

**Justus-Liebig-Universität Giessen
Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften –
Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Prof. Dr. T. Trenczek**

und

**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg – Universitätsklinikum
Institut für Immunologie – Molekulare Immunologie
PD Dr. Y. Samstag**

**L-Plastin in humanen T-Lymphozyten:
Kostimulations-abhängige Phosphorylierung
an Ser-5 und Verlagerung in die
Immunologische Synapse**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie
der Universität Giessen
vorgelegt von

Guido H. Wabnitz

aus Bonn

Giessen 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Geschäftsführender Direktor Herr Prof. Dr. S. Meuer) in der Arbeitsgruppe „Molekulare Immunologie“ unter der Leitung von Frau PD Dr. Y. Samstag durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachterin Prof. Dr. T. Trenczek
Zweitgutachterin PD Dr. Y. Samstag

Tag der mündlichen Prüfung am _____

Während dieser Arbeit wurden folgende Publikationen und Kongressbeiträge erstellt:

Veröffentlichungen

Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., und **Wabnitz, G.H. (2003)**. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration, *J. Leukoc. Biol.* **73**:30-48

Eibert, S.M., Lee, K.H., Pipkorn, R., Sester, U., **Wabnitz, G.H.**, Giese, T., Meuer, S.C., und Samstag, Y. Cofilin peptide homologues interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *PNAS.* **101**(7):1957-1962

Wabnitz G.H., Stober, C., Klemke, M., Funk, B., Köcher, T., Konstandin, M., Kirstein, F., Sester, U., and Samstag Y. Inhibition of costimulation induced L-plastin phosphorylation may contribute to the immunosuppressive effect of dexamethasone. *zur Publikation eingereicht.*

Kongresse

Wabnitz, G.H., Klemke, M., Eibert, S.M., and Samstag, Y. (2003). Redistribution of the actin-bundling protein L-plastin to cell contact interfaces is independent of phosphorylation. *Immunobiology* **208** (72), 34. Annual Meeting of the German Society of Immunology.

Sester, U., **Wabnitz, G.H.**, Konstandin, M., and Samstag, Y. (2003). Differential activation of actin binding proteins in naive versus memory T cells. *Immunobiology* **208** (70), 34. Annual Meeting of the German Society of Immunology.

Wabnitz, G.H. and Samstag, Y. (2002). The actin bundling protein L-plastin associates with CD2 in human T cells. *Immunobiology* **206** (89), 33. Annual Meeting of the German Society of Immunology.

Wabnitz, G.H., Stober C., Klemke M. and Samstag Y. (2001). Costimulation of human T-lymphocytes through CD28 or CD2 induces phosphorylation of the actin bundling protein L-plastin. *Immunobiology* **205** (72), 32. Annual Meeting of the German Society of Immunology.

Für meine Eltern

et semel emissum volat
irrevocabile verbum
(Horaz Epist. 1, 18, 71)

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 ÜBERBLICK ÜBER DAS HUMANE IMMUNSYSTEM.....	3
2.1.1 <i>Von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort</i>	4
2.1.2 <i>Das adaptive Immunsystem</i>	5
2.1.3 <i>Das immunologische Gedächtnis</i>	7
2.2 T-ZELL VERMITTELTE IMMUNANTWORT	8
2.2.1 <i>Die Immunologische Synapse</i>	11
2.2.2 <i>Signalübertragung während der T-Zell Aktivierung</i>	14
2.2.2.1 <i>Das T-Zell-Rezeptor-vermittelte Erstsinal</i>	14
2.2.2.2 <i>Kostimulation</i>	15
2.3 DAS AKTIN-ZYTOSKELETT ALS GRUNDGERÜST DER IMMUNANTWORT.....	18
2.3.1 <i>Der dynamische Aktin-Kreislauf</i>	18
2.3.2 <i>Mehrdimensionale F-Aktin Netzwerke</i>	20
2.3.2.1 <i>L-Plastin</i>	21
2.4 T-ZELL-AKTIVIERUNG UND DAS AKTIN-ZYTOSKELETT	23
2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.1.1 <i>Zellen</i>	26
3.1.2 <i>Antikörper</i>	26
3.1.2.1 <i>Primäre Antikörper</i>	26
3.1.2.1 <i>Sekundäre Antikörper</i>	27
3.1.3 <i>Plasmide und Vektoren</i>	28
3.1.3 <i>Oligonukleotide</i>	28
3.1.4 <i>Medien</i>	29
3.1.5 <i>Puffer und Reagenzien</i>	30
3.1.6 <i>Chemikalien und Materialien</i>	31
3.1.7 <i>Geräte und Laborausstattung</i>	32
3.1.8 <i>Zellkulturmaterial</i>	33
3.1.9 <i>Software und Datenbanken</i>	34
3.2 METHODEN	35
3.2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	35
3.2.1.1 <i>Isolierung von Plasmid DNA</i>	35
3.2.1.2 <i>Sequenzierung von DNA</i>	35
3.2.2 <i>Zellbiologische Methoden</i>	36
3.2.2.1 <i>Zellkultur</i>	36
3.2.2.2 <i>Zellstimulation</i>	39
3.2.2.3 <i>Lysatpräparation (postnukleäre Lysate)</i>	40
3.2.2.4 <i>Nukleofektion primärer T-Zellen</i>	41
3.2.2.5 <i>Induktion von Rezeptor Klustern</i>	42

3.2.2.6 Zell-Zell-Konjugate	43
3.2.2.7 Konfokale Laserscannmikroskopie	45
3.2.2.8 Durchflußzytometrie	45
3.2.2.9 Proliferationstest	48
3.2.2.10 <i>In vivo</i> Markierung von PBT durch ³² P-Phosphat	49
3.2.3 <i>Biochemische Methoden</i>	49
3.2.3.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	49
3.2.3.3 Färben und Trocknen von Gelen	50
3.2.3.4 Western Blotting	51
3.2.3.5 Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie	52
4. ERGEBNISSE	54
4.1 EXPRESSION VON L-PLASTIN IN HUMANEN PERIPHEREN LEUKOZYTEN	54
4.1.1 <i>L-Plastin Expression in humanen Leukozyten</i>	54
4.1.2 <i>L-Plastin ist vorwiegend in der Triton X-100 löslichen Fraktion und zu geringen Teilen im Zytoskelett lokalisiert</i>	56
4.2 L-PLASTIN WIRD NACH KOSTIMULATION VON PBT AN SER-5 PHOSPHORYLIERT	58
4.2.1 <i>L-Plastin wird nach Kostimulation von PBT phosphoryliert</i>	59
4.2.3 <i>Kinetik der L-Plastin Phosphorylierung nach T-Zell-Kostimulation</i>	65
4.2.4 <i>Genetischer L-Plastin Polymorphismus in primären T-Zellen</i>	65
4.2.5 <i>L-Plastin wird in PBT an Ser-5 phosphoryliert</i>	67
4.2.5.1 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle von endogenem L-Plastin in untransformierten T-Zellen	67
4.2.5.2 Ser-5 zu Ala-5 L-Plastin Mutanten werden in PBT nicht phosphoryliert	70
4.2.6 <i>Nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutanten haben einen dominant-negativen Effekt auf die T- Zellaktivierung</i>	73
4.3 L-PLASTIN IST AN DER KLUSTERBILDUNG VON REZEPTOREN AUF PBT BETEILIGT	77
4.3.1 <i>L-Plastin reichert sich in Rezeptor-Caps an</i>	79
4.3.1.1 L-Plastin reichert sich in xCD3-Rezeptor-Caps von CD45RO-positiven T-Zellen, nicht jedoch von CD45RA-positiven T-Zellen an	82
4.3.2 <i>Rezeptor-Caps können durch cDNA exprimierte L-Plastin Mutanten nicht inhibiert werden</i>	84
4.3.3 <i>Defekte Ausbildung von Rezeptor-Caps durch BPB-induzierte L-Plastin Inhibierung</i>	87
4.3.3.1 Die Phosphorylierung von L-Plastin wird durch BPB nur schwach inhibiert	92
4.3.4 <i>Umgehung der BPB-induzierten Cap-Inhibierung durch cDNA exprimiertes L-Plastin</i>	94
4.4 <i>L-Plastin ist in der reifen IS und der frühen T/B-Zell Kontaktzone lokalisiert</i>	98
4.4.1 <i>PBT werden durch Superantigen-beladene Raji B-Zellen vollständig aktiviert</i>	99
4.4.2 <i>L-Plastin Phosphorylierung in PBT durch APZ Stimulation</i>	101
4.4.3 <i>BPB inhibiert die Superantigen-abhängige Aktivierung von PBT</i>	102
4.4.4 <i>L-Plastin ist in der T-Zell-APZ-Kontaktzone lokalisiert</i>	104
4.4.5 <i>L-Plastin Phosphorylierung an Ser-5 beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin nicht</i>	107
4.4.6.1 <i>Polarisierung von L-Plastin bei der Ausbildung von T-Zell/APZ-Konjugaten</i>	111
4.4.6.2 <i>Polarisierung von L-Plastin in migrierenden T-Zellen</i>	115

5. DISKUSSION	117
5.1 L-PLASTIN EXPRESSION IN LEUKOZYTEN UND NICHT-HÄMATOPO-ETISCHEN TUMORZELLEN.....	118
5.2. PHOSPHORYLIERUNG VON L-PLASTIN NACH T-ZELL-KOSTIMULATION.....	118
5.3 L-PLASTIN PHOSPHORYLIERUNG AN SER-5.....	121
5.4 L-PLASTIN STABILISIERT REZEPTOR KLUSTER.....	123
5.5 L-PLASTIN UND DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE.....	125
5.6 AMÖBOIDE MIGRATION VON T-LYMPHOZYTEN.....	128
5.6 SCHLUSSFOLGERUNG: MODELL DER L-PLASTIN REGULIERUNG IN HUMANEN T ZELLEN.....	129
6. ANHANG	131
6.1 ABKÜRZUNGEN	131
7. LITERATURVERZEICHNIS	133

Abb.2.2.1 Zellinteraktionen von T-Zellen	6
Abb.2.2.2 Dynamische T-Zell Polarisierung	10
Abb. 2.2.3 Die Immunologische Synapse (IS)	12
Abb. 2.2.4 T-Zell-Kostimulation	16
Abb. 2.2.5: Der dynamische Aktin Kreislauf	19
Abb. 2.2.6: Aktin Netzwerke	20
Abb. 2.2.7 L-Plastin	22
Abb. 2.2.8 Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett	24
Abb. 3.2.1 Nukleofektion von PBT	42
Abb. 4.1.1 L-Plastin Expression in peripheren Leukozyten	55
Abb. 4.2.1 Phosphorylierung von L-Plastin nach Kostimulation	60
Abb. 4.2.2 Kinetik der L-Plastin Phosphorylierung nach CD3xCD28-Stimulation	64
Abb. 4.2.3 Phosphorylierung der allelischen L-Plastin Varianten	66
Abb. 4.2.4. Massenspektrometrische Analyse der L-Plastin Phosphorylierung	68
Abb. 4.2.5 Phosphorylierung von cDNA exprimiertem L-Plastin	71
Abb. 4.2.6 Expression von CD69 nach Stimulation untransfizierter bzw. L-Plastin transfizierter PBT ...	75
Abb. 4.3.1 Rezeptor-Caps	78
Abb. 4.3.2 L-Plastin in Rezeptor-Caps	80
Abb. 4.3.3 Differentielle Ko-Caps in CD45RA- und CD45RO-positiven T-Zellen	83
Abb. 4.3.4 CDNA exprimiertes L-Plastin in Rezeptor-Caps	85
Abb. 4.3.5 Inhibierung von Rezeptor-Caps durch BPB	88
Abb. 4.3.6 Die BPB-induzierte Cap-Inhibierung wird nicht durch Arachidonsäure gerettet	90
Abb. 4.3.7 BPB inhibiert die Proliferation von PBT	91
Abb. 4.3.8 BPB inhibiert die L-Plastin Phosphorylierung	93
Abb. 4.3.9 Transiente Inhibierung der Cap-Bildung durch BPB	95
Abb. 4.3.10 Experimentelles Zeitfenster zur Rettung der BPB-vermittelten Cap-Inhibierung	95
Abb. 4.3.11 Umgehung der BPB-induzierten Cap-Inhibierung durch cDNA exprimiertes L-Plastin	97
Abb. 4.4.1 Superantigen-induzierte Adhärenz von PBT an Raji B-Zellen	100
Abb. 4.4.2 L-Plastin Phosphorylierung nach Stimulation durch Raji B-Zellen	102
4.4.3 Effekte von BPB auf Zell-Konjugate	103
Abb. 4.4.4 Subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin in PBT in Abwesenheit von Superantigenen	106
Abb. 4.4.5 In Anwesenheit von Superantigenen lokalisiert L-Plastin im oder um den pSMAC der Immunologischen Synapse	108
Abb. 4.4.6 Subzelluläre Lokalisierung von cDNA kodiertem L-Plastin in Zell-Kontakten	110
4.4.7 L-Plastin Dynamik in Zell-Kontakten zwischen PBTs und Raji B-Zellen	112
4.4.8 Migrierende T-Zelle	116
Abb. 5.1 Modell der Immunologischen Synapse	126
Abb. 5.2 Modell: L-Plastin während der T-Zell Aktivierung	130

1. Zusammenfassung

T-Zellen zirkulieren unaufhörlich durch Blutgefäße und lymphatische Systeme, um die Umgebung nach passenden Antigenen abzusuchen. Bei der Erkennung eines Antigens auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) werden an der Kontaktzone zwischen APZ und T-Zelle hoch-organisierte Proteinkluster geformt, die sich in einem äußeren Adhäsionsring und einer zentralen Aktivierungs- bzw. Effektorzone anordnen. Diese so genannte Immunologische Synapse (IS) ist maßgeblich an der Aktivierung und Funktion der T-Zellen beteiligt. Für die Reifung der IS ist Kostimulation essentiell, d.h. neben Signal 1 über den T-Zell Rezeptor (TZR) benötigt die Zelle ein zweites Signal, das über akzessorische Rezeptoren wie CD28 oder CD2 vermittelt wird. Es gibt Hinweise darauf, dass über diese Kostimulation eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verursacht wird, die letztlich für die Ausbildung von Rezeptor-Klustern in der IS unabdingbar ist. Es ist bislang nur ein Aktin-bindendes Protein beschrieben worden, das speziell nach Kostimulation modifiziert wird und die Brücke zwischen der dynamischen Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Kostimulation schlagen könnte, nämlich Cofilin. Ein weiteres Aktin-bindendes Protein, L-Plastin, wird nach mitogener CD2-Aktivierung an Serinresten phosphoryliert, nicht aber nach alleiniger TZR/CD3 Stimulation. Über die Funktion von L-Plastin bei der T-Zell-Kostimulation war bisher nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob L-Plastin über Kostimulation reguliert wird und an der Reifung der IS bzw. an der Clusterbildung von Rezeptoren beteiligt ist. Alle Arbeiten wurden dabei in primären humanen T-Lymphozyten (PBT) aus gesunden Spendern durchgeführt. Zunächst wurde gezeigt, dass L-Plastin nach klassischer Kostimulation über CD2 bzw. CD28 phosphoryliert wird. Um die Rolle der L-Plastin Phosphorylierung während der T-Zell-Aktivierung genauer untersuchen zu können, wurde die Phosphorylierungsstelle von L-Plastin durch Massenspektroskopie und gerichtete Mutagenese bestimmt. Dabei ergab sich, dass Ser-5 die einzige Phosphorylierungsstelle im L-Plastin-Molekül ist. Interessanterweise zeigten PBT, die cDNA kodiertes nicht-phosphorylierbares 5A-LPL exprimierten, eine Reduktion in ihrer Funktion, gemessen an dem frühen Aktivierungsmarker CD69.

Aufgrund seiner Fähigkeit Aktin-Filamente, die für die Ausbildung einer reifen IS essentiell sind, zu bündeln, lag die Vermutung nahe, dass L-Plastin für die Bildung bzw. Stabilisierung von Rezeptor-Klustern in der IS wichtig sein könnte. Daher wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob L-Plastin an der Clusterbildung von Rezeptoren, die durch

Antikörper gegen Oberflächenmoleküle induziert wurden (Rezeptor-Caps oder Caps), beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass sich L-Plastin an dem Pol der Zelle anreicherte, an dem sich auch das Cap befand, was erstmals darauf hindeutete, dass L-Plastin tatsächlich eine Rolle in der Bildung oder Stabilisierung von Rezeptor-Klustern spielt. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden die Effekte von Bromo-Phenacylbromid (BPB) auf Rezeptor-Caps untersucht. BPB ist eine niedermolekulare Substanz, die in geringen Konzentrationen selektiv und kovalent an L-Plastin bindet. Die Ausbildung von Caps wurde tatsächlich durch eine Vorinkubation von PBT mit BPB um ca. 90% reduziert. Dieser Effekt war transient, d.h. 5-6 Stunden nach der Vorinkubation bildeten etwa 30% der Zellen wieder Rezeptor-Caps aus. Innerhalb dieses Zeitfensters („funktioneller Knock-out Zustand“) konnte mit cDNA exprimiertem wildtyp-L-Plastin die Bildung von Rezeptor-Caps teilweise rekonstituiert werden, wodurch eine direkte Funktion von L-Plastin an der Bildung von Rezeptor-Klustern postuliert werden kann. Eine erneute Cap-Bildung konnte auch mit einer nicht-phosphorylierbaren L-Plastin Mutante (5A-LPL) erzielt werden. Diese war aber verglichen mit der Rekonstitution über wildtyp-L-Plastin deutlich schwächer. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die L-Plastin Phosphorylierung eine stabilisierende Wirkung auf die Rezeptor-Kluster ausübt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass L-Plastin an der Kontaktzone von PBT und Raji B-Lymphom-Zellen, die als APZ dienen, akkumuliert. L-Plastin war dabei nicht nur in der reifen Synapse zu finden, die mit Superantigenen induziert wurde, sondern auch in Superantigen-unabhängigen Kontakten. Über Time-Lapse-Videomikroskopie wurde dargestellt, dass L-Plastin in PBT innerhalb von Sekunden nach Kontaktaufnahme mit den B-Zellen fast komplett an die Kontaktzone verlagert wird. Die Kinetik der Phosphorylierung von L-Plastin, die über mindestens 30 Minuten anstieg, war wesentlich langsamer als die Verlagerung von L-Plastin in die immunologische Synapse, die innerhalb von Sekunden stattfand. Daher musste die Verlagerung in die IS phosphorylierungs-unabhängig sein. Tatsächlich konnte mit L-Plastin-EGFP-Fusionsproteinen demonstriert werden, dass sowohl wildtyp-L-Plastin, als auch nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutanten (5A-LPL) an die Kontaktzone zu Raji B-Zellen verlagert werden.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das über T-Zell-Kostimulation phosphorylierbare Aktin-bündelnde Protein L-Plastin an der Bildung bzw. Stabilisierung von Rezeptor-Klustern beteiligt ist.

2. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden Aktivierungsprozesse humaner T-Lymphozyten untersucht. Im Folgenden wird daher eine kurze Einführung in das humane Immunsystem gegeben. Im Fokus stehen die Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die damit verbundenen Polarisationsprozesse und die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts.

2.1 Überblick über das humane Immunsystem

Der menschliche Organismus ist in seiner Umwelt ständig in Gefahr, durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Viren geschädigt zu werden. Das Immunsystem schützt den Körper jedoch gegen Infektionen und sorgt dafür, dass sie zeitlich begrenzt bleiben und keine dauerhaften Schäden verursachen. Weiterhin spielt das Immunsystem eine wesentliche Rolle in der Tumorabwehr, d.h. entartete körpereigene Zellen werden abgetötet. Das Immunsystem besteht aus festen Organen und Geweben, in denen Immunzellen gebildet, ausgereift und letztlich auch aktiviert werden. Hierzu zählen das Knochenmark, die Milz, der Thymus und die Lymphknoten, in denen primär die Immunaktivierung stattfindet. Die eigentliche Immunabwehr wird durch die Leukozyten und humoralen, d.h. löslichen Bestandteile wie Antikörper, vermittelt. Leukozyten stellen eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar, die auf unterschiedlichste Weise an einer Immunantwort beteiligt sind. Nur das korrekte Zusammenspiel aller Immunzellen und Gewebe gewährleistet die Erhaltung der Gesundheit und Individualität eines Menschen.

Eine Immunantwort auf einen Erreger lässt sich grob in 5 Schritten beschreiben (Janeway *et al.*, 2001):

- 1) Die Erreger durchdringen das Epithel, d.h. die Körpergrenzflächen, (**Infektion**) und stoßen auf Makrophagen, die einerseits phagozytotisch aktiv werden und andererseits einen Entzündungsprozess in Gang setzen. Dadurch werden Dendritische Zellen (DC aus engl. Dendritic cells) aktiviert, die darauf ebenfalls verstärkt phagozytieren und in angrenzenden Lymphknoten Bruchstücke des Erregers (Antigene) auf ihrer Oberfläche präsentieren.
- 2) Es folgt die **spezifische Erkennung** dieser Antigene durch Lymphozyten, d.h. B- und T-Zellen. Jeder dieser Lymphozyten trägt auf seiner Oberfläche einen individuellen

„Antigen-Rezeptor“ der nur eine bestimmte antigene Struktur erkennt. Diese Diversität der Rezeptoren entsteht durch somatische Rekombination. Aufgrund der enormen Anzahl an Lymphozyten (2×10^{12} in erwachsenen Menschen) steht dem Immunsystem eine nahezu unbegrenzte spezifische Erkennung von verschiedenen Stoffen zu Verfügung.

3) Lymphozyten, die „ihr“ Antigen erkennen, werden aktiviert, fangen an zu proliferieren und differenzieren zu Effektor-Zellen (**Differenzierung**), die dann Antikörper (B-Zellen) oder Zytokine bilden bzw. direkt infizierte Zielzellen abtöten (T-Zellen).

4) In der **Wirkungsphase** werden Erreger durch die Abwehrmechanismen der Lymphozyten wirksam bekämpft (z.B. Antigen-Antikörper Reaktion).

5) Nachdem die Erreger durch Effektor-Zellen aus dem Körper eliminiert wurden, kommt es zu einer **Abschaltphase**. Während die Effektor-Zellen absterben bleiben einige Gedächtniszellen übrig, die bei einer Reinfektion mit demselben Keim wesentlich schneller und effektiver reagieren können als die naiven Zellen bei der Primärinfektion.

2.1.1 Von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort

Prinzipiell wird ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem reagiert sehr schnell, d.h. innerhalb von Minuten und Stunden, und sorgt für eine lokale Begrenzung der Infektionen. Kleinere Infektionen können sogar vollständig vom angeborenen Immunsystem kontrolliert werden, während größere Infektionen durch das adaptive Immunsystem bekämpft werden müssen. Dieses benötigt jedoch insgesamt ca. eine Woche, um einen Infekt wirksam zu kontrollieren. Während dieser Latenzzeit ist der Organismus grundsätzlich auf das angeborene Immunsystem angewiesen.

