8,1 eingestellt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert und mit folgenden Zusätzen versehen:

10 % (v/v) FKS

0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin

PBS

PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> wurde als Pulver bezogen, in H<sub>2</sub>O gelöst, der pH-Wert mit NaHCO<sub>3</sub> auf 7,6 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

**Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie:**

DEPC-H<sub>2</sub>O                            0,1 % (v/v) DEPC in H<sub>2</sub>O über Nacht unter Rühren inkubiert, dann autoklaviert

RNA-Gel-Laupfuffer (20 x)            0,8 M MOPS  
    0,2 M NaOAc  
    20 mM EDTA  
    mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt

RNA-Auftragspuffer                    0,5 x Gel-Laupfuffer  
    4,5 % (v/v) Formaldehyd  
    50 % (v/v) Formamid

RNA-Gel-Ladepuffer (10 x)            50 % Glyzerin  
    1 mM EDTA  
    0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
    0,25 % Xylencyanol

Ethidiumbromid-Stammlösung        10 mg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O

Lösung I                                50 mM Glukose  
    25 mM Tris/HCl pH 8,0  
    10 mM EDTA pH 8,0

Lösung II                                0,2 M NaOH  
    1 % SDS  
    jeweils frisch angesetzt

Lösung III                              3 M NaOAc  
    11,5 % (v/v) Eisessig

TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Gel-Ladepuffer (10 x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 2,5 % (v/v) Ficoll 400
DNase I-Puffer (10 x)	400 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 60 mM MgCl <sub>2</sub>
Terminationsmix (10 x)	100 mM EDTA pH 8,0 1 mg/ml Glykogen
SSC (20 x)	175,3 g NaCl 88,2 g Na <sub>3</sub> Citrat · 2 H <sub>2</sub> O
Puffer A	1,25 M Tris/HCl pH 8,0 0,125 M MgCl <sub>2</sub> 40 mM DTT 0,5 mM dATP 0,5 mM dGTP 0,5 mM dTTP
Puffer B	2 M HEPES mit NaOH auf pH 6,6 eingestellt
Lösung C	90 OD Units/ml pd(N) <sub>6</sub> in H <sub>2</sub> O
RPDL (5 x)	Puffer A : Puffer B : Lösung C = 2 : 5 : 3

TE-Puffer pH 7,5	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0
Hybridisierungslösung (4 x)	12 x SSC 0,2 M Tris/HCl pH 7,5 80 µg/ml Transfer-RNA 80 µg/ml denaturierte, einzelsträngige Lachs-sperma-DNA 4 mM EDTA 4 x Denhardt's Lösung
Denhardt's Lösung (50 x)	1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA
ETS-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 autoklaviert, dann 0,5 % (w/v) SDS zugegeben

### Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie:

PBS	8 g/l NaCl 1,15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g/l KCl auf pH 7,4 eingestellt
-----	---

PBS-T	PBS 0,05 % (v/v) Tween20
-------	-----------------------------

SDS-PAGE-Laupuffer	3,02 g Tris 18,8 g Glycin 0,1 % (w/v) SDS ad 1 l H <sub>2</sub> O
Laemml-Probenpuffer (2 x)	100 mM Tris/HCl pH 8,0, 4,8 % (w/v) SDS 16 % (v/v) Glyzerin 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, jeweils frisch zugesetzt
modifizierter RIPA-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 10 % (v/v) Glyzerin 1 % (v/v) Triton-X-100 0,1 % (w/v) SDS 1 % Natriumdesoxycholinsäure 1 mM EDTA 100 mM Na F 0,5 mM aktivierte Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin Aprotinin, Leupeptin und aktivierte Natriumorthovanadat wurden vor Gebrauch jeweils frisch zugesetzt.
aktivierte Natriumorthovanadat	100 mM Natriumorthovanadat in H <sub>2</sub> O bei 95°C unter Schütteln lösen. Anschließend solange 3 M HCl in kleinen Portionen zupipettieren, bis die gelbe Farbe gerade nicht mehr verschwindet.
Aprotinin-Stammlösung	10 mg/ml Aprotinin in H <sub>2</sub> O

Leupeptin-Stammlösung	10 mg/ml Leupeptin in H <sub>2</sub> O
Western Blot-Transferpuffer	20 % (v/v) Methanol 48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS
Anodenpuffer A	0,3 M Tris pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer B	25 mM Tris pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer C	4 mM $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure pH 7,6 20 % (v/v) Methanol
Coomassie Blue-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Serva R 40 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Eisessig
Coomassie Blue-Entfärbler	40 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Eisessig

## 2.1.13 Geräte

### Spannungsgeräte:

200/2.0 Constant Voltage Power Supply	Bio-Rad, München
2303 Multidrive XL	LKB, Heidelberg
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg

### Gelelektrophoreseapparaturen:

DNA Sub Cell™	Bio-Rad, München
Quick Screening Horizontal Gel Electrophoresis Unit	IBI, New Haven, USA
Multi-Purpose Gel Electrophoresis Unit	IBI, New Haven, USA
Mini Protean II	Bio-Rad, München

### Blotapparaturen:

Mini Transblot	Bio-Rad, München
2117 Multiphor II Blotting Unit	LKB, Heidelberg

### Waagen:

R160P	Sartorius, Göttingen
L2200S	Sartorius, Göttingen

### Zentrifugen:

Biofuge A	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
J2-21 M/E Zentrifuge mit JA 14- und JA-20-Rotoren	Beckman, Palo Alto, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

### Mikroskope:

Axiovert 10	Zeiss, Jena
Labovert FS	Leitz, Wetzlar

### Objektive:

Periplan 10 x/18	Leitz, Wetzlar
PL 10 x/20	Leitz, Wetzlar

Periplan GF 12,5 x/20

Leitz, Wetzlar

**Fotoapparaturen:**

WILD MPS52

Leica Camera AG, Solms

WILD MPS46 Dokumentationssystem

Leica Camera AG, Solms

**Sonstige Geräte:**

Autoklav 2540 EK

Tuttnauer/Systec, Wettenberg

Bakterieninkubator B6060

Heraeus, Hanau

DNA Thermal Cycler

Perkin Elmer, Norwalk, USA

Emax Microplate Reader (Molecular Devices)

MWG Biotech, Ebersberg

Entwicklermaschine X-Omat 2000 Processor

Eastman Kodak, Rochester, USA

Geiger-Zähler LB 122

Berthold, Wildbad

Geldokumentationssystem 2000i

MWG-Biotech, Ebersberg

Geltrockner

Fröbel, Gießen

Heizblock TR-L288

Liebisch, Bielefeld

Hybridisierofen GFL® 7601

GFL, Burgwedel

LaminAir® HBB 2472 S, 2448

Heraeus, Hanau

Luminometer Lumat LB 9501

Berthold, Wildbad

Magnetrührer MR 2002, MR 3001

Heidolph, Kehlheim

Mikrowelle MR 6415

Hitachi, Feldkirchen

pH-Meter pH522

WTW, Weilheim

Photometer ultraspec II

LKB, Heidelberg

Schüttler IKA-Vibrax VXR

IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.

Speed Vac® SC110

Savant, Farmingdale, USA

Szintillationszähler LS 5000 TD

Beckman, Palo Alto, USA

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

UV-Transilluminator

Bachofer, Regensburg

Vortex REAX 2000

Heidolph, Kehlheim

Wasserbad GFL® 1083

GFL, Burgwedel

Zellinkubator 6000

Heraeus, Hanau

## 2.2 Methoden

Für Arbeiten mit Organismen und für molekularbiologische Experimente wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Arbeiten mit Säugerzellen erfolgten zudem in einer sterilen Werkbank. Alle Experimente fanden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt.

### 2.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Erhaltung von *E. coli*

Die Kultivierung und Erhaltung von *E. coli* erfolgte nach Maniatis et al. (1982). *E. coli*-Zellen wurden in einer Übernachtkultur bei 37°C auf LB-Agarplatten oder unter Schütteln in LB-Medium herangezogen. Zur Selektion plasmidtragender Stämme wurden dem Medium 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Platten angeimpft. Für die Herstellung von Glyzerinengefrierkulturen zur langfristigen Lagerung von *E. coli* wurden 0,5 ml einer frischen Übernachtkultur mit 0,6 ml steriles Glyzerin (87 %) vermischt. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

#### 2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die meisten Methoden der bakteriellen Transformation basieren auf der Beobachtung, daß Bakterien, die mit eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung behandelt und dann kurz erwärmt werden, mit Plasmid-DNA transformiert werden können. Durch diese Behandlung wird eine reversible Destabilisierung der Bakterienmembran erreicht, so daß die Bakterien zur DNA-Aufnahme kompetent werden. Für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen nach Cohen et al. (1972) wurden 5 ml φ-Medium mit einer Einzelkolonie *E. coli* XL1-blue angeimpft und die Kultur bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bei 550 nm herangezogen. Nach Zugabe von 100 ml vorgewärmten φ-Medium wurden die Bakterien bei 37°C weitergeschüttelt, bis sie eine optische Dichte von 0,48 erreicht hatten. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gestellt und bei 2500 rpm (J2-21 M/E Zentrifuge mit JA-14-Rotor) und 4°C 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml eiskalter TfBI-Lösung resuspendiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert, ehe die Zellen erneut abzentrifugiert und in 4 ml eiskalter TfBII-Lösung aufgenommen, portioniert und bei –80°C aufbewahrt wurden. Die kompetenten Zellen wurden freundlicherweise von Frau Daniela Drenkard zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1.3 Transformation von *E. coli* mit doppelsträngiger Plasmid-DNA

Zur Transformation von *E. coli* mit doppelsträngiger Plasmid-DNA nach Hanahan (1983) wurden Aliquots von 100 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transfizierenden DNA (ca. 0,1 µg) wurden die Zellen 30 min lang auf Eis inkubiert, anschließend 40 sec bei 42°C

hitzebehandelt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert.

## 2.2.2 Arbeiten mit Säugerzellen

### 2.2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte nach Lindl & Bauer (1989). Peritonealexudatzellen (PEZ) aus der Maus, primäre, humane Monozyten und THP-1 Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Luft im Brutschrank kultiviert. Als Medium diente RPMI 1640, dem 10 % (v/v) FKS und 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt waren. THP-1 Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert.

### 2.2.2.2 Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Säger-Zelllinien

Die Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Säger-Zelllinien erfolgte nach Lindl & Bauer (1989). THP-1 Zellen in Kulturmedium wurden 5 min bei 1200 rpm (Megafuge 1.0R) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Verhältnis 10:1 (Medium/Zellpellet) in einer Mischung aus 40 % (v/v) Kulturmedium, 50 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und zu je 1 - 1,5 ml auf Tiefgefrierröhrchen verteilt. Diese wurden dann in einen gut verschließbaren, auf -80°C vorgekühlten, Styroporbehältter gegeben, über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen bei 37°C im Wasserbad geschwenkt und mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden der Inhalt in mindestens 10 Volumen vorgelegtem Kulturmedium verdünnt und 5 min bei 1200 rpm (Megafuge 1.0R) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen. Mittels Trypanblaufärbung wurde die Vitalität der Zellen untersucht.

### 2.2.2.3 Isolierung von humanen Monozyten durch Elutriation

Die nach der folgenden Methode gewonnenen Zellen wurden von den Abteilungen Hämatologie/Onkologie bzw. Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg bezogen. Gesunden Spendern zwischen 20 und 40 Jahren wurden mit Hilfe einer Leukapherese Leukozyten aus dem Blut entnommen (Graw et al., 1971). Daraus wurden mononukleäre Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation in einem Blutzellseparator isoliert (Johnson et al., 1977). Monozyten wurden von den Lymphozyten über eine Gegenstromzentrifugation (Elutriation) getrennt (Sanderson et al., 1977), bei der die Zellen ihrer Größe nach in verschiedene Fraktionen gesammelt werden konnten.

#### 2.2.2.4 Isolation von Peritonealexsudatzellen (PEZ) aus der Maus

Mäusen wurde je 1 ml PBS in die Peritonealhöhle gespritzt, was zur Einwanderung von Leukozyten führt. Nach 16 h, zu dem Zeitpunkt, zu dem der Anteil der Makrophagen an den eingewanderten Zellen am größten ist, wurden die Tiere getötet. Nach Desinfizieren des Fells mit 70 %igem (v/v) Ethanol wurde dieses im Bauchbereich geöffnet. Anschließend wurde soviel wie möglich eiskaltes Kulturmedium in die Peritonealhöhle gespritzt. Durch den Kälteschock lösen sich die Makrophagen von der Peritonealwand. Das Medium mit den nun darin enthaltenen Makrophagen wurde mit einer Spritze wieder abgenommen und in ein vorbereitetes Polypropylen-Gefäß mit Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt.

#### 2.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl nach Lindl & Bauer (1989) wurde die Zellsuspension in ein Hämostrometer (Neubauer-Zählkammer) gefüllt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert aus den vier sich diagonal gegenüberliegenden, großen Quadranten multipliziert mit  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor ergab die Zellzahl/ml.

#### 2.2.2.6 Test auf Lebensfähigkeit von Zellen

Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblaufärbung oder MTT-Test ermittelt.

##### 2.2.2.6.1 Trypanblaufärbung

Für die Trypanblaufärbung nach Lindl & Bauer (1989) wurde 1 Teil Zellen mit 6 Teilen PBS bzw. Medium und 3 Teilen Trypanblau vermischt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Er dringt nur in tote Zellen ein, die sich so von lebenden Zellen unterscheiden lassen.

##### 2.2.2.6.2 MTT-Test

Der MTT-Test erfolgte nach Mosmann (1983). Der Test mißt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen. Das schwach gelbe MTT dringt in die Zellen ein und sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien unter Beteiligung von NADH und NADPH aufgebrochen. Es entstehen wasserunlösliche, dunkelblaue Formazankristalle, die mit Hilfe von SDS in Lösung gebracht werden können. Die Absorption der Formazanlösung kann dann photometrisch bestimmt werden. Die MTT-Tests wurden mit Hilfe des Cell Proliferation Kits I (Roche Diagnostics) durchgeführt. THP-1 Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml bzw. primäre, humane Monozyten in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium wurden mit den

jeweils angegebenen Konzentrationen an Inhibitor bzw. Lösungsmittel versetzt. Je 100 µl Zellsuspension wurden in eine Vertiefungen einer 96-Loch Platte gegeben, danach wurden die Zellen 24 h kultiviert. Nach Zugabe von 10 µl MTT-Lösung pro Vertiefung wurde 4 h bei 37°C inkubiert. Je Vertiefung wurden nun 100 µl SDS-Lösung zugesetzt, danach wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe eines Emax Microplate Readers (Molecular Devices) wurde dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Die Referenzwellenlänge lag bei 650 nm. Als Standard dienten Verdünnungsreihen von Zellen ohne Hemmstoff. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes SOFTmax® (Molecular Devices).

### **2.2.2.7 *In vitro* Stimulation von Zellen**

#### **2.2.2.7.1 Beschichten von Gewebekulturschalen mit Protein**

Gewebekulturschalen mit Polystyrolbeschichtung (Costar bzw. Greiner) wurden 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit in PBS verdünntem 4-1BB-Fc (Maus-CD137-Fc; 3 µg/ml), CD137-Fc (5 µg/ml) oder Fc-Protein (1,5 bzw. 2,5 µg/ml) inkubiert. Durch *Van der Waals Kräfte* wurde dabei das Protein an der Polystyroloberfläche der Schalen gebunden. Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurden die Schalen einmal mit PBS gewaschen.

#### **2.2.2.7.2 Induktion von Zytokinfreisetzung und Adhärenz**

$2 \times 10^6$  PEZ in 2 ml Kulturmedium wurden in 4-1BB-Fc- bzw. Fc-Protein-beschichteten oder unbeschichteten 6-Loch-Gewebekulturschalen kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fotografiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet. Dazu wurden die Überstände in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, 5 min bei 13000 rpm (Mikrozentrifuge) abzentrifugiert und anschließend in frische Eppendorfgefäße pipettiert. Bis zur Messung der IL-6 Konzentration im ELISA wurden die Überstände bei -20°C gelagert. Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände in RNAzol™B (AMS Biotechnology) aufgenommen.

Jeweils 100 µl THP-1 Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in Kulturmedium wurden für 24 h in CD137-Fc- bzw. Fc-Protein-beschichteten oder unbeschichteten 96-Loch-Gewebekulturschalen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fotografiert. Die Kulturüberstände wurden geerntet und bis zur Mesung der IL-8 Konzentration im ELISA bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.7.3 Hemmung von Zytokinfreisetzung und Adhärenz**

Primäre, humane Monozyten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml bzw. THP-1 Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in Kulturmedium wurden mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an Inhibitor bzw. Lösungsmittel 10 min bei 37°C in Rundbodenröhrchen aus Po-

lystyrol (Falcon) vorinkubiert. Anschließend wurden je 100 µl Zellsuspension in eine Vertiefungen einer mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichteten 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert und etwa 24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann teilweise fotografiert und danach 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R). Anschließend wurden die Kulturerstände geerntet und bis zur Untersuchung im ELISA bei -20°C gelagert. Tab. 2.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren.

#### 2.2.2.7.4 Induktion und Hemmung von Proteinphosphorylierung

Primäre Monozyten wurden in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen. THP-1 Zellen wurden einmal mit Leibovitz's L-15 Medium gewaschen und in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in diesem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für die jeweils angegebenen Zeiten bei 37°C auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein inkubiert. Dazu wurde pro Bedingung 1 ml Zellen in eine Vertiefung einer entsprechend beschichteten 24-Loch-Gewebekulturschale pipettiert. Danach wurde 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R). Die Verwendung von Inhibitoren erfolgte wie unter 2.2.2.7.3 beschrieben. Von den so vorbehandelten Zellen wurden Zytoplasmaextrakte für die Analyse im Western Blot gewonnen.

#### 2.2.2.7.5 Induktion von Genexpression

Primäre, humane Monozyten wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und für 6 bzw. 20 h in CD137-Fc- bzw. Fc-Protein-beschichteten Petrischalen ( $\varnothing$  8,5 cm) kultiviert. Aus den so vorbehandelten Zellen wurde Gesamt-RNA für die Analyse der CD137-Fc-induzierten Genexpression mittels der cDNA-Arraytechnologie isoliert.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Arbeiten mit RNA

##### 2.2.3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Gesamt-RNA aus PEZ für die RT-PCR sowie aus primären, humanen Monozyten für die Analyse der Genexpression mittels cDNA-Arrays wurde unter Verwendung von RNAzol<sup>TMB</sup> (AMS Biotechnology) nach Angaben des Herstellers isoliert (Chomczynski & Sacchi, 1987).  $2 \times 10^6$  PEZ bzw.  $3,5 \times 10^7$  THP-1 Zellen oder  $10^8$  Monozyten wurden pelletiert, in 500 µl bzw. 6 oder 10 ml RNAzol<sup>TMB</sup> aufgenommen. und entweder bis zu 14 Tage bei -20°C gelagert oder direkt nach Protokoll weiterverarbeitet. Das RNA-Pellet wurde etwa 25 min luftgetrocknet, anschließend in einem

geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert oder direkt in 20 µl RT-Ansatz aufgenommen.

Gesamt-RNA aus unbehandelten, primären, humanen Monozyten für die RT-PCR wurde mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits (Roche Diagnostics) isoliert. Dabei wird die RNA nach der Lyse der Zellen in Gegenwart eines chaotropen Salzes an ein Glasvlies gebunden (Vogelstein & Gillespie, 1979). Im Anschluß an einen Verdau mit DNase I, direkt auf dem Glasvlies, und mehrere Waschschrifte kann die RNA dann in H<sub>2</sub>O eluiert werden. 7,5 x 10<sup>6</sup> Monozyten wurden in 400 µl Lyse-/Bindepuffer aufgenommen und nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll weiterverarbeitet. Die RNA wurde zum Schluß in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Da sich herausstellte, daß bei Durchführung des Verdaus mit DNase I nach den Angaben des Herstellers die genomische DNA nicht vollständig abgebaut worden war, wurde die RNA im Anschluß an die Isolation einem weiteren Verdau mit DNase I unterzogen. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1 Unit/µl RNase-Inhibitor und 2,5 Units/µl RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics) versetzt und 30 min bei 25°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann erneut in 400 µl Lyse-/Bindepuffer aufgenommen, die RNA nochmals nach Protokoll, diesesmal jedoch ohne DNase I Verdau, aufgereinigt und wiederum in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Bis zur Verwendung in der RT-PCR wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.1.2 Reinigung von RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinresten wurde RNA, die unter Verwendung von RNAzol<sup>TM</sup>B B (AMS Biotechnology) isoliert worden war, einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (Chomczynski & Sacchi, 1987). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Die wässrige RNA-Lösung wurde zunächst mit einem Volumen eines Gemisches aus Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt, pH 4,5 – 5), Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) versetzt. Mit Hilfe eines Vortex wurde dann gut gemischt. Anschließend wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge), um die Phasen zu trennen. Der wässrige Überstand mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion unterzogen. Die untere Phase wurde verworfen. Um Reste von Phenol zu entfernen, wurde die wässrige RNA-Lösung anschließend mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Mit Hilfe eines Vortex wurde gut gemischt. Anschließend wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge). Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Mischen mit 1/5 Volumen 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc und 2,5 Volumen 96 %igem (v/v) Ethanol gefällt. Danach wurde 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde mit 100 µl 80 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, etwa 25 min bei Raumtemperatur luftge-

trocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren nach Maniatis et al. (1982) wurde die UV-Absorption (A) einer Nukleinsäurelösung bei 260 bzw. 280 nm ermittelt. Die Messung erfolgte gegen das jeweilige Lösungsmittel in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Alle Messwerte wurden lösungsmittelkorrigiert.

Näherungsweise gilt folgender Zusammenhang:

$$A = 1 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g/ml doppelsträngiger DNA}$$

$$40 \mu\text{g/ml RNA}$$

$$33 \mu\text{g/ml einzelsträngiger Oligonukleotide}$$

Zusätzlich gibt das Verhältnis A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> Aufschluß über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA etwa 1,8 und für RNA ca. 2 betragen.

Alternativ wurde die Konzentration von Nukleinsäurelösungen mit Hilfe des NUCLEIC dotMETRIC™ Kits (Geno Technology) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

#### 2.2.3.1.4 Gelelektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen

Um die Güte der RNA zu überprüfen, wurde diese in einem 1 %igen, denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Maniatis et al., 1982). Die entsprechende Menge Agarose wurde in H<sub>2</sub>O im Mikrowellenherd verflüssigt und anschließend auf etwa 60°C temperiert. Danach wurde die Lösung mit RNA-Gel-Laufpuffer (1/20 des Endvolumens) und Formaldehyd (Endkonzentration 6 %, v/v) gemischt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die in H<sub>2</sub>O gelösten RNA-Proben (3 – 5 µg in 23 µl) wurden mit zwei Teilen RNA-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 60°C denaturiert. Danach wurden 1/10 Volumen RNA-Gel-Ladepuffer und 0,4 % (w/v) Ethidiumbromid hinzugefügt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm in 1 x RNA-Gel-Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einer UV-Durchlichtbank (Bachofer, 254 nm) fotografiert.

#### 2.2.3.1.5 Reverse Transkriptase (RT)-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der RT-PCR (Cuddy et al., 1993) handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zur Untersuchung von Genexpression auf der Stufe der RNA. Dabei wird zunächst mittels der RT anhand einer RNA-Matrize cDNA synthetisiert, die dann in einer PCR amplifiziert werden kann. Außer für Array-Hybridisierungen, deren Durchführung in Kapitel 2.2.3.3 gesondert beschrieben wird, wurde dabei die SUPERSCRIPT™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (GibcoBRL) verwendet. Als Primer für die reverse Transkription dienten Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz. Von der RNA aus primärem, humanen Monozyten bzw. THP-1 Zellen, welche in H<sub>2</sub>O gelöst vorlag, wurden 1,5 – 3 µg für die reverse Transkription eingesetzt. Die RNA aus 2 x 10<sup>6</sup> Maus-PEZ wurde nach dem Fällen und Trocknen sofort im RT-Ansatz aufgenommen. Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen:

11 µl RNA in H<sub>2</sub>O

0,5 µl Hexanukleotide (2 mg/ml)

1 µl dNTPs (10 mM)

4 µl 5 x RT-Puffer (vom Hersteller der Reversen Transkriptase mitgeliefert)

2 µl DTT (100 mM; vom Hersteller der Reversen Transkriptase mitgeliefert)

0,5 µl RNase-Inhibitor (40 Units/µl)

1 µl SUPERSCRIPT™ II (200 Units/µl)

Der Ansatz wurde 50 min bei 42°C und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde dann entweder zunächst bei -20°C gelagert oder sofort in der PCR eingesetzt.

### 2.2.3.2 Arbeiten mit DNA

#### 2.2.3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die PCR (Mullis & Falloona, 1987) angewendet.

Eine PCR erfolgte in folgendem Ansatz:

	CD137 Ligand (Maus)	$\beta$ -Aktin	humaner CD137 Ligand	G3PDH
sense-Primer	2 ng/ $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l	0,8 ng/ $\mu$ l
antisense-Primer	2 ng/ $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l	0,8 ng/ $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
10 x Puffer*	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
DMSO	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	----	----
cDNA	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Nach einem Denaturierungsschritt von 4 min (CD137 Ligand (Maus),  $\beta$ -Aktin) bzw. 5 min (humane CD137 Ligand, G3PDH) bei 94°C erfolgte die Amplifikation nach folgenden Reaktionsparametern:

	CD137 Ligand (Maus), $\beta$ -Aktin	humaner CD137 Ligand, G3PDH
Denaturierung	30 sec, 94°C	1 min, 94°C
Annealing	1 min, 61°C	2 min, 52°C
Extension	1,5 min, 72°C	2 min, 72°C
Zyklenzahl	34	40

Dem schloß sich eine weitere Extension für 10 min bei 72°C an. Die PCR-Produkte wurden auf 1 oder 1,5 %igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt.

\* vom Hersteller der Polymerase mitgeliefert

### 2.2.3.2.2 Gelelektrophorese von DNA

Die analytische Auf trennung von DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese (Maniatis et al., 1982) in horizontalen Kammern mit Gelvolumina zwischen 10 und 200 ml. Die Konzentration der in 1 x TAE gelösten Agarose betrug je nach Größe der zu trennenden Fragmente 1 oder 1,5 % (w/v). Als Laupuffer diente 1 x TAE. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen DNA-Gel-Ladepuffer versetzt. Als Längenstandards dienten die Standards II und X (Roche Diagnostics). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm. Anschließend wurden die Gele für etwa 10 min in 10 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und danach zum Entfernen überschüssigen Ethidiumbromids aus der Gelmatrix gewässert. Die gefärbten DNA-Banden wurden auf einer UV-Durchlichtbank sichtbar gemacht und mit Hilfe des Geldokumentationssystems 2000i (MWG-Biotech) fotografiert.

### 2.2.3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnbaum & Doly, 1979) mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden zunächst ca. 1,5 ml einer stationären Übernachtkultur in einem Eppendorfreaktionsgefäß 2 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Mikrozentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 100 µl eiskalter Lösung I mit RNase A (1 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurde durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt und kurz auf Eis inkubiert. Proteine und genomische DNA wurden aus diesem Lysat mit 150 µl eiskalter Lösung III 10 min auf Eis gefällt und dann 5 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Mikrozentrifuge). Der wässrige Überstand mit den darin enthaltenen Plasmiden wurde zunächst mit 1 Volumen Phenol (TE-gesättigt, pH 7,5 - 8)/Chloroform (1:1, v/v) und anschließend mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Anschließend wurde die DNA mit 2 Volumen 100 %igem Ethanol gefällt und 20 min bei 14000 rpm abzentrifugiert (Mikrozentrifuge). Das Pellet wurde dann mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, etwa 25 min luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst. Alternativ wurden Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab mit Hilfe von NUCLEOBOND® AX 20 Silicagelsäulen (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde für die Sequenzierung verwendet. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.3.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

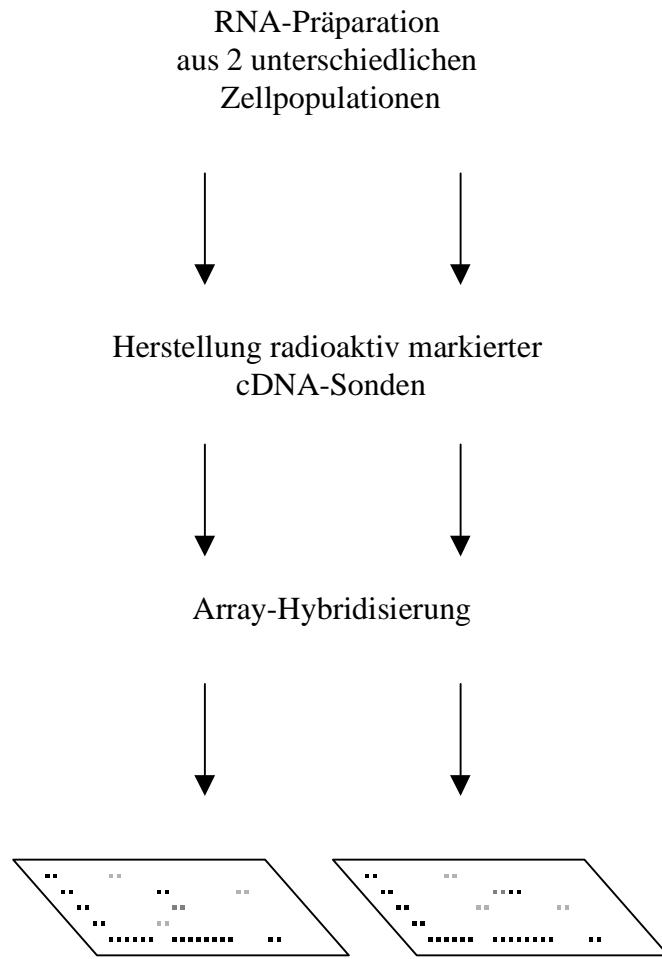
Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen (Maniatis et al., 1982) wurde in einem Volumen von 20 µl mit 1 µg Plasmid-DNA, 10 Units des entsprechenden Enzyms und 2 µl des von Hersteller empfohlenen 10 x Reaktionspuffers durchgeführt. Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und durch Agarosegel-Elektrophorese analytisch aufgetrennt.

