

# **Über Glykoepitope auf CD-Antigenen vermittelte Signalweiterleitung bei T-Zellen durch Galectin-1**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(doctor rerum naturalium)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

von  
Diplom-Chemiker  
Matthias Blach

Rostock 2003

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0129-6

Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. habil. Josef Brock  
Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Schillingallee 70  
18057 Rostock

Prof. Dr. rer. nat. habil. Edda Siegl  
Prof. in Rostock:  
Institut für Biowissenschaften  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock  
Wismarsche Str. 8  
18051 Rostock

Prof. Dr. med. habil. Georg Hübner  
Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Klinikum Sauerbruchstraße  
17487 Greifswald

Datum der Verteidigung: 28.11.2008

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
3.1	Klassifizierung, Struktur und Funktion endogener kohlenhydratbindender Proteine	8
3.2	Einteilung, Struktur und Sekretion der Galectine	12
3.3	Expression und biologische Funktion von Galectin-1	14
3.4	Durch Galectin-1 stimulierte frühe Ereignisse der T-Zell Aktivierung	17
<b>4</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
5.1	Zellen	23
5.2	Isolierung von Galectin-1 aus humanen Plazentagewebe	23
5.2.1	Herstellung der Lactosyl-Sepharose 4B	23
5.2.2	Herstellung von Asialofetuin-Sepharose 4B	24
5.2.3	Affinitätschromatographische Isolierung von Galectin-1	24
5.2.4	Immobilisierung von Galectin-1	25
5.2.5	Biotinylierung von Galectin-1	25
5.2.6	Proteinbestimmung	25
5.3	Elektrophoretische Techniken	26
5.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
5.3.2	Elektrotransfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (Blotting)	26
5.4	Nachweis Gal-1 bindender CD-Antigene	27
5.4.1	Immunpräzipitation von CD2 und CD3 in Jurkat T-Zell Lysaten	27
5.4.2	Auf trennung von Jurkat T-Zell Lysaten an Gal-1 Agarose	27
5.4.3	Nachweis von CD2 und CD3 auf Blots	28
5.5	Bestimmung der Konzentration an intrazytoplasmatisch freiem Calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ )	28
5.5.1	Beladen der Zellen mit Fura-2 AM	28
5.5.2	Messung der Calciumkonzentration	29
5.6	Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) und Messung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP <sub>3</sub> )	29
5.6.1	Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C- $\gamma$ 1	29
5.6.2	Messung der Konzentration von InsP <sub>3</sub>	30

<b>5.7</b>	<b>Messung der zellulären Phosphatidylserin (PtdSer) Synthese</b>	<b>30</b>
5.7.1	Stimulation der Zellen	30
5.7.2	Bestimmung des Gesamteinbaus von [ <sup>3</sup> H]Serin	31
5.7.3	Extraktion der Lipide, Abtrennung und Nachweis von [ <sup>3</sup> H]Phosphatidylserin	31
<b>5.8</b>	<b>Transiente Transfektion - AP-1 Reportergenassays und AP-1 Gel Shift Assays</b>	<b>32</b>
5.8.1	AP-1 Reportergenassays	32
5.8.2	Präparation der Kernextrakte	32
5.8.3	AP-1 Gel Shift Assays	33
5.8.4	JNK1 Immunkomplex Kinase Assay	33
<b>5.9</b>	<b>Nachweis der Translokation von Proteinkinase C (PKC) Isoformen an die Plasmamembran</b>	<b>35</b>
5.9.1	Transfektion der Zellen	35
5.9.2	Nachweis der PKC-EGFP Translokation	35
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>6.1</b>	<b>Elektrophoretische Analyse der Gal-1 Präparationen durch SDS-PAGE</b>	<b>36</b>
<b>6.2</b>	<b>Nachweis Gal-1 bindender CD-Aktivierungsmarker auf Blots</b>	<b>37</b>
6.2.1	Gal-1 erkennt Glykoepitope auf dem CD2 Antigen	37
6.2.2	Gal-1 erkennt Glykoepitope auf dem CD3-Komplex	38
<b>6.3</b>	<b>Charakterisierung der Gal-1 stimulierten Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	<b>39</b>
6.3.1	Gal-1 stimuliert einen biphasischen Verlauf der Calciummobilisation	40
6.3.2	Effekte der Proteinkinaseinhibitoren Herbimycin A und Staurosporin auf die Gal-1 stimulierte Erhöhung von [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	41
6.3.3	Cholera Toxin hemmt die Gal-1 stimulierte Calciummobilisation partiell	42
6.3.4	Der Gal-1 stimulierte Calciumeinstrom wird durch Membrandepolarisation gehemmt	44
<b>6.4</b>	<b>Effekt von Gal-1 auf die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und die Tyrosinphosphorylierung der PLC-γ1</b>	<b>46</b>
6.4.1	Galectin-1 stimuliert einen transienten Anstieg von InsP <sub>3</sub>	46
6.4.2	Die Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1 und C2S führt zur Tyrosinphosphorylierung der PLC-γ1	47
<b>6.5</b>	<b>Gal-1 hemmt die zelluläre Synthese von Phosphatidylserin (PtdSer)</b>	<b>48</b>
6.5.1	Gal-1 hemmt die PtdSer-Synthese konzentrationsabhängig	49
6.5.2	Die Expression von CD3 und CD45 ist für die Gal-1 und CD3 mAk stimulierte PtdSer-Synthesehemmung erforderlich	50
6.5.3	Effekt von Trifluoperazin und von Xestospongin C auf die Gal-1 stimulierte PtdSer-Synthesehemmung	52
<b>6.6</b>	<b>Effekt von Gal-1 auf die Translokation der Proteinkinase C Isoformen (PKCα, -β, -γ, -θ)</b>	<b>53</b>
6.6.1	Proteinkinase Cα	54
6.6.2	Proteinkinase Cβ	55
6.6.3	Proteinkinase Cγ	57
6.6.4	Proteinkinase Cθ	58
<b>6.7</b>	<b>Galectin-1 stimuliert in Jurkat T-Lymphozyten den Transkriptionsfaktor AP-1</b>	<b>59</b>
6.7.1	Gal-1 stimuliert die c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) in Jurkat E6.1 Zellen	59
6.7.2	Gal-1 stimuliert das Reportergenkonstrukt pAP1(PMA)-TA-Luc	60
6.7.3	Gal-1 stimuliert die Aktivierung von AP-1 in Jurkat T-Lymphozyten	62

<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>LEBENSLAUF</b>	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>89</b>
<b>12</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>90</b>

## 2 Abkürzungsverzeichnis

[ <sup>3</sup> H]	Tritium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
AchR	Acetylcholinrezeptor
AP-1	Aktivatorprotein-1
BCR	B-Zell Rezeptor
BNHS	Biotinyl-N-hydroxysuccinimid
BSA	Rinderserum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CIA	Kollagen induzierte Arthritis
ConA	Concanavalin A
CRACs	calcium release activated calcium channels
CRD	Kohlenhydrat-erkennende Domäne
CTX	Choleratoxin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
ECL	enhanced chemoluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminomethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum
Gal-1	Galectin-1
Gal	Galactose

Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
IFN	Interferon
IGF II	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor II
IL	Interleukin
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4, 5-trisphosphat
ITAMs	Immunrezeptor Aktivierungsmotive
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
LAT	Linker für aktivierte T-Zellen
mAk	monoklonaler Antikörper
Man-6-P	Mannose-6-phosphat
MbP	myelinbasisches Protein
MePBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 4 mM 2-Mercaptoethanol
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
NFAT	nucleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PHA	Phytohämagglutinin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdSer	Phosphatidylserin
PTPase	Proteintyrosinphosphatase

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
Siglecs	Sialinsäure-bindende-Proteine
SP-A	Surfaktantprotein A
SP-D	Surfaktantprotein D
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS/Tw	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TCR	T-Zell Rezeptor
TFP	Trifluoperazin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
XeC	Xestospongin-C

### **3 Einleitung**

#### ***3.1 Klassifizierung, Struktur und Funktion endogener kohlenhydratbindender Proteine***

Kohlenhydrate finden sich auf der Oberfläche aller Zellen und in der extrazellulären Matrix. Bei der Biosynthese werden die Saccharidstrukturen an Proteine und Lipide fixiert und von ihnen zum Bestimmungsort innerhalb und außerhalb der Zelle transportiert. Für die Biosynthese der Oligosaccharide betreibt die Zelle einen beträchtlichen energetischen Aufwand, und mehrere hundert Enzyme sind involviert. Dieser Aufwand weist darauf hin, dass Kohlenhydratstrukturen Funktionen bei einer Reihe biologischer Prozesse zukommen. Gezeigt worden sind diese Funktionen für die Proteinfaltung und Stabilität, die Zielsteuerung der Proteine und den Abbau sowie für Zell-Matrix und Zell-Zell-Wechselwirkungen (1). Spezifische Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen und Glykolipiden sind für spezielle Funktionen verantwortlich (2, 3). So wird die Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothel und die Wanderung in den postkapillären Venolen über die Erkennung von Zelloberflächen Sialyl-Lewis<sup>x</sup> Oligosacchariden durch Mitglieder der C-Typ Lektinfamilie der Selektine (E-, P- und L-Selektin) vermittelt (4-6). Die Kohlenhydratstrukturen von Laminin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix, beeinflusst die Adhäsion, das axonale Wachstum und das Spreading von Zellen (7).

Kohlenhydratstrukturen von Glykoproteinen und von Glykolipiden werden von Glykosyltransferasen unter Verwendung von Nucleotiddiphosphat-aktivierten Zuckern im ER und Golgi Apparat synthetisiert und durch eine Vielzahl von Glycosidasen prozessiert (8). Veränderte Aktivitäten dieser Enzyme während der Entwicklung oder im Zusammenhang mit der Antwort der Zelle auf Stimulierungen führen zu veränderten Kohlenhydratstrukturen vieler Zelloberflächenglykokonjugate (9, 10). Eine Reihe von Krankheiten werden durch veränderte Aktivitäten von Glykosyltransferasen ausgelöst, wie zum Beispiel die I-Zellen Krankheit (11), der Leukozyten-Adhäsionsdefizit Typ II (12) und das Kohlenhydratdefizienz-Glycoprotein-Syndrom (13). Veränderte Glykosyltransferaseaktivitäten sind auch bei Tumorerkrankungen beschrieben worden (14), wobei eine erhöhte Sialyltransferase und

verringerte  $\alpha$ 1-3 Fucosyltransferaseaktivität mit einem hohen Metastasierungspotential bei Colonkarzinomen korreliert (**15, 16**).

Im Vergleich zu Proteinen und Nukleinsäuren wurde bisher dem Phänomen der spezifischen Erkennung von Kohlenhydratstrukturen weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Eine der zentralen, bis heute nur zum Teil beantworteten Fragen der modernen Glykobiologie ist die Funktion zellulärer Glykokonjugate. Von tierischen Zellen exprimierte kohlenhydratbindende Proteine (endogene Lektine), die spezifische Oligosaccharidstrukturen von Glykokonjugaten erkennen, sind geeignete Werkzeuge um diesen „Glykocode“ zu entschlüsseln (**2, 17**). Effiziente rekombinante Expressionssysteme und die Reinigung endogener Lektine durch Affinitätschromatographie haben umfangreiche strukturelle Untersuchungen ermöglicht. Auf der Grundlage von Sequenzierungs- und kristallographischen Analysen erfolgt die Einteilung dieser Proteine nicht mehr über die Saccharidspezifität, sondern anhand der Sequenzhomologie ihrer Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (CRD). Die Klassifizierung anhand des Sequenzvergleichs der CRDs führte zur Definition von fünf Familien endogener Lektine (Tab. 1, **18, 19, 20**).

**Tabelle 1 Klassifizierung endogener Lektine nach Gabius (21)**

Familie	Strukturelles Motiv	Kohlenhydratligand
C-Typ	konservierte CRD	variabel (Mannose, Galaktose, Fucose, Heparin-Tetrasaccharide)
I-Typ	Immunglobulin-ähnliche CRD	variabel ( $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-Sialyllactose)
Galectine	konservierte CRD	$\beta$ -Galactoside
Pentraxine	pentamere Anordnung der Untereinheiten	4,6-cyclische Acetale der $\beta$ -Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide
P-Typ	konservierte CRD	Mannose-6-phosphatreste von Glykoproteinen

Die CRDs innerhalb jeder Proteinfamilie zeigen ein charakteristisches Muster invariabler hochkonservierter Aminosäurereste. Außerdem gibt es signifikante Unterschiede in wichtigen Eigenschaften, die die Funktion und die Lokalisation der Proteinfamilie bestimmen. C-Typ

Lektine, die im Serum, der extrazellulären Matrix und als Membranproteine vorkommen, binden verschiedene Saccharidstrukturen wie auch die Pentraxine calciumunabhängig (5, 22). Dabei vermitteln Asialoglykoprotein-Rezeptoren mit multiplen C-Typ CRDs, der Fucose-Rezeptor mit einer C-terminalen C-Typ-Lektindomäne und der Mannose-Rezeptor von Makrophagen mit acht C-Typ CRDs für N-verknüpfte Mannosereste die Endocytose von Glykoproteinen (20). Durch die Clusterung der C-Typ CRDs wird die Affinität und Selektivität gegenüber komplexen Oligosacchariden beträchtlich erhöht (Chelateffekt). Neben den Selektinen zählen auch Collectine (Mannose-bindendes Protein, die Surfactant Proteine A und D, bovines Conglutinin, Collectin 43) zu endogenen Lektinen vom C-Typ (20). Collectine erkennen Mannosereste über ihre in eine trimere Orientierung angeordneten C-Typ CRDs. Die Collectine haben Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunität, indem sie an Kohlenhydrattargets von Pathogenen binden und den Lektin-vermittelten Weg Komplementaktivierung initiieren (23, 24). Surfactant Protein A und D (SP-A, SP-D) erkennen verschiedene Allergene (25). Diese Wechselwirkungen inhibieren kompetitiv bzw. sterisch die Bindung von IgE an bestimmte Allergene und modulieren so allergische Reaktionen in der Lunge. Es ist gezeigt worden, dass SP-A und SP-D die Agglutination, Phagocytose und die Eliminierung von Aspergillus fumigatus Sporen durch humane Alveolarmakrophagen und zirkulierende Neutrophile stimulieren. Beide Proteine binden die Saccharidstrukturen infektiöser Sporen über ihre C-Typ CRDs Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Sequenzvergleiche zeigten, dass die Aminosäurereste Glu185 und Asn187 in mannosebindenden Proteinen in die Zuckerbindung und die Ca<sup>2+</sup>-Koordination involviert sind (26).

Kohlenhydratbindende Proteine vom P-Typ sind am Transport lysosomaler Enzyme vom Trans-Golgi Kompartiment zu den Lysosomen beteiligt (27, 28, 29, 30). Die Abtrennung der lysosomalen Proteine von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen hängt von der Bindung an membranintegrierte Mannose-6-phosphat (Man-6-P)-Rezeptoren im Bereich des Golgi-Apparates ab. Dabei erfolgt die Synthese der Man-6-P Reste an lösliche lysosomale Proteine posttranslational mit Hilfe einer Phosphotransferase. Die Bindung dieser Proteine an Man-6-P-Rezeptoren verhindert deren Sekretion bzw. Membranintegration und ermöglicht den vesikulären Transport zu den Lysosomen. Dieser vektorielle Transport der Liganden ist durch die pH-Abhängigkeit der Bindung (neutraler pH-Wert im Golgi-Apparat, saurer pH-Wert in den prälysosomalen Organellen) möglich und wird durch den kationabhängigen und

den kationunabhängigen Man-6-P-Rezeptor vermittelt (**31**). Der kationunabhängige Man-6-P-Rezeptor, ein Dimer mit fünfzehn Repeats von P-Typ CRDs, ist auch in die Internalisierung extrazellulärer Hydrolasen eingebunden. Dieser Rezeptor bindet gleichzeitig Man-6-P und den insulinähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF II) mit hoher Affinität. Es ist gezeigt worden, dass der IGF II-Man-6-P Rezeptor bei der Initiation verschiedener biologischer Antworten, wie z.B. der Stimulation des Ioneneinstroms in 3T3 Fibroblasten, der Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>), der DNA-Synthese in Erythroleukämiezellen und der Stimulation der Glykogensynthase in Hepatozyten, beteiligt ist (**32**).

Für Sialinsäuren ist kennzeichnend, dass sie endständig an Saccharidstrukturen von sezernierten Glykokonjugaten und Zelloberflächenglykokonjugaten gebunden sind. Infolge ihrer negativen Ladung können sie intermolekulare und Zell-Zell-Wechselwirkungen beeinträchtigen, sind jedoch auch Zielstrukturen für Sialinsäure-bindende Proteine (Siglecs), die zur Gruppe der I-Typ Lektine gehören. Im Gegensatz zu den anderen tierischen Lektinen zählen die Siglecs zur Immunglobulin-Superfamilie, und mehrere haben eine charakteristische V<sub>1</sub>-C2 Domänenstruktur (**33**). Es sind integrale Membranproteine mit einer Sialinsäure-bindenden extrazellulären Domäne, und einige (CD22, CD33, Myelin-assoziiertes Glykoprotein) haben lange cytosolische Domänen mit multiplen Phosphorylierungsstellen an Ser/Thr- und Tyr- Resten mit einem Immunorezeptor Tyrosin-abhängigen inhibitorischen Motiv (**34**). Seit der Entdeckung des ersten Sialinsäure-bindenden Proteins (Faktor H des alternativen Weges der Komplementaktivierung, **35**) ist ihre Anzahl inzwischen auf sieben Mitglieder angewachsen (**36**). Jedes dieser Proteine erkennt bevorzugt bestimmte Gruppen des sialylierten Liganden, wie z.B. die Seitenkette, die N-Acetylgruppe, die Bindung an Position 2 und die präterminalen Zucker (**37, 38**). Die Zuordnung spezifischer Funktionen zur Erkennung von Sialinsäureresten ist erschwert, da die Bindungsstellen der Siglecs oft durch endogene Liganden maskiert sind und erst durch Sialidase Behandlung oder durch Zellaktivierung freigelegt werden (**39**). Eine solche Demaskierung von Sialinsäure-Bindungsstellen ist für Siglec-tragende B-Zellen, Monocyten und Makrophagen und auch bei NK-Zellen gezeigt worden. Siglec-2 (CD22) ist ein spezifisch von B-Zellen exprimierte Transmembran Glykoprotein, das als Corezeptor die Signalweiterleitung über den B-Zell Rezeptor (BCR) reguliert (**40, 41**). Dabei wird die Corezeptorfunktion von CD22 durch die LYN-Kinase reguliert, die die cytoplasmatische Domäne tyrosinphosphoryliert und damit Phosphotyrosinmotive für Effektorproteine mit SH2-Domänen generiert (**42**). Es konnte

gezeigt werden, dass CD22 durch seine Wechselwirkung mit der Proteintyrosinphosphatase (PTPase) SHP-1 die BCR-vermittelte Signalweiterleitung inhibiert (43). An diesem Regelkreis ist auch die Transmembran PTPase-CD45 beteiligt, die die Tyrosinphosphorylierung von CD22 und damit die Bindung und Aktivierung von SHP-1 reguliert. Darauf weisen die Hyperphosphorylierung von CD22 und die Aktivierung der SHP-1-Phosphatase in CD45 defizienten Zellen bzw. die durch CD45 monoklonale Antikörper (mAk) vermittelte Ligation von CD45, die zur Trennung des in der Plasmamembran von B-Zellen vorliegenden multimolekularen CD45-CD22 Komplexes führt, hin (41, 44).

### ***3.2 Einteilung, Struktur und Sekretion der Galectine***

Galectine bilden eine Familie eng verwandter  $\beta$ -Galactosid-bindender Proteine, die von Schwämmen über Nematoden bis hin zu Vertebraten weit verbreitet sind und ihre molekularen Eigenschaften wie die Proteinarchitektur und Bindungsspezifität evolutionär konserviert haben. Sie verfügen über ein hochkonserviertes Aminosäuresequenzmotiv in der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (45, 46). Vom Standpunkt ihrer Proteinarchitektur werden die zehn Mitglieder dem Prototyp, dem Chimärentyp und dem Tandem-Repeat-Typ zugeordnet (47). Prototyp-Galectine sind kleine Proteine (Molmassen um 15 kDa) mit einer CRD. Zu dieser Gruppe gehören die Galectine 1, 2, 5 und 7. Während Gal-5 unter physiologischen Bedingungen als Monomer vorliegt, bilden die Galectine 1, 2 und 7 nichtkovalent assoziierte Homodimere (48, 49), die aufgrund ihrer Bivalenz die Fähigkeit haben, Glykokonjugate mit Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Sequenzen zu vernetzen. Besonders effizient gelingt dies, wenn solche Sequenzen als Repeats bzw. am Ende antennärer Glykanstrukturen vorliegen. Gal-3 zählt zum Chimärentyp. Es hat eine Molmasse von 30 kDa mit einer C-terminalen CRD, die über Repeats von 7-10 Aminosäureresten (hauptsächlich Prolin, Glycin, Tyrosin) mit der N-terminalen Region verbunden ist. Die N-terminale Hälfte hat Homologie zu Komponenten des heteronukleären Ribonucleoprotein-Komplexes mit den charakteristischen repetitiven Prolin- und Cystein-reichen Sequenzen (50). Während Gal-3 in freier Form als Monomer vorliegt, führt die CRD-vermittelte Glykokonjugaterkennung auf Zelloberflächen zur Multimerisierung des Proteins (46).

Zum Tandem-Repeat-Typ gehören die Galectine 4, 6 und 8, die über zwei CRDs in einer Peptidkette verfügen (51). Bei dieser Gruppe sind die CRDs über Repeats aus 7-10 Aminosäureresten mit der Konsensussequenz PGAYPG(X)<sub>4</sub> verbunden. Dabei ist die Spezifität und Affinität der CRDs gegenüber Disaccharidstrukturen unterschiedlich (52, 53). Mutageneseexperimente zeigten, dass sechs hydrophile Aminosäurereste (His44, Asn46, Arg48, Asn61, Glu71, Arg73), die in einer hochkonservierten zentralen Region der Prototyp-Galectine lokalisiert sind und von einem Exon kodiert werden, für die Bindung von N-Acetyllactosaminresten durch Gal-1 essentiell sind. Dabei kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Aminosäuren und den OH-Gruppen 4 und 6 der Galaktose sowie der 3-OH-Gruppe von GlcNAc (54, 55). Freie Cysteinreste sind an der Kohlenhydraterkennung nicht direkt beteiligt, jedoch konnte mit mutiertem Gal-1 (Cys2/Ser) gezeigt werden, dass die Oxidation von Cys2 und Cys130 im nativen Protein unter Ausbildung einer Disulfidbindung zur Inaktivierung der β-Galactosiderkennung führt (55). Unter nichtreduzierenden Bedingungen geht daher die Kohlenhydratbindung verloren, kann jedoch durch Thiolschutzgruppenreagenzien stabilisiert werden.

Alle bisher untersuchten Galectine besitzen charakteristische Merkmale cytoplasmatischer Proteine. Sie haben einen durch Acetylierung blockierten N-Terminus, keine Transmembrandomäne, und obwohl Glykosylierungsmotive sowie mehrere Cysteinreste vorhanden sind, ist für Galectine das Fehlen von Glykosylierung und Disulfidbindungen charakteristisch (56, 57). Die Klonierung der cDNA zeigte, dass Galectine ohne Signalsequenz synthetisiert werden (58). Diese Eigenschaften kennzeichnen Galectine als typische cytoplasmatische Proteine und schließt ihre Freisetzung durch den klassischen Sekretionsweg über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat aus. Obwohl der genaue Mechanismus dieser atypischen Sekretion nur ungenügend verstanden wird, ist gezeigt worden, dass Gal-1 nach einem vom klassischen Sekretionsweg unabhängigen Mechanismus sezerniert wird (59, 60). Insbesondere im Verlauf der Differenzierungsphase reichern sich Galectine ungleichmäßig im Ektoplasma in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran an, invaginieren sie an bestimmten Stellen in erhöhten Konzentrationen unter Bildung lektinreicher Vesikel und werden aus diesen in den extrazellulären Raum ecytisiert (59). Erythropoietin stimuliert die erythroide Differenzierung von K562 Zellen und die Sekretion von Gal-1, das an N-Acetyllactosaminreste von Zelloberflächenglykokonjugaten bindet (61). Die autokrine

Bindung von Gal-1 an Glykanstrukturen weist auf eine Einbindung in Prozesse wie Signalweiterleitung, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hin. Der alternative Signalsequenz-unabhängige Weg des Proteinexports wird auch bei anderen physiologisch wichtigen Proteinen mit autokrinen Funktionen, wie z.B. beim basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor (**62**) oder Interleukin-1 $\beta$  (**63**), gefunden.

Der biologische Vorteil des Proteinexports durch Ectocytose ist unklar. Möglicherweise ist eine Trennung von Glykosylierung und Glykanprozessierung im ER und Golgi-Apparat von der Erkennung dieser Strukturen sowie der Schutz freier SH-Gruppen vor dem oxidierenden Milieu im ER für die Zelle sinnvoll (**64, 65**).

### **3.3 Expression und biologische Funktion von Galectin-1**

Die Expression von Gal-1 ändert sich während der Entwicklung (**66, 67**) und wird durch DNA-Methylierung kontrolliert (**68, 69**). Das Protein wird im sich entwickelnden, jedoch nicht im adulten Gehirn exprimiert (**70**), und in humanen endothelialen Zellen stimuliert IL-1, TGF-  $\beta$  und IFN- $\gamma$  seine Expression (**71**). In epithelialen Gewebe korreliert eine erhöhte Gal-1-Expression bei Tumorzellen mit einer schwach differenzierten Morphologie und einem metastasierenden Phänotyp (**72**). Bei Schilddrüsen-Tumoren gilt eine erhöhte Expression des Proteins als diagnostischer Marker für die Malignität (**73**).

Betrachtet man die Biologie der Galectine, so ist zu beachten, dass das typische Rezeptor-Ligand-Modell, nach dem ein Proteinligand mit einem Rezeptorprotein interagiert, nicht zutreffend ist. Galectine binden zwar spezifische Oligosaccharide, die jedoch auf einer Vielzahl von Glykokonjugaten gefunden werden. Daraus ergibt sich, dass Galectine auch komplementäre Glykostrukturen auf funktionell weniger relevanten Molekülen erkennen bzw. die Expression von Galectinen und entsprechend glykosylierten Rezeptoren in Geweben und zellulären Kompartimenten nicht simultan erfolgt. Bei allen bisher für Gal-1 identifizierten Rezeptoren (Fibronectin, Laminin, CD2, CD3, CD4, CD7, CD45-Isoformen, lysosomal-assoziiertes Glykoprotein; **74, 75, 76, 77, 78, 79**) handelt es sich um Zelloberflächen- bzw. um Glykoproteine der extrazellulären Matrix (ECM). Intrazelluläre Rezeptoren sind für Gal-1 bisher nicht identifiziert. Gal-3 hingegen bindet an extra- und intrazelluläre Targets. Intrazellulär bindet Gal-3 mit seiner N-terminalen RNA-bindenden Domäne an RNA

innerhalb des Kerns (80) und an bcl-2, ein cytoplasmatisches Regulatorprotein der Apoptose, kohlenhydratunabhängig über eine Peptidsequenz in der C-terminalen CRD (81). Der antiapoptotische Effekt von Gal-3 resultiert aus der Heterodimerisierung mit bcl-2. Die durch Gal-1 induzierte Antwort von Zellpopulationen wird daher vom Glykosylierungsmuster verschiedener Rezeptoren abhängen, deren Ligation zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führen kann. Während Gal-1 bei aktivierten T-Zellen Apoptose induziert und dabei die Expression von CD3, CD45 und CD7 erfordert (82, 77, 79), antworten CD45-defiziente Fibroblasten auf die Bindung von Gal-1 mit Proliferation (83). Die biologische Antwort einer Zelle auf die Bindung dieses Proteins wird auch von der Glykosylierung so genannter kompetitiver, d.h. Gal-1 bindender, jedoch nicht in die Signalweiterleitung integrierter Rezeptoren abhängen, die durch Änderungen der Aktivität der Glycosyltransferasen und/oder Glykosidasen reguliert wird. Die zwei ECM-Glykoproteine Laminin und Fibronectin binden Gal-1 und lokalisieren das Protein in der extrazellulären Matrix, das dann die Adhäsion von Zellen vermittelt. Andererseits inhibiert die Überproduktion von Gal-1 durch Myoblasten die Adhäsion an Laminin durch eine sterische Behinderung der Bindung von Integrinen an Laminin (84). Bei Ovarial-Carcinomzellen begünstigen hohe Gal-1 Konzentrationen die Zellaggregation gegenüber der Adhäsion (85). In welchem Maße bei der Gal-1 vermittelten Adhäsion von Zellen auch frühe Ereignisse der Signalweiterleitung initiiert werden, ist bisher nicht untersucht.