Nach einer Infektion mit einem Pathogen stellt das angeborene Immunsystem in Form von Makrophagen und Granulozyten die erste Abwehrfront des Körpers dar. Die Erkennung des Pathogens erfolgt über konservierte Strukturen, die von Rezeptoren auf den Makrophagen gebunden werden. Bekannte Beispiele für diese Mustererkennungsrezeptoren sind Mannose-Rezeptoren, die an Komponenten der Bakterienzellwand binden und dadurch Phagozytose induzieren. Letztlich werden die Bakterien in Phagolysosomen, durch Acidifizierung, lytische Granula und extrem reaktive Sauerstoffradikale abgetötet. Zusätzlich lösen Makrophagen Entzündungsprozesse aus (Inflammation), durch die weitere phagozytierende Zellen, z.B. neutrophile Granulozyten bzw. Komponenten des humoralen Immunsystems, rekrutiert werden. Eine wesentliche

Funktion der Inflammation ist jedoch die Aktivierung und Einbeziehung des adaptiven Immunsystems: Unreife Dendritische Zellen dienen dabei als direkte Vermittler. Sie nehmen antigene Strukturen auf, die anschließend prozessiert und über spezielle Oberflächenmoleküle, den MHCs (engl. Major histokompatibility complex), präsentiert werden. Gleichzeitig werden die DC aktiviert und wandern als reife dendritische Zellen in die regionalen Lymphknoten, wo sie von Lymphozyten nach Antigenen abgesucht werden. Wenn die Lymphozyten durch das „richtige“ Antigen auf den APZ aktiviert wurden, wandern sie in das infiltrierte Gewebe, um dort die Infektion einzudämmen (Janeway *et al.*, 2001).

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die herausragenden Eigenschaften des adaptiven Immunsystems sind Spezifität, Vielfalt und letztlich das Immunologische Gedächtnis. Die spezifische Erkennung von Antigenen erfolgt bei B-Zellen durch Membran-gebundene Antikörper, die als B-Zell-Rezeptor (BZR) bezeichnet werden, und bei T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor (TZR). Beide Typen von Rezeptoren besitzen einen hoch variablen Anteil, der bestimmte Determinanten eines Moleküls (Epitope) erkennt. Durch somatische Rekombinationen besitzt jede B- bzw. T-Zelle ihren individuellen Antigen-spezifischen Rezeptor und gewährleistet damit die enorme Anzahl individuell verschiedener Lymphozyten. Nachdem ein Lymphozyt durch eine Antigen-präsentierende Zelle stimuliert wurde, fängt er an sich zu teilen (Proliferation). Diese klonale Expansion gewährleistet, dass eine passende und genügend starke Immunantwort gegen eine bestimmte Infektion gegeben wird. Weiterhin differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen, die Antikörper als Kopie ihres BZR produzieren. Die löslichen Antikörper binden Keime und markieren sie so zur Lyse durch das Komplementsystem bzw. zur Phagozytose durch Fresszellen. Zusätzlich werden durch Antikörperbindung essentielle Oberflächenstrukturen von Viren und Bakterien blockiert, die deren Pathogenität vermitteln. Außerdem können deren Toxine inaktiviert werden. Obwohl B-Zellen durch einige Antigene direkt aktiviert werden können, ist zur somatischen Hypermutation und dem Klassenwechsel der Antikörper, z.B. von IgM zu IgG, die Hilfe von T-Zellen nötig. Nur durch eine zusätzliche Ausschüttung von Zytokinen durch die T-Zellen können B-Zellen aktiviert werden. T-Zellen stellen die weitaus größte Lymphozytenpopulation dar und bestehen aus verschiedenen Subpopulationen, die

Abbildung 2.2.1

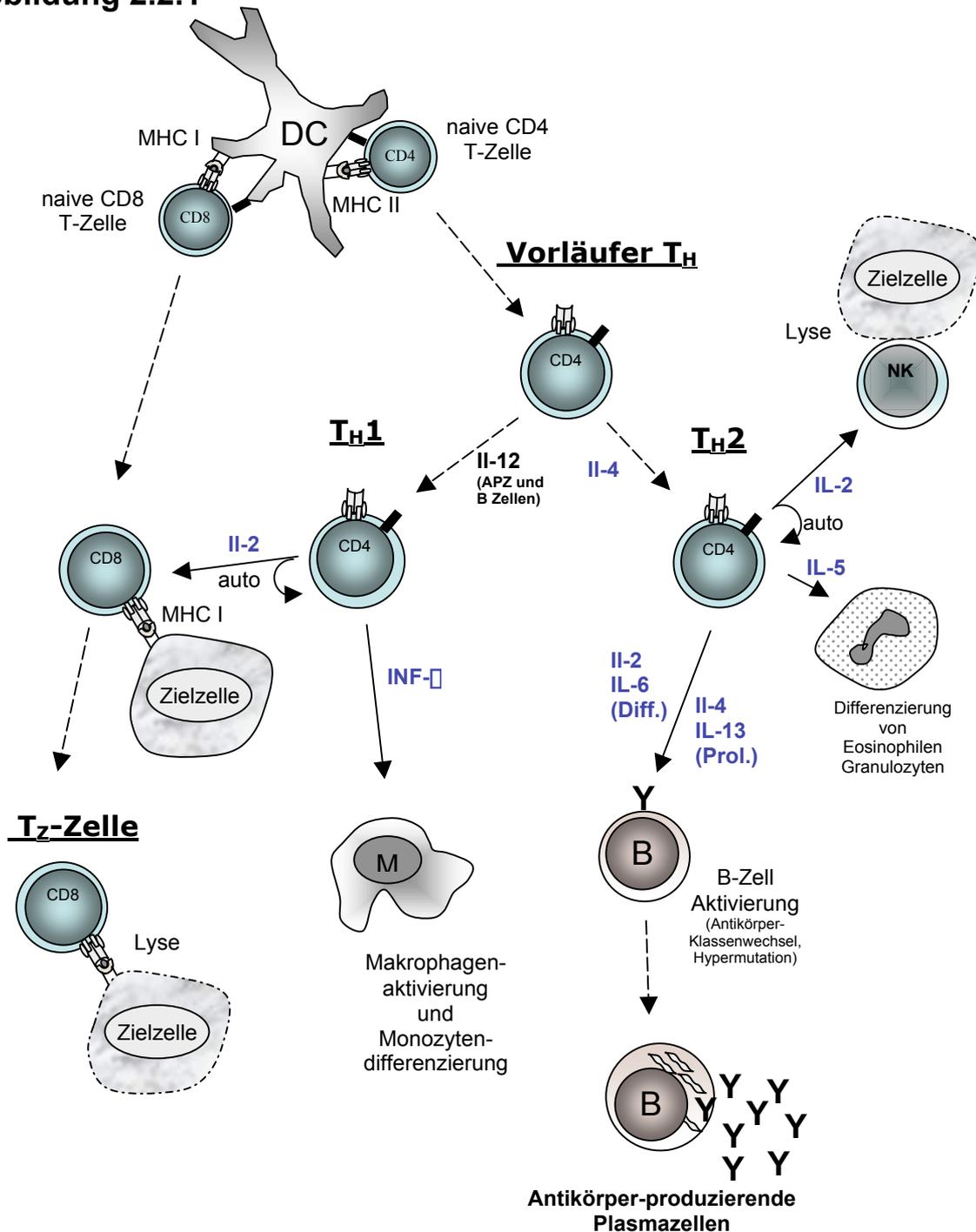


Abb.2.2.1 Zellinteraktionen von T-Zellen

Zur immunologischen Überwachung agieren T-Zellen über direkte Zellkontakte, bei denen Immunzellen aktiviert oder Zielzellen lysiert werden. T-Zellen sind in blau dargestellt und entweder mit „CD8“ als zytotoxische T-Zellen oder „CD4“ als T-Helfer-Zellen markiert. Unterbrochene Pfeile stellen eine Differenzierung der Lymphozyten dar, während durchgehende Pfeile Wirkungen auf andere Zellen symbolisieren. An den Pfeilen sind in blau die Zytokine verzeichnet, die von den T-Zellen sezerniert werden, bzw. in schwarz, diejenigen, die von anderen Zellen abgegeben werden.

Abkürzungen: B = B-Zellen, Y = Antikörper, NK = Natürliche Killerzellen, M = Monozyten, Makrophagen, DC = Dendritische Zellen, IL = Interleukin, INF = Interferon, Diff = Differenzierung, Prol. = Proliferation; T_H1 = T-Helfer 1 Zelle; T_H2 = T-Helfer 2 Zelle; NK = Natürliche Killer-Zelle; T_Z = Zytotoxische T- Zelle;

einerseits Makrophagen und B-Zellen aktivieren können und andererseits an der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und Viren beteiligt sind (Abb. 2.1.1).

2.1.3 Das immunologische Gedächtnis

Der erstmalige Kontakt des Immunsystems mit einem Antigen löst die so genannte Primärantwort aus. Wie oben beschrieben kommt es nach einer induktiven Phase zur Produktion von Antikörpern und zur Eliminierung der Erreger aus dem Menschen. Nach einer Reinfektion mit dem gleichen Keim wird die Sekundärantwort ausgelöst, die sich in einer Reihe von Punkten von der Primärantwort unterscheidet: Bereits eine geringe Antigen-Dosis löst die Aktivierung aus, die schneller von statten geht und letztlich zu einem höheren Antikörper-Titer führt. Die effizientere Antwort kommt zustande, weil sich das Immunsystem an den vorherigen Kontakt mit dem Erreger „erinnert“. Dieses immunologische Gedächtnis existiert in Form von Gedächtnis B- und T-Zellen. Im Gegensatz zu naiven Zellen hatten Gedächtniszellen bereits Kontakt mit „ihrem“ Antigen und können bereits wenige Stunden nach der Antigen-Exposition große Mengen Antikörper bzw. Zytokine bilden. Sogar die klonale Expansion der Gedächtnis T-Zellen ist um einen Faktor 5 stärker als bei naiven T-Lymphozyten. Sie persistieren über Jahre bis lebenslang im Körper und können im Gegensatz zu naiven T-Zellen auch in nicht lymphatisches Gewebe einwandern (Lakkis und Sayegh, 2003). Man kann Naive und Gedächtnis T-Zellen durch ihr unterschiedliches Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen leicht unterscheiden. So ist auf Gedächtniszellen CD2, LFA-3, LFA-1 und α 4-Integrin mindestens doppelt so stark exprimiert (Janeway *et al.*, 2001). Weiterhin exponieren sie auf der Zelloberfläche eine andere Splice-Form von CD45: CD45RO gegenüber CD45RA auf naiven T-Zellen.

Im Gegensatz zu Lymphozyten besitzen Makrophagen keine Möglichkeit aus vorherigen Infektionen zu lernen. Auf der Seite des angeborenen Immunsystems läuft die Immunantwort auf eine Re-Infektion also genauso ab wie bei dem ersten Kontakt. Nachdem aber das Immunsystem über die effizienten Mittel der Lymphozyten verfügt, mit der eine Sekundärantwort gegeben werden kann, erhebt sich die Frage, wieso dieses Repertoire nicht bei der Primärantwort ausgeschöpft wird? Die Antwort liegt in der Selbstkontrolle des Immunsystems. Durch den komplexen Vorgang der Lymphozyten-Aktivierung während der Primärantwort wird eine ungewollte Immunantwort beispielsweise bei kleineren Infektionen vermieden. Es ist also ein gewisser Schwellenwert

an Antigenen nötig, um die Zellen zu aktivieren. Weiterhin können Lymphozyten, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, kontrolliert werden, d.h. es kann eine Toleranz induziert werden, indem Liganden zur Auslösung kostimulatorischer Signale auf den APZ fehlen (s.u.). Diese Kontrolle ist bei der Aktivierung von Gedächtniszellen nicht nötig, weil sie bei ihrer vorherigen Stimulation bereits die Kontrollsysteme durchlaufen haben (Janeway *et al.*, 2001).

2.2 T-Zell vermittelte Immunantwort

T-Zellen tragen die Hauptaufgabe der immunologischen Überwachung und Steuerung des Immunsystems. Die eminente Bedeutung von T-Zellen wird durch den schwerwiegenden Verlauf einer HI Virus¹-Infektion deutlich, bei der T-Zellen depletiert werden. Die Abbildung 2.2.1 zeigt die verschiedenen Zellinteraktionen, bei denen T-Zellen als Vermittler der Aktivierung von anderen Leukozyten dienen (T_H oder CD4 T-Zellen) oder selbst als Effektorzellen (T_Z oder CD8 T-Zellen) fungieren. Am Anfang steht die Aktivierung der T-Zellen durch professionelle APZ, wie Dendritische Zellen.

Die so genannten T-Helfer-Zellen (T_H) produzieren nach ihrer Aktivierung durch die DC Signalstoffe, die Zytokine oder Interleukine (IL), mit deren Hilfe sie auf andere Immunzellen einwirken. T_H-Zellen erkennen Antigene im MHC II Kontext, der auf den APZ exprimiert wird. Das beladene Antigen stammt von Proteinen die zuvor von den DC aufgenommen und in Phagosomen verdaut wurden (z.B. von exogenen Pathogenen). Die T_H-Zellen erkennen den MHC II Komplex durch den Ko-Rezeptor CD4, der Antigen-unabhängig an MHC II bindet.

Nach der Aktivierung kann sich aus einer Vorläufer T_H-Zelle eine Helfer 1 (T_{H1}) oder Helfer 2 (T_{H2}) T-Zelle entwickeln. Diese unterscheiden sich in ihrem Zytokin-Expressions-Muster und den Leukozyten, die sie aktivieren können (Aktivierungsspektrum) (Janeway *et al.*, 2001). T_{H1}-Zellen produzieren vor allem Interferon- γ (INF- γ) bzw. IL-2 und aktivieren Monozyten, Makrophagen oder T_Z-Zellen, während T_{H2}-Zellen vor allem B-Zellen durch IL-2, IL-6, IL-4 und IL-13 aktivieren. Weiterhin können letztere Granulozyten zur Differenzierung anregen oder NK-Zellen ko-aktivieren. Welche der Helfer Antworten generiert wird hängt wiederum von Zytokinen ab. So wird eine T_{H1}-Zelle gebildet, wenn IL-12 von den APZ abgegeben wird.

¹ das Human Immunodeficiency Virus (HIV) ist der Erreger von AIDS

Zytotoxische T-Zellen (T_Z) können durch APZ oder direkt durch ihre Zielzellen aktiviert werden. Sie exprimieren den Ko-Rezeptor CD8 auf ihrer Oberfläche, welcher durch Bindung an MHC I signaltransduktorisches aktiv wird. MHC I wird auf fast allen Körperzellen gebildet und exponiert Peptide aus Proteinen, die im Zytoplasma gebildet werden, d.h. körpereigene und virale Proteine. Allerdings werden manchmal Proteine von exogenen Keimen über MHC I präsentiert. Dieses Phänomen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Belz *et al.*, 2002). Auch zytotoxische T-Zellen bekommen Hilfe von T_H1 -Zellen in Form des Wachstumsfaktors IL-2. Die T_Z -Zellen bilden toxische Granula, mit denen sie direkt ihre Zielzelle zerstören können. Somit können diese T-Zellen nicht nur Virus-infizierte Zellen abtöten, sondern auch Tumorzellen aus dem Körper eliminieren.

Um das richtige Antigen bzw. die passenden Zielzellen zu finden, sind alle T-Zellen während ihres Lebens in ständiger Bewegung (Abb. 2.2.2). Sie zirkulieren zwischen Blut und lymphatischem System und wandern letztlich als Effektor-T-Zellen in inflammatorisches Gewebe ein. Bei diesen Prozessen transmigrieren T-Zellen durch das vaskuläre Endothel, um das entsprechende Gewebe zu erreichen. Dieser Vorgang wird „Homing“ genannt (Abb. 2.2.2 A). Als erstes werden die T-Zellen dabei am Gefäß-Endothel durch reversible Bindung von Selektinen verlangsamt und rollen so an der Gefäßwand entlang (*Rollen*). So können sie auf Chemokine reagieren, die z.B. von Makrophagen sezerniert wurden. Dies bewirkt eine Erhöhung der Affinität und Avidität von Integrinen (z.B. LFA-1) und dadurch eine feste Adhäsion der T-Zellen an das Endothel bewirkt (*feste Adhäsion*). Sie wandern darauf an der Gefäßwand entlang und transmigrieren schließlich ins Gewebe (*Diapedese*) (Butcher und Picker, 1996; von Andrian und Mackay, 2000). Im Gewebe bewegen sich die Zellen durch *Migration* (Abb. 2.2.2 B). Dabei polarisieren sich die T-Zellen, d.h. ihre runde Morphologie, die sie während der Zirkulation im Blut inne hatte, wird durch eine Umverteilung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Bestandteilen verändert, so dass ein vorderer und ein hinterer Teil entsteht. Im vorderen Teil (Zellfront oder aus engl. „leading edge“) werden Lamellipodien gebildet, in denen Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) und der Hauptteil des Aktin-Zytoskeletts lokalisiert sind (Campanero *et al.*, 1994; Friedl und Brocker, 2000; Nieto *et al.*, 1997). Im hinteren Teil, oder Uropod, befinden sich interzelluläre Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, -2 und -3, sowie Membran-Anker der ERM Familie (del Pozo *et al.*, 1995; Serrador *et al.*, 1997).

Abbildung 2.2.2

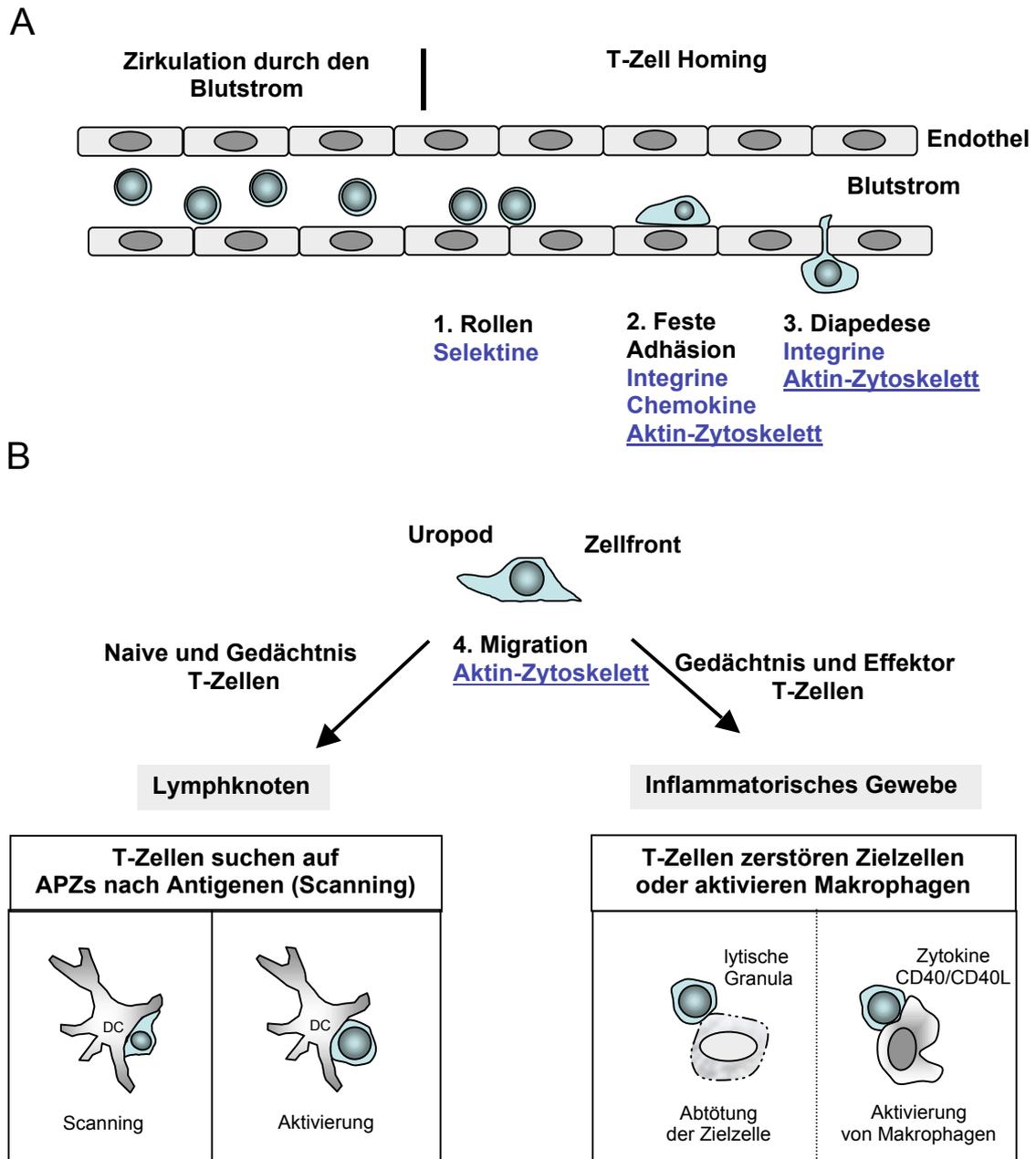


Abb.2.2.2 Dynamische T-Zell Polarisierung

A) Die Abbildung zeigt den Weg von T-Zellen, die im Blutstrom zirkulieren, aus den Blutgefäßen in das angrenzende Gewebe. Dieser Prozess wird „Homing“ genannt und besteht aus 3 nacheinander abfolgenden Schritten: 1) Rollen entlang der Gefäßwand, 2) Feste Adhäsion, 3) Diapedese. In blau sind die wesentlichen Moleküle beschrieben, die an den einzelnen Schritten beteiligt sind.

B) Nachdem die Zellen das angrenzende Gewebe erreicht haben, migrieren sie entweder in Lymphknoten (links) oder in inflammatorisches Gewebe. Im Lymphknoten suchen sie APZs nach dem „richtigen“ Antigen ab (Scanning) und werden entweder aktiviert oder gelangen zurück in den Blutstrom. Effektor Zellen wandern in inflammatorisches Gewebe, um dort ihre Zielzellen zu zerstören oder andere Immunzellen zu aktivieren.