#### 2.2.3.2.5 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden von Sanger et al. (1977). Sequenzreaktionen wurden mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) unter Verwendung doppelsträngiger Plasmid-DNA angesetzt und Abbruchfragmente nach der Cycle-Sequencing-Methode (McCombie et al., 1992) erzeugt. Die Detektion erfolgte über Laseranregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in einem automatischen DNA-Sequenzer (ABI/Perkin Elmer, Typ 373). Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau Anne Pietryga-Krieger durchgeführt.

### 2.2.3.3 cDNA-Arraytechnologie

Die Arraytechnologie ist ein Verfahren, welches die gleichzeitige Analyse der Expression einer Vielzahl von Genen ermöglicht (van Hal et al., 2000; Hughes & Shoemaker, 2001). Nylonmembranen oder Glaschips werden in bestimmten Koordinaten mit cDNAs bekannter Gene oder cDNA-Fragmenten, sog. ESTs beschickt. Aus zwei verschiedenen Zellpopulationen wird RNA isoliert, welche als Matrize für die Synthese von cDNA dient. Diese wird hierbei direkt oder in einem weiteren Schritt mit Radioaktivität oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert und als Sonde zur parallelen Hybridisierung zweier identischer Arrays eingesetzt. Durch Vergleich der beiden Arrays können Hybridisierungssignale mit unterschiedlichen Intensitäten ermittelt werden. Anhand der Koordinaten der entsprechenden Spots lassen sich dann die differentiell exprimierten Gene identifizieren.



**Abb. 2.1: Ablaufschema der Analyse differentieller Genexpression mit Hilfe von cDNA-Arrays.**

Für die Untersuchung der CD137 regulierten Genexpression in humanen Monozyten wurde der Atlas<sup>TM</sup> Human cDNA Expression Array I (Clontech) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine positiv geladene Nylonmembran, auf der in bestimmten Koordinaten 588 PCR-amplifizierte cDNA-Fragmenten bekannter Gene gespottet sind. Die Länge der als Doppelspots aufgetragenen cDNA-Fragmente beträgt dabei 200 – 500 bp. Zusätzlich ist die Membran mit cDNA-Fragmenten von neun Haushaltsgenen als Positivkontrolle und Plasmid- und Bakteriophagen-DNAs als Negativkontrollen beschickt. Pro Spot wurden dabei 10 ng cDNA immobilisiert. Außerdem wurde der Human HL-60 cDNA-Array verwendet, welcher vom Ressourcen Zentrum Primärdatenbank (RZPD), dem Organisationszentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes vertrieben wird. Auch dies sind Nylonmembranen, auf denen allerdings 27648 Gene als Bakterienkolonien, die die entsprechende cDNA enthalten, in einer definierten Anordnung doppelt gespottet sind. Die Analyse der Genexpression mit Hilfe des Human HL-60 cDNA-Arrays erfolgte nach Becker et al. (2001).

### 2.2.3.3.1 Präparation der RNA

$10^8$  primäre Monozyten mit einem Reinheitsgrad von etwa 90 % wurden für die Analyse der Genexpression mit Hilfe der Atlas Arrays 20 h, für die Analyse mittels der Human HL-60 cDNA-Arrays 6 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert. Aus diesen Zellen wurde dann unter Verwendung von RNAzol<sup>TM</sup>B (AMS Biotechnology) Gesamt-RNA isoliert und anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Um die Güte der RNA zu überprüfen wurde ein Aliquot in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Evtl. noch vorhandene genomische DNA wurde dann durch Verdau mit RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics) entfernt. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 100 µl 10 x DNase I-Puffer und 50 Units DNase I versetzt und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA erneut über Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Schließlich wurde nochmals die Qualität der RNA mittels Elektrophorese in einem denaturierenden Agarosegel ermittelt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde RNA dann bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.3.2 Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die Hybridisierung der Atlas Arrays erfolgte über reverse Transkription unter Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP. Dabei wurde die im Kit enthaltene MMLV (*Moloney-Murine-Leukemia Virus*) RT sowie der ebenfall im Kit enthaltene CDS Primer Mix verwendet. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, jedoch wurde statt der angegebenen polyA<sup>+</sup>-RNA entsprechend vorbereitete Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt. Falls nötig wurde die RNA-Lösung vorher mit Hilfe einer Speed Vac<sup>®</sup> SC110 (Savant) auf ein geeignetes Volumen eingeengt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden im Anschluß an die reverse Transkription über die mitgelieferten CHROMA SPIN-200 DEPC-H<sub>2</sub>O Säulchen nach Anleitung abgetrennt. Die markierte cDNA konnte aufgrund ihrer radioaktiven Strahlung im Durchlauf der Säulen detektiert werden. Dazu wurde je 1 µl der gesammelten Fraktionen mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die spezifische Aktivität in einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die Human HL-60 cDNA-Arrays wurden zunächst 100 ng der entsprechend vorbereiteten RNA mit Hilfe des SMART-Protokolls (Clontech) in einzelsträngige cDNA transkribiert und anschließend amplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden dann unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurde die cDNA zum Schluß in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und dann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Für die anschließende radioaktive Markierung wurden je 100 ng cDNA in einem Volumen von 34 µl H<sub>2</sub>O für 10 min auf 98 - 100°C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit 10 µl RPDL, 4 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP und 1 µl Klenow-Fragment (5 Units)

versetzt. Danach wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 µl Lachssperma-DNA (2 mg/ml), 10 µl ETS-Puffer und 30 µl TE-Puffer zugegeben. Nicht einge- baute Nukleotide wurden mit Hilfe von NICK Columns (Amersham Pharmacia Biotech) nach Pro- tokoll abgetrennt. Die spezifische Aktivität von je 1 µl der markierten cDNA wurde dann nach der Methode von Cherenkov ohne Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Tritiumkanal eines Szintilla- tionszählers (Beckman) bestimmt.

#### 2.2.3.3 Hybridisierung der Arrays

Die Atlas Arrays wurden zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen zunächst entsprechend der Anleitung des Herstellers in 0,1 mg/ml Lachssperma-DNA in Express Hyb™ Hybridisierungslösung 30 min bei 68°C inkubiert. Die Sonden (je ca.  $3 \times 10^6$  cpm in 340 µl) wurden ebenfalls nach Protokoll vorbereitet und mit je 4 ml Express Hyb™ Hybridisierungslösung mit 0,1 mg/ml Lachs- sperma-DNA gemischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Danach wurden die Membranen zunächst dreimal für je 20 min bei 68°C mit jeweils 200 ml 2 x SSC, 1 % (w/v) SDS und anschließend zweimal je 20 min bei 68°C mit jeweils 200 ml 0,1 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS ge- waschen. Sämtliche Hybridisierungs- und Waschschrifte wurden dabei in Rollerflaschen durchge- führt. Die Autoradiographie der Membranen erfolgte bei –80°C mit Verstärkerfolie.

Die Prähybridisierung der Human HL-60 cDNA-Arrays erfolgte über Nacht bei 38°C in einer Lö- sung aus 5 ml 4 x Hybridisierungslösung, 10 ml Formamid, 0,2 ml 10 % (w/v) SDS und 4,8 ml H<sub>2</sub>O in Rollerflaschen. Nach Zugabe der Sonden (je ca.  $9 \times 10^5$  cpm) wurde wiederum über Nacht bei 38°C inkubiert. Darauf folgte ein 10-minütiger Waschschritt bei 38°C in 1 x Denhardt's Lösung, 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS. Anschließend wurden die Membranen zunächst 15 min, dann mehrmals jeweils etwa 1 h mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS (w/v) bei steigenden Temperaturen zwischen 38° und 60°C gewaschen. Nach jedem der Waschschritte wurde mit einem Geigerzähler (Berthold) die Ak- tivität gemessen. Nachdem diese auf weniger als 10 cpm pro Membran gesunken war, wurden die Filter für etwa 1,5 h auf Whatman Papier getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei Raumtem- peratur ohne Verstärkerfolie.

#### 2.2.3.4 Auswertung der Arrays

Durch Vergleich der Autoradiogramme zweier Membranen, die parallel mit Sonden von CD137-Fc- bzw. Fc-Protein-behandelten Monozyten hybridisiert worden waren, wurden Hybridisierungssignale mit unterschiedlicher Signalintensität ermittelt.

Anhand der Koordinaten der jeweiligen cDNA-Spots konnten dann im Falle der Atlas Arrays die Namen der entsprechenden, potentiell durch CD137 regulierten Gene aus einer im Kit enthaltenen Liste mit den gespotteten cDNAs entnommen werden.

Im Falle der Human HL-60 cDNA-Arrays wurden anhand der Koordinaten von Spots mit unterschiedlich starkem Hybridisierungssignal Bakterienklone mit den entsprechenden cDNA-Fragment vom RZPD bestellt. Diese wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Je 5 ml LB-Medium, ebenfalls mit 50 µg/ml Ampicillin wurden dann mit Einzelkolonien von den Platten angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert und, unter Verwendung der Primer pSPORT1-forward und pSPORT1-reverse, sequenziert.

## 2.2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.2.4.1 Herstellung von Zytosplasmaextrakten

Die Herstellung von Zytosplasmaextrakten erfolgte wie beschrieben in Finkelstein & Shimizu (2000) mit einigen Abänderungen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zellen wurden nach Inkubation auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein in der Gewebekulturschale für 2 - 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert (Megafuge 1.0R). Das Medium wurde sorgfältig entfernt, in Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge), um evtl. mitabgesaugte Zellen zu pelletieren. Zur Lyse wurden die Zellen anschließend mit modifiziertem RIPA-Puffer versetzt und 30 min inkubiert.  $5 \times 10^5$  THP-1 Zellen bzw.  $10^6$  primäre, humane Monozyten wurden dabei 40 µl des Puffers aufgenommen. Die Lysate wurden dann in Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zum Entfernen der Zellkerne 25 min bei 11000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge). Je 20 µl des Überstandes wurden für die SDS-PAGE mit 1 Volumen 2 x Laemmli-Puffer versetzt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Der restliche Teil der Überstände wurde zur Proteinbestimmung verwendet.

### 2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits (Pierce) bestimmt (Smith et al., 1985). Die dem Kit zugrunde liegende Methode beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine in alkalischer Milie. Cu<sup>+</sup> bildet dann mit Bicinchoninsäure (BCA) einen wasserlöslichen, blauen Farbkomplex, welcher durch Messung der Absorption bei 562 nm quantifiziert werden kann. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl Zytosplasmaextrakt in einer 96-Loch Platte mit 8 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl einer nach Angaben des Herstellers vorbereiteten al-

kalischen BCA-Kupfer(II) Lösung versetzt und etwa 30 min bei 37°C bis zur Entwicklung einer leicht blauen Färbung inkubiert. Mit Hilfe eines Emax Microplate Readers (Molecular Devices) wurde dann die Absorption bei 540 nm bestimmt und mit Hilfe einer BSA-Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Zur Auswertung wurde das Programm SOFTmax® (Molecular Devices) verwendet.

#### **2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Bei der Elektrophorese von Proteinen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit hauptsächlich von Ladung, Größe und Form ab. Da SDS die meisten Proteine denaturiert und in einem festen Verhältnis bindet (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren), weisen die Moleküle ein konstantes Verhältnis von Ladung und Größe und eine ähnliche Form auf. Deshalb werden sie in der SDS-PAGE vorwiegend nach ihrem Molekulargewicht getrennt (Reynolds & Tanford, 1970).

Die Elektrophorese erfolgte mit diskontinuierlichem Puffersystem (King & Laemmli, 1971) in vertikalen Minigelen des Formats 7 cm x 10 cm x 0,15 cm. Die Acrylamidkonzentrat betrug dabei 10 %. Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt (Menge für ein Gel):

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
Acrylamid:Bisacrylamid (40 %, 19:1)	201 µl	1,75 ml
Tris/HCl (1 M, pH 6,8)	241 µl	----
Tris/HCl (2 M, pH 8,8)	----	1,312 ml
H <sub>2</sub> O	1,526 ml	3,83 ml
SDS (10 %, w/v)	20 µl	70 µl
TEMED	2 µl	3,5 µl
APS (10 %, w/v)	10 µl	35 µl
Gesamtvolumen	2 ml	7 ml

TEMED und APS initiieren die Polymerisation und wurden daher zum Schluß zugegeben. Die Länge des Sammelmols, in welches die Proteinlösungen aufgetragen wurden, betrug 1,3 cm.

Die Proteinproben wurden nach Aufnahme in 1 Volumen 2 x Laemmli-Puffer 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Mikrozentrifuge). Die Elektrophorese erfolgte unter Spannungsbegrenzung (120 V) in SDS-PAGE-Laufpuffer. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele für Western Blot-Analysen verwendet.

#### 2.2.4.4 Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen. Für den Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (Towbin et al., 1979) wurden das Gel und eine Nitrozellulose-Membran in Gelgröße im Anschluß an die SDS-PAGE zunächst 20 min in Western Blot-Transferpuffer äquilibriert. Sechs Whatman Papierstreifen, ebenfalls in Gelgröße, wurden kurz in Western Blot-Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden in der Transferapparatur zunächst drei Lagen Whatman Papier, dann die Membran, das Gel und schließlich wiederum drei Lagen Whatman Papier übereinander geschichtet. Die Proteine wurden dann durch Anlegen einer Stromstärke von  $0,85 \text{ mA/cm}^2$  für etwa 1 – 1,5 h auf die Membran übertragen.

Für den Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Methanol benetzt und zusammen mit dem Gel für etwa 1 min in Puffer B inkubiert. Drei Lagen Whatman Papier wurden in Puffer A getränkt und auf die Anodenplatte der Transferapparatur gelegt. Darauf folgten drei Schichten mit Whatman Papier, die zuvor mit Puffer B getränkt worden waren, dann die Membran, das Gel und schließlich drei Lagen von in Puffer C getränktem Whatman Papier. Nach Bedecken des Aufbaus mit der Kathodenplatte wurde für 0,8 h eine Stromstärke von  $1,3 \text{ mA/cm}^2$  angelegt. Die Polyacrylamidgele wurden im Anschluß an den Transfer mit Coomassie Blue gefärbt.

#### 2.2.4.5 Proteinnachweis auf Western Blots

An eine Membran gebundene Proteine bzw. deren Phosphorylierung wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Peltre et al., 1982; Haas et al., 1986). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran im Anschluß an den Transfer zunächst 1 - 1,5 h in einer Lösung von 5 % (w/v) BSA in PBS-T, welche jeweils frisch angesetzt worden war, inkubiert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in PBS-T gewaschen. Danach wurde 2 h bei Raumtemperatur mit dem in PBS-T verdünnten Primärantikörper geschwenkt. Nach mindestens drei etwa 10-minütigen Waschschritten mit PBS-T wurde die Membran für 2 h mit dem ebenfalls in PBS-T verdünnten, Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten mindestens drei weitere Waschschritte. Gebundene Antikörper wurden dann unter Verwendung des Nowa Western Blot Detection Kits (EnerGene) über eine Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) nachgewiesen. Der Nachweis durch ECL beruht auf der HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -katalysierten Oxidation eines zyklischen Diazylhydrazids (Luminol) unter alkalischen Bedingungen. Das Luminol wird durch die Oxidation angeregt und geht unter Lichtemission wieder in den Grundzustand über. Chemische Verstärker (Phenole) erhöhen sowohl Dauer als auch Ausbeute der Lichtemission, die auf einem blau-sensitiven Autoradiographie-Film (Hyperfilm-ECL<sup>TM</sup>, Amersham) sichtbar gemacht werden kann. Zum Entfernen von gebundenen Antikörpern wurden PVDF-Membranen zunächst 5 min in  $\text{H}_2\text{O}$ , dann 5 min in

0,2 %iger (w/v) NaOH und danach wiederum 5 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt. Nach nochmaligem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen konnten die Blots zum Nachweis weiterer Proteine erneut mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden.

#### **2.2.4.6 Coomassie-Färbung von Proteinen**

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten durch Coomassie-Färbung (Fairbanks, 1971) direkt im Gel sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für etwa 1 h in Coomasie Blue-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde der nicht an Protein gebundene Farbstoff durch Schwenken in Entfärbser aus der Gelmatrix entfernt. Dies erforderte regelmäßiges Erneuern des Entfärbers. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf Whatman Papier bei 90°C unter Vakuum getrocknet.

#### **2.2.4.7 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

Zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden *sandwich*-ELISAs durchgeführt. Dazu wurde eine 96-Loch-Platte (Falcon) mit einem für das jeweilige Zytokin spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach Entfernen von überschüssigem Antikörper durch Inkubation mit einer Lösung aus 1 % BSA und 5 % Saccharose in PBS abgesättigt. Nach einem Waschschritt mit PBS-T wurde mit den geeignet verdünnten Zellkulturüberständen inkubiert und ungebundenes Protein anschließend weggewaschen. Zur Detektion des gebundenen Proteins wurde nacheinander mit einem zweiten, spezifischen, polyklonalen, biotinylierten Antikörper, Streptavidin-gekoppeltem Enzym, jeweils gefolgt von einem Waschschritt, und schließlich mit Substrat inkubiert. Durch die Kopplung des Enzyms über Biotin-Streptavidin wird dabei die Sensitivität des ELISAs gesteigert. Das Enzym kann jedoch auch, wie dies z.B. beim Milenia Human-IL-8 ELISA (DPC Biermann) der Fall war, direkt an den Antikörper gebunden sein. Die Absorption der durch enzymatische Umsetzung des Substrats entstehenden Färbung wurde photometrisch durch Messung in einem Emax Microplate Readers (Molecular Devices) ermittelt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen, rekombinanten Protein. Zur Auswertung der Meßwerte wurde das Programm SOFTmax® (Molecular Devices) verwendet.

Die Messung von Maus-IL-6 erfolgte mit Hilfe des Duo Set Maus-IL-6 ELISAs (R&D Systems). Die Bestimmung von humanem IL-8 erfolgte entweder mit Hilfe des DuoSet Human-IL-8 ELISA (R&D Systems) oder des Milenia Human-IL-8 ELISA (DPC Biermann) nach den jeweiligen Angaben der Hersteller. Als Enzym diente in allen Fällen Meerrettich-Peroxidase. Für die ELISAs von R&D System wurde ABTS (Roche Diagnostics) als Substrat verwendet. Durch enzymatische Umsetzung dieses Stoffes entsteht ein grüner Farbstoff, dessen Absorption bei 405 nm ermittelt werden

konnte. Im ELISA von DPC Biermann wurde eine TMB-Substratlösung eingesetzt. Nach enzymatischer Umsetzung dieses Substrates und Abstoppen der Reaktion mit Hilfe von 2 N HCl konnte die Absorption des entstehenden Farbstoffes bei 450 nm ermittelt werden.

### 3 Ergebnisse

CD137 ist ein Mitglied der TNF Rezeptorfamilie. Sein Ligand gehört zur TNF Familie. Für mehrere Mitglieder dieser Familie wurde reverse Signalübertragung in die Ligand-tragende Zelle beschrieben. Auch für den CD137 Liganden gibt es Hinweise auf eine solche reverse Signalübertragung. So induziert immobilisiertes CD137 in humanen T-Lymphozyten Apoptose (Schwarz et al., 1996). Dagegen übt CD137 eine kostimulatorische Funktion bei der Aktivierung von B-Lymphozyten aus (Pollok et al., 1994; Pauly, 2000). Verschiedene Tumor-Zelllinien werden durch Zugabe von löslichem CD137 zur Produktion von IL-8 angeregt (Salih et al., 2000). Ähnlich bewirkt immobilisiertes CD137 in primären, humanen Monozyten die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 oder IL-8. Außerdem fördert es die Adhärenz und führt zu einer Verlängerung des Überlebens dieser Zellen (Langstein et al., 1998; Langstein & Schwarz, 1999). Auch konnte gezeigt werden, daß immobilisiertes oder auf der Oberfläche von Spheroiden exprimierte CD137 die Migration der Monozyten *in vitro* und in die Spheroide verstärkt (Becke et al., eingereicht). Schließlich stimuliert immobilisiertes CD137-Fc die Proliferation der Monozyten (Langstein et al., 1999).

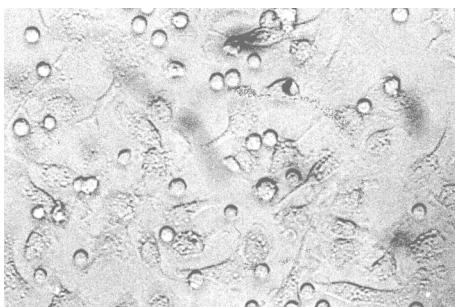
#### 3.1 CD137-induzierte reverse Signalübertragung in Peritonealexsudatzellen aus der Maus und humanen THP-1 Zellen

##### 3.1.1 CD137-induzierte morphologische Veränderungen und Verstärkung der Adhärenz

Bislang ist nichts über eine CD137-induzierte reverse Signalübertragung in monozytären Zellen bekannt. Um einen ersten Hinweis auf eine potentielle reverse Signaltransduktion in Peritonealexsudatzellen (PEZ) aus der Maus und den humanen, monozytären THP-1 Zellen zu erhalten, sollte deshalb zunächst der Einfluß von CD137 auf das Adhärenzverhalten dieser Zellen untersucht werden. Dazu wurden PEZ isoliert und in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit 4-1BB-Fc, einem Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne von Maus-CD137 und dem Fc-Fragment von humanem IgG1, bzw. mit dem Kontrollprotein Fc beschichtet oder unbeschichtet waren. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fotografiert. Analog dazu wurden THP-1 Zellen für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet oder unbeschichtet waren, und anschließend ebenfalls fotografiert.

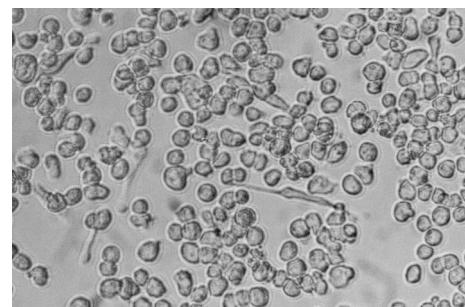
A) PEZ

4-1BB-Fc

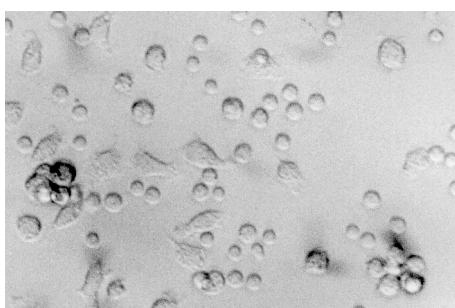


B) THP-1 Zellen

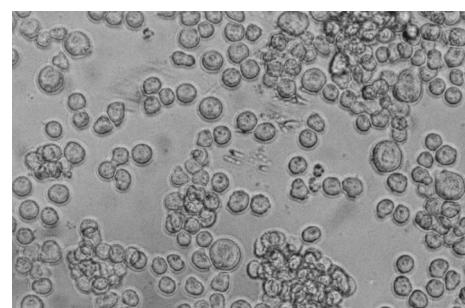
CD137-Fc



Fc-Protein



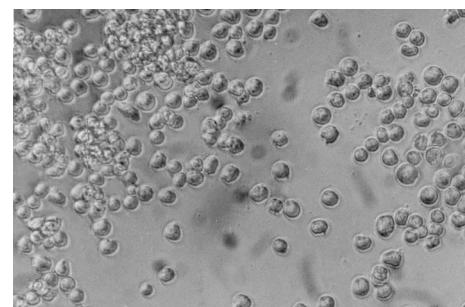
Fc-Protein



nur Zellen



nur Zellen



**Abb. 3.1: CD137-Fc induziert morphologische Veränderungen in PEZ und THP-1 Zellen und verstärkt die Adhärenz dieser Zellen.** A) PEZ ( $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Kulturmedium) wurden für 4 Tage in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit 4-1BB-Fc (3 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (1,5 µg/ml) beschichteten oder unbeschichtet waren und anschließend fotografiert. B) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) wurden in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet oder unbeschichtet waren. Nach 24 h wurden die Zellen fotografiert.

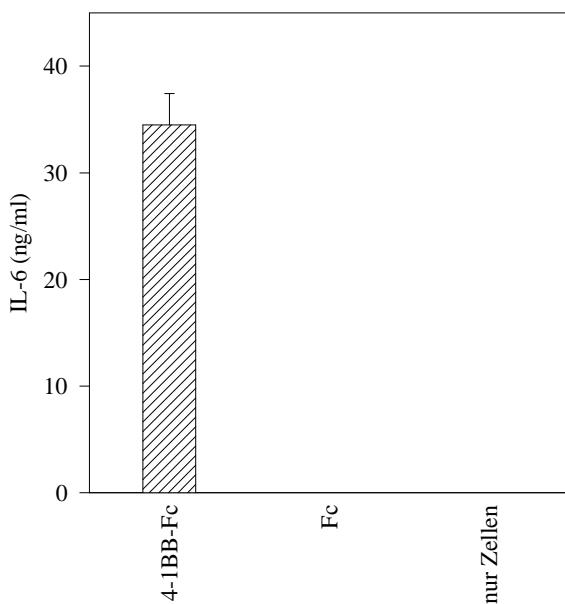
Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, zeigen sowohl die PEZ als auch die THP-1 Zellen, die auf immobilisiertem 4-1BB-Fc bzw. CD137-Fc kultiviert wurden, morphologische Veränderungen gegenüber Zellen, die in Fc-Protein-beschichteten oder unbeschichteten Gewebekulturschalen gehalten wurden. So treten bei auf 4-1BB-Fc inkubierten PEZ verstärkt unregelmäßige sowie langgestreckte und

verzweigte Zellformen auf. Auch bei THP-1 Zellen, die auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden, sind langgestreckte Zellformen zu beobachten. Diese kommen bei Zellen, die in Fc-Protein-beschichteten oder unbeschichteten Gewebekulturschalen kultiviert wurden, nicht vor. Für primäre, humane Monozyten konnte gezeigt werden, daß solche morphologischen Veränderungen mit einer verstärkten Adhärenz der Zellen einhergehen (Andreesen et al., 1990). Immobilisiertes CD137 fördert auch die Adhärenz primärer, humaner Monozyten (Langstein et al., 1998). Die in den PEZ und THP-1 Zellen bei Stimulation mit immobilisiertem 4-1BB-Fc bzw. CD137-Fc beobachteten morphologischen Veränderungen waren ein erster Hinweis auf eine CD137-induzierte reverse Signalübertragung in diesen Zellen.

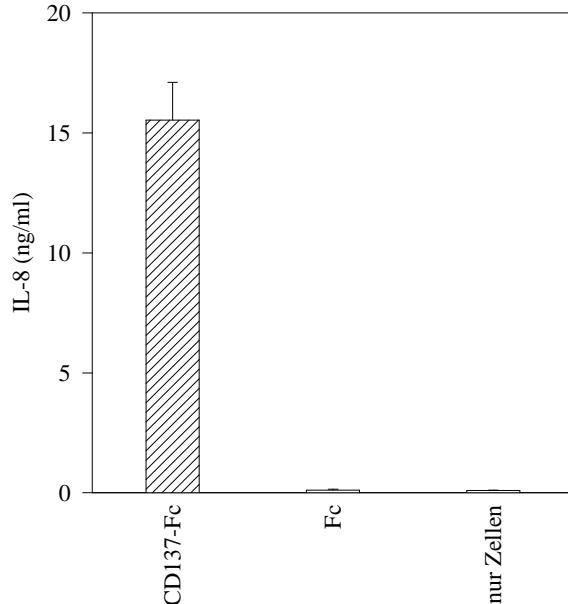
### 3.1.2 CD137-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

CD137 fördert nicht nur die Adhärenz primärer, humaner Monozyten sondern induziert auch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-6 und IL-8 in diesen Zellen (Langstein et al., 1998). Um einen weiteren Hinweis auf eine mögliche CD137-induzierte reverse Signaltransduktion in PEZ und THP-1 Zellen zu erhalten, sollte deshalb der Einfluß von CD137 auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in diesen Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Kulturerstände der, wie unter 3.1.1 beschrieben, vorbehandelten PEZ bzw. THP-1 Zellen nach dem Fotografieren geerntet. Im ELISA wurden dann die Konzentrationen an IL-6 bzw. IL-8 in den Überständen ermittelt.