Gal-1 kann die Zellproliferation inhibieren und stimulieren. Bei pulmonalen arteriellen Endothelzellen korreliert die Expression von Gal-1 mit einer erhöhten Proliferation (86). Endogenes Gal-1 ist bei murinen embryonalen Fibroblasten als autokriner negativer Wachstumsfaktor wirksam, indem es den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und S/G<sub>2</sub>-Übergang kontrolliert (87). Die Expression von Gal-1 ist in lymphoiden Organen wie Thymus (88) und Lymphknoten (71), in aktivierten Makrophagen (89, 90), aktivierten T-Zellen (91) und in immunprivilegierten Organen wie Plazenta (92, 93) und Cornea (85) gezeigt worden. Diese Befunde und seine immunmodulatorische Wirkung (94, 95) weisen darauf hin, dass dem Protein Funktionen bei der Induktion und Erhaltung der zentralen und peripheren Immuntoleranz zukommen. Die spezifische Expression von Gal-1 auf deciduale Zellen der Plazenta und von Gal-3 auf Trophoblasten weist auf eine Beteiligung beider Proteine an der Adhäsion von Trophoblasten an die deciduale extrazelluläre Matrix über die Bindung an Poly-N-Acetyllactosaminreste des Laminins hin (96). Die uterine Expression der murinen Gal-1 mRNA wird durch Progesteron

und Estradiol differentiell reguliert und korreliert mit dem Implantationsprozess (97). Seine Lokalisation auf Syncytiotrophoblasten und endometrialen Stromazellen (98, 99) sowie der inhibitorische Effekt auf die Mitogen- (PHA) bzw. Alloantigen-stimulierte Proliferation humaner peripherer Blutzymphozyten (100) deuten darauf hin, dass das Protein in immunregulatorische Prozesse eingebunden ist, die für eine Akzeptanz des fetalen Semiallografts erforderlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass das Gal-1-Gen bei der Induktion von T-Effektorzellen stark hochreguliert wird (91). Durch virale Infektion induzierte CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen exprimieren die Gal-1 mRNA auf hohem Niveau, ist jedoch in ruhenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachweisbar. Die Expression von Gal-1 wird in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Peptidantigene und durch ConA induziert. Indem es die Antigen-induzierte Proliferation naiver und CD8<sup>+</sup> memory T-Zellen inhibiert, kann es als ein autokriner negativer Wachstumsfaktor für diese Zellpopulation betrachtet werden. Gal-1 wird im humanen Thymus und Lymphknoten von Stromazellen exprimiert und damit in Organen, wo Zelltod durch Apoptose während der normalen T-Zell Entwicklung und Reifung erfolgt. Humane Endothelzellen binden Gal-1 vermittelt aktivierte T-Zellen und lösen den programmierten Zelltod dieser T-Zellpopulation aus (101). Damit ist das endogene Lektin in die Regulierung von Apoptose bei der T-Zell Reifung im Thymus und in die Regulation der peripheren Immunantwort integriert. Für die durch Gal-1-vermittelten Effekte bei murinen Thymozyten ist die Aktivität der Core-2β-1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase von besonderer Bedeutung, die Verzweigungen auf O- und N-verknüpften Glykanen generiert, an die multiple Lactosaminreste gebunden werden (102).

Die immunsuppressiven und therapeutischen Effekte von Gal-1 konnten auch in tierexperimentellen Modellen gezeigt werden (94, 95, 103). Eine durch Immunisierung von Kaninchen mit dem gereinigten Acetylcholinrezeptorprotein (AchR) induzierte Myasthenia gravis führte zur Antikörper-vermittelten Herunterregulation der AchR im Skelettmuskel an postsynaptischen Membranen durch gesteigerte Endozytose. Nach simultaner Immunisierung mit Rezeptorprotein und Gal-1 waren keine Anzeichen dieser Autoimmunerkrankung nachweisbar (94). Obwohl der Mechanismus dieses therapeutischen Effektes nicht geklärt ist, wird eine Wirkung von Gal-1 auf das Immunsystem und dabei insbesondere ein Effekt von AchR-Antikörpern und Gal-1 auf Thymozyten vermutet. Auch bei einer experimentell induzierten Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), einer paralytischen T-Zell-vermittelten Erkrankung, die gegen das Myelin-basische Protein (MbP) gerichtet ist, ist rekombinantes

Gal-1 immunsuppressiv wirksam (95). Nach einer täglichen Vorbehandlung der Ratten mit Lektin bzw. einer Immunisierung mit MbP und Gal-1 waren klinische und histologische Anzeichen einer EAE nicht nachweisbar. Der suppressive Effekt des Proteins wird auf die Hemmung der in vivo Sensibilisierung MbP-spezifischer T-Zellen zurückgeführt. Auch an einem murinen durch Kollagen Typ II induzierten Arthritismodell (CIA) konnten die immunmodulatorischen Eigenschaften und das therapeutische Potential des endogenen Lektins gezeigt werden (103). Eine einmalige Injektion syngener Gal-1 sezernierender DBA/1 Fibroblasten (permanent transfiziert mit einem pCDNA3 Expressionsvektor mit CMV-Promotor und 495 bp Gal-1 Insert) bzw. eine kontinuierliche tägliche Injektion von rekombinantem Gal-1 führte zu einem Abbruch der klinischen und histopathologischen Ausbildung einer Arthritis. Dabei induzierte Gal-1 ein Zytokinmuster, das in die Remission der CIA involviert ist. Lymphknotenzellen von gen- und proteintherapeutisch behandelten Tieren zeigten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Antigen-induzierter Apoptose. Dies deutet darauf hin, dass Gal-1 das apoptotische Programm reifer aktiver T-Zellen beeinflusst und somit depletierend die Expression autoaggressiver Zellklone inhibiert.

### **3.4 Durch Galectin-1 stimulierte frühe Ereignisse der T-Zell Aktivierung**

Ein kritisches Ereignis bei der Initiation einer Immunantwort ist die Aktivierung von T-Lymphozyten, die durch die Wechselwirkung des klontypischen T-Zell-Antigenrezeptors (TCR) mit seinen Liganden, den an MHC-Moleküle gebundenen antigenen Peptiden (MHC-Peptid), vermittelt wird (104). Innerhalb von Sekunden nach Besetzung des TCR durch MHC-Peptide initiiert der TCR eine Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen, die mehrere sich verzweigende Signalwege stimuliert (105). Diese frühen Signale können für einige Effektorfunktionen (Targetzellyse durch T-Killerzellen) hinreichend sein. Komplexe Funktionen wie die T-Zell Proliferation erfordern eine langandauernde TCR-Ligation und Signalweiterleitung über Stunden. Eine langandauernde Besetzung des TCR wird durch die geringe Größe von TCR und MHC-Peptidkomplexen (106) gegenüber Membranglykoproteinen (CD43, CD45), die niedrige Affinität für MHC-Peptide (107, 108), durch die geringe Anzahl der MHC-Peptidkomplexe auf Antigen-präsentierenden Zellen im Vergleich zu den TCR/CD3-Komplexen auf T-Zellen (109, 110) und durch die T-Zell

Bewegung, die einer langandauernden Antigenerkennung entgegenwirkt, limitiert. Insbesondere die Bindungsstärke der MHC-Peptide an den TCR ist für eine langandauernde und klonale Expansion Antigen-spezifischer T-Zell Klone von Bedeutung. T-Lymphozyten zeigen eine hohe Spezifität, Differenzen von MHC-Peptiden zu evaluieren, und schon ein einzelner Aminosäureaustausch in einem antigenen Peptid kann signifikante biologische Effekte auf T-Zellen haben (109). Die Limitierung einer langandauernden Besetzung des TCR wird durch die Ausbildung spezialisierter Kontaktstellen zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen überwunden. Eine solche sogenannte immunologische Synapse (109, 111) besteht aus einem zentralen Cluster von TCR/CD3-Komplexen, die ringförmig von Adhäsionsmolekülen umgeben sind. Nach der Besetzung der TCRs mit MHC-Peptiden assoziieren die Komplexe mit Actin des Cytoskeletts und werden durch aktiven Transport konzentriert (112, 113). Die Organisation der Synapse, die zu einer mehr als hundertfachen Aufkonzentrierung der MHC-Peptide im Inneren führt, ist das determinierende Ereignis für die T-Zell Proliferation. Nach einem kinetischen Model der T-Zell Aktivierung korreliert die Zahl der MHC-Peptide im zentralen Cluster der Synapse mit der Halbwertszeit der TCR-MHC-Peptid Wechselwirkung (114). Es wird vermutet, dass die Signalweiterleitung auf dem Niveau der immunologischen Synapse sowie durch MHC-Peptide induzierte Konformationsänderungen im TCR für den biologischen Ausgang der T-Zell Aktivierung (Proliferation, Differenzierung, Anergie, Apoptose) mit entscheidend sind. Die Signalereignisse, die zur Reorganisation des Rezeptors und der Cytoskelettproteine führen, sind nicht bekannt. Die Besetzung des TCR initiiert intrazelluläre Signalereignisse, die bei reaktiven T-Lymphozyten zur Zytokinproduktion und Differenzierung, zur klonalen Expansion oder zu Apoptose führen. Der T-Zell Rezeptorkomplex (TCRC) besteht aus den Antigenerkennungs-Komponenten (je einer Transmembran  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette), die nichtkovalent mit dem CD3-Signalmodul (je eine  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette, je zwei  $\epsilon$ - und  $\xi$ -Ketten) verknüpft sind. Das CD3-Signalmodul übersetzt die Besetzung des TCR durch antigene Peptide bzw. Antikörper in intrazelluläre biochemische Vorgänge. Da der TCRC keine intrinsische Proteintyrosinkinaseaktivität hat, erfolgt nach Rezeptorstimulation die Rekrutierung proximaler intrazytoplasmatischer Proteintyrosinkinasen (PTKs), die der Src- ( $p56^{lck}$ ,  $p59^{fyn}$ , yes) und der Syk/Zap-70-Familie angehören. Diese proximalen PTKs sind für die Initiation und Amplifikation der Aktivierungssignale zuständig (115). Die Src-Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste in Immunorezeptor Aktivierungsmotiven (ITAMs, zwei durch 6-8

Aminosäurereste getrennte YXXL-Motive) von CD3 $\xi$  und CD3 $\epsilon$  (115). Die über ihre Tandem-SH2-Domäne vermittelte Bindung von Zap-70 an doppelt-tyrosinphosphorylierte ITAMs führt zur Aktivierung der Kinase. Die Neigung der Src-Kinasen, ITAMs zu phosphorylieren, resultiert aus ihrer Verankerung an der Innenseite der Plasmamembran über ihren Lipid-modifizierten N-Terminus. Darüber hinaus tendieren Src-Kinasen dazu, sich in spezialisierten Membranmikrodomänen (Lipid Rafts) zu konzentrieren (116). Stricke Voraussetzung für die Akkumulation der Src-Kinasen in Rafts ist ihre duale Acylierung mit einem Myristat- und mindestens einem Palmitatrest am aminoterminalen Glycin und an Cysteinresten. Eine Zerstörung der Rafts durch Cholesterol-Depletion inhibiert die Zellaktivierung signifikant (117). Es wurde gezeigt, dass auch die Corezeptoren CD4 und CD8, die p56<sup>lck</sup> binden, in der cytoplasmatischen Domäne palmitoyliert und möglicherweise in Rafts lokalisiert sind (118, 119). Es gibt erste experimentelle Daten, dass die phosphorylierte  $\xi$ -Kette nach antigener TCR-Stimulation in Rafts angereichert (120) und damit in die Nähe der Zap-70-Kinase gebracht wird. Bei der Aktivierung distaler Effektoren ist LAT (Linker für aktivierte T-Zellen), ein acyliertes Raft-assoziiertes Transmembran-Adapterprotein, beteiligt, das mit der Phospholipase C (PLC- $\gamma$ 1), Vav, SLP-76 und der Phosphatidylinositol-3-kinase interagiert (121). LAT ist für die Aktivierung der PLC- $\gamma$  durch die Zap-70-Kinase erforderlich. Damit begünstigen Rafts durch die Bündelung von Kinasen, Adaptorproteinen und intrazellulären Effektoren die Signalweiterleitung durch den TCR, grenzen jedoch nicht-lipidmodifizierte negative Regulatoren wie die Transmembran-Proteintyrosinphosphatase (PTPase) CD45 aus (122). Die TCR-Ligation durch antigenen Peptid, die zu einer schnellen Translokation der Src-Kinasen in das Zentrum der immunologischen Synapse führt, wo sie mit dem TCRC und der PKC- $\theta$  interagieren (112), weist auf eine Kooperation von Rafts und Synapsen im Rahmen der T-Zell Aktivierung hin. Strukturelle Untersuchungen zeigen, dass die Dauer der TCR-Besetzung durch antigenen Peptid sehr unterschiedlich ist, jedoch den biologischen Ausgang der T-Zell Aktivierung bestimmt (123). Die meisten biochemischen Signalereignisse sind nur kurz nach der TCR-Ligation nachweisbar. Eine Ausnahme ist die intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), die durch den kapazitiven Calciumeinstrom über CRACs (calcium release activated calcium channels) langandauernd auf 400 nM erhöht bleibt (124). Die TCR-Ligation führt zur Aktivierung der PLC- $\gamma$ , die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Isonitol-1, 4, 5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet (125). InsP<sub>3</sub> bindet an seinen im ER

lokalisierten Rezeptor, der als Calciumkanal zur Entleerung der Speicher führt. Die Entleerung dieser Speicher stimuliert den schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über CRACs aus dem Extrazellulärtraum und führt bei T-Zellen zu einer Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über Stunden. Ein langandauerndes Calciumsignal ist für die Transkription der IL-2 Gene erforderlich. In CRAC-defektiven Zelllinien wird die Hemmung der Aktivierung früher Gene (IL-2) durch Transfektion mit einer konstitutiv aktiven Form der Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin überwunden (126). Die durch Calcium/Calmodulin-regulierte Phosphatase dephosphoryliert den nucleären Faktor aktiverter T-Zellen (NFAT), der nach seiner Translokation in den Kern die Transkription der IL-2 Gene induziert (127). Andererseits führt die Nichtbesetzung des TCR bzw. eine Hemmung von Calcineurin mit Cyclosporin A oder FK506 zu einem schnellen und quantitativen Export von NFAT aus dem Kern (127). Eine Reihe von in vitro Untersuchungen deuten darauf hin, dass in den nucleären Export die Glykogensynthasekinase-3 integriert ist, die NFAT in Serin/Prolin-reichen Regionen phosphoryliert und damit die Kernlokalisationssequenz maskiert (123). Eine langandauernde TCR-Stimulation und hohe Calciumspiegel sind daher erforderlich, um den Transkriptionsfaktor über eine Zeit im Kern zu lokalisieren, die für die Aktivierung früher Gene ausreichend ist.

Monoklonale Antikörper (mAk) mit Spezifität für CD-Antigene sind geeignete Liganden, um den von einem CD-Marker ausgehenden Signalweg zu untersuchen. Da Gal-1 Glykoepitope auf einer Reihe von CD-Antigenen (CD2, CD3, CD4, CD7, CD43, CD45) bindet (76, 128, 78, 77, 79), unterscheidet es sich von mAk wesentlich. Es ist daher nicht vorhersehbar, welche Signalwege das endogene Lektin bei T-Zellen aktiviert und wie diese Signaleignisse zellulär integriert werden. Gal-1 stimuliert bei Jurkat T-Lymphozyten effizient eine konzentrationsabhängige Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wozu beide Phasen, die transiente Stimulation von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Entleerung der intrazellulären Speicher und der langandauernde  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, beitragen. Diese Effekte des Proteins auf die Calciummobilisation sind bei CD3<sup>+</sup> 31-13 Jurkat T-Zellen und bei CD45<sup>+</sup> J45.01 T-Zellen nicht nachweisbar, was auf eine Beteiligung von CD3 und auf die Notwendigkeit von CD45 bei der Signalweiterleitung hinweist (78). Die vollständige Hemmung der durch Gal-1 stimulierten Calciummobilisation mit Lactose (10 mM) zeigt, dass die Signalweiterleitung über Glykoepitope vermittelt wird. Gal-1 stimuliert die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> über eine Aktivierung der PLC- $\gamma$ 1 durch Tyrosinphosphorylierung (78). Damit generiert das endogene Lektin Aktivierungssignale, die

auch für CD2- und CD3-mAk charakteristisch sind, so dass Effekte auf PKC-Isoformen erwartet werden können. Gal-1 ist ein natürlicher Ligand für die Transmembran-PTPase CD45 und bindet auf den extrazellulären Domänen der Isoformen mit den Molmassen von 180 kDa (R0), 190 kDa, 205 kDa und 220 kDa (RA) Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Sequenzen. Die Bindung des Proteins hemmt die membranassoziierte und die immunpräzipitierte PTPase Aktivität (77). Damit generiert das Lektin durch Ligation von CD2 und CD3 bei T-Zellen Aktivierungssignale (78), die über die PTPase-Aktivität von CD45 moduliert werden können. Aufgrund der dualen Funktion von CD45 im Rahmen der T-Zell Aktivierung als ein Aktivator der Src-Kinasen lck und fyn durch Dephosphorylierung der negativ regulatorischen Tyrosinreste (Y505 bzw. Y531), andererseits als ein Terminator der Lymphozytenfunktion durch Dephosphorylierung von CD3 $\zeta$ , ist diese Modulation möglich (129). Andererseits ist denkbar, dass Gal-1 aufgrund seiner Bivalenz CD45 dimerisiert und damit das katalytische Zentrum blockiert, wodurch die Verfügbarkeit für Substrate und damit TCR-Funktionen inhibiert werden (130). Insbesondere eine Coligation von TCR und CD45 inhibiert die Signalweiterleitung über den Antigenrezeptor und hemmt die IL-2 Synthese sowie die Zellproliferation. Eine Ligation von CD45 stimuliert bei T-Zellen Apoptose und wird durch Vernetzung von CD3 verstärkt (131). Diese Erkenntnis stimmt mit Daten überein, die zeigen, dass Gal-1 nicht in der Lage ist, bei CD3 $^-$  und CD45 $^-$  T-Zelllinien Apoptose zu induzieren (77). Für die Generierung modulierender T-Zell Aktivierungssignale spricht auch, dass das endogene Lektin eine schnelle Phosphorylierung von pp21 $\zeta$ , jedoch nicht die Tyrosinphosphorylierung von pp23 $\zeta$  stimuliert, die eine langandauernde Ligation der Aktivierungsmarker benötigt und für die T-Zell Proliferation erforderlich ist (132).

## **4 Zielstellung**

Eine der zentralen bisher nur zum Teil beantworteten Fragen der modernen Glykobiologie betrifft die Funktion zellulärer Glykokonjugate. Endogene kohlenhydratbindende Proteine mit definierter Glykoepitopspezifität kommen als natürliche Liganden in Betracht, um darüber weitere Hinweise zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit steht Galectin-1, ein immunsuppressiv wirksames Protein, das Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Sequenzen von Glykokonjugaten erkennt, im Mittelpunkt. An humanen Jurkat T-Lymphozyten als einem Modell sollen Untersuchungen auf der Ebene der Signaltransduktion mit dazu beitragen, den molekularen Mechanismus seiner immunsuppressiven Aktivität zu klären. Es war daher erforderlich, zunächst Gal-1 bindende CD-Aktivierungsmarker zu identifizieren. Bei den Untersuchungen zur Signalweiterleitung wurden zwei Fragen in den Mittelpunkt gestellt. Erstens war vorgesehen, den Effekt der Bindung des endogenen Lektins an CD-Antigene auf die Calciummobilisation, die Aktivierung der PLC- $\gamma$ 1 und auf die Generierung von InsP<sub>3</sub> zu charakterisieren. Zweitens sollte im Rahmen der Arbeit geklärt werden, in welchem Maße Gal-1 distale Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege aktiviert bzw. inhibiert. Dabei waren in Verbindung mit der Gal-1 stimulierten Depletion intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher inhibierende Effekte auf das im ER lokalisierte Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-regulierte Enzymsystem für die Synthese von Phosphatidylserin (PtdSer) zu erwarten. Durch transiente Transfektion von T-Zellen mit pPKC-EGFP Vektoren und cytoplasmatische Expression der PKC-EGFP Fusionsproteine für die Proteinkinase-C-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\theta$  sollte mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie geprüft werden, ob Gal-1 die Translokation dieser Isoformen an die Plasmamembran stimuliert. Gel Shift Assays mit <sup>32</sup>P-markierten Konsensusoligonucleotiden sowie Reportergenassays unter Verwendung von Konstrukten mit multiplen Kopien von AP-1 Bindungsstellen sollten zeigen, in welchem Maße Gal-1 diesen Transkriptionsfaktor aktiviert.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an der humanen T-Zelllinie Jurkat (Klon E6.1, CD2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>) von ATTC, an einem CD45-defizienten Klon dieser Zelllinie (J45.01, CD2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>) und an CD3-defizienten J31-13 Zellen (CD2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup>) durchgeführt. Die J45.01 Zellen wurden von G. A. Koretzky (University of Iowa) und der CD3<sup>-</sup> J31-13 Zellklon wurde von A. Alcover (Institut Pasteur, Paris) erhalten. Für die Kultivierung der Zellen wurde RPMI 1640 Flüssigmedium von Gibco verwendet, das mit 10 % fetalem hitzeinaktivierten Kälberserum (FCS) und 10 µg/ml Kanamycin supplementiert wurde. Die Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen bis zu einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen war die Viabilität der Zellen (Trypanblau-negativ) > 96 %.

### **5.2 Isolierung von Galectin-1 aus humanen Plazentagewebe**

#### **5.2.1 Herstellung der Lactosyl-Sepharose 4B**

Die Immobilisierung von Lactose an den Träger erfolgte nach den Angaben von Allen und Johnson (133). Sepharose 4B (30 ml) wurde auf der Fritte mit Aqua dest., anschließend mit 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 11,0) gewaschen und dann in 30 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 3 ml Divinylsulfon wurde das Gel unter Schütteln für 70 min bei Raumtemperatur derivatisiert, auf der Fritte mit Aqua dest. gewaschen und in 100 ml 0,1 M Lactose in 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 10,0) resuspendiert. Nach einer Reaktionszeit von 72 h bei 6 °C wurde auf der Fritte abgesaugt und mit 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 8,5) gewaschen. Zur Blockierung verbliebener Vinylgruppen wurde das Gel in 60 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 8,5) resuspendiert und mit 1,2 ml 2-Mercaptoethanol für 3 h bei Raumtemperatur umgesetzt. In einer Chromatographiesäule wurde die Lactosyl-Sepharose abschließend mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) äquilibriert.

## **5.2.2 Herstellung von Asialofetuin-Sepharose 4B**

In 50 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Kupplungspuffer, pH 8,3) wurden 300 mg Asialofetuin gelöst und an 60 ml CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekuppelt (134). Nach der Blockierung verbliebener reaktiver Gruppen am Träger in 0,2 M Glycinpuffer (pH 8,0) bei Raumtemperatur für 2 h wurde das Gel auf der Fritte, wie vom Hersteller (Amersham-Pharmacia) angegeben, alternierend mit Kupplungspuffer sowie 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,0) gewaschen. Das Gel wurde in einer Chromatographiesäule (3 cm x 25 cm) mit PBS, pH 7,4, äquilibriert.

## **5.2.3 Affinitätschromatographische Isolierung von Galectin-1**

Die Präparation des β-galactosidbindenden Proteins aus humanem Plazentagewebe wurde, wie von Hirabayashi und Kasai (135) beschrieben, jedoch mit einigen Modifizierungen durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Bereich von 0 bis 4 °C. Das blutfrei gespülte Gewebe (400 g) wurde zerkleinert und in 2000 ml EDTA-MePBS-Puffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM 2-Mercaptoethanol) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 10 000 x g für 30 min zentrifugiert und das Pellet mit 0,1 M Lactose in 1000 ml EDTA-MePBS-Puffer für 1 h extrahiert. Der durch Zentrifugation (10 000 x g, 30 min) erhaltene Überstand wurde mit einem Hollow Fiber Dialyzer (HRD 1.0, Typ III) auf 300 ml eingeengt und in dem gleichen System die Lactose durch Dialyse für 2 h gegen EDTA-MePBS-Puffer abgetrennt. Die Reinigung des Proteins erfolgte durch sequentielle Affinitätschromatographie an einer Asialofetuin-Sepharose 4B- und Lactosyl-Sepharose 4B-Säule, wobei die Elution des adsorbierten Lektins jeweils mit 50 mM Lactose in EDTA-MePBS-Puffer vorgenommen wurde. Nach der Umpufferung über eine mit 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) äquilierte Bio-Gel P6-Säule (Bio-Rad) erfolgte die Endreinigung des Proteins durch Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer 1 ml Resource Q Säule (Amersham-Pharmacia) durch Elution mit einem linearen NaCl Gradienten (0 bis 0,5 M) in 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit dem FPLC-System von Amersham-Pharmacia. Die Ausbeute je Plazenta betrug 1,1 - 3,0 mg. Die Lagerung des in PBS gelösten Proteins erfolgte nach Sterilfiltration und Portionierung bei -20 °C. In der SDS-

Elektrophorese zeigt das präparierte Lektin nach Coomassie R250 Färbung eine homogene Bande im Bereich von 14 kDa.

Das humane rekombinante Gal-1 (recGal-1) und das mutierte Lektin (C2S) wurden von J. Hirabayashi (Teikyo University, Dep. Biol. Chem. Kanagawa) erhalten. Die Herstellung beider Proteine ist publiziert (**142, 54**).

#### **5.2.4 Immobilisierung von Galectin-1**

Galectin-1 (6,0 mg/ml 20 mM HEPES-Puffer, pH 8,0) wurde mit 0,4 ml NHS-aktivierter Sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow (Amersham-Pharmacia) durch Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur gekuppelt. Durch Zugabe von 5 ml 0,2 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) und Inkubation für weitere 4 h wurden verbliebene reaktive Gruppen des Trägers blockiert. Das Gel wurde auf der Fritte alternierend mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) und mit 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,0) gewaschen, in PBS (pH 7,4) mit 4 mM 2-Mercaptoethanol äquilibriert und in diesem Puffer bei 4 °C gelagert.

#### **5.2.5 Biotinylierung von Galectin-1**

Die Biotinylierung erfolgte nach der von Boorsma et al. beschriebenen Methode (**136**). Biotinyl-N-hydroxysuccinimid (BNHS) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 60 µl einer 0,01 M BNHS-Lösung wurden mit 1 mg Galectin-1/ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (pH 8,5) bei Raumtemperatur für 1h umgesetzt. Der Überschuss an BNHS wurde durch Gelfiltration über eine mit PBS (pH 7,4) äquilierte Bio-Gel P6-Säule entfernt. Das biotinylierte Protein wurde nach der Proteinbestimmung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### **5.2.6 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (**137**) anhand einer Kalibriergeraden unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Das von Bio-Rad bezogene Bradford Reagenz wurde mit Aqua dest. 1:5 verdünnt. Die Extinktionsmessung erfolgte am Ultrospec 3000 (Amersham-Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

## **5.3 Elektrophoretische Techniken**

### **5.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Dem für die SDS-PAGE benutzten diskontinuierlichen Gel- und Puffersystem zur Herstellung der Polyacrylamidflachbettgele liegen die Angaben von Laemmli zugrunde (138). Es wurden zur Aufkonzentrierung der Proben 1 cm lange Sammelgele (4 %) und zur Auftrennung 14 cm lange Trenngele (10 % oder 12 %) eingesetzt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an doppelkonzentriertem Laemmli-Probenpuffer (pH 6,8) gemischt und im Wasserbad für 5 min bei 100 °C behandelt.