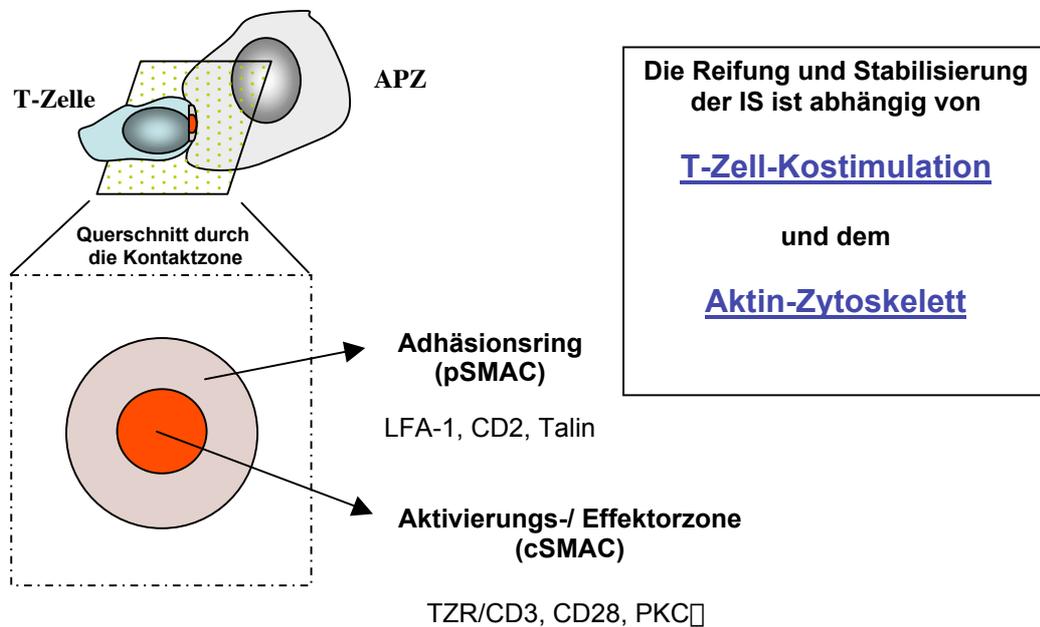
Naive T-Zellen bewegen sich vor allem zwischen Blut und lymphatischen Systemen. Im Lymphknoten kommen T-Zellen schließlich in engen Kontakt zu APZ und suchen sie nach dem passenden MHC-Antigen Komplex ab (Scanning, Abb. 2.2.2 B links). Wenn eine T-Zelle den passenden MHC-Antigen-Komplex gefunden hat hört sie auf zu wandern und polarisiert sich schnell zu einer APZ hin (Dustin *et al.*, 1997; Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003). Dabei werden an der Kontaktzone hoch-organisierte Proteinkluster gebildet, die für die Aktivierung und Funktion der T-Zellen essentiell sind (Kap 2.2.1). Effektor T-Zellen wandern indes präferenziell in inflammatorisches Gewebe ein (Abb. 2.2.2 B rechts) (Moser und Loetscher, 2001). Dort suchen z.B. T_Z-Zellen nach Zielzellen, um sie zu zerstören. Auch hierbei polarisieren sie sich zu der Zielzelle hin, damit die lytischen Granula umliegendes Gewebe nicht beschädigen.

Die schnelle Formwandlung und Polarisation ist eine herausragende Eigenschaft der Leukozyten und für ihre Funktion der Immunüberwachung essentiell, da sie sich in ständiger Bewegung befinden müssen. Für die Polarisierung von T-Zellen während der Migration, Aktivierung und Erfüllung ihrer Effektor-Aufgaben ist ein molekulares Grundgerüst nötig, durch das Proteine in und auf der T-Zelle „sortiert“ werden können bzw. die Zelle eine stabile äußere Form erhält. Dieses Gerüst besteht vor allem aus dem Zytoskelett (s. Kap. 2.3), Adaptorproteinen (s. Kap. 2.2.2) und speziellen Lipid-Inseln in der Membran. Letztere unterscheiden sich in Ihrer Lipid-Zusammensetzung stark von der restlichen Lipid-Doppelschicht, indem sie z.B. Cholesterin und Sphingolipide angereichert haben (Brown und Rose, 1992; Harder und Simons, 1997; Parton und Simons, 1995; Simons und Ikonen, 1997). Diese Inseln werden als „Lipid Rafts“ oder GEM (engl. glycosphingolipid-enriched microdomains) bezeichnet. Einige Moleküle sind konstitutiv mit den GEM assoziiert, während andere (z.B. CD2) erst nach Stimulation dort nachgewiesen werden können. Durch die Aktivierung von T-Zellen können die GEM mit den assoziierten Proteinen an einem Pol der Zelle zusammenfließen und so zur Ausbildung von Protein-Klustern beitragen, die im Folgenden besprochen werden.

2.2.1 Die Immunologische Synapse

Die Aktivierung von T-Zellen ist ein multifaktorieller Prozess, der aus mehreren Schritten besteht. Diese können einer sehr frühen, einer frühen und einer späten Phase zugeordnet werden. Als erstes orientieren sich die T-Zellen schnell zur APZ und bilden dann langsam

Abbildung 2.2.3

**Abb. 2.2.3 Die Immunologische Synapse (IS)**

Als Immunologische Synapse wird die Kontaktzone zwischen der T-Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle (DC oder B-Zelle) bezeichnet. In einem Querschnitt durch die Kontaktzone sind in der reifen IS zwei in konzentrischen Kreisen aufgebaute Zonen zu unterscheiden. Der innere Kreis besteht aus einem zentralen Aktivierungskluster, in dem TZR/CD3, CD28 und PKC \square lokalisiert sind. Der periphere Adhäsionsring enthält die Adhäsionsmoleküle CD2 und LFA-1. Für die Ausbildung dieser Proteinkluster sind sowohl ein intaktes Zytoskelett als auch T-Zell-Kostimulation unabdingbar.

an der Kontaktzone außergewöhnlich organisierte Strukturen aus, die Rezeptoren, Signaltransduktionsmoleküle, GEM und F-Aktin enthalten (Dustin und Shaw, 1999; Grakoui *et al.*, 1999). Analog zu neuronalen Synapsen wurden diese Strukturen an den Kontaktzonen zwischen T-Zelle und APZ „Immunologische Synapse“ (IS) genannt (Abb. 2.2.3) (Grakoui *et al.*, 1999; Paul und Seder, 1994). Diese besteht aus einem äußeren Adhäsionsring, genannt pSMAC (engl. peripheral supramolecular activation cluster), in dem LFA-1, CD2 sowie der Membrananker Talin lokalisiert sind und einem inneren Aktivierungsbereich, cSMAC (engl. central SMAC), mit dem der TZR, der akzessorische Rezeptor CD28, sowie die Protein Kinase C \square (PKC \square) assoziiert sind. Die „Reifung“

dieser Proteinkluster dauert etwa 30 Minuten. Sie entstehen in der frühen Phase aus kleinen unstabilen Rezeptor-Komplexen, die zu großen stabilen Klustern während der späten Phase zusammenfließen. Es ist nicht genau bekannt, wie diese hoch-organisierte Ring-Struktur entsteht. Sicher ist, dass sowohl Kostimulation, d.h. Signal 1 über den TZR und Signal 2 über akzessorische Rezeptoren (s. Kap. 2.2.3) als auch ein dynamisch funktionierendes Aktin-Zytoskelett nötig sind (Dustin und Cooper, 2000; Dustin und Shaw, 1999; Lowin Kropf *et al.*, 1998; Sedwick *et al.*, 1999; Wülfing und Davis, 1998). So wurde beispielsweise gezeigt, dass durch T-Zell-Kostimulation präformierte GEM zu großen Klustern an der Kontaktzone zusammenfließen und dadurch die Verlagerung von Rezeptoren und zytoplasmatischen Proteinen wie PKC ζ ermöglicht wird (Alonso und Millan, 2001; Cherukuri *et al.*, 2001; Mestas und Hughes, 2001; Samstag und Nebl, 2003; Villalba *et al.*, 2001; Wülfing und Davis, 1998). Weiterhin kann sich keine reife IS ausbilden, wenn das Aktin-Zytoskelett zuvor durch Cytochalasine zerstört wurde (Dustin und Cooper, 2000). Aktin wird von den T-Zellen bei einem APZ-Kontakt zur Schnittstelle hin verlagert. Auch DC verlagern das Aktin-Zytoskelett in Richtung der zu aktivierenden T-Zelle. Interessanterweise wird im Gegensatz dazu das Aktin-Zytoskelett von B-Zellen, die als APZ fungieren, nicht verlagert (Delon *et al.*, 1998). Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Modulation des Aktin-Zytoskeletts durch T-Zell-Kostimulation gesteuert wird. Das 19 kDa Aktin-bindende Protein Cofilin wird beispielsweise nur durch Kostimulation dephosphoryliert und assoziiert darauf mit Aktin (Lee *et al.*, 2000; Samstag *et al.*, 1992). Wenn die Aktin-Bindefähigkeit dieses essentiellen Proteins durch zellpermeable Peptid-Homologe funktionell eingeschränkt wird, bildet sich keine reifen IS aus (Eibert *et al.*, 2004).

Über die Funktion der Immunologischen Synapse gibt es kontroverse Ansichten. Einerseits soll sie die aktivierenden Signale aufrecht erhalten und somit eine vollständige Aktivierung der T-Zellen ermöglichen (Lanzavecchia und Sallusto, 2000; Valitutti *et al.*, 1995). Andererseits zeigten mehrere Arbeiten, dass der Grossteil der Tyrosinphosphorylierung in den ersten 10 Minuten des Zellkontakts stattfindet und daher bereits abgeschlossen ist, bevor die reife IS gebildet ist (Chan *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2002). Möglicherweise werden in späteren Aktivierungsphasen, wenn die reife IS bereits gebildet ist, andere Signale von der Zelle verwendet, wie z.B. Serinphosphorylierung (Samstag *et al.*, 2003). Weiterhin wurde von van der Merwe und Davis vorgeschlagen, dass die IS ein multifunktionelles Gebilde ist, das sowohl für die T-Zell Aktivierung, als auch für die Ausführung von Effektor-Funktionen nötig ist. Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass T_Z-Zellen

ihre lytischen Granula in die reife IS abgeben und so in gerichteter Weise ihre Zielzellen abtöten. Durch diesen Mechanismus werden umliegende gesunde Zellen verschont (Stinchcombe *et al.*, 2001; van der Merwe und Davis, 2002).

2.2.2 Signalübertragung während der T-Zell Aktivierung

2.2.2.1 Das T-Zell-Rezeptor-vermittelte Erstsinal

Bisher wurde beschrieben welche Ereignisse zur Aktivierung von T-Zellen führen. Im Folgenden wird kurz dargelegt, wie durch Stimuli auf der Zelloberfläche Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert werden, um die Proteinbiosynthese in Gang zu bringen. Wie bereits erwähnt, erkennen T-Zellen den MHC-Antigen-Komplex über ihren TZR. Dieser setzt sich zusammen aus den Antigen-erkennenden α - und β -Untereinheiten, deren extrazelluläre Bereiche wiederum aus konstanten (C-Ketten) und variablen Anteilen (V-Ketten) aufgebaut sind. Diese sind jeweils über einen transmembranen Anteil in der Zytoplasmamembran verankert und besitzen sehr kurze zytoplasmatische Schwänze, die signaltransduktorisch nicht aktiv sind. Der variable, extrazelluläre Anteil ist bei jeder Zelle individuell und für die hohe Spezifität der Zellen verantwortlich. Allerdings können an einige der 52 verschiedenen Subklassen der V β -Ketten bakterielle Superantigene binden, die zu einer breiten T-Zell-Aktivierung ohne Anwesenheit des eigentlichen Antigens führen. Zu diesen Superantigenen gehören die *Staphylococcus aureus* Enterotoxine, durch die Nahrungsmittelvergiftungen auftreten können.

Die Signaltransduktion in die Zelle wird nicht vom TZR direkt, sondern durch den fest assoziierten CD3 Komplex (α -, β -, γ -, δ -Ketten) vermittelt. Die CD3-Untereinheiten besitzen in ihren zytoplasmatischen Anteilen ein oder mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsmotive, ITAMs (engl. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), die während der Antigen-abhängigen Stimulation sofort durch die Src-Tyrosin-Kinase Lck phosphoryliert werden. Diese ist konstitutiv mit den Ko-Rezeptoren CD4 bzw. CD8 verbunden. Durch die Phosphorylierung der CD3 β -ITAMs wird die Syk-Tyrosin-Kinase ZAP-70 (engl. ζ -associated protein of 70 kDa) gebunden und auch von Lck phosphoryliert. Diese Kinase ist eines der ersten Proteine, das an die Plasma-Membran rekrutiert wird und phosphoryliert seinerseits die Adaptorproteine LAT (engl. Linker for aktivation of T cells) und SLP-76 (engl. SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa) (Jackman *et al.*,

1995; Zhang *et al.*, 1998). Adaptorproteine sind wesentlich an der Polarisierung des Aktivierungskomplexes beteiligt, obwohl sie selbst keine katalytische Funktion aufweisen. Sie enthalten mehrere Bindestellen für Proteine, die eine SH2-Domäne besitzen, und können diese somit an die Plasma-Membran verlagern und in die entstehenden Aktivierungskomplexe einbinden. In diesen Komplexen werden Enzyme und deren Substrate in räumliche Nähe gebracht, so dass die Adaptorproteine quasi als „Katalysatoren“ für die Reaktionen wirken. Dadurch werden an der Plasma-Membran weitere Signalkaskaden in Gang gesetzt. Diese führen über Phospholipasen, Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Kinasen), Protein Kinase C (PKC) und kleine G-Proteine zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und schlussendlich zur Produktion von Zytokinen (Acuto und Cantrell, 2000; Germain, 2001). Weiterhin werden Proteine angeschaltet, die zu einer Aktivierung des Aktin Polymerisations-Komplexes (Arp2/3 Komplexes) führen (Kap. 2.3). Das Aktin-Zytoskelett ist als Grundgerüst wesentlich am Ablauf der Signaltransduktion beteiligt.

2.2.2.2 Kostimulation

Zur vollen Aktivierung benötigen T-Zellen neben dem Signal 1 über den TZR (Kompetenzsignal) ein zweites, kostimulatorisches Signal (Zwei-Signal Regel). Die kostimulatorischen Signale wirken synergistisch mit Signal 1 über den TZR. Wenn eine Antigen-präsentierende Zelle keine Liganden für akzessorische Rezeptoren exponiert, d.h. kostimulatorische Signale fehlen, gehen die T-Zellen in einen Zustand der Anergie über oder der programmierte Zelltod (Apoptose) wird ausgelöst (Abb. 2.2.4) (Boise *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 1992; Mueller *et al.*, 1989; Radvanyi *et al.*, 1996). Wird indes in Abwesenheit von Antigen Signal 2 alleine über die APZ vermittelt, kann kein Effekt nachgewiesen werden. Obwohl die molekularen Mechanismen der Kostimulation bis dato kaum verstanden sind, können zusammenfassend vier verschiedene Konsequenzen der Kostimulation beschrieben werden:

- 1) Die Aktivierungsschwelle des TZR/CD3 Signals wird herabgesetzt (Bachmann *et al.*, 1997; Tuosto und Acuto, 1998; Viola und Lanzavecchia, 1996),
- 2) die Adhärenz an die APZ wird verstärkt, z.B. durch CD2 und LFA-1 (Koyasu *et al.*, 1990; Wingren *et al.*, 1995),

- 3) Rezeptoren und GEM werden an die Kontaktzone zwischen APZ und T-Zelle verlagert, wodurch die Ausbildung der IS ermöglicht wird (Viola *et al.*, 1999; Wülfing und Davis, 1998) und
- 4) für die Kostimulation spezifische Signale, häufig Serin- (De)-Phosphorylierungen werden ausgelöst (Boise *et al.*, 1995; Henning *et al.*, 1994; Reif *et al.*, 1997; Samstag *et al.*, 1991; Samstag *et al.*, 1992).

Abbildung 2.2.4

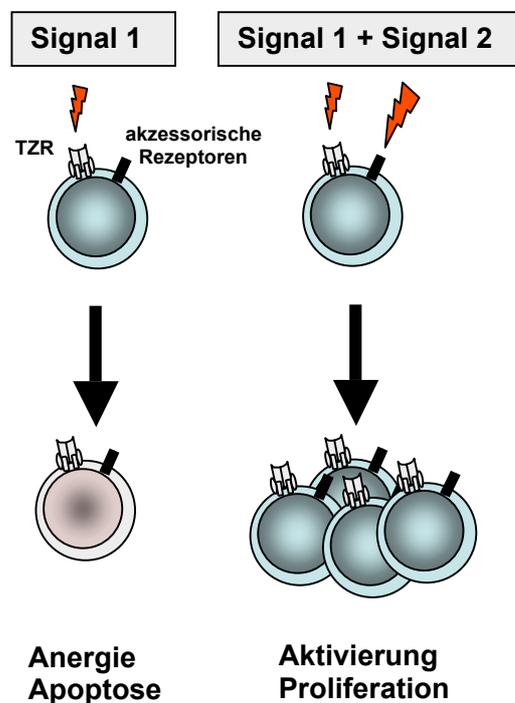


Abb. 2.2.4 T-Zell-Kostimulation

Zur vollen Aktivierung von T-Zellen sind zwei Signale nötig. Signal 1 über den TZR/CD3-Komplex alleine (links) führt zur Anergie oder zum Zelltod. Erst nach Kostimulation über Signal 1 plus Signal 2 (über akessorische Rezeptoren, rechts) kommt es zu einer vollständigen Aktivierung von T-Zellen.

Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Rezeptoren sind CD2 und CD28. Sie gehören von ihrer Struktur zur Klasse der Immunglobuline (Albert-Wolf *et al.*, 1991; Boise *et al.*, 1995; Brottier *et al.*, 1985; Gollob und Ritz, 1996; June *et al.*, 1994; Linsley und Ledbetter, 1993). Während des initialen Kontaktes der T-Zellen mit APZ wird die Adhäsion vor allem über CD2 und in geringerem Maße über LFA-1 vermittelt (Shaw *et al.*,

1986). Nach der Aktivierung der T-Zellen wird die Adhäsion jedoch hauptsächlich von LFA-1 getragen. Durch eine erhöhte Adhäsivität während des Scannings kann die Mindestmenge an Antigen herabgesetzt werden, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig ist (Koyasu *et al.*, 1990). Der CD2 Ligand auf den APZ ist LFA-3 (CD58). Wenn die Interaktion von CD2 und LFA-3 durch Antikörper inhibiert wird, bildet sich eine fehlerhafte IS aus, in der CD45 nachgewiesen werden kann, eine Tyrosinphosphatase, die normalerweise außerhalb der IS zu finden ist. Weiterhin werden über CD2 auch Signale in die Zelle vermittelt, durch die die T-Zell-Aktivierung verstärkt wird. Dazu ist CD2 mit Signaltransduktionsmolekülen wie Lck und PI3Kinase assoziiert (Bell *et al.*, 1996; Meuer *et al.*, 1984b; Shimizu *et al.*, 1995). Interessanterweise kann sogar mit einer reinen CD2-Stimulation (mit Antikörpern gegen 3 verschiedene Epitope des CD2-Moleküls) ohne Kompetenzsignal über den TZR eine komplette T-Zell-Aktivierung ausgelöst werden (alternativer Weg der T-Zell-Aktivierung (Meuer *et al.*, 1984b)).

Die Signaltransduktion über CD28 wird natürlicherweise von den Liganden auf den APZ, CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2), angeregt. Sie führt zu einer Tyrosinphosphorylierung im zytoplasmatischem Anteil von CD28 und dadurch zur Aktivierung der PI3Kinase und dem Adaptorprotein Grb2. Über diese Wege werden letztlich die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B angeschaltet, womit die Expression von IL-2 deutlich verstärkt wird (Kane *et al.*, 2002; Wingren *et al.*, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass CD28^{-/-} T-Zellen keine SMACs ausbilden können (Huang *et al.*, 2002), was die Abhängigkeit von Rezeptor und GEM-Bewegung zur Kontaktzone zwischen T-Zelle und APZ von der Kostimulation untermauert (Wülfing und Davis, 1998; Viola *et al.*, 1999).

Interessanterweise zeigen sowohl CD2, als auch CD28 „Knock out“ Mäuse keinen ausgeprägten Phänotyp, obwohl man dies nach den eben beschriebenen Gegebenheiten vermuten sollte. Eine doppelte "Knock out" Maus zeigt hingegen starke Immundefekte. Daraus ist zu schließen, dass beide Moleküle ähnliche Prozesse in der Zelle aktivieren und ein Ausfall des Einen daher kompensiert werden kann. Ein Konvergenzpunkt beider Rezeptoren ist das Aktin-Zytoskelett. Die dynamische Organisation des Aktin-Zytoskeletts ist essentiell für die Aviditätsregulation von Rezeptoren, ergo die Ausbildung von Klustern und bietet als strukturelle Einheit das Netzwerk, das das Signaltransduktionsgebäude während der Stimulation zusammenhält. Somit könnte die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eines der Hauptaufgaben der Kostimulation darstellen.

2.3 Das Aktin-Zytoskelett als Grundgerüst der Immunantwort

Lymphozyten befinden sich in ständiger Bewegung und müssen daher ihre innere, zytoplasmatische und äußere Form an die gegebenen Umstände anpassen. Obwohl das Aktin-Zytoskelett ein rigides und formgebendes Gebilde ist, unterliegt es dabei ständigen Umorganisationen. Bei jeder Zellpolarisation werden auf der einen Seite der Zelle Aktin-Polymere gebildet und auf einer anderen abgebaut. Im Folgenden wird dieser Kreislauf und die daran beteiligten Proteine erläutert (Mullins *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 2000; Samstag *et al.*, 2003).

