

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Funktionelle Charakterisierung eines Cysteinrestes
in der Regulation der Zap70-Aktivität

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Annika Schultz aus Berlin
Magdeburg 2023

Bibliographische Beschreibung:

Schultz, Annika

Funktionelle Charakterisierung eines Cysteinrestes in der Regulation der Zap70-Aktivität

-2023-, 79 Bl., 24 Abb., 8 Tab., 106 Literaturangaben

I. Kurzreferat

Tyrosinkinasen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Signaltransduktion in den Zellen unseres Immunsystems. Durch Phosphorylierung ihrer Substrate sind sie in der Lage, die Signaltransduktion zu ermöglichen, zu verstärken, abzuschwächen oder sogar zu blockieren. Angeborene oder erworbene Defekte der Regulation der Tyrosinkinasen können zu Krebserkrankungen, Immunschwächen oder Autoimmunität führen. Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors spielt die Tyrosinkinase Zap70 (*Zeta-Chain Associated Protein Kinase, 70kD*). Einzelne Punktmutationen innerhalb von Zap70 reichen bereits aus, um schwere Immunschwächen im Sinne eines SCID (severe combined immunodeficiency) hervorzurufen oder die Prognose einer chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie zu verschlechtern. Die Vorgänge rund um Zap70 und seine Interaktionspartner sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Diese Arbeit ist einem Cysteinrest (C564) innerhalb von Zap70 gewidmet, dessen Mutation nachweislich zur Dysregulation der Immunantwort mit schwerer klinischer Symptomatik führt und über die kürzlich eine Publikation erschien, die eine mögliche Erklärung des Regulationsmechanismus via Palmitoylierungshypothese anführt. Die vorliegende Arbeit widerlegt einen Einfluss dieser Palmitoylierung und stellt andere mögliche Regulationsmechanismen vor. Hierzu gehört ein verändertes Zusammenspiel mit Lck (*Lymphozytenspezifische Protein-Tyrosinkinase*), welches zu erhöhter Aktivität dieser Tyrosinkinase führt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	8
1.1	Lymphozyten in der adaptiven Immunität.....	9
1.1.1	T-Zell-Rezeptoren.....	9
1.1.2	Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors.....	10
1.1.2.1	Struktur und Funktion von Lck in der Signalkaskade.....	10
1.1.2.2	Struktur und Funktion von Zap70 in der Signalkaskade.....	12
1.1.2.3	Signaltransduktion im TZR-Signalweg distal von Lat.....	15
1.2	Mit Zap70 assoziierte Erkrankungen.....	19
1.2.1	Zap70 in Krebserkrankungen.....	19
1.2.2	Zap70 und Autoimmunität.....	19
1.2.3	Zap70 und Immundefizienz.....	20
1.2.4	Die Faszination von Zap70 C564.....	22
1.3	Ziel der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Chemikalien, Antikörper und andere Reagenzien.....	25
2.1.1	Chemikalien.....	25
2.1.2	Antikörper für Western-Blots und Immunopräzipitation.....	25
2.1.3	Antikörper für Analyse und Sortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	26
2.1.4	Antikörper für Stimulation.....	26
2.1.5	Prozedurale Sets.....	26
2.2	Plasmide.....	26
2.3	Puffer und Lösungen.....	27
2.3.1	Blotting Puffer.....	27
2.3.2	Laufpuffer für SDS-Page (BioRad Laboratories).....	27
2.3.3	Lysepuffer.....	27
2.3.4	Brij-Lysepuffer.....	28
2.3.5	Waschpuffer für Immunopräzipitationen.....	28
2.3.6	Tyrosinkinasepuffer.....	28
2.3.7	Waschpuffer für Kinase-Assay.....	28
2.3.8	5x- SDS-Probenpuffer.....	28
2.3.9	SDS-PAGE Trenngel (10%).....	28
2.3.10	SDS-PAGE Sammelgel.....	29
2.3.11	TBS-Puffer pH 7,5.....	29
2.3.12	TBS-Waschpuffer für Membranen.....	29
2.3.13	Reagenz zum Blocken von Membranen und als Grundlage für Antikörper-Puffer.....	29
2.4	Zellkulturen.....	29
2.4.1	Jurkat T-Zellen.....	29
2.4.2	HEK ^{293T} -Zellen.....	30
2.4.3	Titration der Puromycinresistenz.....	30
2.5	Plasmidpräparation mittels Maxi-Prep.....	31
2.6	Transformation.....	31
2.7	Transfektion.....	32
2.7.1	Generierung stabiler Zelllinien.....	32
2.7.2	Transfektion mittels Elektroporation.....	34
2.7.3	Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation.....	34
2.8	Selektion.....	34
2.8.1	Selektion mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	34
2.8.2	Selektion mittels Durchflusszytometrie.....	35
2.8.3	Überprüfung der experimentellen Vergleichbarkeit mittels Durchflusszytometrie.....	35
2.9	Stimulation mit löslichen Antikörpern.....	35
2.9.1	Stimulation mit Anti-T-Zell-Rezeptor Antikörper Klon C305.....	35

2.9.2 Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper UCHT1.....	36
2.10 Stimulation mit immobilisierten Antikörpern.....	36
2.10.1 Stimulation mit Anti-T-Zell-Rezeptor Antikörper Klon C305.....	36
2.10.2 Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper UCHT1.....	36
2.11 Zellyse.....	36
2.12 Immunopräzipitation.....	36
2.13 Kinase-Assay.....	37
2.14 SDS-PAGE.....	38
2.15 Western-Blot.....	38
2.15.1 Proteintransfer.....	38
2.15.2 Proteindetektion.....	39
2.16 Calciumfluss-Messung.....	39
2.17 Datenanalyse und Statistik.....	40
2.18 Grafiken.....	40
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Zap70 C564A erzeugt keinen Signalabbruch in der folgenden Signalkaskade.....	42
3.1.1 Zap70 C564A ist hyperphosphoryliert.....	43
3.1.2 Zap70 C564A ist in der Lage, das TZR-vermittelte Signal weiterzuleiten.....	45
3.1.3 Die Funktion von Zap70 C564A ist weitgehend unabhängig von der Art der Stimulation.....	45
3.1.4 Die finale Signaltransduktion ist in Zap70 C564A erhalten.....	48
3.1.5 Zusammenfassung der Funktionsscreenings.....	49
3.2 Charakterisierung der Funktion von Zap70 C564.....	50
3.2.1 Zap70 C564 beeinflusst die Phosphorylierung der ζ -Ketten.....	50
3.2.2 Zap70 C564A übt einen Einfluss auf Phosphorylierungsstatus und Aktivität von Lck aus.....	52
3.2.3 Die Hyperphosphorylierung in Zap70 C564A ist von Lck abhängig.....	54
3.2.4 Zap70 scheint keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Lck Y192 zu nehmen.....	57
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	58
4 Diskussion.....	59
4.1 Die S-Acylierung von Zap70 C564 spielt keine Rolle bei der Signaltransduktion.....	59
4.2 Zap70 beeinflusst die Aktivität und Lokalisierung von Lck.....	63
4.2.1 Die Lck-Aktivität ist in Zap70 C564A-exprimierenden Zellen erhöht.....	63
4.2.2 Zap70 C564A fördert die Interaktion von Lck mit CD3 ϵ	63
4.3 Zap70 C564A ist möglicherweise weniger autoinhibiert.....	66
4.4 Experimenteller Ausblick.....	66
4.5 Zap70 als potentielles therapeutisches Ziel.....	67
5 Zusammenfassung.....	69
6 Literaturverzeichnis.....	70
7 Danksagungen.....	77
8 Ehrenerklärung.....	78
9 Bildungsweg.....	79

II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADA	Adenosin-Desaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
Bcl	B-cell lymphoma/leukemia
C564A	Mutation Cystein zu Alanin an Stelle 564 innerhalb von Zap70
CARD	caspase recruitment domain
CARMA1	CARD11/Caspase recruitment domain-containing protein 11
c-CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CD	Cluster of Differentiation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CRAC	Calcium release activated channel
Cdc	cell division cycle
Csk	C-terminal Src-kinase
DAG	Diacylglycerin
DCP-Bio1	Cysteine Sulfenic Acid probe (sulfenic acid-reactive 3-(2,4-dioxocyclohexyl) propyl (DCP) appended to biotin)
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DTT	Dithiothreitol
DUSP	dual specificity phosphatase
E1A	Adenovirus early region
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase (auch MAPK (mitogen acitvated protein Kinase) genannt)
FACS	Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sorting
FBS	fetales bovines Serum
FDA	Food and drug administration
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat

GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gads	Grb2-related adaptor downstream of Shc
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HEK	human embryonic kidney
HSP	Heat-shock-protein
IAA	Iodacetamid
IKK	IkappaB-Kinase
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK	interleukin-2-inducible T cell kinase
ITR	inverted terminal repeats
IkappaB	Inhibitor von kappa B
kpb	Kilobasenpaare
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LAT	linker for activation of T-cells
LM	n-Dodecyl-Beta-Maltoside
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosin kinase
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAPK	mitogen aktivierte Protein Kinase
MEK	Mitogen activated protein Kinase; Synonym MAPKK (Kinase der MAP-Kinase)
MHC	Major histocompatibility complex
NEM	n-Ethylmaleimid
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NK	Natürliche Killerzellen
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NaF	Natriumfluorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	PiggyBac
PI-3 Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-2,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTPN	Protein tyrosine phosphatase non receptor type
pb	plate bound
RASGRP1	Ras guanyl releasing protein 1
RNF41	ring finger protein 41

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Ras	Rat sarcoma
Ret	Rearranged during transfection
rpm	revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP	SH2 domain containing phosphatase
SLP-76	SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SOC	Super optimal broth with Catabolite repression
SOS	Son of sevenless
Src	sarcoma
Syk	Spleen tyrosine kinase
TBS	Tris buffered Saline
TCR	T-cell-receptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
YES	Yamaguchi sarcoma viral oncogene
ZAP 70	Zeta-Chain Associated Protein Kinase, 70kD

1 Einführung

Die derzeitige Situation rund um die Pandemie wirft auf vielerlei Weise ein Schlaglicht auf die Medizin und im Speziellen auf die Immunologie. Die pandemische Lage rund um SARS-COV-2 führt dazu, dass die gesamte Bevölkerung über natürliche Immunität, Impfungen und immunologische Therapien diskutiert. Diskussionen über unsere Abwehrkräfte, Schutzmaßnahmen und Impfungen sind jedoch nicht neu, sondern traten bei jeder epidemischen oder pandemischen Lage auf. Von der Pest über Grippepandemien bis zur Coronapandemie zeigte sich immer, dass Menschen in Bezug auf ihr Immunsystem wissbegierig sind. Indes kann unser Immunsystem uns nicht nur vor einer Infektion schützen oder uns die Heilung ermöglichen, sondern sich auch gegen uns wenden, mit der Folge, dass beispielsweise schwere Virusinfektionen sogar mit Immunsuppressiva behandelt werden müssen oder autoimmune Vorgänge stattfinden.

Als Begründer der Immunologie wird oft Edward Jenner genannt. Auch wenn bereits zuvor bekannt war, dass man bei vielen Erkrankungen nach überstandener Infektion Immunität erlangt hatte, so war er der Erste, der diesen Umstand genutzt hat, um Menschen vor den Pocken zu schützen und diesen Schutz auch nachweisen konnte. Der genaue Ursprung der „Variolation“, bei der Sekret von Pockenpusteln eingenommen oder übertragen wurde, ist unbekannt. Man vermutet die Herkunft Anfang des 2. Jahrtausends in Zentralasien. Über China, die Türkei und Afrika kam diese erste „Impfung“ schließlich durch Lady Mary Wortley Montagu 1721 aus Konstantinopel nach England. Von wo sich der Trend rasch ausbreitete (Plotkin and Plotkin, n.d.). Jenner veröffentlichte seine Versuche mit Kuhpocken an Menschen und der daraus entstandenen Immunität gegen Pocken schließlich auf wissenschaftlicher Basis 1798 unter dem Titel *„An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, Or Cow-Pox“* (Jenner, 1802). Jenner selbst bezeichnete sein Vorgehen als „Vaccination“. Die Forschung nahm nach den Erkenntnissen Jenners Fahrt auf. Robert Koch entdeckte die Mikroorganismen als Erreger von Krankheiten und kurz darauf entdeckten Behring und Kitasato die Antikörper, die sie damals als „Antitoxine“ bezeichneten. Bald stellte sich heraus, dass der Körper Antikörper gegen eine enorme Anzahl von Substanzen bilden konnte, die man als „Antigene“ bezeichnet. Antigene können aber nicht nur Teile von Krankheitserregern sein, sondern auch Bestandteil bestimmter Nahrungsmittel, Metalle oder Medikamente. Das Immunsystem kann uns bei Allergien eben auch schaden.

So eindrucklich der Aufbau unseres Immunsystems ist, so wichtig ist es jeden einzelnen Bestandteil genau zu verstehen, um Menschen adäquat helfen zu können. In dieser Arbeit widme ich mich einem Teil der adaptiven Immunantwort, die neben der angeborenen Immunität die zweite Säule unseres Immunsystems darstellt und vor allem aus antigenspezifischen Lymphozyten besteht.

1.1 Lymphozyten in der adaptiven Immunität

Lymphozyten reifen in Knochenmark oder Thymus heran und zirkulieren dann sowohl im Blut als auch in den Lymphgefäßen. Reife, aber naive Lymphozyten zirkulieren vor allem in den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz oder den zahlreichen lymphatischen Geweben des Darms, der Atemwege oder des Urogenitaltraktes, wo die adaptive Immunantwort ausgelöst wird. Lymphozyten sind in der Lage, auf eine große Anzahl von Erregern und anderen Antigenen zu reagieren und ein entsprechendes immunologisches Gedächtnis zu entwickeln. In unserem Immunsystem gibt es zwei Typen von Lymphozyten: B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen), die sehr unterschiedliche Aufgaben in der Immunabwehr übernehmen, aber auch Teil verschiedener Krankheitsbilder sein können. Nach Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor (BZR) entstehen durch Proliferation und Differenzierung antikörperproduzierende Plasmazellen. Bei Antigenbindung an T-Zell-Rezeptoren (TZR), bilden sich unterschiedliche Arten von T-Effektorzellen. Dazu gehören T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Die Vorgänge rund um den T-Zell-Rezeptor sind sehr komplex und werden nachfolgend genauer erläutert.

1.1.1 T-Zell-Rezeptoren

T-Zell-Rezeptoren sind große Proteinkomplexe (TZR/CD3-Komplex) auf der Oberfläche von T-Zellen und bestehen aus zwei plasmamembranverankerten Ketten (zumeist α/β), die für die Antigenerkennung verantwortlich sind (Abb. 1.1). Die TZR α/β -Ketten sind mit CD3-Molekülen assoziiert, die bei der Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielen. Die Antigenbindung von T-Zell-Rezeptoren verläuft sehr spezifisch. Sie erkennen nur Peptidpitope, die an MHC I oder II (*Haupthistokompatibilitätskomplex/major histocompatibility complex*) gebunden sind. Die Funktion des TZR ist es, der Zelle zu signalisieren, dass ein Antigen erkannt worden ist. Da der TZR selbst nur eine sehr kurze intrazelluläre Domäne besitzt, bildet er einen Komplex mit CD3-Molekülen, die in ihren cytoplasmatischen Anteilen bestimmte Signaltransduktionsmotive, sogenannte ITAMs

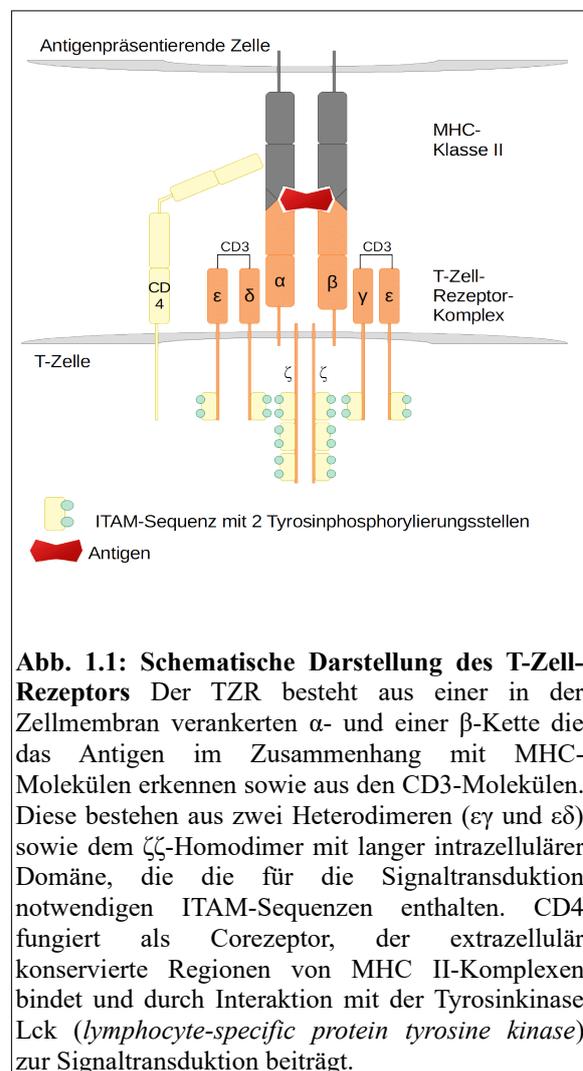


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptors Der TZR besteht aus einer in der Zellmembran verankerten α - und einer β -Kette die das Antigen im Zusammenhang mit MHC-Molekülen erkennen sowie aus den CD3-Molekülen. Diese bestehen aus zwei Heterodimeren ($\epsilon\gamma$ und $\epsilon\delta$) sowie dem $\zeta\zeta$ -Homodimer mit langer intrazellulärer Domäne, die die für die Signaltransduktion notwendigen ITAM-Sequenzen enthalten. CD4 fungiert als Corezeptor, der extrazellulär konservierte Regionen von MHC II-Komplexen bindet und durch Interaktion mit der Tyrosinkinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) zur Signaltransduktion beiträgt.

(*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), besitzen (Abb. 1.1). Diese CD3-Moleküle sind beim Menschen γ , δ , ϵ und ζ -Ketten, die zusammen mit den α - und β -Ketten den TZR/CD3-Komplex bilden. Corezeptoren wie CD4 und CD8, die an MHC-Moleküle binden, stabilisieren die TZR, MHC- und Peptid-Interaktion und tragen zur Signaltransduktion bei (Abb. 1.1).

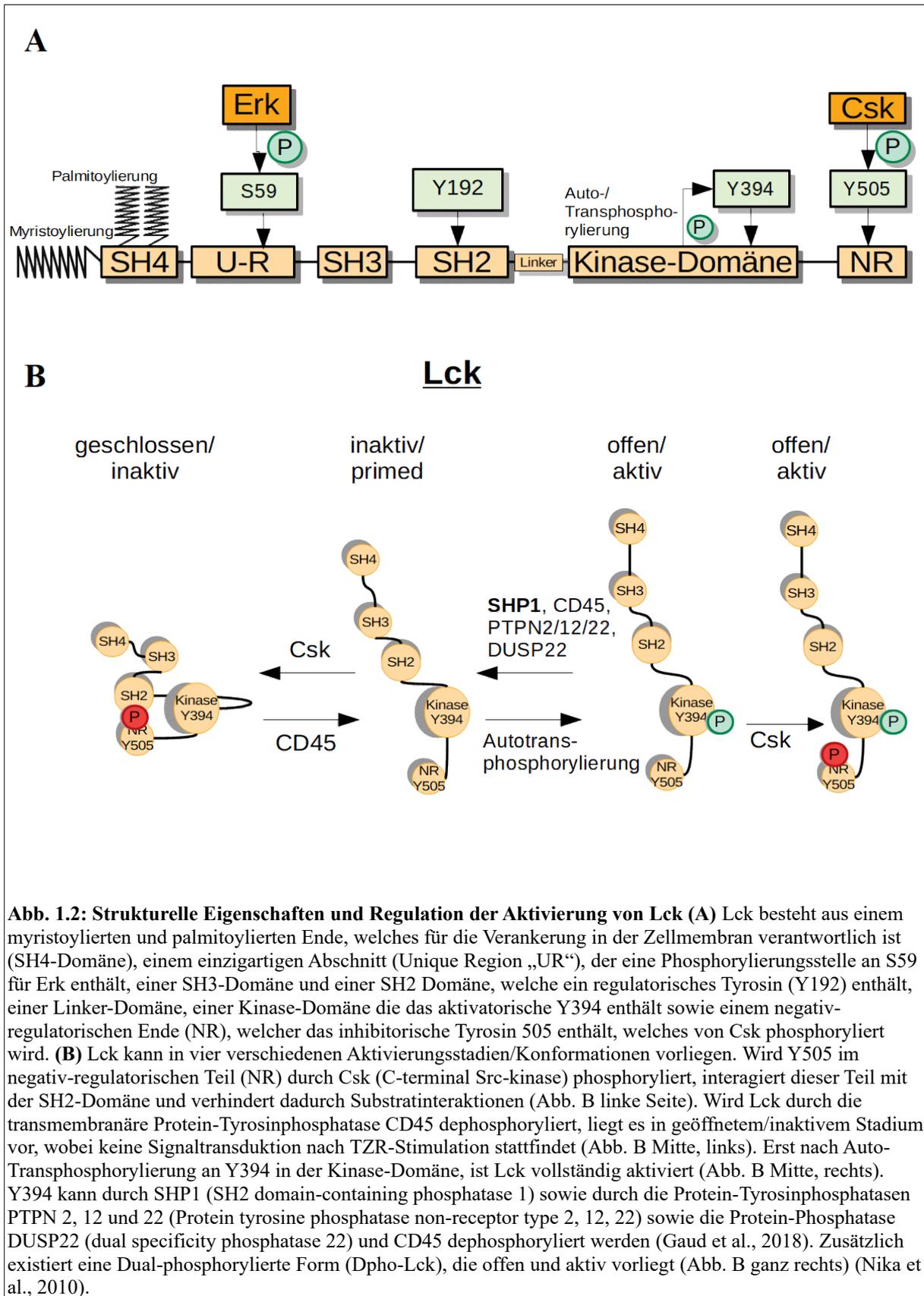
1.1.2 Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors

An der Signaltransduktion innerhalb von Zellen ist eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen beteiligt, die auf einer oder mehreren hintereinander geschalteten Ebenen interagieren (Signalkaskade). Das ursprüngliche Signal kann hierbei amplifiziert oder modifiziert werden. Die Transduktion erfolgt durch koordinierte Protein-Protein-Interaktionen und posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, Acylierungen oder Ubiquitinierungen. Phosphorylierungen, die sowohl zu Konformationsänderungen einzelner Proteine führen als auch zu Interaktionen zwischen Proteinen, bilden einen wichtigen regulatorischen Bestandteil der Signalkaskade des TZR. Tyrosinkinase wie Zap70 (*zeta-associated protein of 70 kilodalton*) oder Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) übertragen Phosphatgruppen zwischen Proteinen, indem sie Phosphatreste an Tyrosinreste anhängen, übermitteln auf diese Weise Signale und ermöglichen so die regulierte Signaltransduktion innerhalb der T-Zelle (Courtney et al., 2018).

Binden nun also T-Zell-Rezeptoren einen Peptid-MHC-Komplex wird die Tyrosinkinase Lck aktiviert (Stirnweiss et al., 2013), (Philipsen et al., 2017) und phosphoryliert die ITAMs an den entsprechenden Tyrosinresten. Es existieren jeweils drei ITAMs in jeder ζ -Kette und jeweils eine in jeder anderen CD3-Kette, wodurch jeder TZR/CD3-Komplex zehn ITAMs besitzt (Love and Hayes, 2010) (Abb. 1.1). Im Folgenden werden mit Lck und Zap70 die beiden Tyrosinkinase vorgestellt, deren Aktivierungsstatus und Zusammenspiel essentiell für die Signaltransduktion des TZR ist. Einen vertiefenden Einblick in die Initiierung des T-Zell-Signalwegs bietet ein ausführliches Review von Courtney et al. aus dem Jahr 2018 (Courtney et al., 2018).

1.1.2.1 Struktur und Funktion von Lck in der Signalkaskade

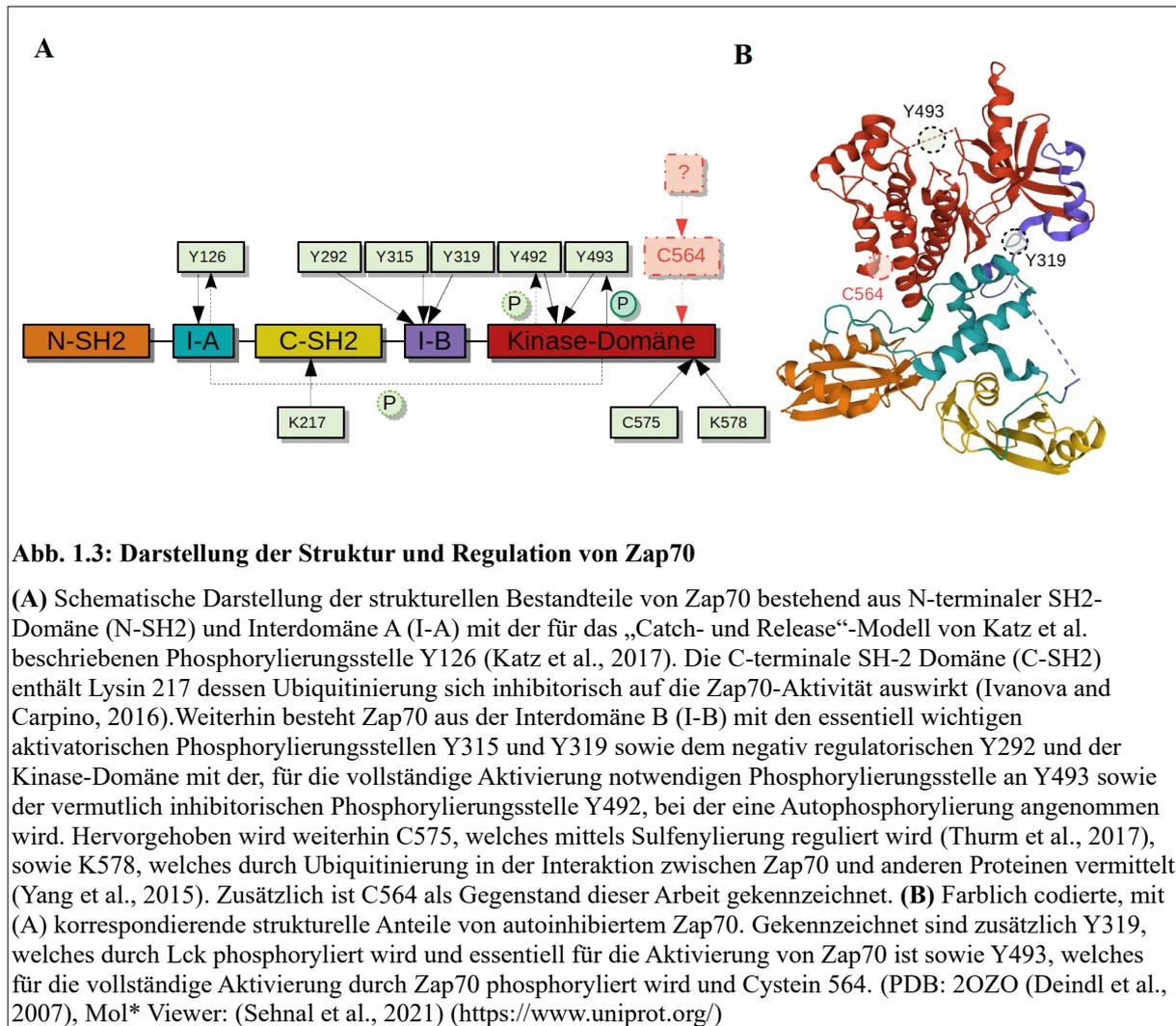
Lck ist ein Mitglied der Src-Familie (*sarcoma*) der Tyrosinkinase und besteht aus einer N-terminalen, myristoylierten und palmitoylierten Region (SH4 Domäne), einer einzigartigen Domäne (unique region), welche unter anderem das regulatorische Serin an Position 59 enthält (Watts et al., 1993), einer SH3-Domäne, die nach neueren Erkenntnissen mit CD3 ϵ interagiert (Hartl et al., 2020), einer SH2-Domäne mit dem nach bisherigen Annahmen möglicherweise negativ regulatorischen Tyrosin 192 (Courtney et al., 2017; Kästle et al. 2020; Kästle et al., 2022), einer Linker-Sequenz, der Kinase-Domäne mit dem für die Aktivierung wichtigen Tyrosin 394, sowie dem negativ regulatorischen C-terminalen Ende, welches das Tyrosin 505 enthält (Bozso et al., 2020) (Abb. 1.2 A).



Lck selbst wird vor allem durch den Phosphorylierungsstatus zweier Tyrosine reguliert und kann in vier verschiedenen Aktivitätsstadien/Konformationen vorliegen (Nika et al., 2010). Y394 ist ein Tyrosin in der Kinase-Domäne von Lck und fungiert, vereinfacht gesagt, als aktivierende Stelle. Y505, welches in der negativen regulatorischen Domäne von Lck liegt, als inhibitorische. Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Form werden durch den Phosphorylierungsstatus dieser beiden Tyrosine bestimmt (Abb. 1.2 B). Ist Y394 dephosphoryliert, aber Y505 phosphoryliert, so befindet sich Lck in inaktivem geschlossenem Zustand. Wird Y505 ebenfalls dephosphoryliert, befindet es sich in geöffnetem, aber inaktivem Zustand („primed state“). Es wird geöffnet und aktiv, wenn Y394 phosphoryliert wird. Unsere Arbeitsgruppe hat zudem demonstriert, dass eine de novo Phosphorylierung auf Y394 nach TZR-Stimulation essentiell für die Initiierung der TZR-Signaltransduktion ist (Stirnweiss et al., 2013; Philipsen et al., 2017). Zusätzlich gibt es eine geöffnete aktive Form, in der beide Tyrosine phosphoryliert sind (Nika et al., 2010). Ein weiteres regulatorisches Tyrosin (Lck Y192) in der SH2-Domäne von Lck ist in den letzten Jahren in den Fokus gerückt (Courtney et al., 2017; Kästle et al., 2020, Kästle et al. 2022). Es besteht die Vermutung, dass eine Phosphorylierung auf Y192 die Funktion von Lck auf mindestens zwei Arten reguliert: Erstens soll sie eine Assoziation mit der Phosphatase CD45 verhindern (Courtney et al., 2017; Kästle et al., 2020), die Lck an Y505 dephosphoryliert, und zweitens reguliert sie die ligandeninduzierte Assoziation mit CD3 ϵ durch Behinderung der Rekrutierung von Lck zum TZR (Kästle et al., 2020). Ein weiteres Modell, das massenspektrometrische Daten der Phosphorylierung von stimulierten und unstimulierten T-Zellen mit und ohne Inhibition der katalytischen Aktivität von Zap70 verglich, legt eine negative Feedback-Schleife zwischen Lck und Zap70 nahe, wobei Zap70 Lck auf Y192 phosphoryliert und eine inhibitorische Wirkung haben könnte (Sjölin-Goodfellow et al., 2015). Tatsächlich zeichnen bisher noch unpublizierte Daten unseres Labors sowie die vorliegende Arbeit ein gegenteiliges Bild. So zeigen sich auch Zap70 negative Zellen unvermindert an Lck Y192 phosphoryliert (Kapitel: 3.2.4). Doppelt durch Lck tyrosinphosphorylierte ITAMs bilden Bindungsstellen für die Tandem-SH2-Domänen (*Src-homology 2*) der Tyrosinkinase Zap70 (Chan et al., 1991). Diese ist in der Lage, nach Bindung der ITAMs auf verschiedenen Wegen das Signal weiterzuleiten. Als Thema dieser Arbeit stelle ich im Folgenden Zap70 detaillierter vor.