### **5.3.2 Elektrotransfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (Blotting)**

Der Elektrotransfer wurde nach Kyhse-Andersen (139) durchgeführt. Es wurde eine Apparatur der Firma Phase mit Graphitplatten als Elektrodenmaterial eingesetzt.

Zur Vorbereitung wurde das Filterpapier (2 x 3 Lagen) und die Nitrocellulose 1 h, das Trenngel 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Zum elektrophoretischen Transfer der im SDS-Gel enthaltenen Proteinbanden war das vom Filterpapier aufgenommene Volumen an Transferpuffer ausreichend (semidry). Der verwendete Transferpuffer enthielt 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 1,3 mM SDS und 20 % (V/V) Methanol. Danach wurde auf das Trenngel (Polyacrylamidgel) die Transfervorlage (Nitrocellulosemembran) luftblasenfrei gelegt und zwischen zwei mit Transferpuffer äquilibrierten Filterpapierlagen zwischen Kathode und Anode eingespannt. Bei einer Stromdichte von 1,5 mA/cm<sup>2</sup> gelang ein nahezu quantitativer Proteintransfer innerhalb einer Stunde.

## **5.4 Nachweis Gal-1 bindender CD-Antigene**

### **5.4.1 Immunpräzipitation von CD2 und CD3 in Jurkat T-Zell Lysaten**

E6.1 Zellen ( $1 \times 10^8$ ) wurden dreimal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für 1 h mit 1 ml Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1% NP 40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin) auf Eis behandelt. Das Zelllysat wurde bei 10 000 x g für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Je 500 µl des erhaltenen Überstandes wurden mit 100 µg CD3 mAk (Klon X35, Coulter-Immunotech) bzw. mit 100 µg CD2 mAk (Klon 39C1.5, Coulter-Immunotech) für 1 h und nach Zugabe von jeweils 100 µl Protein G Agarose für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Die Beads wurden durch Zentrifugation auf einer 0,22 µm Zentrifugationsfiltereinheit (Costar) gesammelt und fünfmal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen. Die Dissoziation der an Protein G Agarose adsorbierten Immunkomplexe erfolgte mit 90 µl doppelkonzentriertem nichtreduzierenden Laemmli Probenpuffer durch Inkubation für 5 min bei 100 °C. Mit Hilfe der Zentrifugationsfiltereinheiten gelang eine gute Abtrennung der Beads von den gelösten Proteinen. Die Proben wurden bei – 20 °C gelagert.

### **5.4.2 Auftrennung von Jurkat T-Zell Lysaten an Gal-1 Agarose**

E6.1 Zellen ( $5,8 \times 10^8$ ) wurden in 2 ml EDTA-MePBS-Puffer (pH 7,2) mit 1 % NP 40, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin und 1 mM PMSF für eine Stunde auf Eis lysiert. Das Lysat wurden 10 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Inkubation des Überstandes mit 300 µl Gal-1 Agarose für 30 min wurde die Gelsuspension auf eine 0,22 µm Zentrifugationsfiltereinheit überführt und fünfmal mit jeweils 500 ml Lysepuffer gewaschen. Das Gel wurde auf dem Filter mit 300 µl 0,1 M Lactose in Lysepuffer eluiert. Das Eluat wurde mit 100 µl 4 x konzentriertem Laemmli Probenpuffer für 5 min bei 100 °C inkubiert.

### **5.4.3 Nachweis von CD2 und CD3 auf Blots**

Die CD2- und CD3-Immunpräzipitate sowie die Gal-1 bindenden Glykoproteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Hybond ECL-Membranen (Amersham-Pharmacia) geblottet. Nach Inkubation der Membranen in Blockpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1 M NaCl, 1 % Tween 20) für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Blots im Falle der Immunpräzipitate mit 2 µg/ml biotinyliertem Gal-1 in 20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 1 M NaCl, 0,05 % Tween 20 (TBS/Tw) in Gegenwart von 4 mM 2-Mercaptoethanol für 16 h bei 4 °C inkubiert. Zum Nachweis von CD2 und CD3 in der Gal-1 bindenden Fraktion wurden die Blots mit je 1 µg/ml biotinylierten CD2- bzw. CD3-mAk (Coulter-Immunotech) in TBS/Tw für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Blots erfolgte die Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase Konjugat (1:1000 Verdünnung in TBS/Tw) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Blots wurden in TBS/Tw gewaschen und für 1 min in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte in einer Lösung von 10 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1 ml Aceton, 25 ml 50 mM Natriumacetatpuffer und 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

## **5.5 Bestimmung der Konzentration an intracytoplasmatisch freiem Calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ )**

### **5.5.1 Beladen der Zellen mit Fura-2 AM**

Zur Bestimmung von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der fluoreszierende Ca<sup>2+</sup>-Chelator Fura-2 AM eingesetzt. Die Zellen ( $2 \times 10^6$ ) wurden in 1 ml RPMI 1640 Medium mit 5 µM Fura-2 AM für 30 min bei 37 °C beladen und nach Zugabe von 2 ml RPMI 1640 Medium für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der beladenen Zellen mit 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1 g/l BSA) erfolgte die Einstellung auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml. Nach der Beladung war der Anteil Trypanblau-negativer Zellen > 94 %.

## 5.5.2 Messung der Calciumkonzentration

Die Messungen erfolgten in 1 cm Quarzküvetten bei 37 °C an einem Shimadzu RF-5001 PC Spektrofluorimeter. Die Zellsuspension (1,5 ml) wurde abwechselnd bei 339 nm und 380 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 490 nm gemessen. Zur Darstellung von  $[Ca^{2+}]_i$  in nM wurde aus dem Verhältnis (R) der bei 339 nm und 380 nm gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei einem  $K_d$ -Wert von 224 nM die Calciumkonzentrationen nach der Gleichung von Grynkiewicz (140)

$$[Ca^{2+}]_i = 224 \times \frac{R - R_{min.}}{R_{max.} - R} \times \frac{Sf_{380}}{Sb_{380}}$$

berechnet. In HEPES-Puffer mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> wurde nach Zugabe von Triton X100 (0,5 %) R<sub>max</sub> und Sb<sub>380</sub> (Fluoreszenzintensität von Ca<sup>2+</sup> beladenem Fura-2 angeregt bei 380nm) sowie nach Zugabe von EGTA (1 mM) R<sub>min</sub> und Sf<sub>380</sub> (Fluoreszenzintensität von Ca<sup>2+</sup> freiem Fura-2 angeregt bei 380nm) bestimmt. Zur Messung der Stimulation von  $[Ca^{2+}]_i$  in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium wurden zum Zeitpunkt 0 die Calciumionen des Puffers durch Zugabe einer äquimolaren Menge EGTA komplexiert.

## 5.6 Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) und Messung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>)

### 5.6.1 Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase C-γ1

Jurkat T-Zellen (Klon E6.1,  $1 \times 10^7$ /0,5 ml RPMI 1640 Medium) wurden mit Gal-1 bzw. mit dem mutierten Lektinprotein C2S bei 37 °C stimuliert. Die mitgeführten Kontrollen erhielten das gleiche Volumen PBS (pH 7,4). Nach der Termination der Stimulation auf Eis (10 min) wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 min und 4 °C gesammelt, einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und dann auf Eis für 30 min mit 300 µl Lysepuffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin und je 2 µg/ml Antipain, Pepstatin, Leupeptin) behandelt. Der durch Zentrifugation bei 5 000 x g für 10 min und 4 °C erhaltene Überstand wurde mit 5 µg PLC-γ1 mAk (Bio Mol) für 2 h und nach Zugabe von 50 µl Protein A Agarose für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Die Beads

wurden fünfmal mit je 500 µl Lysepuffer gewaschen und mit 100 µl doppelkonzentriertem Probenpuffer 5 min bei 100 °C inkubiert. Nach Auftrennung der Immunpräzipitate in der SDS-PAGE (7,5 % Trengel) erfolgte der Elektrotransfer auf Hybond ECL Nitrocellulosemembranen. Die Membranen wurden mit 1 % BSA in PBS (pH 7,4) für 1 h geblockt und mit einem anti-Phosphotyrosin HRP-Konjugat (Bio Mol, Verdünnung 1:12500 in PBS) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Blots wurden abschließend mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Der Nachweis der Banden erfolgte luminographisch mit Hilfe der ECL-Reagenzien von Amersham-Pharmacia Biotech unter Verwendung von Agfa Curix HT1.000G Plus Röntgenfilmen.

### **5.6.2 Messung der Konzentration von InsP<sub>3</sub>**

Jurkat E6.1 Zellen ( $1 \times 10^7$ /0,5 ml RPMI 1640 Medium mit 15 mM LiCl) wurden mit Gal-1 bzw. C2S für 1 min, 3 min, 5 min und 15 min bei 37 °C stimuliert. Die mitgeführten Kontrollen erhielten das gleiche Volumen PBS (pH 7,4). Die Stimulation wurde auf Eis durch Zugabe von 100 µl Perchlorsäure (20 %) terminiert. Nach 20 min wurden die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation bei 2 000 x g für 15 min sedimentiert und der Überstand elektrometrisch mit eiskalter 10 M KOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Der durch Zentrifugation bei 2 000 x g erhaltene Überstand wurde für die Messung der InsP<sub>3</sub>-Konzentration eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem kompetitiven Biotrak InsP<sub>3</sub>-[<sup>3</sup>H] Assay System (Amersham-Pharmacia) unter Verwendung eines Rinder InsP<sub>3</sub>-Bindungsproteins. Mit diesem System kann anhand einer mitgeführten Kalibriergeraden InsP<sub>3</sub> im Bereich von 0,19 pM bis 25 pM/Testansatz quantifiziert werden.

## **5.7 Messung der zellulären Phosphatidylserin (PtdSer) Synthese**

### **5.7.1 Stimulation der Zellen**

Jurkat E6.1 Zellen wurden dreimal mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM Glucose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und auf eine Zellkonzentration von  $4 \times 10^6$ /ml eingestellt. Nach Zugabe von 6 µCi [<sup>3</sup>H]Serin zu 1,5 ml der Zellsuspension erfolgte die Stimulation mit CD3 mAk (Klon X35, Coulter Immunotech), CD2 mAk (Klon 39C1.5

und 6F10.3, Coulter Immunotech) bzw. mit Gal-1 ohne bzw. in Gegenwart des Calmodulinantagonisten Trifluoperazin (TFP, 50 µM) für 1 h bei 37 °C.

### **5.7.2 Bestimmung des Gesamteinbaus von [<sup>3</sup>H]Serin**

Zur Messung des zellulären [<sup>3</sup>H]Serineinbaus wurden von jedem Stimulationsansatz jeweils 2 x 200 µl Zellsuspension in 96 well Zellkulturplatten (Greiner) pipettiert, mit dem Zellharvester auf Filterpapierstreifen überführt und gewaschen. Nach dem Trocknen der Streifen erfolgte die Messung des [<sup>3</sup>H]-Einbaus durch Flüssigkeitsszintillations-Messung.

### **5.7.3 Extraktion der Lipide, Abtrennung und Nachweis von [<sup>3</sup>H]Phosphatidylserin**

Nach der Stimulation wurde die Zellsuspension (1 ml) bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 300 µl Chloroform:Methanol (1:2) durch Schütteln für 2 min extrahiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und 100 µl Aqua dest. wurde für weitere 30 Sekunden extrahiert. Zur Phasentrennung wurde die Suspension bei 5 000 x g für 10 min zentrifugiert und die untere Chloroformphase durch Abpipettieren gewonnen. Die Auftrennung der extrahierten Lipide erfolgte mittels Kieselgel 60 F<sup>254</sup> Dünnschichtchromatographie Platten (0,2 mm Schichtdicke, 20 x 20 cm, Merck). Durch Besprühen mit 54 mM Oxalsäurelösung (pH 7,2) und anschließender Trocknung bei 110 °C für 15 min wurden die Platten aktiviert. Je Bahn wurden 100 µl Chloroformextrakt aufgetragen und mit dem Laufmittelsystem Chloroform:Methanol:Essigsäure:Wasser (75:45:12:3) aufgetrennt (143). Nach einer Laufstrecke der Front von 15 cm wurde die DC-Platte mit dem Fön getrocknet. Die Lokalisation der [<sup>3</sup>H] PtdSer-Spots erfolgte mit Hilfe einer Tritium-Bildplatte nach einer Expositionszeit von 6 Tagen. Anschließend wurden die [<sup>3</sup>H] PtdSer-Spots ausgeschnitten und der Einbau durch Flüssigkeitsszintillations-Messung quantifiziert.

## **5.8 Transiente Transfektion - AP-1 Reporterassays und AP-1 Gel Shift Assays**

### **5.8.1 AP-1 Reporterassays**

Der cis-Reporter Vektor pAP1(PMA)-TA-Luc und der pTAL-Luc Vektor (Negativkontrolle) von Clontech ermöglichen durch Messung der Luciferase-Aktivität den Nachweis ligandinduzierter Signalereignisse, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen. pAP1(PMA)-TA-Luc hat oberhalb vom Reportergen Luc und einem minimalen TA-Promotor sechs Tandemkopien der AP-1 Konsensussequenz und reagiert spezifisch auf Phorbolester (PMA). Nach Bindung von endogenem AP-1 an die Enhancerelemente wird die Transkription induziert und das Reportergen aktiviert. Luciferase ist ein hoch sensitiver enzymatischer Reporter, der quantitative Daten über das Maß der Initiation der Transkription liefert.

Zur Transfektion wurden Jurkat T-Zellen ( $1 \times 10^7$ /0,8 ml RPMI 1640 Medium) mit 25 µg pAP1(PMA)-TA-Luc bzw. pTAL-Luc gemischt und in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad) im CO<sub>2</sub>-Brutschrank für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Elektroporation der Zellen erfolgte mit einem Genpulser (Bio-Rad) bei 350 V und 900 µF. Die transient transfizierten Zellen wurden bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /4 ml RPMI 1640 Medium mit Gal-1, PMA und CD3 mAk ohne bzw. mit Inhibitoren (Lactose, Cellobiose, Asialofetuin, Staurosporin, Curcumin), wie in den Legenden angegeben, inkubiert. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen zweimal mit PBS (pH 7,2) gewaschen, die Zellpellets mit 250 µl Lysepuffer (Promega) für 5 min bei Raumtemperatur behandelt und dann bei 10 000 x g für 1 min zentrifugiert. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 10 µl Überstand mit 50 µl Luciferase-Substratlösung (Promega) gemischt. Die Lumineszenzmessungen erfolgten am Lumat LB950 (Berthold).

### **5.8.2 Präparation der Kernextrakte**

Die Stimulation der Jurkat T-Lymphozyten ( $1 \times 10^7$ /2ml RPMI 1640 Medium) mit Gal-1, PMA und CD3 mAk ist in den Legenden beschrieben. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen

einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und in 0,5 ml 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,2 % Triton X100, 10 % Glycerol sowie je 1 µg/ml Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin) für 15 min auf Eis behandelt (141). Nach der Zentrifugation bei 20 000 x g für 2 min und 4 °C wurden die erhaltenen Pellets für 20 min auf Eis mit 0,1 ml 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,9, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 % Glycerol und je 1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin) extrahiert. Die Extrakte wurden bei 20 000 x g für 5 min und 4 °C zentrifugiert und die Überstände nach Aliquotierung (30 µl) bei -80 °C gelagert.

### 5.8.3 AP-1 Gel Shift Assays

Das Doppelstrang AP-1 Consensus Oligonucleotid (sc-2501, Santa Cruz Biotechnology) wurde mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (Amersham Pharmacia) und der T4 Polynucleotid Kinase (Roche)  $^{32}\text{P}$ -markiert und über eine 2 ml Sephadex G10-Säule umgepuffert. Zur Komplexbildung wurden jeweils 4 µl Kernextrakt mit 20 µl Bindungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X100, 5 % Glycerol, 1 mg/ml BSA, 2 mg/ml poly[dI-dC]), der mindestens 65000 c.p.m.  $^{32}\text{P}$ -markiertes Consensus Oligo enthält, gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Die Komplexe wurden in 6 % Polyacrylamid Nativgelen aufgetrennt. Zur Autoradiographie wurden die Röntgenfilme HT1.000G Plus (Agfa-Gevaert N.V.) in einer Röntgenkassette auf die getrocknete Gele gelegt und bei – 70 °C exponiert. In den Kompetitionsversuchen wurden die Bindungsreaktionen mit einem hundertfachen Überschuss an unmarkiertem Consensus-Oligo bzw. an mutiertem Oligo (sc-2514, Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt. Bei den Supershift Assays wurden die c-Fos und c-Jun mAk (Santa Cruz, Biotechnology) jeweils mit 2 µg/Bindungsreaktion eingesetzt, und der Reaktionsansatz wurde 20 min auf Eis vor Zugabe des  $^{32}\text{P}$ -markierten Oligonucleotids inkubiert.

### 5.8.4 JNK1 Immunkomplex Kinase Assay

Zur Messung der c-Jun N-terminale Kinase (JNK1) Aktivität wurden Jurkat E6.1 Zellen (5 x 10<sup>6</sup>/ml RPMI 1640 Medium) bei 37 °C mit Gal-1 stimuliert. Die Kontrollansätze erhielten das

gleiche Volumen PBS (pH 7,4). In diese Versuche wurde auch der spezifische Inhibitor der JNK1 Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-on (SP 600125, Tocris) einbezogen (**144**), wobei die Stimulationsansätze mit dem Inhibitor (3 µM, 10 µM) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit Gal-1 stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (500 µl) gewaschen und in 350 µl Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 7,6, 10 mM β-Glycerophosphat, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 0,1 mM Pefabloc, 1 % Triton X100) für 30 Minuten auf Eis lysiert (**145**). In dem durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 15 min und 4 °C erhaltenen Überstand erfolgte zunächst die Proteinbestimmung nach Bradford. Die Überstände (je 450 µg) wurden mit 6 µg JNK1 pAk (Santa Cruz Biotechnology) für eine Stunde auf Eis und nach Zugabe von 50 µl Protein G Agarose Beads eine weitere Stunde inkubiert. Die Beads wurden viermal mit jeweils 300 µl Lysepuffer und zweimal mit je 350 µl Kinasepuffer (20 mM HEPES, pH 7,6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM β-Glycerophosphat, 20 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT) gewaschen und in 20 µl Kinasepuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 5 µg c-Jun(1-169)-GST als Substrat (Upstate Biotechnology) und 5 µCi [ $\gamma$  <sup>32</sup>P]ATP (Amersham-Pharmacia) je Stimulationsansatz wurde auf einem thermostatierbaren Eppendorf Schüttler für 20 min bei 30 °C inkubiert. Die Substratphosphorylierung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an doppelkonzentriertem Laemmli Probenpuffer terminiert. Nach Auf trennung mit Hilfe der SDS-PAGE wurde auf PVDF Membranen geblottet. Der Nachweis der phosphorylierten Substratbande [c-Jun(1-169)-GST] im Bereich von 41 kDa erfolgte autoradiographisch unter Verwendung von Agfa Curix HT1.000G Plus Röntgenfilmen. Um abzusichern, ob in den Kinaseassays gleiche Mengen an JNK1 eingesetzt wurden, erfolgte nach dem Blocken der PVDF-Membranen mit 4 % BSA in PBS (pH 7,4) die Inkubation mit 0,25 µg/ml JNK1 mAk (Pharmigen) in PBS mit 1 % BSA für 16 h bei 4 °C. Nach dem Waschen der Membranen erfolgte die Inkubation mit einem anti-Maus IgG-POD Konjugat (1:5000) in PBS mit 1 % BSA für 2 h bei Raumtemperatur. Auf den Blots erfolgte der Nachweis der JNK1 (46 kDa) luminographisch unter Verwendung der ECL-Reagenzien von Amersham-Pharmacia.

## **5.9 Nachweis der Translokation von Proteinkinase C (PKC) Isoformen an die Plasmamembran**

Für die cPKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und für die PKC-Isoform  $\theta$  wurden pPKC-EGFP Vektoren von Clontech eingesetzt, die Fusionsproteine, bestehend aus der entsprechenden PKC-Isoform und dem grünfluoreszierenden Protein (EGFP), codieren. Nach der Transfektion der Zellen werden die Fusionsproteine normalerweise im Cytosol exprimiert und können nach ligandinduzierter Zellaktivierung (PMA) innerhalb weniger Minuten aus dem Cytosol an die Plasmamembran transloziert werden. Die intrazelluläre Bewegung der Proben kann fluoreszenzoptisch anhand der EGFP-Fluoreszenz (Anregungsmaximum 488 nm, Emissionsmaximum 509 nm) nachgewiesen werden. Die Expression der PKC-EGFP Fusionsproteine steht unter der Kontrolle eines humanen CMV „immediate-early“ Promotors.

### **5.9.1 Transfektion der Zellen**

Zur Transfektion wurden Jurkat E6.1 Zellen zunächst zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen und auf eine Zellkonzentration von  $1,25 \times 10^7/\text{ml}$  eingestellt. In einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad) wurden 0,8 ml der Zellsuspension mit 25  $\mu\text{g}$  pPKC-EGFP Vektor gemischt und 5 min im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Nach der Elektroporation bei 350 V und 935  $\mu\text{F}$  wurden die Zellen 5 min bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank nachinkubiert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte nach Zugabe von 5 ml RPMI 1640 Medium in Zellkulturplatten bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden war die Expression der PKC-EGFP Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.

### **5.9.2 Nachweis der PKC-EGFP Translokation**

Je 250  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden in spezielle Küvetten (chambered cover slides, Lab-Tech) überführt und bei 37 °C mit Gal-1, einem CD3 mAk (Klon X35) bzw. mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert. Der Nachweis der PKC-EGFP Translokation erfolgte mit einem Laser-Scanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss-Oberkochen) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Messung der Emission bei 509 nm.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Elektrophoretische Analyse der Gal-1 Präparationen durch SDS-PAGE

Das aus Plazentagewebe extrahierte und durch sequentielle Affinitätschromatographie an Asialofetuin- und Lactosyl-Sepharose 4B isolierte Protein wurde durch anschließende Anionenaustauschchromatographie an Resource Q weiter aufgereinigt. Gal-3, das auch an Asialofetuin- und Lactosyl-Sepharose 4B bindet, wird nicht an die mit Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) äquilierte Resource Q Säule gebunden. Mit einem linearen NaCl-Gradienten in Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) wird Gal-1 bei 140 mM NaCl von der Säule eluiert. Die SDS-elektrophoretische Auftrennung des gereinigten Proteins ist in Abbildung 1 dargestellt. Die homogenen Proteinbanden in den Spuren 2 und 3 im Bereich von 14 kDa zeigen, dass die Gal-1 Präparationen nach Coomassie Brilliantblau R250 Färbung auch bei der Auftrennung von 4 µg/Bahn elektrophoretisch rein sind.

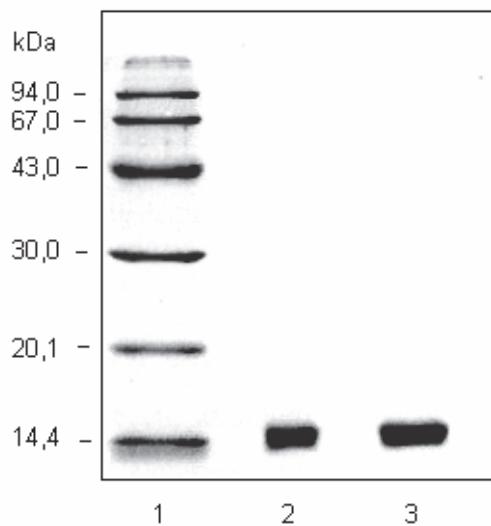


Abbildung 1 SDS-PAGE der Gal-1 Präparationen in einem 12 % igen Trenngel unter reduzierenden Bedingungen.

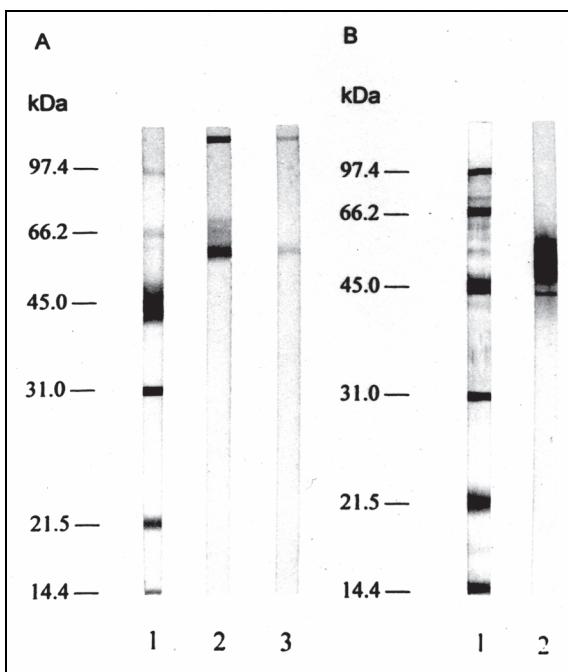
- 1: Molekulargewichtsstandards (Amersham-Pharmacia)
- 2: Gal-1 Präparation (2 µg)
- 3: Gal-1 Präparation (4 µg)

## **6.2 Nachweis Gal-1 bindender CD-Aktivierungsmarker auf Blots**

In Verbindung mit der immunsuppressiven Wirkung von Gal-1 und den geplanten Untersuchungen zur Signalweiterleitung bei T-Zellen sollte zunächst geklärt werden, an welche CD-Antigene mit Relevanz für die Signalweiterleitung das endogene Lektin Glykoepitop-vermittelt bindet. Bei diesen Untersuchungen standen CD2 und CD3 im Mittelpunkt.

### **6.2.1 Gal-1 erkennt Glykoepitope auf dem CD2 Antigen**

In Jurkat T-Zell Lysaten wurde CD2 immunpräzipitiert und an Protein G Agarose adsorbiert. Nach der Dissoziation der Immunkomplexe in nichtreduzierendem Laemmli Probenpuffer und SDS-elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Elektrotransfer der Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose. Das Bindungsmuster von biotinyliertem Gal-1 auf Blots zeigt Abbildung 2A. Während das Lektin eine starke Bande bei 50 kDa generiert, die auf CD2 hindeutet, konnte die im Bereich von 150 kDa liegende Bande dem CD2 mAk (IgG1 Isotyp) zugeordnet werden (Spur 2). Die Hemmung der Gal-1 Bindung mit Asialofetuin (4 mg/ml) reduziert die Bandenstärke sehr stark, was auf eine Glykoepitop-vermittelte Erkennung von CD2 hinweist (Spur 3). Neben der Bindung von biotinyliertem Gal-1 an immunpräzipitiertes CD2 wurden Jurkat E6.1 Zelllysate an Gal-1 Agarose affinitätschromatographisch aufgetrennt und die gebundene Fraktion mit 0,1 M Lactoselösung eluiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gal-1 Agarose bindenden Fraktion und dem Transfer auf Nitrocellulose Membranen wurden die Blots mit einem biotinylierten CD2 mAk inkubiert. Neben einer sehr schwachen Bande bei 45 kDa erkennt der CD2 mAk auch hier eindeutig CD2 im Bereich von 50 kDa (Abbildung 2B, Spur 2). Eine identische Bande wurde auf Blots erhalten, wenn immunpräzipitiertes CD2 von Jurkat E6.1 Zelllysaten auf Blots mit dem biotinylierten CD2 mAk nachgewiesen wurde (78).



**Abbildung 2** Erkennung von CD2 in CD2 Immunpräzipitaten von Jurkat E6.1 Zelllysaten durch biotinyliertes Gal-1 (A) und in der Gal-1 Agarose bindenden Fraktion dieser Lysate durch einen biotinylierten CD2 mAk auf Blots (B). Die SDS-PAGE erfolgte in 12 % igen Trenngelen unter nichtreduzierenden (A) und reduzierenden Bedingungen (B).