2.3.1 Der dynamische Aktin-Kreislauf

Aktin hat ein Molekulargewicht von 43 kDa und ist eines der am stärksten exprimierten Proteine. Es ist in der Zelle entweder an ADP oder ATP gebunden und liegt als Monomer (G-Aktin) oder filamentöses Polymer (F-Aktin) vor (Abb. 2.2.5). Aktin-Filamente haben stets ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minusende. Der große Vorrat von (ATP)-G-Aktin ist in der Zelle an Thymosin- β 4 und Profilin gebunden. Während der G-Aktin-Thymosin- β 4-Komplex einen rein inaktiven Speicherzustand darstellt, kann Profilin-gebundenes Aktin an Plusenden von bereits bestehendem F-Aktin angelagert werden (Gomez-Marquez *et al.*, 1989; Huff *et al.*, 2001; Sobko *et al.*, 2002). Das angelagerte Aktin hat stets ATP gebunden, welches nach einer gewissen Zeit zu ADP hydrolysiert wird. Auf diese Weise werden ältere Aktin-Filamente markiert. Eine spontane Polymerisation von Aktin-Monomeren kommt in der Zelle nicht vor. Zur *de novo* Polymerisation (Nukleation) von Aktin ist ein großer Protein-Komplex aus 7 Untereinheiten nötig, der Arp2/3-Komplex (engl. Actin related proteins) (Machesky *et al.*, 1994; Svitkina und Borisy, 1999). Die Polymerisation wird initiiert, wenn dieser Komplex durch das Wiskott Aldrich Syndrom Protein (Wasp) aktiviert wird. Die eigentliche Polymerisation läuft nach dieser Initiation spontan ab und wird durch so genannte Capping-Proteine (CapZ, Gelsolin) gestoppt, die sich auf die Plusenden von F-Aktin setzen (Cooper und Schafer, 2000; DiNubile *et al.*, 1995). Eine weitere Elongation der Filamente ist nur möglich, wenn die Capping-Proteine durch geeignete Stimuli wieder abgelöst werden oder F-Aktin-Stränge durchtrennt werden. Letzterer Mechanismus wird durch Cofilin vermittelt. Es werden dabei aus dem parentalen F-Aktin Strang mehrere kürzere

Abbildung 2.2.5

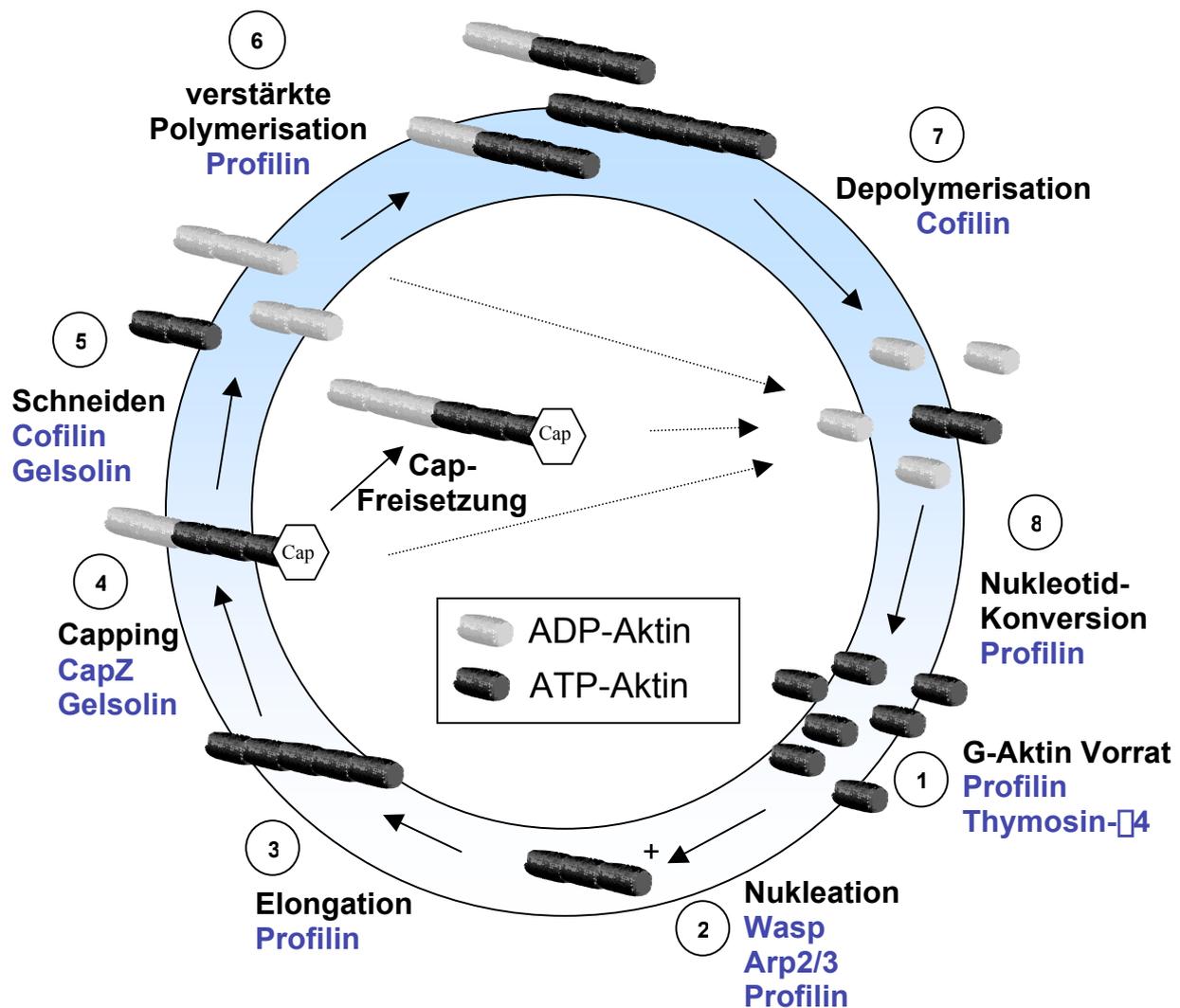


Abb. 2.2.5: Der dynamische Aktin Kreislauf

Der Kreislauf zeigt die wichtigsten Schritte während der Aktin Polymerisation und Depolymerisation. Die dunklen Aktin-Moleküle symbolisieren ATP-gebundenes Aktin, die hellen Moleküle stellen ADP-gebundenes Aktin dar (ältere F-Aktin Filamente). Blau beschriftet sind Aktin-bindende Proteine, die an den jeweiligen Schritten beteiligt sind. Das + Zeichen zeigt stellvertretend einmal das schnell wachsende Ende an. (Modifiziert nach (Samstag *et al.*, 2003))

Aktin-Filamente mit freien Plusenden produziert. Deshalb kann es wiederum zu einer verstärkten Aktin-Polymerisation kommt. Je nach Bedarf kann Cofilin aber auch zur kompletten Depolymerisation von F-Aktin führen und es damit wieder in den G-Aktin Vorrat entlassen (Chan *et al.*, 2000; Du und Frieden, 1998; Ichetovkin *et al.*, 2002; Samstag *et al.*, 2003; Zebda *et al.*, 2000). Cofilin hat eine höhere Affinität zu (ADP)-Aktin, wodurch präferenziell ältere Teile der Aktin-Filamente abgebaut werden. In anderen Worten: F-Aktin wird vom Minus-Ende her abgebaut. Die freigesetzten Aktin-Monomere sind demnach an ADP gebunden und werden von Profilin in (ATP)-Aktin konvertiert.

Dieser (ATP)-G-Aktin Vorrat wird durch Profilin und Thymosin- β 4 gebunden, wodurch der Kreislauf geschlossen ist.

2.3.2 Mehrdimensionale F-Aktin Netzwerke

Einzelne Aktin-Filamente werden in den Zellen zu komplexen, dreidimensionalen Netzwerken verbunden, die aus einfachen Verzweigungen, maschenartigen Gittern (Gele) oder rigiden Bündeln bestehen (Abb. 2.2.6). Dabei werden einfache Verzweigungen in einem Winkel von 70° durch die Bindung des Arp2/3-Komplexes an Aktin-Filamente gebildet (Urano *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001). Aktin-Gele und -Bündel werden durch so genannte „Aktin-Kreuzvernetzende Proteine“ gebildet. Diese Proteine besitzen entweder zwei Aktin-Binde-Regionen oder funktionieren als Dimer. Dadurch können je zwei Aktin-Filamente verbunden werden (Otto, 1994). Wenn die Aktin-Filamente sehr dicht und parallel angeordnet werden, spricht man von einem Bündel. Diese sind besonders stabil und an der Bildung von Zell-Ausstülpungen bzw. -Invaginationen zu finden. Daher sind sie in fokalen Adhäsionspunkten bzw. Podosomen stark angereichert. Weiterhin sind sie an Strukturen beteiligt, die die generelle Zellform, Teilung, Adhäsion, Bewegung und sogar Signaltransduktion beeinflussen (Bartles, 2000; Volkmann *et al.*, 2001). L-Plastin ist ein Aktin-bündelndes Protein der Fimbrin-Familie, dessen Expression, abgesehen von einigen nicht-hämatopoetischen Tumoren, ausschließlich auf Leukozyten beschränkt ist (Lin *et al.*, 1993). Dieses Protein wird im Folgenden genauer beschrieben.

Abbildung 2.2.6

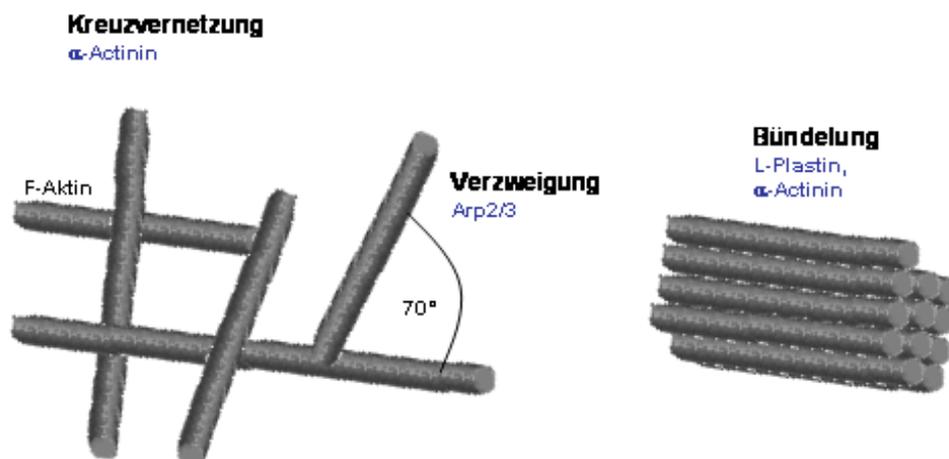


Abb. 2.2.6: Aktin Netzwerke

Die Abbildung zeigt mehrdimensionale Strukturen, die aus F-Aktin in der Zelle gebildet werden. In blau sind die für T-Zellen beschriebenen Proteine aufgeführt.

2.3.2.1 L-Plastin

L-Plastin gehört zu den Aktin-bündelnden Proteinen der Fimbrin-Familie. Fimbrine bestehen aus einer 10 kDa großen Kopf- und einer 60 kDa Kern-Domäne, die sich durch limitierten, tryptischen Verdau spalten lassen (Abb. 2.2.7) (Messier *et al.*, 1993). Die Kern-Domäne enthält die für Aktin-kreuzvernetzende Proteine typischen zwei Aktin-Binde-Regionen, die ihrerseits aus je zwei hintereinander angeordneten CH-Domänen (engl. Calponin homology) bestehen (Lin *et al.*, 1988; Zu *et al.*, 1990). Es sind drei humane Proteine der Fimbrin-Familie beschrieben, deren Expression an unterschiedliche Gewebe gekoppelt ist: I-Plastin wird von Nieren- und Darm-Epithelien, T-Plastin von allen festen Geweben und L-Plastin ausschließlich von Leukozyten gebildet. Interessanterweise bindet L-Plastin *in vitro* tatsächlich nur β -Aktin. Obwohl β - und γ -Aktin sich nur in ca. 6% von β -Aktin unterscheiden, kann bei diesem keine Bindung von L-Plastin nachgewiesen werden (Namba *et al.*, 1992). Die Bindung an Aktin ist nicht willkürlich, sondern an bestimmte Bindestellen innerhalb des Aktin-Filaments gekoppelt. Durch die Bindung eines L-Plastin Moleküls wird die Bindung eines weiteren an der gegenüberliegenden Seite des Aktin-Filaments erleichtert. Durch diese kooperative Bindung entstehen geordnete, parallele Aktin-Bündel, die eine regelmäßige Bänderung aufweisen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die L-Plastin-Aktin Bindung an die Aktin-Polymerisation gekoppelt ist (Volkman *et al.*, 2001). Es wurde in diesem Zusammenhang berichtet, dass durch die Bindung von Plastin an sehr kurze Aktin-Filamente deren Polymerisation verstärkt werden könnte (Kovar *et al.*, 2000; Volkman *et al.*, 2001). Welche Faktoren regulieren die L-Plastin-Aktin Bindung? Diese Frage lässt sich nur bedingt beantworten. In der Kopf-Domäne von L-Plastin befinden sich einige putative regulatorische Sequenzen, über deren Funktion jedoch wenig bekannt ist. Neben zwei EF-Hand Kalzium Binde-Regionen wurde eine vermutliche Calmodulin-Bindestelle und zwei Serin-Phosphorylierungsstellen ermittelt (de Arruda *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1988; Pacaud und Derancourt, 1993; Wang *et al.*, 2001). Als mögliche Phosphorylierungsstellen wurden Ser-5 und Ser-7 beschrieben. Je nach Zelltyp können beide Serin-Reste phosphoryliert werden (Lin *et al.*, 1998), wobei die Phosphorylierungsstelle in humanen T-Zellen bisher noch unbekannt war. Die Phosphorylierung kann - je nach experimentellem System - durch CD2-Stimulation, Chemokine, Fc-Rezeptor-Signale oder Phorbolster induziert werden. Ob die Phosphorylierung die Aktin-Bindung beeinflusst, ist nicht bekannt. Es wurde jedoch in adhärennten Makrophagen gezeigt, dass 5% des L-Plastins an das unlösliche Zytoskelett

al., 1998). Obwohl L-Plastin zu den 15 am stärksten exprimierten Proteinen in Lymphozyten gehört, gab es bislang noch keine Untersuchungen zur Funktion von L-Plastin in humanen T-Zellen.

2.4 T-Zell-Aktivierung und das Aktin-Zytoskelett

Bei der Aktivierung von T-Zellen kommt es zu einer massiven Polymerisation von Aktin und zur Ausbildung mehrdimensionaler Aktin-Netzwerke. Über Signal 1 wird hauptsächlich eine Aktin-Polymerisation in Gang gesetzt. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, werden durch TZR vermittelte Signale mehrere Signaltransduktionskaskaden aktiviert und deren Moleküle durch Adaptorproteine an die Zellmembran verankert. An das Adaptorprotein SLP76 bindet der Guanin-Austauschfaktor Vav (Abb. 2.2.8), der über Phosphorylierung durch Fyn und ZAP-70 aktiviert wird (Fischer *et al.*, 1998b; Valensin *et al.*, 2002). Vav kontrolliert G-Proteine der Ras-Superfamilie. Dazu gehören Rho, Rac1 und Cdc42, die über das Aktin-Zytoskelett die Zellform beeinflussen: Rho reguliert die Formation von Stress-Fasern, Rac1 induziert kleine Membran-Ausstülpungen (Lamellipodien) und Cdc42 größere filopodienartige Ausstülpungen (Fischer *et al.*, 1998a). Zusätzlich aktiviert Cdc42 über Wasp (Kenney *et al.*, 1986; Rivero-Lezcano *et al.*, 1995) den Arp2/3-Komplex. Wasp wird in unstimulierten Zellen durch eine cis- oder trans-Bindung zweier eigener Regionen in einem inaktiven Zustand gehalten. Über Bindung an das Adaptorprotein Nck wird Wasp an die Membran rekrutiert. Cdc42 löst dort die Autoinhibition (Cannon *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000). Als Konsequenz wird der Arp2/3-Komplex an der Zellmembran in räumlicher Nähe des TZR aktiviert und sorgt somit für eine gerichtete Polymerisation von Aktin. Die entstehenden Aktin-Filamente werden an der Plasma-Membran über Membran-Ankerproteine fixiert. Zwei dieser Membran-Anker, Talin und Vinculin, binden auch an das bereits erwähnte Vav Protein (Fischer *et al.*, 1998a).

Für die komplette Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sind zusätzlich kostimulatorische Signale notwendig. Die genauen molekularen Mechanismen hierfür sind jedoch kaum erforscht. Ein Kandidat, der die Kostimulation mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet, ist das 19 kDa-Protein Cofilin (Eibert *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000). Durch dieses Protein kann die Aktin-Polymerisation einerseits verstärkt werden, andererseits können ältere, nicht mehr

Abbildung 2.2.8

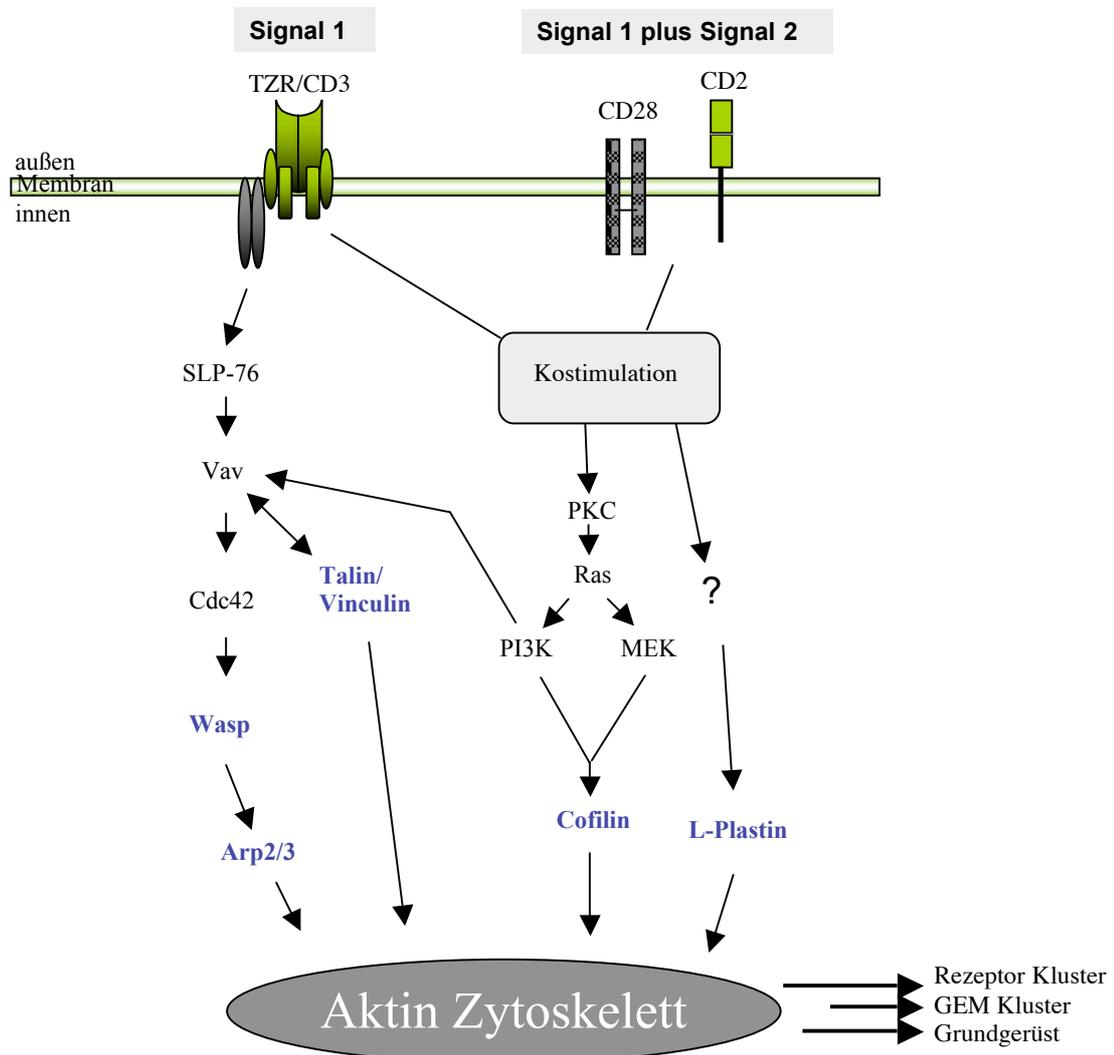


Abb. 2.2.8 Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett

Signal 1 über den TZR führt zu Aktivierung von Aktin-bindenden Proteinen, die zur Polymerisation des Aktin Zytoskeletts beitragen. Alle Aktin-bindenden Proteine sind in blau geschrieben. Nach Kostimulation (Signal 1 plus Signal 2) werden andere Aktin-Reorganisierende Proteine modifiziert, die zur verstärkten Polymerisation und Depolymerisation (Cofilin) bzw. zur Aktin Bündelung (L-Plastin) führen. Das Aktin Zytoskelett ist maßgeblich am Klustern von GEMs und Rezeptoren beteiligt und bietet ein Grundgerüst für die Signaltransduktion (Review s. Samstag et al., 2003).

benötigte Aktin-Filamente, abgebaut werden. Ein weiteres potentiell wichtiges Protein in diesem Zusammenhang ist L-Plastin, das durch reine mitogene Stimulation des akzessorischen Rezeptors CD2, jedoch nicht über den TZR alleine phosphoryliert wird (Henning *et al.*, 1994). Studien zur Funktion von L-Plastin in T-Zellen wurden bislang nicht durchgeführt und sind Gegenstand dieser Arbeit.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Aktin-Zytoskelett stellt eine zentrale Schaltstelle in der Aktivierung von T-Zellen dar. Dazu zählen einerseits die Antigen-abhängige Aktivierung und die damit verbundenen Signaltransduktionsprozesse und andererseits die Zell-Polarisation, Adhäsion und Migration. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob das Aktin-bündelnde Protein L-Plastin für die Aktivierung von primären, humanen T-Zellen bedeutsam ist. Zunächst war von Interesse, ob (und wenn ja an welchen Aminosäuren) L-Plastin nach klassischer Kostimulation phosphoryliert wird. Weiterhin sollte ein System etabliert werden, in dem die Kontaktzone zwischen primären PBT und APZ untersucht werden kann. In diesem System sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich L-Plastin in frühen und/oder reifen Immunologischen Synapsen anreichert und ob es die Ausbildung von Rezeptor-Klustern beeinflusst. Weiterhin sollte der Einfluss einer Phosphorylierung auf die Funktion und subzelluläre Lokalisation von L-Plastin analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Bezeichnung	Beschreibung
primäre Zellen (PBT und PBMC)	s. Kap. 2.2.2.1
Raji	Burkitt Lymphom B-Zellen

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primäre Antikörper

Beschreibung: D = Durchflußzytometrie, IF = Immunofluoreszenz, C = Clusterbildung, S = Stimulation, mk = monoklonal, pk = polyklonal, M = Maus, K = Kaninchen, WB = Western Blot, FITC/PE/PerCP/APC = Fluoreszenzfarbstoffe, in Klammern sind die jeweiligen Klonbezeichnungen angegeben

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
Anti-Aktin	pk, K, (A2066)	WB 1/600	Sigma
Anti-CD14	mk, M, (RMO42), FITC, APC, PE	D 1:6,25	Coulter Immunotech
Anti-CD16	mk, M, (DJ130c), PE	D 1:6,25	Dako
Anti-CD19	mK, M, (SJ25C1), PerCP	D 1:6,25	BD Bioscience
Anti-CD1a	mk, M, (HI149), FITC	D 1:25	BD Bioscience
Anti-CD2	mK, M, IgG1, (3PT2H9)	S 10 µg/ml C 15 µg/ml	Schlossman, Dana Faber Cancer Institute, Boston U.S.A
Anti-CD2	mK, M, (M1)	S 10 µg/ml	(Meuer <i>et al.</i> , 1984a)
Anti-CD2	mK, M, (M2)	S 10 µg/ml	(Meuer <i>et al.</i> , 1984a)
Anti-CD28	mk, M, IgG1, (CD28.2)	S 10 µg/ml C 15 µg/ml	BD Bioscience

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
Anti-CD28	mk, M, (L293)	S 1 µg/ml	BD Bioscience
Anti-CD3	mk, M, (BMA030)	S 1 µg/ml	R. Kurrle, Behringwerke, Marburg
Anti-CD3	mk, M, (OKT3)	S 1 µg/ml C 15 µg/ml	ATCC, Manassas, VA, U.S.A
Anti-CD3	mk, M, (SK7), APC, PE, PerCP, FITC	D 1:12,5	BD Bioscience
Anti-CD40	mk, M, (5C3), FITC	D 1:6,25	BD Bioscience
Anti-CD45RO	mk, M, PE	D 1:12,5	BD Bioscience
Anti-CD49d	mk, M, (9F10),	S 1 µg/ml	BD Bioscience
Anti-CD56	mk, M, FITC	D 1:6,25	BD Bioscience
Anti-CD69	mk, M, (L78)	D 1:10	BD Bioscience
Anti-CD80	mk, M, (BB-1), PE	D 1:12,5	Cymbus Biotechnology LTD
Anti-CD83	mk, M, PE	D 1:10	BD Bioscience
Anti-CD86	mk, M, (IT2.2), PE	D 1:10	BD Bioscience
Anti-CTB	mk, M	C 10 µg/ml	Calbiochem
Anti-HLA-DR	mk, M, (B8.12.2), FITC	D 1:10	Coulter/ Immunotech
Anti-IFN- γ	mk, M, (4S.B3), FITC	D 1:50	BD Bioscience
Anti-Lck	mk, M, (3A5)	WB 1:600	Santa Cruz
Anti-L-Plastin	pk, K	WB 1/10.000 IF/D 1/500	eigenes Labor