1.1.2.2 Struktur und Funktion von Zap70 in der Signalkaskade

Zap70 wurde erstmals 1991 durch Immunopräzipitationen der ζ -Ketten nach Stimulation mit dem TZR-Antikörper C305 von Arthur Weiss' Arbeitsgruppe an der University of California in San Francisco entdeckt (Chan et al., 1991). In einem kürzlich erschienenen Review dieser Arbeitsgruppe wurde der aktuelle Forschungsstand ausführlich zusammengefasst (Au-Yeung et al., 2018). Zusammen mit Syk (*Spleen tyrosine kinase*) bildet Zap70 die Familie der Syk-Tyrosinkinasen (Kong et al., 1995).



Wie in Abbildung 1.3 A dargestellt, besteht Zap70 aus zwei SH2-Domänen, die phosphorylierte Tyrosine in den ITAMs erkennen und binden, sowie zwei Interdomänen und der Kinasedomäne, die für die Aktivierung nachfolgender Proteine des Signalwegs verantwortlich ist. Zap70 liegt im Zytosol überwiegend in einer inaktiven Konformation vor (Abb. 1.3 B), bei der die SH2-Domänen auseinanderweichen und die Interdomänen A und B eng zwischen SH2-Domänen und Kinase-Domäne liegen, wobei Y319 mit dem N-Lobe der katalytischen Domäne interagiert, um die inaktive Konformation zu stützen (Yan et al., 2013). Der „Activation Loop“, welcher Y493 enthält, liegt in der Kinase-Domäne, wobei die Struktur an dieser Stelle noch nicht völlig klar ist, was sich in den gestrichelten Linien des Modells (Abb. 1.3 B) ausdrückt (Deindl et al., 2007). Nach Phosphorylierung der ITAMs durch Lck, bindet Zap70 zuerst mit der C-terminalen SH2-Domäne und anschließend mit der N-terminalen SH2-Domäne an die ITAMs, was zu einer Konformationsänderung und vollständiger ITAM-Bindung führt (Gangopadhyay et al., 2020). Anschließend ist Lck in der Lage, Zap70 in der Interdomäne B an Tyrosin 315 und 319 zu phosphorylieren (Williams et al., 1999). Das ist essentiell für die nachfolgende Autotransphosphorylierung des Activation Loop an Y493 und führt zu einer

vollständigen Aktivierung von Zap70 (Abb. 1.3 A) (Liaunardy-Jopeace et al., 2017). Einige Studien beschreiben zudem eine negativ regulatorische Rolle für Y292 in der Interdomäne B, die sich jedoch nicht auf die Kinaseaktivität oder die Bindung der ζ -Ketten auswirkt. pY292 reguliert die Assoziation mit c-Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma), einer Ubiquitin-Protein-Ligase, die die Degradation von Zap70 reguliert (Wang et al., 2010). Ein weiteres, möglicherweise inhibitorisch wirkendes Tyrosin, das nach Aktivierung des TZR phosphoryliert wird, liegt ebenfalls im Activation Loop (Y492) (Szabo et al., 2012), jedoch ist dessen genaue Regulation bisher ungeklärt.

Zap70 gelangt durch die ITAM-Bindung zur Zellmembran. An der Zellmembran phosphoryliert Zap70 das transmembranöse Adapterprotein Lat (*Linker for activation of T-cells*), ein Protein mit einer langen cytoplasmatischen Domäne, sowie das zytosolische Adaptorprotein SLP-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa*) (Wardenburg et al., 1996).

Der Mechanismus, durch den Zap70 Lat an mindestens vier Tyrosinen (Y132, Y171, Y191, und Y226) phosphoryliert (Yablonski, 2019), ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es gibt zwei Modelle, die nachfolgend erläutert werden, da sie für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit unerlässlich sind. Eine Arbeit von Katz et. al beschreibt das so genannte „Catch and release“-Modell (Abb. 1.4 A). Dieses Modell geht von der Existenz TZR-enthaltender Nanocluster aus, die eng benachbart zu Lat-enthaltenden Nanoclustern liegen. Nach Bindung von Zap70 an die ITAMs, wird Zap70 aktiviert und durch mindestens zwei Mechanismen in seiner Bindungsaffinität zum TZR geschwächt. Zum einen wird Zap70 an Y126 durch Lck oder Autotransphosphorylierung in der Interdomäne A (Abb. 1.3 A) phosphoryliert, zum anderen wird ATP in der Kinasedomäne gebunden. Beide Mechanismen sollen die Ablösung von Zap70 von den ITAMs regulieren. Danach wandert Zap70 auf bisher ungeklärte Art und Weise zu einem benachbarten, verketteten Nanocluster, in welchem Lat enthalten ist (Abb. 1.4 A), um dieses zu phosphorylieren (Katz et al., 2017). Ein anderes Modell, das von der Arbeitsgruppe um Arthur Weiss entwickelt wurde, beschreibt eine Art Brückenbildung mithilfe von Lck zwischen dem TZR und Lat (Abb. 1.4 B). Nach Phosphorylierung der ITAMs und Rekrutierung von Zap70 aktiviert Lck Zap70 durch Phosphorylierung an Y319 und stabilisiert die aktive Form durch Interaktion zwischen der SH2-Domäne von Lck und Zap70 pY319, wodurch zusätzlich Lck selbst in seiner offenen aktiven Form unterstützt wird. Weiterhin bindet die SH3-Domäne von Lck an ein prolinreiches Motiv in Lat und bildet dadurch eine Art Brücke (Abb. 1.4 B), welche die Interaktion von Zap70 und Lat unterstützt und die Phosphorylierung von Lat erleichtert (Lo et al., 2018).

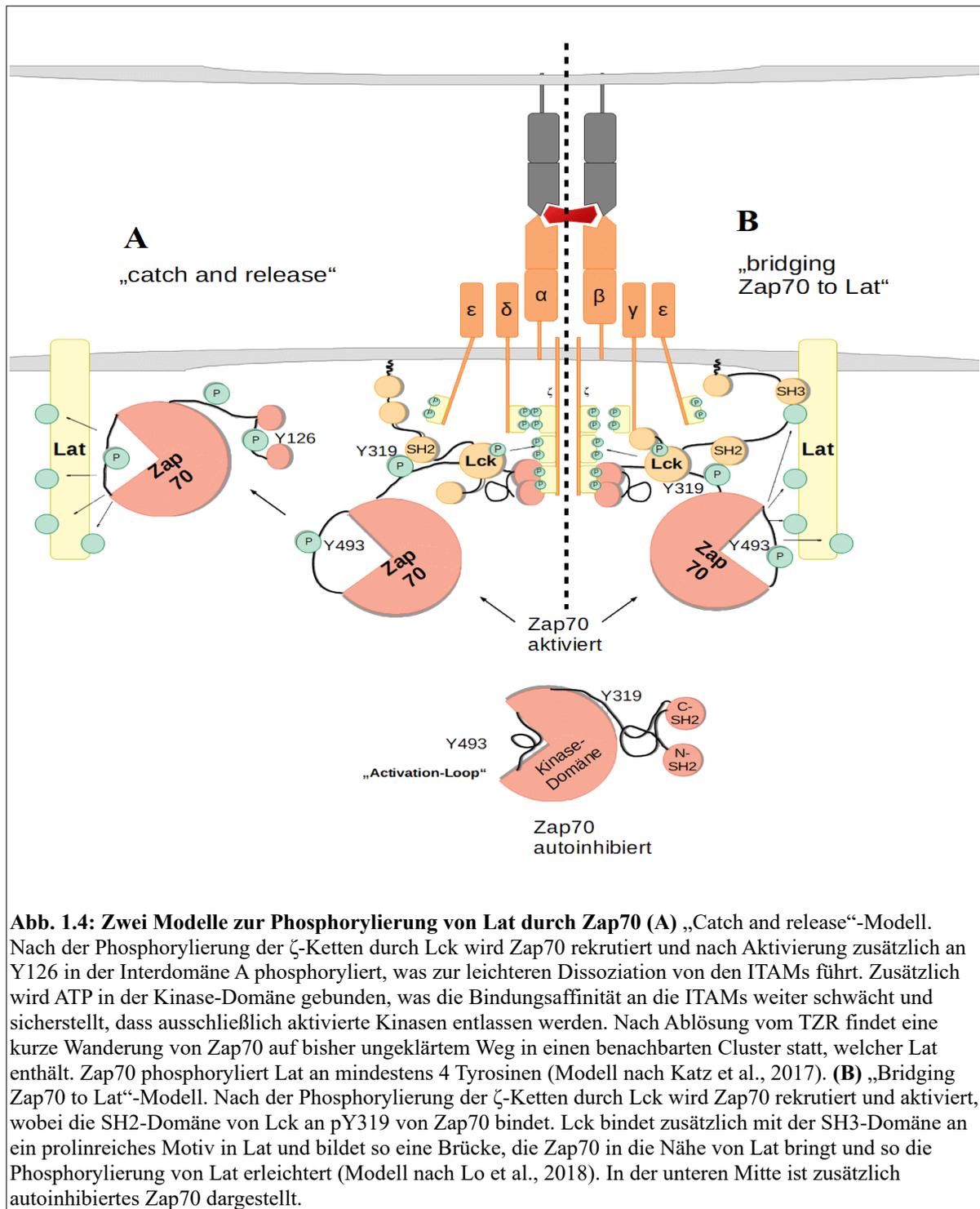


Abb. 1.4: Zwei Modelle zur Phosphorylierung von Lat durch Zap70 (A) „Catch and release“-Modell. Nach der Phosphorylierung der ζ -Ketten durch Lck wird Zap70 rekrutiert und nach Aktivierung zusätzlich an Y126 in der Interdomäne A phosphoryliert, was zur leichteren Dissoziation von den ITAMs führt. Zusätzlich wird ATP in der Kinase-Domäne gebunden, was die Bindungsaffinität an die ITAMs weiter schwächt und sicherstellt, dass ausschließlich aktivierte Kinasen entlassen werden. Nach Ablösung vom TZR findet eine kurze Wanderung von Zap70 auf bisher ungeklärtem Weg in einen benachbarten Cluster statt, welcher Lat enthält. Zap70 phosphoryliert Lat an mindestens 4 Tyrosinen (Modell nach Katz et al., 2017). **(B)** „Bridging Zap70 to Lat“-Modell. Nach der Phosphorylierung der ζ -Ketten durch Lck wird Zap70 rekrutiert und aktiviert, wobei die SH2-Domäne von Lck an pY319 von Zap70 bindet. Lck bindet zusätzlich mit der SH3-Domäne an ein prolinreiches Motiv in Lat und bildet so eine Brücke, die Zap70 in die Nähe von Lat bringt und so die Phosphorylierung von Lat erleichtert (Modell nach Lo et al., 2018). In der unteren Mitte ist zusätzlich autoinhibiertes Zap70 dargestellt.

Die Vielfalt der Signalwege, die durch die Lat-Aktivierung ausgelöst wird, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb im Folgenden nur eine Übersicht dargestellt wird.

1.1.2.3 Signaltransduktion im TZR-Signalweg distal von Lat

Die folgenden Abläufe sind trotz Konzentration auf das Wesentliche komplex und werden daher zusätzlich graphisch in Abb. 1.5 dargestellt.

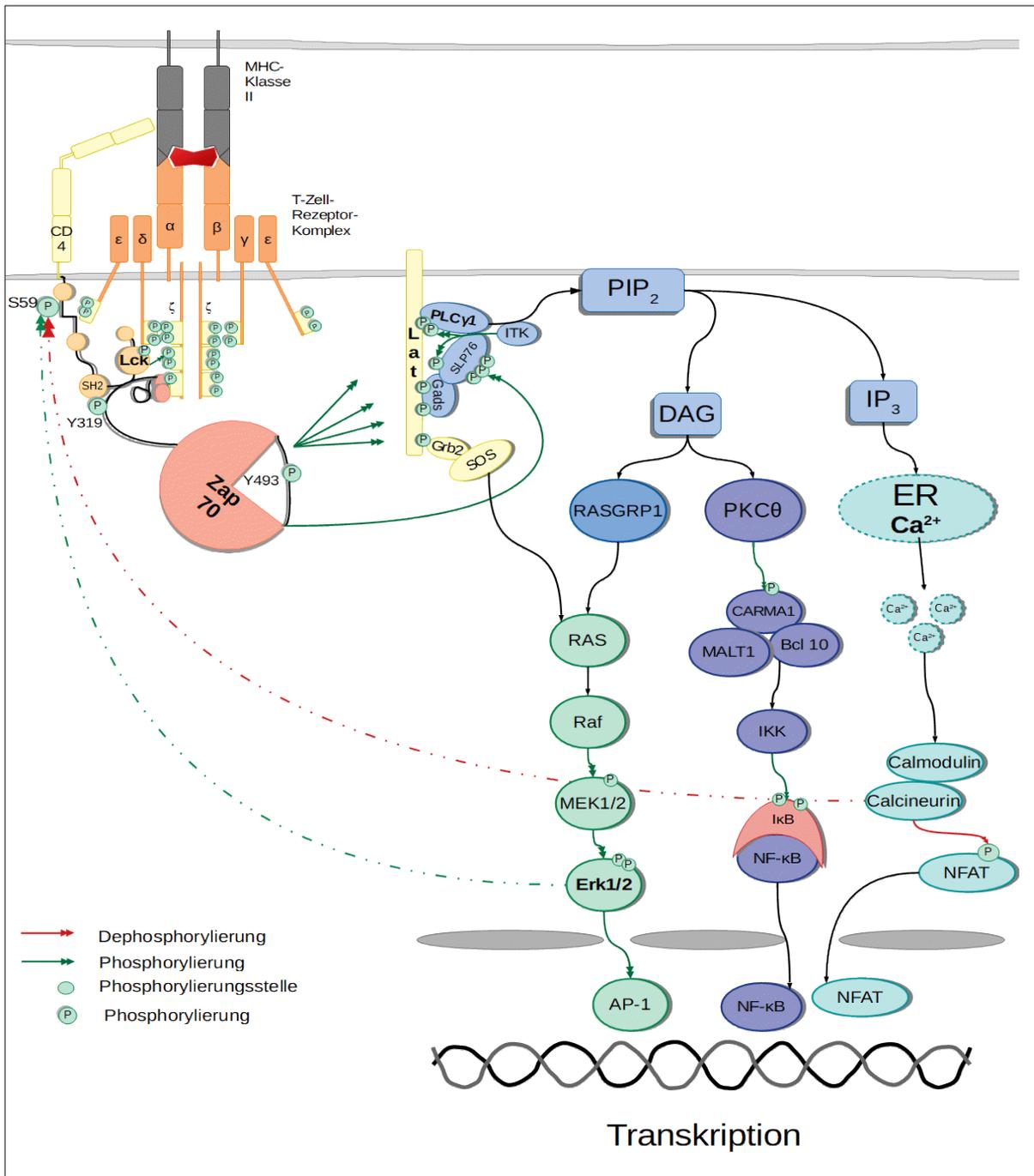


Abb. 1.5: Signaltransduktion des TZR anhand ausgewählter Signalwege

Nach Bindung des TZR wird Lck aktiviert, welches die ITAMs phosphoryliert. Infolge dessen wird Zap70 rekrutiert und aktiviert. Zap70 phosphoryliert Lat und SLP76, welches ITK aktiviert. ITK sorgt im Zusammenspiel mit Zap70 für die Aktivierung von Lat gebundenem PLC γ 1, welches daraufhin durch die Spaltung von PIP $_2$ in DAG und IP $_3$ drei Signalwege auslöst. IP $_3$ sorgt für eine Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER, was zu einer Komplexbildung von Calmodulin und Calcineurin führt, welches NFAT dephosphoryliert und in die Lage versetzt, in den Nukleus zu gelangen. Zudem dephosphoryliert Calcineurin Lck an S59. DAG löst sowohl eine Signalkaskade durch PKC θ aus, welche zu Aktivierung von NF- κ B, führt, als auch eine bekannte Ras-Kaskade, welche zur Aktivierung von Erk1/2 und nachfolgend AP-1 führt. Erk1/2 phosphoryliert zusätzlich Lck auf S59. Durch fett gedruckte Bezeichnungen hervorgehobene Moleküle wurden in dieser Arbeit direkt betrachtet.

Bedeutsam für die Signaltransduktion distal von Zap70 und Lat ist vor allem die Aktivierung des Enzyms PLC γ 1 (Phospholipase C γ 1). PLC γ 1 bildet den Ausgangspunkt mehrerer Signalwege, die Transkriptionsvorgänge auslösen, welche unter anderem Zytokinfreisetzung und Zellwachstum oder -proliferation bewirken. Hierfür ist die Aktivierung von PLC γ 1 wichtig, die im Folgenden beschrieben wird. Beteiligt sind hierbei verschiedene Proteine, die stufenweise aktiviert werden und für die Bindung von PLC γ 1 an Lat und SLP-76 sorgen. SLP76 ist konstitutiv mit dem Adapterprotein Gads (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*) assoziiert. Gads wiederum ist in der Lage, phosphoryliertes Y171 und Y191 von Lat via SH2-Domäne zu binden und hierdurch SLP76 an Lat zu rekrutieren (Yablonski, 2019). Zap70 phosphoryliert SLP76 an drei der N-terminalen Tyrosine (Y112, Y128 und Y145) (Qu et al., 2017). Die Tyrosinkinase ITK (*interleukin-2-inducible T-cell kinase*) phosphoryliert SLP76 auf Y173, was essentiell für die Phosphorylierung an PLC γ 1 Y783 und die Aktivierung von PLC γ 1 durch ITK und Zap70 ist (Bogin et al., 2007; Devkota et al., 2015; Yablonski, 2019). PLC γ 1 katalysiert, nach Aktivierung, an der Membran den Abbau von PIP $_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), wodurch unter anderem der Second messenger IP $_3$ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) entsteht, der die zytosolischen Rezeptoren (IP $_3$ R) bindet, die sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden und dort gespeichertes Calcium ins Zytosol freisetzen (Abb. 1.5). Der Abfall der Calciumkonzentration im ER führt zum Calciumeinstrom durch transmembranäre CRAC-Kanäle (Calcium release activated channels) in der Plasmamembran der Zelle (Parekh and Putney, 2005). Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt durch Calciumbindung von Calmodulin zu einer Komplexbildung mit der Phosphatase Calcineurin, die den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) dephosphoryliert (Abb. 1.5). Nach Dephosphorylierung wandert NFAT in den Zellkern und bewirkt dort die Genexpression von Zytokinen, wie beispielsweise Interleukin 2 (IL-2) (Garcia-Cozar et al., 1998; Minami, 2014). Calcineurin ist zudem kürzlich für seine Phosphatase-Aktivität an Lck S59 bekannt geworden, was vermutlich die Bindung von Lck an Zap70 schwächt (Dutta et al., 2017). Bei der Spaltung von PIP $_2$ entsteht neben IP $_3$ auch Diacylglycerol (DAG). DAG ist wiederum für die Auslösung zweier weiterer Signalwege verantwortlich: erstens für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) und zweitens für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Abb. 1.5). NF- κ B repräsentiert eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum, -proliferation und Apoptose sowie Immunantworten regulieren. DAG aktiviert hierfür die Proteinkinase C Theta (PKC θ), die das Signal mittels Phosphorylierung von Caspase-Rekrutierungsdomänenproteinen (CARD *caspase recruitment domain*) - wie CARMA1 (CARD11/*Caspase recruitment domain containing protein 11*) und mit Stabilisierung des Komplexes durch Bcl10 (*B-cell leukemia 10*), sowie MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) - zum I κ B-Kinase-Komplex (IKK) weiterleitet (Schmitz et al., 2003, Thome et al., 2010). NF- κ B liegt normalerweise an einen Inhibitor (I κ B) gebunden vor, welcher sich durch Phosphorylierung an zwei N-terminalen Serinresten von NF- κ B löst, welches nun in der Lage ist, in den Nukleus zu gelangen und dort beispielsweise spezifische Promotorsequenzen zu

binden (Hayden and Ghosh, 2004). Ein dritter Ast der Signaltransduktion durch PLC γ 1 betrifft die Aktivierung des RASGRP1 (*RAS guanyl releasing protein 1*) durch DAG (Abb. 1.5) (Topham and Prescott, 2001). RASGRP1 fungiert als „nucleotide exchange factor“, indem er an Ras (*Rat sarcoma*) gebundenes GDP zu GTP umsetzt (Stone, 2011). Die GTPase-Ras setzt nun eine enzymatische Kaskade aus mehreren Kinasen in Gang, an deren Ende die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) Erk (*extracellular signal regulated kinase*) 1 und 2 steht (Eblen, 2018). Erk 1/2 wird mithilfe von MEK (*MAPK/Erk-kinase*) 1/2 an Y204 und T202 phosphoryliert (Roskoski, 2012), wodurch Erk in der Lage ist, diverse Transkriptionsfaktoren (z.B. AP1) (Whitmarsh and Davis, 1996) zu phosphorylieren und zu aktivieren. Zudem fungiert die Kinase Erk als Regulator von Lck, indem es Lck in der Unique-Domain an S59 phosphoryliert. Diesbezüglich sind die funktionellen Konsequenzen noch nicht vollständig geklärt (Watts et al., 1993; Poltorak et al., 2013; Dutta et al., 2017). Sichtbar wird diese Phosphorylierung, wenn man sich die Lck-Immunoblots der vorliegenden Arbeit anschaut, bei denen eine deutliche Verschiebung (59 kDa) aktivierter Lck Moleküle nach Stimulation hinsichtlich des Proteingewichts stattfindet (vgl. Abb. 3.8). Über einen komplexen Mechanismus ist Erk in der Lage eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, die unter dem Begriff AP-1 (*activator protein-1*) zusammengefasst werden können. Diese wirken sich auf T-Zellaktivierung und -differenzierung aus (Shaulian and Karin, 2002; Atsaves et al., 2019). Neben den zahlreichen Aktivierungswegen über PLC γ 1, gibt es noch einen weiteren, wichtigen Signalweg zur Aktivierung der Ras-Kaskade, ausgehend von Lat. Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) ist in der Lage mit seiner SH-2 Domäne an Lat Y226 (Yablonski, 2019) zu binden und mit seiner SH3 Domäne mit prolinreichen Regionen von SOS1 (*Son of sevenless*) zu interagieren (Houtman et al., 2006). Der SOS1/Grb2-Komplex aktiviert ebenfalls via Ras die Signalkaskade, die zur Aktivierung von Erk 1/2 führt (Eblen, 2018). Erk 1/2 kann also auf mehreren Wegen aktiviert werden, jedoch mit unterschiedlichen Zielen. Wie von unserer Arbeitsgruppe publiziert, wirken die RASGRP1- und SOS1-vermittelten Wege synergistisch (Warnecke et al., 2012; Poltorak et al., 2014). Im Gegensatz dazu ist SOS1 essentiell für eine IL2-vermittelte Erk-Aktivierung, RASGRP1 jedoch nicht.

Aufgrund der essentiellen Funktion von Zap70 innerhalb der Signalkaskade ist die Vergesellschaftung von Funktionsstörungen und Leukämien mit Störungen von Zap70 plausibel. Im Folgenden möchte ich die wichtigsten Erkrankungen kurz vorstellen.

1.2 Mit Zap70 assoziierte Erkrankungen

Zap70 ist mit einer Vielzahl genetischer Erkrankungen des Immunsystems assoziiert, von denen viele jedoch eher selten auftreten, da sie überwiegend rezessiv vererbt werden. Am bekanntesten ist die Rolle von Zap70 bei manchen Formen von Immunschwächen, aber auch bei Krebserkrankungen spielt Zap70 eine Rolle, die zunehmend intensiver erforscht wird.

1.2.1 Zap70 in Krebserkrankungen

Obwohl Zap70 vor allem in T- und NK-Zellen exprimiert wird, gibt es einige B-Zell-Tumore, wie chronisch lymphatische Leukämie (CLL), akute lymphatische B-Zell-Leukämie (B-ALL) und Burkitt-Lymphome, die ebenfalls Zap70 exprimieren (Carreras et al., 2005). Die Expression von Zap70 ist hierbei eng mit einer schlechten Prognose assoziiert. Methylierungsanalysen von Zap70 können hier wertvolle Informationen über die Prognose liefern (Claus et al., 2012). Vermutet wird unter anderem, dass Zap70 in CLL-Zellen als Adapterprotein fungiert, das die Signalgebung des BZR erleichtert (Au-Yeung et al., 2018). Eine Immuntherapie, die Zap70 blockiert, scheint also ein vielversprechender Ansatz zu sein. Problematisch ist jedoch die simultane Inhibition von Zap70 in T- und NK-Zellen.

Eine prognostisch negative Markerfunktion bei Überexpression hat Zap70 den gesammelten Daten des Proteinatlas.org nach auch beim papillären Nierenkarzinom. Positiv ist eine Überexpression hingegen bei Endometriumkarzinom und Gebärmutterhalskrebs mit einem Überlebensvorteil von mehreren Jahren (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115085-ZAP70/pathology> abgerufen 28.09.2023).

1.2.2 Zap70 und Autoimmunität

Eine vollständige Zap70 Defizienz führt nicht nur zu Immunschwäche (siehe Kapitel 1.2.3: Zap 70 und Immundefizienz), sondern es gibt auch Hinweise darauf, dass sie für Autoimmunität prädisponiert. Leider fehlte dafür bisher weitgehend die klinische Evidenz, da Kinder, welche daran erkranken, sehr früh einer kurativen hämatopoetischen Stammzelltransplantation unterzogen werden können oder versterben. Jedoch gibt es einen Bericht über ein 4-jähriges Kind mit Colitis und idiopathischer thrombozytopenischer Purpura (Poliani et al., 2013). Diese Symptome sind eher typisch autoimmune Manifestationen. Zudem stellten Chan et al. den interessanten Fall eines Geschwisterpaares vor, die einzigartige Mutationen von Zap70 aufwiesen (Chan et al., 2016), welche jedoch nicht zu Symptomen einer Immunschwäche führten, sondern zu schweren autoimmunen Manifestationen. Beide Kinder waren compound heterozygot für zwei Zap70-Mutationen: eine in der C-terminalen SH-2 Domäne (R192W) und eine in der Kinase-Domäne (R360P). Während die Mutation in der SH2-Domäne vermutlich zu einer reduzierten Bindung von Zap70 an die ζ -Ketten führt, liegt die Mutation in der Kinase-Domäne ausgerechnet im N-Lobe, welcher bei autoinhibiertem Zap70 mit Y319 interagiert. Daher wird eine reduzierte Autoinhibition vermutet. Beide Kinder litten unter bullösem Pemphigoid, der Bruder im Alter von 9 Monaten auch an nephrotischem Syndrom, im Alter von 2 Jahren an

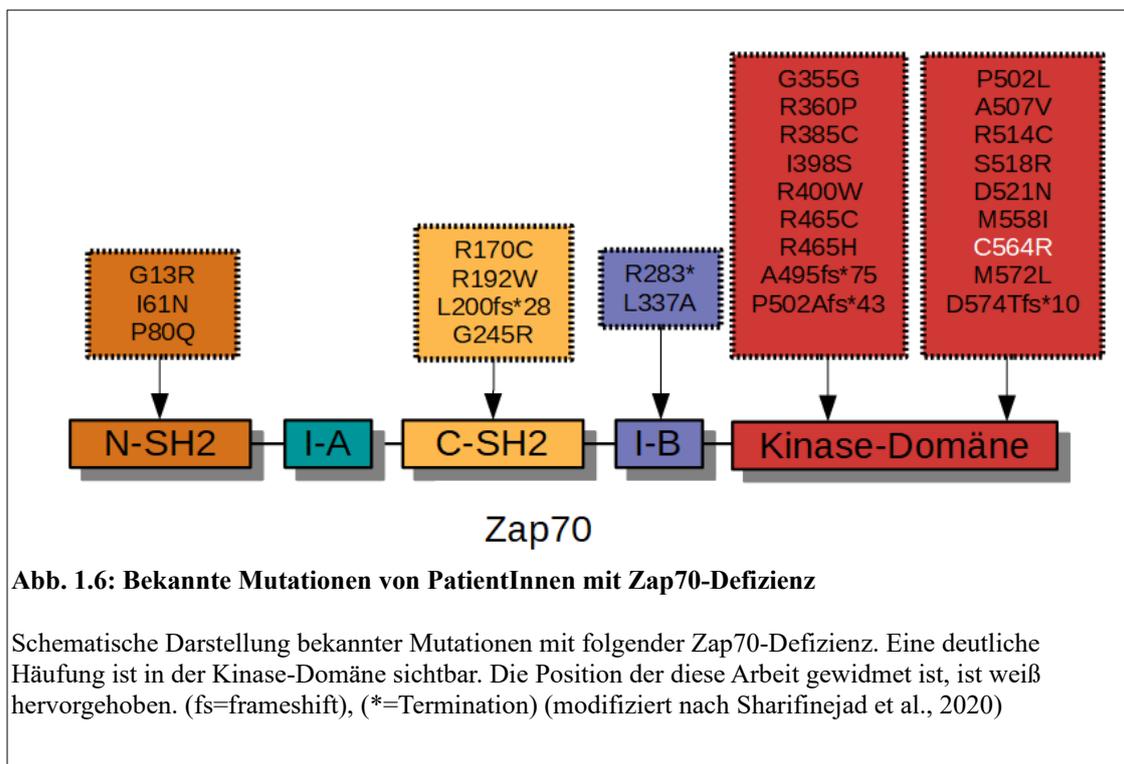
Hämarthrosis durch Faktor VIII-Antikörper und im Alter von 3 Jahren an inflammatorischer Colitis. Eine Behandlung mit Steroiden und anderen Immunsuppressiva blieb auf lange Sicht nicht erfolgreich, so dass er im Alter von 5 Jahren eine Stammzelltransplantation erhielt. Seine Schwester, die schon im Alter von 1 Monat durch generalisierte blasenbildende Hauterscheinungen auffiel und an Gedeihstörungen durch inflammatorische Colitis und Proteinurie litt, erhielt im Alter von 6 und 28 Monaten jeweils eine Stammzelltransplantation und zeigte sich danach soweit gesund (Chan et al., 2016).

1.2.3 Zap70 und Immundefizienz

Immunschwächen gehen mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einher. Ihre Einteilung erfolgt nach verschiedenen Kriterien. Ist vor allem die zelluläre Immunantwort betroffen, spricht man von einem zellulären Immundefekt, sind eher Antikörper und assoziierte Proteine betroffen von einem humoralen Immundefekt. Bei Zap70-assoziiierter Immunschwäche ist vor allem die zelluläre Immunantwort betroffen, die humorale kann aber ebenfalls betroffen sein. Daher wird Zap70-Mangel teilweise unter dem Begriff des „schweren kombinierten“ Immundefekts, teilweise aber auch als eigene Entität geführt.

Der Begriff des schweren kombinierten Immundefektes (SCID, *severe combined immunodeficiency*) umfasst eine Gruppe seltener monogener primärer Immundefektstörungen, die durch Dysfunktion oder den Mangel peripherer T-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Je nach SCID-Form sind B-Lymphozyten vorhanden (T-B+ SCID) oder fehlen (T-B- SCID). Beide Gruppen umfassen mehrere Formen mit oder ohne Natürliche Killerzellen. Die Häufigkeit wird laut Orpha.net auf 1:50.000 Lebendgeburten geschätzt, wobei regionale Unterschiede und Konsanguinität zu berücksichtigen sind. Wegen der Häufigkeit X-chromosomaler Varianten, sind eher Männer betroffen. Seit 2019 gehört ein Test auf SCID zum Neugeborenenenscreening, bei dem aus einem Blutstropfen die Zahl der T-Cell receptor excision circles (TRECs) (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=183660 abgerufen 02.10.2023) bestimmt wird. TRECs sind DNA-Ringstrukturen, die bei Genumlagerungen der TZR-Gensegmente entstehen. Sie werden als Marker für Zellen verwendet, die gerade den Thymus verlassen haben und bei SCID reduziert sind. Hierbei werden jedoch keine SCID-Erkrankungen erfasst, die mit normalen Zellzahlen, aber gestörter Zellfunktion einhergehen. Hierzu gehört auch die Zap70-Defizienz (Farmand et al. AWMF S2k Leitlinie „Diagnostik auf Vorliegen eines primären Immundefekts“ Stand 10/2017). Meist werden die Säuglinge oder Kleinkinder durch Gedeihstörungen und rezidivierende, häufig opportunistische Infektionen der Atemwege auffällig. Die einzige bisher bekannte kurative Therapie ist die Stammzelltransplantation. Genterapeutische kurative Verfahren sind bereits seit den 90er Jahren in Erprobung. So wurde durch die EMA 2016 (Europäische Arzneimittelagentur) als erstes Genterapeutikum „Strimvelis“ zur Therapie des Adenosin-Desaminase-SCID (ADA-SCID) zugelassen, das einen retroviralen Vector mit der ADA cDNA Sequenz enthält.