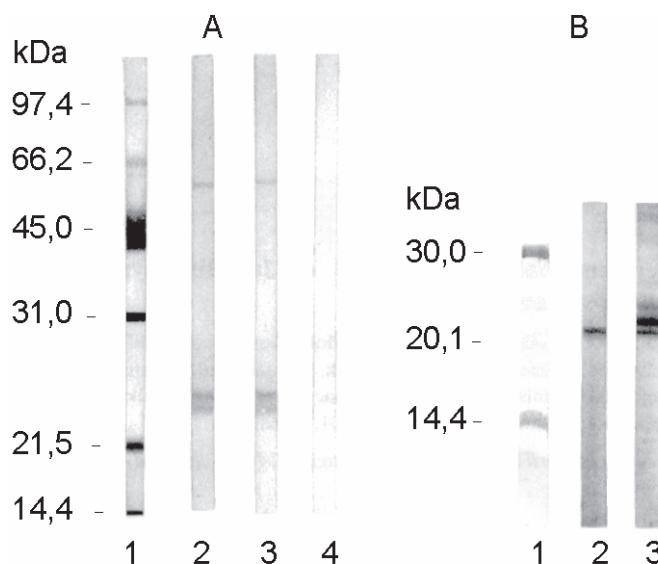
Spur 1: biotinylierte Molekulargewichtsstandards, A-Spur 2 und 3: Inkubation von CD2 Immunpräzipitaten ( $2,8 \times 10^7$  Zellen) mit biotinyliertem Gal-1 ohne (Spur 2) bzw. mit 4 mg/ml Asialofetuin (Spur 3), B-Spur 2: Inkubation der Gal-1 Agarose bindenden Fraktion ( $2,9 \times 10^7$  Zellen) mit 0,5 µg/ml biotinyliertem CD2 mAk.

Alle Blots wurden abschließend mit einem Streptavidin-HRP Konjugat (1:1000 Verdünnung) inkubiert und mit 3-Amino-9-ethylcarbazol als HRP-Substrat entwickelt.

### 6.2.2 Gal-1 erkennt Glykoepitope auf dem CD3-Komplex

Das CD3-Antigen wurde in Jurkat E6.1 Zelllysaten mit einem CD3 mAk (Klon UCHT1) immunpräzipitiert und an Protein G Agarose adsorbiert. Nach der Dissoziation der Immunkomplexe in nichtreduzierendem Probenpuffer und SDS-elektrophoretischer Auftrennung wurde das Bandenmuster auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die Bindung von biotinyliertem Gal-1 zeigt Abbildung 3A. Auf den Blots erkennt Gal-1 zwei Banden im Bereich von 22-26 kDa (Spur 2). Während die Gal-1 Bindung mit Lactose (30 mM) nicht inhibierbar ist (Spur 3), ist die Gal-1 Bindung an beide Banden in Gegenwart von Asialofetuin (2 mg/ml) nicht nachweisbar (Spur 4). Durch Erhöhung der eingesetzten CD3-Immunpräzipitatmenge ist eine zusätzliche Bande im Bereich von 22-26 kDa nachweisbar (B, Spur 3). Obwohl der mAk (Klon UCHT1) spezifisch an CD3ε bindet (146), werden zwei

Ketten des Komplexes coimmunpräzipitiert. Im Gegensatz zu Gal-1 reagiert der biotinylierte CD3 $\epsilon$  mAk spezifisch mit der  $\epsilon$ -Kette des CD3-Komplexes (Spur 2).



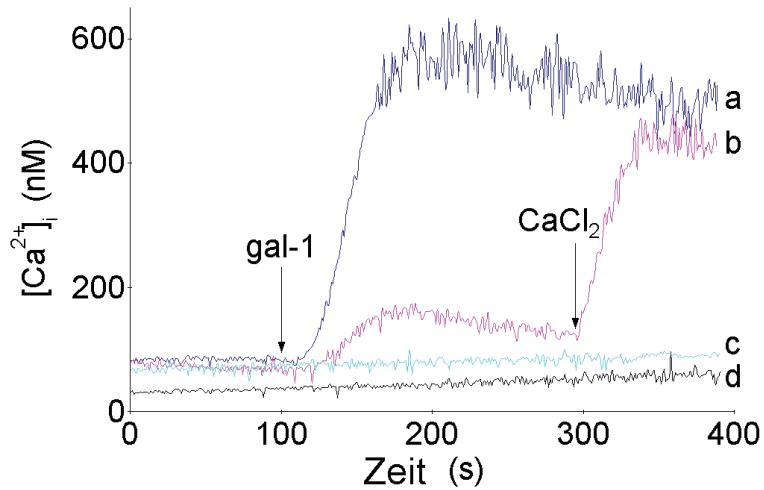
**Abbildung 3** Bindung von biotinyliertem Gal-1 an immunpräzipitiertes CD3 von Jurkat E6.1 Zelllysaten. Die SDS-PAGE erfolgte in einem 12 %igen Trenngel unter nichtreduzierenden Bedingungen. A-Spur 1: biotinylierte Molekulargewichtsstandards, Spur 2-4: Inkubation von CD3-Immunpräzipitaten (je  $2,2 \times 10^7$  Zellen) mit 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinyliertem Gal-1 (Spur 2), in Gegenwart von 30 mM Lactose (Spur 3) bzw. mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Asialofetuin (Spur 4). B-Spur 1: Molekulargewichtsstandards, Spur 2 und 3: Inkubation von immunpräzipitiertem CD3 von  $4,8 \times 10^7$  Zellen/Spur mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinyliertem CD3 mAk (Klon UCHT1, Spur 2) und mit 4,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinyliertem Gal-1 (Spur 3). Die Blots wurden mit einem Streptavidin-HRP Konjugat (1:1000) inkubiert und mit 3-Amino-9-ethylcarbazol als Substrat entwickelt (Spur 2, 3 und 4).

### 6.3 Charakterisierung der Gal-1 stimulierten Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$

In Verbindung mit der Erkennung von Glykoepitopen auf den CD-Aktivierungsmarkern CD2 und CD3 war von Interesse, die Effekte des endogenen Lektins auf die Calciummobilisation zu charakterisieren. In diese Experimente wurden neben Jurkat E6.1 Zellen auch ein CD45-defizienter Zellklon (J45.01) sowie ein CD3 $^-$  Zellklon dieser Zelllinie (J31-13) einbezogen. Weiterhin sollten die Proteinkinaseinhibitoren Herbimycin A und Staurosporin, Cholera Toxin (CTX) sowie die Effekte der Membrandepolarisation bei E6.1 Zellen mit Gramicidin bzw. bei einer hohen K $^+$ - und entsprechend niedrigen Na $^+$ -Konzentration im Puffer zur Charakterisierung beider Phasen der Gal-1 stimulierten Calciummobilisation beitragen.

### **6.3.1 Gal-1 stimuliert einen biphasischen Verlauf der Calciummobilisation**

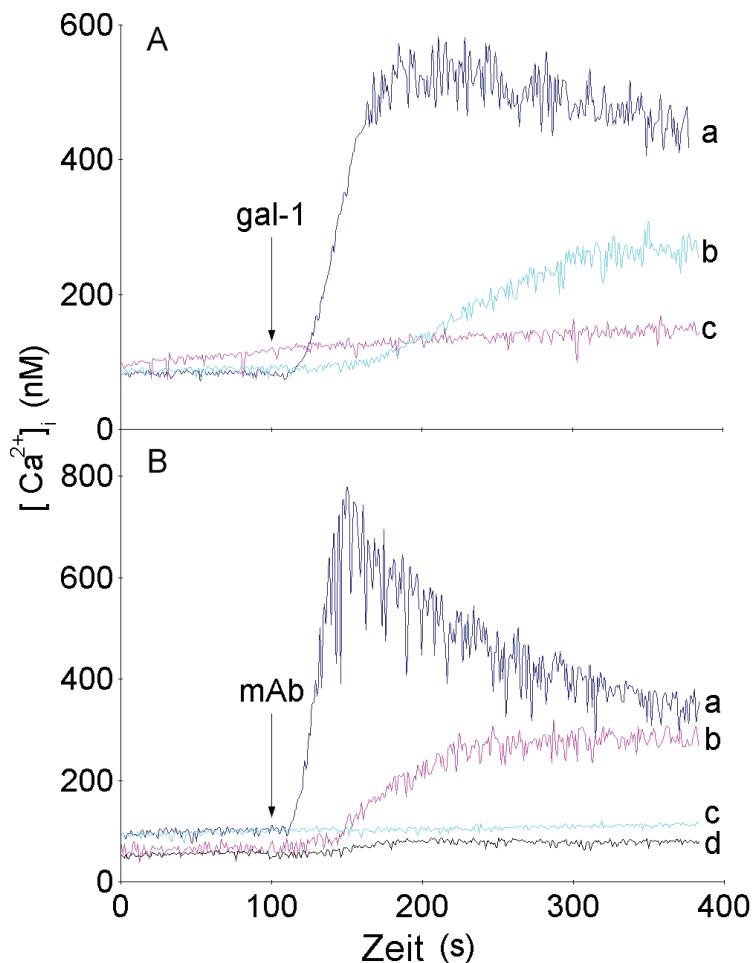
In Abbildung 4 sind die Effekte des Proteins auf die Konzentration von intracytoplasmatisch freiem Calcium von Fura-2 beladenen Jurkat E6.1 Zellen, CD45<sup>-</sup> J45.01 Zellen und von CD3<sup>-</sup> J31-13 Zellen zusammenfassend dargestellt. In Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> im Medium liegt die intrazelluläre Calciumkonzentration bei  $80 \pm 21$  nM. Die Stimulation der Zellen mit 15 µg/ml Gal-1 erhöht [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach einer kurzen Latenzzeit von etwa 25 Sekunden auf  $580 \pm 43$  nM und bleibt langandauernd auf 500 nM erhöht (a). Die Präinkubation der Zellen mit Lactose (10 mM) für 100 Sekunden bei 37 °C inhibiert die Gal-1 induzierte Calciumfreisetzung vollständig (c). Bei CD45<sup>-</sup> J45.01 Zellen und CD3<sup>-</sup> J31-13 Zellen zeigt das Lektin keinen Calcium-mobilisierenden Effekt (d). Auch nach der Stimulation beider Zelllinien mit einem CD3ε mAk bzw. der Costimulation mit zwei CD2 mAk unterschiedlicher Epitopspezifität war keine Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nachweisbar. Bei Jurkat E6.1 Zellen zeigt Gal-1 den charakteristischen biphasischen Verlauf der Calciummobilisation. In Calcium-freiem Medium stimuliert das Protein zunächst einen transienten, etwa auf das Zweifache der basalen Calciumkonzentration ansteigenden Wert, der nach der Repletion des Mediums mit CaCl<sub>2</sub> (1 mM) auf etwa 450 nM ansteigt und langandauernd erhöht bleibt (b). Während die transiente Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aus der Entleerung intrazellulärer Speicher resultiert, ergibt sich die langandauernde Erhöhung aus dem Einstrom von extrazellulärem Calcium.



**Abbildung 4** Gal-1 induzierte Calciummobilisation von Fura-2 beladenen Jurkat E6.1 Zellen (a, b, c), von J31-13 und J45.01 Zellen (d). E6.1 Zellen wurden bei 37 °C ohne (a) bzw. mit Lactose (10 mM, c) für 100 Sekunden vorinkubiert. Die Zugabe von Gal-1 (15 µg/ml) erfolgte jeweils bei 100 Sekunden. Der Effekt von Gal-1 auf die Calciummobilisation von J45.01 und J31-13 Zellen ist in der Spur d dargestellt. Das durch Gal-1 (15 µg/ml) stimulierte transiente Calciumsignal ohne Ca<sup>2+</sup> im Medium ist in der Spur b dargestellt. Dazu wurden die Calciumionen mit EGTA (1,5 mM) zu Beginn der Messungen maskiert. Die Repletion des Puffers mit CaCl<sub>2</sub> (1,5 mM) erfolgte bei 300 Sekunden.

### 6.3.2 Effekte der Proteinkinaseinhibitoren Herbimycin A und Staurosporin auf die Gal-1 stimulierte Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Um Hinweise zu erhalten, in welchem Maße frühe Phosphorylierungseignisse für das Gal-1 induzierte Calciumsignal erforderlich sind, wurden E6.1 Zellen mit dem Proteintyrosinkinase Inhibitor Herbimycin A vorinkubiert, was zur Hemmung der TCR-vermittelten IL-2 Sekretion führt (147). In diese Untersuchungen wurde auch der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin einbezogen. Die hemmenden Effekte beider Inhibitoren auf die Calciummobilisation zeigt Abbildung 5A. Während Gal-1 bei E6.1 Zellen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> langandauernd auf etwa 500 nM stimuliert (a), reduziert Herbimycin A (3 µM) diesen Effekt auf etwa 40 % (b). Nach Vorinkubation der Fura-2 beladenen Zellen mit Staurosporin (1 µM) ist nach der Stimulation mit Gal-1 keine zelluläre Calciumantwort nachweisbar (c). Abbildung 5B zeigt den Effekt einer CD3- Stimulation mit einem CD3ε mAk (Klon UCHT1, a) bzw. einer CD2-Costimulation mit zwei CD2 mAk (Klon 39C1.5 und 6F10.3, b) unterschiedlicher Epitopspezifität. Im Gegensatz zu Gal-1 löscht eine Herbimycin A Vorbehandlung der Zellen das durch CD2 mAk (c) und CD3 mAk stimulierte Calciumsignal (d).

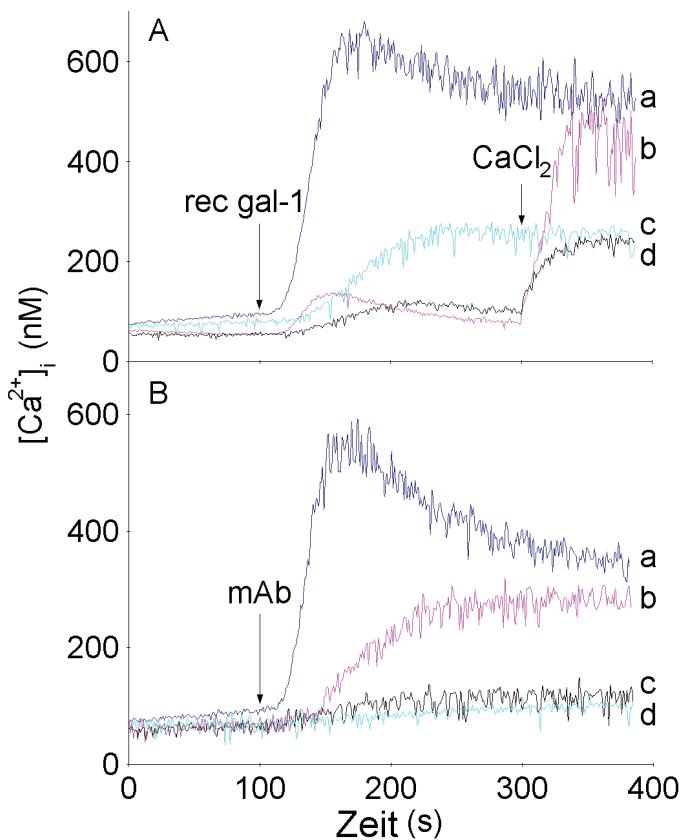


**Abbildung 5** Gal-1 (15 µg/ml) induzierte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation von unbehandelten (A, a), von Herbimycin A (A, b) und von Staurosporin behandelten E6.1 Zellen (A, c). Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in E6.1 Zellen nach Stimulation mit 2 µg/ml CD3 mAk (Klon UCHT1) in unbehandelten (B, a), mit Herbimycin A behandelten (B, d) sowie nach CD2-Costimulation mit jeweils 3,3 µg/ml CD2 mAk (Klon 39C1.5, Klon 6F10.3) von unbehandelten (B, b) und von Herbimycin A vorbehandelten Zellen (B, c). Fura-2 beladene E6.1 Zellen wurden in der Quarzküvette für 3 min bei 37 °C mit Staurosporin (1 µM) vorinkubiert. Mit Herbimycin A (3 µM) wurden die Zellen (1 x 10<sup>6</sup>/2 ml Kulturmedium für 21 Stunden bei 37 °C kultiviert.

### 6.3.3 Cholera Toxin hemmt die Gal-1 stimulierte Calciummobilisation partiell

Um weitere Hinweise zum Mechanismus der Gal-1 stimulierten Calciummobilisation zu erhalten, wurde Choleratoxin (CTX) eingesetzt, das CD3ζ modifiziert und damit den TCR von der Signalweiterleitung abkoppelt (**148**). Wie in Abbildung 6 dargestellt, wird durch 20 µg/ml rekombinantes Gal-1 (rec Gal-1) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bis auf 674 nM stimuliert (a), was einer 7,7-

fachen Erhöhung gegenüber der basalen Calciumkonzentration entspricht. Die Kultivierung von E6.1 Zellen in komplettem Kulturmedium mit 0,5 µg/ml CTX für 2 Stunden bei 37 °C reduziert die durch das rekombinante Protein stimulierte Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  auf 300 nM (c). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (b) führt die CTX-Behandlung der Zellen zu einer reduzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und zu einem herabgesetzten  $Ca^{2+}$ -Einstrom (d) nach Stimulation mit rekombinantem Gal-1. Vergleichbare Hemmeffekte des Toxins auf die Calciummobilisation wurden gemessen, wenn Gal-1 zur Zellstimulation eingesetzt wurde. Im Gegensatz zur Zellstimulation mit Gal-1 führt die Vorinkubation der Zellen mit CTX zu einer kompletten Hemmung der CD3 mAk (Abbildung 6B, c) und der durch zwei CD2 mAk induzierten zellulären Calciumantwort (Abbildung 6B, d).

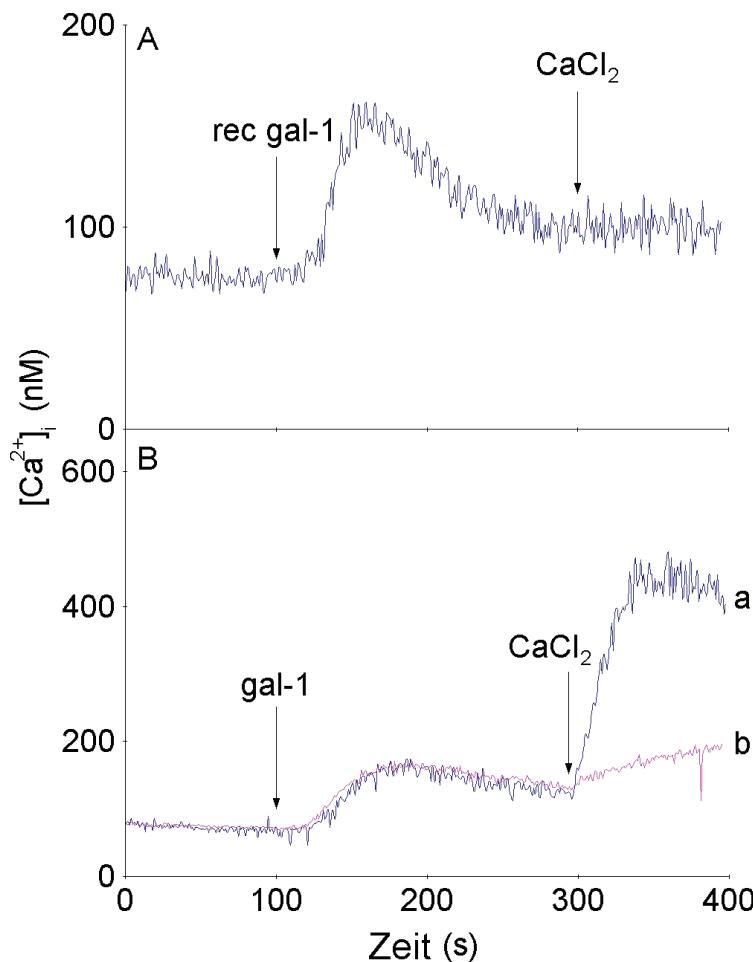


**Abbildung 6** Hemmung der rec Gal-1, CD3 mAk und der CD2 mAk stimulierten Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Jurkat E6.1 Zellen mit Cholera Toxin. Die Zellen ( $1,5 \times 10^6/ml$  Kulturmedium) wurden mit  $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  CTX für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert und danach mit Fura-2/AM beladen. A: Stimulation von  $[Ca^{2+}]_i$  in unbehandelten (a) und CTX-behandelten Zellen (c) in Gegenwart von  $1 \text{ mM } Ca^{2+}$  im Medium sowie von unbehandelten (b) und von CTX-behandelten Zellen (d) ohne  $Ca^{2+}$  im Medium mit  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  rec Gal-1. Die Zugabe von EGTA ( $1,5 \text{ mM}$ ) erfolgte beim Zeitpunkt 0, die von  $CaCl_2$  ( $1,5 \text{ mM}$ ) und von rec Gal-1 sind durch Pfeile markiert. B: CD3 mAk ( $2,6 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Klon X35, a) und CD2 mAk (je  $3,3 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Klone 6F10.3 und 39C1.5, b) stimuliertes Calciumsignal in unbehandelten und CTX-behandelten Zellen (c, d).

### 6.3.4 Der Gal-1 stimulierte Calciumeinstrom wird durch Membrandepolarisation gehemmt

Um den biphasischen Verlauf der Calciummobilisation weiter zu charakterisieren, wurde der Effekt der Membrandepolarisation mit Gramicidin und durch Äquilibrierung der Fura-2 beladenen Zellen in HEPES-Puffer mit  $110 \text{ mM } K^+$  und  $22 \text{ mM } Na^+$  untersucht. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Die Membrandepolarisation der Fura-2

beladenen Zellen mit dem Transportantibiotikum Gramicidin (A) bzw. durch eine hohe K<sup>+</sup>-Konzentration im Puffer (B) zeigen übereinstimmend, dass die transiente Galectin-stimulierte Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher Membranpotential-unabhängig stimulierbar ist. Beide Methoden der Membrandepolarisation zeigen übereinstimmend, dass der Galectin-stimulierte langandauernde Ca<sup>2+</sup>-Einstrom gehemmt wird.



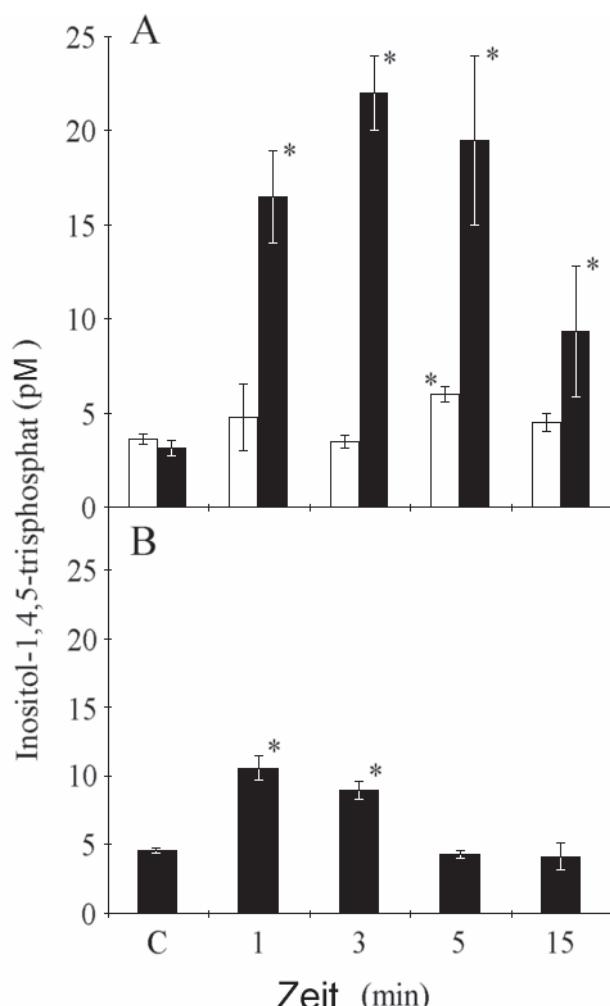
**Abbildung 7** Effekt der Membrandepolarisation mit Gramicidin (A) und in HEPES-Puffer mit 110 mM K<sup>+</sup> (B) auf die Gal-1 stimulierte Ca<sup>2+</sup>-Antwort von Jurkat E6.1 Zellen. A: EGTA (1,5 mM) und Gramicidin (4,5 µg/ml) wurden zum Zeitpunkt 0 zur Zellsuspension gegeben. Die Zugabe von rec Gal-1 (13,3 µg/ml) und von CaCl<sub>2</sub> (1,5 mM) ist durch Pfeile gekennzeichnet. B: Gal-1 stimulierte Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in HEPES-Puffer mit 5 mM K<sup>+</sup> (a) und in HEPES-Puffer mit 110 mM K<sup>+</sup> (b). Die Zugabe von EGTA (1,5 mM) erfolgte zum Zeitpunkt 0, die von Gal-1 (16 µg/ml) und CaCl<sub>2</sub> (1,5 mM) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

## **6.4 Effekt von Gal-1 auf die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und die Tyrosinphosphorylierung der PLC-γ1**

In Zusammenhang mit der Erkennung von Glykoepitopen auf CD2 und CD3 und dem Galectin-stimulierten biphasischen Verlauf der Calciummobilisation bei T-Zellen waren auch Effekte auf den Inositolphosphatstoffwechsel und die Aktivierung der PLC-γ zu erwarten. Es war daher von Interesse, welchen Effekt die Zellstimulation mit Gal-1 auf den Spiegel und die Kinetik von InsP<sub>3</sub> und die Tyrosinphosphorylierung der PLC-γ hat.

### **6.4.1 Galectin-1 stimuliert einen transienten Anstieg von InsP<sub>3</sub>**

Die Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1 steigert die Synthese von InsP<sub>3</sub>. In Abbildung 8A ist die Kinetik dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen (C) mit  $3,6 \pm 0,3$  pM führt die Stimulation der Zellen mit 10 µg Gal-1 nur zu einem geringen nichtsignifikanten Anstieg von InsP<sub>3</sub>. Die Zellstimulation mit 45 µg Gal-1 generiert jedoch einen signifikanten Anstieg dieses Inositoltriphosphates mit einem Maximalwert von  $22,0 \pm 1,0$  pM nach 3 Minuten. In diese Experimente wurde auch das mutierte Lektinprotein C2S einbezogen, dessen β-Galaktosidbindung auch unter nichtreduzierenden Bedingungen stabil ist (54). Wie in Abbildung 8B gezeigt wird, stimuliert auch C2S einen transienten, im Vergleich zum nativen Lektin weniger effizienten Anstieg von InsP<sub>3</sub>.

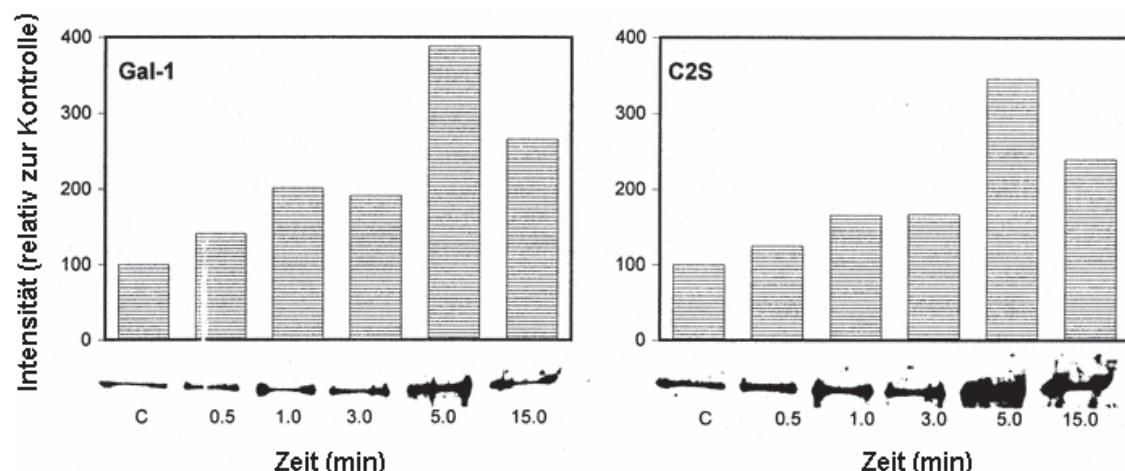


**Abbildung 8** Durch Gal-1 (A) und C2S (B) stimulierte InsP<sub>3</sub>-Kinetik in Jurkat E6.1 Zellen. Die Zellen ( $1 \times 10^7/0,5 \text{ ml RPMI } 1640 \text{ Medium}$ ) wurden mit Gal-1 bzw. C2S bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert. Die Messungen der InsP<sub>3</sub>-Konzentration erfolgte mit dem kompetitiven Biotrak™ [<sup>3</sup>H] Assay System von Amersham-Pharmacia. A: InsP<sub>3</sub>-Kinetik stimuliert durch  $10 \mu\text{g}$  Gal-1 (offene Balken) und durch  $45 \mu\text{g}$  Gal-1 (schwarze Balken), B: InsP<sub>3</sub>-Kinetik stimuliert durch  $40 \mu\text{g}$  C2S. Die InsP<sub>3</sub> Konzentrationen sind als Mittelwerte von vier Einzelmessungen mit der Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der T-Test verwendet. Differenzen der InsP<sub>3</sub> Konzentrationen zwischen Kontrollen und Lektin-behandelten Proben sind mit  $P < 0,01$  statistisch signifikant und mit einem Stern versehen.