3.1.2.1 Sekundäre Antikörper

Beschreibung: IF = Immunofluoreszenz, C = Rezeptorcaps, S = Stimulation, pk = polyklonal, Z = Ziege, E = Esel, WB = Western Blot, Cy2, Cy3 = Fluoreszenzfarbstoffe, POX = Peroxidase

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
Anti-Maus IgG + IgM	pk, Z	S 7 µg/ml	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG	pk, Z, Cy3	C 1,5 µg/ml IF 1,5 µg/ml	Dianova
Anti-Kaninchen IgG	pk, E, Cy2, Cy5	IF 7,5 µg/ml	Dianova

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
Anti-Kaninchen IgG	pk, E, Cy3	IF 1,5 µg/ml	Dianova
Anti-Kaninchen IgG	pk, Z, POX	WB 1:10.000	Dianova
Anti-Maus IgG	pk, Z, POX	WB 1:10.000	Dianova

3.1.3 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pEGFP-N1	Vektor mit einer GFP-Variante und der MKS N-Terminal davon; Kan ^r /Neo ^r ; pUC Ori; P _{CMV IE}	BD Bioscience
pEGFP-wt-LPL	pEGFP-N1 Derivat mit wildtyp L-Plastin als EGFP-Fusionsprotein über <i>EcoRI</i> und <i>BamH1</i> kloniert	eigenes Labor
pEGFP-5A-LPL	pEGFP-wt-LPL Derivat mit einer Mutation: Serin 5 (tca) zu Alanin (gca)	eigenes Labor
pEGFP-5E-LPL	pEGFP-wt-LPL Derivat mit einer Mutation: Serin 5 (tca) zu Glutaminsäure (gaa)	eigenes Labor
pEGFP-wt-hLPL	pEGFP-N1 Derivat mit L-Plastin Kopf-Domäne (AS 1-120 = hLPL) als EGFP-Fusionsprotein über <i>BamH1</i> kloniert	eigenes Labor
pEGFP-5A-hLPL	pEGFP-wt-hLPL Derivat der L-Plastin Kopf-Domäne mit einer Mutation: Serin 5 (tca) zu Alanin (gca)	eigenes Labor

Alle cDNA-Konstrukte wurden vor der Verwendung durch Sequenzierung überprüft

3.1.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
GFP for	ggc gtg tac ggt ggg agg
GFP rev	cgt cgc cgt cca gct cga c
LPL-1	gga ttt gtg caa tcg gtg g

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
LPL-3	gca tgc tgc agc agg cgg ag
LPL-4	cta cgc ggt aga att ggg

3.1.4 Medien

Vollmedium

RPMI 1640 mit 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES (alles von Gibco Invitrogen, Karlsruhe) und 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS; PAN-Biotech, Aidenbach)

Waschmedium

RPMI 1640 mit 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES (alles von Gibco Invitrogen, Karlsruhe) und 2% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS; PAN-Biotech, Aidenbach)

Phosphatfreies Medium

25 mM Hepes, 1x „Mem Aminosäuren“, 1x „Nicht essentielle Aminosäuren“, 1 mM Natrium-Pyruvat, 0,2% Natriumhydrogenkarbonat, 1x „Mem Vitamine“ (alles von Gibco), 0,2% BSA (Sigma), 0,007% β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt), 10 mg/ml Gentamycin (Sigma), 1x „RL-Salzlösung“ (s.u.)

10x RL-Salzlösung

1,3 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 g KCl, 1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 32 g NaCl, 10 g Glukose, 84 mg Phenolrot (alles von Merck, Darmstadt)

LB-Medium

Bacto-Tryptone (10 g/l), Bacto Hefe-Extrakt (5g/l) (beides Difco), NaCl (10 g/l – GibcoBRL), auf pH 7,5 mit NaOH eingestellt.

Für Agarplatten 15 g/l Agar in LB-Medium lösen.

3.1.5 Puffer und Reagenzien

FACS-Puffer

500 ml PBS werden 25 ml filtriertes, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 2,5 g BSA und 3,5 ml 10% NaN₃ zugesetzt.

Paraformaldehyd (12%)

12 g Paraformaldehyd in 90 ml Millipore Wasser mit einem Tropfen NaOH versetzten und bei 62°C unter Rühren lösen. Auf RT abkühlen lassen, 10 ml 10x PBS, 10 µl 1 M CaCl₂, 100 µl 1 M MgCl₂ zugeben, filtrieren und bei 4°C lagern.

Mowiol 4-88 Eindeckelmedium

6 g Glycerin mit 2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem) mischen, 6 ml Millipore Wasser zugeben und 2 h bei RT schütteln. 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5 zugeben und bei 53°C mehrere Stunden Schütteln, bis das Mowiol gelöst ist. Anschließend bei 5000 UpM für 20 Min. zentrifugieren und den klaren Überstand in Aliquots bei -20°C lagern.

TBS (10x)

1,5 M NaCl, 500 mM Tris/HCl pH 7,3-7,4

PBS

Dulbecco's PBS Fertigpulver ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrome, Berlin)

PBS/Mg/Ca

PBS mit 0,9 mM CaCl₂ und 0,49 mM MgCl₂ (Biochrome)

Trypanblau Lösung

1,6 g/l Typanblau, 8,5 g/l NaCl

Probenauftragungspuffer für SDS-Gele (3x)

190 mM Tris/HCl pH 6,8, 6% SDS, 30% Glycerin, 0,15 M DTT, 0,03% (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer für SDS-Gele (3x)

250 mM Tris, 1,29 M Glycin, 1% SDS

3.1.6 Chemikalien und Materialien

Acrylamid 30%/Bisacrylamid 0,8%	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Ampholine pH 3,5-9,5	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ampholine pH 6-8	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ampholine pH 3,5-10	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Brefeldin A	Sigma, München
Bromphenol Blau	Merck, Darmstadt
Bromphenacyl bromid	Sigma, München
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
CHAPS	Sigma, München
Coomassie brilliant blue R	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Eisessig	J.T.Baker, Deventer, Holland
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
ECL, RPN 2106	Amersham, Braunschweig
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	GibcoBRL, Karlsruhe
³ H-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Iodoacetamid	Sigma, München
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Glücksklee, Frankfurt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, München

□-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichts-Marker (Rainbow RPN 800)	Amersham, Braunschweig
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, München
Natrium-Fluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Natrium-Vanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
PMA	Sigma, München
Propidiumjodid	Sigma, München
PVDF-Membran	Millipore, Bredford, U.S.A
SEB	Sigma, München
SEF	Sigma, München
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
TEMED	Biorad, München
Thio-Harnstoff	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Tween-20	Gerbu, Gaiberg
3MM Whatman Papier	Whatman, Maidstone, UK
VE-Wasser	Universität Heidelberg
X-ray Film (Biomax MR)	Kodak, Rochester, U.S.A.

3.1.7 Geräte und Laborausstattung

Axiovert 200M - Mikroskop	Zeiss, Benzheim
Autoklav	Wedeco, Düsseldorf
Beta-Counter LS1701	Beckman, Fullerton, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot Apparatus 2117 Multiphor II	Pharmacia, Uppsala, Schweden

(semi-dry)	
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Cool Snap HQ - Videokamera	Visitron
DMRBE mit TCS NT - Software	Leica, Bensheim
Filmkassette	Suprema
Filmentwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Flow cytometer LSR	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophorese Kammer (Protean II Cell)	BioRad, München
Minigelkammer (Mini-Protean II)	BioRad, München
Mikroskop ID 03	Zeiss, Jena
pH-Meter 240	Corning, New York, USA
Pipetten: Multistepper	Eppendorf, Köln
Pipet boy	TecNoMara, Fernwald
P2, P20	
P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Scanner: GS800	BioRad, München
Spannungsquelle 23023 Multidrive XL	Pharmacia/LKB
Thermomixer 5436	Eppendorf, Köln
Vortex MS1	IKA, Staufen
Zentrifugen:	
Megafuge 3,0 RS	Heraeus, Hanau
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Sigma 2K15 C	Sigma, Osterode
Zellerntegerät (Tomtec)	Perkin Elmer, Freiburg

3.1.8 Zellkulturmaterial

Adapter für S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Butterfly-21	Venisystems, Sligo, Irland
Ficoll-Hypaque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, München
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe

Heparin 25000 I.E./5 ml	Braun, Melsungen
HEPES	GibcoBRL, Karlsruhe
Luer-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Penizillin-Streptomycin	GibcoBRL, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
Schafserythrozyten (SRBC)	ICN Biomedicals, Eschwege
Spritzen (50 ml) Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg
Plastikmaterial	Greiner, Nürtingen
	Nunc, Wiesbaden

3.1.9 Software und Datenbanken

Software

Microsoft Office Paket, Adobe Photoshop 6.0, GraphPad Prism, Metamorph 4.6r9, TCS NT, ISI ResearchSoft EndNote 4

Internet-Datenbanken und Software-Pakete

Expasy-Paket (SwissInstitute of Bioinformatics) – (<http://www.expasy.org>), NCBI-Paket mit PubMed – (<http://www.ncbi.nih.gov>), BioDaten – (<http://www.biodaten.de>), Sequence Retrieval System – (<http://srs.ebi.ac.uk/>)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid DNA

Die zur Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendete Plasmid-DNA wurde in *E. coli* Dh5 α propagiert. Zur Plasmidproduktion wurden 150 ml Bakterienkultur hergestellt. Dem Kulturmedium wurde entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz ein Antibiotikum zugesetzt (Kanamycin 30 $\mu\text{g/ml}$). Die Bakteriensuspension wurde \ddot{u} N bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mittels des „Plasmid Maxi Kit (25)“ von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 100 μl Millipore-Wasser aufgenommen und die Konzentration und Reinheit mit Hilfe eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei 260 und 280 nm bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Millipore-Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert. Typischerweise war die Ausbeute 300 – 500 μg DNA.

3.2.1.2 Sequenzierung von DNA

Vor der Verwendung in Experimenten wurde die korrekte Basenabfolge der Plasmid-DNA durch Sequenzierung verifiziert. Dazu wurden 0,5 μg DNA in einem PCR-Reaktionsgefäß (MicroAmp) mit 5 pmol Sequenzierprimer und 5 μl „Terminator Ready Reaction Mix“ („ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit“, Applied Biosystems) gemischt. Die Amplifikation erfolgte mit 25 Zyklen im „GeneAmp PCR System 2400“ (Perkin-Elmer). Innerhalb jedes Zyklus wurde für 10 Sek. bei 95°C, 5 Sek. bei 50°C und 4 Min. bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA im 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Zugabe von 80 μl Millipore-Wasser, 10 μl Natriumazetat (Stock: 3 M, pH 4,6) und 220 μl 100%igem Ethanol für 10 Min. bei RT gefällt. Danach wurde 30 Min. bei 21.000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet 2x mit 250 μl 70%igem Ethanol gewaschen, d.h. 5 Min. bei 21.000 g in 70%igem Ethanol zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 37°C für 5 Min. getrocknet und in 12 μl Millipore-Wasser aufgenommen, für 2 Min. bei 95°C denaturiert und in Sequenziergefäße („Genetic Analyzer 0,5 ml Sample Tubes“ mit Septa, Applied Biosystems) überführt. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in einem Sequenzierautomaten („PE ABI Prism 310 Genetic Analyzer“, Perkin Elmer) mit dem Polymer POP6 nach Angaben des Herstellers.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Im Folgenden wird der Umgang mit eukaryotischen Zellen in dieser Arbeit beschrieben. Die Kulturbedingungen bei 37°C erfolgten - soweit nicht anders deklariert - in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) mit feuchter Luft und einer Atmosphäre, die mit Kohlendioxid (5% CO₂) angereichert war. Für Zellsedimentationsschritte wurde eine Kühlzentrifuge (4°C) von Heraeus (Minifuge T) verwendet, wobei ein Waschschrift die Sedimentation der Zellen bei 1200 UpM für 10 Minuten und anschließendes Dekantieren des Überstandes bedeutet.

3.2.2.1 Zellkultur

3.2.2.1.1 Isolierung primärer hämatopoetischer Zellen

Primäre hämatopoetische Zellen wurden aus heparinisiertem Vollblut von freiwilligen, nach eigenen Angaben gesunden Spendern beider Geschlechter gewonnen. Der überwiegende Teil der Spender gehörte der Altersgruppe von 25 bis 35 Jahren an.

3.2.2.1.1.1 Periphere Blut Mononukleäre Zellen (PBMC)

Primäre PBMCs (im Wesentlichen Monozyten, NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten, selten Granulozyten-Verunreinigungen) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation von frischem heparinisiertem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Zunächst wurde das Blut in Aliquots zu 20 ml in je ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 15 ml Kulturmedium verdünnt. Zur Dichtegradientenbildung wurde mit 15 ml Ficoll-Hypaque (Linaris, Wertheim-Bettingen) unterschichtet und bei 2500 UpM (Bremse und Beschleunigung 1) für 20 Minuten bei RT zentrifugiert. PBMCs erschienen darauf als weißer Ring auf dem Ficoll-Gradienten, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentierten. Die PBMCs wurden in ein neues Greiner-Röhrchen überführt, dieses mit Waschmedium aufgefüllt und die PBMCs mit 1800 UpM für 15 Min. sedimentiert. Anschließend wurden sie weitere 3-mal mit Waschmedium durch Zentrifugation (1200 UpM für 10 Minuten bei 4°C) gewaschen, um Ficollreste und Blutplättchen zu entfernen. Auf diese Weise standen aus 500 ml Vollblut je nach Spender zwischen 800 und 1200 Mio. PBMCs zur Verfügung. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer, wobei die Zellen 1:10 mit 2% Essigsäure verdünnt wurden.

3.2.2.1.1.2 Periphere Blut T Lymphozyten (PBT)

T-Lymphozyten wurden aus PBMCs durch Monozyten-Depletion mittels Plastikadhärenz und anschließender Rosettierung der T-Zellen durch Schafserythrozyten (ICN Biomedicals, Eschwege) gewonnen. Auf 15 cm Zellkulturschalen (Nunc) wurden die PBMCs mit einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ ml in 50 ml Vollmedium pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit adhäreren die Monozyten an die Plastikschalen und werden auf diese Weise aus der Zellsuspension depletiert. Die Suspensionszellen (Periphere Blut Lymphozyten, PBL) wurden anschließend abgenommen und einmal mit Waschmedium gewaschen. Zur Rosettierung mit Schafserythrozyten wurden je 50 Mio PBLs in 13 ml Vollmedium in ein 50 ml Greiner Röhrchen pipettiert und 2 ml Schafserythrozyten (1%), die zuvor in Vollmedium gewaschen wurden, zugegeben. Das Zellgemisch wurde bei 700 UpM für 5 Minuten bei RT sedimentiert und 45 Min. bei RT inkubiert, wobei das T11TS-Molekül der Schafserythrozyten an CD2-Moleküle der T- und NK-Zellen bindet. Anschließend wurde das Zell-Sediment durch Drehen des Röhrchens in Suspension gebracht und mit 15 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet. Die Dichtezentrifugation erfolgte in zwei Schritten (Beschleunigung 5, 1000 UpM, Bremse 1, 20 Min bei 24°C und Beschleunigung 5, 1800 UpM, Bremse 1, 20 Min bei 24°C), wodurch die T- und NK-Zellen zusammen mit den Schafserythrozyten sedimentiert wurden, wogegen die B-Zellen in einem Ring über dem Ficoll-Hypaque erschienen. Dieser wurde zusammen mit dem gesamten Überstand abgesaugt und die Zellsedimente aller Röhrchen in 50 ml ACK Lysepuffer (0,15 M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH 7,28) resuspendiert (Erythrozytenlyse). Die verbleibenden Zellen bestehen aus T-Zellen und NK-Zellen und werden als E-Rosettierungspositive Zellen (E-plus) bezeichnet. Die E-plus wurden dreimal mit Vollmedium gewaschen und die Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau und einer Neubauer Zählkammer festgestellt. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium (2-3 Mio/ ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde in regelmäßigen Abständen die Reinheit durch eine Lymphozyten- und Monozytenfärbung geprüft (Kap. 3.2.2.8.1.1). Typischerweise konnten keine B-Zellen und nur sehr wenige Monozyten (~1 %) nachgewiesen werden. Der Anteil an NK-Zellen schwankte zwischen 5 und 10 % der Zellen.

3.2.2.1.1.3 T-Zell Subpopulationen (CD45RA/CD45RO)

Naive und Gedächtnis T-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Sester zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wird daher nur das Isolierungsprinzip erläutert:

Die Reinigung erfolgte mittels Negativ-Selektionierung aus PBMCs mit Hilfe eines AutoMACS (Miltenyi Biotec, Gladbach). Bei dieser Methode werden unerwünschte Zellen mit Antikörpern (Hapten-Antikörper) markiert, die anschließend mit Magnetpartikeln, die Anti-Hapten-Antikörper tragen, beladen werden. In einem starken Magnetfeld können diese beladenen Zellen zurückgehalten werden und die Zielzellen gehen ungehindert hindurch.

Die Separierung der CD45RA- und CD45RO-Subpopulationen aus den PBMCs erfolgte jeweils in einem einzigen Schritt: Die Zellen wurden in zwei Ansätzen mit Antikörpern gegen CD45RA oder CD45RO markiert, die bereits an magnetische Mikropartikel gebunden waren („CD45RA MicroBeads™“ oder mit „CD45RO MicroBeads™“). Zur Reinigung wurden zusätzlich alle nicht-T-Zellen (NK-, B-Zellen und Monozyten) mit Antikörpern aus dem „Hapten-Antibody Cocktail“ des „Pan T cell Isolierung kits™“ markiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit Anti-Hapten Antikörper tragenden Magnetpartikeln inkubiert, damit die Hapten-Antikörper-tragenden Zellen, d.h. die nicht-T-Zellen, magnetisch markiert wurden. Die Trennung der markierten von den nicht markierten Zellen erfolgte darauf unter Verwendung eines AutoMACS. Dabei wurde die Isolierung in den Magnetsäulen jeweils im negativen Modus durchgeführt („Deplete-Modus“), d.h. CD45RA-positive T-Zellen wurden durch die Abtrennung von CD45RO-positiven T-Zellen gewonnen und umgekehrt. Dadurch waren sie nach der Isolierung in einem unstimulierten Zustand und Kontaminationen von doppelt positiven Zellen (CD45RA- und CD45RO-positiv) wurden minimiert. Die isolierten Zellen wurden anschließend gewaschen und die Reinheit durchflußzytometrisch ermittelt. Typischerweise wurde eine Reinheit von $\geq 95\%$ erzielt.

3.2.2.1.2 Kultivierung und Gefrierkulturen von Lymphoma Zelllinien

Die Lymphoma Zelllinien Raji (B-Lymphoma) und Jurkat (T-Lymphoma) wurden mit einer Zelldichte zwischen 5×10^4 und 5×10^5 Zellen/ ml in Zellkulturflaschen (Nunc) kultiviert. Die Zellen wurden in Vollmedium vermehrt und 2-mal pro Woche 1:5 mit Vollmedium verdünnt. Die Zellzahl und -vitalität wurde mittels einer Neubauer Zählkammer (Brand) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt und ein Großquadrat ausgezählt (\Rightarrow Zellzahl/ ml = gezählte Zellzahl x Verdünnungsfaktor (hier: 2) x 10^4).

Zur Langzeitlagerung wurden Gefrierkulturen in FKS/ 10% DMSO angelegt. Dazu wurden 5 Mio. Zellen in 0,5 ml kaltem FKS aufgenommen und sofort mit 0,5 ml kaltem FKS/ 20% DMSO versetzt, in ein Kryo-Röhrchen (Nunc) überführt und für mind. eine Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei -70°C gelagert und zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen bei RT aufgetaut und der Inhalt in 50 ml warmes Vollmedium überführt. Nach anschließendem Waschen in Vollmedium wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

3.2.2.2 Zellstimulation

Hämatopoetische Zellen wurden entweder über Antikörper, mit Phorbolestern oder antigenpräsentierende Zellen (s.3.2.2.6) stimuliert.

3.2.2.2.1 Antikörperstimulation

Die Antikörper wurden über Spezies-spezifische Zweit-Antikörper (Ziege Anti-Maus IgG und IgM, Dianova, Hamburg) an Nunc Maxisop Flachboden Platten verschiedenen Formats gekoppelt (96 Loch, 50 µl; 48 Loch, 200 µl; 24 Loch, 500 µl). Die Zweit-Antikörper wurden in PBS bei 4°C über Nacht angelagert. Die Vertiefungen wurden danach mit PBS/1% BSA gewaschen und freie Bindestellen wurden durch Inkubation mit PBS/1% BSA für 2 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurden die spezifischen Erst-Antikörper in unten angegebenen Konzentrationen (Tab. 3.2.1) über Nacht bei 4°C in PBS/ 1% BSA gekoppelt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit Vollmedium entfernt. Zur Stimulation wurden die Zellen gewaschen und in einer Zell-Konzentration von 3 Mio./ ml (1,3 Mio./cm²) in die Vertiefungen der Platten gegeben und mit 1500 UpM für 5 Min. zentrifugiert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C für 30 Min., wenn nicht anders angegeben. Zum Abstoppen der Stimulation wurden die Nunc-Platten auf Eis gestellt und die Zellen in 15 ml Greiner-Röhrchen auf Eis überführt. Die einzelnen Löcher wurden mit PBS/0,5% BSA/ 0,2 mM EDTA nachgespült, bis unter mikroskopischer Kontrolle keine Zellen mehr auf den Platten klebten.

Eine weitere Art der mitogenen Antikörperstimulation erfolgte mit drei Antikörpern gegen unterschiedliche CD2-Epitope (alternativer Weg). Dabei wurden die Antikörper (M1, M2 und

3PT2H9) in einer Konzentration von 10 µg/ml (ohne Kreuzvernetzung) zu den Zellen (3 Mio/ml) gegeben und für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Stimulation	Sekundäre Antikörper (Ziege Anti Maus IgG und IgM)	Primäre Antikörper
unstimuliert	1/250	-
CD3	1/250	BMA030 1µg/ml oder OKT3 1µg/ml
CD3xCD2	1/250	BMA030 1µg/ml plus 10µg/ml 3PT2H9
CD3xCD28	1/250	BMA030 1µg/ml plus 10µg/ml CD28.2
CD2 (alternativer Weg)		M1 10 µg/ml plus M2 10 µg/ml plus 3PT2H9 10 µg/ml

Tab. 3.2.1 Antikörperstimulation

In der Tabelle sind die verwendeten Antikörper sowie die benutzten Konzentrationen der jeweiligen Stimulation angegeben.