Zap70-Mangel wird im ICD-Code unter „sonstige kombinierte Immundefekte“ geführt. In wissenschaftlichen Veröffentlichungen findet man es häufig unter dem Oberbegriff „SCID“ oder „Zap70-related-CID“. Diese Erkrankung präsentiert sich ebenfalls mit wiederkehrenden opportunistischen Infektionen, aber auch mit Autoimmunität, Colitis (Parry et al., 1996) und Hautveränderungen durch Akkumulation defekter CD4⁺ T-Zellen (Katamura et al., 1999). Meist zeigt sich eine normale oder nur leicht erhöhte Anzahl von Lymphozyten (B-Zellen und CD3⁺CD4⁺ positiven Zellen), jedoch ein extremer Mangel an CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut. IgG-Titer sind normal oder nur leicht reduziert und IgA und IgM ebenfalls weitgehend normal, jedoch in etwa 11-13% der Fälle reduziert (Sharifinejad et al., 2020). Generell zeigt sich je nach Literaturquelle ein äußerst variables Bild der Symptome, was möglicherweise der geringen Zahl der Betroffenen und der Vielfalt der Mutationen (Abb.1.6) geschuldet ist. In einem Review wurden kürzlich zahlreiche bekannte Fälle aufgearbeitet und genetische Zusammenhänge dargestellt. Hier zeigte sich, dass 18 von 27 Mutationen bei Zap70-Defizienz in der Kinase-Domäne von Zap70 (Position 338-600) lagen (Sharifinejad et al., 2020) (Abb.1.6).



Von speziellem Interesse für diese Arbeit ist hier der Fall eines türkischen Mädchens, dessen Eltern Cousin und Cousine 2. Grades waren. Dieses Kind zeigte eine homozygote loss-of-function Zap70 Mutation der Kinase-Domäne (Cys564Arg) und präsentierte erste Symptome im Alter von 2 Monaten mit Gedeihstörungen, wiederkehrenden Infekten der unteren Atemwege, disseminierter BCG-Infektion nach Tuberkuloseimpfung, oraler Candidose, generalisierten Lymphknotenschwellungen, Thymusaplasie, Hepatosplenomegalie und exfoliativer Dermatitis. Die Diagnose wurde im Alter von

11 Monaten gestellt. Bei Veröffentlichung der Studie befand sich das Kind noch in klinischer Therapie und wartete auf eine Stammzelltransplantation (Turul et al., 2008).

1.2.4 Die Faszination von Zap70 C564

Diese Arbeit soll Licht in das Dunkel um ein möglicherweise regulatorisches Cystein bringen, welches in der Kinase-Domäne von Zap70 liegt. Cystein 564 liegt in der Kinase-Domäne von Zap70 innerhalb eines „RMxCPxxCP“-Motivs mit einigen Prolinen. Dieses Motiv findet sich ebenfalls in den Kinase-Domänen von Syk und Yes. Yes ist eine Tyrosinkinase, die in Zellwachstum und -überleben sowie Apoptose, Adhäsion und Differenzierung involviert ist. Auch in Src und anteilig in Lck findet man Teile des entsprechenden Motivs (Abb. 1.7).

Tyrosinkinase			RMxCPxxCP				
Zap70	556-	K	RMECPPECP	PELY	-569	Kinase-Domäne	338-600
Syk	589-	E	RMGCPAGCP	REMY	-602	Kinase Domäne	371-631
Yes	489-	Y	RMPCPQGCP	ESLH	-502	Kinase Domäne	277-530
Src	482-	Y	RMPCPPECP	ESLH	-495	Kinase Domäne	270-523
Lck	457-	Y	RMVRPDNCP	EELY	-470	Kinase Domäne	245-498

Abb. 1.7: Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen Zap70, Syk, Yes, Src und Lck Vergleich des RMxCPxxCP-Motivs in den Kinase-Domänen der verwandten Tyrosinkinasen Zap70, Syk, Yes, Src und Lck. Die Boxen markieren gemeinsame Aminosäuren innerhalb des Motivs. Cysteine des Motivs über die bereits Literatur betreffend ihrer Relevanz vorliegt, sind rot hervorgehoben. Sequenzen: <https://www.uniprot.org/>

Das Motiv liegt in allen genannten Proteinen - abgesehen von Yes bei dem die Struktur noch nicht aufgeklärt ist - als strangartige Verbindung zwischen zwei Helixmotiven. Die Gemeinsamkeit in der Sequenz und Struktur, die diese fünf Kinasen an dieser Stelle besitzen, könnte auf eine wichtige, eventuell regulatorische Funktion hindeuten. Als essentiell für die Tyrosinkinaseaktivität von Lck wurde bereits 1993 das hier im Motiv enthaltene Lck C465 (dort als Lck C464 bezeichnet) beschrieben. Eine Mutation zu Alanin führte zum vollständigen Verlust der Lck-Aktivität (Veillette et al., 1993). Auch für Src C486 liegen Daten zu reduzierter Aktivität nach Mutation zu Alanin vor (Oo et al., 2003 dort C487). Zwei der von Sharifinejad et al. beschriebenen Zap70-Mutationen, die zu einem SCID-artigen Krankheitsbild führen, liegen innerhalb dieses Motivs: M558I und C564R (siehe Abb. 1.6). Weiter oben habe ich bereits den Fall eines Mädchens beschrieben, bei welchem eine Mutation des Cysteins 564 zu Arginin eine fulminante Form des Zap70-related CID auslöste (Turul et al., 2008). Eine texanische Arbeitsgruppe untersuchte kürzlich die molekularen Mechanismen dieser Form von SCID (Tewari et al., 2021). Die Autoren generierten eine Zap70^{C564R}-Mutante welche stabil in Zap70-defizienten Jurkat-T-Zellen der Linie P116 exprimiert wurden. Die Daten zeigten, dass Zap70^{C564R} (I) keine veränderte enzymatische Aktivität aufweist, (II) nach TZR-Stimulation regelhaft an die Plasmamembran rekrutiert wird, (III) an Y319 und Y493 hyperphosphoryliert wird und (IV) eine

vermehrte Assoziation mit Lck zeigt. Obwohl die enzymatische Aktivität erhalten blieb war Zap70^{C564R} nicht in der Lage, das TZR-Signal weiterzuleiten, was sich in einer Blockade der Phosphorylierung seiner Substrate Lat und SLP76, sowie in einem distalen Signalabbruch nach Phosphorylierung von Zap70 Y493 zeigte. Zusätzliche mechanistische Analysen ergaben, dass C564 S-Acyliert (palmitoyliert) wird. Die S-Acylierung (Palmitoylierung) soll die Annäherung von Zap70 an Lat und SLP76 ermöglichen. Dies wäre ein weiterer Mechanismus, der das „Catch and release“ Modell unterstützt (Katz et al., 2017). Zusammengefasst weisen diese Daten auf einen neuen Mechanismus der Regulation der T-Zell-Aktivierung hin und erklären die induzierte Immundefizienz durch die C564R-Mutation auf molekularer Ebene (Tewari et al., 2021).

1.3 Ziel der Arbeit

Während der letzten Jahrzehnte zogen Cysteinreste vermehrt Aufmerksamkeit auf sich, da sie eine regulatorische Rolle der Aktivität vieler Enzyme übernehmen (Poole and Nelson, 2008). Zunehmendes Interesse galt hierbei Cysteinen außerhalb des katalytischen Zentrums von Enzymen, insbesondere in Tyrosinkinase (Corcoran and Cotter, 2013). Wegen ihrer Thiolgruppe sind Cysteine häufig Teil verschiedener Redoxreaktionen wie Sulfenylierungen, Nitrosylierungen und Gluthationylierungen. Diese bemerkenswerten Eigenschaften prädestinieren Cysteinreste dafür, Proteinstrukturen und ihre Funktion zu beeinflussen. Die Regulation von Tyrosinkinase durch Oxidation von Cysteinresten wurde unter anderem für c-Src (Giannoni et al., 2005; Rahman et al., 2010), c-Abl (Leonberg and Chai, 2007a), Lyn (Yoo et al., 2011) und EGFR (Paulsen et al., 2011) sowie für die Tyrosinphosphatase PTP1B (Barrett et al., 1999) gezeigt. Eine Reihe von Medikamenten zur Regulation von Tyrosinkinase ist bereits auf dem Markt oder in der Entwicklung (siehe Kapitel 4.4). Die Identifizierung funktionell relevanter Cysteinreste ist demnach nicht nur für das bessere biologische Verständnis unseres Immunsystems relevant, sondern ebenso für zukünftige, therapeutische Ansätze. In dieser Arbeit widme ich mich deshalb einem möglicherweise regulatorischen Cysteinrest (C564) innerhalb der Kinasedomäne von Zap70. Tewari et al. postulierten, dass die Palmitoylierung von C564 relevant ist, um die Annäherung von Zap70 an Lat zu ermöglichen. Dies wäre ein weiterer Beitrag zur Unterstützung des „Catch and release“-Modells (Abb. 1.4 und Abb. 1.8) (Katz et al., 2017). Der Verlust der Palmitoylierung durch die C → R-Mutation führt zur mangelnden Translokation von Zap70 an die Zellmembran und so zur fehlenden Phosphorylierung der Zap70 Substrate Lat und SLP76. Ich vermutete, dass der Defekt von Zap70^{C564R} eher durch seine speziellen chemischen Eigenschaften entsteht. Eine Mutation von Cystein zu Arginin, also von einer leicht polaren zu einer basischen Aminosäure, die zudem deutlich größer ist als Cystein, ist eine tiefgreifende Veränderung innerhalb der Aminosäurekette, die Zap70 in seiner Funktion deutlich beeinträchtigen dürfte. Die Mutation zu Arginin erklärt zwar die Symptome der Erkrankung des Mädchens, jedoch keineswegs die Funktion von C564. Der Analyse der Funktion und der Frage, ob eine S-Acylierung von C564 relevant für die Rekrutierung an die Zellmembran und die weitere

Signaltransduktion ist, widmet sich die vorliegende Arbeit. Für eine optimale Vergleichbarkeit wählte ich ebenfalls das Modell der Zap70 defizienten Jurkat T-Zelllinie P116. Anstelle einer Argininmutation, jedoch eine Alaninmutation. Alanin ist eine unpolare Aminosäure, die dem Cystein an Position C564 strukturell ähnlicher ist und keine unerwünschten tiefgreifenden Veränderungen der Struktur von Zap70 hervorrufen sollte. Der Ersatz eines Cysteins durch Alanin entspricht zudem dem konventionellen Weg, um die Funktion eines Cysteinrestes sowie die Funktion möglicher post-translationaler Modifikationen zu untersuchen. Für diese Arbeit wurden Zap70-defiziente P116 Zellen mit stabiler Expression von Zap70 Wildtyp ($Zap70^{WT}$) oder $Zap70^{C564A}$ erstellt. Als Negativkontrolle wurden P116-Zellen mit einem leeren Vektor ($Zap70^{Neg}$) versehen. Um die versehentliche Selektion individueller Klone, die eine zufällige Integration in das Genom enthalten und somit die Funktion zellulärer Gene verändern könnten, auszuschließen, werden hier Massenkulturen statt Einzellzellklonkulturen verwendet.

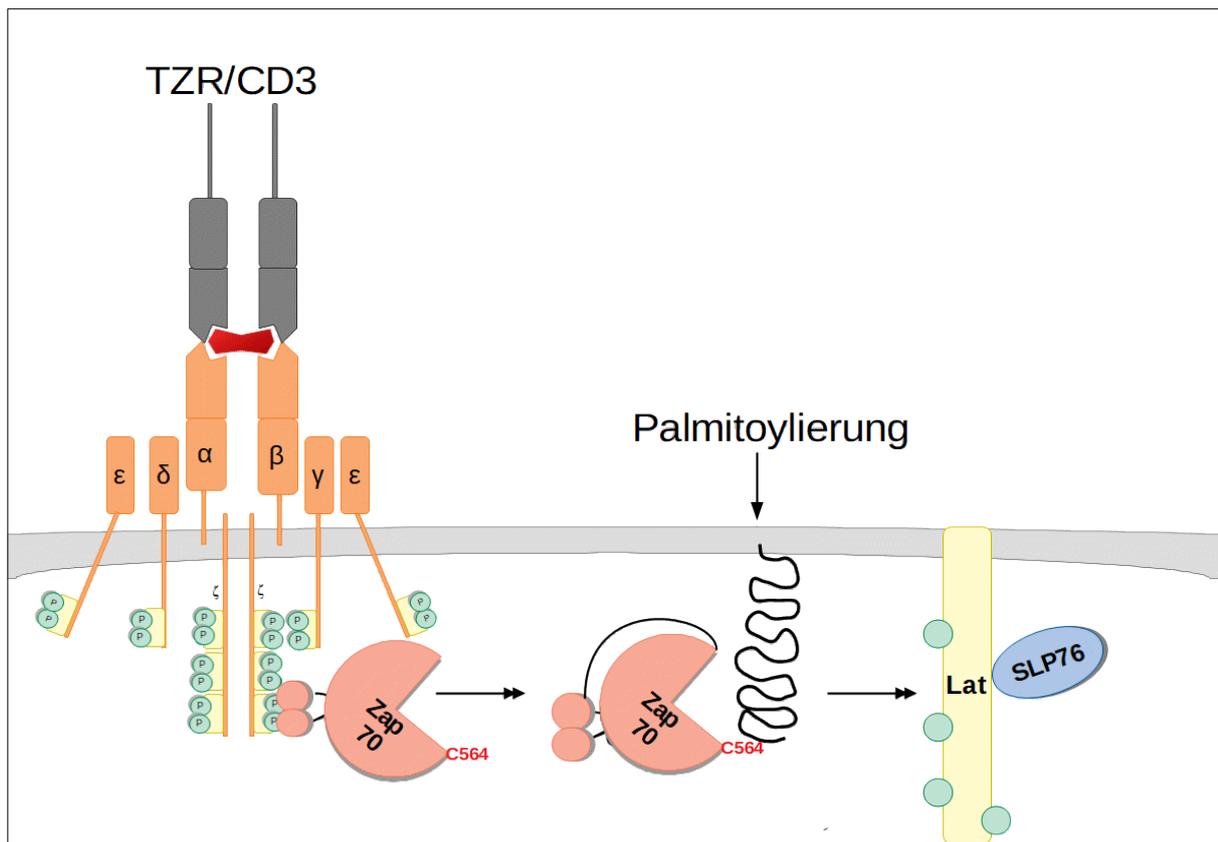


Abb. 1.8: Palmitoylierungskonzept nach Tewari et al. 2020 Postuliertes Modell von Tewari et al., nachdem die Palmitoylierung von C564 essentiell für die nachfolgende Aktivierung der Zap70 Substrate Lat und SLP76 ist. Nach Aktivierung des TZR und Bindung von Zap70 an die ITAMs wird Zap70 mittels Palmitoylierung an der Zellmembran gehalten, um nachfolgend Lat und SLP76 zu phosphorylieren (Tewari et al., 2021).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Antikörper und andere Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: genutzte Chemikalien und Hersteller

Chemikalie	Hersteller
DMSO	Sigma Aldrich
n-Dodecyl- β -D-maltosid	Chem Cruz
Indo-1 AM	Life Technologies GmbH
Ionomycin	Sigma Aldrich
Milchpulver	Carl Roth GmbH
PBS	Merck Millipore
Protein G Plus Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein A Plus Agarose	Santa Cruz Biotechnology

2.1.2 Antikörper für Western-Blots und Immunopräzipitation

Tabelle 2.2: Antikörper für Western-Blot und Immunopräzipitation (WB:Western-Blot; IP: Immunopräzipitation)

Antikörper	Ursprung	Klon	Hersteller	Applikation
Monoklonaler Anti- β -Actin	Maus	AC-15	Sigma-Aldrich	WB
CD3 ϵ	Ziege	-	Everest Biotech Ltd	WB
Anti-Maus IgG+IgM	Ziege	-	Dianova	Beschichtung
Lck	Maus	3A5	Santa Cruz	IP/WB
Lck	Hase	-	Merck Millipore, upstate	IP/WB
Lck	Ziege	-	Sigma-Aldrich	WB
Phospho-LAT (Y191)	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-Lck Y505	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-Lck Y192	Hase	-	Biozol	WB
Phospho-PLC γ 1 Y783	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Hase	D13.14.4E	Cell Signaling Technology	WB

Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Hase	D3F9	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-Src Y416	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-Tyrosin	Maus	4G10		WB
Phospho-CD3 ζ Y142	Hase	-	Sigma-Aldrich	WB
Phospho-Zap-70 (Y319)	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Phospho-Zap-70 (Y493)	Hase	-	Cell Signaling Technology	WB
Zap70	Maus	1E7.2	Santa Cruz Biotechnology	IP/WB
Zap70	Hase	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
CD3 ζ	Maus	6B10.2	Santa Cruz Biotechnology	IP

2.1.3 Antikörper für Analyse und Sortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Tabelle 2.3 Antikörper für FACS-Analyse und FACS-Sorting

Antikörper	Ursprung	Klon	Hersteller
APC Anti-Human CD3	Maus	HIT3a	BD Pharmingen™
APC Anti-Human CD69	Maus	FN 50	BD Pharmingen™

2.1.4 Antikörper für Stimulation

Tabelle 2.4. Antikörper für Stimulation des T-Zell-Rezeptors

Antikörper	Ursprung	Klon	Hersteller
Jurkat T-Cell Rezeptor	Maus	C305	Laboreigene Hybridoma-Zellen
Anti-Human CD3	Maus	UCHT1	BioLegend

2.1.5 Prozedurale Sets

- NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel)
- ADP-Glo™ Kinase-Assay (Promega-Corporation)

2.2 Plasmide

Tabelle 2.5 Plasmide

Plasmid	Hersteller	Experimenteller Name
pPB-Puro-EF1A-Zap70: T2A: EGFP C564A	Zur Verfügung gestellt von Aqif Siddique	Zap70 C564A
pPB[Exp]-Puro-EF1A>hZAP70:T2A:EGFP	Vector builder	Zap70 Wildtyp
pPB[Exp]-Puro-EF1A>EGFP	Vector builder	Zap70 Neg.

pRP[Exp]-mCherry-EF1A>hyPBase	Vector builder	Transposase
pEYFP-N1 Zap70	Zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Thurm	Zap70 Wildtyp
pEYFP-N1 Zap70 „C564A“	Zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Thurm	Zap70 C564A
pEFBos	Institutsintern, Ursprung: (Mizushima and Nagata, 1990)	Leerer Vektor
pEF-Lck_Y394F-IRES-GFP	Zur Verfügung gestellt von M. Kästle	Lck mit defekter Kinase-Domäne

Für die Mutagenese wurden folgende Primer der Firma Biomers verwendet:

Primer vorwärts	Primer rückwärts
tacagtctgggtggagcctctggtgggcactc	gagtgccaccagaggctccaccgaactgta

Für die ortsspezifische Mutagenese des PiggyBac-Plasmid-Systems, wurden die Anweisungen der Herstellers befolgt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung der Firma Star Sequenzing in Mainz bestätigt.

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Blotting Puffer

- 47,9 mM Tris (Carl Roth GmbH)
- 39 mM Glycin (Carl Roth GmbH)
- ~0,0375% SDS (Carl Roth GmbH)
- 20% Methanol (J.T. Baker)
- 80% Aqua dest (Braun Melsungen AG)

2.3.2 Laufpuffer für SDS-Page (BioRad Laboratories)

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycine
- 0,1% SDS

2.3.3 Lysepuffer

- 1% IGEPAL (Sigma Aldrich)
- 1% n-Dodecyl- β -D-maltosid (LM) (Santa Cruz Biotechnology)
- 50mM Tris pH 7,5 (Carl Roth GmbH)
- 165mM NaCL (Carl Roth GmbH)
- 10mM NaF (Carl Roth GmbH)
- 10mM EDTA (Carl Roth GmbH)
- 1mM Natriumorthovanadat (Fluka)
- 1mM PMSF (Sigma-Aldrich)

2.3.4 Brij-Lysepuffer

- 10% Brij™-58 Surfact Amps™ Detergenz (Thermo Fisher Scientific)
- 150 mM NaCl (Carl Roth GmbH)
- 10 mM NaF (Carl Roth GmbH)
- 150 mM Tris pH 7,5 (Carl Roth GmbH)
- 1% PMSF (Sigma-Aldrich)
- 1 mM Natriumorthovanadat (Fluka)
- 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Adrich)

2.3.5 Waschpuffer für Immunopräzipitationen

- 50 mM Tris pH 7,5 (Carl Roth GmbH)
- 165 mM NaCl (Carl Roth GmbH)
- 10 mM NaF(Carl Roth GmbH)
- 1% Brij™-58 Surfact Amps™ Detergenz (Thermo Fisher Scientific)
- 1% LM (Calbiochem)

2.3.6 Tyrosinkinasepuffer

- 40 mM Tris pH 7,5 (Carl Roth GmbH)
- 20 mM MgCl x6H₂O (Carl Roth GmbH)
- 2 mM Mn Cl₂ (Sigma-Adrich)
- 0,5 mM DTT (Thermo Fisher Scientific)
- 0,1% BSA (Sigma-Aldrich)

2.3.7 Waschpuffer für Kinase-Assay

- 1% Brij™-58 Surfact Amps™ Detergenz (Thermo Fisher Scientific)
- 50 mM Tris pH 7,5 (Carl Roth GmbH)
- 165 mM NaCl (Carl Roth GmbH)

2.3.8 5x- SDS-Probenpuffer

- 420 mM Tris pH 6,8 (Carl Roth GmbH)
- 3,4 mM SDS (Carl Roth GmbH)
- 29,2% Glycerol (Merck)
- 6 mM DTT (Thermo Fisher Scientific)
- 1,4 mM Bromphenolblau (Carl Roth GmbH)

2.3.9 SDS-PAGE Trenngel (10%)

- 369 mM Tris pH 8.8 (Carl Roth GmbH)
- 10% Acrylamid (Carl Roth GmbH)
- 0,1% SDS (Carl Roth GmbH)

- 0,1% APS (Carl Roth GmbH)
- 1% Temed (Carl Roth GmbH)

2.3.10 SDS-PAGE Sammelgel

- 125mM Tris pH 6,8
- 5% Acrylamid (Carl Roth GmbH)
- 0,1% SDS (Carl Roth GmbH)
- 0,1% APS (Carl Roth GmbH)
- 1% TEMED (Carl Roth GmbH)

2.3.11 TBS-Puffer pH 7,5

- 10 mM Tris (Carl Roth GmbH)
- 150 mM NaCl (Carl Roth GmbH)

2.3.12 TBS-Waschpuffer für Membranen

- TBS
- 0,2% Tween® 20 (Carl Roth GmbH)

2.3.13 Reagenz zum Blocken von Membranen und als Grundlage für Antikörper-Puffer

- TBS
- BSA (Sigma Aldrich) oder Milchpulver (Carl Roth GmbH) in 5% Lösung

2.4 Zellkulturen

2.4.1 Jurkat T-Zellen

Jurkat-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie humaner T-Lymphozyten, die vor allem in der *in vitro* Forschung der T-Zell-Leukämie sowie der Erforschung von Signaltransduktionen und der HIV-Forschung verwendet werden. Ursprünglich „JM“ genannt, wurde sie in den 1970er Jahren aus dem Blut eines 14-Jährigen mit T-Zell-Leukämie gewonnen (Schneider et al., 1977) und seitdem immer wieder durch Deletionen einzelner Proteine verändert. P116 T-Zellen, eine Zap-70 defiziente Zelllinie der Jurkat-Zellen (Williams et al., 1998), J.Lck, eine Lck-defiziente Jurkat-Zelllinie (Courtney et al., 2017) sowie die mit Zap70 oder dem leeren Vektor rekonstituierten Zellen wurden konstant bei Konzentrationen zwischen $1-6 \times 10^5$ Zellen/ml in einem Inkubator (Labotech) mit konstanter Temperatur von 37°C, CO₂-Konzentration von 5%, Luftfeuchtigkeit von 85%, sowie einer Sauerstoffkonzentration von 21% kultiviert. Während die P116 T-Zellen in einem Medium bestehend aus einer speziellen Zusammensetzung von RPMI 1640 (Pan Biotech), 10% FBS (Sigma-Aldrich) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden, enthielt das Medium der rekonstituierten Zellen

zusätzlich 0,5µg/ml Puromycin (Gibco Life technologies) zur Selektion mithilfe der plasmidkodierte Puromycinresistenz.

2.4.2 HEK^{293T}-Zellen

Die adhärenzte Zelllinie HEK²⁹³ (human embryonic kidney cells) ist aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften unverzichtbar, wenn es um die Erforschung von Signaltransduktion und Protein-Interaktionen geht. Zudem wird sie in der Entwicklung von Impfstoffen und zur Produktion rekombinanter Adenovirus-Vektoren verwendet. Die Zellen wurden 1973 aus embryonalen Nierengewebezellen (Lin et al., 2014) gewonnen und mittels Adenovirus-DNA-Fragmenten (Ad5) transformiert (Russell et al., 1977). Dadurch gelangte ein etwa 4 kbp großes Genomfragment in die Zellen und integrierte sich in Chromosom 19. Dieses codiert für das E1A/E1B-Protein, das zur Überwindung des Checkpoints in der G₀-Phase des Zellzyklus führt und so die Zellen immortalisiert (Guan and Ricciardi, 2012). Die Variante HEK^{293T} (ursprünglich „293/tsA1609neo“), die 1986 in Stanford entstand, exprimiert zusätzlich eine Variante des „großen T-Antigens“ aus dem Simianvirus 40 (DuBridge et al., 1987), welches die DNA-Replikation von viralen Plasmiden mit dem entsprechenden Replikationsursprung ermöglicht. So lassen sich beispielsweise Lentiviren in 293T-Zellen vermehren. HEK^{293T}-Zellen prägen normalerweise keinen TZR-Komplex aus, weshalb für die Experimente eine kürzlich generierte HEK-TZR-Zelllinie genutzt wurde (James and Vale, 2012). Die Zellen wurden in DMEM-Medium (Pan Biotech) sowie mit dem gleichen Anteil an FBS und Penicillin/Streptomycin kultiviert wie auch alle anderen hier verwendeten Zellkulturen. TZR-positive HEK-Zellen, die den Lck-Wildtyp exprimierten, wurden durch M. Kästle zur Verfügung gestellt und dauerhaft durch zusätzliche 0,5µg/ml Puromycin selektiert (Kästle et al., 2020).

2.4.3 Titration der Puromycinresistenz

Um eine sichere Selektion der gewünschten, puromycinresistenten Zellen zu gewährleisten, ermittelte ich mittels Verdünnungsreihen von Puromycin in P116 Zellkulturen mit den tabellarisch dargestellten Konzentrationen sowie mit den puromycinresistenten Zellen in entsprechend höheren Konzentrationen die gewünschte Selektionsgrenze, indem ich in regelmäßigen Abständen mittels FACS-Analyse die prozentualen Anteile lebender Zellen maß.

Tabelle 2.6 Puromycintitration P116-Zellen

Puromycin-Konzentration in µg/ml	Kontrolle	0,04	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10
Anteile lebender Zellen nach 4 Tagen in %	92,99	88,3	76,03	6,14	0,61	0,16	0,08	0,15	0,05	0,08

Tabelle 2.7 Puromycintitration rekonstituierter Zellen

Puromycin-konzentration in µg/ml	0,5	2,5	3,5	5
Anteile lebender Zellen nach 24h in %				
Zap70 ^{C564A}	90,76	84,98	85,31	80,93
Zap70 ^{WT}	92,55	88,81	87,64	84,77
Zap70 ^{Neg}	91,86	88,97	88,78	86,62
Anteil lebender Zellen nach 48h in %				
Zap70 ^{C564A}	93,23	90,03	86,57	82,42
Zap70 ^{WT}	94,45	92,68	91,93	89,48
Zap70 ^{Neg}	94,33	92,50	92,04	89,98
Anteil lebender Zellen nach 4 Tagen in %				
Zap70 ^{C564A}	79,98	78,05	82,31	83,89
Zap70 ^{WT}	71,37	67,43	69,51	71,36
Zap70 ^{Neg}	71,47	73,85	74,24	72,94

Die experimentell ermittelten Ergebnisse zeigten, dass eine Puromycinkonzentration von 0,5µg/ml ausreicht, um eine nahezu vollständige Elimination nativer P116-Zellen zu gewährleisten, während sich bei dieser Konzentration gleichzeitig eine hohe Verträglichkeit durch die puromycinresistenten Zellen zeigt.

2.5 Plasmidpräparation mittels Maxi-Prep

Die Präparation der benötigten Plasmide aus vorhandenen Glycerolstocks wurde mittels NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Die gewonnene Plasmidmenge, sowie der Reinheitsgrad wurden mittels Nano-Drop-Spektralphotometrie (Thermo Fisher) quantifiziert.

2.6 Transformation

Zur Vervielfältigung von genutzter Plasmid-DNA, wurde die Kompetenz von E.coli-Bakterien (invitrogen One Shot ® von Thermo Fisher scientific) genutzt, fremde DNA aufzunehmen. 50 µl der Bakterien wurden mit 50 µl Calciumchlorid (50mM) behandelt, die DNA hinzugefügt und 10 Min. bei 0-4°C inkubiert. Anschließend erfolgt ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C während einer Zentrifugation bei 300rpm. Nach weiteren 5 Min. Kühlung wurden 400 µl SOC-Medium (Super-Optimal Broth with Catabolite Repression von Thermo Fisher scientific) zugegeben und eine Stunde bei 37°C, 1000 rpm inkubiert. 50% des Produkts wurden anschließend auf einer Nährbodenplatte

(Luria-Bertani Agar; Sigma-Aldrich) mit entsprechender Selektionsresistenz ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.7 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man in der Zellbiologie das Einbringen von zellfremdem genetischen Material (RNA oder DNA) in eukaryotische Zellen. Hierbei wird zwischen dem zeitweiligen Einbringen in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion) unterschieden. Die Transfektion führt zur Bildung des codierten Genproduktes. Je nach Methode erhält man unterschiedliche Mengen transfizierter und/oder lebender Zellen. So sind besonders die physikalischen Transfektionsmethoden - wie beispielsweise die Elektroporation - mit enormem Zellstress verbunden, der zu einer Vielzahl toter Zellen führt. Transient transfizierte Zellen sind zudem nur kurzzeitig experimentell verwendbar, da die Fähigkeit der Ausprägung der entsprechend codierten Proteine nur kurzzeitig anhält.

2.7.1 Generierung stabiler Zelllinien

Um optimale Bedingungen in Bezug auf die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Zelllinien herzustellen und zeitgleich große Mengen transfizierter Zellen mit möglichst geringem Anteil toter Zellen zu erhalten, nutzte ich die Möglichkeit, stabile Zelllinien mithilfe des PiggyBac (pB)-Systems zu generieren. Das System beruht auf der Nutzung von Transposons, mobiler genetischer Elemente, welche in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts durch Barbara McClintock (McClintock, 1950) entdeckt wurden. Für diese Entdeckung erhielt Barbara McClintock 1983 den Nobelpreis. Ein Hauptelement des Systems wurde zuerst in einer Mottenart (*Trichoplusia ni* oder auch „aschgraue Höckereule“) entdeckt und enthält ein Transposon-Gen, welches von zwei inverted terminal repeats (itr) flankiert wird (Cary et al., 1989). Für eine erfolgreiche Generierung werden ein Transposon mit den genannten ITRs und dem zwischenliegenden Gen sowie eine Transposase, welche in der Lage ist, an den ITRs zu schneiden und diese in die genomische DNA zu integrieren, benötigt (Abb. 2.1). Wenn beides in einer Zelle exprimiert wird, bindet das PiggyBac-Transposase-Protein an die ITRs und legt Hydroxylgruppen an beiden Enden des Transposons frei. Das führt zu einem hydrophilen Angriff auf die flankierenden TTAA-Sequenzen und befreit das Transposon aus seinem Plasmid. Die PB-Transposase lokalisiert TTAA-Sequenzen in der genomischen DNA der Zelle, bildet einen zeitweiligen Doppelstrangbruch mit beidseitigem TTAA-Überhang und integriert das Transposon in die genomische DNA. Das bewirkt eine Doppelung der TTAA-Sequenzen, die für eine mögliche Exzision des Transposons erneut genutzt werden können (Woodard and Wilson, 2015).