#### 6.4.2 Die Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1 und C2S führt zur Tyrosinphosphorylierung der PLC- $\gamma$ 1

In Verbindung mit den stimulierenden Effekten des endogenen Lektins auf die Konzentration von InsP<sub>3</sub> war auch die Aktivierung des Enzyms durch Tyrosinphosphorylierung zu erwarten. Zum Nachweis von Veränderungen des Phosphorylierungszustandes der Phospholipase C

nach Zellstimulation mit Gal-1 bzw. C2S wurde das Enzym in den Zelllysaten mit einem PLC- $\gamma$ 1 spezifischen mAk immunpräzipitiert und an Protein G Agarose adsorbiert. Auf den Blots erfolgte die Darstellung des Phosphotyrosinierungsgrades der PLC- $\gamma$ 1 mit einem anti-Phosphotyrosin-HRP Konjugat luminographisch mit dem ECL-System. In Abbildung 9 ist die Kinetik der Gal-1 und C2S stimulierten Tyrosinphosphorylierung des Enzyms dargestellt. Übereinstimmend zeigt die durch beide Proteine stimulierte Phosphorylierungskinetik einen transienten Verlauf mit einem Maximum nach fünf Minuten. Die densitometrische Auswertung der Banden bei diesem Zeitpunkt ergibt, dass beide Proteine die Tyrosinphosphorylierung der PLC- $\gamma$ 1 bezogen auf die mitgeführten Kontrollen etwa um den Faktor 3,5 erhöhen.



**Abbildung 9** Kinetik der Tyrosinphosphorylierung der PLC- $\gamma$ 1 nach Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1 und C2S. Die Zellen ( $1 \times 10^7/0,5$  ml RPMI 1640 Medium) wurden mit jeweils 20  $\mu$ g der Lektinproteine stimuliert. Die Kontrollen (C) erhielten das gleiche Volumen PBS (pH 7,4). Nach der Immunpräzipitation der PLC- $\gamma$ 1 in den Zelllysaten und Adsorption an Protein G Agarose erfolgte der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung des Enzyms auf den Blots mit einem anti-Phosphotyrosin-HRP Konjugat luminographisch mit dem ECL-System von Amersham-Pharmacia.

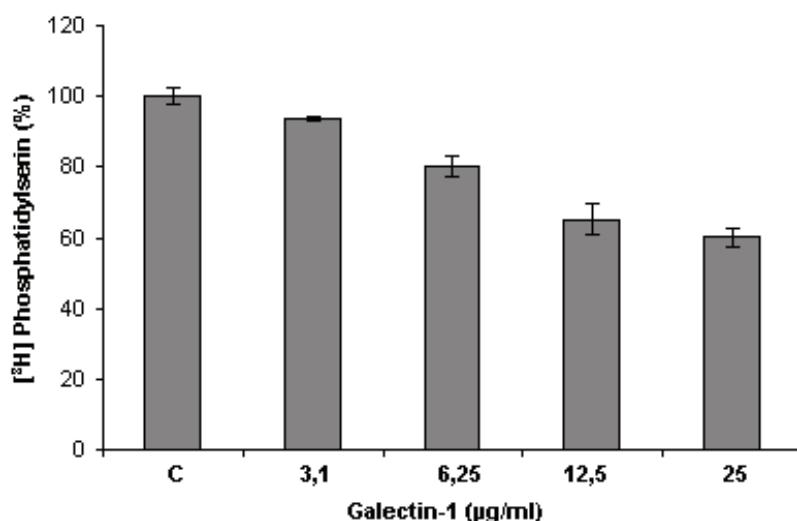
## 6.5 Gal-1 hemmt die zelluläre Synthese von Phosphatidylserin (PtdSer)

Aufgrund des Lektin-stimulierten biphasischen Verlaufes der Calciummobilisation bei T-Zellen, insbesondere der Depletion intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, waren Effekte auf das im ER lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierte Enzymsystem für die Synthese dieses

Phospholipids zu erwarten (143). Um den inhibitorischen Effekt von Gal-1 auf die PtdSer-Synthese von Jurkat E6.1 Zellen ( $CD2^+ CD3^+ CD45^+$ ) zu charakterisieren, wurden auch die defizienten Klone dieser Zelllinie J45.01 ( $CD45^-$ ) und J31-13 ( $CD3^-$ ) einbezogen. Dazu sollte auch der Calmodulinantagonist Trifluoperazin (TFP) und der InsP<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist Xestospongin C (XeC) beitragen.

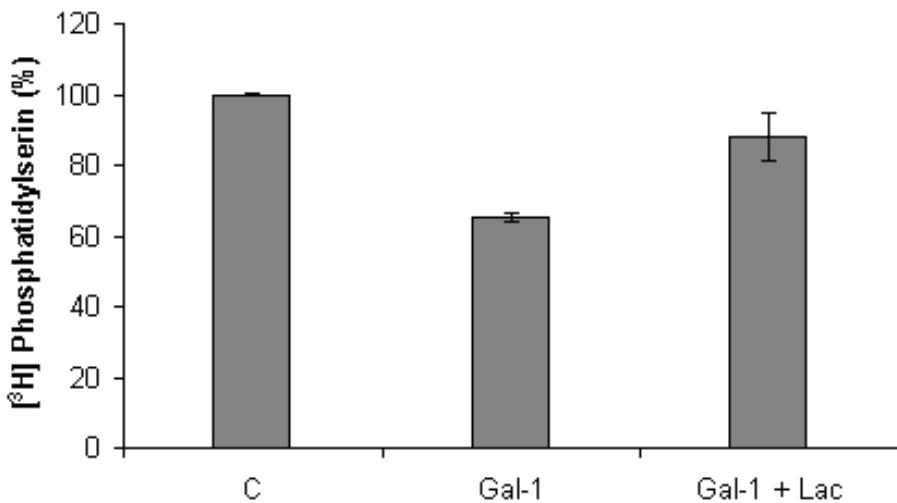
### 6.5.1 Gal-1 hemmt die PtdSer-Synthese konzentrationsabhängig

Die Hemmung des [<sup>3</sup>H]-Serineinbaus in das Phospholipid in Jurkat E6.1 Zellen in Abhängigkeit von der zur Zellstimulation eingesetzten Gal-1 Konzentration ist in Abbildung 10 dargestellt. Dabei wird die Hemmung des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Serin in die PtdSer-Spots relativ zur [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthese der mitgeführten Kontrollen (100 %) in Prozent angegeben. Wie Abbildung 10 zeigt, hemmt das Lektin die Synthese des Phospholipids konzentrationsabhängig und erreicht bei 25 µg/ml einen Wert von etwa 60 %. Für die weiteren Versuche zur Stimulation der PtdSer-Synthesehemmung wurde daher diese Gal-1 Konzentration eingesetzt.



**Abbildung 10** Konzentrationsabhängigkeit der Gal-1 stimulierten [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthesehemmung in Jurkat E6.1 Zellen. Die Zellen ( $4 \times 10^6/\text{ml}$  20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4) wurden nach Zugabe von 4 µCi [<sup>3</sup>H]-Serin ohne (Kontrollen, C) und mit Gal-1 für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Extraktion der Gesamtlipidfraktion und dünnenschichtchromatographischer Auf trennung erfolgte die Messung des [<sup>3</sup>H]-Serineinbaus in die PtdSer-Spots durch Flüssigkeitsszintillations-Messung. Die PtdSer-Synthesehemmung ist als Mittelwert von jeweils drei Einzelmessungen mit der Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Kontrollen (C) dargestellt.

Um den Effekt von Lactose auf die Lektin-stimulierte Synthesehemmung des Phospholipids zu untersuchen, erfolgte die Zellstimulation mit 25 µg/ml Gal-1 in Gegenwart von 30 mM des Disaccharides. Wie Abbildung 11 zeigt, wird die zelluläre [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthese durch das Protein auf 64 % reduziert. Die Gegenwart von 30 mM Lactose führt zur Verringerung der Synthesehemmung mit einem Anstieg auf 87 %.

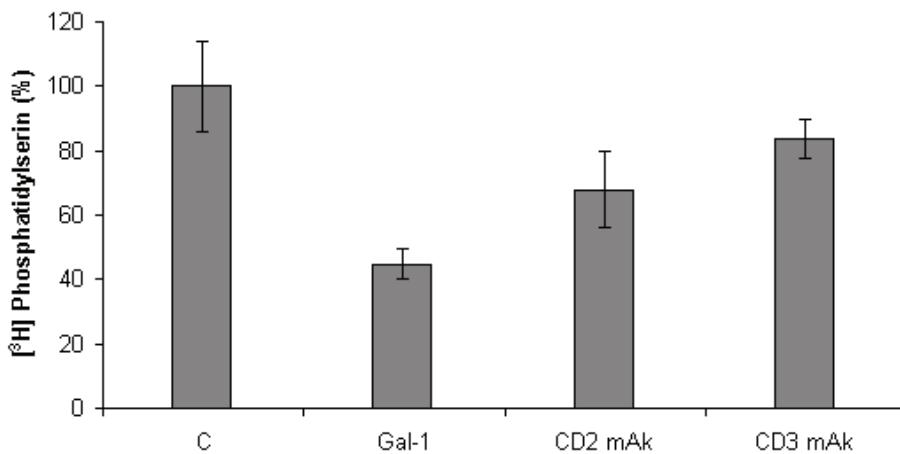


**Abbildung 11** [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthese von Jurkat E6.1 Zellen (Kontrolle, C) und deren Hemmung durch 25 µg/ml Gal-1 sowie durch 25 µg/ml Gal-1 mit 30 mM Lactose im Medium. Die Zellen (4 x 10<sup>6</sup>/ml HEPES-Puffer) wurden nach Zugabe von 4 µCi [<sup>3</sup>H]-Serin für 2 h bei 37 °C ohne (C), mit Gal-1 (25 µg/ml) bzw. mit Gal-1 und 30 mM Lactose im Medium inkubiert. Die Synthese von [<sup>3</sup>H]-PtdSer ist als Mittelwert von drei Einzelmessungen mit der Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Kontrolle dargestellt.

### 6.5.2 Die Expression von CD3 und CD45 ist für die Gal-1 und CD3 mAk stimulierte PtdSer-Synthesehemmung erforderlich

Die Aktivierung von T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex oder CD2 mit CD3 mAk bzw. durch Costimulation mit zwei CD2 mAk unterschiedlicher Epitopspezifität führt zur Tyrosinphosphorylierung der PLC-γ1, zur Produktion von InsP<sub>3</sub> und damit zur Depletion intrazellulärer Calciumspeicher. Da Gal-1 Glykoepitop-vermittelt zur Coligation von CD2 und CD3 befähigt ist, waren vergleichende Untersuchungen zum Effekt dieser Antikörper auf

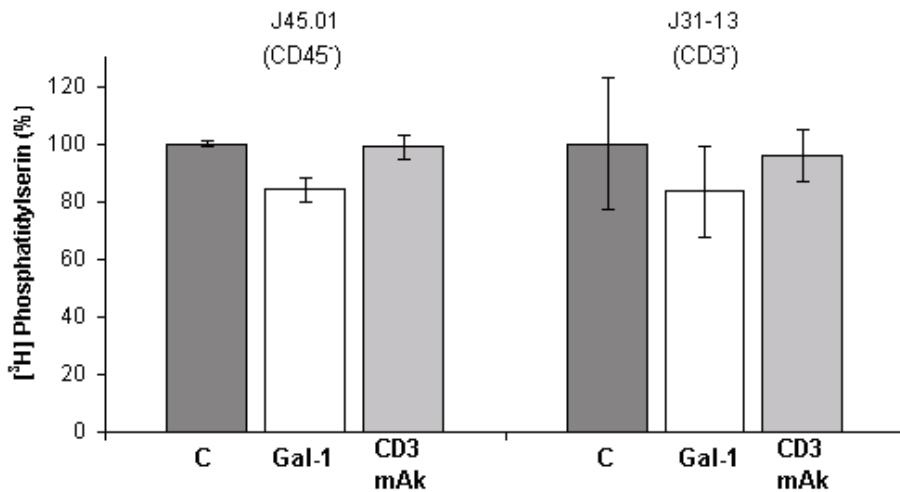
die zelluläre PtdSer-Synthese von Interesse. In Abbildung 12 sind die Effekte der Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1, einem CD3 mAk (Klon X35) und mit zwei CD2 mAk (Klon 39C1.5 und 6F10.3) auf die Synthese von [<sup>3</sup>H]-PtdSer im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen (C) dargestellt. Gal-1 hemmt bei einer Konzentration von 25 µg/ml den [<sup>3</sup>H]-Serineinbau in PtdSer deutlich stärker als der CD3 mAk und beide CD2 mAk, obwohl bei den eingesetzten Konzentrationen der Effektoren in E6.1 Zellen eine in der Höhe vergleichbare transiente Calciumfreisetzung stimuliert wird.



**Abbildung 12** [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthese von Jurkat E6.1 Zellen (C) und deren Hemmung durch Stimulation der Zellen mit zwei CD2 mAk (je 5 µg/ml), einem CD3 mAk (3 µg/ml) und durch Gal-1 (25 µg/ml). Die Zellen ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden nach Zugabe von 4 µCi [<sup>3</sup>H]-Serin ohne (C) und mit den Effektoren für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die PtdSer-Synthesehemmung ist als Mittelwert von jeweils drei Einzelmessungen mit der Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Kontrolle (C) angegeben.

In den defizienten T-Zell Klonen J45.01 (CD45<sup>-</sup>) und J31-13 (CD3<sup>-</sup>) ist die Signalweiterleitung über den TCR/CD3-Komplex unterbrochen. Es war daher von Interesse, an beiden Zelllinien den Effekt einer CD3 mAk und Gal-1 Stimulation auf die PtdSer-Synthese zu untersuchen. Wie die Abbildung 13 zeigt, sind bei beiden defizienten Jurkat T-Zell Klonen nach CD3 mAk Stimulation (Klon X35, 3 µg/ml) keine Hemmeffekte auf die Synthese von [<sup>3</sup>H]-PtdSer nachweisbar. Auch nach Gal-1 Behandlung (25 µg/ml) von J31-13 Zellen ist der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Serin in das Phospholipid gegenüber den Kontrollen nicht signifikant erniedrigt. Bei J45.01 Zellen induziert Gal-1 eine signifikante Reduktion des [<sup>3</sup>H]-Serineinbaus in das Phospholipid auf 85 % im Vergleich zur Kontrolle. Der Hemmeffekt des

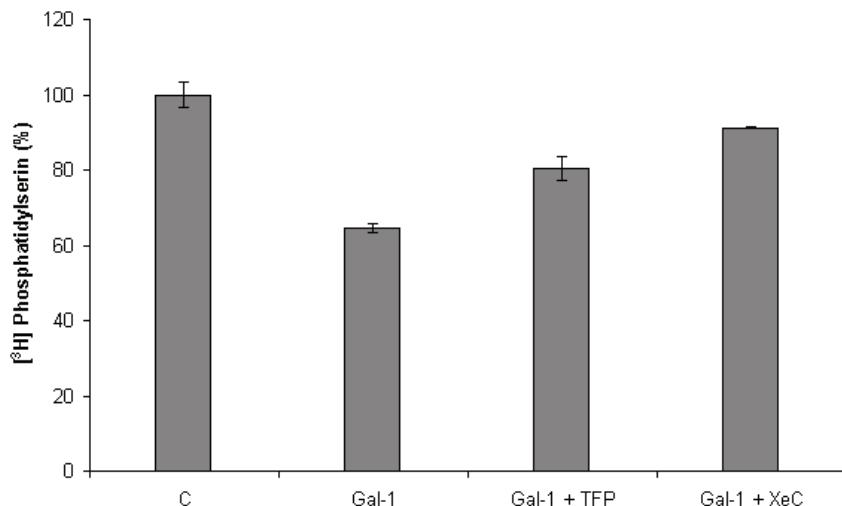
Lektins an dieser defizienten Zelllinie ist im Vergleich zu dem bei Jurkat E6.1 Zellen gefundenen Wert (ca. 60%, Abbildung 10) relativ gering.



**Abbildung 13 Effekt von Gal-1 und CD3 mAk (Klon X35) auf die Synthese von [<sup>3</sup>H]-PtdSer in J45.01 und J31-13 Zellen.** Die Zellen ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden nach Zugabe von  $4 \mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]-Serin ohne (C) und mit Gal-1 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. CD3 mAk (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die [<sup>3</sup>H]PtdSer Synthesehemmung ist als Mittelwert von drei Einzelmessungen mit der Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Kontrolle angegeben.

### 6.5.3 Effekt von Trifluoperazin und von Xestospongin C auf die Gal-1 stimulierte PtdSer-Synthesehemmung

Durch die Einbeziehung des Calmodulinantagonisten Trifluoperazin (TFP) und des Membran-permeablen InsP<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Xestospongin C (XeC), der die InsP<sub>3</sub>-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER blockiert, sollte der Hemmeffekt des endogenen Lektins auf die zelluläre PtdSer-Synthese weiter charakterisiert werden. Den Effekt von TFP (50  $\mu\text{M}$ ) und von XeC (30  $\mu\text{M}$ ) auf die Gal-1 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimulierte Hemmung der PtdSer-Synthese zeigt Abbildung 14. Während das Lektin den [<sup>3</sup>H]-Serineinbau in das Phospholipid auf 64 % erniedrigt, wird der Hemmeffekt von Gal-1 mit TFP im Puffer auf 79 % abgeschwächt. Die Hemmung der Calciumfreisetzung aus dem ER mit XeC führt zu einer stärkeren Reduktion des Lektin-vermittelten Hemmeffektes mit einem Anstieg auf 90 %.



**Abbildung 14 Effekte von Trifluoperazin (TFP) und Xestospongin C (XeC) auf die Gal-1 stimulierte Hemmung der [<sup>3</sup>H]-PtdSer Synthese in Jurkat E6.1 Zellen. Die Zellen ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden nach Zugabe von  $4 \mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]-Serin ohne (C), mit Gal-1 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. mit Gal-1 und TFP (50  $\mu\text{M}$ ) oder XeC (30  $\mu\text{M}$ ) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die PtdSer-Synthesehemmung ist als Mittelwert von drei Einzelmessungen mit der Standardabweichung in Prozent dargestellt.**

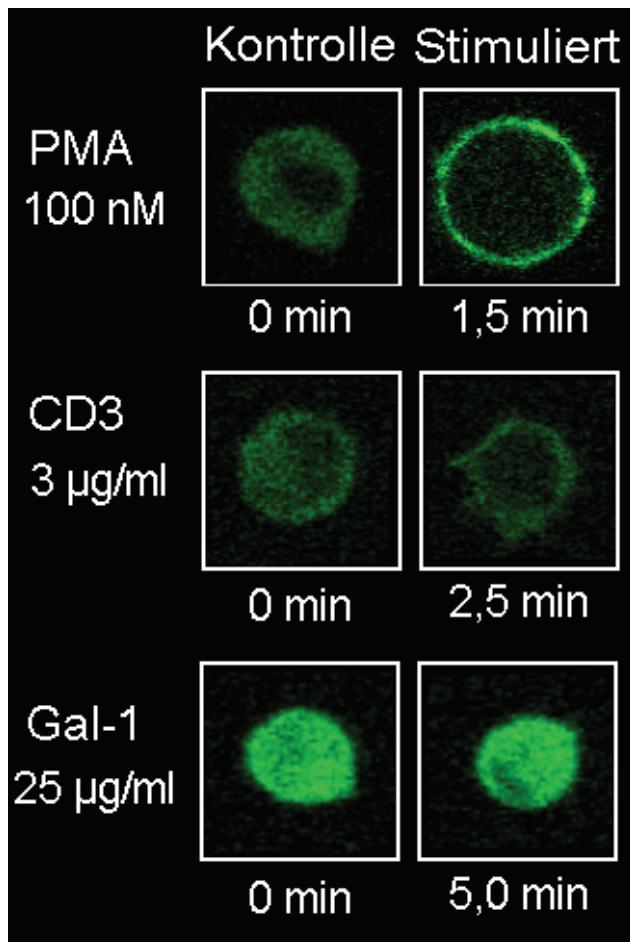
## 6.6 Effekt von Gal-1 auf die Translokation der Proteinkinase C Isoformen (PKC $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\theta$ )

Die Gal-1 stimulierte langandauernde Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei T-Zellen hat Effekte auf Calcium/Calmodulin-regulierte Enzyme. Dabei ist die Wirkung beider Phasen der Calciummobilisation auf diese Enzyme unterschiedlich. Während die Depletion intrazellulärer Speicher zur Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Enzymsystems für die Synthese von PtdSer führt (149), stimuliert der langandauernde Calciumeinstrom die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierte Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin. Gal-1 stimuliert die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung des nucleären Faktors aktiverter T-Zellen (NFAT), was zur Demaskierung seiner Kernlokalisationssequenz und der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern führt (150). Aufgrund der stimulierenden Effekte des Lektins auf die Aktivität der PLC- $\gamma$ 1 und die Konzentration von InsP<sub>3</sub> (Punkt 6.4.1 und 6.4.2) war auch eine Aktivierung der klassischen PKC-Isoformen (cPKC $\alpha$ , - $\beta$ I, - $\beta$ II, - $\gamma$ ) durch Calcium und Diacylglycerol, die zur Translokation an die Plasmamembran führt, denkbar. Wegen der Bedeutung der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen nPKC-Isoform  $\theta$  als ein „upstream“ Regulator

der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), die den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert (**151**), wurde auch diese Isoform in die Untersuchungen einbezogen. Zum Nachweis der Translokation der PKC-Isoformen nach Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und mit einem CD3 $\epsilon$  mAk (Positivkontrollen) bzw. mit Gal-1 wurden die Zellen zunächst mit dem für die jeweilige PKC-Isoform entsprechenden pPKC-EGFP-Vektor durch Elektroporation transient transfiziert. Nach der Kultivierung der Zellen für 18 Stunden bei 37 °C war die Expression der PKC-EGFP Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.

### **6.6.1 Proteinkinase C $\alpha$**

Der Nachweis der Umverteilung des cytosolisch exprimierten PKC $\alpha$ -EGFP Fusionsproteins nach Zellstimulation an die Plasmamembran erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes. Um die Funktionsfähigkeit des Testsystems zu überprüfen, wurde die durch PMA (100 nM) und einen CD3 $\epsilon$  mAk (3  $\mu$ g/ml) stimulierte Translokation des PKC $\alpha$ -EGFP Fusionsproteins untersucht. Wie Abbildung 15 zeigt, stimuliert PMA innerhalb von 1,5 Minuten effizient die Translokation von PKC $\alpha$ -EGFP an die Plasmamembran. Auch der CD3 $\epsilon$  mAk stimuliert bei E6.1 Zellen diese Umverteilung des PKC $\alpha$ -EGFP Fusionsproteins. Die Zellstimulation mit Gal-1 (25  $\mu$ g/ml) führt nicht zu dieser Fluoreszenzumverteilung, wie die homogene über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenz zeigt.

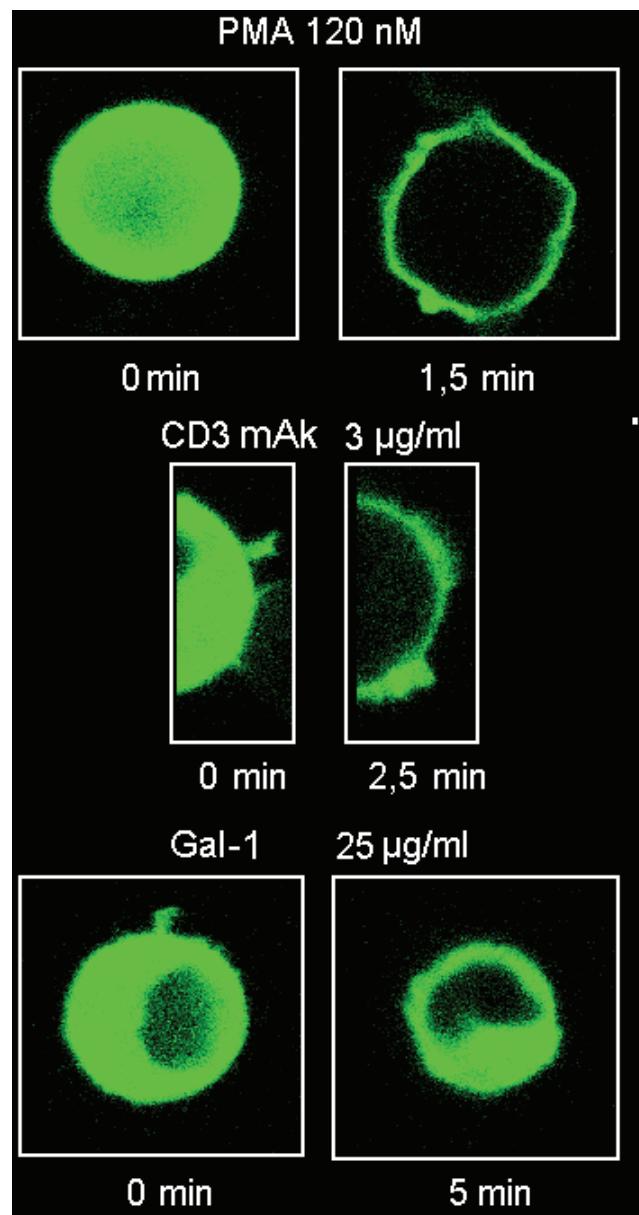


**Abbildung 15** Effekt von PMA (100 nM), einem CD3 $\epsilon$  mAk (3 µg/ml) und von Gal-1 (25 µg/ml) auf die Translokation des PKC $\alpha$ -EGFP Fusionsproteins an die Plasmamembran. E6.1 Zellen ( $1 \times 10^7$ /0,8 ml RPMI 1640 Medium wurden mit 25 µg pPKC $\alpha$ -EGFP-Vektor transient transfiziert und für 18 h Stunden bei 37 °C in 10 ml RPMI 1640 Medium kultiviert. Die Zellen ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden bei Raumtemperatur mit PMA, einem CD3 $\epsilon$  mAk und mit Gal-1 stimuliert und die Fluoreszenzverteilung an die Plasmamembran mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nachgewiesen.

## 6.6.2 Proteinkinase C $\beta$

Wie bei den vorangegangenen Versuchen zur Stimulation der Translokation der PKC $\alpha$  erfolgt nach der Stimulation der PKC $\beta$ -EGFP exprimierenden Jurkat E6.1 Zellen mit PMA (120 nM) und einem CD3 $\epsilon$  mAk (3 µg/ml) eine schnelle Umverteilung des cytosolischen Fusionsproteins an die Plasmamembran. Anhand der scharfen Membranfluoreszenz ist zu erkennen, dass die durch PMA und den CD3 mAk stimulierte Fluoreszenzumverteilung nach 1,5 Minuten bzw. 2,5 Minuten abgeschlossen ist und eine Verlängerung der Stimulationszeit

keine weitere Fokussierung der Membranfluoreszenz bewirkt. Im Gegensatz zu PMA und den CD3 $\epsilon$  mAk hat die Inkubation der PKC $\beta$ -EGFP exprimierenden Zellen mit 25  $\mu$ g/ml Gal-1 über einen Zeitraum von 5 Minuten keine Fluoreszenzumverteilung des cytosolischen Fusionsproteins zur Folge.