3.2.2.2 Phorbol ester Stimulation

Zur Stimulation mit dem Phorbol Ester PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat) wurden die Zellen gewaschen und mit Vollmedium auf eine Konzentration von 3 Mio Zellen/ 900 µl eingestellt. Anschließend wurden 100 µl einer PMA Vorverdünnung (10^{-7} M) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10^{-8} M PMA erreicht wurde. Die Stimulation erfolgte bei 37°C für 30 Min. und wurde auf Eis abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend bei 1.500 UpM für eine Min. sedimentiert und einmal mit eiskaltem PBS/ 0,5% BSA/ 0,2 M EDTA gewaschen.

3.2.2.3 Lysatpräparation (postnukleäre Lysate)

Zur Lyse wurden die Zellen mit PBS/ 0,5% BSA in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 600 g für 5 Min. bei 4°C sedimentiert. Nachdem der Überstand vollständig abgenommen war wurde erneut bei 600 g für 15 Sekunden zentrifugiert um den Überstand quantitativ zu entfernen. Die Lyse erfolgte mit 5 µl/ 1 Mio. Zellen TKM Lysepuffer (1% Nonidet P-40 (Sigma, Taufkirchen,)), 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 5 mM NaF, 5 mM MgCl₂, 1 mM Natriumvanadat (Merck, Darmstadt), 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Aprotinin (Sigma)) auf Eis für 30 Min.. Zelltrümmer und Zellkerne wurden durch 15-minütige Zentrifugation mit

21.000 g bei 4°C entfernt und der klare Überstand als postnukleäres Lysat verwendet bzw. bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.4 Nukleofektion primärer T-Zellen

Zur Transfektion von PBT wurde das Elektroporationssystem von AMAXA mit dem „Human T Cell Nucleofector™ Kit“ verwendet. Dieses System erlaubt das direkte Einbringen von DNA in den Zellkern. Die Nukleofektion wurde mit einigen Änderungen im Wesentlichen aber nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 10 Mio. PBT einmal mit 10 ml PBS bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl „Nucleofector Solution™“ aufgenommen, mit 1 µg (pEGFP) bis 5 µg (pEGFP-LPL) DNA gemischt und mit Programm U14 elektroporiert. Die Zellen wurden sofort in 3 ml Vollmedium überführt und bis zur Verwendung bei 37°C inkubiert. Eine Proben-Expression ist bereits 2 Stunden nach Elektroporation nachzuweisen. Sie steigt anschließend weitere 6 h an und bleibt über mehrere Tage stabil. Die Abbildung 3.2.1 zeigt eine typische durchflußzytometrische Auswertung 16 h nach der Elektroporation von PBT mit dem AMAXA Nucleofector™ System. Die Transfektionseffizienz liegt bei 47% der Zellen ($TI^2 = 5839$), wenn EGFP alleine exprimiert wird. Wenn das verkürzte L-Plastin-Konstrukt (hLPL) verwendet wird, ist ein grüne Fluoreszenz in 36% der lebenden Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 130 nachzuweisen ($TI = 4701$). Wird das vollständige L-Plastin-EGFP Konstrukt (LPL) exprimiert, sinkt die Transfektionseffizienz auf 16% mit einer MFI für GFP von 20 ($TI = 332$). Diese Expression ist ausreichend zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflußzytometrie aber weniger geeignet für biochemische Analysen. Daher wurden für 2D-Western Blot Analysen hauptsächlich die kurzen Kopf-Domäne-Konstrukte (hLPL-GFP) verwendet.

² TI = Transfektions-Index; s. Abbildung 3.2.1

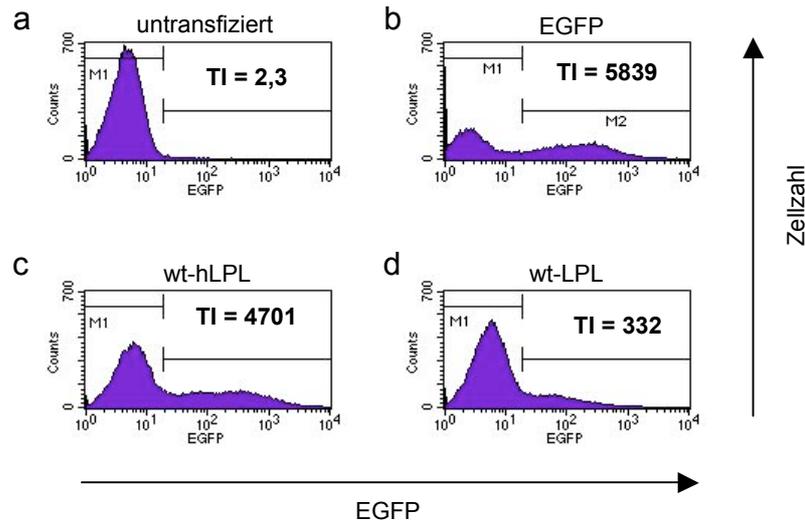


Abb. 3.2.1 Nukleofektion von PBT

Die Abbildung zeigt in Histogrammen die Expression von EGFP 20 Stunden nach Nukleofektion. Die Transfektions-Effizienz spiegelt sich zum einen in der Anzahl (in Prozent) und zum anderen in der Expressionshöhe (MFI) der positiven Zellen wieder. Um in einer einzigen Kennzahl die Transfektions-Effizienz darstellen zu können, wird in dieser Arbeit der Transfektions-Index als Produkt aus Anzahl der positiven Zellen und Expressionshöhe ($TI = \%positive\ Zellen \times MFI$) verwendet. Es werden weiterhin nur lebende Zellen ausgewertet, d.h. der Transfektions-Index bezieht sich auch nur auf diese. Zur Transfektion wurde EGFP alleine (47,75%; MFI = 122,3; TI = 5839) oder an L-Plastin-Konstrukte gekoppelt verwendet. Das wt-hLPL Konstrukt (36,14%; MFI = 130,09; TI = 4701) umfasst dabei die 10 kDa Kopf-Domäne, während wt-LPL (16,19%; MFI = 20,51; TI = 332) das komplette Protein beinhaltet. Die Autofluoreszenz untransfizierter Zellen lag bei 0,46%; MFI = 5,1; TI = 2,3.

3.2.2.5 Induktion von Rezeptor Klustern

3.2.2.5.1 Rezeptor-Caps

Rezeptor-Caps wurden durch Inkubation von PBT mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle und anschließende Kreuzvernetzung dieser Antikörper induziert. Dazu wurden PBT in RPMI 1640 (ohne FKS) gewaschen und anschließend auf Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgetragen (4×10^4 in $10\ \mu\text{l}$). Die Adh'sionszeit betrug 15 Min.. Darauf wurden nicht abgesättigte Bindestellen mit Fisch-Gelatine (0,2% in PBS) blockiert (15 Min. bei RT) und die Zellen weitere 15 Min. mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 alleine ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in Vollmedium) bzw. in Kombination mit CD2 oder CD28 (je $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in Vollmedium) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Vollmedium folgte eine Kreuzvernetzung mit Cy2 bzw. Cy3 markierten sekundären Antikörpern ($1,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in Vollmedium) über 30 Min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Facs-Puffer gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd fixiert (30 Min.

bei RT). Danach wurden sie mit 0,25% Triton X100 in Facs-Puffer permeabilisiert (10 Min. bei RT) und anschließend mit spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörpern in Facs-Puffer gegen intrazelluläre Zielmoleküle, z.B. L-Plastin, 15 Minuten. inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden sie für weitere 15 Min. mit einem Sekundär-Antikörper (z.B. Anti-Kaninchen Cy2 oder Cy5, je 1:100 in Facs-Puffer) inkubiert. Die Adhäsionsobjektträger wurden anschließend zweimal mit Facs-Puffer, ein weiteres mal mit Millipore Wasser gewaschen und mit 180 µl MOWIOL 4-88 und Deckgläschen verschlossen. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Visualisierung erfolgte durch Laserscan-Mikroskopie.

3.2.2.6 Zell-Zell-Konjugate

Für die Untersuchung von B/T-Zell Konjugaten wurden Raji Lymphoma B-Zellen und PBT verwendet. Die Analyse erfolgte je nach Fragestellung mittels Durchflußzytometrie, konfokalen LSM oder Videomikroskopie. Unabhängig von der Anwendung wurden zunächst B-Zellen mit Superantigenen, *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin F (SEF), beladen. Dazu wurden die Zellen gewaschen, in Vollmedium in einer Zellkonzentration von 4 Mio. Zellen/ ml resuspendiert und die Superantigene, SEB und SEF (je 5 µg/ ml), zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen in 20 ml Serum freiem Medium gewaschen und in einem entsprechenden Volumen resuspendiert.

3.2.2.6.1 Durchflußzytometrische Analyse von Zellkonjugaten

Unbeladene (Raji) bzw. Superantigen-tragende (Raji^{SAg}) B-Zellen (5×10^5 in 250 µl RPMI) wurden in je ein FACS-Röhrchen (BD Bioscience, Heidelberg) gegeben. Anschließend wurden 5×10^5 PBT (250 µl RPMI) zugegeben und 5 Min. bei 1.100 UpM zentrifugiert. Nach 30 Min. Inkubation bei 37°C wurden unspezifische Zell-Konjugate durch rigides Vortexen für 10 Sek. gelöst und die Zellen sofort durch Zugabe von 200 µl 12%igem Paraformaldehyd (Endkonzentration 4% Paraformaldehyd) für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad fixiert. Anschließend wurde die Fixierung durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1.100 UpM/ 5 Min.) sedimentiert. Nach erneutem Waschen mit 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Maus-Antikörpern gegen CD19 (PerCP), CD3 (APC) und CD45RO (PE) gefärbt und anschließend

durchflußzytometrisch ausgewertet. Zellkonjugate sind aufgrund der Doppelfärbung von T- und B-Zellmarkern (CD3 und CD19) identifizierbar.

3.2.2.6.2 Zellkonjugate für die Immunfluoreszenz (LSM)

Für die Laserscan Mikroskopie wurden die Zellen auf Silan beschichtete Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgebracht. Vor deren Benutzung wurden sie mit VE Wasser für ca. 5 Minuten aktiviert. Anschließend wurden humane PBT (4×10^4 in 10 μ l) in Eppendorf Reaktionsgefäßen mit unbeladenen oder Superantigen-tragenden Raji B-Zellen (4×10^4) gemischt und sofort 10 μ l pro Ansatz auf die Objektträger aufgebracht. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit FACS-Puffer gewaschen und 15 Min. bei RT mit FACS-Puffer blockiert. Die Zellen wurden durch 10 minütige Inkubation in 0,25% Triton X-100 in FACS-Puffer bei RT permeabilisiert, erneut mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 Min. blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle, z.B CD3 (SK7 1:10) oder CD2 (3PT2H9/ 10 μ g/ml) und gegen intrazelluläre Moleküle, wie L-Plastin (Recpla662, 1:500) oder Aktin (A2066, 1:600) in einem Volumen von 10 μ l für 15 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden nicht-gebundene Antikörper durch 2-maliges Waschen mit FACS Puffer entfernt und die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern bei RT inkubiert. Nach 15 Min. wurde zweimal mit FACS Puffer und ein weiteres mal mit Millipore Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden mit 180 μ l MOWIOL 4-88 und Deckgläschen verschlossen und bei RT im Dunkeln ü/N getrocknet. Die Analyse der Zellkonjugate erfolgte durch konfokale Laserscan-Mikroskopie.

3.2.2.6.3 Time-Lapse Videomikroskopie von Zellkonjugaten

Zur zeitaufgelösten Aufnahme von Zell-Zell-Interaktionen wurde eine Videomikroskopie-Einheit (Axiovert 200M, Zeiss, Bensheim und Cool SNAP HQ, Visitron) verwendet. Diese Technik wurde in Rahmen dieser Doktorarbeit neu im Labor etabliert.

Zunächst wurden 8-Kammer-Deckglas-Objektträger mit Poly-L-Lysin (1/10 in Millipore-Wasser/ Sigma) für 5 Minuten bei RT beschichtet. Anschließend wurden die Kammern mit RPMI ohne Phenolrot (Gibco BRL) gewaschen und standen zur weiteren Verwendung bereit. Währenddessen wurden Raji Lymphoma B-Zellen mit Superantigen beladen (s.o.) und mit RPMI ohne Phenolrot gewaschen, in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ / ml in RPMI ohne

Phenolrot resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Pro Ansatz wurden 50 TSD B-Zellen in eine Poly-L-Lysin beschichtete Kammer gegeben. Nach ca. 1-2 Min. setzten sich diese Zellen auf dem Boden ab. Jetzt wurde das Präparat in die vorgeheizte (37°C) Mikroskop-Anlage bei entsprechender Vergrößerung (Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion Ph3/DIC) eingespannt und die Grundeinstellungen der Mikroskop- bzw. Steuer-Software (Metamorph 4.6r9) - DIC, Ausleuchtung, Belichtungszeiten etc. - vorgenommen. Zur optimalen Ausnutzung des Präparats wurden bei jeder Aufnahme 3 unterschiedliche Regionen elektronisch angefahren. Dazu wurden die x,y,z-Koordinaten dieser Regionen mit der Steuer-Software gespeichert. Anschließend wurden zur Ausbildung von Zellkontakten 100 µl einer PBT Suspension, die aus einem entsprechenden Nukleofektionsansatz stammen (entspricht ca. 200 TSD Zellen, s. 3.2.2.4), zugegeben und im Abstand von 18 Sek. (im Zeitraum von 0 bis 30 Min.) in jeder Region je ein Differentialinterferenz-Kontrast-Bild (aus engl. DIC) und ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Die anschließende Bild- und Filmbearbeitung erfolgte mit Metamorph 4.6r9.

3.2.2.7 Konfokale Laserscanmikroskopie

Immunfluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop (Leica DMRBE – TCS-NT; Bensheim) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv (PL APO 1.4) bei einer Voxelgröße von 50. Die Anregung der Fluorochrome erfolgte mit einem Argon-Ionen-Laser. Bei Mehrfachfluoreszenzenfärbungen wurden die Fluoreszenzen einzeln und/oder als Überlagerung aufgenommen. Die elektronische Bearbeitung der Bilder wurde mit Adobe Photoshop durchgeführt.

Zur 3D-Rekonstruktion wurden mind. 10 optische Schnittebenen durch eine Zelle gelegt. Das entspricht 0,8 bis 1 µm pro Ebene. Die Bilder wurden zu einem Stapel gebündelt und mit Hilfe der Metamorph Software (Metamorph 4.6r9, Visitron) dreidimensional rekonstruiert.

3.2.2.8 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Analysen wurden mit einem LSR (BD Bioscience) durchgeführt. Zur Geräteeinstellung (Kompensation) bei Mehrfarbenanalysen wurde für jeden verwendeten Fluoreszenz-Farbstoff ein Kontroll-Ansatz gemessen, für den ein stark exprimiertes Oberflächenmolekül gefärbt wurde (z.B. CD3 für T-Zellen). Anhand dieser Ansätze wurde die Farbkompensation eingestellt.

3.2.2.8.1 Oberflächen-Färbung

Oberflächen-Färbungen für die Durchflußzytometrie wurden stets mit direkt-markierten Antikörpern durchgeführt. Je nach Anwendung wurden pro Ansatz 3×10^5 bis 1×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen (BD Bioscience, Heidelberg) sedimentiert. Anschließend wurden sie in 50 µl FACS Puffer resuspendiert, der die entsprechenden Antikörper enthielt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde 1 ml FACS Puffer zugegeben und 5 Min. mit 300 g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl PBS/ 1% Paraformaldehyd aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

3.2.2.8.1.1 Lymphozyten und Monozytenfärbung

Zur Phänotypisierung von primären Zellen wurden zwei parallele Färbe-Ansätze verwendet, nämlich die Lymphozyten- und die Monozytenfärbung. Zunächst wurden Kontrollen zur Einstellung und Kompensation der drei Farbkanäle des Durchflußzytometers angefertigt. Dazu wurden PBMC in drei Ansätzen für die 3 Kanäle mit je 8µl CD3-PE, CD3-FITC und CD3-PerCP (jeweils Klon SK7) gefärbt. Mit diesen Proben wurden die Geräteeinstellungen unternommen und gespeichert ("Lymphozyten-Kompensation"). Parallel wurde für die größeren Monozyten entsprechend mit CD14-PE, CD14-FITC und CD14-PE-Cy5 (Klon RMO42) gefärbt und ebenfalls Geräteeinstellungen unternommen und gespeichert ("Monozyten-Kompensation"). Mit den entsprechenden Kompensationen für Lymphozyten und Monozyten wurden die eigentlichen Messproben durch eine Oberflächenfärbung wie folgt charakterisiert:

Lymphozytenfärbung: CD3-FITC (T-Zellen), CD56-PE (NK-Zellen), CD16-PE (NK-Zellen) und CD19-PerCP (B-Zellen)

Monozytenfärbung: CD16-FITC (Monozyten-Subpopulation), CD86-PE (Monozyten) und CD14-PECy5 (Monozyten-Subpopulation)

3.2.2.8.2 Intrazelluläre Färbung

Pro Ansatz wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen mit 300 g bei 4°C sedimentiert. Zur Fixierung wurde das trockengesaugte Zellsediment in 400 µl vorgewärmten 4%igem Paraformaldehyd aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer mit 0,1% Saponin und 10-minütiger Inkubation bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (300 g für 5 Min.), der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 50 µl Antikörperverdünnung (FACS-Puffer/ 0,1% Saponin) aufgenommen. Nach 45-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer/ 1% Saponin gewaschen und in 50 µl Zweitantikörperverdünnung (FACS-Puffer/ 0,1% Saponin) aufgenommen. Die Antikörper wurden für 45 Min. bei 4°C im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene Antikörper im Überstand der Zellen nach Zentrifugation mit 300 g bei 4°C für 5 Min. durch Absaugen entfernt. Das Zellsediment wurde darauf in 300 µl 1% Paraformaldehyd aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

3.2.2.8.3 Vitalitätstest (Life/Dead)

Pro Ansatz wurden $2,5 \times 10^5$ TSD Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit Vollmedium auf 400 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 20 µl Propidiumiodid (Endkonzentration: 250 ng/ml) zugegeben und auf einem Vortex durchmischt. Nach maximal 5-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt, wie viele Zellen Propidium Iodid aufgenommen hatten und somit als tot zu bewerten waren.

3.2.2.8.4 Nachweis Zytokin-produzierender Zellen

Zum Nachweis der Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau wurden die Zellen nach der Stimulation mit Brefeldin A behandelt, das die Verschmelzung von endogenen Vesikeln mit der Zellmembran verhindert. Dadurch verbleiben die Zytokine im Zellinneren und können über eine intrazelluläre Färbung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Für die Zell-Stimulation wurden 200 µl T-Zell-Zellsuspension (1 Mio. PBT) in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden weitere 200 µl APZ-Zellsuspension (1 Mio. Raji B-Zellen) zugegeben. Letztere waren entweder unbeladen oder waren zur T-Zellstimulation mit den Superantigenen SEB und SEF beladen (Kap. 3.2.2.6). Zusätzlich waren

kostimulatorische Antikörper 1 µg/ ml anti-CD28 (L293) und 1 µg/ml anti-CD49d (9F10) enthalten, wodurch eine stärkere T-Zell-Aktivierung erreicht werden kann (Sester *et al.*, 2002). Insgesamt betrug die folgende Inkubation bei 37°C 6 Stunden. Zunächst wurden die Zellen jedoch 30 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend zur besseren Zell-Zell-Kontakt-Bildung 5 Min. bei 300 g zentrifugiert und sofort für weitere 1,5 h bei 37° inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 10 µg/ ml Brefeldin A (Stock: 5 mg/ml in Ethanol) zugegeben und mit einem Vortex gemischt. Erneut wurden die Zellen bei 300 g sedimentiert, um einen engen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde 40 µl 20 mM EDTA zugegeben, für 10 Sek. mit dem Vortex gemischt und 15 Min. bei RT inkubiert. Durch diesen Schritt wurden Zell-Zell-Kontakte für die spätere durchflusszytometrische Analyse gelöst. Anschließend wurden 2 ml PBS/ 2 mM EDTA zugegeben und bei 300 g für 5 Min. zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl vorgewärmtem 4%igem Paraformaldehyd für 5 Minuten bei 37°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit FACS Puffer/ 0,1% Saponin gewaschen. Die Zytokine (IL-2 und INF- γ) wurden mit direkt markierten Antikörpern durch eine intrazelluläre Färbung nachgewiesen. Gleichzeitig wurde sowohl CD3 (T-Zellmarker) als auch CD19 (B-Zellmarker) zur Identifikation der T- und B-Zellen gefärbt.

3.2.2.9 Proliferationstest

Als Maß für die Induktion der Zellproliferation wurde die DNA-Synthese anhand von Tritium-Thymidin-Einbau in die DNA quantifiziert. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in einem Volumen von 150 µl in 96-Lochplatten ausgesät. Jeder Ansatz wurde als dreifach-Wert pipettiert und wie unter 3.2.2.2 für 48 h bei 37°C stimuliert. Darauf wurde 1 µCi [3 H]-Thymidin (Amersham-Pharmacia, Braunschweig) in 25 µl zugegeben und weitere 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Vakuum-Erntegerät („Harvester 96®, GF/C“; Tomtec, Hamden, CT, U.S.A) auf Glasfilterplatten („Unifilter®-96“, Packard, BioScience, Groningen, Niederlande) transferiert und lysiert. Die Platten wurden bei 40°C eine Stunde getrocknet, abgedichtet und 25 µl Szintillationsflüssigkeit („Microscint™ 20“, Packard) pro Vertiefung zugegeben. Die Einbaurate wurde mit einem Szintillationsspektrometer („TopCount Microplate Scintillation Counter“, Packard) gemessen.

3.2.2.10 *In vivo* Markierung von PBT durch ³²P-Phosphat

Zur Markierung mit ³²P-Phosphat wurden 2 Mio. PBT mit phosphatfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in phosphatfreiem Medium aufgenommen (2 Mio Zellen/ ml) und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Markierung erfolgte ü/N bei 37°C durch Zugabe von 100 µCi Phosphorus-32 (Amersham-Pharmacia, Braunschweig). Anschließend wurden die Zellen entweder mit 10⁻⁸ M PMA stimuliert oder unstimuliert gelassen. Vor der Lyse mit TKM-Lysepuffer wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen, wie z.B. Zelllysaten, wurde eine reduzierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurden Glasplatten (ProteanXL-System von BioRad) nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt und ein 1 mm Trenngel (375 mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% APS; 1x TEMED und Rotiphorese (Stocklösung: 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid (Roth)) entsprechend der Prozentigkeit des Geles) gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Ethanol abgenommen und ein Sammelgel (125 mM Tris pH 6,6; 0,1% SDS; 0,1% APS; 1x TEMED und 3,8% Acrylamid (Rotiphorese)) mit entsprechender Anzahl an Probenaschen gegossen. Die fertigen Gele wurden in die Gel-Apparaturen eingespannt und die Probenaschen mit VE Wasser gespült. Anschließend wurden die Proben in Probenauftragspuffer (190 mM Tris/HCl pH 6,8; 6% SDS; 30% Glycerin; 0,15 M DTT; 0,03% (w/v) Bromphenolblau) in die Taschen pipettiert und die Gele mit SDS-Laufpuffer (250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS) überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 25 mA pro Gel für etwa 3 h.