Dementsprechend wurden PB-Plasmide designed (Vectorbuilder), bei denen zwei ITRs den Zap70 Wildtyp, eine T2A-Sequenz für eine äquimolare Expression beider Proteine sowie GFP als fluoreszierendes Markerprotein und die Puromycinresistenzsequenz umschlossen und der Beschreibung in 2.7.2 entsprechend mit der mit mCherry fluoreszenzmarkierten Transposase im Verhältnis 1:1 transfiziert (vgl. auch Abb. 2.1).

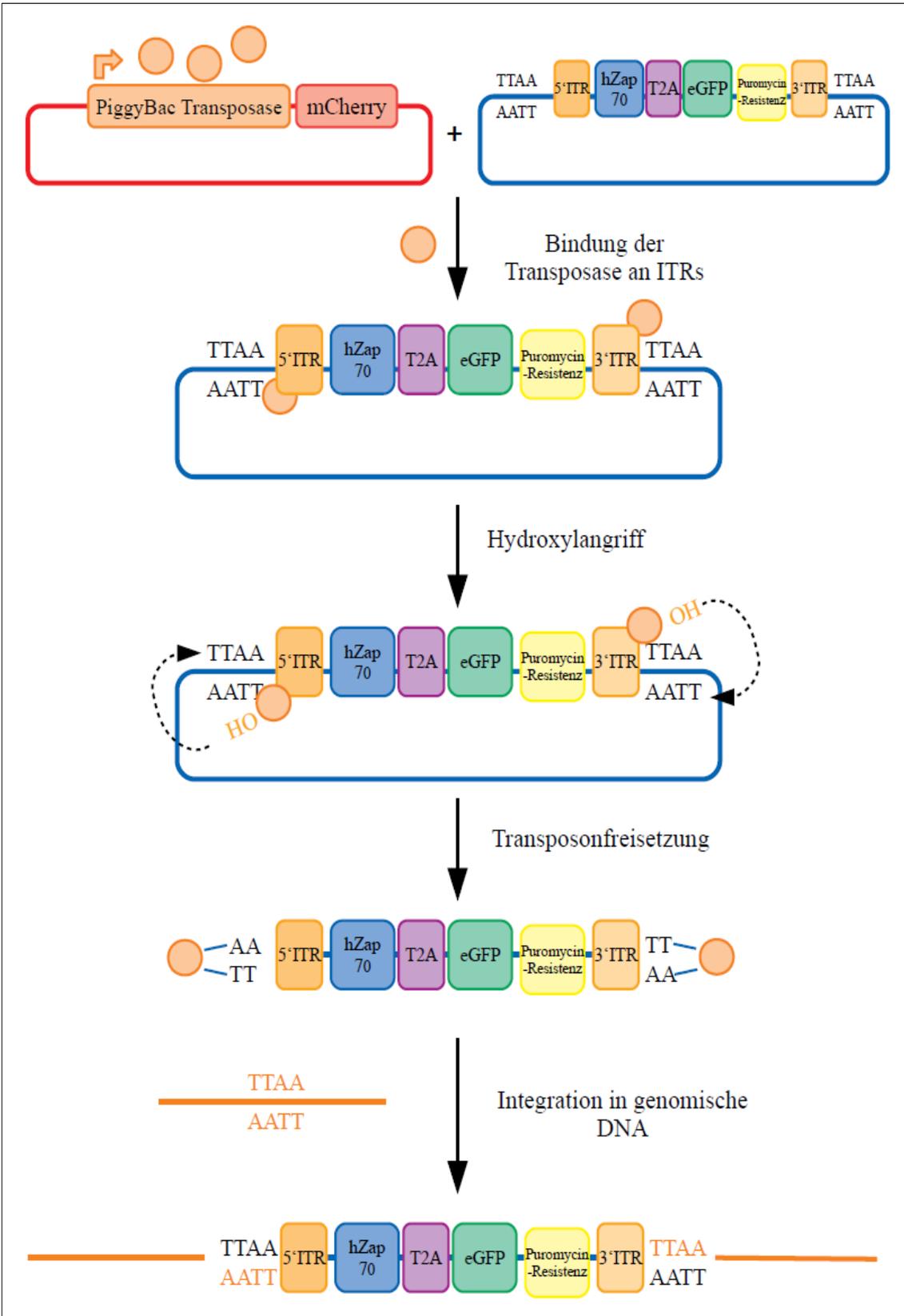


Abb. 2.1: Mechanismus der Transposition mithilfe des PiggyBac-Systems anhand der Integration des Zap70-Wildtyp-Plasmids

Sobald die PB-Transposase (orange Kreise) exprimiert wird, bindet sie an die ITRs und induziert den hydrophilen Angriff auf die 3'TTAA-Enden. Nach Exzision wird das Transposon an einer TTAA-Sequenz in die genomische DNA integriert (modifiziert nach Woodard and Wilson, 2015).

2.7.2 Transfektion mittels Elektroporation

Jeweils 20×10^6 antibiotikafrei kultivierte Zellen wurden in $350 \mu\text{l}$ RPMI mit 10% FBS aufgenommen und mit jeweils $5\text{-}30 \mu\text{g}$ des jeweiligen gewünschten Plasmids sowie $5 \mu\text{g}$ Transposase bei gewünschter stabiler Expression in eine 4 mm Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation fand mittels Gene Pulser II System (Biorad, Hercules) bei 230V und $950 \mu\text{F}$ statt. Die Zellen wurden im Anschluss in eine neue Kulturflasche mit einer 50% prozentigen Mischung alten und neuen Mediums (RPMI+10%FBS) aufgenommen und über Nacht kultiviert.

2.7.3 Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Diese Methode eignet sich für einige adhärent wachsende Zelllinien. Für die Transfektion von HEK^{293T} Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion jeweils 1 Mio. Zellen auf Kulturplatten (6-Well) aufgebracht. Ein Mix aus $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA und $37 \mu\text{l}$ 2M CaCl_2 wurde auf ein Volumen von $300 \mu\text{l}$ mit A.d. aufgefüllt und langsam unter permanentem vortexen in dieselbe Menge HEPES-gepufferte Salzlösung (Sigma Aldrich) getropft. Die übertragene DNA band nun während 45 Min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle wurden in 3 ml Medium vorsichtig zu den Zellen gegeben und nahmen die Präzipitate endozytotisch auf. Nach 24h konnten die Zellen mit 1ml PBS von der Platte gelöst werden.

2.8 Selektion

2.8.1 Selektion mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation gehört zu den physikalischen Trennverfahren von Zellen anhand ihres Sedimentationsverhaltens. Die Zellen werden in einer Zentrifuge anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit und ihrer Dichte sortiert. Bei dieser Selektionsform war es möglich, vor allem lebende Zellen von toten Zellen zu trennen. Hierzu wurden die am Tag zuvor transfizierte Zellen zuerst durch Zentrifugation konzentriert und dann nur unter Einwirkung der Schwerkraft in 15ml PanColl (PanBiotech) mit einer Dichte von $1,077 \text{g/ml}$ pipettiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation der Falcon-Röhrchen mit 1540 rpm bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Da lebende Lymphozyten eine geringere Dichte als das PanColl, nämlich zwischen $1,066$ und $1,077 \text{g/ml}$ aufweisen, blieben sie in der oberen Phase der pipettierten Lösung, während tote Zellen absanken. Mit einer Pipette wurde nun die milchige Zwischenphase (Lymphozyten) abgenommen und in ein neues 50ml Gefäß überführt, wo es nach Bedarf mit RPMI 1640 aufgefüllt wurde. Nach zwei Waschschritten mit RPMI, wurden die Zellen in neue Kulturflaschen mit jeweils 20ml RPMI, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und $0,5 \mu\text{g}$ Puromycin gesetzt und dort für drei Tage kultiviert.

2.8.2 Selektion mittels Durchflusszytometrie

Die Selektion mittels Durchflusszytometrie (FACS Aria™ III; BD Bioscience) erfolgte auf Basis von Fluoreszenzdetektion und hydrodynamischer Fokussierung. Das Plasmid der rekonstituierten Zellen enthält grün fluoreszierendes Protein (GFP), das eine Emissionswellenlänge von 509 nm besitzt und detektiert werden kann. Auf diese Weise können untransfizierte Zellen oder Zellen mit schwacher Ausprägung des Merkmals aussortiert werden. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem CD3-Antikörper (CD3-APC) angefärbt, um Zellen ohne oberflächlich nachweisbare T-Zell-Rezeptoren auszusortieren. APC ist ein Pigment, das nach Anregung Licht der Wellenlänge 680nm emittiert und sich somit nicht mit dem Spektrum von GFP überschneidet. Mittels Fluoreszenzdetektoren sowie einer Vereinzelung der Zellen mithilfe abgestimmter Tröpfchengrößen und Sortierung konnte ein hoher Grad an Vergleichbarkeit zwischen Wildtyp und Mutante erreicht werden. Die rekonstituierten P116-Zellen neigten im Wildtyp und in der Mutante zum oberflächlichen Verlust des T-Zell-Rezeptors, was eine regelmäßige Kontrolle erforderte.

2.8.3 Überprüfung der experimentellen Vergleichbarkeit mittels Durchflusszytometrie

Aufgrund der Neigung der mit Zap70 rekonstituierten Zellen den T-Zell-Rezeptor zu internalisieren, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit CD3-APC gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur™; BD Bioscience) auf ihre GFP-Expression und auf die Ausprägung der T-Zell-Rezeptoren analysiert. Hierbei wurde insbesondere auf einen vergleichbaren prozentual möglichst hohen Anteil CD-3 positiver Zellen geachtet.

2.9 Stimulation mit löslichen Antikörpern

Um die Aktivierung unterschiedlicher Signalmoleküle in der Signalkaskade des TZR bei Antigenbindung zu simulieren und diese in Wildtyp und Mutante zu vergleichen, wurden TZR-Stimulationen mit löslichen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen mit leerem Vektor (Zap70^{Neg}) experimentell mitgeführt.

2.9.1 Stimulation mit Anti-T-Zell-Rezeptor Antikörper Klon C305

C305 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper vom Typ IgM_κ, der in einer hybridisierten Zelllinie produziert wird und gegen den TZR von Jurkat-Zellen gerichtet ist. In den 1980ern entstand er aus einer Fusion von SP-2/0 Myelom- und Milzzellen von Mäusen, die intraperitoneal für 3 Monate mit Jurkat-Zellen immunisiert wurden (Weiss and Stobo, 1984). Für die Stimulation mittels Anti-TZR-Antikörper C305 (im Folgenden „C305“ genannt) wurden pro Probe 2 Mio. Zellen in 100µL RPMI 1640 resuspendiert. C305 wurde bei 37°C im Thermomixer compact (Eppendorf) vorgewärmt. Gestaffelt wurden nun 100µL C305 zu den jeweiligen Proben (2, 5 und 10 Minuten) gegeben und diese bei 37°C für die definierte Zeit inkubiert. Die unstimulierten Kontrollen erhielten 100µl RPMI, um ein vergleichbares Volumen zu gewährleisten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1ml

eiskaltem PBS (Bio&Sell) gestoppt, die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die erhaltenen Zellpellets wurden, wie weiter unten beschrieben, lysiert.

2.9.2 Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper UCHT1

Anti-CD3 ϵ ist ein monoklonaler Maus-Antikörper vom Typ IgG, der ebenfalls in den 1980ern entdeckt wurde (Beverley and Callard, 1981) und gegen die ϵ -Kette des TZR in humanen T-Zellen gerichtet ist. Prozedural gab es, abgesehen von der Dosierung von 10 μ g/ml, keinen relevanten Unterschied zur Stimulation mit C305.

2.10 Stimulation mit immobilisierten Antikörpern

Im Gegensatz zu löslichen Antikörpern sollen immobilisierte Antikörper in der Lage sein, Antigen-präsentierende Zellen (APCs) nachzuahmen und nachhaltigere Signalantworten auszulösen (Arndt et al., 2013). Daher nutzte ich speziell für Stimulationen über 3 und 6 Stunden plattengebundene Antikörper.

2.10.1 Stimulation mit Anti-T-Zell-Rezeptor Antikörper Klon C305

24-Well-Platten wurden zuerst mit Ziege-Anti-Maus Antikörpern beschichtet und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1ml sterilem PBS wurden jeweils 250 μ l C305 aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit 1ml PBS, wurde zum Schutz vor Austrocknung 500 μ l Medium auf die Platten gegeben und jeweils 500.000 Zellen in 500 μ l Medium der stabil transfizierten Zelllinien in jedes Well aufgenommen.

2.10.2 Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper UCHT1

Auch hier wurden 24-Well-Platten mit Ziege-Anti-Maus Antikörpern beschichtet, wie oben beschrieben, und anschließend mit UCHT1 in der Dosierung 10 μ g/ml über Nacht inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben Beschriebenen.

2.11 Zellyse

Zellysate dienen als Grundlage der SDS-PAGE und des Western-Blots. Die Zellpellets wurden in Lysepuffer resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 13.000 rpm, 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit $\frac{1}{4}$ des Lysepuffervolumens in Form von 5x reduzierendem Probenpuffer gemischt. Zur vollständigen Denaturierung der enthaltenen Proteine wurden die Proben für 5 Minuten bei 99°C gekocht. Danach können sie entweder bei -20°C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE verwendet werden.

2.12 Immunopräzipitation

Um posttranslationale Modifikationen, die Aktivität einzelner Tyrosinkinasen oder den Interaktionsstatus von Proteinkomplexen zu untersuchen, führte ich Immunopräzipitationen durch, um die gewünschten Proteine/Proteinkomplexe von anderen Zellbestandteilen zu isolieren. Hierzu nutzte

ich Zelllysate von 20 Mio. Zellen pro Probe, die entsprechend dem jeweiligen Experiment vorbehandelt wurden. 30µl wurden als Lysatkontrolle mit 7,5µl 5x Probenpuffer gemischt und bei 99°C 5 Min. gekocht. Die restlichen Lysate wurden mit 30µl Protein A-Beads aus gekörnter Agarose (bei entsprechendem Hasen-Antikörper) bzw. Protein G-Beads (bei Maus-Antikörpern), 2-5 µl des gewünschten Antikörpers gegen das gesuchte Protein sowie 1% BSA je nach Experiment 2-16 h bei 4°C auf einer Rotatorscheibe inkubiert. Fünf Waschschrte mit jeweils 1ml Waschpuffer und Zentrifugation bei 8.000 rpm für zwei Min. waren zur Entfernung des Überstandes notwendig. Die erhaltenen Beads wurden in 2x Probenpuffer aufgenommen und bei 99°C für 5 Min. gekocht. Danach können sie direkt für die SDS-PAGE und den Western-Blot verwendet werden.

2.13 Kinase-Assay

Um die Aktivität einer einzelnen Kinase zu messen, verwendet man Surrogatparameter wie beispielsweise dem Umsatz von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) (Abb. 2.2). Hierfür wurden IP-Lysate verwendet, die jedoch nur 2h bei 4°C rotierend inkubiert wurden. Nach fünf Waschschrten wurden 30-40% als IP-Kontrolle abgenommen, zentrifugiert und die Agarose-Beads mit den gebundenen Proteinen in 2x Puffer resuspendiert und bei 99°C für 5 Minuten gekocht. Die restlichen Beads wurden zuerst in PBS gewaschen und dann noch einmal in Tyrosinkinase-Puffer. Schließlich wurde für die Kinase-Reaktion ein Mix aus einem spezifischen Substrat (Poly-(Glu,Tyr) Natriumsalz von Sigma-Aldrich), einem 100µM ATP-Mix und dem Tyrosinkinasepuffer im Verhältnis 2:1:1 zu den Beads gegeben und bei 25°C und 750 rpm für 60 Minuten inkubiert. Um die Kinase-Reaktion zu beenden und überschüssiges ATP zu depletieren, wurde ADP-Glo™ (Promega) zugegeben und die Proben erneut für 40 Min. bei 25°C und 750rpm inkubiert. Danach wurde die Kinase-Detektions-Reagenz (Promega) zugegeben, um die Depletion zu beenden und ADP zu ATP umzuwandeln. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur und Lichtschutz, konnte das neu synthetisierte ATP mittels Lumineszenz(TriStar LB 941;Berthold Technologies) gemessen werden, welche mit der ATP-Konzentration korreliert.

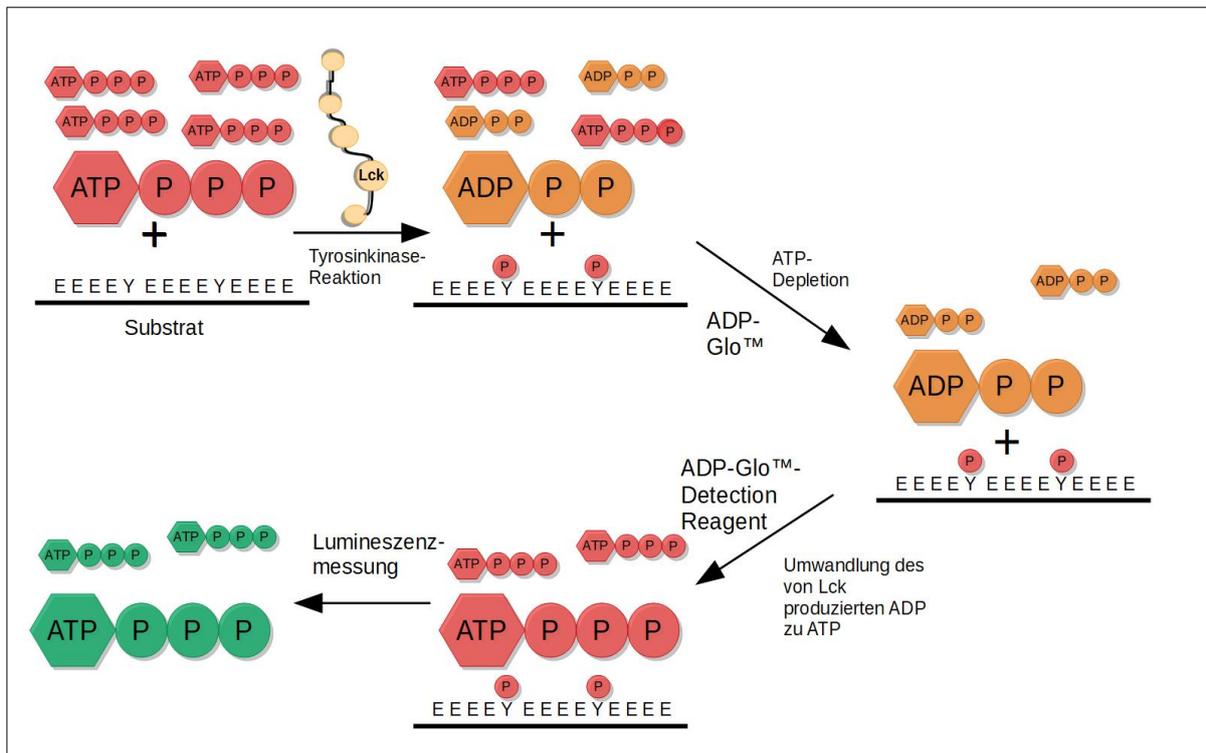


Abb. 2.2 Lumineszenz-Kinase-Assay

Zum immunopräzipitierten Lck werden Substrat und ATP zugefügt, welches dann durch Lck teilweise zu ADP umgewandelt wird. ATP wird depletiert und mittels ADP-Glo-Detection Reagent zu fluoreszierendem ATP umgewandelt.

2.14 SDS-PAGE

Bei dieser Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine elektrophoretisch, abhängig von ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld, aufgetrennt werden. SDS verursacht hierbei eine konstante negative Ladung innerhalb der Proben, welche in Verbindung mit dem Kochvorgang zu einer Linearisierung der Proteine führt. Dies erlaubt eine Auftrennung in Abhängigkeit von der Länge der enthaltenen Proteine. Für die Auftrennung der Proteine nutzte ich 10% -12 %ige Polyacrylamidgele, welche mit 10-35 μL der Proben beladen wurden und bei 140V die Elektrophorese (Bio-Rad) durchliefen.

2.15 Western-Blot

2.15.1 Proteintransfer

Der Western-Blot gehört zur Gruppe der Immunoblots. Hierbei werden Proteine mithilfe eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Nach dem Blot werden die verbleibenden freien Positionen auf der Membran mittels 5%iger

Milch-TBS-Lösung oder 5%iger-BSA-TBS-Lösung blockiert, um die weitere unerwünschte Anhaftung von Proteinen zu verhindern.

2.15.2 Proteindetektion

Die Nitrozellulose-Membranen wurden abhängig vom Antikörper 1-20 Stunden in einer Lösung aus TBS mit 5%igem BSA und der vom Hersteller angegebenen Antikörperverdünnung inkubiert. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Antikörper in diversen Waschschrritten mit TBS und TBS+Tween entfernt und eine einstündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper vorgenommen. Danach erfolgten erneut drei Waschschrritte mit TBS+Tween für jeweils 10 Minuten und abschließend mit TBS für fünf Minuten. Die Fluoreszenz wurde mittels Odyssey Classic infrared imager system (LI-COR Bioscience) bei 700 und 800nm detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels LI-COR Image Studio 2.1.15 statt. Hierbei wurde entweder gegen β -Aktin als Ladungskontrolle oder gegen das jeweilige Protein normalisiert.

2.16 Calciumfluss-Messung

Calcium ist ein wichtiger „second messenger“, der zahlreiche Signalwege reguliert. Bei der Aktivierung des TZR kommt es unter anderem im Laufe der Signalkaskade zur Aktivierung der Phospholipase C, deren Signalgebung zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Durch die Abnahme der Calciumkonzentration im ER erfährt der so genannte „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC) in der Plasmamembran eine Stimulation. Infolge dessen strömt extrazelluläres Calcium durch den CRAC in die T-Zelle, wodurch das zytosolische Calciumsignal verstärkt wird (Schmeitz et al., 2013).

Als Indikator wurde Indo-1 AM invitrogen™ (Thermo Fischer) verwendet. „AM“ steht für Acetoxymethylester. Die Verbindung aus calciumsensitivem Farbstoff (Indo-1) und AM gelangt aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in die Zelle, in der unspezifische Esterasen die AM-Ester zu Formaldehyd und Essigsäure hydrolysieren. Der Farbstoff verliert hierdurch die Fähigkeit zur Membrangängigkeit und verbleibt intrazellulär. Während Ca^{2+} -ungebundenes Indo-1 AM bei einer Anregung mittels Laserstrahlung von 350nm eine Emission von 475nm zeigt, wechselt diese Emission bei Calciumbindung auf 400nm. Dieses Verhältnis kann graphisch und statistisch dargestellt und ausgewertet werden. Als Positivkontrolle diente Ionomycin, eine Substanz bakteriellen Ursprungs, die in der Lage ist intrazellulär Calcium freizusetzen.

Pro Probe wurden 2 Millionen Zellen in 3ml RPMI 1640 ohne Phenolrot und FBS aufgenommen und mit 5 μ l/ml des 1:1 in DMSO gelösten Indo-1 AM für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben weitere 30-45 Minuten mit dem oben genannten Medium bei 37°C gewaschen, zentrifugiert und in 3ml Medium resuspendiert.

Zur Messung wurde 1ml der jeweiligen Probe für eine Minute im Thermomixer bei 37°C erwärmt. Eine Minute nach begonnener Messung wurden 10 μ l C305 bzw. 1 μ g UCHT1 zugegeben. Nach etwa zehn Minuten wurde als Positivkontrolle 10 μ l Ionomycin hinzugefügt. Gemessen wurde

durchflusszytometrisch das Verhältnis der beiden Filter BUV496 (Emissionswellenlänge 525/50 nm) zu BUV395 (Emissionswellenlänge 379/28 nm) über die Zeit mittels LSR (BD Bioscience). Für die Auswertung der Kinetik wurde FlowJo™ (BD Bioscience) genutzt.

2.17 Datenanalyse und Statistik

Für die Datenanalyse wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Alle graphisch präsentierten Daten werden mit Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Gruppen wurde mit dem ungepaartem T-Test nach Welch ermittelt. Die Signifikanzlevel werden in Form von Sternen dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

2.18 Grafiken

Die Grafiken wurden mit den LibreOffice 6.0 Anwendungen „Libre Office Draw“ und „Libre Office Impress“ angefertigt.

3 Ergebnisse

Um die Funktion des Cysteins an Position 564 innerhalb von Zap70 untersuchen zu können, wurde als Modell die Jurkat T-Zelllinie P116 gewählt. Diese wurde Ende der 90er Jahre aus Jurkat T-Zellen entwickelt, ist Zap70 und Syk-defizient und zeigt dadurch eine gestörte intrazelluläre Signalverarbeitung (Williams et al., 1998). Als geeignete Mutation wurde der Ersatz des Cysteins durch Alanin gewählt. Dies folgt einem Standardmodell, das aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zum Cystein Mutationen zu Serin oder Alanin vorsieht. Obwohl Serin dem Cystein hier ähnlicher ist als Alanin, besteht die Gefahr des potentiellen Einfügens einer Phosphorylierungsstelle bei einer Mutation zu Serin, welche hier unbedingt vermieden werden sollte. Daher wurde die unpolare Aminosäure Alanin gewählt. Durch die in Material und Methoden beschriebene stabile Transfektion entstanden drei Zelllinien, die als Hauptmodell nahezu aller Experimente dienen (vgl. Abb. 3.1).

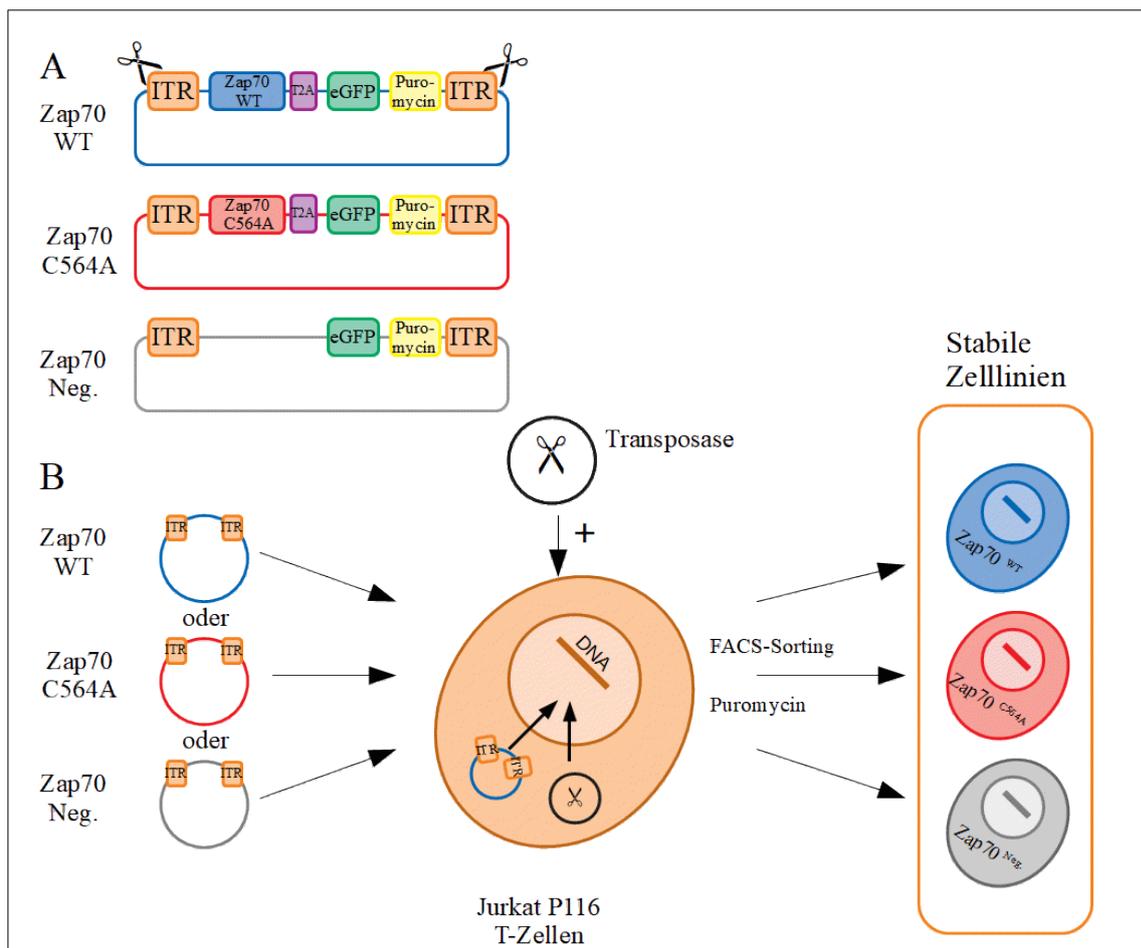
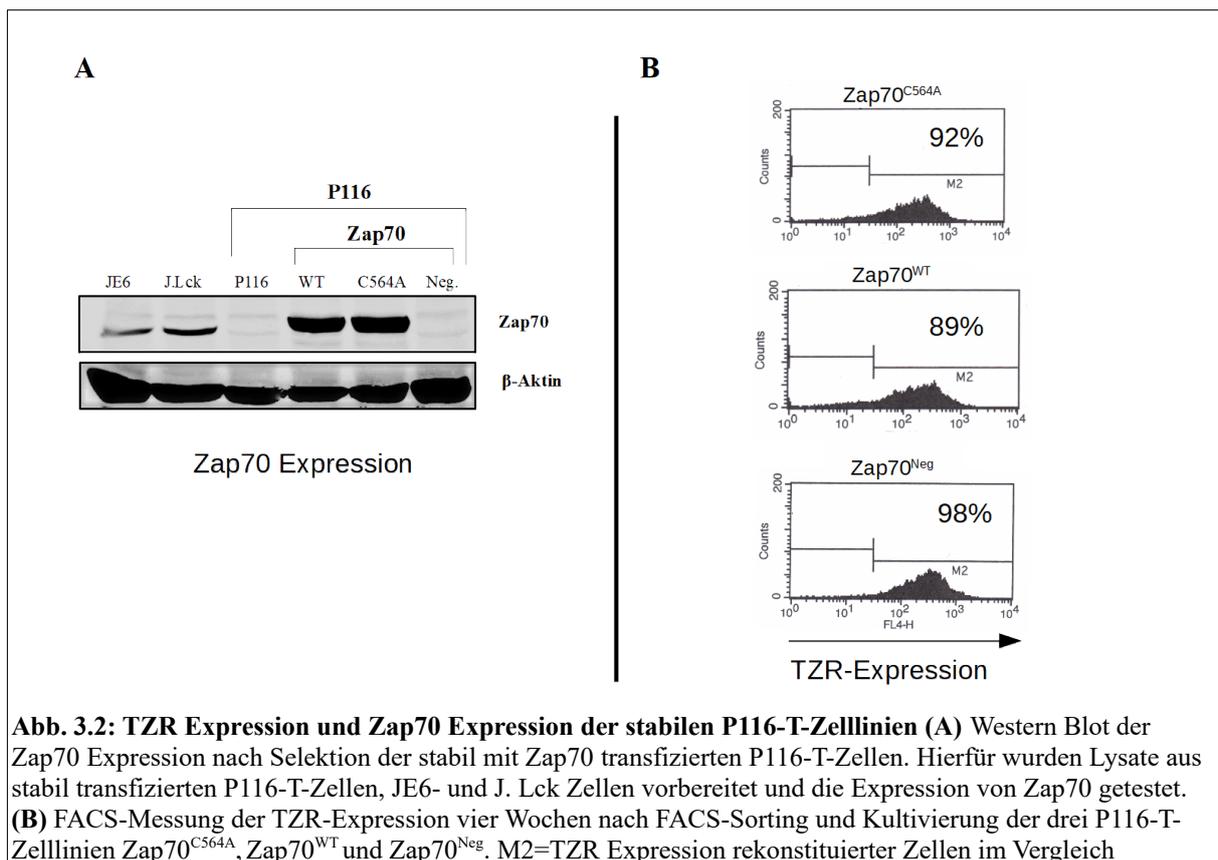


Abb. 3.1: Generierung stabiler P116-Zelllinien (A): Schematische Darstellung der drei für die stabile Transfektion genutzten PiggyBac-Plasmide mit den Transposaseschnittstellen (ITRs=inverted terminal repeats), der Zap70 DNA, einer T2A-Sequenz für die äquimolare Expression der Proteine, eGFP als Fluoreszenzmarker sowie der selektionsrelevanten codierten Puromycinresistenz **(B):** Mittels Elektroporation gelangen das PiggyBac-Plasmid und die plasmidcodierte Transposase in das Zytoplasma. Nach Translation der Transposase ist diese in der Lage, die zwischen den ITRs liegende DNA zu exzidieren und in den Zellkern zu geleiten, in dem diese via TTAA-Sequenz in die DNA der P116-T-Zellen integriert wird.