A) PEZ



B) THP-1 Zellen



**Abb. 3.2: CD137-Fc stimuliert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in PEZ und THP-1 Zellen.** A) PEZ ( $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Kulturmedium) wurden für 4 Tage in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit 4-1BB-Fc (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet oder unbeschichtet waren. Die IL-6 Konzentra-

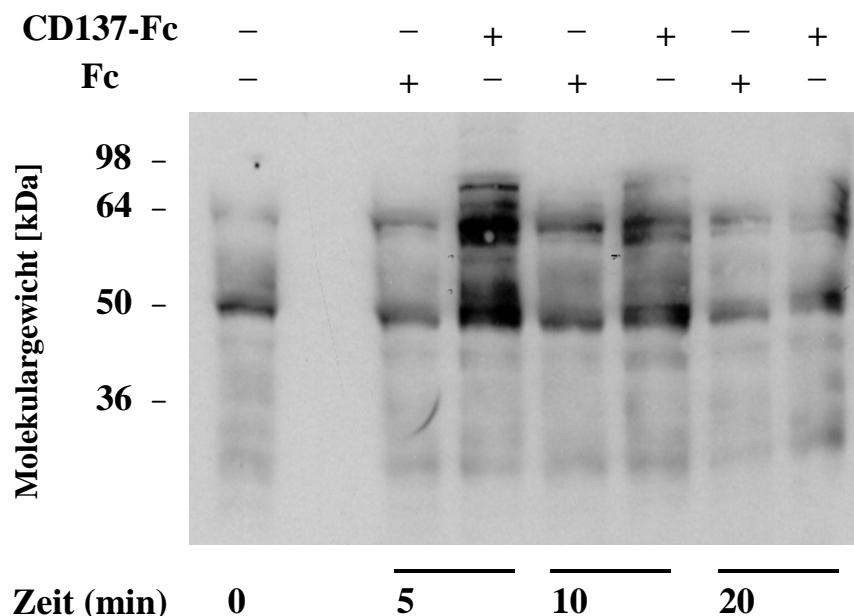
tion im Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. B) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) wurden in Gewebekulturschalen ausgesät, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet oder unbeschichtet waren. Nach 24 h wurden die Überstände geerntet. Die Konzentration an IL-8 wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Triplikate ± Standardabweichung.

Wie Abb. 3.2 zeigt, bewirkt immobilisiertes 4-1BB-Fc eine deutliche Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in PEZ und immobilisiertes CD137-Fc induziert die Synthese von IL-8 in THP-1 Zellen. In Fc-Protein-beschichteten bzw. unbeschichteten Gewebekulturschalen kultivierte Zellen dagegen produzieren keine messbaren Mengen von diesen Zytokinen. CD137 beeinflusst also nicht nur die Morphologie und das Adhärenzverhalten von PEZ und THP-1 Zellen, sondern induziert, ähnlich wie in primären Monozyten, auch proinflammatorische Zytokine, was einen weiteren Hinweis auf eine CD137-induzierte reverse Signaltransduktion in diesen Zellen darstellt. Die Zellen erschienen daher geeignet als zusätzliches Modell zur Untersuchung der Mechanismen der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion. Die Zytokinsekretion kann zur quantitativen Bestimmung der CD137-induzierten Aktivierung und der daran beteiligten Signalübertragungswege genutzt werden.

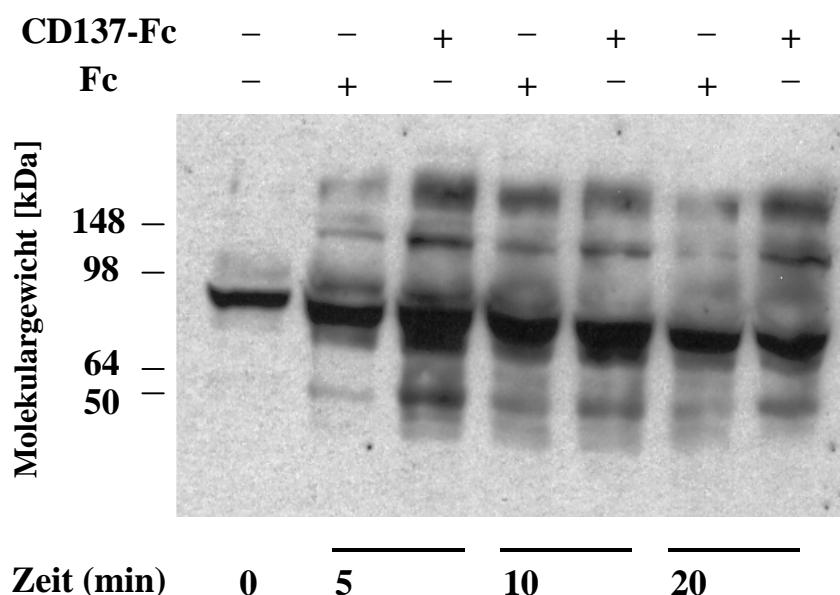
### **3.2 Induktion von Tyrosinphosphorylierung durch CD137 in monozytären Zellen**

Ein wichtiges Prinzip der intrazellulären Signalübertragung stellt die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten durch Proteintyrosinkinasen dar. Um festzustellen, ob Tyrosinphosphorylierung auch bei der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen eine Rolle spielt, wurden THP-1 Zellen bzw. primäre, humane Monozyten für die angegebenen Zeiten in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Von den anschließend aus diesen Zellen gewonnenen Zytoplasmaextrakten wurde der Proteingehalt bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden dann mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung des spezifischen Antikörpers 4G10 (Upstate Biotechnology) auf Tyrosinphosphorylierung untersucht.

A) THP-1 Zellen



B) primäre, humane Monozyten



**Abb. 3.3: CD137-Fc induziert Tyrosinphosphorylierung in THP-1 Zellen und primären, humanen Monozyten.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Leibovitz's L-15 Medium) bzw. B) primäre Monozyten ( $10^6$  Zellen in 1 ml Kulturmöglichkeit) wurden für die angegebenen Zeiten in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Anschließend wurden Zytoplasmextrakte gewonnen und im Western Blot unter Verwendung des spezifischen Antikörpers 4G10 (Upstate Biotechnology; Verdünnung 1:1000) auf Tyrosinphosphorylierung untersucht.

Wie Abb. 3.3 zeigt, weisen sowohl THP-1 Zellen als auch primäre Monozyten, die auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden, einen höheren Grad an Tyrosinphosphorylierung auf als Zellen, die in Fc-Protein-beschichteten Gewebekulturschalen inkubiert wurden. Das Ausmaß der Phosphorylierung ist dabei nach etwa 5 min maximal. Danach nimmt die Phosphorylierung in den CD137-Fc-stimulierten Zellen wieder ab. Bei den primären Monozyten ist sie allerdings im Gegensatz zu den THP-1 Zellen auch nach 20 min noch deutlich stärker als diejenige in den Kontrollzellen. Auch hinsichtlich des Phosphorylierungsmusters weisen die beiden Zellarten teilweise Unterschiede auf. Jedoch sind diese Ergebnisse ein erster Hinweis darauf, daß Tyrosinkinasen an der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion in monozytären Zellen beteiligt sind.

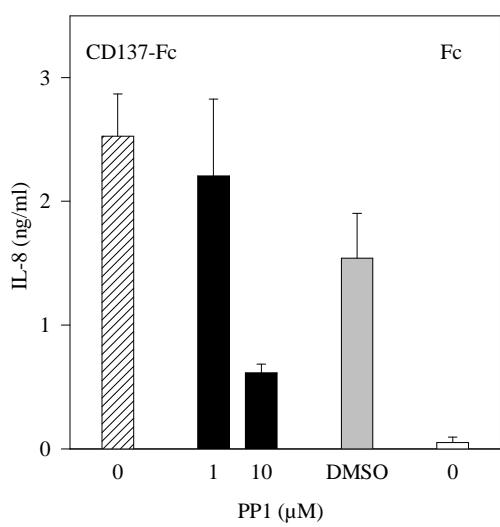
Im folgenden sollten nun diese für die CD137-induzierte Tyrosinphosphorylierung verantwortlichen Kinasen sowie deren Substrate identifiziert werden.

### **3.3 Beteiligung von src-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen**

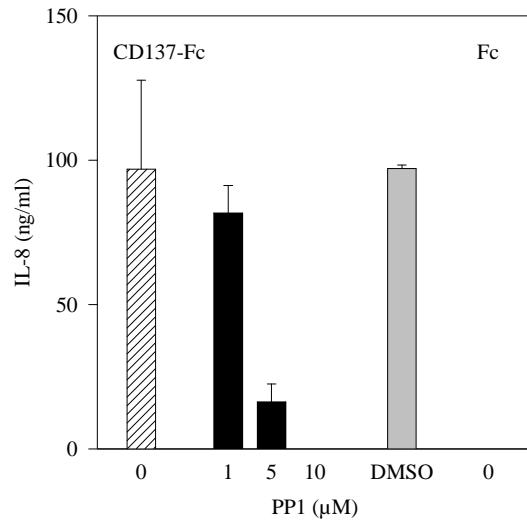
#### **3.3.1 Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Synthese durch PP1**

Wie in Abb. 3.3 zu erkennen ist, stimuliert CD137-Fc sowohl in THP-1 Zellen als auch in primären, humanen Monozyten die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 50 – 60 kDa. Es wurde vermutet, daß es sich hierbei um Mitglieder der src-Kinasefamilie handelt (Rudd et al., 1993; Resh, 1994; Superti-Furga & Courtneidge, 1995). Mit Hilfe von PP1, einem spezifischen Hemmstoff von src-Kinasen (Hanke et al., 1996), sollte diese Annahme überprüft werden. Dazu wurden THP-1 Zellen bzw. primäre, humane Monozyten 10 min mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors bzw. nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert und anschließend in Gewebekulturschalen ausgesät, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 24 h wurden die Überstände geerntet und im ELISA auf ihren Gehalt an IL-8 untersucht. Um festzustellen, ob die Behandlung mit Inhibitor bzw. DMSO die Vitalität der Zellen beeinflußt, wurden parallel dazu MTT-Tests durchgeführt.

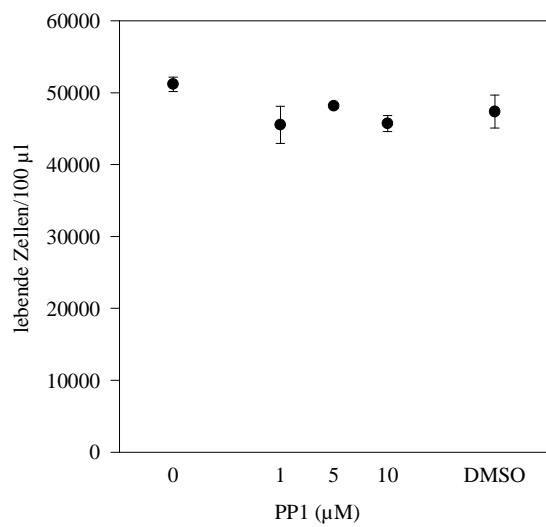
A) THP-1 Zellen



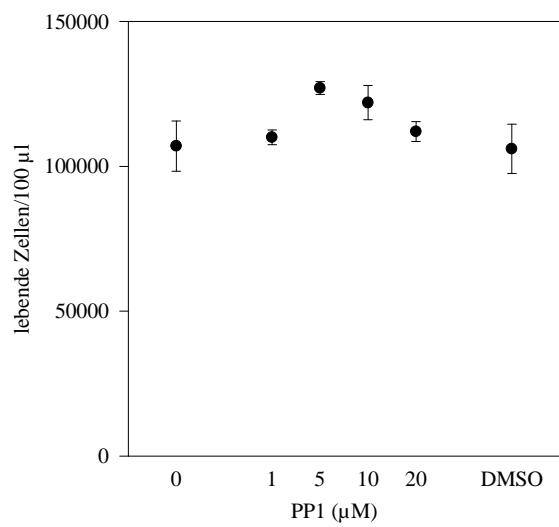
B) primäre, humane Monozyten



C) THP-1 Zellen



D) primäre, humane Monozyten

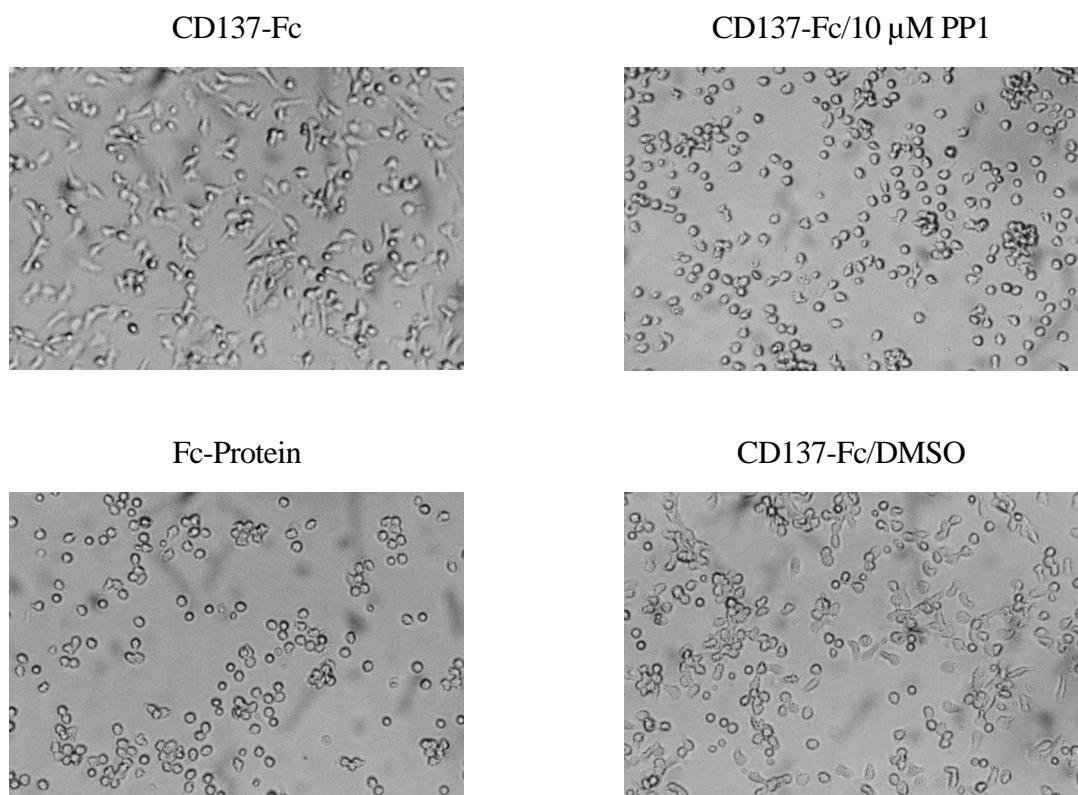


**Abb. 3.4: PP1 hemmt die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen und primären, humanen Monozyten.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 μl Kulturmedium) bzw. B) primäre Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100 μl Kulturmedium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an PP1 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration im Ansatz mit der jeweils höchsten Konzentration an PP1) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5 μg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 μg/ml) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration in den Kulturüberständen wurde im ELISA ermittelt. MTT-Test: C) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 μl Kulturmedium) bzw. D) primäre Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100 μl Kulturmedium) wurden für 24 h in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an PP1 bzw. 0,05 % (THP-1 Zellen) oder 0,1 % (primäre Monozyten) DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei der jeweils höchsten Konzentration an PP1) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung.

Abb. 3.4 zeigt, daß PP1 im Vergleich zum Lösungsmittel DMSO deutlich die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung sowohl aus THP-1 Zellen als auch aus primären, humanen Monozyten hemmt. DMSO dagegen hat im Falle der primären Monozyten keinen, im Falle der THP-1 Zellen nur einen geringen Einfluß auf die IL-8 Freisetzung. Die Abnahme der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand ist dabei nicht auf eine zytotoxische Wirkung des Inhibitors auf die Zellen zurückzuführen, wie aus den MTT-Tests hervorgeht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß src-Kinasen bei der CD137-induzierten, IL-8 Freisetzung in monozytären Zellen eine Rolle spielen.

### 3.3.2 Hemmung der CD137-induzierten morphologischen Veränderungen und Adhärenz durch PP1

Bei der Kultur der Monozyten in Gegenwart von PP1 bzw. DMSO war zu beobachten, daß die durch CD137-Fc hervorgerufenen morphologischen Veränderungen in Anwesenheit des Inhibitors ausbleiben. Die Zellen wurden deshalb vor der Ernte der Zellkulturüberstände fotografiert.



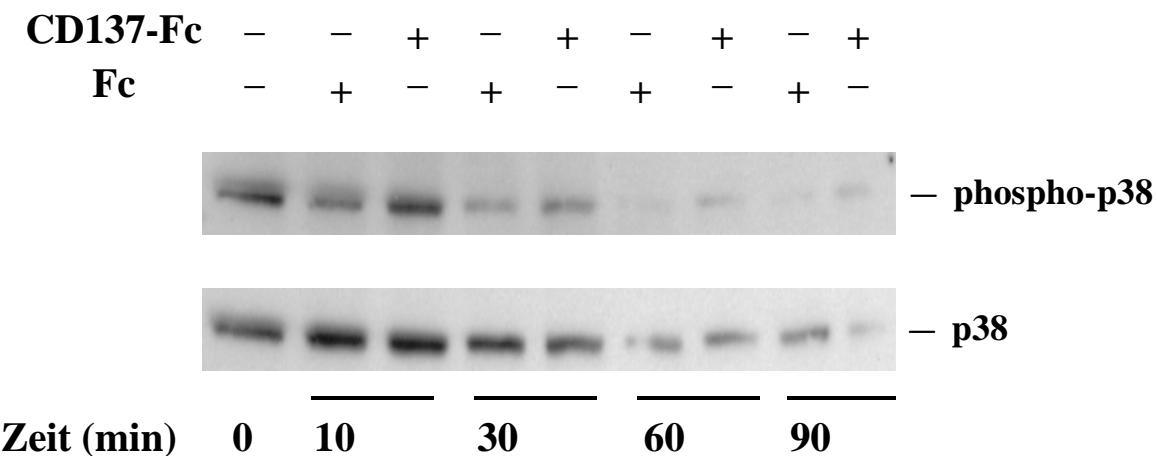
**Abb. 3.5: PP1 hemmt die CD137-Fc-induzierten morphologischen Veränderungen und die Adhärenz primärer, humarer Monozyten.** Humane Monozyten ( $10^6$  Zellen/ml Kulturmedium) wurden 10 min mit PP1 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei 10  $\mu$ M PP1) vorinkubiert und dann 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5  $\mu$ g/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5  $\mu$ g/ml) beschichtet waren. Anschließend wurden die Zellen fotografiert.

Wie aus Abb. 3.5 hervorgeht, weisen Zellen, die in Gegenwart von PP1 auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden, eine runde Form auf. Die unregelmäßige Morphologie, die typischerweise bei Stimulation von monozytären Zellen mit CD137 auftritt, fehlt jedoch. Kontrollzellen, die in Anwesenheit von DMSO auf CD137-Fc kultiviert wurden, unterscheiden sich dagegen in ihrem Aussehen wenig von Zellen, die ohne weitere Behandlung auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden. Dies deutet darauf hin, daß src-Kinasen auch für die CD137-induzierte Adhärenz monozytärer Zellen von Bedeutung sind.

## **3.4 Beteiligung der p38 MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen**

### **3.4.1 CD137-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK**

Aus Abb. 3.3 ist zu entnehmen, daß CD137 in monozytären Zellen die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa stimuliert. Eine wichtige Gruppe von Molekülen der intrazellulären Signalübertragung mit einem Molekulargewicht dieser Größenordnung stellen die MAPK (mitogenaktivierten Proteinkinasen) dar, für deren Aktivierung sowohl die Phosphorylierung eines Threonin- als auch eines Tyrosinrestes erforderlich ist (Reuter et al., 2000). Chen et al. (2001) konnten zeigen, daß die Vernetzung des RANK (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*) Liganden, eines Mitglieds der TNF Familie, über ein RANK-Fc Fusionsprotein in aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Aktivierung der p38 MAPK führt. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die p38 MAP Kinase auch ein Bestandteil der CD137-induzierten Signalkette in monozytären Zellen ist, wurden THP-1 Zellen unterschiedlich lange in Gewebekulturschalen inkubiert, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Anschließend wurden von den so stimulierten Zellen Zytoplasmaextrakte erstellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde dann die p38 MAP Kinase auf Phosphorylierung untersucht. Dazu wurde der polyklonale Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)-Antikörper (New England Biolabs) verwendet. Dieser erkennt p38 MAPK, die sowohl an Threonin 180 als auch an Tyrosin 182 phosphoryliert sind. Anschließend wurden die Antikörper zum Nachweis der phosphorylierten Form weggewaschen. Der Blot wurde dann mit dem ebenfalls polyclonalen Anti-p38 MAPK-Antikörper (New England Biolabs), welcher gegen die unphosphorylierte Form der p38 MAPK gerichtet ist, rehybridisiert.



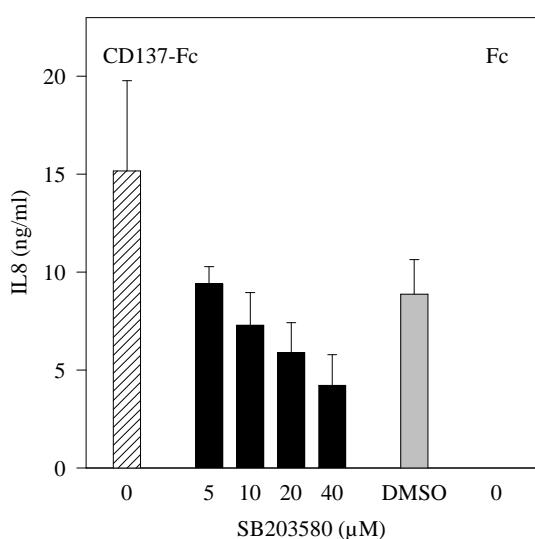
**Abb. 3.6: CD137-Fc induziert die Phosphorylierung der p38 MAPK in THP-1 Zellen.** THP-1 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Leibovitz's L-15 Medium) wurden für die angegebenen Zeiten in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Anschließend wurden Zytoplasmaextrakte hergestellt und im Western Blot unter Verwendung des polyklonalen Anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)-Antikörpers (New England Biolabs; Verdünnung 1:800) auf Phosphorylierung der p38 MAPK untersucht. Nach Entfernen der Antikörper zum Nachweis der phosphorylierten Form der p38 MAPK wurde der Blot mit dem polyklonalen Anti-p38 MAPK-Antikörper (New England Biolabs; Verdünnung 1:800), welcher gegen die unphosphorylierten Formen der p38 MAPK gerichtet ist, rehybridisiert.

Wie Abb. 3.6 zeigt, weisen Zellen, die auf immobilisiertem CD137-Fc inkubiert wurden, einen höheren Gehalt an phosphorylierter p38 MAPK auf als Kontrollzellen, die auf immobilisiertem Fc-Protein gehalten wurden. Dieser Effekt ist bereits nach 10 min deutlich zu sehen. Zwar nimmt, wahrscheinlich bedingt durch ungleichmäßigen Proteintransfer beim Western Blot, die Menge an Gesamtprotein in den Fraktionen ab 60 min deutlich ab, wie die Rehybridisierung des Blots mit einem Antikörper gegen die unphosphorylierte Form der p38 MAPK zeigt. Jedoch ist erkennbar, daß die Menge an phosphoryliertem Protein in den CD137-Fc-stimulierten Zellen auch nach 90-minütiger Inkubation noch höher ist als in Fc-Protein-behandelten Zellen. Der hohe Gehalt an phosphoryliertem Protein zum Zeitpunkt 0 ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die entsprechende Zellfraktion anders als die CD137-Fc bzw. Fc-Protein-behandelten Zellen, welche bei 37°C inkubiert wurden, vor der Lyse für eine gewisse Zeit bei Raumtemperatur gehalten worden war. Gon et al. (1998) konnten zeigen, daß Inkubation von Zellen einer bronchialen Epithel-Zelllinie in kaltem Medium die Tyrosinphosphorylierung der p38 MAPK in diesen Zellen stimuliert. Möglicherweise stellt der Temperaturwechsel von 37°C unter den üblichen Kulturbedingungen auf Raumtemperatur für THP-1 Zellen ebenfalls einen Stressfaktor dar, der auch hier zur Phosphorylierung der p38 MAPK führt.

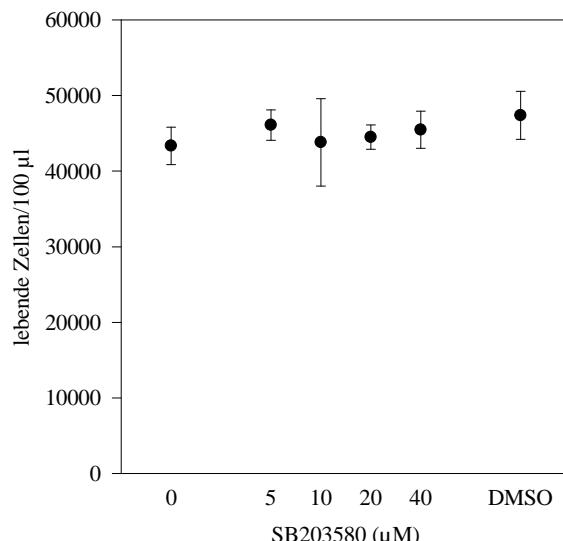
### 3.4.2 Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung durch SB203580

Um festzustellen, ob die p38 MAPK für die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung aus monozytären Zellen eine Rolle spielt, wurden THP-1 Zellen 10 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an SB203580, einem spezifischen Hemmstoff dieser Kinase (Cuenda et al., 1995), bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände geerntet und im ELISA auf ihren Gehalt an IL-8 untersucht. Mittels eines parallel durchgeführten MTT-Tests wurde überprüft, ob der Hemmstoff oder DMSO in den verwendeten Konzentrationen die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigen.

A)



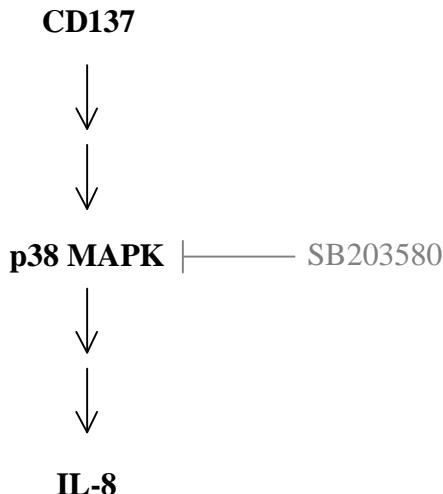
B)



**Abb. 3.7: SB203580 hemmt die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden für 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an SB203580 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei der höchsten Konzentration an SB203580) vorinkubiert und anschließend für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, welche mit CD137-Fc (5  $\mu$ g/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5  $\mu$ g/ml) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde dann im ELISA bestimmt. B) MTT-Test: THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an SB203580 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei 40  $\mu$ M SB203580) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der lebenden Zellen ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung.

Wie aus Abb. 3.7 hervorgeht, hemmt SB203580 im Vergleich zum Lösungsmittel DMSO konzentrationsabhängig die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung aus den THP-1 Zellen. Auch das Lösungsmittel selbst zeigt wiederum einen leicht hemmenden Einfluß auf die IL-8 Sekretion. Wie aus dem MTT-Test hervorgeht, ist der Rückgang der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand nicht

auf eine toxische Wirkung des Hemmstoffes auf die THP-1 Zellen zurückzuführen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle der p38 MAPK bei der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung aus monozytären Zellen, wie in Abb. 3.8 schematisch dargestellt. Jedoch beträgt der Rückgang der IL-8 Konzentration selbst bei einer relativ hohen Hemmstoffkonzentration von 40 µM verglichen mit dem Lösungsmittel nur etwa 50 %. Im folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob auch noch andere MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt sind.



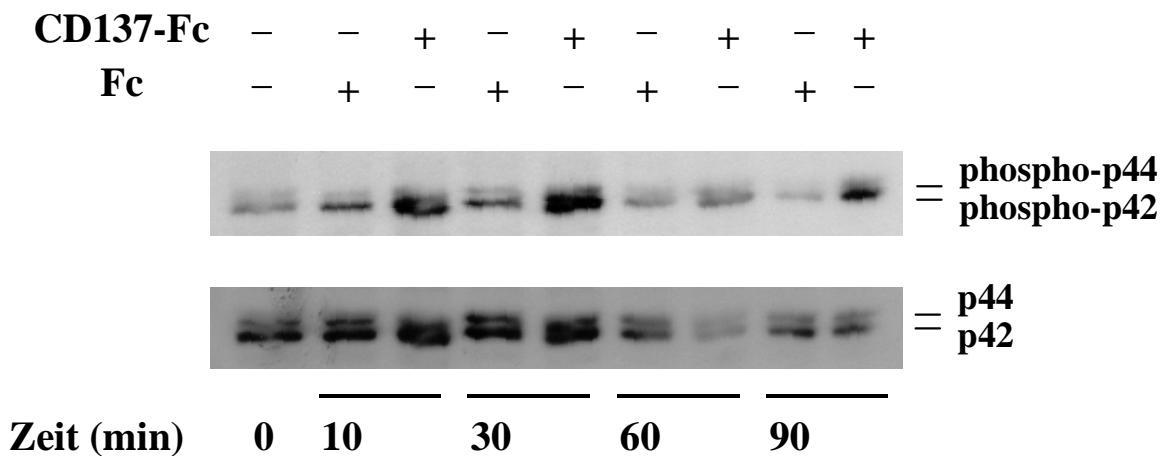
**Abb. 3.8:** Schematische Darstellung der CD137-induzierten Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges (p38 MAPK: p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; SB203580: Inhibitor der p38 MAPK).