3.2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung (IEF)/SDS-PAGE) wurde mit Hilfe des PROTEAN IEF Cell[®] Systems von BioRad durchgeführt. Diese Methode gehörte nicht zu den Labor-Standardmethoden und musste neu etabliert werden.

Das postnukleäre Lysat (5 µl) von 0,5 Mio. oder 1 Mio. Zellen (primäre Zellen oder transformierte Zellen) wurde mit 300 µl IEF-Laufpuffer bei Umgebungstemperatur gemischt (7,5 M Harnstoff; 2,1 M Thio-Harnstoff; 1% CHAPS; 65 µM DTT; 0,2% Bio-Lyte[®] 3/10 (BioRad)). Anschließend wurden diese Proben jeweils in der Vertiefung eines Fokussierungsschlittens verteilt. Darauf wurden je ein ReadyStrip[®] IPG Streifen mit einem linearisierten, immobilisierten pH Gradienten von pH 4 bis pH 7 (17 cm) aufgelegt und mit 1500 µl Mineralöl (BioRad) überschichtet. Nach dem Lauf (Aktive Rehydrierung: 50V; Auftrennung: 12 h; 250 V, 15 Min.; Spannung linear steigend bis 10000 V, 5 h; konstant 10000 V, 6 h; Insgesamt 85670 Vh; alle Schritte bei 20°C) wurden die Streifen entweder bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt für die 2. Dimension (SDS-PAGE) äquilibriert. Dazu wurden die Streifen für 30 Min. in 1 ml Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS; 20% Glyzerin) mit 1% DTT und anschließend weitere 30 Min. in 1 ml Äquilibrierungspuffer mit 4% Iodoacetamid inkubiert. Danach wurden die Streifen auf die 2. Dimension aufgebracht (10%iges 1 mm dickes Gel (diskontinuierliche SDS-PAGE), ProteanXL 1 mm (BioRad), mit einer Markertasche) und mit handwarmer 1%iger „Low melting Agarose“ in Laemmli-Puffer fixiert. Der Lauf erfolgte bei konstanten 50 mA pro Gel. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF Membrane übertragen (Western Blot) oder die Gele mit kolloidal-Coomassie bzw. Silber gefärbt.

3.2.3.3 Färben und Trocknen von Gelen

3.2.3.3.1 Coomassie

SDS-Gele wurden, ggf. auch nach dem Blotten, mit Coomassie (0,5% (w/v) Coomassie, 10% Eisessig (v/v), 30% (v/v) Isopropanol) über Nacht bei RT gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Entfärber (10% Eisessig (v/v) 30% (v/v) Isopropanol) bei Raumtemperatur, bis die Banden bzw. Spots gut sichtbar vom Hintergrund abheben. Anschließend wurden die Gele bei 80°C auf 3 MM Whatman Papier unter Vakuum getrocknet (Gel Dryer Model 583; BioRad).

3.2.3.3.2 Colloidal Coomassie

Zum Anfärben von Gelen, aus denen Spots mittels Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurde eine modifizierte Coomassie-Färbung verwendet. Zum Färben mit Colloidal Coomassie wurden die Gele über Nacht unter Schütteln in eine Färbelösung (0,08%

Coomassie Brilliant Blue G250, 1,6% Orthophosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat, 20% Methanol) gegeben. Anschließend wurden sie mit VE-Wasser durch mehrfaches Waschen entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde. Die Trocknung erfolgte wie unter 3.2.3.3.1 beschrieben.

3.2.3.3.3 Silberfärbung

Die Gele wurden nach dem Lauf für 30 Minuten fixiert (Methanol: Essigsäure:Wasser - 40:10:50). Anschließend wurde die Säure durch 3-maliges Waschen mit VE-Wasser entfernt und das Gel mit 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat für eine Minute sensibilisiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit VE-Wasser wurde 20 Minuten mit 0,1% (w/v) Silbernitrat bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Silbernitrat mit VE-Wasser entfernt und das Gel mit Entwickler (0,04% (v/v) Formaldehyd, 2% (w/v) Natriumkarbonat) inkubiert, bis die erwünschte Färbung eingetreten war. Die Reaktion wurde mit 1%iger (v/v) Essigsäure gestoppt und das Gel anschließend in 4%iger (v/v) Essigsäure bei 4°C gelagert.

3.2.3.4 Western Blotting

3.2.3.4.1 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF Membran (Western Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (SDS-PAGE) wurden die Proteine auf eine PVDF Membran übertragen. Dazu wurden die Membranen mit Methanol für eine Min. aktiviert und darauf für 5 Min. in Blotpuffer äquillibriert. Anschließend wurden die Gele im Sandwich-Verfahren positioniert, d.h. oberhalb der Gele und unterhalb der Membran wurden 3-6 Whatman Papiere (3M) gelegt, die zuvor mit Blotpuffer getränkt wurden. Die so präparierten Gele wurden auf eine feuchte Graphitplatte (Pluspol) gelegt und Luftblasen zwischen den Lagen des Gel-Sandwichs ausgerollt. Anschließend wurde eine zweite, feuchte Graphitplatte (Minuspol) auf das Gel-Sandwich gelegt und die Proteine bei 0,8 mA/ cm² Membran transferiert. Nach einer Stunde Proteintransfer wurden die Membrane in 5% Magermilch/ TBS für 30 Min. bei RT blockiert.

3.2.3.4.2 Detektion gebundener Proteine

Zur Detektion von Proteinen wurden spezifische Antikörper verwendet, die in 5% Magermilch/ TBS mit der Membran eingeschweißt und auf einem Überkopf-Rotator bei 4°C inkubiert wurden. Nach 16 h wurden nicht gebundene Antikörper durch 3-maliges Waschen in TBS/ 0,1 % Tween-20 für 10 Min. entfernt. Anschließend wurde mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern in 5% Magermilch/ TBS für 1 h bei RT inkubiert und erneut 3 mal mit TBS 0,1 % Tween-20 für 10 Min. bei RT gewaschen. Die Detektion erfolgte über Chemolumineszenz (ECL, Amersham-Pharmacia, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

3.2.3.4.3 Nachfärbung von Western Blots

Zur Nachfärbung eines Western Blots, z.B. zur Detektion weiterer Ziel-Proteine nach einer Immunpräzipitation, wurden die Primären und Sekundären Antikörper der vorherigen Färbung komplett abgewaschen. Dazu wurde die Membran in TBS-T (TBS/0,1% Tween 20) zweimal 10 Min. gewaschen und anschließend bei 50°C (Wasserbad) in Strip-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol) für 30 Min. unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBS-T zweimal gewaschen und erneut mit 5% Magermilch/ TBS 20 Min. bei RT blockiert. Zur Kontrolle wurde der Blot erneut mit dem gleichen Zweitantikörper inkubiert, der auch bei der ersten Färbung eingesetzt wurde. Der Blot wurde nur dann für die zweite Färbung eingesetzt, wenn bei dieser Kontroll-Färbung und ECL-Detektion (s. 3.2.3.4) kein Signal zu sehen war. Die Nachfärbung erfolgte wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben.

3.2.3.5 Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie

Proteinmikrosequenzierung und Massenspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Franz sowie der Arbeitsgruppe Wilm am EMBL (European molecular biology laboratories) in Heidelberg durchgeführt.

L-Plastin Spots von unstimulierten und PMA-behandelten PBT wurden aus einer präparativen 2D-SDS-PAGE ausgeschnitten. Anschließend wurden die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Shevchenko *et al.*, 2000). Das Peptid-Gemisch wurde in zwei Aliquots geteilt und separat analysiert. Diese Analyse erfolgte mit einem Triple-Quadruple Instrument (API III,

Perkin-Elmer SCIEX, Thornhill, Canada) mit installierter Nanoelektrospray Quelle. Die Phosphopeptide wurden spezifisch mit „precursor ion scanning ($m/z-79$)“ im negativen Modus detektiert (Wilm *et al.*, 1996).

4. Ergebnisse

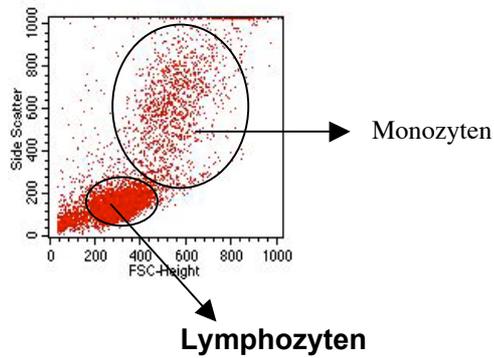
4.1 Expression von L-Plastin in humanen peripheren Leukozyten

4.1.1 L-Plastin Expression in humanen Leukozyten

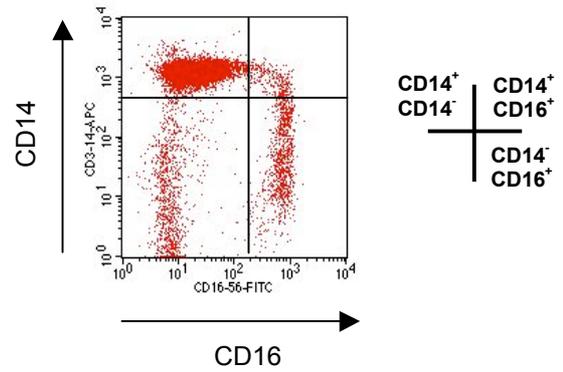
L-Plastin gehört zu den 15 am stärksten exprimierten Proteinen in Leukozyten (Goldstein *et al.*, 1985). Das 67 kDa schwere Aktin-bindende Protein wird bei gesunden Menschen ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, kann aber auch in neoplastischen Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden. Diese Zellen exprimieren allerdings neben L-Plastin auch die Isoform T-Plastin, während in Leukozyten ausschließlich L-Plastin nachgewiesen werden kann (de Arruda *et al.*, 1990; Goldstein *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1990). Über die Expressionsstärke von L-Plastin in den verschiedenen Leukozyten-Populationen, d.h. Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten, gab es bisher keine Studien. Daher wurde hier eine vergleichende Expressionsstudie von L-Plastin in Leukozyten mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Hierzu wurde eine Phänotypisierung von humanen PBMCs gesunder Spender mit direkt-markierten monoklonalen Maus-Antikörpern gegen CD3 (TZR-Komplex, APC-konjugiert), CD14 (LPS-Rezeptor, APC-konjugiert), CD16 (Fc γ RIII, FITC-konjugiert), CD19 (Korezeptor auf B-Zellen, PerCP-konjugiert) und CD56 (NK-Zell-Marker, FITC-konjugiert) durchgeführt (Abb. 4.1.1). Gleichzeitig wurde L-Plastin über ein spezifisches Kaninchen-Serum (RecPla662) und PE-gekoppelte Anti-Kaninchen Antikörper gefärbt. Damit die einzelnen Leukozyten-Populationen direkt miteinander verglichen werden konnten, wurde die Typisierung der unterschiedlichen Leukozyten-Populationen stets innerhalb eines Ansatzes durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe von Lymphozyten (8 – 10 μ Meter) und Monozyten (13 – 18 μ Meter) ist trotz z.T. redundanter Antikörper-Markierung (s.o.) eine eindeutige Identifizierung der Populationen möglich (Abb. 4.1.1, A). Einzig die NK-Zellen (CD16 und CD56 positiv) und CD16 positive Monozyten haben einen Überlappungsbereich hinsichtlich ihrer Größe. Allerdings exprimieren die Monozyten bedeutend mehr CD16 und sind daher von den NK-Zellen zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Während Lymphozyten klar abgegrenzte Populationen bilden (Abb. 4.1.1 C, Lymphozytendifferenzierung), treten bei Monozyten fließende Übergänge in der Expression der Oberflächen-Rezeptoren CD14 und CD16 auf (Abb. 4.1.1 B, Monozytendifferenzierung). Prinzipiell unterscheidet man die CD14

Abbildung 4.1.1

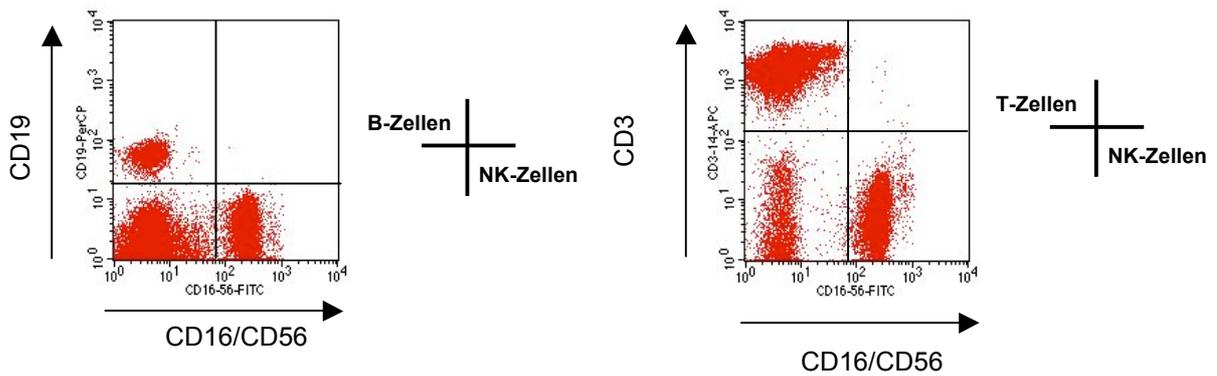
A: PBMC



B: Monozytendifferenzierung



C: Lymphozytendifferenzierung



D: L-Plastin Expression

Zellen	L-Plastin Expression (MFI)
Lymphozyten	
T-Zellen	83,91 ± 4,86
B-Zellen	87,55 ± 8,90
NK-Zellen	91,0 ± 11,32
Monozyten	
CD14 ⁺ /CD16 ⁻	191,35 ± 4,57
CD14 ⁺ /CD16 ⁺	250,96 ± 7,96
CD14 ⁻ /CD16 ⁺	261,89 ± 21,26

Abb. 4.1.1 L-Plastin Expression in peripheren Leukozyten

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Phänotypisierung von PBMC. Oben links (A) ist eine Größen- (Forward-Scatter – FSC-Height) und Granularitäts-Messung (Side-Scatter – SSC-Height) der Zellen gezeigt. Die Kreise geben die Gates an, mit denen die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten gemäß ihrer Größe und Granularität getrennt wurden. Aus diesen Gates wurden anschließend die Monozyten (B) und Lymphozyten-Phänotypisierung (C) durchgeführt. Die Monozyten wurden aufgrund der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 in 3 Subgruppen unterteilt: CD14⁺ (B, oberer linker Quadrant), CD14⁺/CD16⁺ (B, oberer rechter Quadrant) und CD14⁻/CD16⁺ (B, unterer rechter Quadrant). Die Lymphozyten (C) wurden zum einen in B-Zellen (CD19⁺) und NK-Zellen (CD16⁺/CD56⁺) getrennt (C, linker Teil) und zum anderen in T-Zellen (CD3⁺) und NK-Zellen (CD16⁺/CD56⁺) differenziert (C, rechter Teil). Die große Beschriftung an den Pfeilen gibt die für das betrachtete Gate relevante Färbung an. Tabelle (D) gibt den Mittelwert der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der L-Plastin Expression aus den Leukozyten-Populationen von 3 Spendern mit Standardfehler wieder.

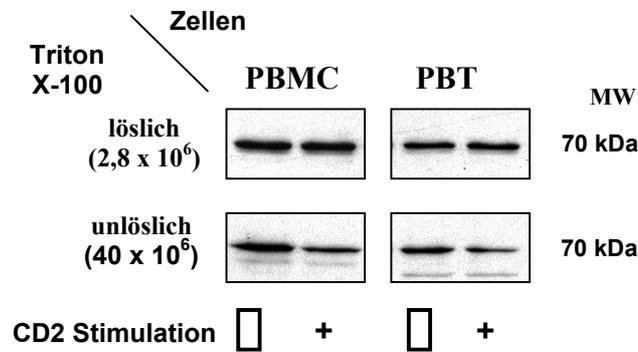
positiven und CD16 negativen (CD14⁺/CD16⁻), die CD14 und CD16 positiven (CD14⁺/CD16⁺) und die CD14 negativen aber CD16 positiven (CD14⁻/CD16⁺) Monozyten (Abb. 4.1.1 B). Diese Populationen differieren zum Teil stark hinsichtlich ihrer Größe und Funktion. So sind CD14⁻/CD16⁺ Monozyten phagozytotisch stärker aktiv und exprimieren mehr IL-1 als z.B. CD16⁻ Zellen (Passlick *et al.*, 1989; Scherberich und Nockher, 1999). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der L-Plastin-Expression pro Zelle ist in Monozyten höher als in Lymphozyten (Abb. 4.1.1 D). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass Monozyten ein wesentlich größeres Zellvolumen haben. Wie in Abbildung 4.1.1 D zu sehen, ist die Stärke der L-Plastin-Expression in allen Lymphozyten-Populationen, d.h. NK-Zellen sowie B- und T-Zellen, auf gleichem Niveau. Allerdings sind innerhalb der T-Zellen zwei Subpopulationen zu unterscheiden. CD45RO positive T-Zellen weisen allgemein ein höheres L-Plastin Expressionsniveau als CD45RA positive T-Zellen auf (nicht gezeigt und (Sester *et al.*, persönliche Kommunikation)). Interessanterweise variiert dagegen die L-Plastin-Expression zwischen den verschiedenen Monozyten-Subpopulationen. So ist in CD14⁺/CD16⁺ (MFI = 250,96 ± 7,96) und CD14⁻/CD16⁺ (MFI = 261,89 ± 21,26) Monozyten mehr L-Plastin nachzuweisen, als in CD14⁺/CD16⁻ Monozyten (MFI = 191,35 ± 4,57).

4.1.2 L-Plastin ist vorwiegend in der Triton X-100 löslichen Fraktion und zu geringen Teilen im Zytoskelett lokalisiert

Da L-Plastin ein Aktin-bindendes Protein ist, sollte biochemisch dessen subzelluläre Lokalisation in T-Zellen festgestellt werden. Messier *et al.* zeigten, dass L-Plastin in PMN hauptsächlich in der Triton X-100 löslichen Fraktion lokalisiert ist, während T-Plastin in

Abbildung 4.1.2

A



B

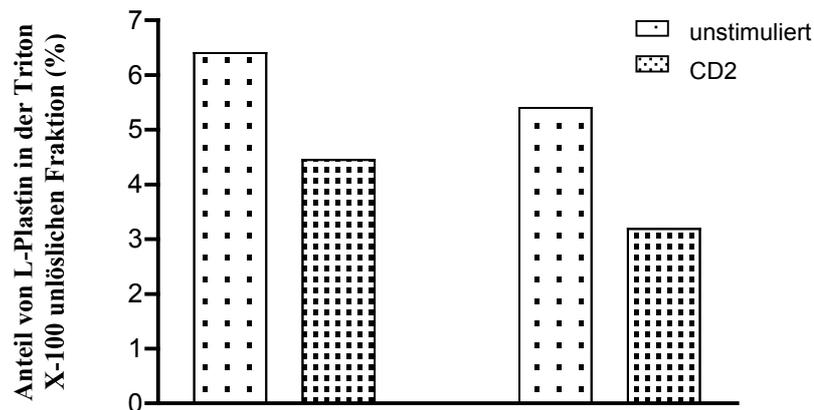


Abb. 4.1.2 L-Plastin ist hauptsächlich in der Triton X-100 löslichen Fraktion enthalten

(A) Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Anti-L-Plastin Western Blot aus zwei Experimenten. Die **obere Reihe** zeigt die Triton X-100 lösliche Fraktion aus 2,8 Mio Zellen (**Zellzahl ist in Klammern angegeben**). Die Triton X-100 unlösliche Fraktion (**untere Reihe**) repräsentiert ein Zelläquivalent aus 40 Mio Zellen, da in dieser Fraktion insgesamt weniger Protein als in der Triton X-100 löslichen Fraktion enthalten ist. Nach CD2-Stimulation nimmt der Anteil von L-Plastin in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion ab. Die Experimente wurden zusammen mit Dr. Eibert durchgeführt.

(B) L-Plastin-Gehalt in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion. Zunächst wurden die L-Plastin-Banden aus den Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen in (A) densitometrisch quantifiziert. Anschließend wurden die so erhaltenen Werte auf ein Zelläquivalent von einer Mio Zellen umgerechnet und daraus der relative L-Plastin Gehalt in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion bestimmt (Angabe in % des Gesamt-L-Plastins)

Fibroblasten zu einem Großteil im unlöslichen Pellet (Zytoskelett) nachgewiesen werden kann (Messier *et al.*, 1993). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Adhärenz von PMN an Immunkomplexe eine Lokalisation von L-Plastin in Podosomen verursacht, die in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion enthalten sind. Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob sich L-Plastin im Zytoskelett von ruhenden und aktivierten humanen PBT befindet. Dazu wurden sowohl T-Zellen (PBT) als auch mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) unbehandelt kultiviert oder mit Antikörpern gegen drei verschiedene CD2 Epitope für 30 Minuten stimuliert (alternativer Weg der T-Zell-Aktivierung). Diese Art der Stimulation führt zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen (Meuer *et al.*, 1984b) und zur Phosphorylierung von L-Plastin (nicht gezeigte Daten und (Henning *et al.*, 1994)). Die Triton X-100 lösliche Fraktion von einem Zell-Äquivalent aus 2,8 Mio Zellen und die Triton X-100 unlösliche Fraktion aus 40 Mio Zellen wurden auf einer 14%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und L-Plastin mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 4.1.2 A). Die densitometrische Auswertung der L-Plastin-Banden ergab, dass im gezeigten Beispiel in unstimulierten PBT 6,4 % bzw. in PBMCs 5,4 % des L-Plastins in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion enthalten waren (Abb. 4.1.2 B). Diese Ergebnisse entsprechen dem Wert, der von Messier *et al.* in adhärenenten Maus-Makrophagen ermittelt wurde. Interessanterweise geht die Menge des L-Plastins aus der Triton X-100 unlöslichen Fraktion nach CD2-Stimulation in PBMCs um 31% bzw. in PBT um 41 % zurück. Als Kontrolle für die Stimulation wurde das Aktin-bindende Protein Cofilin betrachtet. Im Unterschied zu L-Plastin bindet Cofilin erst nach CD2-Stimulation ans Aktin-Zytoskelett. Tatsächlich war auch in dem hier gezeigten Experiment mehr Cofilin in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion von CD2-stimulierten Zellen nachzuweisen, als bei ruhenden PBT (Eibert *et al.*, persönliche Kommunikation).