P116+hZap70 WT („Zap70^{WT}“) sind dabei mit einem wildtypischen Zap70 rekonstituiert worden. P116+hZap70C564A („Zap70^{C564A}“) exprimieren die C zu A Mutante von Zap70 und P116+hZap70 negativ („Zap70^{Neg}“) schließlich stellen eine Zelllinie dar, die kein Zap70 exprimiert und die somit als Negativkontrolle dient.

Alle Plasmide trugen zusätzlich eine Puromycinresistenz zur Selektion sowie GFP (Green Fluorescent Protein) zur einfachen Expressionskontrolle und zur Identifikation der erfolgreich transfizierten Zellen während der Zellsortierung. Im Anschluss an die Selektion der generierten Zelllinien, testete ich die Expression von Zap70, welche sich vergleichbar zwischen WT und C564A-exprimierenden Zellen zeigte. Darüber hinaus exprimieren die mit Zap70 rekonstituierten P116-Klone eine vergleichbare Ausprägung des TZR (Abb. 3.2). Zum Vergleich wurden Zellen einer Lck-defizienten Jurkat-Zelllinie (J. Lck) sowie JE6-Zellen, die sowohl Zap70 als auch Lck enthalten, experimentell mitgeführt.



3.1 Zap70 C564A erzeugt keinen Signalabbruch in der folgenden Signalkaskade

P116-T-Zellen zeigen bedingt durch ihre Zap70-Defizienz eine Blockade der TZR-vermittelten Signaltransduktionskaskade (Williams et al., 1998). Aus diesem Grund eignen sie sich besonders als Modell zur Untersuchung der Funktion von Zap70-Mutationen. Ein Screening auf Phosphorylierungsunterschiede innerhalb der Signalkaskade zwischen P116-T-Zelllinien, die unterschiedliche Mutanten exprimieren, führt auf einfache und schnelle Weise zu einem ersten

Überblick möglicher Funktionsunterschiede im Vergleich zu Zap70 WT. Für die Experimente nutzte ich die mit Zap70 WT, Zap70 C564A und leerem Vektor stabil rekonstituierten P116-T-Zellen im Vergleich. Die Zellen wurden für zwei, fünf und 10 Minuten mit agonistischen Antikörpern des TZR/CD3-Komplexes behandelt, anschließend lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsmuster untersucht.

Betrachtet wurden zuerst Protein-Phosphorylierungsstellen, die direkte Substrate von Lck oder Zap70 sind oder indirekt mit der Aktivität von Zap70 zusammenhängen (Abb. 3.3 A). Der Signalkaskade folgend waren dies: Zap70 Y319, das durch die Tyrosinkinase Lck phosphoryliert wird und für die Aktivierung von Zap70 relevant ist (Au-Yeung et al., 2018), Zap70 Y493, das durch Zap70 selbst phosphoryliert werden kann (Liaunardy-Jopeace et al., 2017) und Lat Y191, das direkt durch Zap70 phosphoryliert wird (Paz et al., 2001). Der Signalkaskade weiter abwärts folgend untersuchte ich zusätzlich PLC γ 1 Y783, an dessen Aktivierung ITK und Zap70 beteiligt sind (Bogin et al., 2007) und - als Repräsentant der Endstrecke zum Zellkern - Erk 1/2 (Thr 202/Tyr 204). Als TZR/CD3-Stimulanz benutzte ich den monoklonalen Maus-IgM-Antikörper vom Klon „C305“, sowie zum Vergleich den Maus-IgG-Antikörper „UCHT1“. Es zeigten sich interessante Unterschiede in der Ausprägung und Kinetik zwischen beiden Stimulationsformen.

3.1.1 Zap70 C564A ist hyperphosphoryliert

Bei dem monoklonalen Antikörper C305 handelt es sich um einen IgM-Antikörper gegen den klonotypischen TZR, der nur in Jurkat-T-Zelllinien exprimiert wird (Weiss and Stobo, 1984). IgM-Moleküle liegen im Plasma meist als Pentamere vor und besitzen daher 10 Antigen-Bindungsstellen. Die Bindung eines einzelnen IgM-Pentamers an den TZR reicht daher aus, um die biologischen Signalwege in Gang zu setzen (Abb. 3.3 A) (Murphy and Weaver, 2018).

Nach Stimulation der P116-T-Zellen mit C305 zeigte sich durchweg eine verstärkte Phosphorylierung im Vergleich zu Zap70 WT-Zellen auf allen oben genannten Protein-Phosphorylierungsstellen in Zellen, die Zap70^{C564A} ausprägten, gegenüber Zap70^{WT}-Zellen. Dieser Unterschied wurde bereits vor der Stimulation sichtbar (Abb. 3.3 B, C). Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung der betrachteten Tyrosine über einen Zeitraum von zehn Minuten ohne eine Reduktion im zeitlichen Verlauf. Zap70 C564A präsentierte bis hierher ein ähnliches Bild wie es von Tewari et al. für Zap70 C564R gezeichnet wurde (Tewari et al., 2020). Die Mutante ist hyperphosphoryliert, wobei die Alaninmutante eine geringere Hyperphosphorylierung aufweist, als die von Tewari et al. verwendete Argininmutante.

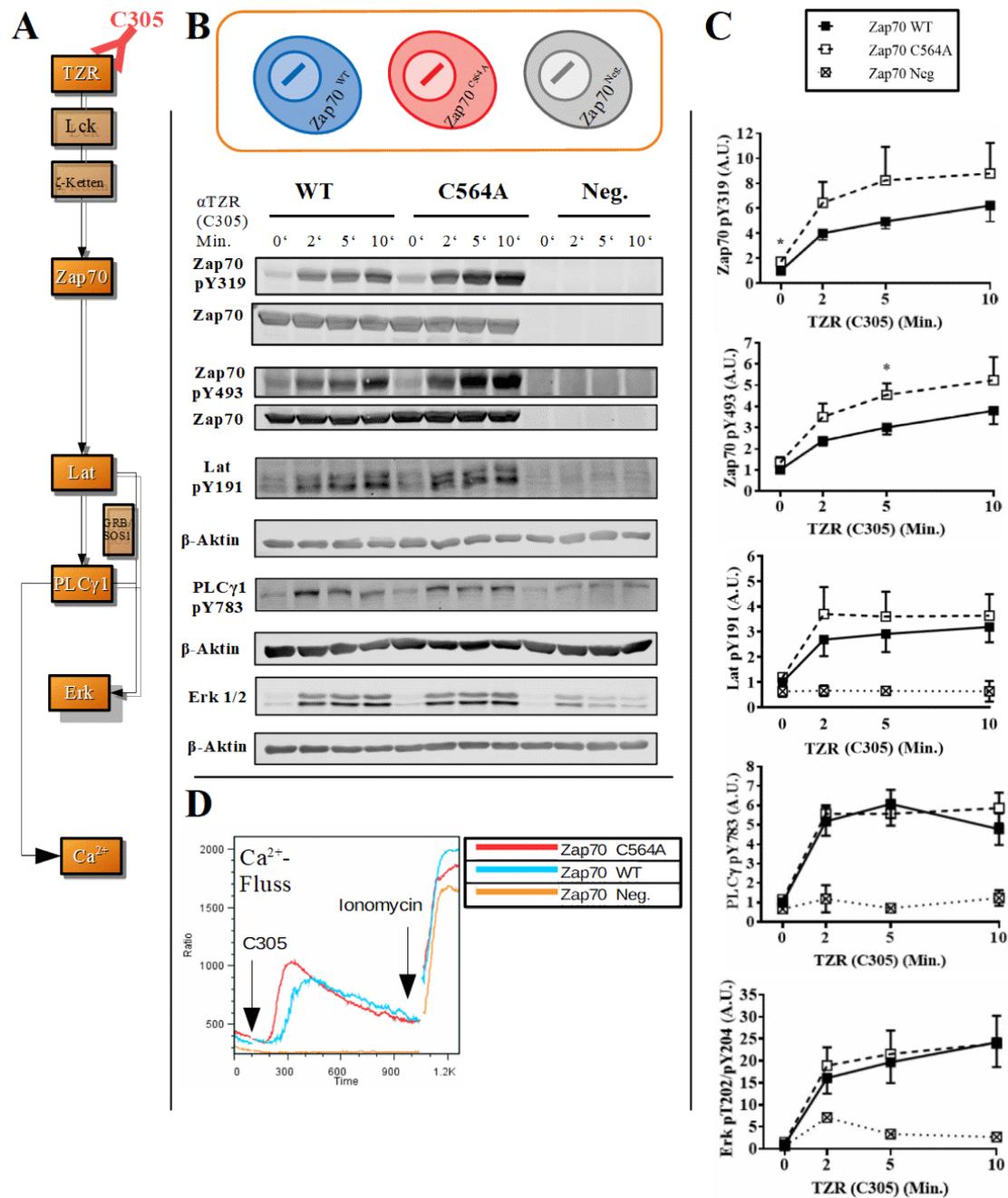


Abb. 3.3: Qualitative und quantitative Auswertung des Phosphorylierungsscreenings nach Stimulation mit dem TZR-Antikörper C305 (A) Vereinfachte schematische Darstellung des TZR-Signalweges mit farblicher Hervorhebung hier experimentell betrachteter Proteine. **(B)** Zap70 defiziente P116-T-Zellen, die stabil Zap70^{WT}, Zap70^{C564A} oder kein Zap70 (Zap70^{Neg}) exprimieren, wurden mit dem TZR-Antikörper C305 für die dargestellte Zeitdauer stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung für Zap70 Y319, Y493, Lat, PLCγ1 und Erk mithilfe spezifischer Antikörper untersucht. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde mittels Total-Zap70 und β-Aktin-Antikörpern sichergestellt. Es ist jeweils ein repräsentatives Experiment dargestellt. **(C)** Die Banden der Westernblots wurden quantifiziert und gegen das totale Protein oder gegen das Signal von β-Aktin normalisiert. Die Graphen zeigen die Phosphorylierungslevel der gekennzeichneten Moleküle als relative Einheit (A.U.=arbitrary units) ± dem Standardfehler von mind. fünf Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels einseitigem Welch-Test durchgeführt und zeigte nur in Bezug auf Zap70 Y493 einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben. (n≥5) (einseitiger Welch-Test: *p<0,05) **(D)** Der Calciumfluss wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ionomycin wurde hier zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung mit Indo-1 genutzt. Gezeigt wird hier ein repräsentatives Experiment. (n = 3)

3.1.2 Zap70 C564A ist in der Lage, das TZR-vermittelte Signal weiterzuleiten

Die von Tewari et al. charakterisierte C564R Mutante zeigte eine Hyperphosphorylierung auf Zap70 Y319 und Y493 und war nicht in der Lage, Lat zu phosphorylieren und so das Signal weiterzuleiten (Tewari et al., 2020). Es zeigte sich praktisch ein Block der TZR-vermittelten Signaltransduktion. Daher stellte sich die Frage, ob dies nach Bestätigung der bisherigen Hyperphosphorylierung von Zap70 ebenfalls der Fall bei der C564A Mutante sein würde. Zellen, die Zap70^{C564A} exprimierten, waren jedoch in der Lage, Lat zu phosphorylieren (Abb. 3.3 B, C) und die distale Signaltransduktion zu sichern, so dass es zu keinem Signalabbruch distal von Lat kam. Weiterhin zeigte sich sogar eine leichte erhöhte Lat-Phosphorylierung in Zap70^{C564A} (Abb. 3.3 C). Da sich auch die Phosphorylierung von PLC γ 1 Y783 unverändert zeigte, maß ich den PLC γ 1-abhängigen intrazellulären Calciumfluss, der ebenfalls kaum einen Unterschied zwischen beiden Zelllinien erkennen ließ (Abb. 3.3 D). Auch die Phosphorylierung von Erk 1/2 T202/Y204 und somit der distale Weg der Signaltransduktion erschien unverändert (Abb. 3.3 B, C). Im Verhältnis dazu zeigte sich erwartungsgemäß in Zap70^{Neg}-Zellen keine Induktion der Signaltransduktion. Die Phosphorylierung von Lat und PLC γ 1 sowie der daraus folgende Calciumfluss (Abb. 3.3 D) waren nahezu vollständig blockiert, die Phosphorylierung von Erk1/2 in Zap70^{Neg} T-Zellen stark vermindert (Abb. 3.3 B, C). In der Gesamtbetrachtung lässt sich also eine proximale Hyperphosphorylierung des TZR-Signalweges in C564A-exprimierenden P116-T-Zellen beschreiben. Meine Daten deuten darauf hin, dass die Acylierung von C564 keineswegs an der direkten Regulation der Weiterleitung des Signals beteiligt zu sein scheint, wie Tewari et al. postulierten (Tewari et al., 2020). Während die Mutation zu Arginin dort einen Signalabbruch hervorrief, war dies bei der Alaninmutation nicht der Fall.

3.1.3 Die Funktion von Zap70 C564A ist weitgehend unabhängig von der Art der Stimulation

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben in der Vergangenheit unter anderem gezeigt, dass unterschiedliche Stimulationsformen des TZR zu anders gearteten Reaktionen führen können (Arndt et al., 2013). IgM ist mit seinen zahlreichen Bindungsstellen in der Lage, viele TZR parallel zu binden, während IgG lediglich zwei TZR vernetzen kann. Um zu bestätigen, dass die Funktion von Zap70 C564A unabhängig von der Art der Stimulation ist, nutzte ich den IgG monoklonalen anti-human-Antikörper vom Klon UCHT1, der an CD3 ϵ als Teil des TZR angreift und wie C305 in der Lage ist, die intrazelluläre Signalkaskade (Abb. 3.4 A) auszulösen. Wie auch bei den vorhergehenden Experimenten verglich ich unstimulierte Zellen mit stimulierten Zellen nach zwei, fünf und zehn Minuten Stimulation mit UCHT1 (Abb. 3.4 B, C). Wie auch nach Stimulation mit C305 (Abb. 3.3 B, C) zeigte sich auch hier in der Alaninmutante eine - bereits in unstimulierten Zellen nachweisbare - erhöhte Phosphorylierung an Zap70 Y319 gegenüber dem WT. Nach Stimulation entfaltete sich ein ähnliches Bild wie zuvor bei den Versuchen mittels C305. Zap70 C564A zeigte sich jedoch signifikant

stärker an Y319 phosphoryliert als das entsprechende Tyrosin des Wildtyps, während sich die Phosphorylierung von Y493 vergleichbar zwischen Wildtyp und Mutante zeigte (Abb. 3.4 B, C). Auch Lat wies in der Mutante keinen signifikanten Unterschied in der Phosphorylierung an Y191 zwei Minuten nach Stimulation gegenüber dem WT auf (Abb. 3.4 C). Wie auch in C305 zeigte sich ebenfalls keine Differenz in der Phosphorylierung von PLC γ 1 Y783 (Abb. 3.4 B, C) sowie im intrazellulären Calciumfluss nach Stimulation (Abb. 3.4 D). Abweichend fiel nach UCHT1 Stimulation jedoch die Phosphorylierung von Erk1/2 T202/Y204 aus, welches eher den distalen Abschnitt des TZR-Signalweges repräsentiert (Abb. 3.4 B,C). Auch hier war - ähnlich wie in Lat - eine leichte Anhebung der Phosphorylierung in der Mutante gegenüber dem WT sichtbar. Der Unterschied, der sich in der Phosphorylierung von Erk zeigte, welches in der Signalkaskade hinter PLC γ 1 liegt, könnte hierbei auf den Lat-Grb2/SOS1 Signalweg zurückzuführen sein, während der Weg über PLC γ 1 unverändert blieb (vgl. Abb. 1.5).

Zusätzlich präsentierten sich jedoch Differenzen in der Reaktionskinetik. Während bei Stimulationen mittels C305 die Phosphorylierungen über zehn Minuten stetig anstiegen (Abb. 3.3 B, C), zeigte sich bei Stimulation durch UCHT1 ein deutlicher Höhepunkt nach zwei bis fünf Minuten mit nachfolgender Abnahme des Signals (Abb. 3.4 B, C).

In der Gesamtschau bestätigte sich die vor allem proximal ausgeprägte Hyperphosphorylierung der Zap70 C564A Mutante gegenüber des Zap70 Wildtyps. Zusätzlich konnte auch die vollständige Signaltransduktion bis Erk 1/2 gezeigt werden.

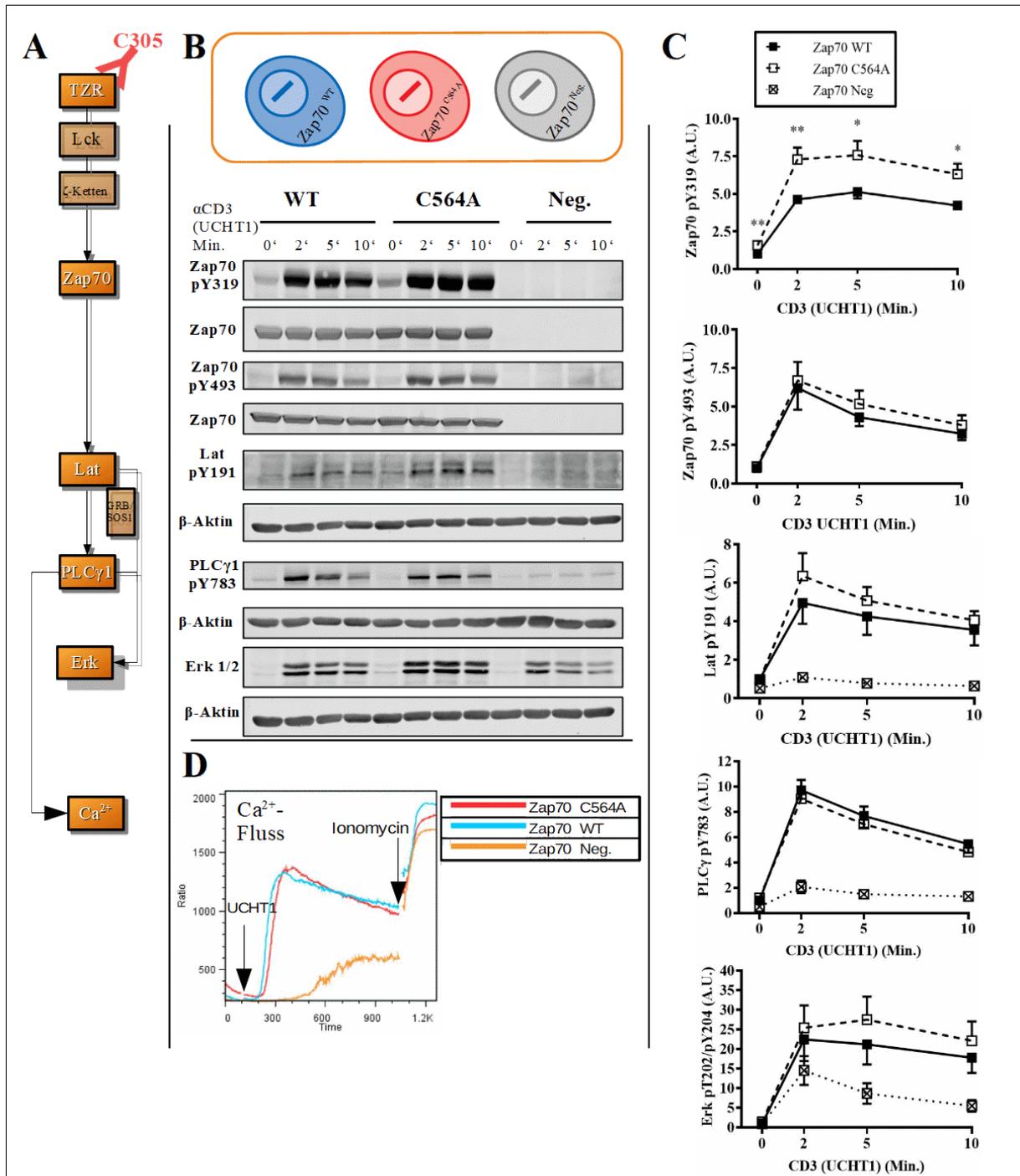


Abb. 3.4: Qualitative und quantitative Auswertung des Phosphorylierungsscreenings nach Stimulation mit dem CD3-Antikörper UCHT1 (A) Vereinfachte schematische Darstellung des TZR-Signalweges mit farblicher Hervorhebung hier experimentell betrachteter Proteine. **(B)** Zap70 defiziente P116-T-Zellen, die stabil Zap70^{WT}, Zap70^{C564A} oder kein Zap70 (Zap70^{Neg}) exprimieren, wurden mit dem CD3 ϵ -Antikörper UCHT1 für die dargestellten Zeiten stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung für Zap70 Y319, Y493, LAT, PLC γ 1 und Erk mithilfe spezifischer Antikörper untersucht. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde mittels Total-Zap70 und β -Aktin-Antikörpern sichergestellt. Es ist jeweils ein repräsentatives Experiment dargestellt. **(C)** Die Banden der Westernblots wurden quantifiziert und gegen das totale Protein oder gegen das Signal von β -Aktin normalisiert. Die Graphen zeigen die Phosphorylierungslevel der gekennzeichneten Moleküle als relative Einheit (A.U.=arbitrary units) \pm dem Standardfehler von mind. fünf Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels einseitigem Welch-Test durchgeführt und zeigte nur in Bezug auf Zap70 Y319 einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben ($n \geq 5$) (einseitiger Welch-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **(D)** Der Calciumfluss wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ionomycin wurde hier zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung mit Indo-1 genutzt. Gezeigt wird hier ein repräsentatives Experiment ($n = 3$).

3.1.4 Die finale Signaltransduktion ist in Zap70 C564A erhalten

Die erfolgreiche Signaltransduktion bis Erk zeigte zwar deutlich die erhaltene Funktion von Zap70^{C564A}-exprimierenden Zellen, sagt jedoch nichts über die Effizienz der Signaltransduktion aus, die zur erfolgreichen Transkription führt. CD69 ist ein membrangebundener Typ II Lectin-Rezeptor und ein klassischer Marker für eine frühe Lymphozytenaktivierung, da er nach Stimulation relativ rasch an der Plasmamembran erscheint. CD69 reguliert zudem die Sekretion verschiedener Interferone und Interleukine, die als extrazelluläre Botenstoffe des Immunsystems agieren (Cibrián and Sánchez-Madrid, 2017). Um die Effizienz der aus der Signaltransduktion folgenden Transkription zu untersuchen, maß ich die jeweiligen Ausprägungen von CD69 mittels FACS-Analyse nach Stimulation für drei oder sechs Stunden im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen und einer Positivkontrolle mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) (Abb. 3.5). PMA ist in der Lage, durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Diacylglycerol, die Proteinkinase C sowie die Ras-Kaskade zu aktivieren und so die Signaltransduktion unabhängig von Zap70 oder Lck auszulösen. Tatsächlich erwies sich nach Stimulation mit PMA die Ausprägung von CD69 vergleichbar zwischen Wildtyp, Mutante und Zap70^{Neg} Zellen (Abb. 3.5). Nach Stimulation durch UCHT1 zeigte sich eine deutlich geringere Expression von CD69 in Zap70^{Neg} Zellen gegenüber Zap70 positiven Zellen, was die essentielle Rolle von Zap70 in der Signaltransduktion nach TZR-Stimulation widerspiegelt. Es konnte kein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet werden.

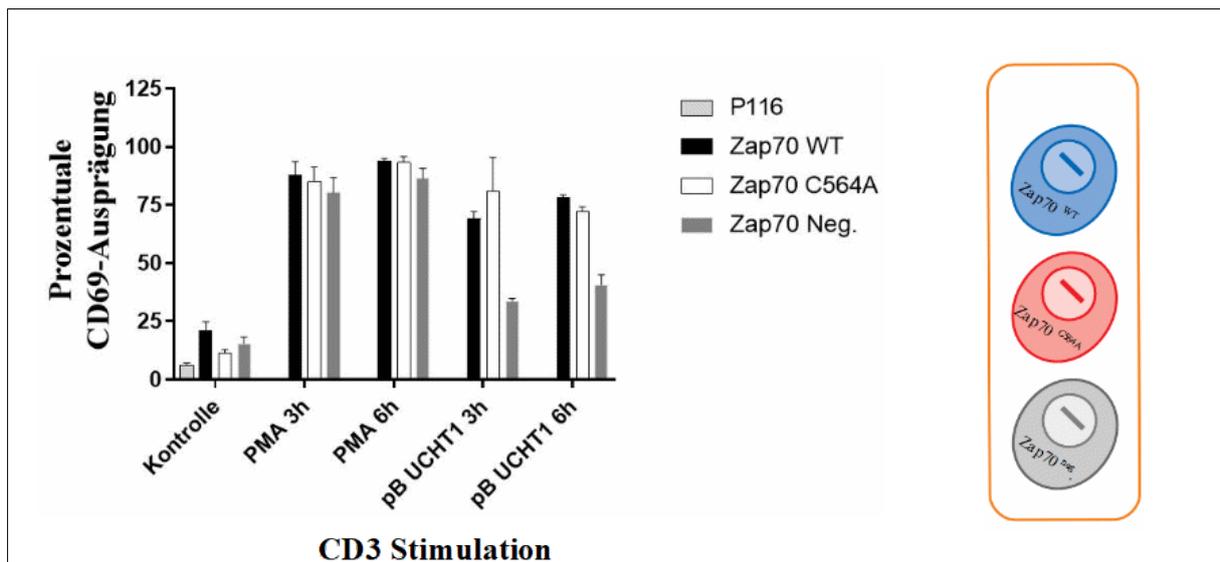


Abb. 3.5: Ausprägung von CD69 nach CD3 Stimulation

Mittels FACS gemessene, absolute Ausprägung von CD69 in stabil transfizierten P116 T-Zellen nach Stimulation des TZR mit plattengebundenen (pB=Platebound=“Plattengebundene Stimulation“) Antikörpern im Vergleich zu PMA (PMA= Phorbol-12-myristat-13-acetat → Positivkontrolle). (n=3)

3.1.5 Zusammenfassung der Funktionsscreenings

Um einen Überblick über mögliche Funktionsunterschiede zwischen dem Zap70 Wildtyp und Zap70 C564A zu erhalten, führte ich die beiden oben beschriebenen Stimulationsexperimente durch und wertete die Ergebnisse mittels Quantifizierung der Western-Blots aus. Es stellte sich eine erhöhte Phosphorylierung von Zap70 auf Y319 in Zellen, die die Mutation Zap70 C564A ausprägten, gegenüber den Wildtypzellen dar, aber kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung der Moleküle distal von Zap70. Während Tewari et al. bei der Argininmutation des Cysteins an Position 564 in Zap70 neben der proximalen Hyperphosphorylierung einen Block der Signaltransduktion beobachten konnten (Tewari et al., 2020), zeigte sich die Signaltransduktion bei einer Alaninmutation nicht beeinträchtigt. Sollte also eine Acylierung an C564 bestehen, wie von Tewari et al. postuliert, so scheint diese nicht notwendig für die Signaltransduktion zu sein.

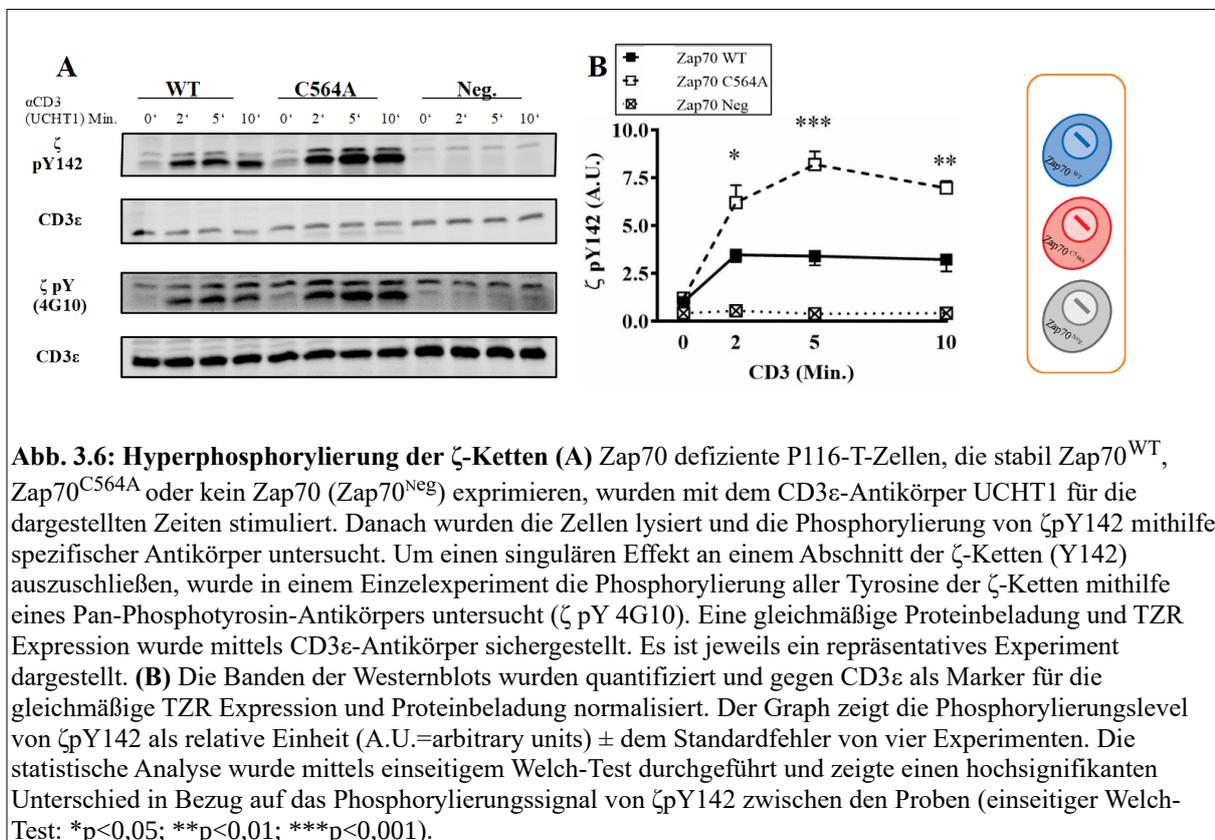
Vorrangig stellte sich jetzt die Frage, aus welchem Grund die Phosphorylierung von Zap70 in Zap70^{C564A} ausprägenden T-Zellen erhöht ist. Die erhöhte Phosphorylierung kann ein Zeichen für eine erhöhte Kinaseaktivität von Lck sein oder für eine erhöhte Phosphorylierung der ζ -Ketten, die zu einer vermehrten Rekrutierung von Zap70 und zu einer erhöhten Phosphorylierung von Zap70 durch Lck führt. Daher habe ich die molekularen Mechanismen der Regulation rund um die Phosphorylierung von Zap70 Y319 näher untersucht.

3.2 Charakterisierung der Funktion von Zap70 C564

In den Phosphorylierungsscreenings konnte im proximalen Signalweg eine deutlich verstärkte Phosphorylierung in der Zap70 Alaninmutante nachgewiesen werden. Hierbei war vor allem Zap70 Y319 betroffen, das nach Bindung von Zap70 an die phosphorylierten ζ -Ketten des TZR von Lck phosphoryliert wird und unabdingbar mit der Aktivierung der Kinaseaktivität von Zap70 verbunden ist (Wang et al., 2010).