**Abbildung 16** Umverteilung der cytosolischen Fluoreszenz von PKC $\beta$ -EGFP exprimierenden Jurkat E6.1 Zellen an die Plasmamembran durch PMA (120 nM), CD3 $\epsilon$  mAk (3  $\mu$ g/ml) und Gal-1 (25  $\mu$ g/ml). Die Zellen ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden bei Raumtemperatur mit den Effektoren inkubiert und die Fluoreszenzumverteilung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nachgewiesen.

### 6.6.3 Proteinkinase C $\gamma$

Bei dieser cPKC-Isoform stimuliert nur PMA (100 nM) die Translokation des PKC $\gamma$ -EGFP Fusionsproteins an die Plasmamembran (Abbildung 17). Nach der Inkubation von PKC $\gamma$ -EGFP exprimierenden Jurkat E6.1 Zellen mit 3  $\mu$ g/ml CD3 $\epsilon$  mAk und mit 25  $\mu$ g/ml Gal-1 über eine Zeit von 5 Minuten ist eine Fluoreszenzumverteilung an die Plasmamembran nicht nachweisbar.

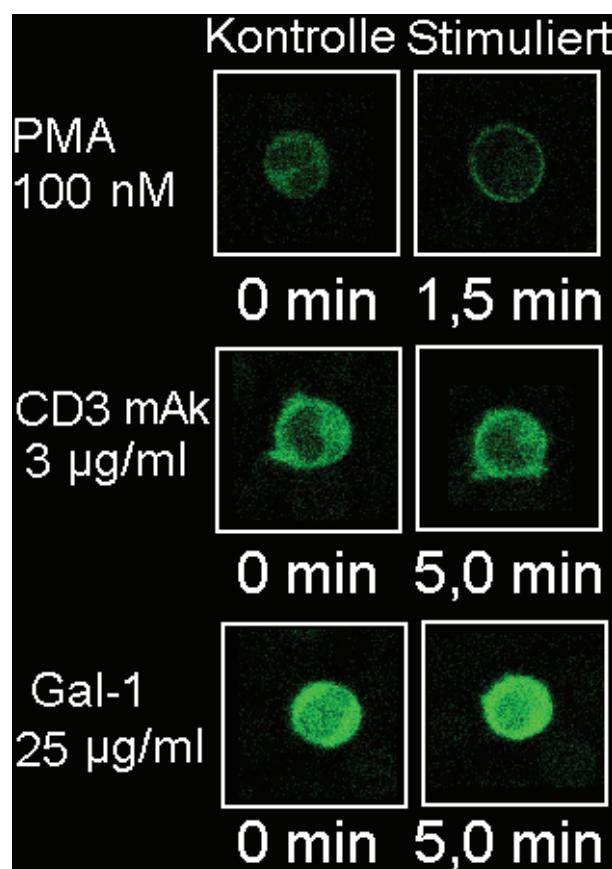
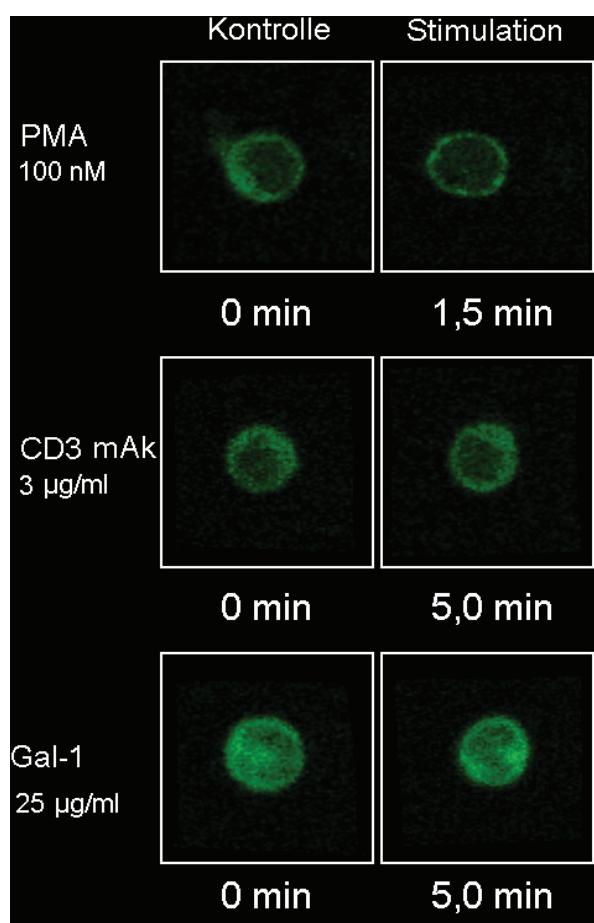


Abbildung 17 Effekte von PMA (100 nM), CD3 $\epsilon$  mAk (3  $\mu$ g/ml) und von Gal-1 (25  $\mu$ g/ml) auf die Umverteilung der cytosolischen Fluoreszenz an die Plasmamembran von PKC $\gamma$ -EGFP exprimierenden Jurkat E6.1 Zellen. Die Zellen ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden mit den Effektoren bei Raumtemperatur inkubiert und die Fluoreszenzumverteilung an die Plasmamembran mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nachgewiesen.

#### 6.6.4 Proteinkinase C $\theta$

Physiologischer Aktivator der Calcium-unabhängigen nPKC-Isoform ist Diacylglycerol, jedoch ist die PKC $\theta$  auch durch den unphysiologischen Effektor PMA aktivierbar. Bei der Inkubation von PKC $\theta$ -EGFP exprimierenden Jurkat E6.1 Zellen mit PMA (100 nM), dem CD3 $\epsilon$  mAk (3  $\mu$ g/ml) und mit Gal-1 (25  $\mu$ g/ml) zeigt sich die schon für die PKC $\gamma$  nachgewiesene Fluoreszenzumverteilung. Nur PMA stimuliert die Translokation des PKC $\theta$ -EGFP-Fusionsproteins an die Plasmamembran (Abbildung 18). Der CD3 mAk und Gal-1 haben keinen Effekt auf die Umverteilung des cytosolisch homogen verteilten Fusionsproteins an die Plasmamembran.



**Abbildung 18** Effekte von PMA (100 nM), von CD3 $\epsilon$  mAk (3  $\mu$ g/ml) und Gal-1 (25  $\mu$ g/ml) auf die Translokation des PKC $\theta$ -EGFP Fusionsproteins an die Plasmamembran von Jurkat E6.1 Zellen. Die Zellen ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden bei Raumtemperatur mit den Effektoren stimuliert und die Fluoreszenzumverteilung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nachgewiesen.

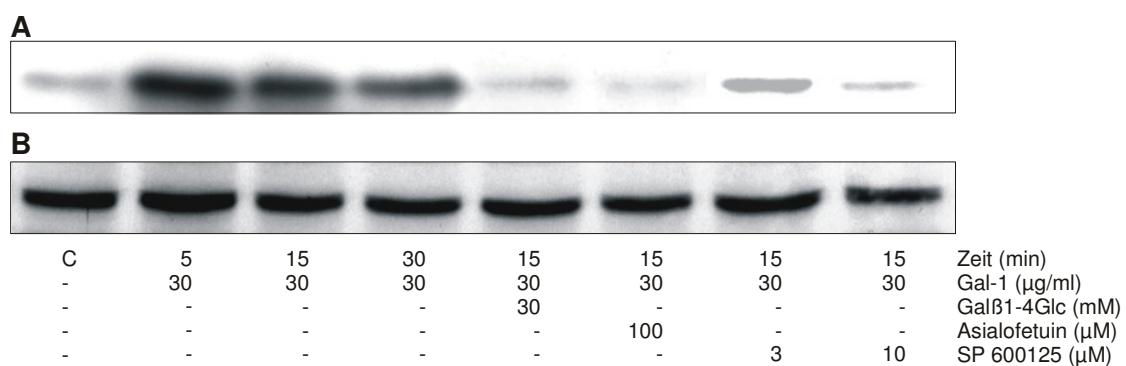
## **6.7 Galectin-1 stimuliert in Jurkat T-Lymphozyten den Transkriptionsfaktor AP-1**

Der Transkriptionsfaktor AP-1, ein Dimer bestehend aus den Mitgliedern der Onkogenfamilie Jun und Fos, wird unter Einbeziehung von Proteinkinasen p36, Grb2 und Sos über den Ras-Weg aktiviert (152). Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) phosphoryliert die N-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun, das mit c-Fos zum AP-1 Komplex heterodimerisiert (153). Die Aktivierung der JNK korreliert mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität von AP-1. Mit einem Immunkomplex-Kinaseassay wurde daher zunächst der Effekt von Gal-1 auf die Aktivität der JNK1 getestet. Reportergenassays unter Verwendung eines Konstruktions mit multiplen Kopien von AP-1-Bindungsstellen und der Nachweis der Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität (EMSA) eines  $^{32}\text{P}$ -markierten Oligonucleotides mit einer AP-1 Konsensussequenz sollten zeigen, in welchem Maße Gal-1 den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert.

### **6.7.1 Gal-1 stimuliert die c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) in Jurkat E6.1 Zellen**

Nach Stimulation der Zellen mit Gal-1 und deren Lyse erfolgte die Immunpräzipitation der JNK1 in jeweils 450 µg Lysatprotein mit einem JNK1 pAk und die Adsorption der Immunkomplexe an Protein G Agarose Beads. Die gewaschenen Beads wurden im Kinaseassay mit dem c-Jun(1-169)-GST Fusionsprotein als Substrat in Gegenwart von [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP für 20 Minuten bei 30 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Termination der Immunkomplex-Kinasereaktion erfolgte durch Zugabe von Laemmli Probenpuffer. Nach SDS-elektrophoretischer Auf trennung der Stimulationsansätze und dem Transfer auf PVDF-Membranen wurden die  $^{32}\text{P}$ -markierten c-Jun(1-169)-GST Banden (41 kDa) autoradiographisch nachgewiesen. In der Abbildung 19, A ist der Effekt von Gal-1 auf die JNK1-katalysierte Substratphosphorylierung dargestellt. Bereits nach einer Stimulationszeit von 5 Minuten mit 30 µg/ml des Lektins ist die Substratphosphorylierung am stärksten und schwächt sich bei verlängerten Inkubationszeiten nur leicht ab. Mit 30 mM Lactose oder 100

$\mu\text{M}$  Asialofetuin im Medium ist die Gal-1 stimulierte Substratphosphorylierung nur noch schwach nachweisbar. Auch die Präinkubation der Zellen in Kulturmedium für 20 Minuten bei 37 °C mit dem c-Jun Kinaseinhibitor Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-on (SP 600125, Tocris) inhibiert die Lektin-stimulierte Substratphosphorylierung. Um zu überprüfen, ob in den Kinaseassays gleiche Enzymmengen eingesetzt wurden, erfolgte die semiquantitative Bestimmung der JNK1 auf den Blots (Auf trennung von 100  $\mu\text{g}$  Lysatprotein) durch Inkubation mit einem JNK1 mAk und einem anti-Maus IgG-HRP Konjugat. Die Darstellung der JNK1-Banden bei 46 kDa erfolgte luminographisch. Wie in der Abbildung 19 B dargestellt ist, sind keine erkennbaren Unterschiede der Bandenintensität zwischen der Kontrolle (C) und den stimulierten Proben erkennbar.

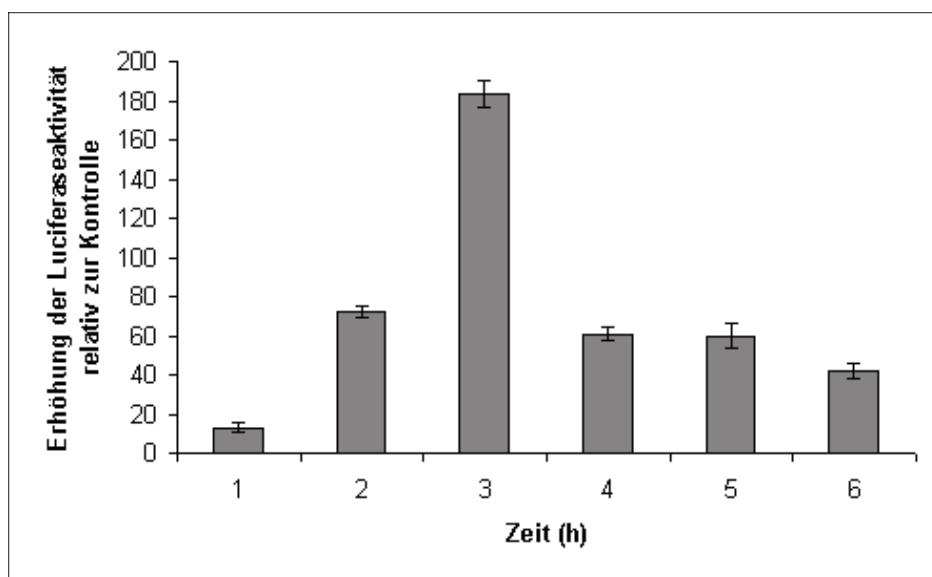


**Abbildung 19 JNK1-Immunkomplex Kinaseassay – Effekt von Gal-1 auf die Aktivität der JNK1.** Jurkat E6.1 Zellen ( $5 \times 10^6$ /1,5 ml RPMI 1640 Medium) wurden bei 37 °C mit 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gal-1 ohne bzw. mit 30 mM Lactose, 100  $\mu\text{M}$  Asialofetuin für die in Abb. 19 angegebenen Zeiten stimuliert. Mit dem c-Jun Kinaseinhibitor SP 600125 wurden die Zellen 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. In jeweils 450  $\mu\text{g}$  Lysatprotein wurde die JNK1 mit einem pAk immunpräzipitiert und an Protein G Agarose adsorbiert. Im JNK1 Immunkomplex Kinaseassay wurden die Beads mit c-Jun(1-169)-GST und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] für 20 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach SDS-elektrophoretischer Auf trennung der Reaktionsansätze und dem Transfer auf PVDF-Membranen erfolgte der Nachweis der phosphorylierten Substratbande bei 41 kDa autoradiographisch (Abb. 19, A) Der Nachweis der JNK1 in 100  $\mu\text{g}$  Lysatprotein auf Blots mit einem JNK1 mAk und einem anti-Maus IgG-HRP Konjugat erfolgte luminographisch mit dem ECL-System (Abb. 19 B).

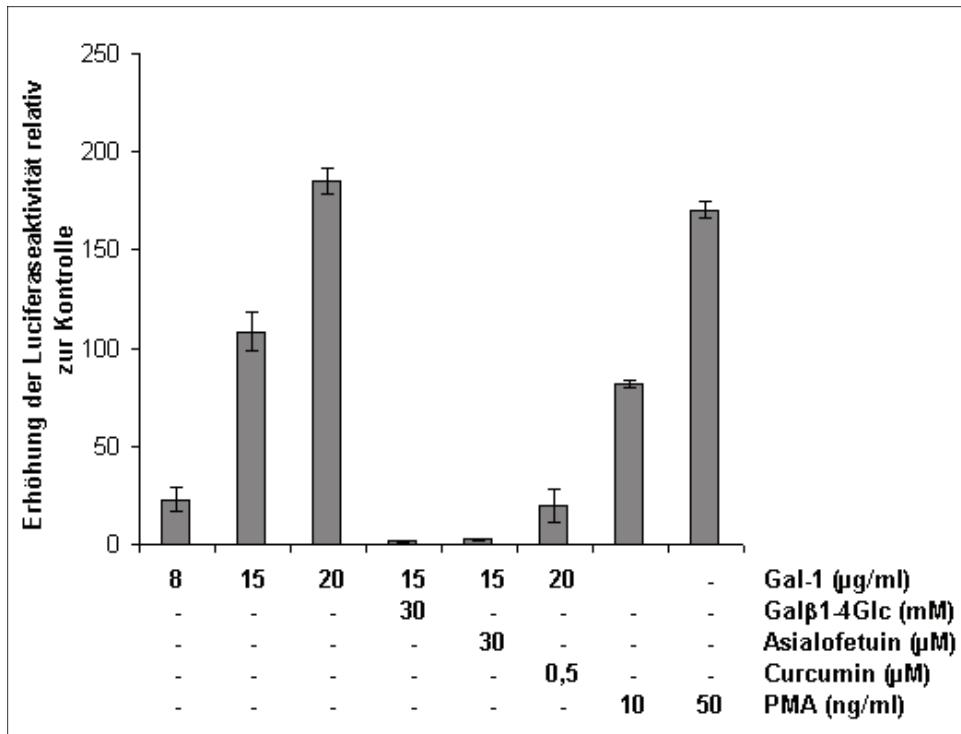
## 6.7.2 Gal-1 stimuliert das Reporterkonstrukt pAP1(PMA)-TA-Luc

Das Konstrukt pAP1(PMA)-TA-Luc verfügt über sechs Tandemkopien des AP-1 Enhancers und ist zum Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors geeignet. Wie in Abbildung 20 gezeigt wird, stimuliert das endogene Lektin in transfizierten Jurkat E6.1 Zellen eine

transiente Expressionskinetik des Reportergenkonstruktes mit einem Maximum der Luciferaseaktivität nach drei Stunden. Die Zunahme der Luciferaseaktivität ist als x-fache Erhöhung bezogen auf die Aktivität der transient mit pAP1(PMA)-TA-Luc transfizierten, jedoch nicht-stimulierten Zellen (Kontrolle) dargestellt. Etwa 10-fach erniedrigte Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle wurde in Zelllysaten von E6.1 Zellen gemessen, die transient mit dem pTAL-Luc Konstrukt (Negativkontrolle) transfiziert wurden. Dieses Konstrukt war in E6.1 Zellen mit PMA und Gal-1 nicht stimulierbar. Die mit dem pAP1(PMA)-TA-Luc Vektor transfizierten Zellen antworten spezifisch auf eine PMA-Stimulation (10 ng/ml, 50 ng/ml) mit einer effizient erhöhten Luciferaseaktivität (Abbildung 21). Die durch Gal-1 stimulierte konzentrationsabhängige Expression des enzymatischen Reporters Luc übersteigt bei 20 µg/ml des Lektins den durch 50 ng/ml PMA stimulierten Wert. Mit 30 mM Lactose oder 30 µM Asialofetuin im Medium wird die Lektin induzierte Stimulation des Reportergenkonstruktes vollständig inhibiert. Auch die Kultivierung der Zellen in supplementiertem Kulturmedium für 15 Stunden mit 0,5 µM Curcumin, einem Inhibitor der AP-1 Aktivierung (**154**), hemmt die Expression des enzymatischen Reporters.



**Abbildung 20 AP-1 Reporterassay - Kinetik der Gal-1 stimulierten Erhöhung der Luciferaseaktivität.** Jurkat E6.1 Zellen wurden transient mit dem pAP1(PMA)-TA-Luc cis-Reportervektor transient transfiziert. Die Zellen ( $5 \times 10^6/4$  ml RPMI 1640 Medium) wurden bei 37°C für die angegebenen Zeiten ohne (Kontrolle) bzw. mit 20 µg/ml Gal-1 inkubiert. Die Luciferaseaktivität ist als x-fache Erhöhung relativ zu den für jeden Zeitpunkt mitgeführten Kontrollen als Mittelwert von drei Bestimmungen mit der Standardabweichung dargestellt.

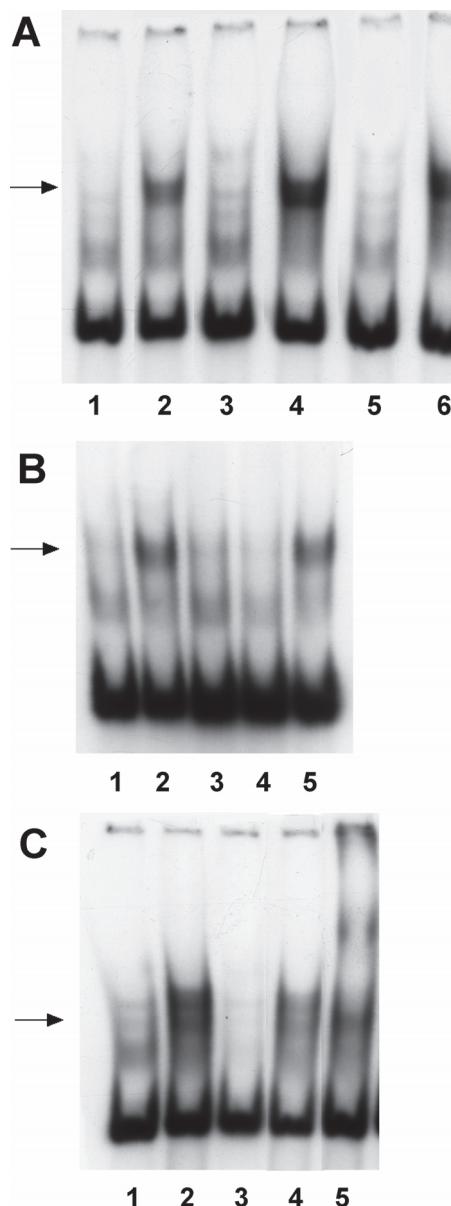


**Abbildung 21 AP-1 Reportergenassay.** Transient mit dem pAP1(PMA)-TA-Luc Konstrukt transfizierte E6.1 Zellen ( $4 \times 10^6$ /4 ml RPMI 1640 Medium) wurden für drei Stunden bei 37 °C mit Gal-1 ohne bzw. mit Asialofetuin, Lactose oder Curcumin im Medium und mit PMA in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Erhöhung der Luciferaseaktivität relativ zu den mitgeführten Kontrollen ist als Mittelwert von drei Bestimmungen mit der Standardabweichung angegeben.

### 6.7.3 Gal-1 stimuliert die Aktivierung von AP-1 in Jurkat T-Lymphozyten

Neben AP-1 Reportergen-Assays sollten Gel-Shift-Assays verdeutlichen, in welchem Maße die Zellstimulation durch das endogene Lektin die Bindung von Kernextrakten an ein  $^{32}$ P-markiertes Oligonucleotid mit einer AP-1 Konsensussequenz ändert, was zur verringerten elektrophoretischen Mobilität des markierten Oligos führt (EMSA). Die EMASAs zeigen, dass die Bindung der Kernextrakte Lektin-stimulierter Kulturen an das Konsensus-Oligo (Abbildung 22 A, Spur 2, 4, 6) im Gegensatz zu den Kernextrakten der Kontrollen (ohne Gal-1, Spur 1, 3, 5) zu einer Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität führt. Die durch Gal-1 induzierten DNA-Protein-Komplexe haben die gleiche elektrophoretische Mobilität und eine vergleichbare Intensität wie die Komplexe, die durch PMA oder einen CD3ε mAk stimuliert wurden. Im Gegensatz zu Gal-1 und PMA erreicht die durch den CD3ε mAk

induzierte DNA-Protein-Komplexbildung in einer Stunde das Maximum und nimmt danach ab (150). Wie in Abbildung 22 B dargestellt, wird die Gal-1 stimulierte DNA-Protein-Komplexbildung durch 30 mM Lactose (Spur 3) und 30 µM Asialofetuin (Spur 4) gehemmt. Cellobiose (30 mM) hat keinen Hemmeffekt auf die Lektin-stimulierte Komplexbildung (Spur 5). Um die Spezifität der Komplexbildung zu prüfen, wurden Kompetitionsexperimente mit einem 100-fachen molaren Überschuss an unmarkiertem AP-1 Konsensus- bzw. mutiertem Oligonucleotid in der Bindungsreaktion durchgeführt. Die Abbildung 22 C zeigt, dass die Bildung <sup>32</sup>P-markierter DNA-Protein-Komplexe durch das unmarkierte Konsensusoligonucleotid gehemmt wird (Spur 3), während das mutierte Oligo nur zu einer leichten Verringerung der Komplexbildung (Spur 4) im Vergleich zur ungehemmten Reaktion führt (Spur 2). Die Präinkubation der Kernextrakte mit einem c-Fos pAk hat eine leicht abgeschwächte DNA-Protein-Komplexbildung (Spur 5) im Vergleich zur Bindungsreaktion ohne Antikörper (Spur 2) zur Folge und generiert zwei schwache hochmolekulare Komplexe.



**Abbildung 22** Nachweis der Gal-1 stimulierten Bindung von AP-1 an ein Konsensusoligonucleotid durch EMSAs. Jurkat E6.1 Zellen ( $1 \times 10^7$ /2 ml RPMI 1640 Medium) wurden bei 37°C kultiviert. A: Die Zellen wurden für 30 min (Spur 1, 2), 1 h (Spur 3, 4) und 3 h (Spur 5, 6) mit 20 µg/ml Gal-1 im Medium (Spur 2, 4, 6) bzw. ohne das Lektin (Spur 1, 3, 5) inkubiert. B: E6.1 Zellen wurden für 1 h kultiviert (Spur 1-5) ohne (Spur 1) und mit 20 µg/ml Gal-1 (Spur 2-5), mit 30 mM Lactose (Spur 3), 30 µM Asialofetuin (Spur 4) sowie 30 mM Cellobiose (Spur 5) im Medium. C: E6.1 Zellen wurden für 1 h in RPMI 1640 Medium (Spur 1) und mit 20 µg/ml Gal-1 im Medium (Spur 2-5) inkubiert. Die Bindungsreaktion der Kernextrakte an das  $^{32}$ P-markierte AP-1 Konsensusoligonucleotid erfolgte ohne Kompetitor (Spur 1, 2) oder mit einem 100-fachen Überschuss an unmarkiertem AP-1 Konsensus- (Spur 3) bzw. mutiertem AP-1 Oligonucleotid (Spur 4). Für die Supershift Assays wurden die Kernextrakte mit 1 µg c-Fos pAk 20 min auf Eis vor der Zugabe des  $^{32}$ P-markierten AP-1 Konsensusoligonucleotids inkubiert (Spur 5).