### 3.5 Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2 an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen

#### 3.5.1 CD137-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2

Um einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von p44 ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) 1 und p42 ERK2 an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen zu bekommen, wurden THP-1 Zellen unterschiedlich lange in Gewebekulturschalen inkubiert, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Von den so vorbehandelten Zellen wurden Zytoplasmaextrakte hergestellt und im Western Blot auf Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 untersucht. Der hierfür verwendete, spezifische Antikörper E10 (New England Biolabs) erkennt p44 und p42 MAPK, die sowohl an Threonin 202 als auch an Tyrosin 204 phosphoryliert sind. Im Anschluß an diese Hybridisierung wurden die Antikörper zum Nachweis von phosphoryliertem ERK1 und ERK2 weggewaschen. Der Blot wurde dann mit dem polyklonalen Anti-p44/42

MAPK-Antikörper (New England Biolabs), welcher gegen die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 gerichtet ist, rehybridisiert.



**Abb. 3.9: CD137-Fc induziert die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in THP-1 Zellen.** THP-1 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Leibovitz's L-15 Medium) wurden für die angegebenen Zeiten in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Anschließend wurden Zytoplasmaextrakte hergestellt und im Western Blot mit Hilfe des spezifischen Antikörpers E10 (New England Biolabs; Verdünnung 1:2000) auf Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 untersucht. Nach Entfernen der Antikörper zum Nachweis der phosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 wurde der Blot mit dem polyklonalen Anti-p44/42 MAPK-Antikörper (New England Biolabs; Verdünnung 1:800), welcher gegen die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 gerichtet ist, rehybridisiert.

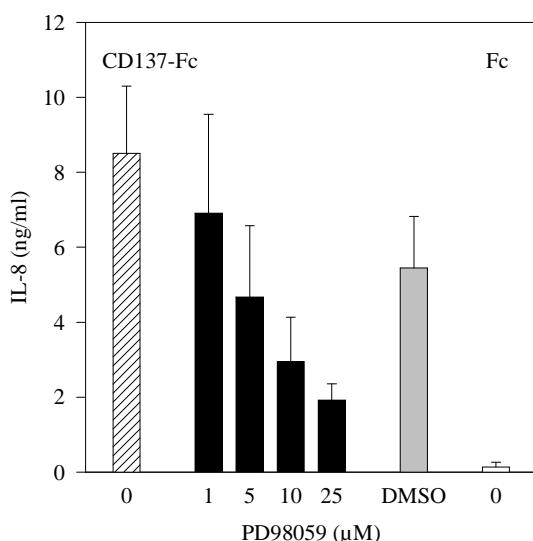
Wie aus Abb. 3.9 hervorgeht, weisen THP-1 Zellen, die in CD137-Fc-beschichteten Gewebekulturschalen inkubiert wurden, deutlich höhere Mengen an phosphorylierten p44 ERK1 und p42 ERK2 auf als Kontrollzellen, die parallel dazu auf immobilisiertem Fc-Protein inkubiert wurden. Dieser Effekt ist bereits nach 10 min deutlich erkennbar und tritt verstärkt nach 30 min auf. Wie die Rehybridisierung des Blots mit einem Antikörper gegen die unphosphorylierten Formen der beiden MAPK zeigt, ist die geringe Menge an phosphoryliertem Protein in den Fraktionen ab 60 min auf eine geringere Gesamtmenge an diesen MAPK, bedingt durch ungleichmäßigen Proteintransfer beim Western Blot bzw. durch einen Beladungsfehler bei der Fraktion mit Zytoplasmaextrakt von Zellen, die 60 min mit CD137-Fc stimuliert wurden, zurückzuführen. Jedoch ist erkennbar, daß auch nach 90-minütiger Inkubation der Gehalt an phosphoryliertem Protein in den CD137-Fc-stimulierten Zellen noch höher ist als in den Fc-Protein-behandelten Kontrollzellen. Diese durch CD137-Fc hervorgerufene Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 war ein erster Hinweis auf eine Beteiligung dieser Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen.

### 3.5.2 Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Sekretion durch PD98059

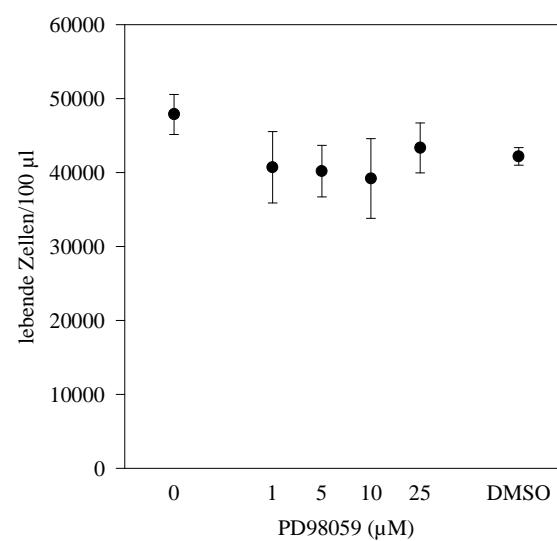
Zwei gut untersuchte *upstream*-Aktivatoren von ERK1 und ERK2 sind die MAPK Kinasen MEK (MAPK/ERK Kinase)1 und MEK2. PD98059, ein synthetischer Inhibitor des MAPK-Signalweges, hemmt spezifisch die Aktivierung von MEK1 und in geringerem Ausmaß von MEK2, ohne dabei andere MAPK, wie z.B. die SAPK (*stress-activated protein kinases*) oder die p38 MAPK zu beeinflussen (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Pang et al., 1995).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß CD137 die Phosphorylierung von ERK in monozytären Zellen induziert, sollte nun untersucht werden, ob der MAPK-Signalweg auch eine Rolle bei der Stimulierung der IL-8 Synthese in diesen Zellen spielt. Dazu wurden THP-1 Zellen für 10 min mit steigenden Konzentrationen an PD98059 bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelt und anschließend für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Im ELISA wurde dann die Konzentration an IL-8 in den Kulturüberständen bestimmt. Parallel dazu wurde mittels MTT-Test überprüft, ob der Inhibitor bzw. DMSO in den eingesetzten Konzentrationen zytotoxisch für die Zellen sind.

A)



B)



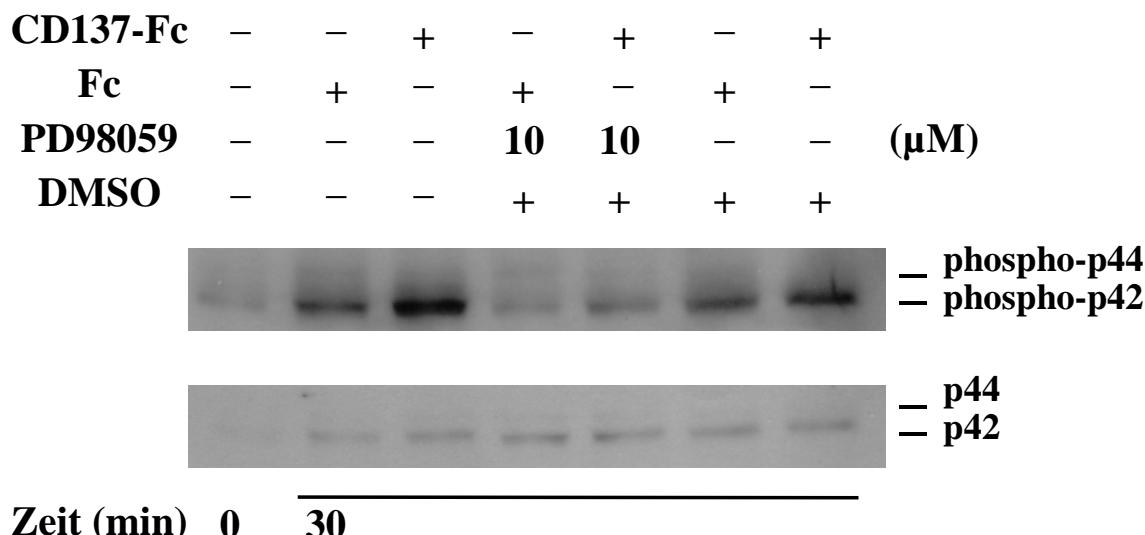
**Abb. 3.10: PD98059 hemmt die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Kulturmedium) wurden für 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an PD98059 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei der höchsten Konzentration an PD98059) vorinkubiert und anschließend für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, welche mit CD137-Fc ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein ( $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde dann im ELISA bestimmt. B) MTT-Test: THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Kulturmedium) wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an PD98059 bzw. 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei  $25 \mu\text{M}$

PD98059) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der lebenden Zellen ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplicaten  $\pm$  Standardabweichung.

Wie Abb. 3.10 zeigt, nimmt der Gehalt an IL-8 im Kulturüberstand mit steigender Inhibitorkonzentration deutlich ab, wohingegen das Lösungsmittel DMSO nur eine leicht hemmende Wirkung auf die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung zeigt. Der Rückgang der IL-8 Konzentration im Kulturüberstand ist dabei nicht auf eine Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen durch den Inhibitor zurückzuführen, wie der MTT-Test zeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß MEK1/2 bei der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung aus monozytären Zellen eine Rolle spielen.

### 3.5.3 Hemmung der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch PD98059

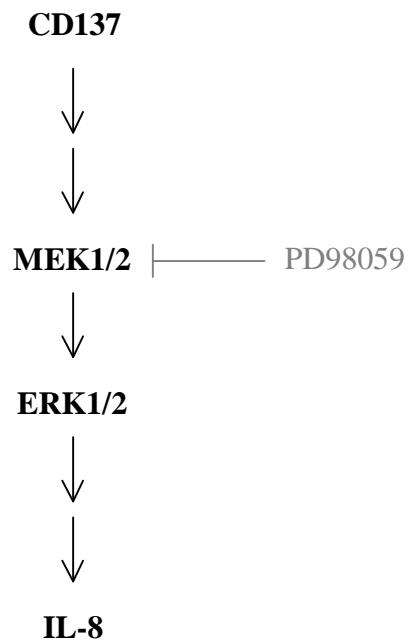
Im folgenden sollte untersucht werden, ob die CD137-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in monozytären Zellen tatsächlich durch MEK1 vermittelt wird. Dazu wurden THP-1 Zellen zunächst 10 min mit 10  $\mu$ M des Inhibitors bzw. mit DMSO vorbehandelt, bevor sie dann 30 min in Gewebekulturschalen inkubiert wurden, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Anschließend wurden von diesen Zellen Zytoplasmaextrakte gewonnen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde dann der Gehalt an phosphoryliertem ERK1 und ERK2 ermittelt.



**Abb. 3.11: PD98059 hemmt die CD137-Fc-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in THP-1 Zellen.** THP-1 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Leibovitz's L-15 Medium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an PD98059 bzw. mit 0,05 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei 10  $\mu$ M PD98059) vorinkubiert und

anschließend 30 min in Gewebekulturschalen inkubiert, welche mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Die Zytoplasmaextrakte dieser Zellen wurden im Western Blot mit Hilfe des spezifischen Antikörpers E10 (New England Biolabs; Verdünnung 1:2000) auf Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 untersucht. Nach Entfernen der Antikörper zum Nachweis der phosphorylierten Form von ERK1 und ERK2 wurde der Blot mit dem polyklonalen Anti-p44/42 MAPK-Antikörper (New England Biolabs; Verdünnung 1:800) rehybridisiert.

Wie Abb. 3.11 zeigt, hemmt PD98059 bei einer Konzentration von 10 µM deutlich die CD137-Fc-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, während das Lösungsmittel DMSO nur einen leichten Einfluß auf die Phosphorylierung hat. Der unterschiedliche Gehalt an phosphoryliertem Protein in den einzelnen Fraktionen ist dabei nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen, wie die Rehybridisierung des Blots mit einem Antikörper gegen die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 zeigt. Die Hemmung der CD137-Fc-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch PD98059 in THP-1 Zellen lässt darauf schließen, daß diese Kinasen tatsächlich den nächsten Schritt nach MEK1/2 im CD137 induzierten Signalweg in monozytären Zellen darstellen und bestätigt die Ergebnisse von Abschnitt 3.5.2 . In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse von Abschnitt 3.5 schematisch dargestellt.



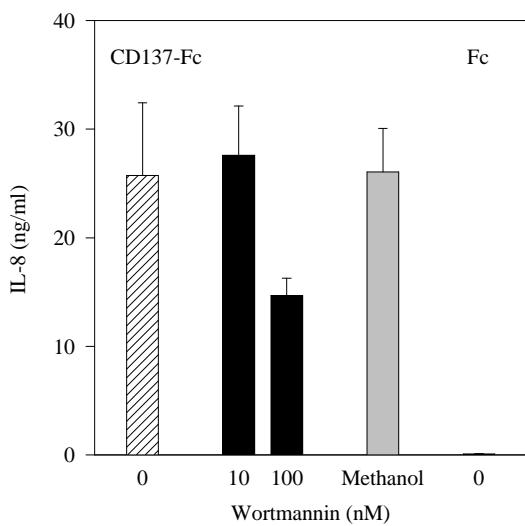
**Abb. 3.12:** Schematische Darstellung der CD137- induzierten Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 (ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; MEK1/2: MAPK/ERK Kinase 1/2; PD98059: Inhibitor der Aktivierung von MEK1/2).

## **3.6 Beteiligung von Phosphoinositid 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion in monozytären Zellen**

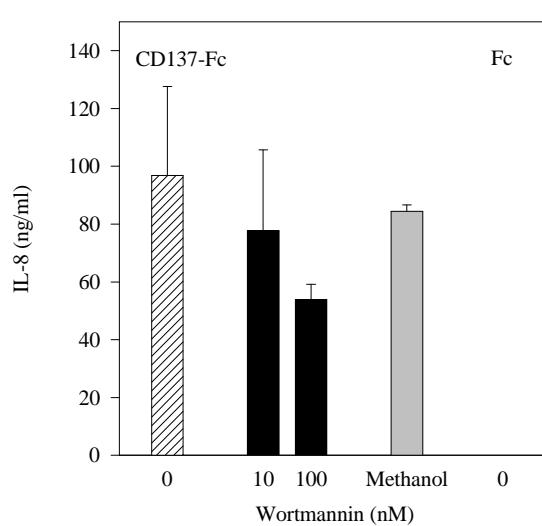
### **3.6.1 Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung durch Wortmannin**

Phosphoinositid (PI) 3-Kinasen sind Lipidkinasen, die sich aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Klassen unterteilen lassen. Klasse I PI 3-Kinasen werden, entsprechend ihrer Aktivierung über Wechselwirkung mit phosphorylierten Tyrosinresten oder durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimärer G-Proteine, weiter in Klasse I<sub>A</sub> und Klasse I<sub>B</sub> Enzyme unterteilt. Die Stimulation fast aller Rezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität induzieren, führt auch zur Aktivierung von Klasse I<sub>A</sub> PI 3-Kinasen (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). Da bei der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen src-Kinasen und Tyrosinphosphorylierung eine Rolle zu spielen scheinen, sollte nun untersucht werden, ob auch PI 3-Kinasen Bestandteil des CD137-induzierten Signalweges sind. Dazu wurden THP-1 Zellen bzw. primäre, humane Monozyten 10 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wortmannin, einem spezifischen Hemmstoff der PI 3-Kinasen (Arcaro & Wyman, 1993; Yano et al., 1993), bzw. mit dem Lösungsmittel Methanol vorinkubiert und anschließend in Gewebekulturschalen kultiviert, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 24 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet. Mit Hilfe eines ELISAs wurde dann die IL-8 Konzentration in diesen Überständen ermittelt. Parallel dazu wurde mittels MTT-Test der Einfluß von Wortmannin bzw. Methanol auf die Vitalität der Zellen untersucht.

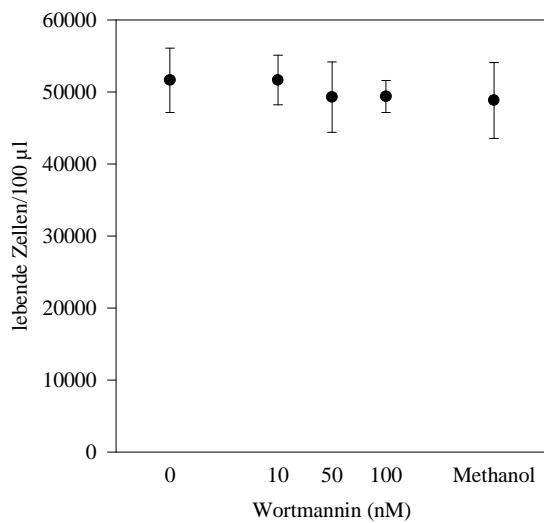
A) THP-1 Zellen



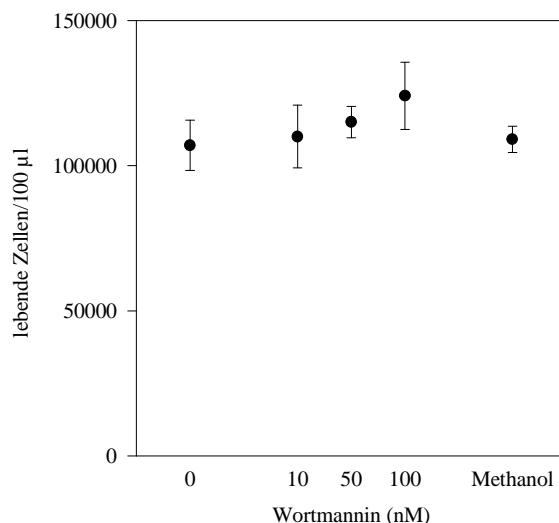
B) primäre, humane Monozyten



C) THP-1 Zellen



D) primäre, humane Monozyten

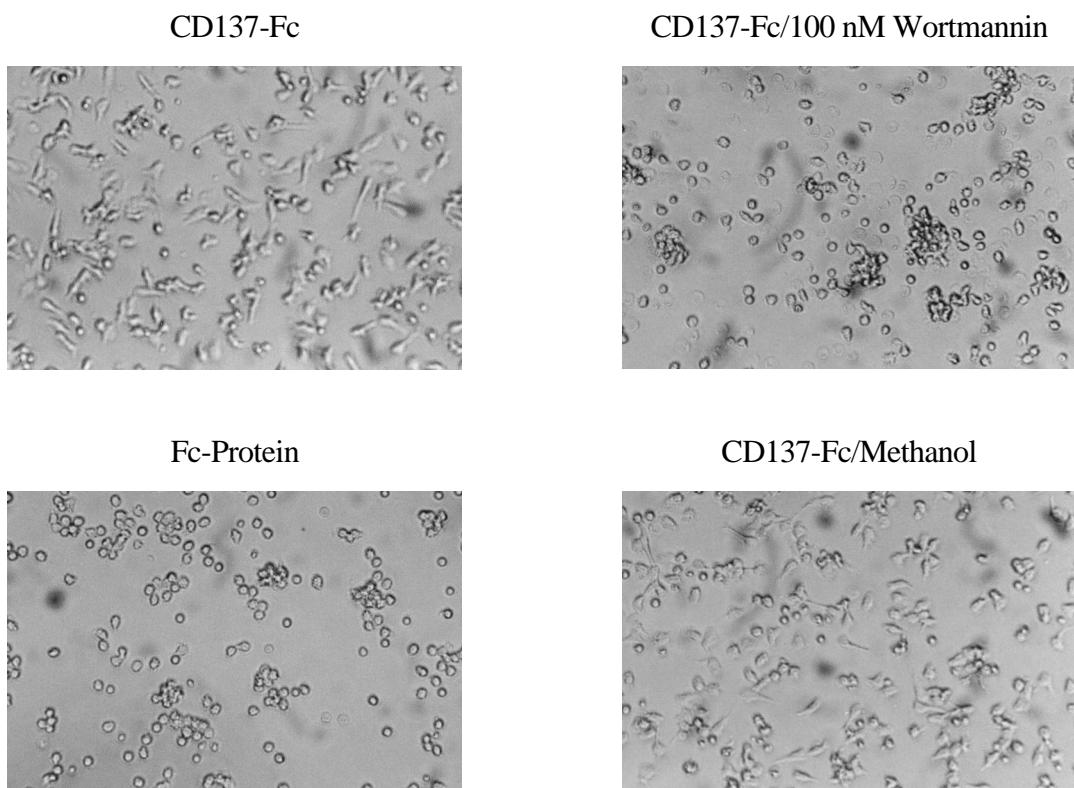


**Abb. 3.13: Wortmannin hemmt die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung in THP-1 Zellen und primären, huma-nen Monozyten.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) bzw. B) primäre Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an Wortmannin bzw. mit 0,01 % Methanol (entsprechend der Methanolkonzentration bei 100 nM Wortmannin) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration in den Kulturüberständen wurde dann mittels ELISA bestimmt. MTT-Test: C) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) bzw. D) primäre Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100 µl Kulturmedium) wurden für 24 h in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an Wortmannin bzw. 0,01 % Methanol (entsprechend der Methanolkonzentration bei 100 nM Wortmannin) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der leben-den Zellen ermittelt. Gezeigt sind Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, führt Wortmannin bei einer Konzentration von 100 nM sowohl in THP-1 Zellen als auch in primären, humanen Monozyten zu einer Abnahme der IL-8 Sekretion, wohingegen das Lösungsmittel Methanol in THP-1 Zellen keinen und in den primären Monozyten nur einen minimalen Einfluß auf die CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung hat. Verglichen mit der Methanol-Kontrolle beläuft sich der Rückgang der CD137-Fc-induzierten IL-8 Sekretion bei einer Inhibitorkonzentration von 100 nM dabei typischerweise auf etwa 40 %. In einem vergleichbaren Experiment mit THP-1 Zellen konnte jedoch auch eine Hemmung der IL-8 Freisetzung von etwa 85 % ermittelt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß PI 3-Kinasen bei der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung in monozytären Zellen eine Rolle spielen.

### 3.6.2 Hemmung der CD137-induzierten morphologischen Veränderungen und Adhärenz durch Wortmannin

Während der Kultur der mit Wortmannin bzw. Methanol behandelten Monozyten zeigte sich, daß die durch CD137-Fc hervorgerufenen morphologischen Veränderungen – ähnlich wie bei der Kultur in Gegenwart von PP1 – in Anwesenheit des Inhibitors ausbleiben. Die Zellen wurden daher vor der Ernte der Zellkulturüberstände fotografiert.



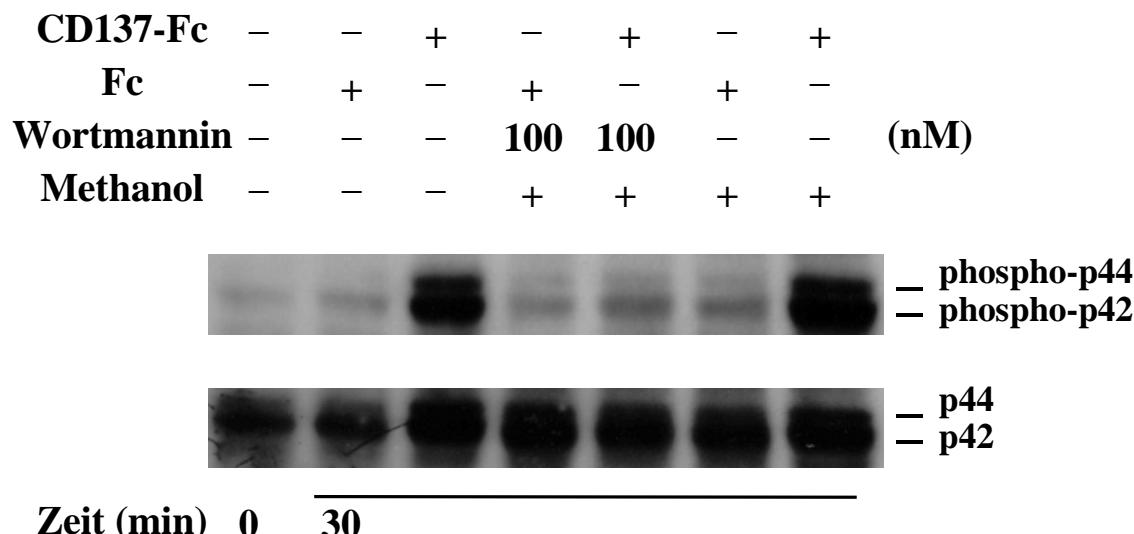
**Abb. 3.14: Wortmannin hemmt die CD137-Fc-induzierten morphologischen Veränderungen und die Adhärenz primärer, humaner Monozyten.** Humane Monozyten ( $10^6$  Zellen/ml Kulturmedium) wurden 10 min mit Wortmannin bzw. 0,01 % Methanol (entsprechend der Methanol-Konzentration bei 100 nM Wortmannin) vorinkubiert und dann 24 h

in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Anschließend wurden die Zellen fotografiert.

Wie Abb. 3.14 zeigt, ähneln die Zellen, die in Gegenwart von Wortmannin auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden, in ihrem Aussehen den Zellen, die auf immobilisiertem Fc-Protein gehalten wurden. Die unregelmäßigen Morphologien, die bei Stimulation der Monozyten mit CD137-Fc auftreten, fehlen. Die Methanol-Kontrolle unterscheidet sich dagegen in ihrem Aussehen nicht von Zellen, die ohne weitere Behandlung auf immobilisiertem CD137-Fc kultiviert wurden. Dies deutet darauf hin, daß PI 3-Kinasen auch für die CD137-induzierte Adhärenz von monozytären Zellen von Bedeutung sind.

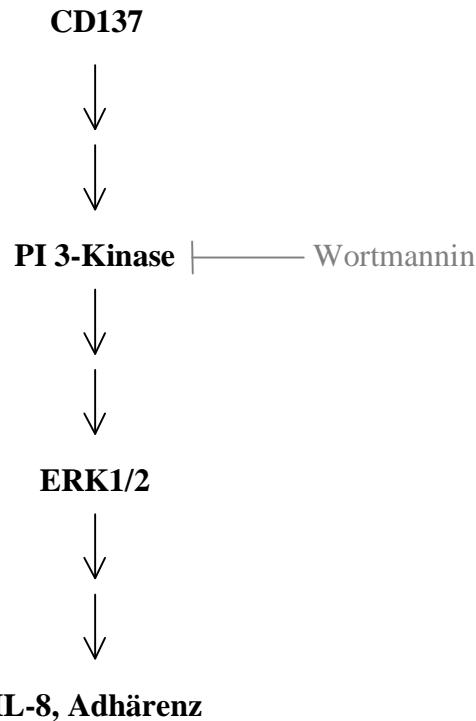
### **3.6.3 Hemmung der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch Wortmannin**

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, daß PI 3-Kinasen für die Aktivierung von ERK eine Rolle spielen (Von Willebrand et al., 1996; Finkelstein & Shimizu, 2000). Im folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob diese Kinasen auch an der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in monozytären Zellen beteiligt sind. Dazu wurden THP-1 Zellen 10 min mit 100 nM Wortmannin oder mit Methanol vorbehandelt und anschließend in Gewebekulturschalen gegeben, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 30-minütiger Inkubation wurden von den so vorbehandelten Zellen Zytoplasmaextrakte hergestellt und auf ihren Proteingehalt untersucht. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot wurden dann die MAPK ERK1 und ERK2 auf Phosphorylierung untersucht. Auch hierfür wurde wiederum der spezifische Antikörper E10 (New England Biolabs) verwendet, der p44 und p42 MAPK erkennt, welche sowohl an Threonin 202 als auch an Tyrosin 204 phosphoryliert sind.



**Abb. 3.15: Wortmannin hemmt die CD137-Fc-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in THP-1 Zellen.** THP-1 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Leibovitz's L-15 Medium) wurden 10 min mit Wortmannin bzw. mit 0,01 % Methanol (entsprechend der Lösungsmittelkonzentration bei 100 nM Wortmannin) vorinkubiert und dann für 30 min in Gewebekulturschalen inkubiert, die mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Die Zytoplasmaextrakte dieser Zellen wurden dann im Western Blot unter Verwendung des spezifische Antikörpers E10 (New England Biolabs; Verdünnung 1:2000) auf Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 untersucht. Nach Entfernen der Antikörper zum Nachweis der phosphorylierten Form von ERK1 und ERK2 wurde der Blot mit dem polyklonalen Anti-p44/42 MAPK-Antikörper (New England Biolabs; Verdünnung 1:800), welcher gegen die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 gerichtet ist, rehybridisiert.

Abb. 3.15 ist zu entnehmen, daß Wortmannin bei einer Konzentration von 100 nM zu einer weitgehenden Hemmung der durch CD137-Fc hervorgerufenen Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in THP-1 Zellen führt. Das Lösungsmittel Methanol hingegen hat keinen Einfluß auf die CD137-Fc-induzierte Phosphorylierung der MAPK. Die geringe Menge an phosphoryliertem Protein in der Fraktion mit Inhibitor ist dabei nicht auf eine verringerte Gesamtmenge an ERK, zurückzuführen, wie die Rehybridisierung des Blots mit dem Anti-p44/42 MAPK-Antikörper (New England Biolabs), welcher gegen die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 gerichtet ist, zeigt. Diese Daten deuten darauf hin, daß im CD137-induzierten Signalübertragungsweg in monozytären Zellen neben MEK auch PI 3-Kinasen *upstream* von ERK liegen. Die Ergebnisse von Abschnitt 3.6 sind in Abb. 3.16 schematisch dargestellt.