3.2.1 Zap70 C564 beeinflusst die Phosphorylierung der ζ -Ketten

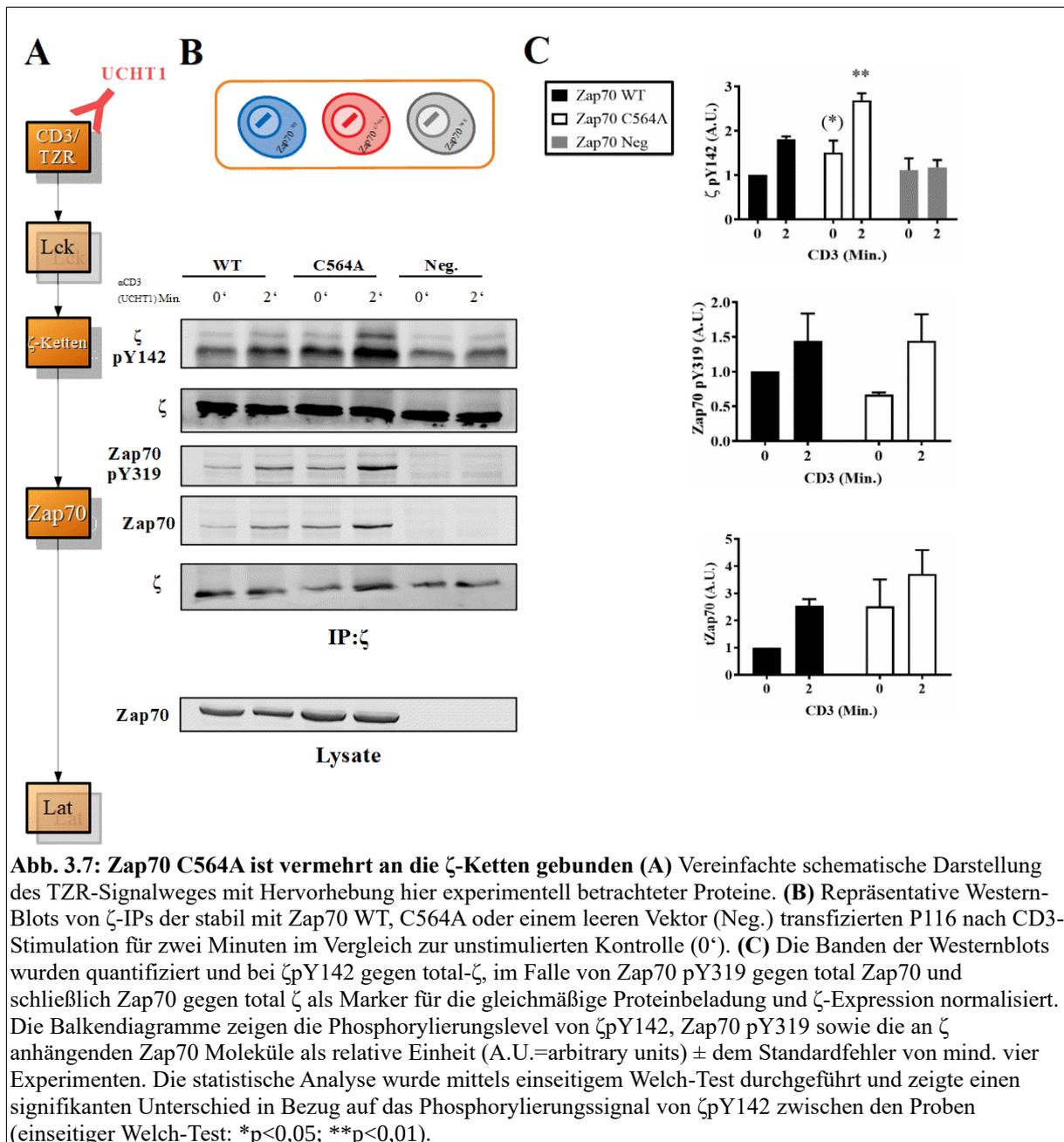
Lck und Zap70 interagieren bekannterweise besonders im Bereich des TZR (Pelosi et al., 1999; Chae et al., 2010; Lo et al., 2018). Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse untersuchte ich nun speziell das Zusammenspiel zwischen Lck und Zap70. Es stellte sich die Frage, ob die Hyperphosphorylierung von Y319 mit einer ebenfalls erhöhten Phosphorylierung der ζ -Ketten einhergeht und einer daraus resultierenden verstärkten Rekrutierung von Zap70 an die ζ -Ketten. Diese Frage überprüfte ich erneut mithilfe der stabil rekonstituierten P116-Zelllinien und Stimulationen mittels UCHT1 wie zuvor in den Phosphorylierungsscreenings. Die Alaninmutante zeigte sich hier bereits in unstimulierten Zellen um etwa 20% stärker an ζ Y142 phosphoryliert als der Wildtyp, jedoch wurde der Unterschied erst nach Stimulation überdeutlich (Abb. 3.6).



Im Mittel waren die ζ -Ketten in Zellen, die Zap70^{C564A} trugen, nach Stimulation auf pY142 stärker phosphoryliert als im Wildtyp. Zusätzlich war praktisch keine Phosphorylierung in Zap70^{Neg} Zellen nachweisbar (Abb. 3.6 A, B).

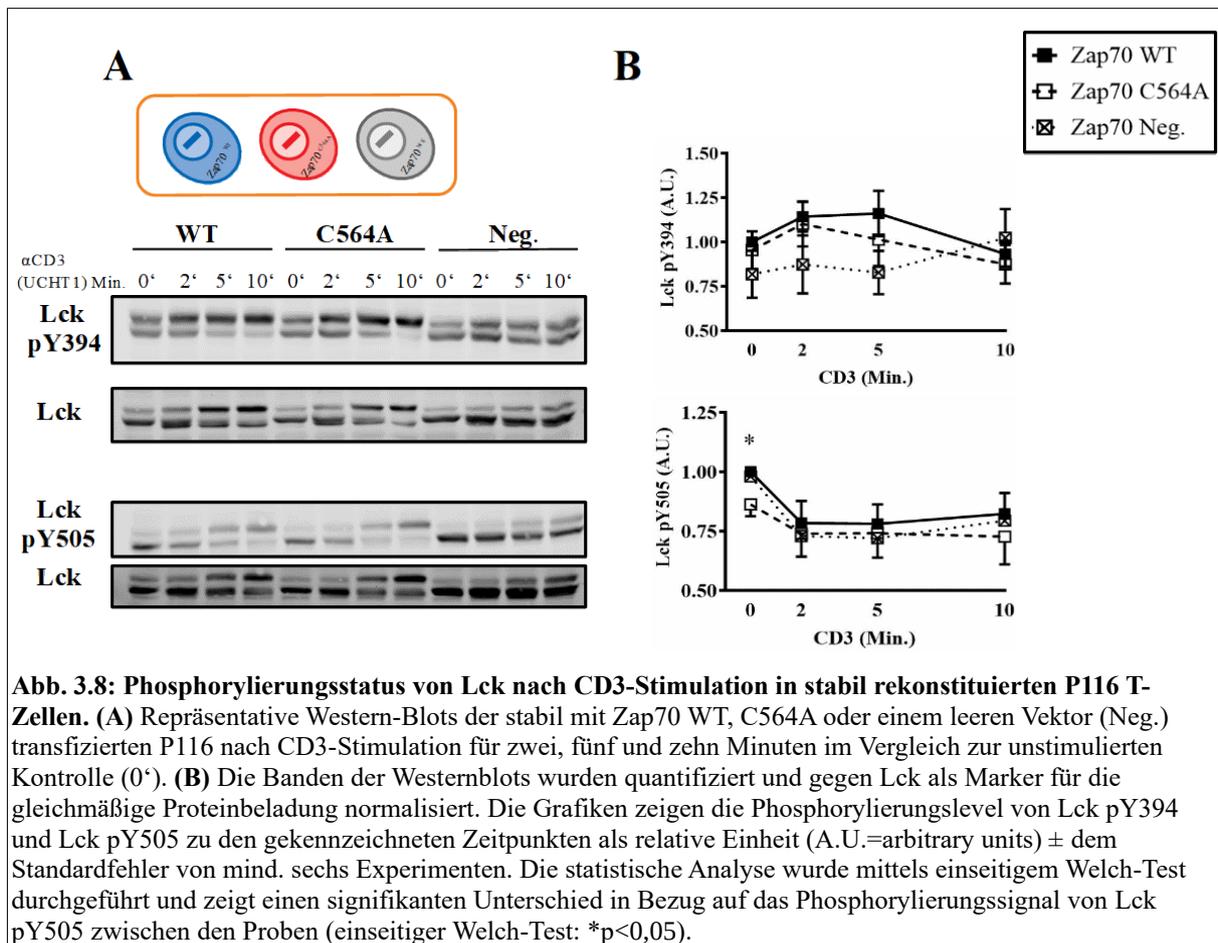
Darüber hinaus überprüfte ich in einem Pilotversuch mit dem Pan-Phosphotyrosinantikörper 4G10 die Gesamtphosphorylierung der ζ -Ketten (Abb. 3.6 A). Auch hier zeigte sich eine Hyperphosphorylierung. Die gewonnenen Erkenntnisse erforderten eine genauere Analyse der Interaktion von Zap70 mit den ITAMs. Hierfür bot sich die Immunopräzipitation der ζ -Ketten an.

Um eine direkt erhöhte Interaktion der ζ -Ketten mit Zap70 nachzuweisen, extrahierte ich aus ruhenden Zellen und nach einer zweiminütigen Stimulation mit UCHT1 mittels einer Immunpräzipitation (IP) durch agarosegebundene CD3 ζ -Antikörper, die ζ -Ketten und anhängende Proteine aus den stabil rekonstituierten P116 T-Zellen, die Zap70^{WT}, Zap70^{C564A} oder Zap70^{Neg} exprimierten. Anschließend wies ich mittels SDS-PAGE und WB sowohl das Phosphorylierungsmuster der ζ -Ketten an Y142 und Zap70 Y319 als auch die Menge von anhängendem Zap70 nach (Abb. 3.7 A). Wie schon in den Phosphorylierungsscreenings bestätigte sich auch in den IPs eine Erhöhung der ζ -Ketten-Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.7 B, C). Zudem ließ sich keine Zunahme der Phosphorylierung Zap70 defizienter (Zap70^{Neg}) Zellen nach Stimulation darstellen, was erneut deutlich macht, dass Zap70, wahrscheinlich durch das Zusammenspiel mit Lck, eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung der ζ -Ketten spielt. Neben den hier beschriebenen Ergebnissen präsentierte sich zudem eine leicht erhöhte Anzahl von Zap70-Molekülen sowohl in Ruhe als auch nach Stimulation an den immunopräzipitierten ζ -Ketten in Zellen, die C564A ausprägten (Abb. 3.7 B, C), ohne dass die Gesamtmenge von Zap70 in den mutierten Zellen um einen ähnlichen Faktor erhöht gewesen wäre, was aus den Lysatkontrollen der IPs hervorging (Abb. 3.7 B). Zudem zeigte sich zwar eine Induktion der Phosphorylierung von Zap70 Y319 in Wildtyp und Mutante, jedoch kein nachweisbarer Unterschied in der Stärke der Phosphorylierung nach Stimulation (Abb. 3.7 B, C). Der Unterschied, der in ruhenden Zellen nachweisbar ist, entsteht durch die größere Menge von Zap70-Molekülen, die bereits in unstimulierten Zellen an die ζ -Ketten gebunden sind. Insgesamt waren die ζ -Ketten in der Alaninmutante also verstärkt phosphoryliert, mehr Zap70 an sie gebunden und - vermutlich infolgedessen - verstärkt an Y319 durch Lck phosphoryliert.



3.2.2 Zap70 C564A übt einen Einfluss auf Phosphorylierungsstatus und Aktivität von Lck aus

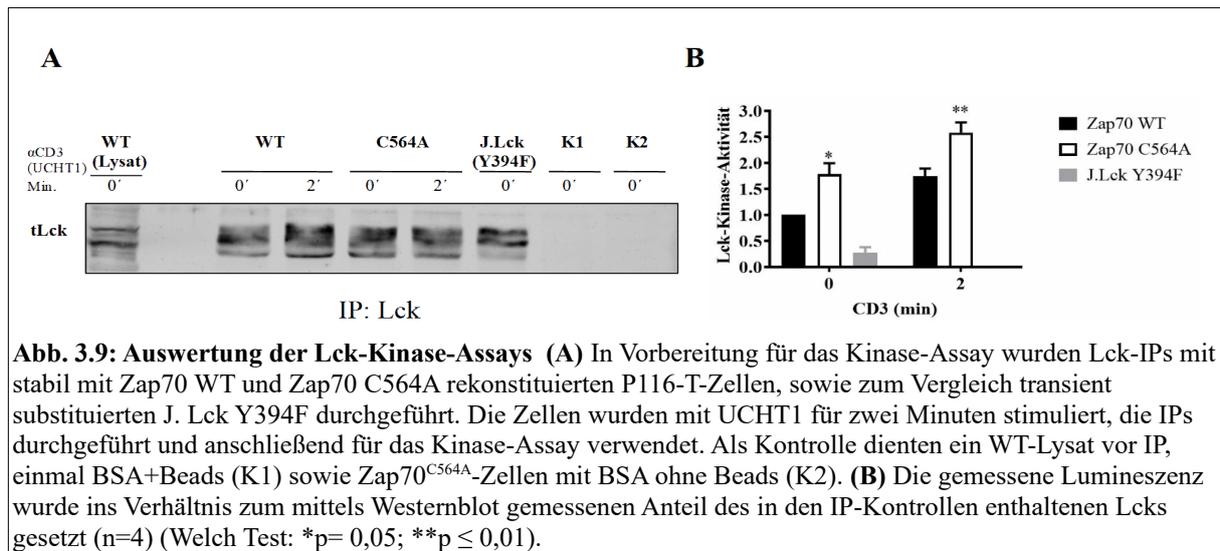
Die bisherigen Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus der ζ-Ketten ergaben vor allem eine erhöhte Phosphorylierung der ITAMs in der Alaninmutante sowie eine quantitativ vermehrte Bindung von Zap70. Da Lck sowohl für die Phosphorylierung der ITAMs als auch für die Phosphorylierung von Zap70 Y319 verantwortlich ist, stellte sich die Frage, ob sich die Mutation in Zap70 auf die Phosphorylierung und/oder die Kinase-Aktivität von Lck auswirkt. Mithilfe der stabil transfizierten P116-T-Zellen, untersuchte ich beide Möglichkeiten.



Nachdem sich in den Immunopräzipitationen die Hyperphosphorylierung der ζ -Ketten und die verstärkte Rekrutierung von Zap70 gezeigt hatte, erweiterte ich das Screening auf die Phosphorylierungsunterschiede nach Stimulation mit UCHT1 um den Nachweis des Phosphorylierungsstatus von Lck Y505 und Lck Y394 (Abb. 3.8 A, B). Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und C564A in der Phosphorylierung des aktivatorischen Y394, das in der Kinase-Domäne liegt. Das inhibitorische Y505 liegt im negativ-regulatorischen C-terminalen Bereich von Lck. Hier präsentierte sich interessanterweise eine signifikant verminderte Phosphorylierung in unstimulierten Zap70^{C564A}-Zellen im Vergleich zu Zap70^{WT}-Zellen (Abb. 3.8 B). In Abgrenzung dazu waren sowohl Zap70^{WT}-, als auch Zap70^{Neg}-Zellen jedoch nahezu vergleichbar auf Y505 phosphoryliert. Das deutet darauf hin, dass die Mutante offenbar einen Funktionsgewinn erfährt, der eventuell zur Behinderung der inhibitorischen Phosphorylierung von Lck Y505 führt. Dieser leichte Unterschied ist jedoch vermutlich nicht der einzige Grund für die bisherigen Ergebnisse, da er nach Stimulation verschwindet.

Mittels ADP-Glo™ Kinase-Assay ging ich dem potentiellen direkten Einfluss von Zap70 C564A auf die Aktivität von Lck auf den Grund. Hierfür nutzte ich erneut die stabilen P116-T-Zelllinien Zap70^{WT} und Zap70^{C564A} sowie im Vergleich J.Lck^{Y394F} - eine Lck defiziente Jurkat-Zelllinie - in die transient eine Y394F „Kinase-dead“-Lck Mutante eingefügt wurde, so dass Lck nicht mehr an Position 394 phosphoryliert und aktiviert werden kann (Kästle et al. 2020). Die Phosphorylierung von Y394 ist

essentiell für die Funktion von Lck. Die Mutation zu Phenylalanin nimmt die Möglichkeit dieser Phosphorylierung und sorgt für eine konstitutiv geschlossene/inaktive Form von Lck (Philipsen et al., 2017).



Bei der Messung der Kinaseaktivität von Lck ergab sich in ruhenden Zellen, die Zap70 C564A ausprägten, eine etwa 50% höhere Aktivität von Lck als in Zap70^{WT}-Zellen (Abb. 3.9). Im Vergleich dazu zeigte sich die Aktivität in J.Lck mit Lck^{Y394F} gegenüber den Zellen mit Zap70 Wildtyp um 70% vermindert. Nach Stimulation des TZR/CD3-Komplexes mittels UCHT1 stieg die Kinaseaktivität von Lck erwartungsgemäß in beiden Zelllinien an (Abb. 3.9). In beiden Zelllinien fand sich nach Stimulation des TZR eine deutliche Aktivitätszunahme von Lck gegenüber der Kontrolle. Die Daten bestätigen gemeinsam mit den Beobachtungen aus den Phosphorylierungsscreenings das Modell unserer Arbeitsgruppe, wonach die Lck-Aktivität nach CD3 Stimulation ohne nennenswerte Veränderung der Phosphorylierung von Lck auf Y394 ansteigt (Abb. 3.8 B, C) (Stirnweiss et al., 2013).

Es stellte sich die Frage, warum Lck aktiver in Zellen ist, die eine Mutation an Zap70 C564 aufweisen. Folglich galt es nun, das Zusammenspiel von Zap70 und Lck genauer zu untersuchen.

3.2.3 Die Hyperphosphorylierung in Zap70 C564A ist von Lck abhängig

Um das Zusammenspiel von Lck und Zap70 besser zu verstehen, nutzte ich ein HEK-Zell-Modell (DuBridge et al., 1987). HEK^{293T}-Zellen sind eine Epithelzelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen und exprimieren normalerweise weder den TZR noch Lck noch Zap70. Sie eignen sich so hervorragend dazu, Interaktionen beider Kinasen mit dem TZR zu untersuchen, indem man einzelne Moleküle in den HEK-Zellen exprimiert. Ich nutzte für meine Experimente HEK^{293T}-TCR-Zellen, die stabil den TZR/CD3-Komplex exprimieren und sich dadurch idealerweise für Untersuchungen der proximalen Signaltransduktion eignen (Abb. 3.10). Diese wurden mir freundlicherweise von John R. James zur Verfügung gestellt (James and Vale, 2012). Um Cotransfektionen zu vermeiden, benutzte ich außerdem HEK^{293T}-TCR-Zellen, die bereits den Lck Wildtyp exprimierten und mir

freundlicherweise von M. Kästle zur Verfügung gestellt wurden (Kästle et al., 2020) (Abb. 3.10). Beide Zelllinien erhielten jeweils in transients Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation den Zap70 Wildtyp, die Zap70 C564A-Mutante oder einen leeren Vektor (pBos) (Abb. 3.10).

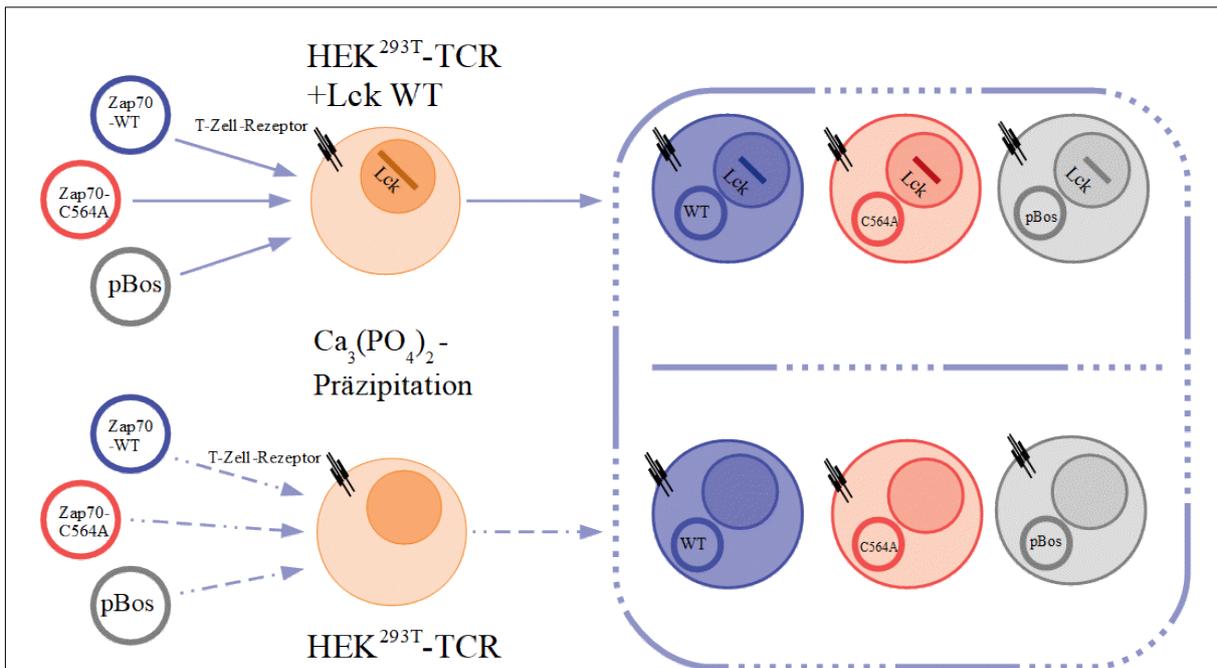


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der transfizierten HEK^{293T}-TCR-Zellen

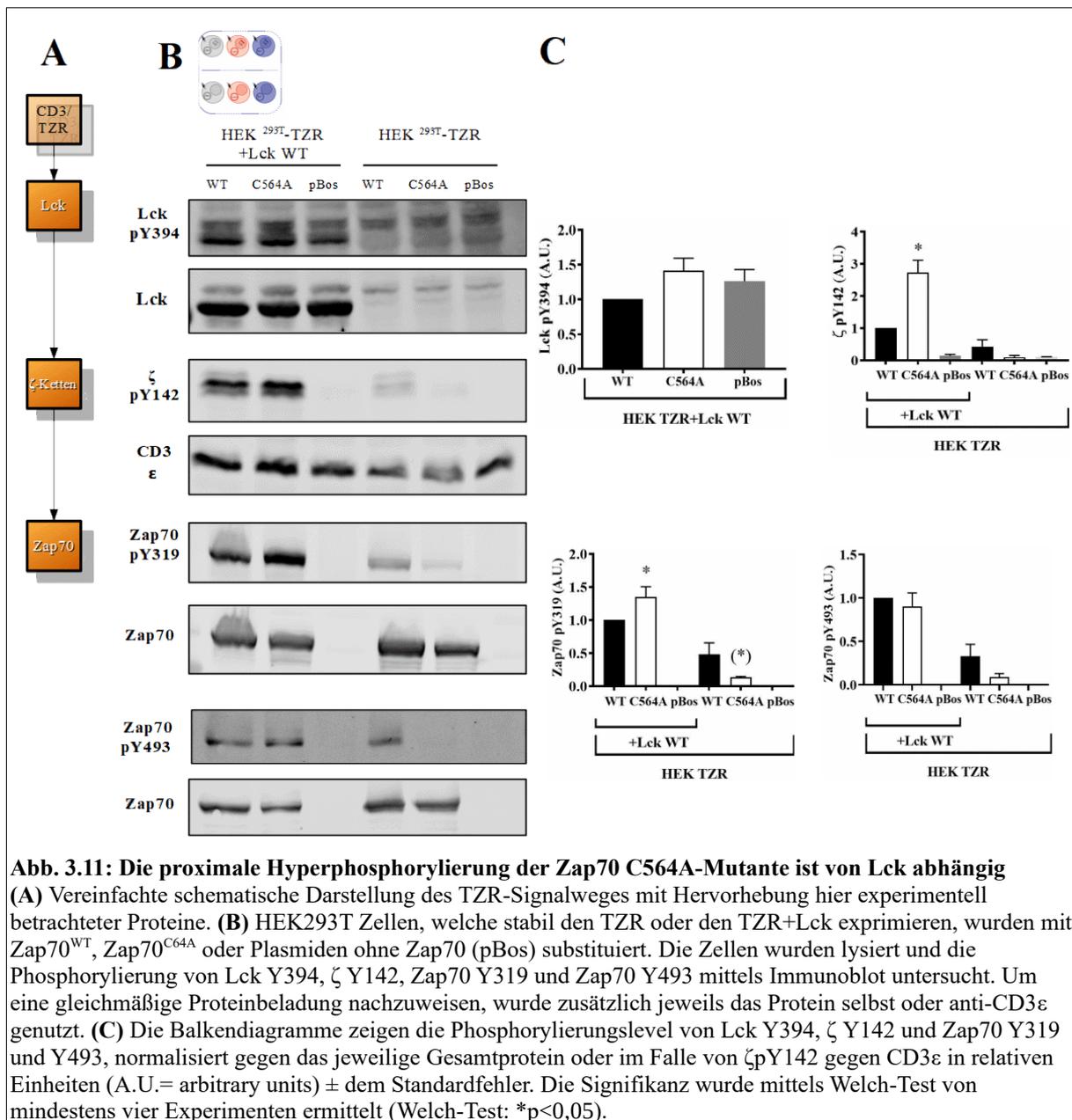
Mittels Calciumphosphatpräzipitation wurden HEK^{293T}-TCR-Zellen mit und ohne stabil exprimierten Lck WT vorübergehend mit dem Zap70 WT, Zap70 C564A sowie einem leeren Vektor (pBos) transfiziert.

Etwa 20 Stunden später wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und WB hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsmuster bei gleicher Ausprägung von Zap70 analysiert (Abb. 3.11 B). Wie auch in den P116-T-Zellen zeigte sich hier eine erhöhte Phosphorylierung von Zap70 Y319 in Zap70 C564A und Lck exprimierenden Zellen gegenüber dem Zap70 WT in den entsprechenden Zellen (Abb. 3.11 B, C). Zelllinien, die jedoch Zap70, aber kein Lck, exprimierten, zeigten insgesamt eine verminderte, jedoch deutlich messbare Phosphorylierung auf Zap70 Y319, wobei sich diese in der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich um etwa 70% verringert zeigte (Abb. 3.11 B, C).

Dieselbe Konstellation zeigte sich in der Phosphorylierung der ITAMs. In Zellen, die zusätzlich zum Lck WT auch Zap70 C564A ausprägten, lag die Phosphorylierung von ζ pY142 deutlich über der Phosphorylierung im entsprechenden Zap70 WT, während die Phosphorylierung in Abwesenheit von Lck in der C564A-Mutante gegenüber dem Zap70 WT vermindert war (Abb. 3.11 B, C). In Zap70 defizienten Zellen zeigte sich im Übrigen weder in Präsenz von Lck noch in dessen Abwesenheit eine ernsthafte Phosphorylierung auf ζ pY142, was erneut die essentielle Rolle von Zap70 in der Phosphorylierung der ITAMs betont. Eine Arbeit von 2004 demonstrierte bereits, dass die TZR induzierte Phosphorylierung der ITAMs in Zap70 defizienten Zellen mangelhaft ist (Steinberg et al.,

2004). Meine Ergebnisse bestätigen diese Annahme sowohl in P116-T-Zellen (vgl. Abb. 3.6) als auch im HEK-Modell.

Auch bei der Phosphorylierung von Zap70 Y493 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie in P116-T-Zellen (Abb. 3.3 C und Abb. 3.4 C). Mit Lck waren Zap70 Wildtyp und C564A in HEK-Zellen nahezu gleichmäßig phosphoryliert. Bei intrazellulär fehlendem Lck konnte im Wildtyp weiterhin eine Phosphorylierung nachgewiesen werden, in der Alaninmutante jedoch nicht (Abb. 3.11 B, C).



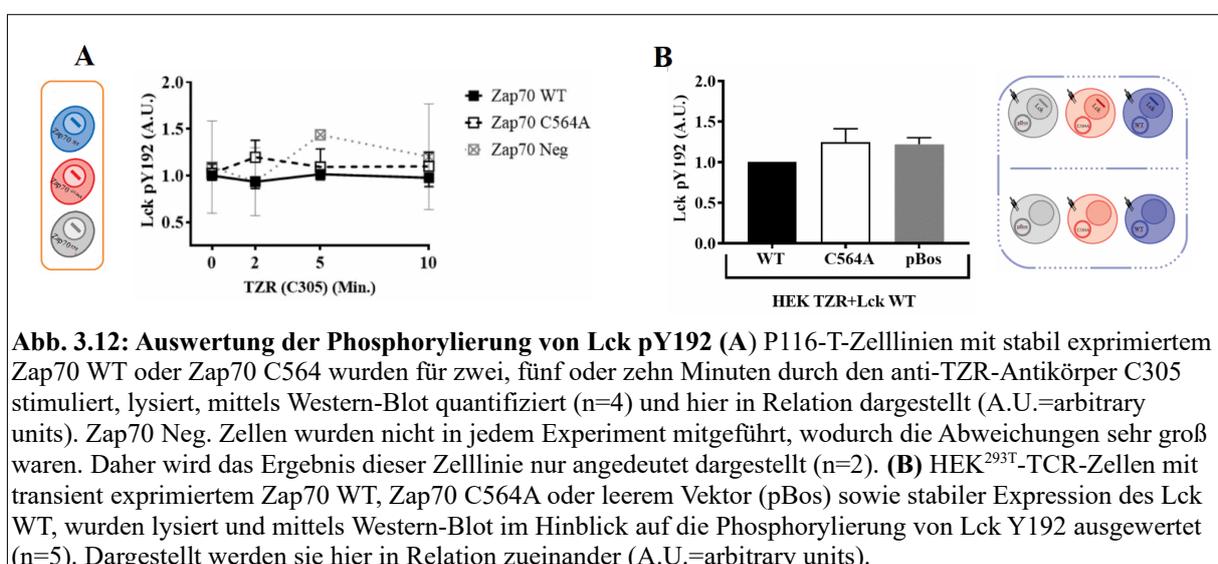
Um die ITAMs zu phosphorylieren, muss Lck an den TZR rekrutiert werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein RK-Motiv innerhalb von CD3ε an die SH3-Domäne von Lck bindet und so die Rekrutierung und Aktivierung von Lck erleichtert (Hartl et al., 2020). Wir kooperierten mit der Freiburger Arbeitsgruppe rund um Fr. Prof. Susanna Minguet, deren Team auf *in situ proximity*

ligation assays (PLA) im Bereich der TZR spezialisiert ist, um die Annäherung von Lck an CD3 ϵ in verschiedenen Zelllinien zu objektivieren (Schultz et al., 2022). PLA ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, indem es ein Fluoreszenzsignal für ein einzelnes Ereignis liefert, welches fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Hierbei wird ein Antikörperpaar eingesetzt, das, wenn sich die Proteine in einem bestimmten Abstand zueinander befinden, in der Lage ist, eine Rolling-circle-DNA zu produzieren, die dann mit Fluoreszenzsonden detektiert werden kann. Auf diese Weise wird eine räumliche Annäherung der Proteine zueinander sichtbar. Für unsere Versuche wurden Zap70^{WT}, Zap70^{C564A} und Zap70^{Neg} Zellen mit einem CD3 ϵ -Antikörper stimuliert. Eine Positivkontrolle wurde mit Pervanadat stimuliert, eine Negativkontrolle unstimuliert gelassen. P116-T-Zellen, die Zap70^{C564A} exprimierten, zeigten deutlich mehr Interaktion von Lck und CD3 ϵ , als die übrigen Zelllinien (Schultz et al., 2022). Dies erklärt die erhöhte Lck-Kinaseaktivität sowie die vermehrte Phosphorylierung der Lck-Substrate.