## 7 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Signalübertragung durch Galectin-1, einem Mitglied der Proteinfamilie der  $\beta$ -Galactosid-bindenden Proteine, bei T-Zellen untersucht. Aufgrund seiner Struktur als ein nichtkovalent verknüpftes Homodimer mit einer Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-erkennenden Domäne (CRD) je Untereinheit kann das endogene bivalente Lektin auf zellulären Glykokonjugaten entsprechend präsentierte komplementäre Glykanstrukturen binden und vernetzen. Dies gelingt besonders dann effizient, wenn das Gal $\beta$ 1-4GlcNAc Epitop mit nichtreduzierender terminaler Galaktose in Form von Repeats bzw. am Ende von O- oder N-verknüpften bi- und triantennären Glykostrukturen vorliegt (155). Obwohl das Protein an Zelloberflächenglykokonjugate von humanen promyeloleukämischen (HL-60), monozytären Leukämiezellen (THP-1) und an K562-Zellen bindet, werden keine frühen Ereignisse der Signalweiterleitung generiert. Im Gegensatz dazu stimuliert das Protein bei der humanen lymphoblastoiden T-Zelllinie Jurkat E6.1 glykoepitopvermittelt effizient die Signalweiterleitung (156). Es war daher zu erwarten, dass Gal-1 an intrazelluläre Signalketten gekoppelte CD-Marker mit Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Sequenzen bindet. Während jedoch mAk mit Spezifität für einen CD-Marker geeignete Werkzeuge sind, um den gekoppelten Signalweg gezielt zu untersuchen, gilt dies aufgrund der Häufigkeit von Lactosylresten auf Glykoproteinen der Plasmamembran für Gal-1 nicht. Durch die Bindung von Gal-1 an mehrere CD-Aktivierungsmarker (78, 76) ist denkbar, dass an CD-Marker gekoppelte miteinander interagierende Signalwege parallel aktiviert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte beantwortet werden, welche frühen Ereignisse durch das Gal-1 in Jurkat E6.1 T-Zellen ausgelöst werden. Dies war auch deshalb von Interesse, um auf der Ebene der Signaltransduktion molekulare Mechanismen zu erkennen, die die immunsuppressive Wirkung des Proteins erklären.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen, dass Gal-1 an Zelloberflächenglykoproteine von Jurkat E6.1 Zellen mit Relevanz für die Signalweiterleitung bindet. Auf Westernblots von CD2 und CD3-Immunpräzipitaten konnten die T-Zell Marker CD2 und CD3 als Bindungsstellen für biotinyliertes Gal-1 nachgewiesen werden (78). Die Bindung des Lektins an CD2 und CD3 konnte mit Asialofetuin, ein Glykoprotein, das drei triantennäre N-verknüpfte Oligosaccharide mit terminalen Gal $\beta$ 1-4GlcNAc Sequenzen und eine biantennäre

Kette mit terminalem N-Acetyllactosamin trägt (**157**, **158**), inhibiert werden. Die Hemmversuche zeigen, dass CD2 und CD3 komplementäre Glykoepitope für die Bindung des endogenen Lektins tragen. Auch die Analyse der Gal-1 Agarose gebundenen Zelllysatfraktion auf Blots mit einem biotinylierten CD2 mAk zeigte CD2 als das hauptsächlich gebundene Protein. Bei Fura 2 beladenen Jurkat E6.1 Zellen stimuliert Gal-1 einen langandauernden Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , der in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium zunächst einen transienten und nach Supplementierung des Mediums mit  $CaCl_2$  einen langanhaltenden Verlauf zeigte. Dieser biphasische Verlauf der Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ist auch für die T-Zell Stimulation mit CD2 und CD3 mAk charakteristisch. Im Gegensatz zu Gal-1 stimuliert monovalentes Gal-3, bei deutlich geringerer Signalstärke, nur den Calciumeinstrom (**159**). Disaccharide mit nichtreduzierender terminaler  $\beta$ -Galaktose wie Lactose ( $Gal\beta 1\text{-}4Glc$ ), N-Acetyllactosamin ( $Gal\beta 1\text{-}4GlcNAc$ ), Lactulose ( $Gal\beta 1\text{-}4Fru$ ) und  $Gal\beta 1\text{-}4Man$  hemmen bei einer Konzentration von 8 mM die Galectin-1 stimulierte zelluläre Calciumantwort nahezu vollständig. Asialofetuin zeigt schon bei einer Konzentration von 15  $\mu M$  einen vergleichbaren Hemmeffekt, was darauf hinweist, dass terminal auf antennären Glykostrukturen präsentierte Lactosyl-Epitope bevorzugte Bindungsstrukturen für das endogene Lektin sind. Cellobiose ( $Glc\beta 1\text{-}4Glc$ ), die außer der äquatorial angeordneten 4-OH Gruppe der nichtreduzierenden Glucose mit Lactose identisch ist, und Melibiose ( $Gal\alpha 1\text{-}6Glc$ ) sind inhibitorisch inaktiv (**156**). Für die Lektin-stimulierte Erhöhung der intracytoplasmatischen Calciumkonzentration ist die Expression von CD3 und der Transmembran-Proteintyrosinphosphatase (PTPase) CD45 erforderlich. Bei  $CD3^-$  (J31-13) und  $CD45^-$  (J45.01) Jurkat T-Zellen zeigt Gal-1 keine Calcium-mobilisierenden Effekte. Die T-Zell Aktivierung über CD2 stimuliert die Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  (**160**), über den Phosphoinositolweg generierter second Messenger (**161**), die Öffnung Spannungs-unabhängiger Calciumkanäle (**162**) sowie die Tyrosinphosphorylierung der  $CD3\zeta$ -Kette (**163**). Die gleichen Ereignisse in der Signalweiterleitung werden auch über den TCR/CD3-Komplex ausgelöst. Für die T-Zell Aktivierung über CD2 ist die  $CD3\zeta$ -Kette erforderlich (**164**). Obwohl die cytoplasmatische Domäne von CD2 keine Tyrosinkinaseaktivität hat und über keine Tyrosinreste verfügt, die nach Phosphorylierung als SH2-Bindungsstellen fungieren, induziert die Stimulation über CD2 die Tyrosinphosphorylierung einer Reihe intrazellulärer Proteine. Die Signalweiterleitung erfolgt über die Kopplung von SH3-Domänen der Proteintyrosinkinasen der Src-Familie an

cytoplasmatische prolinreiche Sequenzen von CD2 (165). Das Ausbleiben des Calciumsignals in CD3-defizienten J31-13 Zellen nach Stimulation mit Gal-1 dokumentiert zwar die Notwendigkeit der Expression von CD3, liefert jedoch keine Aussagen, in welchem Maße die Signalweiterleitung über CD2 in die Calciummobilisation integriert ist. Für TCR-vermittelte proximale Signalereignisse ist die Funktion der Rezeptor-PTPase CD45 kontinuierlich notwendig (166) und hat im Rahmen der T-Zell Aktivierung eine duale Funktion als ein Aktivator der Src-Kinasen durch Dephosphorylierung und als ein Terminator der Lymphozytenfunktion durch Dephosphorylierung der CD3 $\zeta$ -Kette (167, 168). An CD45-defizienten T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine antigene bzw. CD3 mAk Stimulation keine Protein-Tyrosinphosphorylierung, keine PIP<sub>2</sub>-Hydrolyse und Proliferation, jedoch eine stark erniedrigte Calciummobilisation induziert (169, 170, 171). Die Behandlung der CD45<sup>-</sup> J45.01 Zellen mit Gal-1 führt zu keiner Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Gal-1, CD2 mAk und CD3 mAk-stimulierten Calciumantwort bestehen, wurden die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin und Herbimycin A sowie Choleratoxin (CTX) in die Untersuchungen einbezogen. Während die Vorbehandlung der Jurkat E6.1 Zellen mit Staurosporin die durch die drei eingesetzten Agonisten stimulierte Calciummobilisation vollständig inhibiert, gelingt dies auch mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A nach CD2 mAk und CD3 mAk Stimulation. Die Präinkubation von Jurkat E6.1 Zellen mit Herbimycin A reduziert die Gal-1 stimulierte Calciumantwort nur auf ein Drittel. Diese Differenzen in der Hemmbarkeit der durch mAk (CD2, CD3) bzw. Gal-1 stimulierten zellulären Calciumantwort wurden auch für CTX gezeigt. Im Gegensatz zur völligen Hemmung der mAk-stimulierten Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch CTX wird die Lektin-induzierte zelluläre Calciumantwort durch das Toxin auf ca. 50 % reduziert. Die partielle Hemmung der Lektin-stimulierten Calciummobilisation durch Herbimycin A und Choleratoxin weist darauf hin, dass tyrosinphosphorylierte Kompetenzmotive von CD3 $\zeta$  und die GTP-Bindung an diese CD3-Untereinheit in die Kopplung an intrazelluläre Signalwege integriert sind (172). CTX modifiziert enzymatisch CD3 $\zeta$ , hemmt damit deren GTP-Bindung und koppelt den Rezeptor von weiteren Signalschritten ab (129). Anhand der partiellen Hemmbarkeit der Lektin-stimulierten zellulären Calciumantwort durch CTX-Vorbehandlung der Zellen kann geschlussfolgert werden, dass außer CD2 und CD3 weitere Glykokonjugate und deren Ligation mit Gal-1 involviert sind. Als eine Gal-1 Bindungsstelle mit Signalfunktion wurde

das Gangliosid  $G_{M1}$  identifiziert (173), wobei für die durch Ligation von  $G_{M1}$  stimulierte Calciummobilisation kein intakter TCR/CD3-Komplex erforderlich ist (174). Da Gal-1 in CD2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> J31-13 Zellen kein Calciumsignal stimuliert, kann eine Signalweiterleitung über  $G_{M1}$  ausgeschlossen werden (78). Organische Calciumkanal-Blocker, mit bekannter Spezifität für spannungsabhängige Calciumkanäle, haben keinen Effekt auf die Höhe der Gal-1 stimulierten Calciummobilisation (156), und auch die Depolarisation der Zellen mit einer hohen Kaliumionenkonzentration im Puffer, einer Standardmethode zur Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle, zeigte keine Wirkung auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Depolarisation der Zellen mit Gramicidin bzw. mit einer hohen K<sup>+</sup>-Ionenkonzentration im Puffer hatte keinen Effekt auf die Lektin-vermittelte Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, blockierte jedoch den Calciumeinstrom aus dem Medium. Dieser Befund weist darauf hin, dass bei T-Zellen die Aufrechterhaltung des Membranpotentials für die Calciumeinstromphase erforderlich ist. Gal-1 zeigt bei Jurkat T-Lymphozyten mit CD2 bzw. CD3 mAk vergleichbare Ereignisse der Signalweiterleitung und stimuliert die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ -1 sowie die Hydrolyse von membranassoziiertem PIP<sub>2</sub>. Die Lektin-induzierte transiente InsP<sub>3</sub>-Produktion mit einem Maximum von  $22 \pm 2$  pM nach drei Minuten, entsprechend einem 7,1-fachen Anstieg gegenüber der basalen Konzentration, verläuft zeitlich parallel zur transienten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus internen Speichern. Bei nichtterregbaren Zellen, zu denen auch T-Zellen zählen, hat InsP<sub>3</sub> nicht nur Bedeutung für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, sondern ist auch in den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom integriert. InsP<sub>3</sub>-Rezeptoren sind auch auf Plasmamembranen von Lymphozyten nachgewiesen worden und können unter bestimmten Bedingungen Ca<sup>2+</sup>-Bewegungen durch die Plasmamembran vermitteln. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass der Calciumeinstrom durch die Plasmamembran mit der InsP<sub>3</sub>-stimulierten Depletion interner Calciumspeicher gekoppelt ist.

Die Hypothese des kapazitiven Calciumeinstroms stützt sich auf Befunde, dass Inhibitoren der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Thapsigargin) InsP<sub>3</sub>-unabhängig die Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Pools und den Calciumeinstrom stimulieren (124). Dabei soll die Entleerung der Calciumspeicher zur Synthese des bisher nicht näher identifizierten Messengers CIF führen, der den Calciumeinstrom durch die Plasmamembran vermittelt.

Diskutiert wird auch, dass die Regulation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen der Plasmamembran durch den Füllungszustand der Calciumspeicher im ER über  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren erfolgt. Indem  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren über Calciumbindungsstellen innerhalb der luminalen Domäne den Abfall der Calciumkonzentration im ER registrieren, führt die Signalübertragung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Plasmamembran über eine so genannte konformative Kopplung (175).

Der Gal-1 stimulierte biphasische Verlauf der Calciummobilisation hat unterschiedliche Effekte auf Calcium/Calmodulin-regulierte Enzyme. Dabei korreliert ein langandauernder  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit der Aktivierung von NFAT. Es konnte gezeigt werden, dass Jurkat T-Zell-Mutanten mit mangelnder NFAT-abhängiger Genexpression einen Defekt im kapazitiven Calciumeinstrom haben (176). In mit dem Reportergenkonstrukt pNFAT-TA-Luc transient transfizierten Jurkat T-Lymphozyten stimuliert Gal-1 effizient die Expression des enzymatischen Reporters Luc (150). Die nahezu völlige Hemmbarkeit der Lektin-induzierten Stimulation des Reportergenkonstruktes mit den Immunsuppressiva FK506 und Cyclosporin A zeigt, dass der Signalweg  $\text{Ca}^{2+}$  - Calcineurin - NFAT aktiviert wird. Beide Inhibitoren hemmen Immunophyllin-vermittelt die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierte Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin (177). Der phosphorylierte Transkriptionsfaktor NFAT ist ein Calcineurinsubstrat und wird nach seiner Dephosphorylierung in den Kern transloziert. Andererseits werden in Verbindung mit der Depletion intrazellulärer Calciumspeicher im ER lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierte Enzyme gehemmt (143, 178). Die im Rahmen der Arbeit vorgelegten Ergebnisse zum Effekt von Gal-1 auf das im ER lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-regulierte Enzymsystem für die Synthese von PtdSer zeigen, dass die Synthesehemmung durch das endogene Lektin stärker ist als die durch Costimulation mit zwei CD2 mAk bzw. CD3 mAk Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen induzierten Hemmungen. In den CD45<sup>-</sup> und CD3<sup>-</sup> T-Zell Klonen J45.01 bzw. J31-13 war nach Stimulation mit einem CD3 mAk keine PtdSer-Synthese hemmung nachweisbar, während beide defektiven Zelllinien im Vergleich zu Jurkat E6.1 Zellen nach Stimulation mit Gal-1 deutlich geringere Synthese hemmungen zeigten (149). Auch hier wird die durch das endogene Lektin induzierte Synthese hemmung des Phospholipids durch Lactose stark abgeschwächt. Der Calmodulin-Antagonist Trifluoperazin und besonders Xestospongin C, ein potenter membranpermeabler Blocker des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors (179), inhibieren die Gal-1 vermittelte zelluläre PtdSer-Synthese hemmung. Diese Daten zeigen, dass das endogene Lektin Glykoepitop-vermittelt parallel

$\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige T-Zell Aktivierungswege stimuliert, die beiden Phasen der Calciummobilisation zugeordnet werden können. Während die Lektin-stimulierte langandauernde Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT führt (150), wird durch die Depletion intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher die PtdSer-Synthese in T-Zellen gehemmt (149). Welche Bedeutung die Synthesehemmung dieses auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierten Phospholipids im Rahmen der T-Zell Aktivierung hat, ist bisher nicht gezeigt worden. Es ist jedoch denkbar, dass durch die Synthesehemmung die Asymmetrie der Plasmamembran geändert und dadurch deren Fluidität erhöht wird. Dies könnte die in der frühen Phase der T-Zell Aktivierung erfolgende Clusterung von Rezeptoren und Integrinen stabilisieren, dynamische Prozesse, die zur Bildung der immunologischen Synapse und von Lipid Rafts erforderlich sind (180, 116). Gal-1 stimuliert bei T-Zellen eine Umverteilung von CD-Markern innerhalb der Plasmamembran, die an intrazelluläre Signalketten gekoppelte sind, z.B. die Colokalisation von CD3 und CD45 in abgegrenzten Membran Microdomänen (128). Das Lektin bindet an die Rezeptor-PTPase CD45 bei T (77) und B-Zellen (181) und hemmt durch die Bindung von N-Acetyllactosamin-Resten auf der hochglykosylierten extrazellulären Domäne die intrinsische PTPase-Aktivität. Die lektinduzierte Dimerisierung von CD45 kann das katalytische Zentrum blockieren, wodurch die Verfügbarkeit für Substrate und damit TCR-Funktionen inhibiert werden (182). Galectin-1 hat aufgrund seiner Bivalenz die Fähigkeit dazu. Da die tyrosinphosphorylierte CD3 $\zeta$ -Kette ein Substrat für die Tyrosinphosphatase ist, kann Gal-1 durch Hemmung der PTPase-Aktivität über den CD3-Komplex induzierte Aktivierungssignale modulieren, die zur Apoptose führen (77, 82). Für eine Schlüsselrolle von CD45 bei der Induktion modulierender T-Zell Aktivierungssignale spricht auch, dass Gal-1 eine schnelle Phosphorylierung von pp21 $\zeta$ , nicht jedoch von pp23 $\zeta$ , die eine längere Zeitspanne benötigt, stimuliert (132). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD3 und CD45 für die Gal-1 stimulierte Expression von PtdSer auf der Plasmamembran erforderlich ist (77). Dies stimmt mit Untersuchungen überein, die zeigen, dass eine Costimulation von T-Zellen mit immobilisierten CD45 mAk und CD3 mAk Apoptose induziert (131). In welchem Zusammenhang dabei die durch das endogene Lektin stimulierte PtdSer-Synthesehemmung zur Translokation des Phospholipids in der frühen Phase der Apoptose auf die Außenseite der Plasmamembran steht, ist bisher unbeantwortet.

Obwohl Gal-1 bei Jurkat E6.1 Zellen die Calciummobilisation und den transienten Anstieg von InsP<sub>3</sub> stimuliert, konnte eine Translokation der cPKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und der PKC $\theta$  an die Plasmamembran nicht nachgewiesen werden. Bei den in dieser Zelllinie für die jeweilige PKC-Isoform cytosolisch exprimierten PKC-EGFP-Fusionsproteinen erfolgte nach Zellstimulation mit PMA eine schnelle Umverteilung an die Plasmamembran. Dies konnte auch nach der Stimulation von E6.1 Zellen mit einem CD3 mAk für PKC $\alpha$ -EGFP und PKC $\beta$ -EGFP gezeigt werden. Möglicherweise ist die Signalweiterleitung über partiell tyrosinphosphoryliertes CD3 $\zeta$  (132) für eine Translokation der PKC-Isoformen an die Plasmamembran unzureichend. Die Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (154, 150). AP-1 wird über den Ras-Weg aktiviert und erfordert Tyrosinkinasen sowie p36, Grb2 und SOS. Gal-1 wurde als ein Ras-bindendes Protein identifiziert (183). Die Überexpression von Gal-1 erhöht Membran-assoziiertes Ras, Ras-GTP, aktiviert extrazellulär regulierte Kinasen (ERKs) und führt zur Zelltransformation, die jedoch durch dominant negatives Ras hemmbar ist. Durch Gal-1 antisense RNA wird die Zelltransformation durch H-Ras(12V) und die Membranverankerung des Fusionsproteins GFP-H-Ras(12V) inhibiert. Im Vergleich zu Ras-Transfektionen führen H-Ras/Gal-1 oder K-Ras4B/Gal-1 Cotransfektionen zu einer verlängerten EGF-stimulierten Erhöhung von Ras-GTP, der Raf-1 Aktivität und zu aktivierte ERKs (184). In diesen Signalweg, der zur Aktivierung von AP-1 führt, ist die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) als ein Mitglied der MAP-Kinasen integriert. JNK phosphoryliert die N-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun (Ser63, Ser73), das mit c-Fos zum AP-1 Komplex heterodimerisiert (153). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von Jurkat T-Lymphozyten mit dem endogenen Lektin die JNK1 stimuliert. Im JNK1-Immunkomplex Kinaseassay zeigt die Phosphorylierungskinetik des Substrates c-Jun(1-169)-GST einen leicht transienten Verlauf mit einem Maximum bereits nach fünf Minuten. Die stimulierenden Effekte des Lektins sind mit Lactose, Asialofetuin und mit dem JNK-Inhibitor Anthrapyrazolon (SP 600125, 144) auf das Niveau der Kontrollen inhibierbar.

In transient mit dem Konstrukt pAP-1(PMA)-TA-Luc transfizierten Jurkat E6.1 Zellen stimuliert Gal-1 konzentrationsabhängig die Expression des enzymatischen Reporters. Die Zellstimulation mit dem endogenen Lektin führt zur Bindung von AP-1 an ein <sup>32</sup>P-markiertes AP-1 Konsensusoligonucleotid. Auch hier sind die stimulierenden Effekte des endogenen

Lektins auf das Reportergenkonstrukt bzw. auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 durch Lactose und Asialofetuin inhibierbar, während Cellobiose keine inhibierende Wirkung auf die Bindung von AP-1 an das <sup>32</sup>P-markierte Oligonucleotid zeigt. Curcumin, ein Inhibitor der AP-1 Aktivierung, hemmt die Gal-1 stimulierte Expression des enzymatischen Reporters Luc. Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Umwandlung extrazellulärer Signale in Änderungen der Expression spezifischer Gene und regulieren damit komplexe biologische Prozesse (152). Bei der Transkription der Gene für IL-2 und den IL-2-Rezeptor wirken NFAT und AP-1 synergistisch, indem AP-1 die Bindung von NFAT an das Antigenrezeptor Responselement (ARRE-2) des IL-2 Promoters begünstigt und die Halbwertszeit der Dissoziation um eine Größenordnung verlängert (176). Obwohl das endogene Lektin die Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1 aktiviert, führt dies nicht zur Expression der IL-2 Gene und zur Expression hochaffiner Rezeptoren für den autokrinen T-Zell Wachstumsfaktor IL-2. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise, dass Bcl-2 Ziel von Gal-1 stimulierten Signalwegen ist (154). Dabei zeigte sich, dass die Gal-1 stimulierte Aktivierung von AP-1 mit einer Suppression von anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 verbunden ist.

Aufgrund der Fähigkeit des endogenen Lektins, bei Thymozyten und aktivierte T-Zellen Apoptose zu induzieren, ist denkbar, dass es depletierend gegenüber alloreaktiven T-Zellen bei der Regulation der Immunantwort, z.B. in immunprivilegierten Organen, eingebunden ist. Die Expression des Proteins auf Syncytiotrophoblasten und Trophoblasten der humanen Plazenta (99) und seine Fähigkeit, die Mitogen (PHA)- und Alloantigen (MLC)-stimulierte Proliferation von humanen peripheren Lymphozyten zu inhibieren (100), weisen darauf hin, dass das Lektin in immunregulatorische Prozesse involviert ist, die zur Akzeptanz des fetalen Semiallografts mit beitragen.

## 8 Zusammenfassung

Galectin-1 (Gal-1), ein Mitglied der Familie der endogenen  $\beta$ -Galactosid-bindenden Proteine mit immunsuppressiver Wirkung, erkennt auf den T-Zell Aktivierungsmarkern CD2 und CD3 Glykoepitope. Die Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten mit dem Protein führt zur Tyrosin-Phosphorylierung der Phospholipase C $\gamma$ -1 und generiert einen transienten Anstieg von Inositol-1, 4, 5-trisphosphat.

Gal-1 stimuliert bei Jurkat T-Lymphozyten Glykoepitop-vermittelt einen biphasischen Verlauf der Calciummobilisation, bestehend aus dem transienten Anstieg durch Entleerung intrazellulärer Speicher und der langandauernden Erhöhung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Medium. Asialofetuin, das tri- und biantennären Glykanstrukturen mit terminalen Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Sequenzen hat, erweist sich dabei als ein sehr potenter Inhibitor der Lektin-stimulierten Calciummobilisation. In CD3 $^-$  und CD45 $^-$  Jurkat T-Zell Klonen sind keine Effekte des endogenen Lektins auf die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nachweisbar. Der Tyrosinkinase Inhibitor Herbimycin A und Choleratoxin hemmen die Gal-1 stimulierte Calciummobilisation in Jurkat T-Lymphozyten partiell, der Kinase Inhibitor Staurosporin vollständig. Die Depolarisation der Jurkat E6.1 Zellen mit dem Transportonophor Gramicidin bzw. mit einer hohen  $\text{K}^+$ -Ionenkonzentration im Puffer zeigte die Notwendigkeit der Membranpolarisation für den Calciumeinstrom.

Die Galectin-1 stimulierte Depletion intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher hemmt die im ER lokalisierte Synthese von PtdSer. Die Synthesehemmung wird durch den Calmodulinantagonisten Trifluoperazin, jedoch effizienter durch den InsP<sub>3</sub>-Rezeptor Blocker Xestospongin C inhibiert.

Nach Expression der cPKC-EGFP Fusionsproteine für die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sowie für die PKC $\theta$  in Jurkat T-Lymphozyten konnte die schnelle Translokation aller Fusionsproteine nach PMA-Stimulation bzw. für die cPKC $\alpha$  und cPKC $\beta$  nach CD3 mAk-Stimulation an die Plasmamembran gezeigt werden. Nach Stimulation PKC-EGFP exprimierender Jurkat E6.1 Zellen mit Gal-1 war keine Umverteilung der Fusionsproteine nachweisbar.

Die Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten mit Galektin-1 führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Mit einem Immunkomplex Kinaseassay wurde gezeigt, dass die Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit dem endogenen Lektin zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase 1 (JNK1) führt. Dabei zeigt die Phosphorylierungskinetik des Fusionsproteins c-Jun(1-169)-GST einen nur leicht transienten Verlauf mit einem Maximum

bereits nach fünf Minuten. Die Gal-1 induzierte Substratphosphorylierung ist mit Lactose, Asialofetuin und mit dem JNK-Inhibitor Anthrapyrazolon SP600125 effizient inhibierbar. Gal-1 stimuliert in transient mit dem Konstrukt pAP1(PMA)-TA-Luc transfizierten Jurkat T-Lymphozyten konzentrationsabhängig die Expression des enzymatischen Reportes Luc. Dabei zeigt die Luc-Expression einen transienten Verlauf mit einem Maximum bei drei Stunden. Die Stimulation des Reporteren Konstruktes durch Gal-1 ist mit Curcumin, einem Inhibitor der AP-1 Aktivierung, hemmbar. Das endogene Lektin stimuliert Glykoepitop-vermittelt die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an ein  $^{32}\text{P}$ -markiertes Konsensus Oligonucleotid. In den EMSAs wird die Bindung von AP-1 an das  $^{32}\text{P}$ -markierte Oligonucleotid durch einen hundertfachen Überschuss des unmarkierten Konsensus Oligos nahezu völlig inhibiert, während das mutierte Oligonucleotid nur eine geringe Hemmung zeigt. c-Fos und c-Jun mAk in der Bindungsreaktion führen in den EMSAs zu Supershifts, was auf deren Anwesenheit im Komplex schließen lässt.