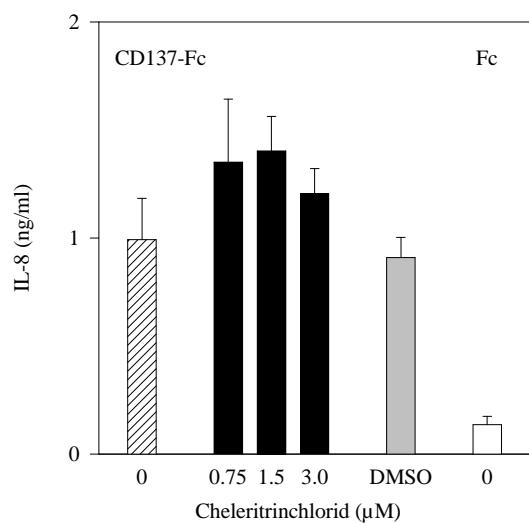


**Abb. 3.16:** Schematische Darstellung des CD137-induzierten PI 3-Kinase/ERK1/2-Signalweges (ERK1/2: *extra-cellular signal-regulated kinase 1/2*; PI 3-Kinase: Phosphoinositid 3-Kinase; Wortmannin: Inhibitor der PI 3-Kinase).

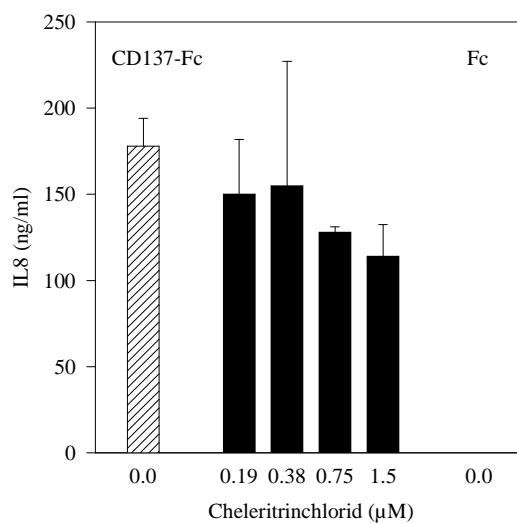
### 3.7 Proteinkinase C ist nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt

Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin-/Threoninkinase, von der in Säugern mehrere Isoformen bekannt sind (Alberts et al. – Molekularbiologie der Zelle, 1995). Für humane Monozyten konnte eine PI 3-Kinase-abhängige Aktivierung von PKC $\zeta$  gezeigt werden (Herrera-Velit et al., 1997) und PKC $\delta$  spielt eine Rolle bei der Ras-unabhängigen Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges (Ueda et al., 1996). Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob PKC an der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion in monozytären Zellen beteiligt ist, wurden THP-1 Zellen bzw. primäre, humane Monozyten 10 min mit dem spezifischen Hemmstoff Cheleritrinchlorid (Herbert et al., 1990) bzw. mit einem Lösungsmittelgemisch aus 80 % DMSO und 20 % H<sub>2</sub>O vorinkubiert und anschließend in Gewebekulturschalen inkubiert, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 24 h wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-8 untersucht. Um festzustellen, ob die Behandlung mit Inhibitor bzw. DMSO die Vitalität der Zellen beeinflusst, wurde parallel dazu ein MTT-Test durchgeführt.

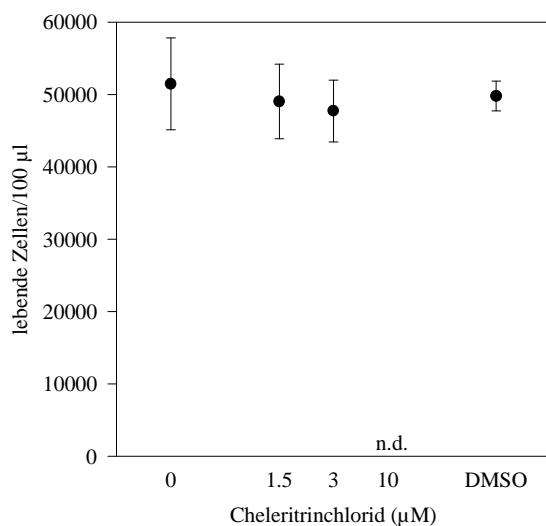
## A) THP-1 Zellen



## B) primäre, humane Monozyten



## C) THP-1 Zellen



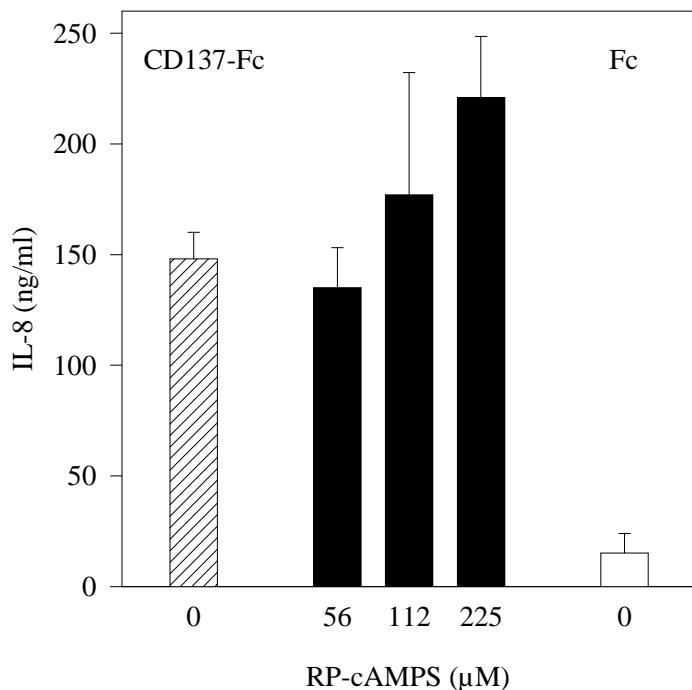
**Abb. 3.17: Cheleritrinchlorid hat keinen Einfluß auf die CD137-Fc-stimulierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen bzw. primären, humanen Monozyten.** A) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an Cheleritrinchlorid bzw. mit 0,04 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei der höchsten Konzentration an Cheleritrinchlorid) vorinkubiert. B) Primäre Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an Cheleritrinchlorid inkubiert. Danach wurden die THP-1 Zellen bzw. primären Monozyten für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5  $\mu$ g/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5  $\mu$ g/ml) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration in den Kulturüberständen wurde dann mittels ELISA bestimmt. MTT-Test: C) THP-1 Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden für 24 h in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an Cheleritrinchlorid bzw. 0,04 % DMSO (entsprechend der DMSO-Konzentration bei der höchsten Konzentration an Cheleritrinchlorid) kultiviert. Anschließend wurde die Zahl der lebenden Zellen ermittelt. Gezeigt sind Triplicate  $\pm$  Standardabweichung.

Wie Abb. 3.17 zeigt, bewirkt Cheleritrichlorid in THP-1 Zellen bei Konzentrationen bis zu 3 µM, bei denen die Vitalität dieser Zellen noch nicht wesentlich beeinträchtigt wird, keinen Rückgang der IL-8 Konzentration im Kulturüberstand. Ein vergleichbares Ergebnis lieferten auch entsprechende Experimente mit primären, humanen Monozyten. Diese Daten deuten darauf hin, daß PKC nicht Bestandteil des CD137-induzierten Signalweges in monozytären Zellen ist.

Alle bisher aufgezeigten Signalwege tragen zur CD137-induzierte Aktivierung der monozytären Zellen bei oder spielen keine Rolle bei der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in diesen Zellen. Es gibt jedoch auch einen Hinweis darauf, daß der CD137-induzierte Signalweg in monozytären Zellen negativ reguliert wird.

### **3.8 Hemmung der CD137-induzierten reversen Signalübertragung durch Proteinkinase A**

Die Wirkung von zyklischem AMP (cAMP), einem sekundären Botenstoff (*second messenger*), wird in tierischen Zellen hauptsächlich über die Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase, PKA) vermittelt (Alberts et al. – Molekularbiologie der Zelle, 1995). RP-cAMPS hemmt spezifisch die Aktivität dieser Kinase (Rothermel & Parker Botelho, 1988; Dostmann et al., 1990). Um festzustellen, ob PKA auch eine Rolle bei der durch CD137 hervorgerufenen reversen Signalübertragung in monozytären Zellen spielt, wurden primäre, humane Monozyten 10 min mit verschiedenen Konzentrationen an RP-cAMPS vorbehandelt und anschließend in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände geerntet. Mit Hilfe eines spezifischen ELISAs wurde dann die Konzentration an IL-8 in diesen Überständen bestimmt.



**Abb. 3.18: RP-cAMPS verstärkt die CD137-Fc-induzierte IL-8 Sekretion in primären, humanen Monozyten.** Humane Monozyten ( $10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium) wurden 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an RP-cAMPS vorinkubiert und anschließend für 24 h in Gewebekulturschalen kultiviert, die mit CD137-Fc (5  $\mu$ g/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (2,5  $\mu$ g/ml) beschichtet waren. Die IL-8 Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Triplikate  $\pm$  Standardabweichung.

Wie aus Abb. 3.18 hervorgeht, nimmt die IL-8 Konzentration im Überstand der mit CD137-Fc-stimulierten Monozyten mit steigender Hemmstoffkonzentration zu. Dies läßt darauf schließen, daß die Vitalität der Zellen durch den Hemmstoff nicht beeinträchtigt wird, weshalb auf die Durchführung eines MTT-Tests verzichtet werden konnte. Zwar beträgt der Anstieg der Zytokinkonzentration bei einer Inhibitorkonzentration von 225  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor nur etwa 50 %, jedoch war der Effekt gut reproduzierbar. Diese Daten deuten darauf hin, daß PKA einen hemmenden Einfluß auf die CD137-induzierte Signalübertragung ausübt.

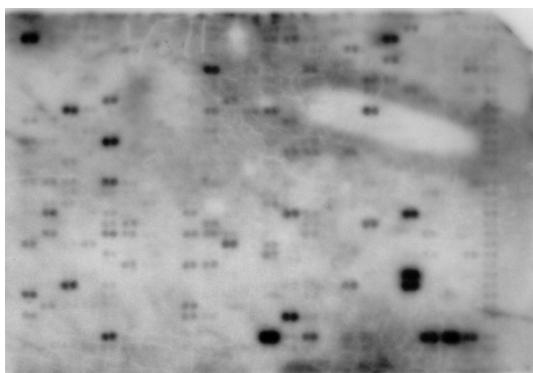
### 3.9 Analyse der CD137 regulierten Genexpression in monozytären Zellen mit Hilfe der cDNA-Arraytechnologie

Neben der Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen läßt auch die veränderte Expression einzelner Komponenten eines Signalweges einen Rückschluß auf eine Beteiligung dieses Signalweges an der Regulation bestimmter Prozesse zu. Mit Hilfe der cDNA-Arraytechnologie sollten deshalb Gene identifiziert werden, die in monozytären Zellen durch CD137 reguliert werden.

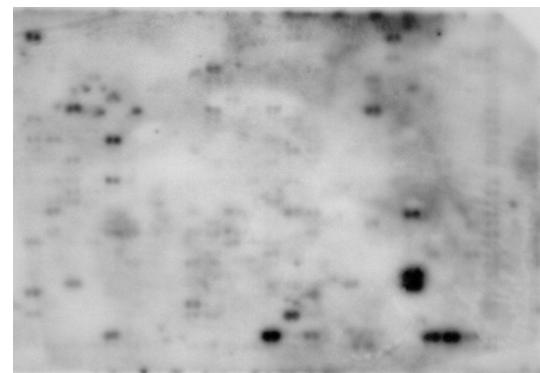
Für die Untersuchung der Genexpression mittels des Atlas<sup>TM</sup> Human cDNA Expression Array I (Clontech) wurden primäre, humane Monozyten 20 h, für die Analyse mittels des Human HL-60 cDNA-Arrays (RZPD) 6 h in Gewebekulturschalen kultiviert, welche mit CD137-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet waren. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, welche dann als Matrize für die Synthese von cDNA diente. cDNA für die Hybridisierung der Atlas Arrays wurde dabei direkt radioaktiv markiert, cDNA für die Hybridisierung der Human HL-60 cDNA-Arrays wurde vor der radioaktiven Markierung zunächst noch einem Amplifizierungsschritt mittels PCR unterzogen. Im Anschluß an die darauffolgende Hybridisierung wurden die Membranen gewaschen und autoradiographisch ausgewertet. Abb. 3.19 zeigt exemplarisch die Autoradiogramme der Atlas Arrays.

A)

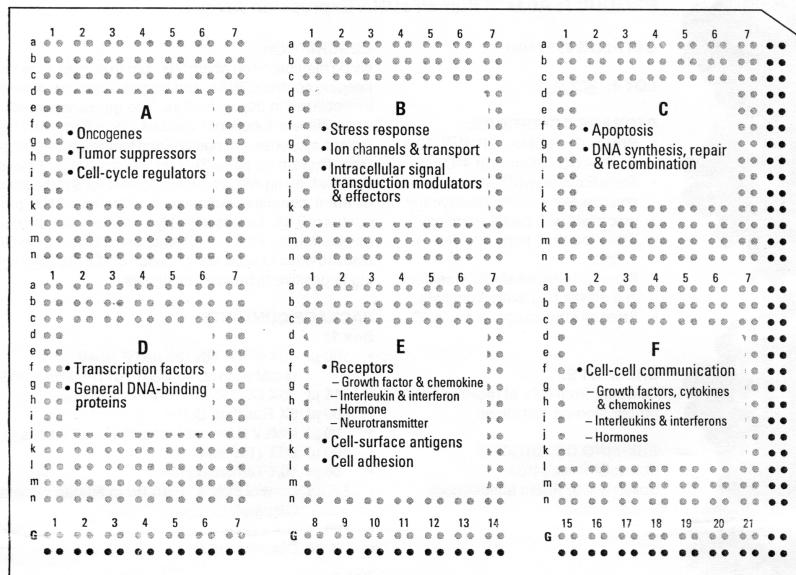
CD137-Fc



Fc



B)



**Abb. 3.19: Analyse der CD137-Fc regulierten Genexpression mit Hilfe des Atlas<sup>TM</sup> Human cDNA Expression Array I (Clontech)** A) Autoradiogramme von Arrays, die parallel mit cDNA-Sonden aus CD137-Fc- bzw. Fc-stimulierten primären, humanen Monozyten hybridisiert wurden. Monozyten ( $10^8$  Zellen in 20 ml Kulturmedium) wurden 20 h in Gewebekulturschalen kultiviert, welche mit CD137-Fc (5 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-

Protein (2,5 µg/ml) beschichtet waren. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, mit Hilfe des SMART-Protokolls (Clontech) in einzelsträngige cDNA transkribiert und amplifiziert. Danach wurde die cDNA radioaktiv markiert. Im Anschluß an die darauffolgende Hybridisierung wurden die Membranen gewaschen und autoradiographisch analysiert. B) Anordnung der als Doppelspots aufgetragenen cDNA-Fragmente auf dem Array.

Durch Vergleich der Autoradiogramme der Atlas Arrays, die parallel mit Sonden von CD137-Fc bzw. Fc-Protein-behandelten Monozyten hybridisiert worden waren, konnten mehrere Spots ermittelt werden, deren Hybridisierungssignale unterschiedliche Intensitäten aufwiesen. Die entsprechenden Gene sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Name des Gens	Genbank-Zugangsnummer	Regulation der Expression durch CD137-Fc
<b>Transkriptionsfaktoren:</b>		
AP-1 ( <i>activator protein-1</i> )	J04111	<b>Induktion</b>
NF-κB (Untereinheit p105)	M58603	<b>Induktion</b>
ZFM1	D26120	<b>Induktion</b>
<b>Moleküle der intrazellulären Signalübertragung :</b>		
Proteintyrosinkinase hck	U30473	<b>Induktion</b>
Proteinkinase MLK-3 ( <i>mixed lineage kinase 1</i> )	L32976	<b>Induktion</b>
ILK ( <i>integrin-linked kinase, mixed lineage kinase 2</i> )	U40282	<b>Induktion</b>
MacMARCKS	X70326	<b>Induktion</b>
PKA (katalytische Untereinheit α)	X07767	<b>Induktion</b>
<b>Rezeptoren:</b>		
C5A Anaphylatoxin chemotaktischer Rezeptor	M62505	<b>Induktion</b>
IL-2 Rezeptor (γ-Kette)	D11086	<b>Induktion</b>
Fibronectin-Rezeptor (α-Untereinheit)	X06256	<b>Induktion</b>
<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	M81750	<b>Hemmung</b>

**Tab. 3.1: Name, Genbank-Zugangsnummer und Regulation der Expression von Genen, deren Expression in primären, humanen Monozyten als durch CD137-Fc reguliert gefunden wurde.** Die zur Analyse im Atlas Array verwendete RNA wurde aus Zellen isoliert, die 20 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren.

In Tab. 3.2 sind die Namen von Genen aufgelistet, deren Expression bei der Analyse von CD137-Fc bzw. Fc-Protein-behandelten Monozyten mittels der Human HL-60 cDNA-Arrays als durch CD137 reguliert gefunden wurde. Nicht aufgelistet ist eine Reihe weiterer CD137 regulierter Gene, von denen bekannt ist, daß sie oft unspezifisch in Array-Hybridisierungen gefunden werden, wie z.B. ribosomale RNAs. Desweiteren wurden Gene, zu denen es kaum Informationen gab, außer z.B. Klonnummern, weggelassen.

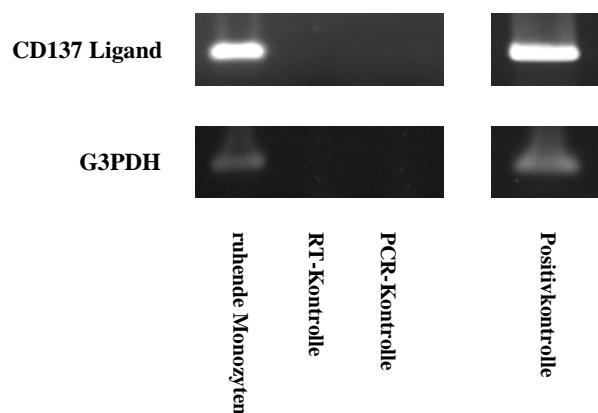
Name des Gens	Genbank-Zugangsnummer	Regulation der Expression durch CD137-Fc
Homo sapiens poly(A)-bindendes, zytoplasmatisches Protein 1 (PABPC1)	NM_002568	<b>Hemmung</b>
Humanes Homolog für <i>Drosophila lethal (3) malignant brain tumor (l(3)mbt) protein</i>	AL031681	<b>Hemmung</b>
Homo sapiens β-Aktin (ACTB)	NM_001101	<b>Hemmung</b>
Homo sapiens <i>voltage-dependent anion channel 1</i> (VDAC1)	NM_003374	<b>Induktion</b>
Homo sapiens Kalzium-bindendes Protein P22 (CHP)	NM_007236	<b>Hemmung</b>
Homo sapiens poly(A)-bindendes, zytoplasmatisches Protein 1 (PABPC1)	NM_002568	<b>Hemmung</b>
MHC Klasse I HLA-Bw62	D87665	<b>Hemmung</b>
Homo sapiens Aspartyl-tRNA Synthetase (DARS)	NM_001349	<b>Induktion</b>
Homo sapiens <i>telomerase-associated protein 1</i> (TEP1)	NM_007110	<b>Induktion</b>
Homo sapiens poly(A)-bindendes, zytoplasmatisches Protein 1 (PABPC1)	NM_002568	<b>Hemmung</b>
MHC Klasse I HLA-Cw*0602	X70857	<b>Hemmung</b>
humanes Laminin-bindendes Protein aus Kolonkarzinoma	J03799	<b>Hemmung</b>

**Tab. 3.2: Name, Genbank-Zugangsnummer und Regulation der Expression von Genen, deren Expression in primären, humanen Monozyten als durch CD137-Fc reguliert gefunden wurde.** Die zur Analyse mittels der Human HL-60 cDNA-Arrays verwendete RNA wurde aus Zellen isoliert, die 6 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren.

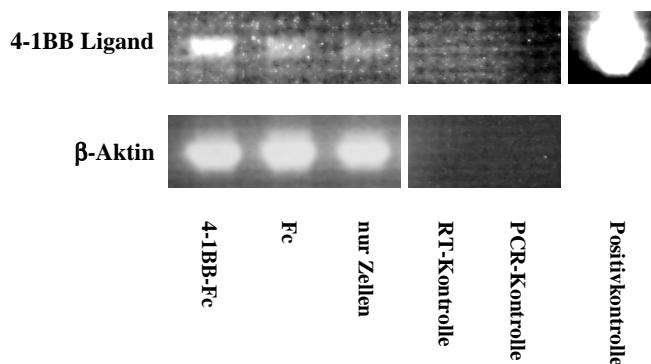
### 3.10 Expression der CD137 Ligand-mRNA in monozytären Zellen

Die aktivierende Wirkung von CD137 auf Monozyten sowie der kostimulatorische Effekt auf B-Lymphozyten bzw. die Apoptoseinduzierende Wirkung auf T-Lymphozyten und die Induktion von IL-8 in humanen Karzinom-Zelllinien sind vermutlich auf die Quervernetzung eines CD137 Liganden auf der Oberfläche dieser Zellen zurückzuführen. Der publizierte, humane CD137 Ligand (Alderson et al., 1994) konnte jedoch bislang in primären, humanen Monozyten nicht und in Lymphozyten nur nach deren Aktivierung nachgewiesen werden (Michel, 1998), was die Existenz weiterer, noch unbekannter Liganden für CD137 vermuten ließ. Allerdings konnte sowohl in THP-1 Zellen (Alderson et al., 1994) als auch in humanen B-Zellen (Pauly, 2000) und Karzinom-Zelllinien eine konstitutive Expression des bereits bekannten Liganden auf Ebene der RNA und in den Karzinom-Zelllinien auch auf Proteinebene (Salih et al., 2000) nachgewiesen werden. Dies wiederum ist ein Indiz dafür, daß die reverse Signalübertragung doch durch den bekannten CD137 Liganden vermittelt wird. Im folgenden sollten daher erneut ruhende, primäre, humane Monozyten mittels RT-PCR auf Expression des bekannten CD137 Liganden hin untersucht werden. Analog dazu wurden PEZ aus der Maus ebenfalls mit Hilfe von RT-PCR, auf Expression des bekannten Maus-Liganden untersucht. Diese Zellen waren zuvor 2 Tage in Gewebekulturschalen, welche mit 4-1BB-Fc bzw. Fc-Protein beschichtet oder unbeschichtet waren, kultiviert worden.

A) primäre, humane Monozyten



## B) PEZ aus der Maus



**Abb. 3.20: Analyse der Expression der CD137 Ligand-mRNA in primären, humanen Monozyten und Maus-PEZ mittels RT-PCR.** A) Aus ruhenden, humane Monozyten wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die PCR erfolgte unter Verwendung der Primerpaare hILA-Lig-sen und hILA-Lig-as bzw. G3PDH-sense und G3PDH-antisense. Als RT-Kontrolle wurde ein RT-Ansatz ohne RNA, als PCR-Kontrolle ein PCR-Ansatz ohne cDNA verwendet. Als Positivkontrolle diente cDNA aus ruhenden THP-1 Zellen. Die spezifischen Amplifikationsprodukte für den CD137 Liganden und für G3PDH wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. B) PEZ aus der Maus wurden für 2 Tage in Gewebekulturschalen inkubiert, welche mit 4-1BB-Fc (3 µg/ml) bzw. äquimolaren Konzentrationen an Fc-Protein (1,5 µg/ml) beschichtet oder unbeschichtet waren. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Für die PCR wurden die Primerpaare 4-1BB-L-SEN und 4-1BB-L-AS bzw. β-Aktin-for und β-Aktin-rev verwendet. Als RT-Kontrolle diente wiederum ein RT-Ansatz ohne RNA, als PCR-Kontrolle ein PCR-Ansatz ohne cDNA. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pcDNA3::4-1BBL (KI12) verwendet. Die PCR-Produkte wurden wiederum mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Wie Abb. 3.20 zeigt, wird die mRNA für den bekannten, humanen CD137 Liganden in primären, humanen Monozyten, entgegen bisheriger Annahmen, konstitutiv synthetisiert. Ebenso ist die mRNA für den publizierten Maus-Liganden in PEZ konstitutiv vorhanden. Diese Ergebnisse sind ein Indiz dafür, daß die CD137-vermittelten, stimulatorischen Signale für primäre, humane Monozyten bzw. PEZ aus der Maus über den, für die jeweilige Art bekannten, CD137 Liganden übertragen werden können.

## 4 Diskussion

### 4.1 CD137-induzierte reverse Signalübertragung in PEZ aus der Maus und THP-1 Zellen

CD137 ist ein Mitglied der TNF Rezeptorfamilie. Für mehrere Mitglieder dieser Familie, wie CD27, CD30, CD40, Ox40 oder RANK (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*), wurde bidirektionelle Signaltransduktion beschrieben (vgl. Einleitung). Auch für CD137 gab es Hinweise auf eine reverse Signalübertragung. So hemmt immobilisiertes CD137 die Proliferation aktiverter, humarer T-Zellen und induziert Apoptose in diesen Zellen (Schwarz et al., 1996). Dagegen verstärkt es die Proliferation und Immunglobulinsynthese voraktivierter, humarer B-Zellen (Pauly, 2000). Auch primäre, humane Monozyten werden durch CD137 aktiviert. So reagieren sie bei Kultivierung auf immobilisiertem CD137 mit der Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8 oder TNF. Zudem fördert immobilisiertes CD137 die Adhärenz und das Überleben dieser Zellen (Langstein et al., 1998; Langstein & Schwarz, 1999). Außerdem werden primäre, humane Monozyten durch CD137 zur Proliferation angeregt (Langstein et al., 1999b). Schließlich fördert immobilisiertes CD137 oder CD137, welches auf der Oberfläche von Spheroïden exprimiert wird, die Wanderung dieser Zellen *in vitro* bzw. in die Spheroide (Becke et al., eingereicht). Bisher war nichts über eine solche CD137-induzierte reverse Signalübertragung in monozytären Zellen bekannt. Diese Arbeit liefert erste Hinweise auf eine CD137-induzierte reverse Signaltransduktion auch in PEZ aus der Maus und in humanen THP-1 Zellen. So ruft immobilisiertes CD137 in diesen Zellen morphologische Veränderungen hervor, die typischerweise bei der Adhärenz von Monozyten auftreten (Andreesen et al., 1990). Zudem bewirkt immobilisiertes CD137 die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus diesen Zellen. So führt die Kultur von PEZ auf immobilisiertem CD137 zur Freisetzung von IL-6 aus diesen Zellen. In THP-1 Zellen stimuliert immobilisiertes CD137 die Sekretion von IL-8. Auch über die Mechanismen und die an der reversen Signalübertragung von CD137 beteiligten Moleküle war bisher nichts bekannt.

### 4.2 Beteiligung von src-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen

In dieser Arbeit konnte mittels Western Blot-Analyse mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper gezeigt werden, daß die Stimulation von monozytären Zellen mit immobilisiertem CD137 zu einer

Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung in diesen Zellen führt. Dabei werden u.a. auch Proteine mit einem Molekulargewicht von 50 – 60 kDa phosphoryliert. Da dies dem Molekulargewicht von src-Kinasen entspricht (Rudd et al., 1993; Resh, 1994; Superti-Furga & Courtneidge, 1995), wurde vermutet, daß Mitglieder der src-Familie an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung beteiligt sind. Gestützt wurde diese Annahme durch verschiedene Untersuchungen, aus denen hervorgeht, daß src-Kinasen wichtige Bestandteile im Signalweg mehrerer Monozyten bzw. Makrophagen aktivierender Faktoren sind (Stefanova et al., 1993; Boulet et al., 1994). So z.B. bewirkt LPS die Aktivierung der src-Kinasen p53/56<sup>lyn</sup>, p58/64<sup>hck</sup> und p59<sup>c-fgr</sup> (Stefanova et al., 1993). Zudem konnte in GST-Fusionsprotein Interaktionsassays auch für den CD95 Liganden, einem anderen Mitglied der TNF Familie, für welches reverse Signalübertragung in T-Zellen beschrieben wurde (Suzuki und Fink, 1998; 2000), Wechselwirkung mit verschiedenen Mitgliedern der src-Kinasefamilie, wie fyn, yes und lck, gezeigt werden (Sanzenbacher et al., 2001). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß PP1, ein Inhibitor von src-Kinasen (Hanke et al., 1996), die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung aus monozytären Zellen hemmt. Dies deutet darauf hin, daß Tyrosinkinasen der src-Familie bei der CD137-stimulierten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in monozytären Zellen eine Rolle spielen, wobei natürlich nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß PP1 neben Mitgliedern der src-Kinasefamilie auch noch andere Enzyme beeinflußt (Blake et al., 1999). Jedoch hemmt PP1 auch die CD137-induzierten morphologischen Veränderungen, welche mit der Adhärenz von Monozyten einhergehen, was darauf hindeutet, daß an diesen Vorgängen ebenfalls src-Kinasen beteiligt sind. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß src-Kinasen auch bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion eine Rolle spielen. So führt die Integrin-abhängige Adhäsion von Neutrophilen an Proteinen der Extrazellulärmatrix zur Aktivierung der src-Kinasen hck, fgr und lyn (Berton et al., 1994, 1996). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, daß die Integrin-vermittelte Anheftung und Ausbreitung von Neutrophilen aus hck/fgr- sowie von Peritonealexsudatzellen aus hck/fgr/lyn-defizienten Mäusen gestört ist. Diese Zellen haften nur schwach an mit Proteinen der Extrazellulärmatrix beschichteten Oberflächen und zeigen nicht die für die Wechselwirkung mit diesen Proteinen typischen morphologischen Veränderungen (Lowell et al., 1996; Meng & Lowell, 1998). Ähnlich sind auch Adhäsion, Migration und Organisation des Zytoskeletts in Fibroblasten und neuronalen Zellen aus src- und fyn-defizienten Mäusen gestört (Beggs et al., 1994; Thomas et al., 1995). src-Kinasen spielen jedoch nicht nur bei der Integrin-abhängigen sondern auch bei der LPS-vermittelten Zelladhäsion eine Rolle. So kann die LPS-induzierte Anheftung und Ausbreitung von humanen Monozyten durch PP1 gehemmt werden (Williams & Ridley, 2000). Und Untersuchungen von Scholz et al. (2000) deuten auf eine Beteiligung von hck bei der LPS-stimulierten Adhärenz von Makrophagen. Zwar wurde dieses Mitglied

der src-Familie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht auf eine potentielle Aktivierung durch CD137 untersucht. Jedoch wurde die mRNA für diese Kinase bei der Analyse der Genexpression humaner Monozyten, welche 20 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein inkubiert worden waren, als durch CD137-Fc hochreguliert gefunden. Möglicherweise erfolgt die durch CD137 hervorgerufene Induktion der morphologischen Veränderungen und der Freisetzung von IL-8 in monozytären Zellen über die Aktivierung der src-Kinase hck. Die Erhöhung der Expression dieser Kinase könnte dann zu einer Verstärkung der durch CD137 hervorgerufenen Effekte in diesen Zellen beitragen.