3.2.4 Zap70 scheint keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Lck Y192 zu nehmen

Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass Zap70 die Aktivität von Lck hemmen kann. Sjölin-Goodfellow et al. hatten beobachtet, dass bei Inhibition der Kinase-Aktivität von Zap70 eine deutliche Verringerung der Phosphorylierung von Lck an Y192, welches in der SH2-Domäne von Lck lokalisiert liegt, in unstimulierten Zellen zu beobachten war und präsentierten ein Modell, in dem die Phosphorylierung an Y192 durch Zap70 zu einem inaktiven Status von Lck führen soll (Sjölin-Goodfellow et al., 2015).

Um zu untersuchen, ob Lck Y192 weniger in Zellen phosphoryliert ist, die die C564A-Mutante oder kein Zap70 exprimieren, nutzte ich erneut TZR Stimulationen in den stabil rekonstituierten P116 Zellen (Abb. 3.12 A) sowie das beschriebene HEK^{293T}-TCR-Modell ohne Stimulationen (Abb. 3.12 B).



Entgegen der Erwartung einer verminderten Phosphorylierung zeigte sich kaum ein Unterschied in der Phosphorylierung von Lck Y192 zwischen Zellen, die Zap70^{C564A} oder gar kein Zap70 (pBos) ausprägten, gegenüber WT-Zellen (Abb. 3.12).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In erster Linie zeigen meine Ergebnisse, dass das Cystein 564 eine regulatorische Funktion innerhalb von Zap70 ausübt. Eine Mutation zu Alanin führt zu einer Hyperphosphorylierung der ζ-Ketten sowie an Zap70 Y319. Dies scheint auf ein verändertes Zusammenspiel mit Lck zurückzuführen zu sein, da Lck eine erhöhte Kinaseaktivität aufweist sowie eine leicht verringerte Inhibition im Ruhezustand in Zellen, die eine C564A Mutante von Zap70 exprimieren. In Abwesenheit von Lck waren die Effekte auf die Phosphorylierung der ζ-Ketten und Zap70 nicht nachweisbar.

In der folgenden Diskussion werde ich auf die einzelnen Effekte und mögliche Erklärungen ausführlich eingehen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Zap70^{C564A}-Mutante. Nach der Betrachtung der experimentellen Ergebnisse, lassen sich zwei Haupteffekte feststellen:

- I. Die TZR-vermittelte Signaltransduktion ist in Zellen, die die Zap70^{C564A} Mutante exprimieren, erhalten. Somit erscheint die S-Acylierung von C564 irrelevant für die Weiterleitung des TZR-vermittelten Signals zu sein.
- II. Zap70 C564A beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung und die enzymatische Aktivität von Lck.

4.1 Die S-Acylierung von Zap70 C564 spielt keine Rolle bei der Signaltransduktion

Cysteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Tyrosinkinase (siehe Kapitel 1.3). Im Jahr 2020 veröffentlichten Tewari et al. eine Arbeit über die homozygote Cystein-Arginin-Mutation von Zap70 C564 (Tewari et al., 2020). Sie suchten nach einer molekularen Erklärung für die klinischen Symptome eines Falls von schwerer kombinierter Immundefizienz (Turul et al., 2008) durch eine Cystein→Arginin Spontanmutation von Zap70 C564. Die molekularen Mechanismen dieser Erkrankung sind weiterhin nicht völlig geklärt. Lediglich eine Häufung von Mutationen in der Kinase-Domäne von Zap70 ist bekannt (vgl. Abb. 1.6) (Sharifinejad et al., 2020). Tewari et al. zeigten, dass die TZR-vermittelte Signaltransduktion distal von Zap 70 bei der Mutation C564R in P116-T-Zellen nachhaltig gestört ist, obwohl im proximal gelegenen Signalweg die Tyrosinreste Y319, Y493 in Zap70 sowie Y394 in Lck eine Hyperphosphorylierung aufweisen (vgl. Tabelle 4.1). Sie vermuteten aufgrund ihrer Messungen mittels Acyl-Biotin-Exchange Assay, durch die S-acylierte Proteine identifiziert werden können, eine stimulationsabhängige S-Acylierung von Zap70 C564, die durch die Argininmutation verhindert wird, wodurch die Signaltransduktion blockiert wurde. In den zellulären Experimenten zeigte sich eine unverändert erhaltene Translokation von Zap70 zur Plasmamembran, jedoch ein Abbruch des Signals direkt danach, so dass Lat, SLP-76 und PLC γ 1 bereits nicht mehr adäquat phosphoryliert wurden, folgend kein Calciumfluss mehr in der Mutante nachweisbar war und auch Erk1/2 kein Phosphorylierungssignal im WB aufwies (vgl. Tabelle 4.1). Zusätzlich wurde eine enorme Reduktion der CD69 Expression von Tewari et al. beschrieben. Sie beschrieben auch eine Substitution von C564 durch Serin, bei der sie die gleichen Ergebnisse beobachten konnten. Abgesehen von der oben genannten Hyperphosphorylierung verhalten sich die C564R-Mutante und die C564S-Mutante von Tewari et al. nahezu exakt wie ihre Zap70-defiziente Kontrolle. Die vermutete ausbleibende Signaltransduktion bei fehlender S-Acylierung durch die Mutation liefert zwar eine plausible Begründung für eine Zap70-assoziierte kombinierte Immundefizienz, jedoch spiegeln meine

experimentellen Daten die daraus gezogenen Schlüsse, dass die fehlende S-Acylierung für die nachgewiesenen Phänomene verantwortlich sei, nicht wider.

In meinen Experimenten mit der C564A-Mutante zeigte sich ebenfalls - wie beschrieben - eine Hyperphosphorylierung, jedoch ist die Signaltransduktion in den stabil mit Zap70 C564A rekonstituierten P116-T-Zellen vollständig erhalten, obwohl die Alaninmutation eine S-Acylierung dieser Stelle verhindert. Zusätzlich zeigt sich kein Unterschied in der CD69 Expression zwischen Zellen, die Zap70 WT und Zellen, die Zap70 C564A exprimieren (vgl. Tabelle 4.1). Teilweise noch nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem keinen Abbruch der Signaltransduktion bei einer C564S-Mutation, bestätigen jedoch den Signalabbruch bei der C564R-Mutation (Schultz et al., 2022). Fraglich ist nun, wie diese Unterschiede zustande kommen.

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der experimentellen Ergebnisse von Tewari et al. und der Ergebnisse dieser Arbeit „↑“ = erhöht, „-“ = unverändert, „↓“ = blockiert, „(↑)“ = geringfügig erhöht

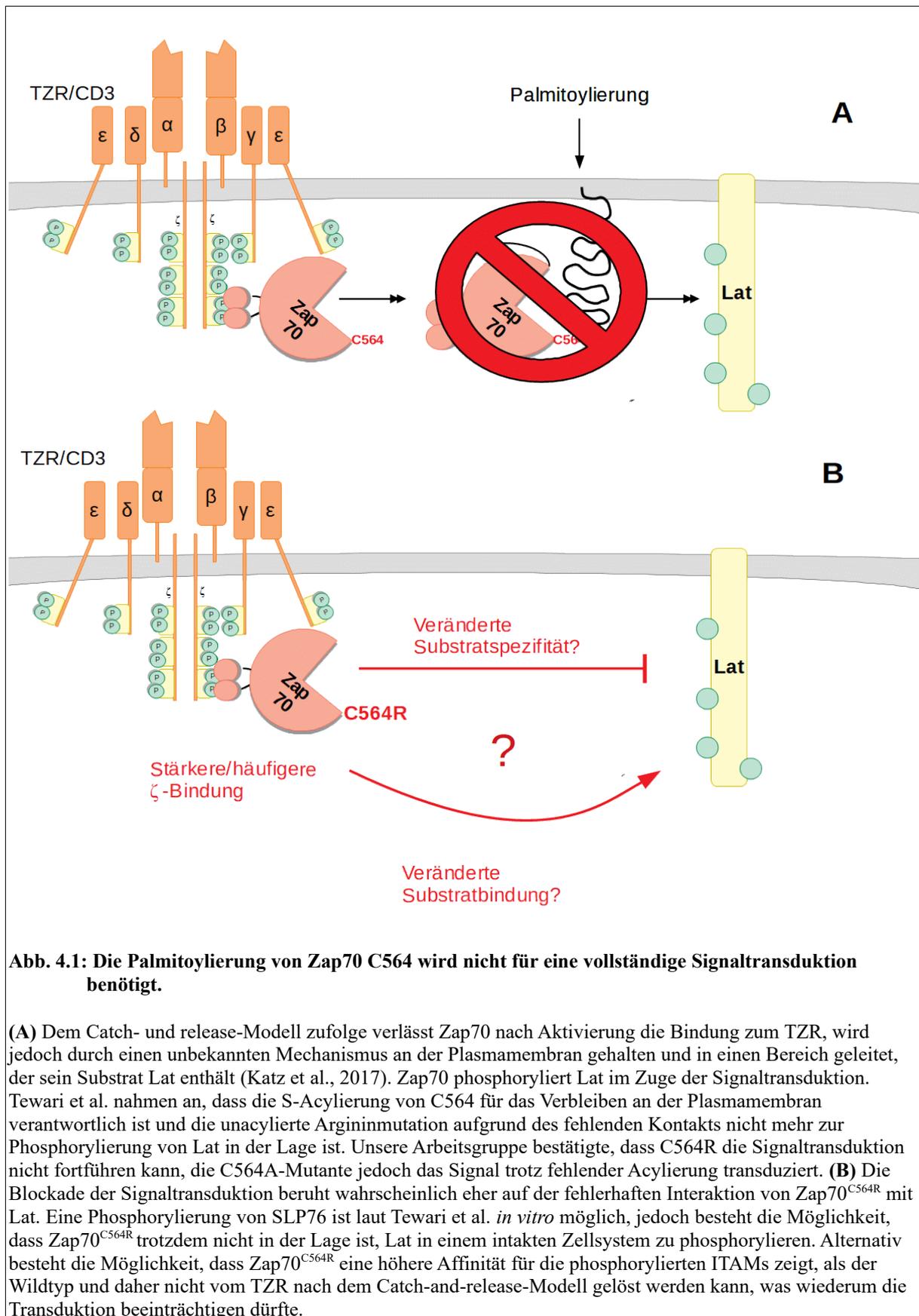
Vergleich mit P116-T-Zellen die Zap70 Wildtyp exprimieren	C564R	C564A
ζ pY142	Nicht betrachtet	↑
pSrc (Lck pY394)	↑	-
Zap70 pY319	↑	↑
Zap70 pY493	↑	(↑)
SLP76 pY128	↓	Nicht betrachtet
Lat pY191	↓	(↑)
PLCγ1 pY783	↓	-
Calcium-Fluss	↓	-
Erk 1/2 pT202/Y204	↓	(↑)
CD69-Expression	↓	-

Das Modell von Tewari et al. orientiert sich am „Catch-and-release-Modell“ (Abb. 1.4 A). Nach der Phosphorylierung der ζ-Ketten durch Lck wird Zap70 rekrutiert und nach Aktivierung zusätzlich an Y126 in der Interdomäne A phosphoryliert, was zur Dissoziation von den ITAMs beiträgt. Zusätzlich wird ATP in der Kinase-Domäne gebunden, was die Bindungsaffinität an die ITAMs weiter schwächt und sicherstellt, dass ausschließlich aktivierte Kinasen aus der Bindung der ITAMs entlassen werden. Nach Ablösung vom TZR findet eine kurze Wanderung von Zap70 auf bisher ungeklärtem Weg in einen benachbarten Cluster statt, welcher Lat enthält. Zap70 phosphoryliert dort Lat an mindestens vier Tyrosinen (Katz et al., 2017). Tewari et al. vermuten, dass die Palmitoylierung ein essentieller Bestandteil des Verbleibens im Bereich der Plasmamembran ist, da es sich bei Zap70 um ein zytosolisches Molekül handelt, das keine bekannte Domäne besitzt, die eine direkte Verankerung und Lokalisierung an der Plasmamembran erlaubt. Die Ergebnisse der Alaninmutante weisen jedoch darauf hin, dass die Palmitoylierung für diesen Verbleib überflüssig ist (Abb. 4.1 A). Stattdessen schlage ich drei andere Prozesse vor, die die Effekte der Cystein- zu Arginin-Mutation erklären können, die nicht

durch Tewari et al. getestet worden sind. Erstens ist es möglich, dass die Punktmutation die Substratspezifität von Zap70 verändert (Abb. 4.1 B). Tewari et al. überprüften mithilfe gereinigter Proteine, ob die Kinase-Aktivität der Mutante erhalten blieb. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der Phosphorylierung von SLP-76 *in-vitro* (Tewari et al., 2021). Interessant wäre hier jedoch die Phosphorylierung von Lat, als direktem Substrat von Zap70, sowie das Verhalten der mutierten Kinase *in vitro* oder in einem intakten Zellsystem gewesen, wie z.B. die Überexpression von Zap70 C564R und Lat in einem konventionellen HEK293T-Zell-Modell. Es wäre also möglich, dass die C564R Mutante in der Lage ist, SLP76, aber nicht Lat zu phosphorylieren.

Es ist zweitens möglich, dass die C564R Mutation die Annäherung von Zap70 an Lat verhindert, wodurch die Phosphorylierung von Lat nicht mehr möglich ist und das Signal unterbrochen wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zap70 in der Lage ist, Komplexe mit Lat zu formen, die essentiell sind, um die Phosphorylierung von Lat durch Zap70 zu ermöglichen (Xie et al., 2013). Die Arbeitsgruppe rund um A. Weiss hat gezeigt, dass eine prolinreiche Sequenz in Lat mit der SH3 Domäne von Lck interagiert, welche wiederum an das phosphorylierte Y319 von Zap70 über seine SH2-Domäne bindet (Lo et al., 2018). Hier wirkt Lck als molekulare Brücke zwischen Zap70 und Lat. Jene Arbeit schlug ebenfalls vor, dass die Komplexierung nahe des TZR stattfindet, da Lat in CD3- ζ -Immunopräzipitationen zu finden war. Allerdings zeigten Daten der selben Studie, dass der Lck/Zap70/Lat-Komplex auch unabhängig vom TZR formbar ist. Dies wurde in TZR-defizienten HEK293T-Zellen nachgewiesen (Lo et al., 2018). Zudem konnte in einer davon unabhängigen Studie demonstriert werden, dass Zap70 und Lat TZR-unabhängige Komplexe formen können und dass Lat zur Aktivierung von Zap70 beitragen könnte (Dine et al., 2021). Die C564R Mutation könnte also die Bildung solcher Komplexe verhindern.

Drittens könnte der Catch-and-release Mechanismus gestört sein. Die mangelnde Signaltransduktion im distalen Signalweg in Zellen, die die C564R Mutante exprimieren, könnte auf eine höhere Affinität von Zap70^{C564R} gegenüber den phosphorylierten ITAMs hinweisen (Abb. 4.1 B).



4.2 Zap70 beeinflusst die Aktivität und Lokalisierung von Lck

Wie meine Experimente und die Arbeit von Tewari et al. gezeigt haben, ist die proximale Signalgebung in Zellen erhöht, die eine Alanin- oder Arginin-Mutante von Zap70 C564 exprimieren. Wie die Experimente der Arbeitsgruppe um S. Minguet gezeigt haben (siehe Kapitel 3.2.3), findet eine verstärkte Annäherung von Lck an die CD3 ϵ -Kette statt. Lck bindet also vermehrt an CD3 ϵ , was zum Nachweis einer erhöhten der Kinaseaktivität führt (siehe Kapitel 3.2.2).

4.2.1 Die Lck-Aktivität ist in Zap70 C564A-exprimierenden Zellen erhöht

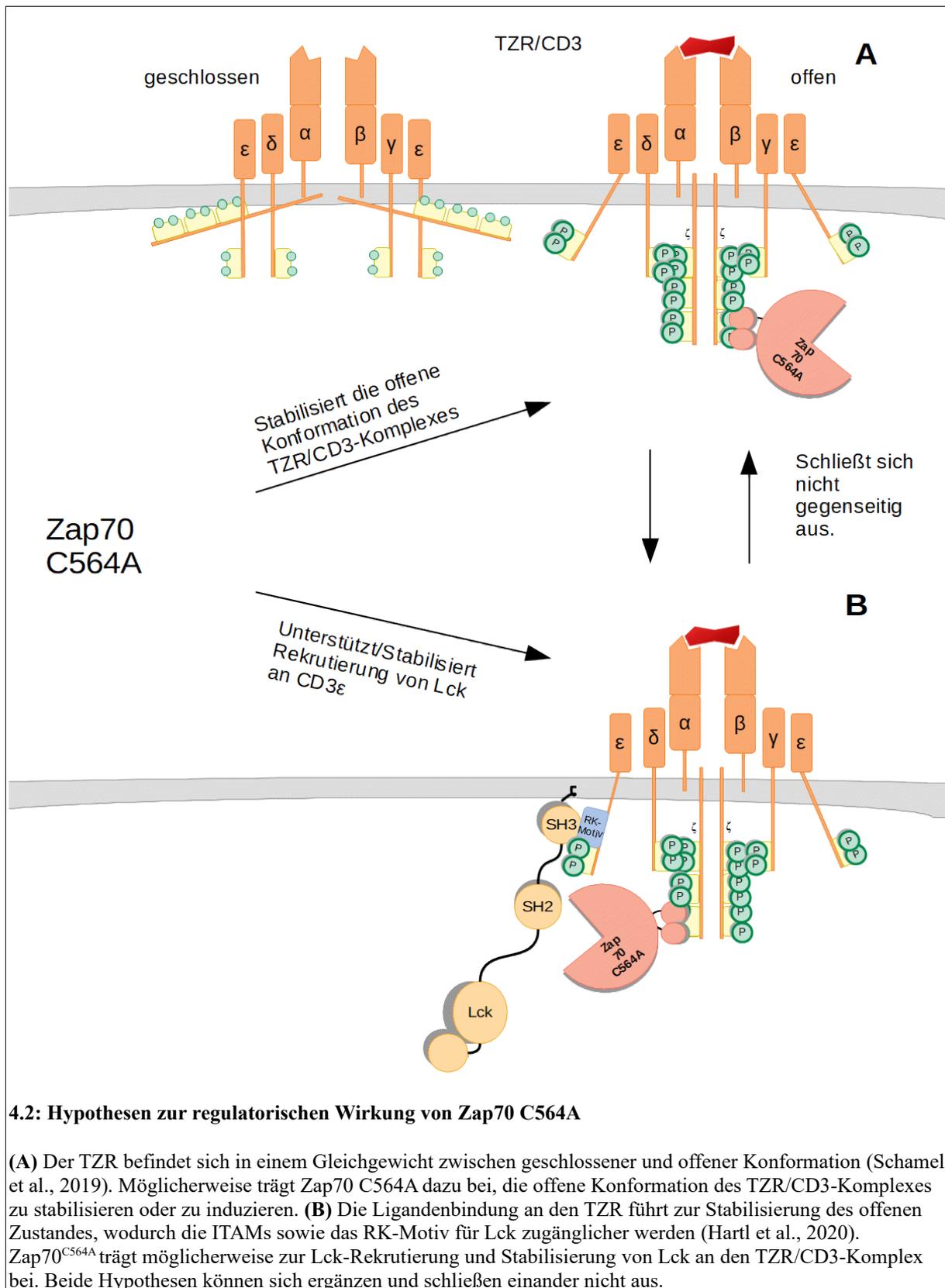
Die erhöhte Lck-Aktivität zeigte sich experimentell in dieser Arbeit durch die verstärkte Phosphorylierung direkter Lck-Substrate, wie der ζ -Ketten (Abb. 3.6) und Y319 in Zap70 (Abb. 3.4 B, C und Abb. 3.3 B, C), sowie in der verminderten Phosphorylierung von Lck Y505 im unstimulierten Zustand (Abb. 3.8 A, B). Zudem konnte auch direkt mittels Lck-Kinase-Assay eine signifikant erhöhte Lck-Kinaseaktivität in P116 Zellen, die die C564A Mutante stabil exprimieren, gegenüber Zap70^{WT} exprimierenden P116-Zellen sowohl in unstimulierten, als auch in stimulierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Möglicherweise beruht dies auf der Interaktion der SH2-Domäne von Lck mit dem phosphorylierten Zap70 Y319 (Abb. 4.2 B). Tewari et al. war es gelungen, in stabilen Zap70^{C564R}-T-Zellen durch Lck-IPs eine erhöhte direkte Interaktion von Lck mit Zap70 nachzuweisen. In meinen Experimenten blieben entsprechende Lck-Immunopräzipitationen zum Nachweis von vermehrt Lck-anhängendem Zap70 nicht aussagekräftig. Dass die Hyperphosphorylierung des proximalen TZR-Signals auf ein verändertes Zusammenspiel von Zap70 und Lck rückführbar ist, wird jedoch nirgendwo deutlicher als in den HEK293T-TCR-Zell-Experimenten (Abb. 3.11 B,C). Hier ist zu beobachten, dass in HEK293T-TCR Zellen die Lck und Zap70 C564A exprimieren, die ζ -Ketten hyperphosphoryliert sind, wie ich es auch in P116-T-Zellen beobachten konnte, während in HEK293T-TCR Zellen, die Zap70 C564A, aber nicht Lck exprimieren, praktisch keine Phosphorylierung der ζ -Ketten in der Mutante stattfindet (Abb. 3.11 B,C).

4.2.2 Zap70 C564A fördert die Interaktion von Lck mit CD3 ϵ

Eine alternative Sichtweise zur den Forschungsergebnissen von Tewari et al. bietet sich, wenn man kürzlich erlangte Erkenntnisse über die Interaktion von Lck mit CD3 ϵ einbezieht sowie kürzlich entsprechend publizierte Daten, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um W. Schamel und S. Minguet der Universität Freiburg entstanden. Demnach fördert Zap70 C564A die Interaktion von Lck mit CD3 ϵ (Schultz et al., 2022). Die Freiburger Arbeitsgruppe stellte ein Modell vor, welches postuliert, dass sich der TZR in einem Gleichgewicht zwischen offener/aktiver und geschlossener/inaktiver Konformation befindet (Schamel et al., 2017, 2019). Bei Ligandenbindung geht der TZR in die offene Konformation über, was zur Phosphorylierung der ITAMs durch Lck und zur weiteren Signaltransduktion führt.

Im Jahr 2020 wurde eine neue Interaktion zwischen Lck und dem TZR im Rahmen eines neu entdeckten Motivs in der CD3 ϵ -Kette entdeckt, das nach seiner Sequenz (RKxQRxxY) RK-Motiv

getauft wurde. Die Studie vermutet einen Mechanismus, in dem die Ligandenbindung des TZR zur Stabilisierung seiner aktiven Konformation führt, wodurch das RK-Motiv und die CD3-ITAMs zugänglicher werden. Die Lck-SH3-Domäne bindet in diesem Modell das RK-Motiv und rekrutiert so Lck in die Nähe der ITAMs, wo dieses seine Substrate phosphoryliert. Diese Interaktion sowie die Position von Lck in der Nähe der ITAMs führt zusätzlich zu einer erhöhten Kinaseaktivität. In der Abwesenheit eines Liganden finden zwar ebenfalls zufällige Kollisionen von Lck mit dem TZR statt, führen aufgrund der instabilen TZR-Konformation aber nicht zur Lck-Bindung (Hartl et al., 2020). In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigen meine Ergebnisse und die von der Arbeitsgruppe um S. Minguet sowohl eine erhöhte Kinaseaktivität von Lck, als auch eine erhöhte Assoziation mit dem TZR (Abb. 4.2 B). Es ist möglich, dass Zap70 C564A dazu beiträgt, die offene Konformation des TZR/CD3-Komplexes zu erhalten oder hervorzurufen (Abb. 4.2 A). Gestützt wird diese Annahme durch Ergebnisse eines *Proximity Ligation Assays* (PLA), das mit den in dieser Arbeit verwendeten Jurkat P116 T-Zellen (Zap70^{WT}, Zap70^{C564A} und Zap70^{Neg}) in Freiburg durchgeführt wurde. Hierbei wurde untersucht, inwiefern sich Lck und der TZR nach Stimulation in diesen drei Zellreihen annähern. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Annäherung von Lck an den TZR/CD3-Komplex in Zellen, die Zap70^{C564A} ausprägten, sowohl in ruhenden als auch in stimulierten Zellen gegenüber Zellen, die Zap70^{WT} exprimierten (Schultz et al., 2022). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht auch die erhöhte Assoziation von Zap70 mit dem TZR in Ruhe und nach CD3-Stimulation, auch wenn sich die Ergebnisse nicht statistisch signifikant zeigten (Abb. 3.7 B, C).



4.3 Zap70 C564A ist möglicherweise weniger autoinhibiert

Zap70 besitzt eine sehr spezielle Protein-Architektur. In der autoinhibierten Konfiguration liegen die ungebundenen SH2-Domänen in einer L-ähnlichen Konfiguration vor, in der eine ITAM Bindung unmöglich ist (Gangopadhyay et al., 2020). Die beiden SH-Domänen liegen dabei eng an die Kinase-Domäne an. Dazwischen liegt ein Teil der Interdomäne B, der mit der Kinase-Domäne interagiert. Dies reduziert die Flexibilität der Kinase-Domäne und behindert so den Übergang zwischen „aktiver“ und „inaktiver“ Konfiguration. Diese Struktur wird durch die Bindung der phosphorylierten ITAMs und die dadurch veränderte Konformation der Interdomäne A aufgehoben, so dass Y319 in der Interdomäne B einer Phosphorylierung durch Lck zugänglich wird (Yan et al., 2013).

Meine Ergebnisse zeigten sowohl eine Hyperphosphorylierung der ITAMs und von Zap70 Y319 als auch eine (nicht signifikante) quantitative Steigerung der an ζ gebundenen Zap70-Moleküle in der Zelllinie, die Zap70 C564A exprimierte. Da die Struktur von Alanin der von Cystein stark ähnelt, gehe ich nicht davon aus, dass sich die Mutation als gravierender struktureller Eingriff in die Konformation von Zap70 erweist, sondern ich nehme eine regulatorische Funktion des Cysteins an, die die inhibierte Form von Zap70 betrifft. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass Zap70 C564A in weniger autoinhibiertem Zustand vorliegt als Zap70 WT, so dass der Zugang für Lck erleichtert wird, was zu einer verstärkten Rekrutierung und Hyperphosphorylierung an Zap70 Y319 führt. C564 nimmt also eventuell eine regulatorische Rolle in der Autoinhibition von Zap70 ein. Zukünftig ist es eventuell mittels Computersimulationen möglich durch Substitution der zu untersuchenden Position einen besseren Einblick in die veränderte Struktur des Proteins zu erlangen.

4.4 Experimenteller Ausblick

Dass das Cystein an Position 564 in Zap70 relevant für die Funktion von Zap70 ist, zeigt sich nicht nur im Krankheitsbild des kleinen Mädchens, welches Turul et al. vorstellten (Turul et al., 2008), sondern auch auf zellulärer Ebene. In den letzten Jahren zogen Cysteinreste als Regulationsstellen diverser Enzyme (z.B.: Deubiquitinasen, Proteasen, Phosphatasen) immer mehr die Aufmerksamkeit auf sich. Wegen ihrer Thiol-Reste sind Cysteine Teil diverser Redoxreaktionen, wie beispielsweise Sulfenylierungen, Nitrosylierungen und Glutathionylierungen. Einige Cysteine sind für die Regulation durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies von Protein-Tyrosinkinasen bekannt. Dies gilt beispielsweise für Zap70 C575, welches posttranslational sulfenyliert wird und im Zusammenhang mit Cdc37 die Stabilität von Zap70 reguliert (Thurm et al., 2017) (vgl. Abb. 1.3 A). Als weitere Beispiele sind hier die Src-Kinase zu nennen, bei der eine Oxidation der Cysteine 245 und 487 zu einer erhöhten Kinase-Aktivität führt (Giannoni et al., 2005), *c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1)*, bei der die Kinase-Aktivität durch S-Glutathionylierung von Cysteinen reguliert werden kann (Leonberg and Chai, 2007), oder das Proto-Onkogen *c-Ret (rearranged during transfection)*, bei dem Cystein 376 ein kritisches Regulationsziel sein könnte (Kato et al., 2000). Tewari et al. wiesen eine Palmitoylierung an Cystein 564 innerhalb von Zap70 nach, welche jedoch keine Rolle in der

Funktion zu spielen scheint. Ich stellte mir die Frage, ob es möglicherweise andere posttranslationale Modifikationen an dieser Position gibt, die Einfluss nehmen. In einem Pilotversuch verglich ich die Sulfonylierungsmuster in verschiedenen P116-T-Zellen (Zap70^{C564A}, Zap70^{WT}, Zap70^{Neg}) (Schultz et al., 2022). Hier zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den Zellreihen, weshalb diesbezüglich noch Forschungspotential besteht. Weiterhin stellt sich die Frage, weshalb die Signaltransduktion nur im proximalen Signalweg verstärkt ist. Möglicherweise gibt es Kompensationsmechanismen in P116-T-Zellen die sich *in vivo* abweichend verhalten. Um dies zu untersuchen, wären Experimente mit Zap70 C564A-Knock-in-Mäusen ein Modell, in welchem man die Entwicklung des Thymus sowie das Auftreten veränderter T-Zellen untersuchen könnte.

4.5 Zap70 als potentiell therapeutisches Ziel

Es stellt sich nun die Frage, ob Zap70 C564 potentiell als therapeutisches Ziel dienen kann. Einige Regulationsmöglichkeiten von Tyrosinkinasen werden inzwischen medikamentös genutzt. So werden bei bestimmten B-Zell-Erkrankungen, wie chronisch lymphatischer Leukämie, aber auch bei manchen Lymphomen Inhibitoren der Bruton-Tyrosinkinase (BTK) eingesetzt. Die BTK übernimmt in B-Zellen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zwischen BZR und nachfolgender Signalkaskade und wirkt sich auf Überleben, Proliferation und Differenzierung der B-Zelle aus. Mit Ibrutinib, Acalabrutinib, Spebrutinib und Tirabrutinib sind unterschiedliche BTK-Inhibitoren mit unterschiedlicher Selektivität auf dem Markt, die das Cystein 481 in der ATP-Bindungsdomäne von BTK kovalent binden (Burger, 2019). Die Hemmung führt zu einer Mobilisierung der Lymphomzellen aus Lymphknoten, Milz und Knochenmark in die Peripherie, wo sie absterben, was zu einer vorübergehenden Leuko- bzw. Lymphozytose führen kann (Ärzteblatt, 2015). Auch zur Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC (*non-small-cell lung cancer*)) ist im Mai 2021 mit Sotorasib ein KRAS-Inhibitor durch die *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassen worden. Etwa 13% der Patienten mit NSCLC, aber auch 1-3% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen und anderen Krebsformen weisen eine G12C (Glycin → Cystein) Mutation des „Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologe“ (KRAS) auf, welche zu einer aktiveren Form von KRAS führt und zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen. Sotorasib ist in der Lage, dieses mutierte Cystein kovalent und irreversibel zu binden und auf diese Weise zu inaktivieren (Hong et al., 2020).

Da einige Tumorformen eine negative Prognose bei Zap70 Expression aufweisen (z.B. CLL, B-ALL), ist es wichtig, mögliche inhibitorisch wirksame Positionen innerhalb des Proteins zu ergründen, um mögliche Angriffspunkte für neue Therapien zu entdecken. Bisher konnte festgestellt werden, dass die Argininmutation von C564 zu einem Abbruch der Signalkaskade führt. Die Bindung eines entsprechenden Moleküls, welches diese Mutation imitiert, könnte also ebenfalls zum Abbruch *in vivo* führen und hierdurch zur Hemmung der TZR-Aktivierung was sich immunsupprimierend auswirken dürfte.