## 9 Literaturverzeichnis

1. K. Fiedler and K. Simons (1995) The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell*, **81**, 309-312
2. J.-P. Zanetta, A. Badache, S. Maschie P. Marschal S. Kuchler (1994) Carbohydrates and soluble lectins in the regulation of cell adhesion and proliferation. *Histol. Histopathol.*, **9**, 385-412
3. R.P. Dennis (1995) A review of the biological significance of carbohydrates on glycoproteins and methods for their analysis. A. Alavi, J S Axford, *Glycoimmunology* Plenum, New York, 1-10
4. K.L Moore, A. Varki, R.P. McEver (1991) GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: Evidence of a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.*, **112**, 490-499
5. R.D. Cummings, D.F. Smith (1992) The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *Bioassays*, **14**, 849-856
6. T.N. Maydas, R.C Johnson, H. Rayburn, R.O. Hynes, D.D. Wagner (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*, **74**, 541-554
7. M.L. Tanzer, S. Chandrasekaran, J.W. III Dean, M.S. Giniger (1993) Role of laminin carbohydrates on cellular interactions. *Kidney Int.*, **43**, 66-72
8. P. Stanley, E. Ioffe (1995) Glycosyltransferase mutants: key to new insights in glycobiology. *FASEB J.*, **9**, 1436-1444
9. T.J. Hahn, C.F Goochee (1992) Growth-associated glycosylation of transferring secreted by HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23982-23987
10. T.W. Kuijpers (1993) Terminal glycosyltransferase activity: a selective role in cell adhesion. *Blood*, **81**, 873-882
11. J. Koscielak (1995) Diseases of aberrant glycosylation. *Acta Biochim. Polonica*, **42**, 1-10
12. A. Etzioni (1996) Adhesion molecules – their role in health and disease. *Pediatr. Res.*, **39**, 191-198
13. J.H. Charuk, J. Tan, M. Bernardini, S. Haddad, R.A. Reitmehmeier, J. Jaeken, H. Schachter (1995) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II. An autosomal recessive N-acetylglucosaminyltransferase II deficiency different from typical hereditary erythroblastic multinuclearity, with a positive acidified-serum lysis test (HEMPAS). *Eur. J. Biochem*, **230**, 797-805
14. S.-I. Hakomori (1985) Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipid: overview and perspectives. *Cancer Res.*, **45** 2405-2414
15. O. Saitoh, W.-C. Wang, R. Lotan, M. Fukuda (1992) Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol Chem*, **267**, 5700-5711

16. J.W. Dennis (1991) N-linked oligosaccharide processing and tumor cell biology. *Sem. Cancer Biol.*, **2**, 411-420
17. S.H. Barondes (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biol. Sci.*, **13** 480-482
18. K. Drickamer (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9557-9560
19. S.H. Barondes, D.N.W. Cooper, M.A. Gitt, and H. Leffler (1994) Galectins, structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20807-20810
20. U. Kishore, P. Eggleton and K.B.M. Reid (1997) Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *Matrix Biol.*, **15**, 583-892
21. H.J. Gabius (1997) Animal Lectins. *Eur. J. Biochem.*, **243**, 543-576
22. H. Gewurz, X.-H. Zang, T.F. Lint (1995) Structure and function of the pentraxins. *Curr. Opin. Immunol.*, **7** 54-64
23. U. Holmskov, R. Malhotra, R.B. Sim and J.C. Jensenius (1994) Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today*, **15**, 67-73
24. S.V. Petersen, S. Thiel, J.C. Jensenius (2001) The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunol.*, **38** 133-149
25. J.Y. Wang, U. Kishore, B.L. Lim, P. Strong and K.B.M. Ried (1996) Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clin. Exp. Immunol.*, **106**, 183-186
26. K. Drickamer (1992) Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature*, **360**, 183-186
27. D.H. van den Eijnden and D.Z. Joziasse (1995) Animal lectins: Carbohydrate-recognizing molecules with important biological functions. *Carbohydrates in Europe*, 5-13
28. K. von Figura (1990) Mannose-6-phosphat-Rezeptoren: Ihre Rolle beim Transport lysosomaler Proteine. *Naturwissenschaften*, **77**, 116-122
29. D.A. Lazzarino and C.A. Gabel (1989) Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **264**, 5015-5023
30. C. Polychronakos, H.J. Guyda, U. Janthly and B.I. Posner (1990) Effects of mannose-6-phosphate on receptor-mediated endocytosis of insulin-like growth factor II. *Endocrinology*, **127**, 1861-1866
31. A. Hille-Rehfeld (1995) Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 177-194
32. R.W. Tsien and R.Y. Tsien (1990) Calcium channels, stores and oscillations. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **6**, 715-760
33. L.D. Powell and A. Varki (1995) I-type lectins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14243-14246

34. R.J. Schulte, M.-A. Campbell, W.G. Fischer and B.M. Sefton (1992) Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. *Science*, **258**, 1001-1004
35. D.T. Fearon (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1971-1975
36. T. Angata and A. Varki (2000) Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology*, **10**, 431-438
37. P.R. Crocker, M. Vinson, S. Kelm and K. Drickamer (1999) Molecular analysis of sialoside binding to sialoadhesin by NMR and site-directed mutagenesis. *Biochem. J.*, **341**, 355-361
38. N. Sawada, H. Ishida, B.E. Collins, R.L. Schnaar and M. Kiso (1999) Ganglioside GD1 $\alpha$  analogues as high-affinity ligands for myelin-associated glycoproteins. *Carbohydr. Res.*, **316**, 1-8
39. N. Razi and A. Varki (1999) Cryptic sialic acid binding lectins in blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment of cellular activation. *Glycobiology*, **9**, 1225-1234
40. L. Nitschke, R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler and M.C. Lamers (1997) CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr. Biol.*, **7**, 133-141
41. S.F. Greer and L.B. Justement (1999) CD45 regulates phosphorylation of CD22 and its association with the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Immunol.*, **162**, 5286-5287
42. K.G. Smith, D.M. Tarlinton, G.M. Doody, M.L. Hibbs and D.T. Fearon (1998) Inhibititon of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J. Exp. Med.*, **187**, 807-811
43. G.M. Doody, L.B. Justement, C.C. Delibrias, R.J. Matthews, J. Lin, M.L. Thomas and D.T. Fearon (1995) A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science*, **269**, 242-244
44. N.K. Tonks and B.G. Neel (1996) From form to function: signalling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*, **87**, 365-368
45. K.I. Kasai and J. Hirabayashi (1996) Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.*, **119**, 1-8
46. U. Kishore, P. Eggleton and K.B.M. Reid (1997) Modular organization of carbohydrate recogniton domains in animal lectins. *Matrix Biol.*, **15**, 583-592
47. J. Hirabayashi (1993) A general comparison of two major families of animal lectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **5**, 251-270
48. A.M. Gitt, M.F. Wiser, H. Leffler, J. Herrmann, Y.R. Xia, S.M. Massa, D.N.W. Cooper, A.J. Lusis and S.H. Barondes (1995) Sequence and mapping of galectin-5, a  $\beta$ -galactoside-binding lectin found in rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5032-5038
49. T. Magnaldo, T. Bernerd and M. Darmon (1995) Galectin-7, a human 14 kDa S-lectin specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. *Dev. Biol.*, **168**, 259-271

50. S. Jia and J.L. Wang (1988) Carbohydrate protein 35: Complementary DNA sequences reveals homology with proteins of the heterogenous nuclear RNP. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6008-60011
51. Y.R. Hadary, K. Paz, R. Dekel, T. Mestrovic, D. Acilli and Y. Zick (1995) Galectin-8, a new rat lectin, related to galectin-4. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3447-3454
52. Y. Arata, J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1997) The two lectin domains of the tandem-repeat 32-kDa galectin of the nematode *Caenorhabditis elegans* have different binding properties. Studies with recombinant protein. *J. Biochem.*, **121**, 1002-1009
53. Y. Arata, J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (2001) Sugar binding properties of the two lectin domains of the tandem-repeat-type galectin LEC-1 (N32) of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3068-3077
54. J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1991) Effect of amino acid substitution by site-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa  $\beta$ -galactoside-binding lectin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23648-23653
55. J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1994) Further evidence by site-directed mutagenesis that the conserved hydrophilic residues form a carbohydrate-binding site of human galectin-1. *Glycoconjugate J.*, **11**, 437-442
56. J. Hirabayashi, H. Kawasaki, K. Suzuki and K. Kasai (1987) Complete amino acid sequence of 14 kDa  $\beta$ -galactoside-binding lectin of chick embryo. *J. Biochem.*, **101**, 775-787.
57. J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1988) Complete amino acid sequence of a  $\beta$ -galactoside-binding lectin from human placenta. *J. Biochem.*, **104**, 1-4.
58. Y. Ohyama, J. Hirabayashi, Y. Oda, S. Oono, H. Kawasaki, K. Suzuki and K. Kasai (1986) Nucleotide sequence of chick 14K  $\beta$ -galactoside-binding lectin mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 51-56.
59. D.N.W. Cooper and S.H. Barondes (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.*, **110**, 1681-1691.
60. V. Avellana-Adalid, G. Rebel, M. Caron, J.-D. Cornillot, D. Bladier and R. Joubert-Caron (1994) Changes in S-type lectin localization in neuroblastoma cells (NIE115) upon differentiation. *Glycoconjugate J.*, **11**, 286-291
61. D. Lutomski, M. Fouillit, P. Bourin, D. Mellottee, N. Denize, D. Bladier and R. Joubert-Caron (1997) Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroide differentiation. *Glycobiology*, **7**, 1193-1199
62. R.Z. Florkiewicz, R.A. Majack, R.D. Buechler and E. Florkiewicz (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent non ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.*, **162**, 388-399
63. W. Siders and S.B. Mizel (1995) Interleukin-1 $\beta$  secretion. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16258-16264

64. D.N.W. Cooper and S.H. Barondes (1990) Evidence for export of a muscle lectin from Cytosol extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.*, **110**, 1681-1691
65. P. Mignatti, T. Morimoto and D.B. Rifkin (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-golgi-complex. *J. Cell. Physiol.*, **151**, 81-93
66. Y. Akimoto, A. Obinata, J. Hirabayashi, Y. Sakakura, H. Endo, K. Kasai and H. Mirano (1995) Changes in the expression of endogenous beta-galactoside-binding isolectin in the dermis of chick embryonic skin during development in ovo and in vitro. *Cell Tissue Res.*, **279**, 3-12
67. F. Poirier, P.M. Timmons, C.-T.J. Chan, J.-L. Guenet and P.W.J. Rigby (1992) Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development*, **115**, 143-155
68. G. Benvenuto, M.L. Carpentieri, P. Salvatore, L. Cindolo, C.B. Bruni and L. Chiaritoti (1996) Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promotor region. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2736-2743
69. L. Chiaritoti, G. Benvenuto, R. Zarrilli, E., Rossi, P. Salvatore, V. Colantuoni and C.B. Bruni (1994) Activation of the galectin-1 (L-14-I) gene from non-expressing differentiated cells by fusion with undifferentiated and tumorigenic cells. *Cell Groth Differ.*, **5**, 769-775
70. R. Joubert, S. Kuchler, J.P. Zanetta, D. Bladier, V. Avellana-Adalid, M. Caron, C. Dionel and G. Vincendon (1989) Immunohistochemical localisation of a  $\beta$ -galactoside-binding lectin in rat central nervous system. I. Light- and electron-microscopical studies on developing cerebral cortex and corpus callosum. *Dev. Neurosci.*, **11**, 397-413
71. L.G. Baum, J.J. Seilhamer, M. Pang, W.B. Levine, D. Beynon and J.A. Berliner (1995) Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconjugate J.*, **12**, 63-68
72. D.M. Skrincosky, H.J. Allen and R.J. Bernacki (1993) Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins. *Cancer Res.*, **53**, 2667-2675
73. X.C. Xu, A.K. El-Naggar and R. Lotan (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. Pathol.*, **147**, 815-822
74. K. Y. Do, D. F. Smith and R. D. Cummings (1990) LAMP1 in CHO cells is primary carrier of poly-N-acetyllactosamine chains and is bound preferentially by a mammalian S-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1123-1128.
75. M. Gu, W. Wang, W.K. Song, D.N.W. Cooper and S.J. Kaufman (1994) Selective modulation of the interaction of  $\alpha 7\beta 1$  integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal differentiation. *J. Cell Sci.*, **107**, 175-181

76. K. E. Pace and L.G. Baum (1997) Induction of T lymphocyte apoptosis: a novel function for galectin-1. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **9**, 21–29.
77. H. Walzel, U. Schulz, P. Neels and J. Brock (1999) Galectin-1. a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine Phosphatase CD45. *Immunol. Lett.*, **67**, 193-202
78. H. Walzel, M. Blach, J. Hirabayashi, K.-I. Kasai and J. Brock (2000) Involvement of CD2 and CD3 in galectin induced signalling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology*, **10**, 131-140
79. K.E. Pace, H.P. Hahn, M. Pang, J.T. Nguyen and L.G. Baum (2000) Cutting Edge: CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J. Immunol.*, **165**, 2331-2334
80. L. Wang, H. Inohara, K.J. Pienta and A. Raz (1995) Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 292-303
81. R.-Y. Yang, K.K. Hsu and F.-T. Liu (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6737-6742
82. N.L. Perillo, K.E. Pace, J.J. Seilhamer and L.G. Baum (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, **378**, 736–739.
83. L. Adams, G.K. Scott and C.S. Weinberg (1996) Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1312**, 137–144.
84. D.N.W. Cooper, S.M. Massa and S.H. Barondes (1991) Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J. Cell Biol.*, **115**, 1437-1448
85. H.J. Allen, D. Sucato, B. Woynarowska, S. Gottstine, A. Sharma and R.J. Bernacki (1990) Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro. *J. Cell Biochem.*, **43**, 43-57
86. G.L. Sanford and S. Harris-Hooker (1990) Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. *FASEB J.*, **4**, 2912-2918
87. V. Wells and L. Mallucci (1991) Identification of an autocrine negative growth factor: mouse  $\beta$ -galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. *Cell*, **64**, 91–97.
88. L.G. Baum, M. Pang, N.L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C.H. Uittenbogaart, M. Fukuda and J.J. Seilhamer (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.*, **181**, 877-887
89. G.A. Rabinovich, M.M. Iglesias, N.M. Modesti, L.F. Castagna, C.W. Todel, C.M. Riera and C.E. Sotomayor (1998) Activated rat macrophages produce a gal-1-like protein that induces apoptosis of T-cells: biochemical and functional characterization. *J. Immunol.*, **160**, 4831-4840
90. G.A. Rabinovich, L.F. Castagna, C.A. Landa, C.M. Riera and C.E. Sotomayor (1996) Regulated expression of a 16kDa galectin-like protein in activated macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, **59**, 363-370

91. C. Blaser, M. Kaufmann, C. Müller, C. Zimmermann, V. Wells, L. Mallucci and H. Pircher (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T-cells inhibits antigen-induced proliferation of T-cells. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2311-2319
92. J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1993) The family of metazoan metal-independent  $\beta$ -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, **3**, 297-304
93. M.M. Iglesias, G.A. Rabinovich, V. Ivanovic, C.E. Sotomayor and C. Wolfenstein-Todel (1998) Gal-1 from ovine placenta: amino acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur. J. Biochem.*, **252**, 400-407
94. G. Levi, R. Tarrab-Hazdai and V.I. Teichberg (1983) Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur. J. Immunol.*, **13**, 500–507.
95. H. Offner, B. Celnik, T.S. Bringman, D. Casentini-Borocz, G.E. Nedwin and A.A. Vandebark (1990) Recombinant human  $\beta$ -galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, **28**, 177–184.
96. E. Maquoi, F.A. van den Brule, V. Castronovo and J.-M. Foidart (1997) Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta*, **18**, 433-439
97. Y.S. Choe, C. Shim, D. Choi, C.S. Lee and K. Kim (1997) Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol. Reprod. Devel.*, **48**, 261-266
98. B.H. Bevan, C.D. Kilpatrick, W.A. Liston, J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1994) Immunohistochemical localization of a  $\beta$ -D-galactoside-binding lectin at the human materno-fetal interface. *Histochem. J.*, **26**, 582-586
99. H. Walzel, P. Neels, H. Bremer, H. Köhler, N. Raab, M. Barten and J. Brock (1995) Immunohistochemical and glycohistochemical localisation of the beta-galactoside-binding S-type lectin in the human placenta. *Acta histochem.* **97**, 33-42
100. P. Neels, H. Walzel, N. Raab, M. Barten, L. Jonas and J. Brock (1995) Localization of placental galectin-1 and its effects on alloantigen and mitogen-induced lymphoproliferation. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **376**, 134 (Abstract)
101. N.L. Perillo, C.H. Uittenbogaart, J.T. Nguyen and L.G. Baum (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.*, **185**, 1851–1858.
102. M. Galvan, S. Tsuboi, M. Fukuda and L.G. Baum (2000) Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by gal-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16730-16737
103. G.A. Rabinovich, G. Daly, H. Dreja, H. Tailor, C.M. Riera, J. Hirabayashi and Y. Chernajovsky (1999) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, **190**, 385-397
104. E.R. Unanue (1984) Antigen presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 395-428

105. L.E. Samelson, M.D. Patel, A.M. Weissman, J.B. Harford and R.D. Klausner (1986) Antigen activation of murine T-cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell*, **46**, 1083-1090
106. P.A. van der Merwe, P.N. McNamee, E.A. Davis, A.N. Barclay and S.J. Davis (1995) Topology of the CD2-CD48 cell-adhesion molecule complex implications for antigen recognition by T cells. *Curr. Biol.*, **5**, 74-84
107. D.S. Lyons, S.A. Lieberman, J. Hampl, J.J. Boniface, Y. Chien, L. J. Borg and M.M. Davis (1996) A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonist. *Immunity*, **5**, 53-61
108. M.M. Davis, J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden and Y. Chien (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 523-544
109. W. Wang, P.H. Gulden, R.A. Pierce, J.A. Shabanowitz, S.T. Man, D.F. Hunt and V.H. Engelhard (1997) A naturally processed peptide presented by HLA-A 0201 is expressed at low abundance and recognized by an alloreactive CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell with apparent high affinity. *J. Immunol.*, **158**, 5797-5804
110. T.A. Springer (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314
111. A. Grakoui, S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin (1999) The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**, 221-227
112. C.R.F. Monks, B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Skiaky and A. Kupfer (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-88
113. C. Wülfing and M.M. Davis (1998) A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T-cell activation. *Science*, **282**, 2266-2269
114. T.W. McKeithan (1995) Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5042-5046
115. S. Latour and A. Veillette (2001) Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signalling. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 299-306
116. C. Langlet, A.-M. Bernard, P. Drevot and H.-T. He (2000) Membrane rafts and signalling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **12**, 250-255
117. T.M. Stulnig, M. Berger, T. Sigmund, D. Raederstorff, H. Stockinger and W. Waldhäusel (1998) Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J. Cell Biol.*, **143**, 637-644
118. P. Crise and J.K. Rose (1992) Identification of palmitoylation sites on CD4 the human immunodeficiency virus receptor. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13593-13597
119. A. Arcaro, C. Gregoire, N. Bouchron, S. Stotz, E. Palmer, B. Malissen and I.F. Luescher (2000) Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J. Immunol.*, **165**, 2068-2076

120. A. Kosugi, S. Saitoh, S. Noda, K. Yasuda, F. Hayashi, M. Ogata and T. Hamaoka (1999) Translocation of tyrosine-phosphorylated TCR zeta chain to glycolipid-enriched membrane domains upon T cell activation. *Int. Immunol.*, **11**, 1395-1401
121. W. Zhang, R.P. Trible and L.E. Samelson (1998) LAT palmitoylation: its essential role in microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **92**, 239-246
122. W. Rodgers and J.K. Rose (1996) Exclusion of CD45 inhibits activity of p56<sup>lck</sup> associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell Biol.*, **135**, 1515-1523
123. J. Neilson, K. Stankunas and G.R. Crabtree (2001) Monitoring the duration of antigen-receptor occupancy by calcineurin/glycogen-synthase-kinase-3 control of NF-AT. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 346-350
124. J.W. Putney and G.W. Bird (1993) The signal for capacitative calcium entry. *Cell*, **75**, 199-201
125. J.B. Imboden and J.D. Stobo (1985) Transmembrane signaling by the T cell antigen receptor: perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.*, **161**, 446-456
126. A.T. Serafini, R.S. Lewis, N.A. Clipstone, R.J. Bram, C. Fanger, S. Fiering, L.A. Herzenberg and G.R. Crabtree (1995) Isolation of mutant T-lymphocytes with defects in capacitive calcium entry. *Immunity*, **3**, 239-250
127. C.R. Beals, N.A. Clipstone, S.N. Ho and G.R. Crabtree (1997) Nuclear localisation of NF-AT<sub>c</sub> by a calcineurin-dependent, cyclosporine-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.*, **11**, 824-834
128. K.E. Pace, C. Lee, P.L. Stewart and L.G. Baum (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol.*, **163**, 3801-3811
129. M. Szamel and K. Resch (1995) T-cell antigen receptor-induced signal transduction pathways. Activation and function of protein kinase C in T lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 1-15
130. A. Weis and J. Schlessinger (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, **94**, 277-280
131. S.J. Klaus, S.P. Sidorenko and E.A. Clark (1996) CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J. Immunol.*, **156**, 2743-2753
132. C.D. Chang, V.P. Patel, M. Moran, L.A. Lewis and M.C. Miceli (2000) Galectin-1 induces partial TCR $\zeta$ -chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.*, **165**, 3722-3729
133. H.J. Allen and E.A.Z. Johnson (1977) A simple procedure for the isolation of L-fucose binding lectins from Ulex europaeus and Lotus tetragonolobus. *Carbohydrate Res.*, **58**, 253-265
134. H. Friemel, (1991) *Immunologische Arbeitsmethoden*. 4. Aufl., Jena, Fischer Verl.

135. J. Hirabayashi and K.-I. Kasai (1984) Human placenta beta-galactoside-binding lectin. Purification and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **122**, 938-944
136. D.M. Boorsma, J. van Bommel and J. van den Heuvel (1986) Avidin-HRP conjugates in biotin-avidin immunoenzyme cytochemistry. *Histochem.*, **84**, 333-337
137. M.M. Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **76**, 248-254
138. U.K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
139. J. Kyhse-Andersen (1984) Elektrotransfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 203-209
140. G. Gryniewicz, M. Poenie and R.Y. Tsien (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450
141. S. Gobert, S. Chretien, F. Gouilleux, O. Muller, C. Pallard, I. Dusanter-Fourt, B. Groner, C. Lacombe, S. Gisselbrecht and P. Mayeux (1996) Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *EMBO J.*, **15**, 2434-2441
142. J. Hirabayashi, H. Ayaki, G.-I. Soma and K.-I. Kasai (1989) Production and purification of a recombinant human 14 kDa beta-galactoside-binding lectin. *FEBS letters* **250**, 161-165
143. C. Aussel, J.-P. Breittmayer, C. Pelassy and A. Bernard (1995) Calmodulin, a junction between two independent immunosuppressive pathways in Jurkat T-cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8032-8036
144. B.L. Bennett, D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning and D.W. Anderson (2001) SP600125, an anthrapyrazolon inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS*, **98**, 13681-13686
145. Y.-M. Go, H. Park, M.C. Maland, V.M. Darley-Usmar, B. Stoyanov, R. Wetzker and H. Jo (1998) Phosphatidylinositol-3-kinase  $\gamma$  mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **275**, H1898-H1904
146. I. Hannet, F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys and M. DeBruyere (1992) Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today*, **13**, 215-218
147. C.H. June, M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, G.L. Schieven, J.N. Siegel, A.F. Phillips and L.E. Samelson (1990) Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7722-7726
148. G.F. Böll, B.M. Haack and K. Resch (1993) CD2 dependence of the  $\zeta$  chain in T cell signaling – shown by inhibitory and modifying effects of cholera toxin. *NATO ASI Ser.*, **H76**, 343

149. M. Blach, J. Brock and H. Walzel (1999) Effects of galectin-1 on the calcium-dependent regulation of phosphatidylserine synthesis. *Eur. J. Cell Biol.*, **78**, 63 (Abstract)
150. H. Walzel, M. Blach, J. Hirabayashi, Y. Arata, K.-I. Kasai and J. Brock (2002) Galectin-induced activation of the transcription factors NFAT and AP-1 in human Jurkat T-lymphocytes. *Cell. Signal.*, **14**, 861-868
151. N. Ghaffari-Tabrizi, B. Bauer, A. Villunger, G. Baier-Bitterlich, A. Altman, G. Utermann, F. Überall and G. Baier (1999) Protein kinase C $\theta$ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in human Jurkat T-cells. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 132-142
152. M. Karin, Z.G. Liu and E. Zandi (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 240-246
153. B. Su and M. Karin (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 402-411
154. G.A. Rabinovich, C.R. Alonso, C.E. Sotomayor, S. Durand, J.L. Bocco and C.M. Riera (2000) Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death and Differentiation*, **7**, 747-753
155. Y. Bourne, B. Bolgiano, D.-I. Liao, G. Strecker, P. Cantau, O. Herzberg, T. Feizi and C. Cambillau (1994) Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides. *Struct. Biol.*, **1**, 863-870
156. H. Walzel, J. Hirabayashi, K.-I. Kasai, J. Brock and P. Neels (1996) Cell calcium signalling induced by endogenous lectin carbohydrate interaction in the Jurkat T cell line. *Glycoconjugate J.*, **13**, 99-105
157. B. Nilsson, N.E. Norden and S. Svensson (1979) Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4545-4553
158. E.D. Green, G. Adelt, J.U. Baenziger, S. Wilson and H. Van Halbeek (1988) The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18253-18268
159. S. Dong and R.C. Hughes (1996) Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca $^{2+}$  in human Jurkat T-cells. *FEBS Lett.*, **395**, 165-169.
160. A. Alcover, M.J. Weiss, J.F. Daley and E.L. Reinherz (1986) The T11 glycoprotein is functionally limited to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2614-2618.
161. G. Pantaleo, D. Olive, A. Poggi, W.J. Kozumbo, L. Moretta and A. Moretta (1987) Transmembrane signaling via the T11-dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 55-60.
162. P. Gardner, A. Alcover, M. Kuno, P. Moingeon, C.M. Weyand, J. Goronzy and E.L. Reinherz (1989) Triggering of T-lymphocytes via either T3-Ti or T11 surface structures opens a voltage-insensitive plasma membrane calcium-permeable

- channel: Requirement for interleukin-2 gene function. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1068–1076
163. E. Monostori, D. Desai, M.H. Brown, D.A. Cantrell and M.J. Crumpton (1990) Activation of human T lymphocytes via the CD2 antigen results in tyrosine phosphorylation of T cell antigen receptor  $\zeta$ -chains. *J. Immunol.*, **144**, 1010–1014
  164. P. Moingeon, J.L. Lucich, D.J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H.-C. Chang, H.R. Rodewald and E.L. Reinherz (1992) CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1492–1496
  165. T. Pawson and G.D. Gish (1992) SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell*, **71**, 359–362
  166. D.M. Desai, J. Sap, J. Schlessinger and A. Weiss (1993) Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*, **73**, 541–554
  167. M. Streuli (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **8**, 182–188
  168. T. Furakawa, M. Itoh, N.X. Krueger, M. Streuli and H. Saito (1994) Specific interaction of the CD45 protein tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10928–10932
  169. G.A. Koretzky, J. Picus, M.L. Thomas and A. Weiss (1990) A tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature*, **346**, 66–68.
  170. C.T. Weaver, J.T. Pingel, J.O. Nelson and M.L. Thomas (1991) CD8<sup>+</sup> T-cell clones deficient in the expression of CD45 protein tyrosine phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4415–4422.
  171. G.A. Koretzky, J. Picus, T. Schultz and A. Weiss (1991) Tyrosine phosphatase CD45 is required for T cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein-tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2037–2041.
  172. J. Sancho, M.E. Peter, R. Franco, S. Danielian, J.S. Kang, R. Fagard, J. Woods, J.C. Reed, M. Kamoun and C. Terhorst (1993) Coupling of GTP-binding to the T cell receptor (TCR)  $\zeta$ -chain with TCR-mediated signal transduction. *J. Immunol.*, **150**, 3230–3242.
  173. J. Kopitz, C. von Reitzenstein, M. Burchert, M. Cantz and H.J. Gabius (1998) Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11205–11211.
  174. H. Gouy, P. Deterre, P. Debre and G. Bismuth (1994) Cell calcium signaling via GM1 cell surface gangliosides in the human Jurkat T cell line. *J. Immunol.*, **152**, 3271–3281.

175. J.W. Putney, L.M. Broad, F.J. Braun, J.P. Lievremont and G.S. Bird (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell Sci.*, **114**, 2223-2229
176. E.S. Masuda, R. Imamura, Y. Amasaki, K. Arai and N. Arai (1998) Signalling into the T- cell nucleus: NFAT regulation. *Cell. Signal.*, **10**, 599-611
177. S. Wesselberg, D.A. Fruman, J.K. Sagoo, B.E. Bierer and S.J. Burakoff (1996) Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFAT<sub>P</sub>). *J. Biol. Chem.*, **271**, 1274-1277
178. M.-J. Dumaurier, C. Pelassy, J.-P. Breittmayer and C. Aussel (1998) Regulation of the serine-base exchange system by CD4: effects of monoclonal antibodies, jacalin, interleukin 16 and the HIV membrane protein gp120.
179. J. Gafni, J.A. Munsch, T.H. Lam, M.C. Catlin, L.G. Costa, T.F. Molinski and I.N. Pessah (1997) Xestospongin: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron*, **19**, 723-733
180. C. Cantu and L. Teyton (2001) The early events of T cell activation: How does a T cell know that its clonal receptor engaged? *Mod. Asp. Immunobiol.*, **2**, 62-65
181. M. Fouillot, R. Joubert-Caron, F. Poirier, P. Bourin, E. Monostori, M. Levi-Straus, M. Raphael, D. Bladier and M. Caron (2000) Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology*, **10**, 413-419
182. A. Weiss and J. Schlessinger (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, **94**, 277-280
183. A. Paz, R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan and Y. Kloog (2001) Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, **20**, 7486-7493
184. G. Elad-Sfadia, R. Haklai, E. Ballan, H.-J. Gabius and Y. Kloog (2002) Galectin-1 augments ras activation and diverts ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide-3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 37169-37175

## **10 Lebenslauf**

Vorname, Name:	Matthias Blach
Geburtsdatum, -ort:	23. Juli 1972 in Güstrow
Anschrift:	Wilsenstr. 27 18273 Güstrow
Eltern:	Werner Paul Heinrich Blach Renate Blach
Familienstand:	ledig
1979-1989	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Fritz Reuter“ in Güstrow
1989-1991	Abitur an der Erweiterten Oberschule „John Brinckman“ in Güstrow
1991-1992	Ersatzdienst beim DRK Güstrow
1992-1997	Studium der Chemie an der Universität Rostock
1997-2000	Untersuchungen zur Promotionsarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock
2001-2002	Arbeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Automatisierungstechnik der Universität Rostock

## **11 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Brock danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Hilfe bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Walzel, der durch seine Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen, durch intensive Diskussion der Ergebnisse und durch zahlreiche zur Verfügung gestellte Literatur maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Gaede für ihre praktischen Unterweisungen und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente.

Mein Dank geht an Dr. U. Schulz für die Anfertigung der FACS-Messungen und die Unterstützung bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Zu Dank bin ich ebenso Dr. Bittorf für die Unterstützung bei der Anfertigung der EMSA-Untersuchungen verpflichtet.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen, die am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Bereichen, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte vollbringen können.

## **12 Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.  
Ich erkläre ferner, dass ich die vorliegende Arbeit an keiner weiteren in- oder ausländischen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Güstrow, Juli 2003

Matthias Blach