### **4.3 Beteiligung von MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen**

Die Stimulierung von monozytären Zellen mit immobilisiertem CD137-Fc führt u.a. zur Tyrosinphosphorylierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Dies ließ eine Beteiligung von MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in diesen Zellen vermuten. MAPK-Kaskaden gehören mit zu den am weitest verbreiteten, intrazellulären Signalübertragungsmechanismen in eukaryotischen Zellen, einschließlich Säugerzellen. Kernbestandteile aller MAPK-Signalwege sind drei aufeinanderfolgende Kinasen, zu denen die MAPK (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK), die MAPK Kinase (MAPKK oder MAPK/ERK Kinase, MEK) und die MAPKK Kinase (MAPKKK oder MEK Kinase, MEKK) gehören. Die Aktivierung der MAPK erfolgt über Phosphorylierung an einem Tyrosin- und einem Threoninrest durch die *upstream* liegenden MAPKK. Diese wiederum werden durch die Serin-/Threonin-spezifischen MAPKKK phosphoryliert und dadurch aktiviert. Zu den wichtigsten MAPK-Signalwegen in Säugern gehören der Ras-Signalweg (ERK-Signalweg), der p38 MAPK-Signalweg und der SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*)-Signalweg (Treisman, 1996; Robinson & Cobb, 1997; Elion, 1998; Garrington & Johnson, 1999; Schaeffer & Weber, 1999; Reuter et al., 2000; Kyriakis & Avruch, 2001).

#### **4.3.1 Beteiligung der p38 MAPK**

Chen et al. (2001) konnten zeigen, daß die RANK-Fc-induzierte reverse Signalübertragung in aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch p38 MAPK vermittelt wird. RANK ist, wie CD137, ein Mitglied der TNF Rezeptorfamilie, weshalb vermutet wurde, daß auch die CD137-induzierte reverse Signalübertragung über p38 MAPK verläuft. Die p38 MAPK sind eine Familie von Kinasen, die derzeit vier Isoformen – p38 $\alpha$  (CSBP (CSAIDs (*cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs*) bin-

ding protein, SAPK2a), p38 $\beta$  (SAPK2b, p38-2), p38 $\gamma$  (SAPK3, ERK6) und p38 $\delta$  (SAPK4) umfaßt (Freshney et al., 1994; Han et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994; Zervos et al., 1995; Jiang et al., 1996; Lechner et al., 1996; Mertens et al., 1996; Goedert et al., 1997; Jiang et al., 1997; Stein et al., 1997; Wang et al., 1997). Die Aktivierung dieser Kinasen erfolgt durch die MEK MKK3 (MEK3 oder SAPK Kinase 2, SKK2) und MKK6 (MEK6 oder SAPK Kinase 3, SKK3), die beide spezifisch die p38 MAPK phosphorylieren. Die Aktivierung von SAPK oder ERK durch diese MEK konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Derijard et al., 1995; Cuenda et al., 1996; Raingeaud et al., 1996; Cuenda et al., 1997). MKK3 und MKK6 unterscheiden sich in ihrer Spezifität für verschiedene Isoformen von p38. So phosphoryliert MKK3 bevorzugt p38 $\alpha$  und p38 $\beta$ , wohingegen MKK6 alle Isoformen der p38 MAPK aktivieren kann (Cuenda et al., 1996; 1997). MKK3 und MKK6 selbst können durch verschiedene MEKK, wie z.B. MEKK3 oder ASK1 (*apoptosis-signal-regulating kinase 1*), oder durch TAOs (*thousand and one kinases*), wie z.B. TAO1 und TAO2, aktiviert werden (Überblick bei Kyriakis & Avruch, 2001).

Mittels Western Blot-Analysen von CD137-Fc bzw. Fc-Protein-behandelten THP-1 Zellen mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 MAPK konnte gezeigt werden, daß auch CD137 die Phosphorylierung der p38 MAPK induziert. Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, daß diese Kinasen eine wichtige Rolle bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine spielen. So kommt den p38 MAPK eine Schlüsselrolle bei der LPS-induzierten IL-1 Produktion zu (Young et al., 1993; Lee et al., 1994; Gallagher et al., 1995; Baldassare et al., 1999). Auch sind p38 MAPK für die Regulation der Expression von TNF und IL-6 von Bedeutung (Young et al., 1993; Lee et al., 1994; Wysk et al., 1999; Rutault et al., 2001). Aus Untersuchungen von Holtmann et al. (1999) geht hervor, daß die Synthese von IL-8 durch verschiedene MAPK-Kaskaden, u.a. auch durch den p38 MAPK-Signalweg, reguliert wird. In Übereinstimmung damit konnten Hashimoto et al. (1999) zeigen, daß p38 MAPK bei der TNF- bzw. IL-1 $\alpha$ -induzierten IL-8 Expression in vaskulären Endothelzellen aus der Lunge eine Rolle spielen. Auch sind p38 MAPK für die LPS- bzw. LAMPf (Lipoproteine aus *Mycoplasma fermentans*)-stimulierte IL-8 Produktion in humanen Monozyten bzw. PMN (*polymorph nuclear cells*) von Bedeutung, wie aus Untersuchungen von Marie et al. (1998) hervorgeht.

SB203580 gehört zu einer Gruppe von bizyklischen Pyridinylimidazolen, welche die Synthese von Zytokinen, wie z.B. IL-1 und TNF hemmen (Lee et al., 1994; Gallagher et al., 1995) und daher auch als CSAIDs (*cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs*) bezeichnet werden (Kyriakis & Avruch, 2001). Diese Stoffe hemmen spezifisch p38 $\alpha$  und  $\beta$ , wohingegen p38 $\gamma$  und  $\delta$  durch diese Stoffe nicht beeinflußt werden (Goedert et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß

SB203580 die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen hemmt. Dies läßt darauf schließen, daß p38 $\alpha$  bzw.  $\beta$  auch bei der CD137-induzierten Expression dieses Chemokins eine Rolle spielen. Jedoch bewirken relativ hohe Hemmstoffkonzentrationen von 40  $\mu$ M nur einen Rückgang der CD137-induzierten IL-8 Sekretion um etwa 50 %, verglichen mit Zellen, die in Gegenwart des Lösungsmittels DMSO auf immobilisiertem CD137 kultiviert wurden. Es ist daher zu vermuten, daß auch bei der CD137-induzierten reversen Signalübertragung noch weitere MAPK-Kaskaden eine Rolle spielen.

#### **4.3.2 Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2**

Eine weitere gut untersuchte MAPK-Kaskade stellt der ERK-Signalweg dar, welcher z.B. durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert wird. Nach Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras kommt es im Verlauf dieses Signalweges zur Aktivierung von Raf-Kinasen. Diese MAPKKK aktivieren dann die MAPKK MEK1 und MEK2, welche wiederum die MAPK ERK1 und ERK2 phosphorylieren (zusammengefaßt in Reuter et al., 2000). In dieser Arbeit konnte mittels Western Blot mit einem gegen die phosphorylierte Form von ERK1 und ERK2 gerichteten Antikörper gezeigt werden, daß die Stimulierung von monozytären Zellen mit CD137-Fc zur Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 führt. Diese Phosphorylierung kann durch PD98059, einen synthetischen Inhibitor, welcher spezifisch die Aktivierung von MEK1 und in geringerem Ausmaß von MEK2 unterbindet (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Pang et al., 1995), gehemmt werden. PD98059 hemmt außerdem die durch immobilisiertes CD137-Fc-induzierte IL-8 Freisetzung aus diesen Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2 an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen.

Auch bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine durch verschiedene andere Stimuli spielen die MAPK ERK1 und ERK2 eine Rolle. So z.B. konnten Van der Bruggen et al. (1999) und Rutault et al. (2001) zeigen, daß ERK1 und ERK2 für die Induktion der TNF Synthese in humanen Monozyten durch LPS von Bedeutung sind. Und auch für die LPS-induzierte IL-8 Freisetzung aus humanen Monozyten bzw. Makrophagen und PMN spielt neben der p38 MAPK-Kaskade auch der ERK-Signalweg eine Rolle, wie aus Experimenten mit den Inhibitoren SB203580 bzw. PD98059 hervorgeht (Marie et al., 1999). Bruder & Kovesdi (1997) konnten außerdem zeigen, daß ERK1 und ERK2 für die Induktion von IL-8 bei Infektion von HeLa Zellen mit Adenovirus von Bedeutung ist. Dagegen konnte für die IgG2-stimulierte IL-8 Synthese in humanen, peripheren, mononukleären Blutzellen keine Beteiligung des ERK-Signalweges nachgewiesen werden (Foreback et al., 1998).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Zell- und Stimulus-spezifische Regulation der IL-8 Produktion (Marie et al., 1999).

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, daß auch die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen an Proteine der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin, Laminin, Kollagen oder Vitronectin zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt (Chen et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994; Zhu & Assoian, 1995; Clark & Hynes, 1996; Renshaw et al., 1997). Die Adhäsion an Substrate wie z.B. poly-L-Lysin, welche ohne Beteiligung von Integrinen erfolgt, bewirkt dagegen keine Aktivierung dieser MAPK (Chen et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994; Miyamoto et al., 1995; Zhu & Assoian, 1995). Im Gegensatz zur kurzzeitigen Aktivierung von ERK durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF (*epidermal growth factor*), welche typischerweise nur einige Minuten dauert (Zhu & Assoian, 1995; Aplin & Juliano, 1999), führt die Integrin-vermittelte Adhäsion zu einer längeranhaltenden, bis zu 2-stündigen Aktivierung dieser MAPK (Chen et al., 1994; Clark & Hynes, 1996; Lin et al., 1997; Renshaw et al., 1997). Auch die durch immobilisiertes CD137-Fc hervorgerufene Phosphorylierung von ERK hält mindestens 90 min an. Dies läßt vermuten, daß Integrine bei der durch immobilisiertes CD137 induzierten Adhäsion von monozytären Zellen eine Rolle spielen. Passend hierzu liefert die vorliegende Arbeit einen Hinweis darauf, daß CD137 die Expression von Bestandteilen des Integrin-Signalweges, wie z.B. ILK (*integrin-linked kinase*), stimuliert (siehe Abschnitt 4.7 ).

Wie aus neueren Untersuchungen hervorgeht, fördert immobilisiertes CD137 oder CD137, welches auf der Oberfläche von Spheroiden exprimiert wird, die Wanderung von humanen Monozyten *in vitro* bzw. in die Spheroide (Becke et al., eingereicht). Auch ERK spielt eine Rolle bei der Migration von Zellen (Klemke et al., 1997; Wei et al., 1998; Nguyen et al., 1999). So konnte gezeigt werden, daß Zellen, die eine konstitutiv aktive Form von MEK exprimieren, durch die Aktivierung von ERK und die darauffolgende Phosphorylierung von MLCK (*myosin light chain kinase*) verstärkt zur Migration auf Komponenten der Extrazellulärmatrix angeregt werden. Entsprechend wird durch die Hemmung von MEK mittels PD98059 die Phosphorylierung von MLCK und die Wanderung der Zellen auf Kollagen gehemmt (Klemke et al., 1997). Auch die uPA (*urokinase-type plasminogen activator*)-stimulierte, Integrin-vermittelte Wanderung verschiedener Tumor-Zelllinien erfordert die Aktivierung des ERK-Signalweg und die Phosphorylierung von MLCK (Nguyen et al., 1999). Diese Daten lassen vermuten, daß MEK und ERK nicht nur bei der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung aus monozytären Zellen sondern auch bei der CD137-stimulierten Migration dieser Zellen eine Rolle spielen.

#### **4.4 Beteiligung von PI 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen**

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, daß Wortmannin bei einer Konzentration von 100 nM zumindest teilweise die durch immobilisiertes CD137-Fc stimulierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen und primären, humanen Monozyten hemmt. Auch die durch immobilisiertes CD137-Fc hervorgerufenen morphologischen Veränderungen in Monozyten sind in Anwesenheit des Hemmstoffs nicht zu beobachten. Wortmannin ist eine niedermolekulare Verbindung, die bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich relativ spezifisch PI 3-Kinasen hemmt (Arcaro & Wyman, 1993). Die Ergebnisse deuten daher auf eine Beteiligung von PI 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signaltransduktion in monozytären Zellen hin.

PI 3-Kinasen sind eine Familie von Lipidkinasen, die die Addition eines Phosphatmoleküls an Position 3 des Inositolrings von Phosphoinositiden (PI) katalysieren (Rameh & Cantley, 1999). Die Mitglieder dieser Familie werden aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität in drei Klassen unterteilt (Domin & Waterfield, 1997; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999) und können vier verschiedene Lipidprodukte – das einfach phosphorylierte Phosphatidylinositol (PtdIns)-3-P, das zweifach phosphorylierte PtdIns-3, 4-P<sub>2</sub> bzw. PtdIns-3, 5-P<sub>2</sub> und das dreifach phosphorylierte PtdIns-3, 4, 5-P<sub>3</sub> – erzeugen (Rameh & Cantley, 1999). Bei den Klasse I PI 3-Kinasen handelt es sich um Heterodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa, die sich aus einer katalytischen Untereinheit mit ca. 110 – 120 kDa und einer regulatorischen Untereinheit mit etwa 50 – 100 kDa zusammensetzen. Diese können *in vitro* PtdIns, PtdIns 4-P und PtdIns-4, 5-P<sub>2</sub> phosphorylieren. *In vivo* scheint dagegen letzteres das bevorzugte Substrat zu sein (Stephens et al., 1991; Hawkins et al., 1992). Für die Aktivität von PI 3-Kinasen ist deren Rekrutierung an die Plasmamembran erforderlich. Entsprechend den an diesem Vorgang beteiligten Adaptorproteine können Klasse I PI 3-Kinasen weiter in zwei Gruppen unterteilt werden (Wyman & Pyrola, 1998; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). Die prototypische Klasse I<sub>A</sub> PI 3-Kinase besteht aus einer regulatorischen Untereinheit mit 85 kDa (p85), welche die Wechselwirkung mit Phosphotyrosinresten anderer Proteine vermittelt, und einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa (p110; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). In Säugern sind bisher drei solche Isoformen von p110 - p110 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  - bekannt. Während jedoch p110 $\alpha$  und  $\beta$  von vielen Zellarten exprimiert werden, findet man p110 $\delta$  hauptsächlich in Leukozyten. PI 3-Kinase  $\gamma$  ist die einzige bisher beschriebene Klasse I<sub>B</sub> PI 3-Kinase (Wymann & Pyrola, 1998; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). Sie setzt sich aus der katalytischen Untereinheit p110 $\gamma$  und dem Adaptorprotein von 101 kDa (p101) zusammen (Stephens et al., 1994; 1997; Van-

haesebroeck & Waterfield, 1999). Klasse I<sub>B</sub> PI 3-Kinasen werden durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aktiviert. Die Klasse II PI 3-Kinasen sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 170 – 210 kDa und einer charakteristischen C-terminalen C2 Homologiedomäne. Sie weisen *in vitro* Substratspezifität für PtdIns und PtdIns 4-P auf. Bisher konnten keine Adaptormoleküle für diese Klasse von PI 3-Kinasen identifiziert werden. Der Mechanismus ihrer Aktivierung ist ebenfalls unbekannt (Wymann & Pyrola, 1998). Klasse III PI 3-Kinasen schließlich sind Homologe des *S. cerevisiae* Vps34p (*vesicular protein-sorting protein*, Herman & Emr, 1990) und phosphorylieren ausschließlich PtdIns (Schu et al., 1993). Da die Menge an PtdIns-3-P in der Zellen praktisch konstant bleibt, wird angenommen, daß die physiologischen Prozesse, an denen Klasse III PI 3-Kinasen beteiligt sind, nicht unmittelbar von einer Stimulation der Zelle abhängen (Vanhaezebroeck & Waterfield, 1999).

Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Bedeutung PI 3-Kinasen für die Expression proinflammatorischer Zytokine haben. Neueren Daten von Pan et al. (2000) deuten jedoch darauf hin, daß PI 3-Kinasen bei der fMet-Leu-Phe (fMLP)-stimulierten Expression von IL-1 $\beta$  eine Rolle spielen. Und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Dong et al. (2001) zeigen, daß die HGF-induzierte IL-8 Produktion in Zelllinien, die von Plattenepithelkarzinoma des Hals-, Nasen- und Rachenbereichs abgeleitet sind, durch Inhibitoren von MEK bzw. der PI 3-Kinasen teilweise gehemmt wird.

Die Hemmung der durch immobilisiertes CD137-Fc hervorgerufenen morphologischen Veränderungen und der damit einhergehenden Adhärenz dieser Zellen in Gegenwart von Wortmannin liefert einen Hinweis darauf, daß PI 3-Kinasen, neben src-Kinasen, auch für diese Prozesse von Bedeutung sind. Auch bei der durch andere Stimuli hervorgerufenen Zelladhäsion spielen PI 3-Kinasen eine Rolle. So führt die Vernetzung von Integrinen durch immobilisiertes Fibronectin in Fibroblasten zu einer deutlichen Steigerung der PI 3-Kinaseaktivität. Durch Hemmung der PI 3-Kinase werden auch die Anheftung und die Ausbreitung dieser Zellen gehemmt (King et al., 1997). Ähnlich hemmen Inhibitoren der PI 3-Kinasen die durch Vernetzung von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit Thrombin hervorgerufene Umordnung des Aktin-Zytoskeletts sowie die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien (Hartwig et al., 1996). Und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die durch Vernetzung von Integrin  $\beta_1$  auf der Oberfläche von Maus-Makrophagen durch immobilisiertes Fibronectin hervorgerufenen morphologischen Veränderungen sowie die Adhärenz dieser Zellen sowohl durch den src-Kinase-spezifischen Inhibitor PP1 (Hanke et al., 1996) als auch durch Inhibitoren der PI 3-Kinasen gehemmt werden können (Meng & Lowell, 1998). Ähnlich sind neben src-Kinasen auch PI 3-Kinasen an der LPS-induzierten Adhärenz und

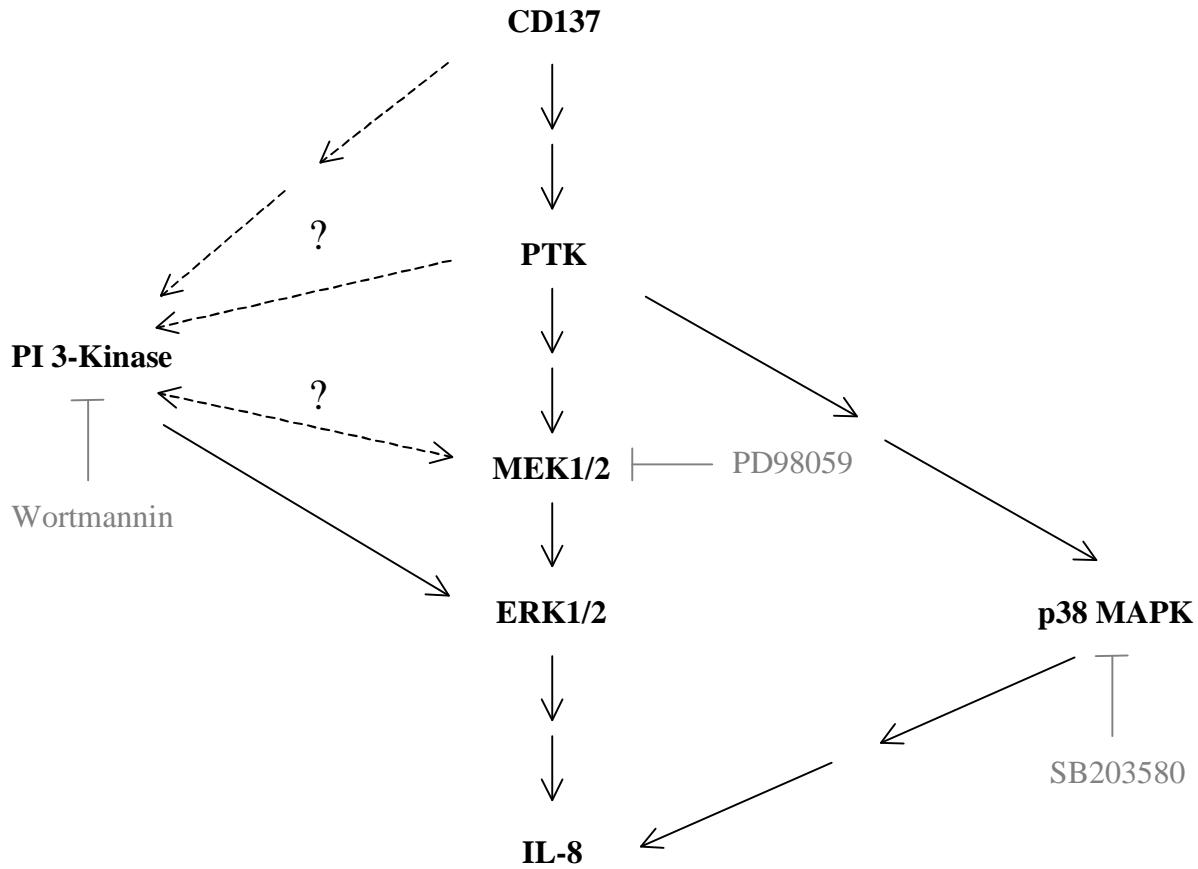
Veränderung der Morphologie von humanen Monozyten und Bac1 bzw. Bac1.2F5 Maus-Makrophagen beteiligt (Scholz et al., 2000; Williams & Ridley, 2000).

Außer bei Adhäsionsvorgängen kommt PI 3-Kinasen auch eine wichtige Bedeutung bei der Induktion der Migration verschiedener Zellarten durch verschiedene Stimuli zu (Kusch et al., 2000; Sotsios & Ward, 2000; Zheng et al., 2000; Rumsey et al., 2001; Yambolieva et al., 2001). So konnten Kusch et al. (2000) zeigen, daß die Urokinase-abhängige Migration von humanen Zellen der glatten Gefäßmuskulatur durch Hemmung der PI 3-Kinasen gehemmt werden kann. Auch die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Migration der hochinvasiven Prostatakarzinoma Zellen, PC3, erfordert die Aktivierung von PI 3-Kinasen (Zheng et al., 2000). Ebenso sind PI 3-Kinasen auch an der Chemo-kin-induzierten Migration verschiedener Zellen des Immunsystems bzw. von diesen Zellen abgeleiteten Zelllinien, wie z.B. T- oder B-Lymphozyten, Neutrophilen oder THP-1 Zellen, beteiligt (Überblick bei Sotsios & Ward, 2000; Rumsey et al., 2001). Auch immobilisiertes oder auf der Oberfläche von Spheroiden exprimiertes CD137 verstärkt die Wanderung humaner Monozyten *in vitro* bzw. in die Spheroide (Becke et al., eingereicht). Möglicherweise spielen also PI 3-Kinasen nicht nur bei der CD137-induzierten Adhärenz und IL-8 Expression der monozytären Zellen sondern auch bei deren Migration eine Rolle.

Alle drei Klassen von PI 3-Kinasen aus Säugerzellen weisen *in vitro* in etwa die gleiche Sensitivität gegenüber Wortmannin auf. Eine Ausnahme hiervon bildet nur die PI 3-Kinase-C2 $\alpha$ , welche mindestens 10 mal weniger empfindlich gegenüber diesem Hemmstoff ist (Virbasius et al., 1996; Domin et al., 1997). Ein pharmakologischer Ansatz über die Verwendung von Wortmannin läßt also praktisch keinen Rückschluß darauf zu, welche Isoform der PI 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung beteiligt sein könnte. Jedoch führt die Stimulation fast aller Rezeptoren, die Tyrosinkinaseaktivität induzieren auch zur Aktivierung von Klasse I<sub>A</sub> PI 3-Kinasen. Diese Tyrosinkinaseaktivität kann sowohl durch Rezeptortyrosinkinasen als auch durch andere Tyrosinkinasen, wie z.B. src-Kinasen, vermittelt werden (Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999). Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, daß CD137 in monozytären Zellen src-Kinasen und Tyrosinphosphorylierung stimuliert. Es ist deshalb zu vermuten, daß es sich bei den durch CD137-induzierten PI 3-Kinasen in monozytären Zellen zummindest teilweise um Klasse I<sub>A</sub> PI 3-Kinasen handelt.

„Klassischerweise“ erfolgt die Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2 über eine Signalkaskade, die ausgehend von Wachstums- oder Zytokinrezeptoren über Ras, Raf und MEK verläuft (Reuter et al., 2000). Diese Arbeit liefert jedoch einen Hinweis darauf, daß im CD137-induzierten Signalweg PI 3-Kinasen *upstream* von ERK1 und ERK2 liegen. So konnte gezeigt werden, daß Wortmannin

weitgehend die durch immobilisiertes CD137-Fc-induzierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 in THP-1 Zellen hemmt. Eine solche PI 3-Kinase-abhängige Aktivierung von ERK konnte auch in anderen Zellarten nach unterschiedlicher Stimulation beobachtet werden. So wird auch die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung von ERK2 in der Jurkat T-Zelllinie durch Wortmannin gehemmt (Von Willebrand et al., 1996). Auch die durch Adhäsion an immobilisiertem Fibronectin hervorgerufene Aktivierung von ERK2 in Cos-7 Zellen wird sowohl durch Inhibitoren der PI 3-Kinasen als auch durch transiente Expression einer dominant-negativen Form der p85 Untereinheit der PI 3-Kinase gehemmt (King et al., 1997). Ähnlich konnte eine Beteiligung von PI 3-Kinasen an der Aktivierung von ERK2 durch Vernetzung von Integrin  $\alpha_4\beta_1$  in der myeloiden HL60 Zelllinie nachgewiesen werden (Finkelstein & Shimizu, 2000). Sowohl das p85/p110 Heterodimer als auch PI 3-Kinase  $\gamma$  weisen neben ihrer Lipidkinase- auch eine Proteinkerinkinaseaktivität auf (Dhand et al., 1994; Stoyanova et al., 1995). Bondeva et al. (1998) konnten MAPK-Aktivierung durch ein PI 3-Kinase  $\gamma$ -Hybridprotein nachweisen, das zwar Protein- jedoch keine Lipidkinaseaktivität besitzt. Mit Hilfe von Wortmannin kann nicht zwischen der Lipid- und der Proteinkerinkinaseaktivität unterschieden werden (Sotsios & Ward, 2000), so daß auch offen bleibt, ob die CD137-stimulierte Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 von der Lipid- oder der Proteinkerinkinaseaktivität der PI 3-Kinasen abhängt. Abb. 4.1 gibt einen Überblick über die bisher diskutierten, CD137-induzierten Signalwege.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung der CD137-induzierten Signalkaskaden.** Dieses Diagramm ordnet die untersuchten Moleküle in die bekannten Signaltransduktionskaskaden ein. Es repräsentiert jedoch keineswegs die vollständige Signalübertragung. Signalwege, welche nicht durch experimentelle Daten abgesichert sind, sind mit gestrichelten Linien dargestellt (ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2; MEK1/2: MAPK/ERK Kinase 1/2; p38 MAPK: p38 mitogenaktivierte Proteinkinase; PD98059: Inhibitor der Aktivierung von MEK1/2; PI 3-Kinase: Phosphoinositid 3-Kinase; PTK: Proteintyrosinkinase; SB203580: Inhibitor der p38 MAPK; Wortmannin: Inhibitor der PI 3-Kinase).