Speziell im Falle von angeborener Zap70-Defizienz mit folgenden immunregulatorischen Störungen könnte es langfristig möglich sein, via Gentherapie das fehlende Zap70-Protein dauerhaft zu ersetzen, so wie es bereits durch das Gentherapeutikum Strimvelis zur Behandlung von ADA-SCID heute möglich ist. Hierbei werden CD34⁺-T-Zellen aus dem Knochenmark gewonnen und retroviral mit dem ADA-Gen versehen. Die Zellen werden dann intravenös infundiert und wandern zurück ins Knochenmark, in dem nun ADA-positive Lymphozyten produziert werden. Bis dieser therapeutische Zugang auch für andere SCID-Formen möglich ist, ist es jedoch unbedingt notwendig, die exakte Funktion von Zap70 und das Zusammenspiel mit anderen Zellbestandteilen so gut wie möglich zu verstehen, um mögliche Folgen einer solchen Substitution abschätzen zu können. Diese Arbeit liefert einen weiteren Baustein zum großen Puzzle rund um den Signalweg des T-Zell-Rezeptors.

5 Zusammenfassung

Die Tyrosinkinase Zap70 nimmt eine zentrale regulatorische Rolle innerhalb des TZR-Signalweges ein. Sie ist selbst zahlreichen Regulationsmechanismen, wie Phosphorylierungen, Sulfenylierungen und Acylierungen unterworfen und ist als Regulator durch Phosphorylierung ihrer Substrate essentiell innerhalb der Signaltransduktion. Einzelne Mutationen innerhalb der Zap70-Sequenz reichen aus, um komplexe Krankheitsbilder hervorzurufen. Dazu gehören sowohl Symptome von Immundefizienzen, wie auch Autoimmunität. Ein genaueres Verständnis einzelner Regulationsstellen ist daher unumgänglich, um diese Erkrankungen und die Regulationsmechanismen unseres Immunsystems und speziell der T-Zellen besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde das regulatorische Cystein 564 innerhalb der Kinase-Domäne von Zap70 auf seine Funktion hin untersucht. Hierfür wurden stabile Zelllinien aus P116-T-Zellen durch Transfektion mittels eines PiggyBac-Transposasesystems generiert, welche den Zap70 Wildtyp (Zap70^{WT}) oder eine Alaninmutante (Zap70^{C564A}) trugen. Als Kontrolle wurde aus der selben Zelllinie eine Zap70-defiziente Linie (Zap70^{Neg}) generiert, welche ein vergleichbares Plasmid trug. Mittels CD3-Stimulationen, Phosphorylierungsscreenings, Immunpräzipitationen der ζ -Ketten, Kinase-Assays, FACS-Messungen und dem Vergleich mit einem passenden HEK293T-TCR-Modell wurde die Mutation funktionell untersucht. Dabei zeigte sich, dass Zap70 C564 eine tragende Rolle in der Regulation der Aktivität von Lck und der proximalen TZR-Signaltransduktion spielt. Offen bleibt weiterhin der genaue Regulationsmechanismus den Zap70 C564 ausübt. Als mögliche weitere Untersuchungen - neben *in vivo* Nachweisen der *in vitro* generierten Daten und exakteren Untersuchungen möglicher Interaktionen von Lck und Zap70 - kommen Screenings auf Nitrosylierungen oder andere posttranslationale Modifikationen in Betracht.

6 Literaturverzeichnis

1. Arndt, B., Poltorak, M., Kowtharapu, B.S., Reichardt, P., Philipsen, L., Lindquist, J.A., Schraven, B., Simeoni, L., 2013. Analysis of TCR activation kinetics in primary human T cells upon focal or soluble stimulation. *J. Immunol. Methods* 387, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.006>
2. Ärzteblatt, D.Ä.G., Redaktion Deutsches, 2015. Ibrutinib: Innovation für Blutkrebs-Patienten [WWW Document]. *Dtsch. Ärztebl.* URL <https://www.aerzteblatt.de/archiv/168371/Ibrutinib-Innovation-fuer-Blutkrebs-Patienten> (accessed 9.29.21).
3. Atsaves, V., Leventaki, V., Rassidakis, G.Z., Claret, F.X., 2019. AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer. *Cancers* 11, 1037. <https://doi.org/10.3390/cancers11071037>
4. Au-Yeung, B.B., Shah, N.H., Shen, L., Weiss, A., 2018. ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 127–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053335>
5. Barrett, W.C., DeGnore, J.P., König, S., Fales, H.M., Keng, Y.-F., Zhang, Z.-Y., Yim, M.B., Chock, P.B., 1999. Regulation of PTP1B via Glutathionylation of the Active Site Cysteine 215. *Biochemistry* 38, 6699–6705. <https://doi.org/10.1021/bi990240v>
6. Beverley, P.C.L., Callard, R.E., 1981. Distinctive functional characteristics of human „T” lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur. J. Immunol.* 11, 329–334. <https://doi.org/10.1002/eji.1830110412>
7. Bogin, Y., Ainey, C., Beach, D., Yablonski, D., 2007. SLP-76 mediates and maintains activation of the Tec family kinase ITK via the T cell antigen receptor-induced association between SLP-76 and ITK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6638–6643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609771104>
8. Bozso, S.J., Kang, J.J.H., Nagendran, J., 2020. The role of competing mechanisms on Lck regulation. *Immunol. Res.* 68, 289–295. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09148-2>
9. Burger, J.A., 2019. BTK Inhibitors: present and future. *Cancer J. Sudbury Mass* 25, 386–393. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000412>
10. Carreras, J., Villamor, N., Colomo, L., Moreno, C., Ramón y Cajal, S., Crespo, M., Tort, F., Bosch, F., López-Guillermo, A., Colomer, D., Montserrat, E., Campo, E., 2005. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J. Pathol.* 205, 507–513. <https://doi.org/10.1002/path.1727>
11. Cary, L.C., Goebel, M., Corsaro, B.G., Wang, H.G., Rosen, E., Fraser, M.J., 1989. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156–169. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90117-7)
12. Chae, H.-D., Siefring, J.E., Hildeman, D.A., Gu, Y., Williams, D.A., 2010. RhoH Regulates Subcellular Localization of ZAP-70 and Lck in T Cell Receptor Signaling. *PLoS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013970>
13. Chan, A.C., Irving, B.A., Fraser, J.D., Weiss, A., 1991. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9166–9170.
14. Chan, A.Y., Punwani, D., Kadlecsek, T.A., Cowan, M.J., Olson, J.L., Mathes, E.F., Sunderam, U., Man Fu, S., Srinivasan, R., Kuriyan, J., Brenner, S.E., Weiss, A., Puck, J.M., 2016. A novel human autoimmune syndrome caused by combined hypomorphic and activating mutations in ZAP-70. *J. Exp. Med.* 213, 155–165. <https://doi.org/10.1084/jem.20150888>
15. Cibrián, D., Sánchez-Madrid, F., 2017. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 47, 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>

16. Claus, R., Lucas, D.M., Stilgenbauer, S., Ruppert, A.S., Yu, L., Zucknick, M., Mertens, D., Bühler, A., Oakes, C.C., Larson, R.A., Kay, N.E., Jelinek, D.F., Kipps, T.J., Rassenti, L.Z., Gribben, J.G., Döhner, H., Heerema, N.A., Marcucci, G., Plass, C., Byrd, J.C., 2012. Quantitative DNA Methylation Analysis Identifies a Single CpG Dinucleotide Important for ZAP-70 Expression and Predictive of Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 30, 2483–2491. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.3090>
17. Corcoran, A., Cotter, T.G., 2013. Redox regulation of protein kinases. *FEBS J.* 280, 1944–1965. <https://doi.org/10.1111/febs.12224>
18. Courtney, A.H., Amacher, J.F., Kadlecsek, T.A., Mollenauer, M.N., Au-Yeung, B.B., Kuriyan, J., Weiss, A., 2017. A PHOSPHOSITE WITHIN THE SH2 DOMAIN OF LCK REGULATES ITS ACTIVATION BY CD45. *Mol. Cell* 67, 498–511.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.024>
19. Courtney, A.H., Lo, W.-L., Weiss, A., 2018. TCR SIGNALING: MECHANISMS OF INITIATION AND PROPAGATION. *Trends Biochem. Sci.* 43, 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008>
20. Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Brdicka, T., Cao, X., Weiss, A., Kuriyan, J., 2007. Structural Basis for the Inhibition of Tyrosine Kinase Activity of ZAP-70. *Cell* 129, 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.039>
21. Devkota, S., Joseph, R.E., Min, L., Fulton, D.B., Andreotti, A., 2015. Scaffold protein SLP-76 primes PLC γ 1 for activation by ITK mediated phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 427, 2734–2747. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.012>
22. Dine, E., Reed, E.H., Toettcher, J.E., 2021. Positive feedback between the T cell kinase Zap70 and its substrate LAT acts as a clustering-dependent signaling switch. *Cell Rep.* 35, 109280. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109280>
23. DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., Calos, M.P., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7, 379–387.
24. Dutta, D., Barr, V.A., Akpan, I., Mittelstadt, P.R., Singha, L.I., Samelson, L.E., Ashwell, J.D., 2017. Recruitment of calcineurin to the TCR positively regulates T cell activation. *Nat. Immunol.* 18, 196–204. <https://doi.org/10.1038/ni.3640>
25. Eblen, S.T., 2018. Extracellular Regulated Kinases: Signaling from Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. *Adv. Cancer Res.* 138, 99–142. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.004>
26. Farmand, S., Baumann, U., Boztug, K., Förster-Waldl, E., Franke, K., Habermehl, P., Kapaun, P., Klock, G., Liese, J., Marks, R., Müller, R., Niehues, T., Sack, U., Schulze, I., Schuster, V., Schwarz, K., Warnatz, K., Welte, T., Witte, T., Ehl, S., n.d. Leitlinie „Diagnostik auf Vorliegen eines primären Immundefekts“ 52.
27. Gangopadhyay, K., Manna, B., Roy, S., Kumari, S., Debnath, O., Chowdhury, S., Ghosh, A., Das, R., 2020. An allosteric hot spot in the tandem-SH2 domain of ZAP-70 regulates T-cell signaling. *Biochem. J.* 477, 1287–1308. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190879>
28. Garcia-Cozar, F.J., Okamura, H., Aramburu, J.F., Shaw, K.T.Y., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., Rao, A., 1998. Two-site Interaction of Nuclear Factor of Activated T Cells with Activated Calcineurin *. *J. Biol. Chem.* 273, 23877–23883. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23877>
29. Gaud, G., Lesourne, R., Love, P.E., 2018. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 485–497. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>
30. Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P., 2005. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6391–6403. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6391-6403.2005>
31. Granum, S., Sundvold-Gjerstad, V., Gopalakrishnan, R.P., Berge, T., Koll, L., Abrahamsen, G., Sørli, M., Spurkland, A., 2014. The kinase Itk and the adaptor TSA1 change the specificity of the

kinase Lck in T cells by promoting the phosphorylation of Tyr192. *Sci. Signal.* 7, ra118.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2005384>

32. Guan, H., Ricciardi, R.P., 2012. Transformation by E1A Oncoprotein Involves Ubiquitin-Mediated Proteolysis of the Neuronal and Tumor Repressor REST in the Nucleus. *J. Virol.* 86, 5594–5602.
<https://doi.org/10.1128/JVI.06811-11>

33. Hartl, F.A., Beck-Garcia, E., Woessner, N.M., Flachsmann, L.J., Cárdenas, R.M.-H.V., Brandl, S.M., Taromi, S., Fiala, G.J., Morath, A., Mishra, P., Yousefi, O.S., Zimmermann, J., Hoefflin, N., Köhn, M., Wöhrl, B.M., Zeiser, R., Schweimer, K., Günther, S., Schamel, W.W., Minguet, S., 2020a. Noncanonical binding of Lck to CD3 ϵ promotes TCR signaling and CAR function. *Nat. Immunol.* 21, 902–913. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0732-3>

34. Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18, 2195–2224.
<https://doi.org/10.1101/gad.1228704>

35. Hong, D.S., Fakih, M.G., Strickler, J.H., Desai, J., Durm, G.A., Shapiro, G.I., Falchook, G.S., Price, T.J., Sacher, A., Denlinger, C.S., Bang, Y.-J., Dy, G.K., Krauss, J.C., Kuboki, Y., Kuo, J.C., Coveler, A.L., Park, K., Kim, T.W., Barlesi, F., Munster, P.N., Ramalingam, S.S., Burns, T.F., Meric-Bernstam, F., Henary, H., Ngang, J., Ngarmchamnanrith, G., Kim, J., Houk, B.E., Canon, J., Lipford, J.R., Friberg, G., Lito, P., Govindan, R., Li, B.T., 2020. KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917239>

36. Houtman, J.C.D., Yamaguchi, H., Barda-Saad, M., Braiman, A., Bowden, B., Appella, E., Schuck, P., Samelson, L.E., 2006. Oligomerization of signaling complexes by the multipoint binding of GRB2 to both LAT and SOS1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 798–805. <https://doi.org/10.1038/nsmb1133>

37. Ivanova, E., Carpino, N., 2016. Negative regulation of TCR signaling by ubiquitination of Zap-70 Lys-217. *Mol. Immunol.* 73, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.03.006>

38. James, J.R., Vale, R.D., 2012. Biophysical Mechanism of T Cell Receptor Triggering in a Reconstituted System. *Nature* 487, 64–69. <https://doi.org/10.1038/nature11220>

39. Jenner, E., 1802. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox - Digital Collections - National Library of Medicine [WWW Document]. URL <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-2559001R-bk> (accessed 9.25.21).

40. Kästle, M., Merten, C., Hartig, R., Kaehne, T., Liaunardy-Jopeace, A., Woessner, N.M., Schamel, W.W., James, J., Minguet, S., Simeoni, L., Schraven, B., 2020. Tyrosine 192 within the SH2 domain of the Src-protein tyrosine kinase p56Lck regulates T-cell activation independently of Lck/CD45 interactions. *Cell Commun. Signal.* 18, 183. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00673-z>

41. Kästle, M., Merten, C., Hartig, R., Plaza-Sirvent, C., Schmitz, I., Bommhardt, U., Schraven, B., Simeoni, L., 2022. Type of PaperY192 within the SH2 Domain of Lck Regulates TCR Signaling Downstream of PLC- γ 1 and Thymic Selection. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 7271. <https://doi.org/10.3390/ijms23137271>

42. Katamura, Tai, Tachibana, Yamabe, Ohmori, Mayumi, Matsuda, Koyasu, Furusho, 1999. Existence of activated and memory CD4⁺ T cells in peripheral blood and their skin infiltration in CD8 deficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 124–130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00759.x>

43. Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M., Nakashima, I., 2000. Ultraviolet Light Induces Redox Reaction-mediated Dimerization and Superactivation of Oncogenic Ret Tyrosine Kinases. *Mol. Biol. Cell* 11, 93–101.

44. Katz, Z.B., Novotná, L., Blount, A., Lillemeier, B.F., 2017. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat. Immunol.* 18, 86–95. <https://doi.org/10.1038/ni.3631>

45. Kong, G.-H., Bu, J.-Y., Kurosaki, T., Shaw, A.S., Chant, A.C., 1995. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 2, 485–492. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90029-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90029-2)

46. Leonberg, A.K., Chai, Y.-C., 2007 The functional role of cysteine residues for c-Abl kinase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 304, 207–212. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9501-y>
47. Liaunardy-Jopeace, A., Murton, B.L., Mahesh, M., Chin, J.W., James, J.R., 2017. Encoding optical control in LCK kinase to quantitatively investigate its activity in live cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 1155–1163. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3492>
48. Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J., Callewaert, N., 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun.* 5, 4767. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
49. Lo, W.-L., Shah, N.H., Ahsan, N., Horkova, V., Stepanek, O., Salomon, A.R., Kuriyan, J., Weiss, A., 2018. Lck promotes Zap70-dependent LAT phosphorylation by bridging Zap70 to LAT. *Nat. Immunol.* 19, 733–741. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0131-1>
50. Love, P.E., Hayes, S.M., 2010. ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002485. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002485>
51. McClintock, B., 1950. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 36, 344–355.
52. Minami, T., 2014. Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated? *J. Biochem. (Tokyo)* 155, 217–226. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu006>
53. Mizushima, S., Nagata, S., 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18, 5322–5322. <https://doi.org/10.1093/nar/18.17.5322>
54. Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
55. Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Höfer, T., Viola, A., Acuto, O., 2010. Constitutively Active Lck Kinase in T Cells Drives Antigen Receptor Signal Transduction. *Immunity* 32, 766–777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>
56. Oo, M.L., Senga, T., Thant, A.A., Amin, A.R., Huang, P., Mon, N.N., Hamaguchi, M., 2003. Cysteine residues in the C-terminal lobe of Src: their role in the suppression of the Src kinase. *Oncogene* 22, 1411–1417. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206286>
57. Parekh, A.B., Putney, J.W., 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
58. Parry, D., Blumenthal, J., Tomar, R., Horowitz, S., Elder, M., Gern, J., 1996. 830 A 3-year-old boy with ZAP-70 deficiency, thrombocytopenia and ulcerative colitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 390–390. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)81048-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)81048-7)
59. Paulsen, C.E., Truong, T.H., Garcia, F.J., Homann, A., Gupta, V., Leonard, S.E., Carroll, K.S., 2011. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat. Chem. Biol.* 8, 57–64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.736>
60. Paz, P.E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., Abo, A., 2001. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem. J.* 356, 461–471. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560461>
61. Pelosi, M., Di Bartolo, V., Mounier, V., Mège, D., Pascucci, J.M., Dufour, E., Blondel, A., Acuto, O., 1999. Tyrosine 319 in the interdomain B of ZAP-70 is a binding site for the Src homology 2 domain of Lck. *J. Biol. Chem.* 274, 14229–14237. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14229>
62. Philipsen, L., Reddycherla, A.V., Hartig, R., Gumz, J., Kästle, M., Kritikos, A., Poltorak, M.P., Prokakov, Y., Turbin, E., Weber, A., Zuschratter, W., Schraven, B., Simeoni, L., Müller, A.J., 2017. De

novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Sci. Signal.* 10, eaaf4736. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf4736>

63. Plotkin, S.L., Plotkin, S.A., n.d. 1 A Short History of Vaccination 1.

64. Poliani, P.L., Fontana, E., Roifman, C.M., Notarangelo, L.D., 2013. ζ Chain-associated protein of 70 kDa (ZAP70) deficiency in human subjects is associated with abnormalities of thymic stromal cells: Implications for T-cell tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 597-600.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.002>

65. Poltorak, M., Arndt, B., Kowtharapu, B.S., Reddycherla, A.V., Witte, V., Lindquist, J.A., Schraven, B., Simeoni, L., 2013. TCR activation kinetics and feedback regulation in primary human T cells. *Cell Commun. Signal. CCS* 11, 4. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-4>

66. Poltorak, M., Meinert, I., Stone, J.C., Schraven, B., Simeoni, L., 2014. Sos1 regulates sustained TCR-mediated Erk activation. *Eur. J. Immunol.* 44, 1535–1540. <https://doi.org/10.1002/eji.201344046>

67. Poole, L.B., Nelson, K.J., 2008. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.021>

68. Qu, X., Lan, X., Deng, C., Zhou, J., Du, J., Huang, S., Li, Y., 2017. Molecular mechanisms underlying the evolution of the slp76 signalosome. *Sci. Rep.* 7, 1509. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01660-0>

69. Rahman, M.A., Senga, T., Ito, S., Hyodo, T., Hasegawa, H., Hamaguchi, M., 2010. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *J. Biol. Chem.* 285, 3806–3814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.059782>

70. Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>

71. Russell, W.C., Graham, F.L., Smiley, J., Nairn, R., 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

72. Schamel, W.W., Alarcon, B., Minguet, S., 2019. The TCR is an allosterically regulated macromolecular machinery changing its conformation while working. *Immunol. Rev.* 291, 8–25. <https://doi.org/10.1111/imr.12788>

73. Schamel, W.W.A., Alarcon, B., Höfer, T., Minguet, S., 2017. The Allostery Model of TCR Regulation. *J. Immunol.* 198, 47–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601661>

74. Schmeitz, C., Hernandez-Vargas, E.A., Fliegert, R., Guse, A.H., Meyer-Hermann, M., 2013. A Mathematical Model of T Lymphocyte Calcium Dynamics Derived from Single Transmembrane Protein Properties. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00277>

75. Schmitz, M.L., Bacher, S., Dienz, O., 2003. NF- κ B activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB J.* 17, 2187–2193. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1100rev>

76. Schneider, U., Schwenk, H.-U., Bornkamm, G., 1977. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621–626. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>

77. Schultz, A., Schnurra, M., El-Bizri, A., Woessner, N.M., Hartmann, S., Hartig, R., Minguet, S., Schraven, B., Simeoni, L., 2022. A Cysteine Residue within the Kinase Domain of Zap70 Regulates Lck Activity and Proximal TCR Signaling. *Cells* 11, 2723. <https://doi.org/10.3390/cells11172723>

78. Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S.K., Koča, J., Rose, A.S., 2021. Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res.* 49, W431–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>

79. Sharifinejad, N., Jamee, M., Zaki-Dizaji, M., Lo, B., Shaghaghi, M., Mohammadi, H., Jadidi-Niaragh, F., Shaghaghi, S., Yazdani, R., Abolhassani, H., Aghamohammadi, A., Azizi, G., 2020. Clinical, Immunological, and Genetic Features in 49 Patients With ZAP-70 Deficiency: A Systematic Review. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00831>
80. Shaulian, E., Karin, M., 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
81. Sjölin-Goodfellow, H., Frushicheva, M.P., Ji, Q., Cheng, D.A., Kadlecsek, T.A., Cantor, A.J., Kuriyan, J., Chakraborty, A.K., Salomon, A.R., Weiss, A., 2015. The catalytic activity of the kinase ZAP-70 mediates basal signaling and negative feedback of the T cell receptor pathway. *Sci. Signal.* 8, ra49–ra49. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005596>
82. Steinberg, M., Adjali, O., Swainson, L., Merida, P., Di Bartolo, V., Pelletier, L., Taylor, N., Noraz, N., 2004. T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. *Blood* 104, 760–767. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4314>
83. Stirnweiss, A., Hartig, R., Gieseler, S., Lindquist, J.A., Reichardt, P., Philipsen, L., Simeoni, L., Poltorak, M., Merten, C., Zuschratter, W., Prokazov, Y., Paster, W., Stockinger, H., Harder, T., Gunzer, M., Schraven, B., 2013. T Cell Activation Results in Conformational Changes in the Src Family Kinase Lck to Induce Its Activation. *Sci. Signal.* 6, ra13–ra13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003607>
84. Stone, J.C., 2011. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* 2, 320–334. <https://doi.org/10.1177/1947601911408082>
85. Szabo, M., Czompoly, T., Kvell, K., Talaber, G., Bartis, D., Nemeth, P., Berki, T., Boldizsar, F., 2012. Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells. *Int. Immunol.* 24, 79–87. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr105>
86. Tewari, R., Shayahati, B., Fan, Y., Akimzhanov, A.M., 2021. T cell receptor–dependent S-acylation of ZAP-70 controls activation of T cells. *J. Biol. Chem.* 296, 100311. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100311>
87. Thome, M., Charton, J.E., Pelzer, C., Hailfinger, S., 2010. Antigen Receptor Signaling to NF- κ B via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003004. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003004>
88. Thurm, C., Poltorak, M.P., Reimer, E., Brinkmann, M.M., Leichert, L., Schraven, B., Simeoni, L., 2017. A highly conserved redox-active Mx(2)CWx(6)R motif regulates Zap70 stability and activity. *Oncotarget* 8, 30805–30816. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16486>
89. Topham, M.K., Prescott, S.M., 2001. Diacylglycerol Kinase ζ Regulates Ras Activation by a Novel Mechanism. *J. Cell Biol.* 152, 1135–1144.
90. Turul, T., Tezcan, I., Artac, H., de Bruin-Versteeg, S., Barendregt, B.H., Reisli, I., Sanal, O., van Dongen, J.J.M., van der Burg, M., 2008. Clinical heterogeneity can hamper the diagnosis of patients with ZAP70 deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 168, 87. <https://doi.org/10.1007/s00431-008-0718-x>
91. Veillette, A., Dumont, S., Fournel, M., 1993. Conserved cysteine residues are critical for the enzymatic function of the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *J. Biol. Chem.* 268, 17547–17553. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85367-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85367-X)
92. VORBEHALTEN, I.U.-A.R., n.d. Orphanet: Immundefekt, kombinierter schwerer (URL:https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=183660 abgerufen 02.10.2023)
93. Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E.S., Hsu, L.-Y., Freedman, T.S., Weiss, A., 2010. ZAP-70: An Essential Kinase in T-cell Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002279>
94. Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J., Flotow, H., Wilkinson, S., Williams, D., Johnson, R., Kong, G., Chan, A., Findell, P., 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-tyrosine Kinase Is

Required for T-cell Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 271, 19641–4.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.19641>

95. Warnecke, N., Poltorak, M., Kowtharapu, B.S., Arndt, B., Stone, J.C., Schraven, B., Simeoni, L., 2012. TCR-mediated Erk activation does not depend on Sos and Grb2 in peripheral human T cells. *EMBO Rep.* 13, 386–391. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.17>

96. Watts, J.D., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Aebersold, R., 1993. Phosphorylation of serine 59 of p56lck in activated T cells. *J. Biol. Chem.* 268, 23275–23282.

97. Weiss, A., Stobo, J.D., 1984. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J. Exp. Med.* 160, 1284–1299.
<https://doi.org/10.1084/jem.160.5.1284>

98. Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74, 589–607.
<https://doi.org/10.1007/s001090050063>

99. Williams, B.L., Irvin, B.J., Sutor, S.L., Chini, C.C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A.C., Abraham, R.T., 1999. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C- γ 1 and Ras activation. *EMBO J.* 18, 1832–1844.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1832>

100. Williams, B.L., Schreiber, K.L., Zhang, W., Wange, R.L., Samelson, L.E., Leibson, P.J., Abraham, R.T., 1998. Genetic Evidence for Differential Coupling of Syk Family Kinases to the T-Cell Receptor: Reconstitution Studies in a ZAP-70-Deficient Jurkat T-Cell Line. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1388–1399.

101. Woodard, L.E., Wilson, M.H., 2015. piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol.* 33, 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.009>

102. Xie, J.-J., Liang, J.-Q., Diao, L.-H., Altman, A., Li, Y., 2013. TRAF6 regulates TCR signaling via interaction with and modification of LAT adapter. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 4027–4036.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202742>

103. Yablonski, D., 2019. Bridging the Gap: Modulatory Roles of the Grb2-Family Adaptor, Gads, in Cellular and Allergic Immune Responses. *Front. Immunol.* 10, 1704.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01704>

104. Yan, Q., Barros, T., Visperas, P.R., Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Weiss, A., Kuriyan, J., 2013. Structural Basis for Activation of ZAP-70 by Phosphorylation of the SH2-Kinase Linker. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2188–2201. <https://doi.org/10.1128/MCB.01637-12>

105. Yang, M., Chen, T., Li, X., Yu, Z., Tang, S., Wang, C., Gu, Y., Liu, Y., Xu, S., Li, W., Zhang, X., Wang, J., Cao, X., 2015. K33-linked polyubiquitination of Zap70 by Nrdp1 controls CD8⁺ T cell activation. *Nat. Immunol.* 16, 1253–1262. <https://doi.org/10.1038/ni.3258>

106. Yoo, S.K., Starnes, T.W., Deng, Q., Huttenlocher, A., 2011. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* 480, 109–112. <https://doi.org/10.1038/nature10632>

7 Danksagungen

Eine Promotion wäre deutlich amüsanter zu lesen, wenn man den gesamten Entstehungsprozess schriftlich dokumentieren würde. Die anfängliche Frustration, die man als Medizinstudentin empfindet, wenn die eigenen Experimente leider nicht so funktionieren, wie man es sich erhofft hat und den Dopaminrausch, wenn ein kompliziertes Experiment unerwartet sofort gelingt. Aber dann würden medizinische Dissertationsschriften vermutlich etliche Seiten voll Enttäuschung geprägter Tagebucheinträge enthalten, was das Forschungsziel wissenschaftlicher Arbeit nicht fördern würde.

Dafür, dass mein lieber Doktorvater, Prof. Dr. Luca Simeoni alle diese ungeschriebenen Lautäußerungen, Verzweiflungsausbrüche und Abbruchpläne aushalten und kompensieren musste, mich stets beruhigte, meine Daten einordnete und mir half, diese Arbeit und das zugehörige Paper zu veröffentlichen, gebührt ihm mein tief empfundener Dank.

Weiterhin geht mein Dank an Prof. Dr. Burkhard Schraven der mir ermöglichte, ein Jahr der reinen Laborarbeit zu widmen und auf diese Weise einen Einblick in die wissenschaftliche und technische Arbeit in der Immunologie zu erlangen.

Vielen Dank auch an die Geduld und Expertise, die alle Mitglieder der AG Simeoni aufbrachten, um mich in der praktischen Umsetzung zu unterstützen. Besonders Camilla, Ines und Sophie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Matthias hat besonders den Start erleichtert und mir immer wieder tolle Anstöße in Bezug auf Lck geliefert. And thank you, Tatjana, for enduring my awful English questioning.

Innigster Dank geht an meinen Verlobten Michael, der stets wusste, wie er mich aufmuntern kann und mir ein ständiger Diskussionspartner und liebevoller Kritiker war. Ich bin dankbar dich an meiner Seite zu haben und freue mich auf die gemeinsame Zukunft.

Besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Familie. Ihr habt stets nachgefragt, mitgelitten und mitgefeiert, mich unterstützt und mir geholfen, nicht nur mein Berufsziel als Ärztin zu erreichen, sondern auch zum wissenschaftlichen Fortschritt beizutragen.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden dafür, dass sie so entspannt blieben, während sie sich ständig unverständliche Begriffe und Erklärungen, gepaart mit dilettantischen Zeichnungen von mir anhören und ansehen mussten.

Schlussendlich möchte ich meiner Oma danken, die das Erscheinen dieser Arbeit nicht mehr erlebt, aber immer interessiert gelauscht hat, wenn ich ihr davon erzählte. Du fehlst mir.

8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung eines Cysteinrestes in der Regulation der Zap-70 Aktivität“ im Institut für molekulare und klinische Immunologie mit Unterstützung durch Prof. Dr. Luca Simeoni, Dr. Matthias Kästle, Dr. Christoph Thurm, Sophie Böttcher, Ines Meinert, Camilla Merten und Aqif Siddique ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 30.10.2023



Annika Schultz

9 Bildungsweg

Studium/Beruf

ab 01/2023	ÄiW Innere Medizin an der Helios Klinik Jerichower Land
23./24.11.2022	3. Staatsexamen
10/2021-10/22	PJ mit Abschnitten in der Allgemein-/Viszeral- und Unfallchirurgie, der Gastroenterologie, der Intensivmedizin und der Allgemeinmedizin
10/2020-10/2021	Promotion am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der OVGU
10/2015-10/2020	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Medizinstudium, währenddessen Nebentätigkeit als Tutorin im Fach „Einführung in die klinische Medizin“
03-04/2020	Nebentätigkeit beim Gesundheitsamt Magdeburg im Rahmen der Bevölkerungsinformation über SARS-CoV2
10/2011- 9/2015	DRK KV Hofgeismar Tätigkeit als Rettungsassistentin

Ausbildung

01.10.2010-31.09.2011	Deutsches Rotes Kreuz KV Hofgeismar Anerkennungsjahr
01.10.2009-31.09.2010	Johanniter-Akademie Berlin Ausbildung zur Rettungsassistentin

Praktika/Famulaturen

2017-2021	Famulaturen: <ul style="list-style-type: none">- MVZ Zeltinger Platz (Allgemeinmedizin), Berlin- Dermatologie, UMMD- Stroke Unit (Neurologie), UMMD- Unfallchirurgie, UMMD- Anästhesie, Harzkrankenhaus Quedlinburg- Innere Medizin, Klinikum Landsberg am Lech- Neuropädiatrie und Kinderheilkunde, Praxis Fruchtenicht, Berlin
09/2008 -08/2009	Schlosspark-Klinik Berlin Freiwilliges Soziales Jahr auf der Allgemeinchirurgischen Station
Januar 2006	Deutsches Herzzentrum Berlin Schülerpraktikum

Schulbildung

08/2001 –07/2008	Georg-Herwegh-Oberschule (Gymnasium), Berlin Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1995 – 07/2001	Victor-Gollancz-Grundschule, Berlin

A. Schullk