## **4.5 PKC ist nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt**

PKC ist eine Serin-/Threoninkinase, von der mehrere Isoformen bekannt sind. Diese lassen sich in verschiedene Gruppen untergliedern. Zu den klassischen PKC (cPKC) gehören PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ . Die Regulation dieser Isoformen erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten - Phosphorylierung des Moleküls im Bereich der katalytischen Domäne, eingeleitet durch PDK (*phosphoinositide-dependent protein kinase*)-1, und anschließende Wechselwirkung mit Diacylglycerin (DAG). Neu synthetisiertes Protein wird zunächst durch die PDK-1, welche mit hoher Affinität an PtdIns-3, 4, 5-P<sub>3</sub>, ein Lipidprodukt der PI 3-Kinase, bindet, im Bereich der Aktivierungsschleife phosphoryliert.

Dieser Schritt ist für die Aktivität der cPKC essentiell. Daraufhin kommt es zur Autophosphorylierung im C-terminalen Autophosphorylierungsbereich und schließlich im C-terminalen, hydrophoben Bereich. Diese beiden Schritte beeinflussen die Löslichkeit und die Stabilität der cPKC (Dutil et al., 1998; Dempsey et al., 2000; Parekh et al., 2000). Durch Bindung an eine autoinhibitorische Sequenz, das sog. Pseudosubstrat, wird die PKC in einer inaktiven Konformation gehalten. Die Bildung von DAG führt dann zur Rekrutierung der PKC an die Zellmembran. Die Wechselwirkung mit DAG bzw. Phosphatidylserin sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung anionischer Phospholipide bewirken die Dissoziation des Pseudosubstrats und somit die Aktivierung der cPKC (Dempsey et al., 2000). Die Regulation der neuen PKC (nPK), welche  $\text{PKC}\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  umfassen, erfolgt ebenfalls über PDK-1-abhängige Phosphorylierung sowie Autophosphorylierung und Wechselwirkung mit Membranlipiden, jedoch ist dieser Prozeß  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig (Ono et al., 1988; Le Good et al., 1998; Dempsey et al., 2000). Auch für die atypischen PKC (aPKC), zu denen  $\text{PKC}\zeta$  und  $\tau$  zählen, konnte Phosphorylierung durch PDK-1 im Bereich der Aktivierungsschleife gezeigt werden (Chou et al., 1998; Parekh et al., 2000). Die Aktivierung dieser Kinasen ist aber weder  $\text{Ca}^{2+}$ - noch lipidabhängig (Ono et al., 1989).  $\text{PKC}\mu$  (PKD) und  $\text{PKC}\nu$  schließlich stellen eine vierte Gruppe von PKC dar. Die Aktivierung von PKD erfolgt durch PKC-abhängige Phosphorylierung von zwei Serinresten im Bereich der Aktivierungsschleife (Zugaza et al., 1996; Iglesias et al., 1998; Hayashi et al., 1999; Waldron et al., 1999). Verschiedene Daten ließen vermuten, daß PKC Bestandteil des CD137-induzierten Signalweges in monozytären Zellen ist. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sowohl die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung aus den monozytären Zellen als auch deren Adhärenz durch Wortmannin gehemmt werden, was auf eine Beteiligung von PI 3-Kinasen an diesen Vorgängen deutet. Sowohl die cPKC als auch die nPKC und die aPKC werden durch PDK-1 phosphoryliert. Diese Kinase wiederum wird durch ein Lipidprodukt der PI 3-Kinasen, reguliert. Außerdem liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung von MEK und ERK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen. Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, daß PKC für die Aktivierung von MEK und ERK von Bedeutung ist (Ueda et al., 1996; Miranti et al., 1999; Monick et al., 2000). So wird die LPS-induzierte Aktivierung von ERK in humanen Alveolar-Makrophagen teilweise durch  $\text{PKC}\zeta$  vermittelt (Monick et al., 2000). Die Aktivierung von MEK und ERK durch TPA erfolgt über  $\text{PKC}\delta$  (Ueda et al., 1996). Schließlich wird auch die Fibronectin-stimulierte Aktivierung des ERK-Signalweges in Cos-7 Zellen durch verschiedene Isoformen der PKC vermittelt (Miranti et al., 1999). Um festzustellen, ob PKC tatsächlich eine Rolle bei der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen spielen, wurden THP-1 Zellen bzw. primäre, humane Monozyten 24 h in Gegenwart von Chelerytrichlorid, einem spezifischen Hemmstoff der PKC (Herbert et al., 1990), auf immobilisiertem

CD137 inkubiert. Der Hemmstoff hatte jedoch in keinem der beiden Fälle signifikanten Einfluß auf die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung. Dies deutet darauf hin, daß PKC nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt ist.

## **4.6 Hemmung der CD137-induzierten reversen Signalübertragung durch PKA**

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, dessen Aktivierung sowohl die Verstärkung als auch die Hemmung von Genexpression zur Folge haben kann, ist der PKA-Signalweg (Asaoka et al., 1992; Roger et al., 1995). Die Aktivierung der Adenylatcyclase führt zur Bildung von cAMP. Dieses bindet an PKA und initiiert intrazelluläre Signale, welche durch dieses Enzym vermittelt werden (Roger et al., 1995; Rohlff and Glazer, 1995). In ihrer inaktiven Form ist die PKA Bestandteil eines Holoenzymkomplexes, in dem zwei katalytische Untereinheiten an eine dimere, regulatorische Untereinheit gebunden sind (Delmas et al., 1994; Hunter, 1995). Die Bindung von vier cAMP-Molekülen an die dimere, regulatorische Untereinheit bewirkt die Freisetzung und damit Aktivierung der beiden katalytischen Untereinheiten (Dostmann et al., 1990; Delmas et al., 1994; Hunter, 1995). Aktive Analogons (Agonisten) des cAMP, zu denen dibutyryl-cAMP und Sp-cAMP gehören, binden an die regulatorische Untereinheit und stimulieren die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten aus dem Holoenzym. Der cAMP-Antagonist Rp-cAMP dagegen bindet an das Holoenzym und verhindert die Dissoziation und damit die Aktivierung der katalytischen Untereinheiten (Dostmann et al., 1990). Die dissozierten, katalytischen Untereinheiten vermitteln die Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen, was dann die Verstärkung oder Hemmung der Expression spezifischer Gene zur Folge hat (Delmas et al., 1994; Hunter, 1995). So z.B. stimulieren agonistische Analoga von cAMP die Expression von IL-6 in Titan-behandelten Monozyten, wohingegen die Expression von TNF in diesen Zellen durch Agentien, die zur Erhöhung der Menge an intrazellulärem cAMP führen, gehemmt wird (Blaine et al., 1997). Um festzustellen, ob der PKA-Signalweg auch bei der CD137-induzierten Genexpression in Monozyten eine Rolle spielt, wurden die Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des cAMP-Antagonisten RP-cAMPS auf immobilisiertem CD137-Fc inkubiert. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren führte RP-cAMPS konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der IL-8 Produktion. Diese durch die Hemmung des PKA-Signalweges herbeigeführte Erhöhung der CD137-induzierten Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 lässt darauf schließen, daß die durch Stimulation mit CD137 induzierte Signal-Kaskade in Monozyten durch den PKA-Weg negativ reguliert wird. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten Farmer & Pugin (2000) zeigen, daß auch die Hemmung der

LPS-induzierten IL-8 Synthese in THP-1 Zellen durch  $\beta$ -adrenergische Agonisten über die Bildung von cAMP und die Aktivierung der PKA erfolgt. Bei der, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten, Analyse der Genexpression humaner Monozyten, welche 20 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren, wurde die mRNA für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  der PKA als durch CD137-Fc hochreguliert gefunden. Die verstärkte Expression einzelner Komponenten eines Signalweges erlaubt eine verstärkte Aktivierung dieses Signalweges. Die verstärkte Aktivierung des inhibitorischen PKA-Signalweges könnte einen negativen *feed back*-Mechanismus darstellen, um die durch CD137 bewirkte Aktivierung monozytärer Zellen unter Kontrolle zu halten.

## 4.7 Analyse der CD137 regulierten Genexpression in monozytären Zellen mit Hilfe der cDNA-Arraytechnologie

Neben der mRNA für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  der PKA oder der Proteintyrosinkinase hck, wurde in humanen Monozyten, die 20 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren, die mRNA für weitere Moleküle der intrazellulären Signalübertragung sowie für Transkriptionsfaktoren und Oberflächenrezeptoren als durch CD137 induziert gefunden. Die Expression des *myeloid cell nuclear differentiation antigen* dagegen wurde als durch CD137 gehemmt gefunden. Auf einige dieser CD137 regulierten Gene soll im folgenden etwas genauer eingegangen werden.

U.a. wurde eine Untereinheit von NF- $\kappa$ B als durch CD137 induziert gefunden. NF- $\kappa$ B ist ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der praktisch in allen Zellarten vorkommt und eine wichtige Komponente bei der induzierbaren Expression zahlreicher Proteine, wie Zytokine oder Zelladhäsionsmoleküle, darstellt (Überblick bei Ghosh et al., 1998). So z.B. finden sich Bindestellen für NF- $\kappa$ B im Promotor von TNF oder IL-8. Der Promotor von IL-8 enthält darüberhinaus Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher ebenfalls als durch CD137 hochreguliert gefunden wurde. CD137 induziert in monozytären Zellen proinflammatorische Zytokine, wie TNF oder IL-8 (Langstein et al., 1998; diese Arbeit). Möglicherweise werden also NF- $\kappa$ B und auch AP-1 durch CD137 induziert, um eine verstärkte Synthese dieser proinflammatorischen Zytokine zu gewährleisten.

Neben der mRNA für verschiedene Transkriptionsfaktoren wurde auch die mRNA für die  $\alpha$ -Untereinheit des Fibronectin-Rezeptors als durch CD137 induziert gefunden. In Übereinstimmung damit konnte Langstein (1999) mittels Western Blot-Analyse von humanen Monozyten, wel-

che 16 bzw. 36 h auf immobilisiertem CD137 bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren, zeigen, daß CD137 in diesen Zellen die Expression von Integrin  $\beta 1$  stimuliert. Integrine sind eine Familie von Adhäsionsmolekülen, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Die extrazellulären Domänen dieser membranständigen Moleküle binden an Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie Fibronectin, Laminin, Kollagen oder Vitronectin. Die zytoplasmatischen Domänen gehen Wechselwirkungen mit dem Aktin-Zytoskelett und damit assoziierten Proteinen ein. Sowohl für die  $\alpha$ - als auch für die  $\beta$ -Untereinheit sind verschiedenen Isoformen bekannt, wobei verschiedene Kombinationen aus verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unterschiedliche Bindungsspezifitäten aufweisen. Die meisten Integrine können jedoch mit verschiedenen Komponenten der Extrazellulärmatrix in Wechselwirkung treten (Überblick bei Boudreau & Jones, 1999; Giancotti & Ruoslahti, 1999). Außer bei der Anheftung und Ausbreitung von Zellen spielen Integrine u.a. auch eine wichtige Rolle bei deren Migration (Überblick bei Holly et al., 2000). Immobilisiertes CD137 induziert in monozytären Zellen morphologische Veränderungen, welche mit der Adhärenz dieser Zellen einhergehen (Langstein et al., 1998; diese Arbeit). Zudem geht aus Untersuchungen von Becke et al. (eingereicht) hervor, daß immobilisiertes oder auf der Oberfläche von Spheroiden exprimiertes CD137 die Migration humaner Monozyten *in vitro* und in die Spheroide verstärkt. Möglicherweise wird also die Expression von Integrinen durch CD137 induziert, um das Adhäsionspotential bzw. die Mobilität dieser Zellen zu erhöhen.

Die vorliegende Arbeit liefert außerdem einen Hinweis darauf, daß CD137 die Expression von ILK stimuliert. ILK ist eine Serin-/Threoninkinase, welche u.a. im Signalweg von Integrinen eine Rolle spielt (Dedhar et al., 1999). So konnte z.B. gezeigt werden, daß ILK mit den zytoplasmatischen Domänen der  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Untereinheiten von Integrinen in Wechselwirkung treten kann (Hannigan et al., 1996). CD137 scheint also nicht nur die Expression von Integrinen selbst, sondern auch von potentiellen Bestandteilen Integrin-abhängiger Signalwege zu induzieren. Passend hierzu konnten Troussard et al. (1999) zeigen, daß die Adhäsion von Zellen an Fibronectin zur ILK-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt, dessen Expression ja ebenfalls als durch CD137 induziert gefunden wurde. Und auch NF- $\kappa$ B spielt eine Rolle im Signalweg von Integrinen (Lin et al., 1995b; McGilvray et al., 1997; de Fougerolles et al., 2000).

Ein weiteres Protein, dessen Expression als durch CD137 induziert gefunden wurde und das für die Regulation Integrin-abhängiger Prozesse in Makrophagen von Bedeutung ist (Li et al., 1996), ist MacMARCKS (*macrophage-enriched myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), ein Mitglied der MARCKS Familie (Li & Aderem, 1992). Bei den Mitgliedern dieser Familie handelt es sich um myristoylierte Proteine, welche sowohl mit Membranen als auch mit dem Aktin-Zytoskelett in Ver-

bindung stehen und *in vivo* als Substrate für PKC dienen (Blackshear, 1993). Li & Aderem (1992) und Chang et al. (1999) konnten zeigen, daß die Synthese von MacMARCKS in Makrophagen durch LPS induziert werden kann. Aus Untersuchungen von Li et al. (1996) geht hervor, daß MacMARCKS bei der Phorbol-ester-stimulierten Anheftung und Ausbreitung von Makrophagen von Bedeutung ist. Und eine dominant negative Mutante von MacMARCKS hemmt die Integrin  $\beta_2$ -vermittelte Anheftung von Makrophagen an immobilisierte Immunkomplexe und deren Ausbreitung auf diesen Komplexen. Zudem gibt es Hinweise darauf, daß MacMARCKS bei der Integrin-abhängigen Phosphorylierung von Paxillin, einem weiteren Substrat der PKC (De Nichilo & Yamada, 1996), eine Rolle spielt (Li et al., 1996). CD137 induziert auch die Expression von Paxillin in humanen Monozyten (Langstein, 1999). Wie aus den Experimenten mit Cheleritrichlorid hervorgeht, scheint der PKC-Signalweg nicht unmittelbar durch CD137 aktiviert zu werden. Die Induktion von Bestandteilen dieses Signalweges, wie MacMARCKS oder Paxillin durch CD137 lassen jedoch vermuten, daß der PKC-Signalweg sekundär, möglicherweise bei der Regulation Integrin-abhängiger Prozesse, eine Rolle spielt.

Schließlich wurde auch die mRNA für die  $\gamma$ -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R $\gamma$ ) als durch CD137 induziert gefunden. Diese ist Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, 4, 7, 9 und 15 (Di Santo et al., 1995). Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, daß IL-2 einen potenteren Aktivator für Monozyten darstellt (Espinoza-Delgado et al., 1990; Bosco et al., 1997). So führt die Stimulation von Monozyten mit IL-2 zur Freisetzung von Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 und IL-8 (Kovacs et al., 1989; Strieter et al., 1989; Musso et al., 1992; Gusella et al., 1993) und von Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF oder M-CSF (Brach et al., 1993; Epling-Burnette et al., 1993; Misago et al., 1993). CD137 induziert in monozytären Zellen die Sekretion eines identischen Spektrums an Zytokinen sowie von M-CSF (Langstein et al., 1998; Langstein & Schwarz, 1999; diese Arbeit). Zudem wurde ja die mRNA für die Proteintyrosinkinase hck als durch CD137 hochreguliert gefunden. Bosco et al. (2000) konnten zeigen, daß die Stimulation von humanen Monozyten mit IL-2 sowohl zur Aktivierung von p59<sup>hck</sup> als auch zur Steigerung der Expression dieser Kinase führt. Diese Daten lassen vermuten, daß der IL-2 Signalweg bei der Aktivierung von Monozyten durch CD137 eine Rolle spielt.

Die Analyse der Genexpression von humanen Monozyten, welche 6 h auf immobilisiertem CD137-Fc bzw. Fc-Protein kultiviert worden waren, erfolgte mit Hilfe des Human HL-60 cDNA-Arrays (RZPD). Auf diesem sind 27648 Gene als Bakterienkolonien, welche die entsprechende cDNA enthalten, doppelt gespottet. Zwar konnten durch Vergleich der Autoradiogramme der Atlas Arrays, die parallel mit Sonden von CD137-Fc bzw. Fc-Protein-behandelten Monozyten hybridisiert

worden waren, 37 Spots ermittelt werden, deren Hybridisierungssignale unterschiedliche Intensitäten aufwiesen. Jedoch waren unter den als durch CD137 reguliert gefundenen Genen einige, zu denen es, außer z.B. Klonnummern, kaum Informationen gab. Außerdem wurde eine Reihe weiterer CD137 regulierter Gene ermittelt, von denen bekannt ist, daß sie oft unspezifisch in Array-Hybridisierungen gefunden werden, wie z.B. ribosomale RNAs. Interessanterweise wurde jedoch die mRNA für VDAC1 (*voltage-dependent anion channel 1*) als durch CD137 hochreguliert gefunden. VDACs sind Poren-bildende Proteine, welche in der äußeren Mitochondrienmembran aller eukaryotischen Zellen zu finden sind (Sorgato & Moran, 1993). Zudem gibt es Hinweise darauf, daß eine Isoform von Maus-VDAC1 in der Zellmembran lokalisiert ist (Büttner et al., 2000). VDACs regulieren den Austausch von Metaboliten zwischen dem Zytoplasma und dem Mitochondrium (Sorgato & Moran, 1993). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Apoptose-fördernde Wirkung von VDACs. So konnte gezeigt werden, daß diese Moleküle eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium spielen (Tsujimoto & Shimizu, 2000; Shimizu et al., 1999; 2001). Langstein (1999) konnte zeigen, daß CD137 in primären, humanen Monozyten Apoptose induziert. Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß VDAC1 für die Induktion von Apoptose durch CD137 in Monozyten von Bedeutung ist. Allerdings geht aus Untersuchungen von Shimizu et al. (1999; 2001) hervor, daß die Freisetzung von Cytochrom c durch Wechselwirkung von pro-apoptotischen Mitgliedern der bcl-2 Familie, wie bax und bak, mit VDAC gefördert wird. CD137 jedoch hemmt die Expression von bax (Langstein, 1999).

## 4.8 CD137 Ligand

Es ist anzunehmen, daß die Effekte von immobilisiertem CD137 auf verschiedene Zellen des Immunsystems von Liganden vermittelt werden, die an CD137 binden können. Sowohl für humanes CD137 als auch für das homologe Protein aus der Maus ist bisher ein spezifischer Ligand beschrieben (Goodwin et al., 1993; Pollok et al., 1994; Alderson et al., 1994). Diese beiden Moleküle weisen jedoch, verglichen mit den Homologien zwischen verschiedenen Spezies bei anderen Mitgliedern der TNF Familie, nur eine geringe Homologie auf. Außerdem wurde die mRNA für den bekannten, humanen CD137 Liganden (Alderson et al., 1994) in T-Zellen, die ja durch immobilisiertes CD137 ein inhibitorisches Signal erhalten, nur nach Aktivierung gefunden. Auch in ruhenden, primären, humanen Monozyten, auf die immobilisiertes CD137 eine aktivierende Wirkung ausübt, konnte der Ligand bisher nicht nachgewiesen werden (Michel, 1998). Aus diesem Grund wurde die Existenz mindestens eines weiteren humanen CD137 Liganden postuliert. In dieser Arbeit konnte jedoch mittels RT-PCR erstmals gezeigt werden, daß primäre, humane Monozyten und auch PEZ aus der

Maus konstitutiv den für die jeweilige Spezies bekannten CD137 Liganden exprimieren. Zwar wurden für die Expressionsanalyse reine Monozyten-Fraktionen verwendet, jedoch ist die RT-PCR eine sehr sensitive Methode, mit der minimale Mengen an mRNA detektiert werden können. Deshalb ist natürlich nicht völlig auszuschließen, daß die detektierte mRNA von kleinen Rückständen anderer Zellen in den untersuchten Monozytenpopulationen herrühren. Allerdings synthetisieren auch THP-1 Zellen, auf die immobilisiertes CD137, wie in dieser Arbeit gezeigt, ebenfalls einen stimulatorischen Effekt hat, konstitutiv die mRNA für den bekannten CD137 Liganden (Alderson et al., 1994). Ebenfalls konstitutive Expression dieses Liganden auf Ebene der mRNA konnte für humane B-Zellen gezeigt werden, deren Proliferation und Immunglobulinsynthese durch immobilisiertes CD137 erhöht werden (Pauly, 2000). Und in verschiedenen, humanen Karzinom-Zelllinien, die durch lösliches CD137 zur Produktion von IL-8 angeregt werden, konnte konstitutive Expression des bekannten CD137 Liganden sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Salih et al., 2000). Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß die CD137-induzierte reverse Signaltransduktion sowohl in der Maus als auch im Menschen durch den, für die jeweilige Art bekannten, CD137 Liganden vermittelt wird.

## 5 Zusammenfassung

CD137 ist ein Mitglied der TNF Rezeptorfamilie. Für mehrere Mitglieder dieser Familie, wie CD27, CD30, CD40, Ox40 oder RANK (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*), wurde reverse Signalübertragung durch den jeweiligen Liganden beschrieben. Auch für CD137 gibt es Hinweise auf eine reverse Signalübertragung. So konnte gezeigt werden, daß primäre, humane Monozyten durch immobilisiertes, rekombinantes CD137 Protein aktiviert werden. CD137 induziert in diesen Zellen die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF, IL-6 und IL-8. Auch fördert es die Adhärenz dieser Zellen und verlängert deren Überleben. Außerdem induziert CD137 in Monozyten Proliferation. Diese Arbeit liefert erstmals Hinweise auf eine CD137-induzierte reverse Signalübertragung auch in humanen, monozytären THP-1 Zellen sowie in Peritonealexudatzellen (PEZ) aus der Maus. So konnte gezeigt werden, daß immobilisiertes, rekombinantes CD137 Protein die Freisetzung von IL-8 aus THP-1 Zellen sowie von IL-6 aus PEZ stimuliert. Außerdem induziert CD137 in beiden Zellarten morphologische Veränderungen, die typischerweise mit der Adhärenz von Monozyten einhergehen. Bisher war nichts über die Mechanismen der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß CD137 sowohl in THP-1 Zellen als auch in primären, humanen Monozyten Tyrosinphosphorylierung induziert. Experimente mit dem spezifischen Inhibitor PP1 deuten auf die Beteiligung von src-Kinasen, einer Klasse von Proteintyrosinkinasen, an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen. Zudem lassen sowohl die CD137-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) als auch die Hemmung der CD137-induzierten IL-8 Freisetzung durch den p38 MAPK-spezifischen Inhibitor SB203580 auf eine Beteiligung der p38 MAPK an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in diesen Zellen schließen. Außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von MEK (MAPK/ERK Kinase)1 sowie ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)1 und ERK2 an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen. So konnte gezeigt werden, daß CD137 in THP-1 Zellen die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 stimuliert. Sowohl diese Phosphorylierung als auch die CD137-induzierte IL-8 Freisetzung aus THP-1 Zellen werden durch PD98059, einem spezifischen Inhibitor von MEK1, gehemmt. Die Hemmung der CD137-induzierten morphologischen Veränderungen in primären, humanen Monozyten sowie die Blockierung der IL-8 Freisetzung aus diesen Zellen und aus THP-1 Zellen durch Wortmannin deuten zudem auf eine Beteiligung von Phosphoinositid (PI) 3-Kinasen an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen hin. Außerdem läßt die Hemmung der CD137-induzierten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 durch Wortmannin darauf schließen, daß neben MEK auch PI 3-Kinasen *upstream* von ERK liegen. Wie aus Experimen-

ten mit dem spezifischen Inhibitor Cheleritrichlorid hervorgeht, ist der Proteinkinase C-Signalweg nicht an der CD137-induzierten reversen Signalübertragung in monozytären Zellen beteiligt. Experimente mit RP-cAMPS, einem spezifischen Inhibitor der Proteinkinase A, hingegen deuten auf einen hemmenden Einfluß dieser Kinase auf die CD137-induzierte reverse Signalübertragung in Monozyten. Um weitere Informationen über die Mechanismen der reversen Signalübertragung von CD137 und deren Auswirkungen auf die Genexpression zu erhalten, wurden cDNA-Arrays mit Sonden von Monozyten hybridisiert, welche mit CD137-Fc bzw. einem Fc-Kontrollprotein stimuliert worden waren. Unter den Genen, deren Expression als durch CD137 induziert gefunden wurde, befanden sich u.a. die Proteintyrosinkinase hck, die Serin-/Threoninkinase ILK (*integrin-linked kinase*), die  $\alpha$ -Untereinheit des Fibronectin-Rezeptors sowie die  $\gamma$ -Kette des IL-2 Rezeptors und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*). Schließlich konnte gezeigt werden, daß der bekannte CD137 Ligand, ein möglicher Interaktionspartner für das immobilisierte CD137, entgegen bisheriger Annahmen, konstitutiv in primären, humanen Monozyten exprimiert wird.

## 6 Literaturverzeichnis

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson D;** Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio: VCH 1995

**Alderson MR; Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS, Goodwin RG;** Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. Eur J Immunol 1994; 24(9): 2219-27

**Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR;** PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. J Biol Chem 1995; 270(46): 27489-94

**Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteche CM, Simoneaux DK, et al.;** CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science 1993; 259(5097): 896-7

**Andreesen R, Brugger W, Scheibenbogen C, Kreutz M, Leser HG, Rehm A, Lohr GW;** Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. J Leukoc Biol 1990; 47(6): 490-7

**Aplin AE, Juliano RL;** Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. J Cell Sci 1999; 112( Pt 5): 695-706

**Arcaro A, Wymann MP;** Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. Biochem J 1993; 296( Pt 2): 297-301

**Arch RH, Thompson CB;** 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor κB. Mol Cell Biol 1998; 18(1): 558-65

**Armitage RJ;** Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. Curr Opin Immunol 1994; 6(3): 407-13

**Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, et al.;** The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. Cell 1993; 72(2): 291-300

**Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y;** Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. Trends Biochem Sci 1992; 17(10): 414-7

**Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ;** The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. J Immunol 1999; 162(9): 5367-73

**Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S;** The CD40 antigen and its ligand. Annu Rev Immunol 1994; 12: 881-922

**Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W;** Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNFβ complex: implications for TNF receptor activation. Cell 1993; 73(3): 431-45

**Becke FM, Richter G, Langstein J, Krieg R, Straub RH, Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Schwarz H;** CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. eingereicht 2001

**Becker B, Vogt T, Landthaler M, Stolz W;** Detection of differentially regulated genes in keratinocytes by cDNA array hybridization: Hsp27 and other novel players in response to artificial ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(6): 983-8

**Beggs HE, Soriano P, Maness PF;** NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 1994; 127(3): 825-33

**Bertini R, Delgado R, Faggioni R, Gascon MP, Ythier A, Ghezzi P;** Urinary TNF-binding protein (TNF soluble receptor) protects mice against the lethal effect of TNF and endotoxic shock. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4(1): 39-42

**Bertoni G, Fumagalli L, Laudanna C, Sorio C;** Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *J Cell Biol* 1994; 126(4): 1111-21

**Bertoni G, Yan SR, Fumagalli L, Lowell CA;** Neutrophil activation by adhesion: mechanisms and pathophysiological implications. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26(3): 160-77

**Birnboim HC, Doly J;** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 1979; 7(6): 1513-23

**Blackshear PJ;** The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J Biol Chem* 1993; 268(3): 1501-4

**Blaine TA, Pollice PF, Rosier RN, Reynolds PR, Puzas JE, O'Keefe RJ;** Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling mechanisms. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(10): 1519-28

**Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC, White L, Francomano T, Perfetto SJ, Kirk AD, June CH;** CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med* 2000; 191(4): 651-60

**Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, Courtneidge SA;** Src promotes PKCdelta degradation. *Cell Growth Differ* 1999; 10(4): 231-41

**Blazar BR, Kwon BS, Panoskaltsis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, Taylor PA;** Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol* 2001; 166(5): 3174-83

**Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP;** Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 1998; 282(5387): 293-6

**Bosco MC, Curiel RE, Zea AH, Malabarba MG, Ortaldo JR, Espinoza-Delgado I;** IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck. *J Immunol* 2000; 164(9): 4575-85

**Bosco MC, Rottschaefer S, Taylor LS, Ortaldo JR, Longo DL, Espinoza-Delgado I;** The anti-neoplastic agent bryostatin-1 induces proinflammatory cytokine production in human monocytes:

- synergy with interleukin-2 and modulation of interleukin-2Rgamma chain expression. *Blood* 1997; 89(9): 3402-11
- Boudreau NJ, Jones PL;** Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 1999; 339 ( Pt 3): 481-8
- Boulet I, Ralph S, Stanley E, Lock P, Dunn AR, Green SP, Phillips WA;** Lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced expression of hck and lyn tyrosine kinases in murine bone marrow-derived macrophages. *Oncogene* 1992; 7(4): 703-10
- Boussaud V, Soler P, Moreau J, Goodwin RG, Hance AJ;** Expression of three members of the TNF-R family of receptors (4-1BB, lymphotoxin- $\beta$  receptor, and Fas) in human lung. *Eur Respir J* 1998; 12(4): 926-31
- Brach MA, Arnold C, Kiehntopf M, Gruss HJ, Herrmann F;** Transcriptional activation of the macrophage colony-stimulating factor gene by IL-2 is associated with secretion of bioactive macrophage colony-stimulating factor protein by monocytes and involves activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 1993; 150(12): 5535-43
- Broll K, Richter G, Pauly S, Hofstaedter F, Schwarz H;** CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(4): 543-9
- Bruder JT, Kovacs I;** Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression. *J Virol* 1997; 71(1): 398-404
- Büttner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R;** Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3201-6
- Cannons JL, Choi Y, Watts TH;** Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response. *J Immunol* 2000; 165(11): 6193-204
- Cannons JL, Hoeflich KP, Woodgett JR, Watts TH;** Role of stress kinase pathway in signaling via the T cell costimulatory receptor 4-1BB. *J Immunol* 1999; 163(6): 2990-8
- Cannons JL, Lau P, Ghuman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH;** 4-1BB Ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 2001; 167(3): 1313-24
- Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G;** Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995; 154(6): 2706-13
- Cascino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G;** Fas/Apo-1 CD95 receptor lacking the intracytoplasmic signal domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1996; 156(1): 13-7
- Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL;** CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1994; 152(4): 1523-31
- Chalupny NJ, Peach R, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, Farr AG, Aruffo A;** T-cell activation molecule 4-1BB binds to extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(21): 10360-4

- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ;** A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. Science 2000a; 288(5475): 2351-4
- Chang S, Stacey KJ, Chen J, Costelloe EO, Aderem A, Hume DA;** Mechanisms of regulation of the MacMARCKS gene in macrophages by bacterial lipopolysaccharide. J Leukoc Biol 1999; 66(3): 528-34
- Chen NJ, Huang MW, Hsieh SL;** Enhanced secretion of IFN- $\gamma$  by activated Th1 cells occurs via reverse signaling through TNF-related activation-induced cytokine. J Immunol 2001; 166(1): 270-6
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K, Juliano RL;** Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 1994; 269(43): 26602-5
- Chen SH, Pham-Nguyen KB, Martinet O, Huang Y, Yang W, Thung SN, Chen L, Mittler R, Woo SL;** Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. Mol Ther 2000; 2(1): 39-46
- Cheng J, Zhou TZ, Liu J, Shapiro MJ, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD;** Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science 1994; 263(5154): 1759-62
- Chomczynski P, Sacchi N;** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162(1): 156-9
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A;** Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. Curr Biol 1998; 8(19): 1069-77
- Chu NR, DeBenedette MA, Stiernholm BJ, Barber BH, Watts TH;** Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells. J Immunol 1997; 158(7): 3081-9
- Clark EA, Hynes RO;** Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. J Biol Chem 1996; 271(25): 14814-8
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L;** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci 1972; 69(8): 2110-4
- Cuddy K, Foley B, Jaffe JS, Gillespie D;** RT-PCR with affinity-captured mRNA. Nucleic Acids Res 1993; 21(9): 2281
- Cuenda A, Alonso G, Morrice N, Jones M, Meier R, Cohen P, Nebreda AR;** Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. EMBO J 1996; 15(16): 4156-64
- Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M;** Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). EMBO J 1997; 16(2): 295-305
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC, SB 203580** is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. FEBS Lett 1995; 364(2): 229-33

**de Fougerolles AR, Chi-Rosso G, Bajardi A, Gotwals P, Green CD, Koteliansky VE;** Global expression analysis of extracellular matrix-integrin interactions in monocytes. *Immunity* 2000; 13(6): 749-58

**De Nichilo MO, Yamada KM;** Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J Biol Chem* 1996; 271(18): 11016-22

**De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J et al.;** Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994; 264(5159): 703-7

**DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH;** Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 1997; 158(2): 551-9

**DeBenedette MA, Wen T, Bachmann MF, Ohashi PS, Barber BH, Stocking KL, Peschon JJ, Watts TH;** Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 1999; 163(9): 4833-41

**Dedhar S, Williams B, Hannigan G;** Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. *Trends Cell Biol* 1999; 9(8): 319-23

**Delmas V, Molina CA, Lalli E, de Groot R, Foulkes NS, Masquelier D, Sassone-Corsi P;** Complexity and versatility of the transcriptional response to cAMP. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; 124: 1-28

**Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO;** Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3): L429-38

**Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ;** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267(5198): 682-5

**Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K, et al.;** PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J* 1994; 13(3): 522-33

**Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH;** Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373(6513): 438-41

**Di Santo JP, Kuhn R, Muller W;** Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol Rev* 1995; 148: 19-34

**DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G;** CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412): 541-3

**Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse SE, Zvelebil MJ, Stein RC, Waterfield MD;** Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J* 1997; 326 ( Pt 1): 139-47

**Domin J, Waterfield MD;** Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett* 1997; 410(1): 91-5

**Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C;** Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5911-8

**Dostmann WR, Taylor SS, Genieser HG, Jastorff B, Doskeland SO, Ogreid D;** Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinases I and II with analogs of adenosine 3',5' -cyclic phosphothioates. *J Biol Chem* 1990; 265(18): 10484-91

**Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J;** RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13(18): 2412-24

**Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR;** A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17): 7686-9

**Dutil EM, Toker A, Newton AC;** Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* 1998; 8(25): 1366-75

**Elion EA;** Routing MAP kinase cascades. *Science* 1998; 281(5383): 1625-6

**Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K;** Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med* 1999; 189(1): 159-68

**Epling-Burnette PK, Wei S, Blanchard DK, Spranzi E, Djeu JY;** Coinduction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release and lymphokine-activated killer cell susceptibility in monocytes by interleukin-2 via interleukin-2 receptor beta. *Blood* 1993; 81(11): 3130-7

**Espinosa-Delgado I, Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Sugamura K, Varesio L, Longo DL;** Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes. *J Exp Med* 1990; 171(5): 1821-6

**Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF;** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971; 10(13): 2606-17

**Farmer P, Pugin J;** beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(4): L675-82

**Finkelstein LD, Shimizu Y;** Role of phosphoinositide 3-kinase and the Cbl adaptor protein in coupling the alpha4beta1 integrin to mitogen-activated protein kinase signalling. *Biochem J* 2000; 345 Pt 2: 385-92

**Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM;** Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81(6): 935-46

**Foreback JL, Sarma V, Yeager NR, Younkin EM, Remick DG, Ward PA;** Blood mononuclear cell production of TNF-alpha and IL-8: engagement of different signal transduction pathways including the p42 MAP kinase pathway. *J Leukoc Biol* 1998; 64(1): 124-33

**Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J;** Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 1994; 78(6): 1039-49

**Fu YX, Chaplin DD;** Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 399-433

**Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic I, Geha RS;** Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(6): 2170-3

**Futterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K;** The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 1998; 9(1): 59-70

**Gallagher TF, Fier-Thompson SM, Garigipati RS, Sorenson ME, Smietana JM, Lee D, Bender PE, Lee JC, Laydon JT, Griswold DE, Chabot-Fletcher MD, Breton JJ, Adams JL;** Triarylimidazole inhibitors of IL-1 biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 5: 1171

**Garrington TP, Johnson GL;** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2): 211-8

**Ghosh S, May MJ, Kopp EB;** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60

**Giancotti FG, Ruoslahti E;** Integrin signaling. *Science* 1999; 285(5430): 1028-32

**Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P;** Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J* 1997; 16(12): 3563-71

**Gon Y, Hashimoto S, Matsumoto K, Nakayama T, Takeshita I, Horie T;** Cooling and rearming-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 MAP kinase-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249(1): 156-60

**Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson TM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Farrah T, Armitage RJ, Fanslow WC, Smith CA;** Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 1993; 23(10): 2631-41

**Graw RG, Herzig GP, Eisel RJ, Perry S;** Leucocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion* 1971; 11(2): 94-101

**Gruss HJ, Dower SK;** Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995; 85(12): 3378-404

**Guinn BA, DeBenedette MA, Watts TH, Bernstein NL;** 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J Immunol* 1999; 162(8): 5003-10

**Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L;** IL-2 up-regulates but IFN-gamma suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol* 1993; 151(5): 2725-32

- Haas H, Becker WM, Maasch HJ, Schlaak M;** Analysis of allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1986; 79(4): 434-40
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ;** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265(5173): 808-11
- Hanahan D;** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166(4): 557-80
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connolly PA;** Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 1996; 271(2): 695-701
- Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S;** Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996; 379(6560): 91-6
- Hartwig JH, Kung S, Kovacsics T, Janmey PA, Cantley LC, Stossel TP, Toker A;** D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein IIb-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 1996; 271(51): 32986-93
- Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Maruoka S, Takeshita I, Hayashi S, Koura T, Kujime K, Horie T;** p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells. *Eur Respir J* 1999; 13(6): 1357-64
- Hawkins PT, Jackson TR, Stephens LR;** Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature* 1992; 358(6382): 157-9
- Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T;** PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450(1): 99-106
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP;** Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(3): 993-9
- Herman PK, Emr SD;** Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1990; 10(12): 6742-54
- Herrera-Velit P, Knutson KL, Reiner NE;** Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C-zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 1997; 272(26): 16445-52
- Hintzen RQ, de Jong R, Hack CE, Chamuleau M, de Vries EF, ten Berge IJ, Borst J, van Lier RA;** A soluble form of the human T cell differentiation antigen CD27 is released after triggering of the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1991; 147(1): 29-35
- Holly SP, Larson MK, Parise LV;** Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 2000; 261(1): 69-74
- Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M;** Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1999; 19(10): 6742-53

**Hughes TR, Shoemaker DD;** DNA microarrays for expression profiling. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5(1): 21-5

**Hunter T;** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80(2): 225-36

**Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS;** Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 1995; 155(7): 3360-7

**Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS;** Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 1997; 158(6): 2600-9

**Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E;** Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* 1998; 273(42): 27662-7

**Jang IK, Lee ZH, Kim YJ, Kim SH, Kwon BS;** Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242(3): 613-20

**Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J;** Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996; 271(30): 17920-6

**Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J;** Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 1997; 272(48): 30122-8

**Johnson WD Jr, Mei B, Cohn ZA;** The separation, long-term cultivation and maturation of the human monocyte. *J Ex Med* 1977; 146(6): 1613-26

**Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H;** The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994; 1(3): 167-78

**Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, Rho J, Wong BR, Josien R, Kim N, Rennert PD, Choi Y;** Regulation of peripheral lymph node genesis by tumor necrosis factor member TRANCE. *J Ex Med* 2000; 192(10): 1467-78

**Kim HH, Kwack K, Lee ZH;** Activation of c-jun N-terminal kinase by 4-1BB (CD137), a T cell co-stimulatory molecule. *Mol Cells* 2000; 10(3): 247-52

**Kim JA, Averbook BJ, Chambers K, Rothchild K, Kjaergaard J, Papay R, Shu S;** Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer Res* 2001; 61(5): 2031-7

**Kim YJ, Kim SH, Mantel P, Kwon BS;** Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur J Immunol* 1998; 28(3): 881-90

**Kim YJ, Pollok KE, Zhou Z, Shaw A, Bohlen JB, Fraser M, Kwon BS;** Novell T cell antigen 4-1BB associates with the protein tyrosine kinase p56<sup>lck1</sup>. *J Immunol* 1993; 151(3): 1255-62

**King J, Laemmli UK;** Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 1971; 62(3): 465-77

**King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsichlis PN, Brugge JS;** Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol* 1997; 17(8): 4406-18

**Kishimoto T, Goyert S, Kikutani H, Mason D, Miyasaka M, Moretta L, Ohno T, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Sugawara H, von dem Borne AE, Zola H;** Update of CD antigens, 1996. *J Immunol* 1997; 158(7): 3035-6

**Kohno T, Brewer MT, Baker SL, Schwartz PE, King MW, Hale KK, Squires CH, Thompson RC, Vannice JL;** A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(21): 8331-5

**Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM;** Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402(6759): 304-9

**Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA;** Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997 6(4): 491-500

**Korthäuer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, Ugazio AG, Notarangelo LD, Levinsky RJ, Kroczeck RA;** Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412): 539-41

**Kovacs EJ, Brock B, Varesio L, Young HA;** IL-2 induction of IL-1 beta mRNA expression in monocytes. Regulation by agents that block second messenger pathways. *J Immunol* 1989; 143(11): 3532-7

**Kusch A, Tkachuk S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I;** Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 39466-73

**Kwon BS, Kestler DP, Eshhar Z, Oh KO, Wakulchik M;** Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cell Immunol* 1989; 121(2): 414-22

**Kwon BS, Kim GS, Prystowsky MB, Lancki DW, Sabath DE, Pan JL, Weissman SM;** Isolation and initial characterization of multiple species of T-lymphocyte subset cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(9): 2896-900

**Kwon BS, Kozak CA, Kim KK, Pickard RT;** Genomic organization and chromosomal localization of the T-cell antigen 4-1BB. *J Immunol* 1994; 152(5): 2256-62

**Kwon BS, Weissman SM;** cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(6): 1963-7

**Kyriakis JM, Avruch J;** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 807-69

**Laemmli UK;** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259): 680-5

**Langstein J, Michel J, Fritzsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwarz H;** CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol* 1998; 160(5): 2488-94

- Langstein J, Michel J, Schwarz H;** CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. Blood 1999; 94(9): 3161-8
- Langstein J, Schwarz H;** Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor. J Leukoc Biol 1999; 65(6): 829-33
- Langstein J;** Charakterisierung der Aktivitäten des CD137/CD137-Ligand Systems in humanen Monozyten. Dissertation, Regensburg 1999
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ;** Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. Science 1998; 281(5385): 2042-5
- Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, Muller M, di Padova F, Moore M, Ryffel B, Eugster HP;** Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. J Exp Med 1996; 183(5): 2367-72
- Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A;** ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(9): 4355-9
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al.;** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature 1994; 372(6508): 739-46
- Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L;** Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annu Rev Immunol 1999; 17: 221-53
- Lens SM, Drillenburg P, den Drijver BF, van Schijndel G, Pals ST, van Lier RA, van Oers MH;** Aberrant expression and reverse signaling of CD70 on malignant B cells. Br J Haematol 1999; 106(2): 491-503
- Li J, Aderem A;** MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates. Cell 1992; 70(5): 791-801
- Li J, Zhu Z, Bao Z;** Role of MacMARCKS in integrin-dependent macrophage spreading and tyrosine phosphorylation of paxillin. J Biol Chem 1996; 271(22): 12985-90
- Lin TH, Aplin AE, Shen Y, Chen Q, Schaller M, Romer L, Aukhil I, Juliano RL;** Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. J Cell Biol 1997; 136(6): 1385-95
- Lin TH, Rosales C, Mondal K, Bolen JB, Haskill S, Juliano RL;** Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. J Biol Chem 1995b; 270(27): 16189-97
- Lindl T, Bauer J;** Zell und Gewebekultur. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag 1994
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ;** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 2001; 104(4): 487-501
- Loo DT, Chalupny NJ, Bajorath J, Shuford WW, Mittler RS, Aruffo A;** Analysis of 4-1BBL and laminin binding to murine 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and comparison with human 4-1BB. J Biol Chem 1997; 272(10): 6448-56

- Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R;** Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 1997; 275(5298): 394-7
- Lotz M, Setareh M, von Kempis J, Schwarz H;** The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *J Leucoc Biol* 1996; 60(1): 1-7
- Lowell CA, Fumagalli L, Berton G;** Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol* 1996; 133(4): 895-910
- Mallett S, Barclay AN;** A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunol Today* 1991; 12(7): 220-3
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J;** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982
- Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G;** Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun* 1999; 67(2): 688-93
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH;** Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long- term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11): 931-6
- McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw AP, Davreux CJ, Rotstein OD;** VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(15): 10287-94
- Melero I, Bach N, Hellström KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L;** Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol* 1998a; 28(3): 1116-21
- Melero I, Johnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L;** NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 1998b; 190(2): 167-72
- Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellström KE, Mittler RS, Chen L;** Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997; 3(6): 682-5
- Meng F, Lowell CA;** A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J* 1998; 17(15): 4391-403
- Mertens S, Craxton M, Goedert M;** SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 1996; 383(3): 273-6
- Michel J, Langstein J, Hofstaedter F, Schwarz H;** A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1998; 28(1): 290-5
- Michel J, Schwarz H;** Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes. *Cytokine* 2000; 12(6): 742-6

**Michel J;** Untersuchungen zur Signalübertragung und Charakterisierung löslicher Formen des Zytokinrezeptors CD137 Dissertation, Regensburg 1998

**Miranti CK, Ohno S, Brugge JS;** Protein kinase C regulates integrin-induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc. *J Biol Chem* 1999; 274(15): 10571-81

**Misago M, Tsukada J, Ogawa R, Kikuchi M, Hanamura T, Chiba S, Oda S, Morimoto I, Eto S;** Enhancing effects of IL-2 on M-CSF production by human peripheral blood monocytes. *Int J Hematol* 1993; 58(1-2): 43-51

**Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K;** Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 295-331

**Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM;** Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995; 131(3): 791-805

**Mogi S, Sakurai J, Kohsaka T, Enomoto S, Yagita H, Okumura K, Azuma M;** Tumour rejection by gene transfer of 4-1BB ligand into a CD80(+) murine squamous cell carcinoma and the requirements of co-stimulatory molecules on tumour and host cells. *Immunology* 2000; 101(4): 541-7

**Monick MM, Carter AB, Flaherty DM, Peterson MW, Hunninghake GW;** Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol* 2000; 165(8): 4632-9

**Moore GE, Gerner RE, Franklin HA;** Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 1967; 199(8): 519-24

**Mosmann T;** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63

**Mullis KB, Faloona FA;** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50

**Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL, Varesio L;** IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148(3): 795-800

**Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A;** CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 1992 Nov; 13(11): 431-3

**Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y** Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(9): 3099-103

**Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y** The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 1988; 263(14): 6927-32

**Pan ZK, Chen LY, Cochrane CG, Zuraw BL;** fMet-Leu-Phe stimulates proinflammatory cytokine gene expression in human peripheral blood monocytes: the role of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 2000; 164(1): 404-11

**Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR;** Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* 1995; 270(23): 13585-8

**Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G;** Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(53): 38241-50

**Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ;** Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000; 19(4): 496-503

**Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G;** Immune and inflammatory responses in TNF  $\alpha$ -deficient mice: a critical requirement for TNF  $\alpha$  in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184(4): 1397-411

**Pauly S;** Untersuchungen zur Funktion des CD137-/CD137-Ligand-Systems in antigenpräsentierenden Zellen. Dissertation, Regensburg 2000

**Peltre G, Lapeyre J, David B;** Heterogeneity of grass pollen allergens (*Dactylis glomerata*) recognized by IgE antibodies in human patients sera by a new nitrocellulose immunoprint technique. *Immunol Lett* 1982; 5(3): 127-31

**Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW;** Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993; 73(3): 457-67

**Pizzolo G, Stein H, Josimovic-Alsevic O, Vinante F, Zanotti R, Chilosi M, Feller AC, Diamantstein T;** Increased serum levels of soluble IL-2 receptor, CD30 and CD8 molecules, pathogenetic role of immunactivation mechanisms. *Br J Haematol* 75(4): 485-8

**Pollok KE, Kim SH, Kwon BS;** Regulation of 4-1BB expression by cell-cell interactions and the cytokines, interleukin-2 and interleukin-4. *Eur J Immunol* 1995; 25(2): 488-94

**Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS;** 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti- $\mu$ -primed splenic B cells. *Eur J Immunol* 1994; 24(2): 367-74

**Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, Kwon BS;** Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 1993 150(3): 771-81

**Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ;** MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16(3): 1247-55

**Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA;** Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J* 1997; 16(18): 5592-9

**Resh MD;** Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 1994; 76(3): 411-3

**Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L;** Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; 96(5): 1655-69

**Reynolds JA, Tanford C;** The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* 1970; 245(19): 5161-5

- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP;** Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268(5215): 1347-9
- Robinson MJ, Cobb MH;** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2): 180-6
- Roger PP, Reuse S, Maenhaut C, Dumont JE;** Multiple facets of the modulation of growth by cAMP. *Vitam Horm* 1995; 51: 59-191
- Rohlf C, Glazer RI;** Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways. *Cell Signal* 1995; 7(5): 431-43
- Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H;** Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection with Listeria monocytogenes. *Nature* 1993; 364(6440): 798-802
- Rothermel JD, Parker Botelho LH;** A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the diastereoisomers of adenosine 3',5' -(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem J* 1988; 251(3): 757-62
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Ne-breda AR;** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78(6): 1027-37
- Rubio I, Rodriguez-Viciiana P, Downward J, Wetzker R;** Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J* 1997; 326 ( Pt 3): 891-5
- Ruby J, Bluethmann H, Peschon JJ;** Antiviral activity of tumor necrosis factor (TNF) is mediated via p55 and p75 TNF receptors. *J Exp Med* 1997; 186(9): 1591-6
- Rudd CE, Janssen O, Prasad KV, Raab M, da Silva A, Telfer JC, Yamamoto M;** src-related protein tyrosine kinases and their surface receptors. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155(2): 239-66
- Rumsey LM, Teague RM, Benedict SH, Chan MA;** MIP-1alpha induces activation of phosphatidylinositol-3 kinase that associates with Pyk-2 and is necessary for B-cell migration. *Exp Cell Res* 2001; 268(1): 77-83
- Rutault K, Hazzalin CA, Mahadevan LC;** Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts. *J Biol Chem* 2001; 276(9):6666-74
- Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA, Kie-ner PA;** Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* 2000; 165(5): 2903-10
- Sanderson RJ, Shepperdson RT, Vatter AE, Talmage DW;** Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1977 118(4): 1409-14
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR;** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5463-7

**Sanzenbacher R, Wenzel J, Lewitzky M, Kaplan D, Kabelitz D, Feller S, Janssen O;** Identification of CD95L-interacting proteins that may explain retrograde signaling of a death ligand. 17. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie 2001; *Abstract B12*

**Saoulli K, Lee SY, Cannons JL, Yeh WC, Santana A, Goldstein MD, Bangia N, DeBenedette MA, Mak TW, Choi Y, Watts TH;** CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* 1998; 187(11): 1849-62

**Schaeffer HJ, Weber MJ;** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999; 19(4): 2435-44

**Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P;** Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372(6508): 786-91

**Scholz G, Cartledge K, Dunn AR;** Hck enhances the adherence of lipopolysaccharide-stimulated macrophages via Cbl and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(19): 14615-23

**Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD;** Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 1993; 260(5104): 88-91

**Schwarz H, Arden K, Lotz M;** CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235(3): 699-703

**Schwarz H, Blanco FJ, von Kempis J, Valbracht J, Lotz M;** ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood* 1996; 87(7): 2839-45

**Schwarz H, Tuckwell J, Lotz M;** A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor-receptor family. *Gene* 1993; 134(2): 295-8

**Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, von Kempis J, Lotz M;** ILA, the human 4-1BB homolog, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 1995; 85(4): 1043-52

**Setareh M, Schwarz H, Lotz M;** A mRNA variant encoding a soluble form of 4-1BB, a member of the murine NGF/TNF receptor family. *Gene* 1995; 164(2): 311-5

**Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y;** Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 2001; 152(2): 237-50

**Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y;** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399(6735): 483-7

**Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raeche H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS;** 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 1997; 186(1): 47-55

**Sica GL, Zhu G, Tamada K, Liu D, Ni J, Chen L;** RELT, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, is selectively expressed in hematopoietic tissues and activates transcription factor NF-kappaB. *Blood* 2001; 97(9): 2702-2707

- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ;** Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000; 288(5475): 2354-7
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG;** The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76(6): 959-62
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC;** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1): 76-85
- Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W;** A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 1992; 90(2): 334-41
- Sorgato MC, Moran O;** Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28(2): 127-71
- Sotsios Y, Ward SG;** Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* 2000; 177: 217-35
- Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, Horak ID;** Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem* 1993; 268(28): 20725-8
- Stein B, Yang MX, Young DB, Janknecht R, Hunter T, Murray BW, Barbosa MS;** p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem* 1997; 272(31): 19509-17
- Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT;** A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 1994; 77(1): 83-93
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT;** The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 1997; 89(1): 105-14
- Stephens LR, Hughes KT, Irvine RF;** Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 1991; 351(6321): 33-9
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al.;** Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 1995; 269(5224): 690-3
- Strieter RM, Remick DG, Lynch JP 3rd, Spengler RN, Kunkel SL;** Interleukin-2-induced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(2): 335-42
- Stüber E, Neurath M, Calderhead D, Fell HP, Strober W;** Crosslinking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 1995; 2(5): 507-21
- Superti-Furga G, Courtneidge SA;** Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* 1995; 17(4): 321-30

**Suzuki I, Fink PJ;** Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med* 1998; 187(1): 123-8

**Suzuki I, Fink PJ;** The dual functions of Fas ligand in the regulation of peripheral CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(4): 1707-12

**Takahashi C, Mittler RS, Vella AT;** Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 1999; 162(9): 5037-40

**Takahashi C, Mittler RS, Vella AT;** Differential clonal expansion of CD4 and CD8 T cells in response to 4-1BB ligation: contribution of 4-1BB during inflammatory responses. *Immunol Lett* 2001; 76(3):183-91

**Tan JT, Ha J, Cho HR, Tucker-Burden C, Hendrix RC, Mittler RS, Pearson TC, Larsen CP;** Analysis of expression and function of the costimulatory molecule 4-1BB in alloimmune responses. *Transplantation* 2000a; 70(1): 175-83

**Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC, Larsen CP;** 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 1999; 163(9): 4859-68

**Tan JT, Whitmire JK, Murali-Krishna K, Ahmed R, Altman JD, Mittler RS, Sette A, Pearson TC, Larsen CP;** 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol* 2000b; 164(5): 2320-5

**Thomas SM, Soriano P, Imamoto A;** Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 1995; 376(6537): 267-71

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J;** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9): 4350-4

**Treisman R;** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(2): 205-15

**Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S;** Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1999; 19(11): 7420-7

**Tsujimoto Y, Shimizu S;** VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 2000; 7(12): 1174-81

**Ueda Y, Hirai Si, Osada Si, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S;** Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 1996; 271(38): 23512-9

**van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS;** Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 1999; 67(8): 3824-9

**Van Essen D, Kikutani H, Gray D;** CD40 ligand-transduced costimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* 1995; 378(6557): 620-3

- van Hal NL, Vorst O, van Houwelingen AM, Kok EJ, Peijnenburg A, Aharoni A, van Tunen AJ, Keijer J;** The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J Biotechnol* 2000; 78(3): 271-80
- Van Kooten C, Banchereau J;** CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* 1996; 61: 1-77
- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD;** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 239-54
- Vinay DS, Kwon BS;** Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 1998; 10(6): 481-9
- Virbasius JV, Guilherme A, Czech MP;** Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem* 1996; 271(23): 13304-7
- Vogelstein B, Gillespie D;** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(2): 615-9
- von Kempis J, Schwarz H, Lotz M;** Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5(6): 394-406
- Von Willebrand M, Jascur T, Bonnefoy-Berard N, Yano H, Altman A, Matsuda Y, Mustelin T;** Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2. *Eur J Biochem* 1996; 235(3): 828-35
- Wajant H, Scheurich P;** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(1): 19-32
- Waldron RT, Iglesias T, Rozengurt E;** Phosphorylation-dependent protein kinase D activation. *Electrophoresis* 1999; 20(2): 382-90
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP;** Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-67
- Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M, Yao Z;** Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23668-74
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S;** The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148(4): 1274-9
- Wei J, Shaw LM, Mercurio AM;** Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by the cytoplasmic domain of the alpha<sub>6</sub> integrin subunit. *J Biol Chem* 1998 Mar; 273(10): 5903-7
- Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA;** Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol* 1996; 157(8): 3635-9
- Williams LM, Ridley AJ;** Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 164(4): 2028-36
- Wysk M, Yang DD, Lu HT, Flavell RA, Davis RJ;** Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(7): 3763-8

**Xiang J;** Expression of co-stimulatory 4-1BB ligand induces significant tumor regression and protective immunity. *Cancer Biother Radiopharm* 1999; 14(5): 353-61

**Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA;** Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994; 1(5): 423-31

**Yambolieva IA, Chen J, Gerthoffer WT;** PI 3-kinases and Src kinases regulate spreading and migration of cultured VSMCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(2): C709-18

**Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y;** Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 1993; 268(34): 25846-56

**Young P, McDonnell P, Dunnington D, Hand A, Laydon J, Lee J;** Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level. *Agents Actions* 1993; 39 Spec No:C67-9

**Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R;** Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(23): 10531-4

**Zheng DQ, Woodard AS, Tallini G, Languino LR;** Substrate specificity of alpha(v)beta(3) integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation. *J Biol Chem* 2000; 275(32): 24565-74

**Zhu X, Assoian RK;** Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* 1995; 6(3): 273-82

**Zugaza JL, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E;** Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *EMBO J* 1996; 15(22): 6220-30

**Zupan AA, Osborne PA, Smith CE, Siegel NR, Leimgruber RM, Johnson EM Jr;** Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1989; 264(20): 11714-20



---

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis Oktober 2001 am Institut für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn PD Dr. Herbert Schwarz für die Überlassung des Themas und für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft auch aus der Ferne.

Herrn PD Dr. Charalampos Aslanidis danke ich für die bereitwillige Betreuung dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter danke ich für die freundliche Aufnahme an sein Institut und für seine Unterstützung während der letzten Jahre.

Mein Dank gilt auch Dr. Gerhard Giegerich, der als Ansprechpartner vor Ort mit Tips und Ratsschlägen zur Seite stand.

Bei Dr. Bernd Becker möchte ich mich für die Einführung in die Geheimnisse der Arraytechnologie bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen – Daniela Drenkard, Gitte Krause, Jan Michel, Susanne Pauly, Anne Pietryga-Krieger, Conny Schmid, Silvia Seegers, Sabine Troppmann und Margarethe Wittmann – und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für ihre Hilfsbereitschaft in den Tücken des Laboralltags.

Den Mitarbeitern der Abteilungen für Hämatologie/Onkologie bzw. Klinische Chemie danke ich für die Zurverfügungstellung von Zellmaterial.

Und *last but not least* danke ich Michael und Peter für ihre Unterstützung bei „computertechnischen“Fragen.

Regensburg, Oktober 2001

Liane Söllner