4.2 L-Plastin wird nach Kostimulation von PBT an Ser-5 phosphoryliert

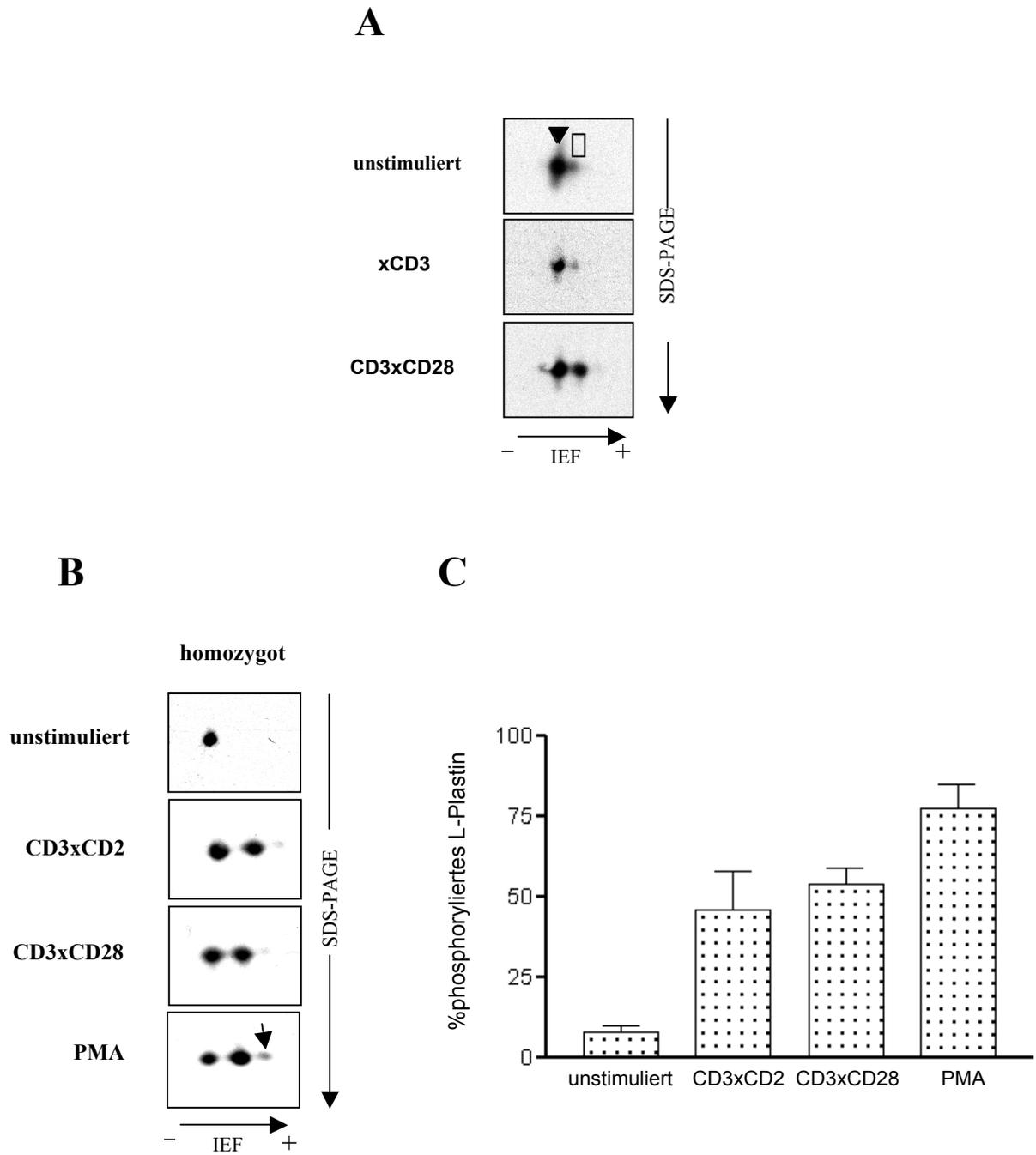
Bei der Antigenerkennung auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) sind zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen zwei Signale nötig (Kostimulation). Das erste oder auch Kompetenz-Signal wird über TZR/CD3-Bindung an Peptid-MHC-Komplexe vermittelt. Zusätzlich exprimieren Antigen-präsentierende Zellen auf ihrer Oberfläche

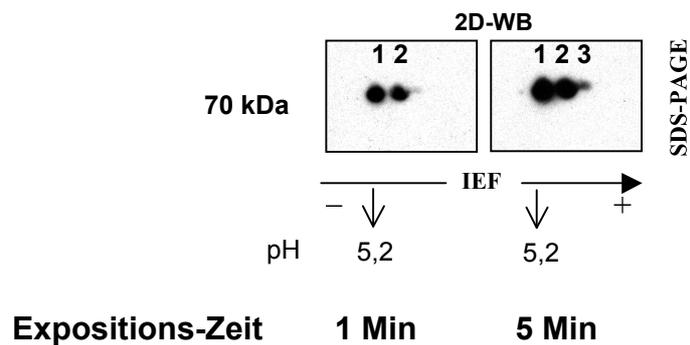
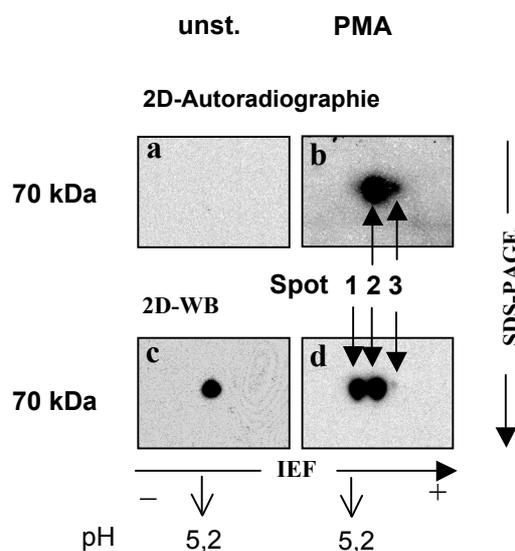
Liganden für akzessorische Rezeptoren der T-Zellen. Über deren Interaktionen wird das zweite, kostimulatorische Signal übermittelt. In dieser Arbeit wurden zur Kostimulation von T-Zellen stimulierende, an Plastik gebundene Antikörper gegen die entsprechenden Rezeptoren verwendet. Diese Art der Kostimulation führt zu einer vollständigen T-Zell-Aktivierung. Außerdem wurden in dieser Arbeit PBT mit Phorbol ester stimuliert. Die T-Zell-Aktivierung über Phorbol ester ist eine weithin anerkannte und häufig verwendete Methode zur Aktivierung von T-Zellen. Diese Stimulation ahmt einige Aspekte der Kostimulation nach (Cantrell, 1996). Die Wirkung beruht auf der direkten Aktivierung von Proteinkinasen des Typs C (PKC). Dadurch werden frühe Ereignisse, die durch Rezeptor-Stimulation ausgelöst werden, wie z.B. die Aktivierung der PLC β übersprungen. Für eine Vielzahl von Experimenten ist wegen der leichteren Handhabung die PMA-Stimulation der Stimulation über kreuzvernetzte Antikörper vorzuziehen, besonders wenn eine größere Anzahl von stimulierten Zellen benötigt wird.

4.2.1 L-Plastin wird nach Kostimulation von PBT phosphoryliert

Zur Analyse der Phosphorylierung von L-Plastin in humanen T-Zellen wurde ein 2D-Western Blot System entwickelt, mit dem ein nicht radioaktiver Nachweis der L-Plastin-Phosphorylierung möglich war. Dazu wurden in 24-Loch-Platten monoklonale Maus-Antikörper gegen CD3 alleine (xCD3) oder zusammen mit CD28-Antikörpern (CD3xCD28) über Ziege-Anti-Maus Antikörper gekoppelt. Als unstimulierte Kontrolle diente ein Ansatz, in der die Platte ausschließlich mit Ziege-Anti-Maus Antikörpern beschichtet war. Anschließend wurden 1,5 Mio PBT pro Ansatz ausgesät, durch kurzes Zentrifugieren in engen Kontakt mit den Antikörpern gebracht und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Stimulation wurden die Zellen geerntet und mit einem Puffer lysiert, der das Detergenz NP40 enthielt (TKM-Lysepuffer). Der Phosphorylierungsstatus von L-Plastin wurde mittels 2D-Western Blotting mit spezifischen L-Plastin Antikörpern ermittelt: Die Separation der Proteine aus Zell-Lysaten erfolgte in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) über einen linearen, immobilisierten pH-Gradienten (pH 4-7) und in der zweiten Dimension über 10%ige SDS-Gele, in der sie nach ihren Größen aufgetrennt wurden. Eine Phosphorylierung kann zu einer Verschiebung des pIs um 0,1 – 0,2 pH Einheiten zum sauren Bereich hin führen. Ein solcher pH-Shift führt auf 2D-Gelen zu einem zusätzlichen Spot, wenn die Trennstrecke des pH-Gradienten entsprechend ausgewählt wird.

Abbildung 4.2.1



D**E****Abb. 4.2.1 Phosphorylierung von L-Plastin nach Kostimulation**

(A) Humane PBT wurden entweder unstimuliert gelassen, über kruzvernetzte Antikörper gegen CD3 (xCD3, Klon BMA030) oder CD3 in Kombination mit CD28 (CD3xCD28, Klone BMA030 und CD28.2) stimuliert. Anschließend wurden die Zelllysate über 2D-SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. L-Plastin wurde mit einem spezifischen polyklonalen Antiserum (RecPla662) detektiert. (Schwarze Pfeilspitze: unphosphoryliertes L-Plastin; weiße Pfeilspitze: phosphoryliertes L-Plastin)

(B) Humane PBT wurden wie unter A über CD3xCD28 stimuliert. Zusätzlich wurden sie über CD3 in Kombination mit CD2 (CD3xCD2, Klone BMA030 und 3ptH9) und mit PMA (10 nM) stimuliert. Anschließend wurde ein L-Plastin 2D-Western Blot angefertigt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot von drei unabhängigen Experimenten. Der Pfeil markiert einen dritten Spot, der nach Stimulation mit L-Plastin-spezifischen Antikörpern detektiert werden kann.

(C) Densitometrische Auswertung der L-Plastin-Phosphorylierung. Das Histogramm zeigt die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinate ist die L-Plastin Phosphorylierung als Quotient von Phospho-L-Plastin und Gesamt-L-Plastin angegeben. Für die densitometrische Auswertung der L-Plastin Phosphorylierung wurde der sauerste Spot nicht berücksichtigt, weil der lineare Bereich der densitometrischen Messmethode die gleichzeitige Quantifizierung aller Spots limitiert.

(D) Die Abbildung zeigt zwei unterschiedliche Expositionszeiten des gleichen Western-Blots nach ECL-Behandlung. Durch die längeren Expositionszeiten des Films wird ein dritter Spot auch nach Kostimulation (CD3xCD28) sichtbar. Der dritte Spot ist ebenfalls nach CD3xCD2-Stimulation zu sehen (nicht gezeigt).

(E) Proteine aus Lysaten von unstimulierten (a, c) oder PMA-stimulierten (b, d) ^{32}P -Phosphat markierten PBT wurden durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF übertragen. Der obere Teil zeigt ein 2D-Autoradiogramm im pH-Bereich zwischen pH 5 und 5,3 (horizontal) und einem Molekulargewichtsbereich von ca. 65 bis 75 kDa (vertikal). Im unteren Bereich ist ein 2D-Western Blot derselben Membran mit L-Plastin-spezifischen Antikörpern gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine unphosphorylierte L-Plastin Form (Spot 1) und zwei phosphorylierte L-Plastin Formen (Spot 2 und 3) existieren.

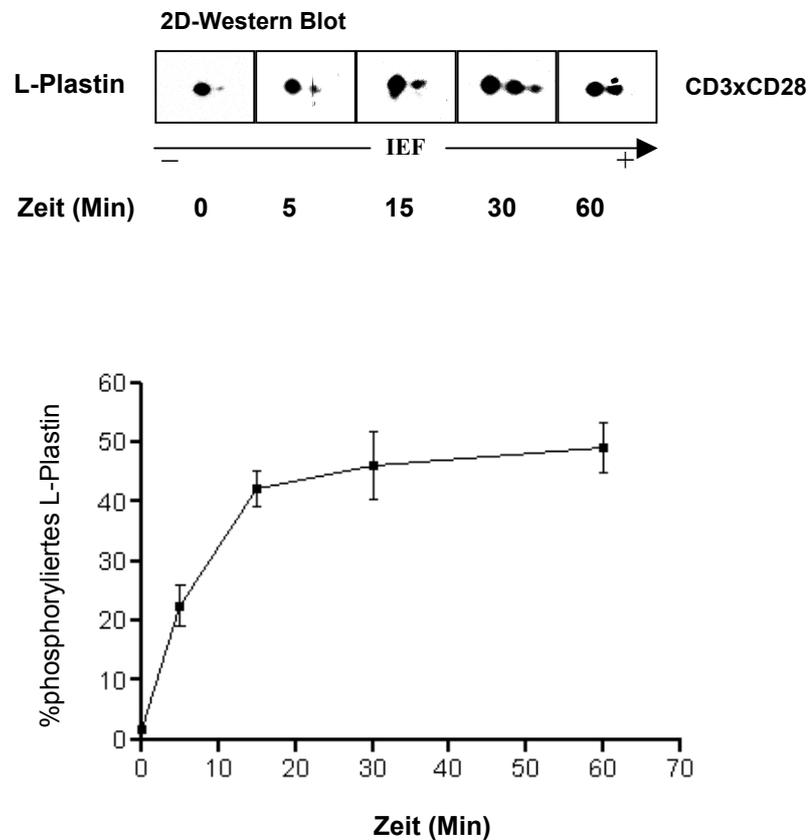
Wie erwartet wurde in Lysaten aus unstimulierten PBT ein deutlicher Spot mit einem pI von 5,2 und einem Molekulargewicht von 67 kDa mit spezifischen L-Plastin Antikörpern auf 2D-Western Blots nachgewiesen (Abb. 4.2.1 A, schwarzer Pfeil). Demnach lag L-Plastin hauptsächlich im unphosphorylierten Zustand vor (s. dazu Abb. 4.2.1 E). Der zweite kleinere Spot mit saurerem pI lässt darauf schließen, dass in dem gezeigten Experiment ein geringer Teil des L-Plastins im phosphorylierten Zustand vorlag (Abb. 4.2.1 A, weißer Pfeil). Die Stimulation über xCD3 alleine ergab ein ähnliches Spotmuster. Eine Intensitätszunahme des Spots, der phosphoryliertem L-Plastin entspricht, wurde nicht beobachtet (Abb. 4.2.1 A, Mitte). Dieses Ergebnis bestätigt, dass L-Plastin nicht über eine Stimulation von TZR/CD3 alleine phosphoryliert werden kann (Henning *et al.*, 1994). Indes nahm durch die Aktivierung über CD3xCD28 (Kostimulation) der phosphorylierte L-Plastin Spot deutlich an Intensität zu (Abb. 4.2.1 A, unten).

Im Folgenden wurde getestet, ob L-Plastin nur über Kostimulation via CD28 phosphoryliert werden kann oder ob eine Ko-Ligation von CD3 mit CD2 (CD3xCD2) ebenfalls zur Phosphorylierung führt. Dazu wurden PBT aus gesunden Spendern über CD3xCD2 oder CD3xCD28 30 Minuten bei 37°C aktiviert. Parallel dazu wurden die Zellen über den Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert. Es war bekannt, dass diese Stimulation in PMN zu einer starken L-Plastin Phosphorylierung führt (Jones und Brown, 1996). Anschließend wurden postnukleäre TKM-Lysate hergestellt und über 2D-Western-Blots analysiert. Die Abbildung 4.2.1 B zeigt, dass L-Plastin wie erwartet in unstimulierten Zellen hauptsächlich als ein einzelner Spot und somit unphosphoryliert nachzuweisen war (Abb. 4.2.1 B, oben). Durch Kostimulation über CD3xCD2 (Abb. 4.2.1 B, zweite Reihe) wurde eine ähnliche L-Plastin Phosphorylierung wie über CD3xCD28-Stimulation (Abb. 4.2.1 B, dritte Reihe) erreicht. Eine densitrometrische Auswertung der Spots ergab, dass nach T-Zell Stimulation über CD3xCD2 $48,6 \pm 5,8\%$ und über CD3xCD28 $54 \pm 4,5\%$ des NP40-löslichen L-Plastins phosphoryliert vorlagen (Abb. 4.2.1 C). Nach Stimulation mit PMA waren sogar $77,3 \pm 4,3\%$ des L-Plastins phosphoryliert. In dem gezeigten Experiment ist nach PMA-Stimulation neben dem phosphorylierten Spot ein zusätzlicher schwacher Spot zu erkennen

(Abb 4.2.1 B, Pfeil). Der Spot unterscheidet sich um weitere 0,05-0,1 pH-Einheiten von dem bereits beschriebenen phosphorylierten Spot. Dieser Spot konnte durch eine längere Belichtungszeit der Filme auch bei Kostimulation nachgewiesen werden (Abb. 4.2.1 D). Es ist derzeit nicht bekannt, welche Art der Modifikation diesen pH-Shift hervorruft. In den folgenden Experimenten sollte durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Orthophosphat geprüft werden, ob dieser Spot ebenfalls eine phosphorylierte Form von L-Plastin repräsentiert.

Um sicher zu stellen, dass die gezeigte Verschiebung des pIs von L-Plastin nach Stimulation tatsächlich mit einer Phosphorylierung einhergeht, wurden die Zellen vor der Stimulation mit radioaktivem Orthophosphat markiert. Dazu wurden PBT 3 h in phosphatfreiem Medium vorinkubiert und anschließend mit radioaktivem Orthophosphat (100 μ Ci/ ml 32 P-Orthophosphat) über Nacht markiert. Danach wurden die Zellen mit 10 nM PMA für 30 Minuten bei 37°C in einer 24 Loch-Platte stimuliert. Die Kontrollzellen wurden für den gleichen Zeitraum mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (DMSO) im Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine über 2D-SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Autoradiographie dieser Membran zeigte, dass in unstimulierten Zellen in dem Bereich, in dem L-Plastin zu erwarten ist, keine Phosphorylierung nachzuweisen war (Abb. 4.2.1 E, oben links). Nach 30-minütiger Stimulation waren jedoch deutliche Signale auf dem Autoradiogramm zu sehen (Abb. 4.2.1 E, oben rechts). Da L-Plastin in Leukozyten zu den 10 am stärksten exprimierten Proteinen gehört, sind bei kurzen Expositionszeiten des Films kaum Signale von anderen Phospho-Proteinen in dem betrachteten pH-Bereich detektierbar. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den detektierten Proteinen tatsächlich um L-Plastin handelte, wurde mit derselben Membran anschließend ein Western Blot mit L-Plastin spezifischen Antikörpern durchgeführt (Abb. 4.2.1 E, unten). Wie oben beschrieben, ist auch in diesem Experiment in unstimulierten Zellen nur ein L-Plastin Spot zu erkennen (Abb. 4.2.1 E, unten links). Nach der PMA-Behandlung erschienen wieder drei L-Plastin Spots, wobei der sauerste Spot nur einen sehr geringen Anteil des Proteins ausmachte. Die beiden L-Plastin Spots, die erst nach der Stimulation nachzuweisen waren, konnten mit denen aus der Autoradiographie in Deckung gebracht werden, was zeigt, dass es sich in beiden Fällen um Phospho-L-Plastin handelte. Die Frage, warum zwei phosphorylierte Spots auftraten, kann zurzeit nicht beantwortet werden. Dieses Ergebnis

Abbildung 4.2.2

**Abb. 4.2.2 Kinetik der L-Plastin Phosphorylierung nach CD3xCD28-Stimulation**

Der obere Teil der Abbildung zeigt L-Plastin 2D-Western Blots einer Stimulationskinetik von PBT. Die Zellen wurden für 5, 15, 30 und 60 Minuten über CD3xCD28 stimuliert oder unstimuliert gelassen (t=0 Minuten). Die quantitative Auswertung der Phosphorylierung erfolgte densitometrisch, wie in Abb. 4.2.1 beschrieben (unterer Teil der Abb.: n=2).

könnte so interpretiert werden, dass Spot 2 eine einfach phosphorylierte und Spot 3 eine doppelt phosphorylierte Form von L-Plastin darstellt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine Phosphorylierung Voraussetzung für eine weitere, bisher unbekannt posttranslationale Modifikation ist, die zu dem zusätzlichen Spot führt.

4.2.3 Kinetik der L-Plastin Phosphorylierung nach T-Zell-Kostimulation

Als nächstes wurde die zeitliche Kinetik der L-Plastin-Phosphorylierung nach T-Zell-Kostimulation über CD28 untersucht. Dazu wurden PBT über kreuzvernetzte Antikörper für 5, 15, 30 und 60 Minuten stimuliert bzw. unstimuliert gelassen ($t = 0$ Minuten). Anschließend wurden die Zellen geerntet und auf Eis mit TKM-Lysepuffer aufgeschlossen. Die Proteine wurden mittels 2D-Western Blots und L-Plastin-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.2.2, oben). Wie bereits gezeigt liegt L-Plastin in unstimulierten Zellen fast ausschließlich in unphosphorylierter Form vor (Abb. 4.2.2, unten). Bereits nach 5 Minuten nahm der Phospho-L-Plastin Anteil auf ca. 20% des gesamten L-Plastins zu. Die Menge an phosphoryliertem L-Plastin stieg in den ersten 20 Minuten schnell an und erreichte ein Plateau nach 30 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 45% des L-Plastins phosphoryliert. Innerhalb des beobachteten Zeitraums von einer Stunde blieb dieser Wert konstant. Interessanterweise war der schwache, dritte Spot bei diesen Experimenten am deutlichsten nach 30-minütiger Stimulation zu sehen und konnte nach 60 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden. Es ist daher Möglich, dass dieser Spot einen instabilen Übergangszustand darstellt.

4.2.4 Genetischer L-Plastin Polymorphismus in primären T-Zellen

Bereits 1983 wurde von Goldstein et al. eine allelische Variante von L-Plastin beschrieben (Goldstein *et al.*, 1985). In dieser Studie waren 18% der Spender heterozygot für L-Plastin. Die häufigere Form trugen rund 75% der untersuchten Spender. Diese L-Plastin-Form wurde als invariante Form bezeichnet. Die seltenere (variante) Form trugen in dieser Studie 7% der untersuchten Personen. Die beiden L-Plastin Varianten lassen sich im 2D-Western Blot aufgrund eines unterschiedlichen isoelektrischen Punktes unterscheiden. Demzufolge waren auf 2D-Western Blots von Lysaten aus unstimulierten PBT von heterozygoten Spendern bereits zwei Spots nachzuweisen (Abb. 4.2.3 A, oben). Die seltenere Form (Abb. 4.2.3 A, weiße Pfeile) wies einen basischeren pI (5,3) auf als die invariante Form (Abb. 4.2.3 A, schwarze Pfeile). Weiterhin zeigte die variante L-Plastin Form ein scheinbar niedrigeres Molekulargewicht, d.h. sie wanderte in der SDS-PAGE schneller als die invariante Form (Goldstein *et al.*, 1985). In eigenen Experimenten wurden 40 Spender auf diese Heterozygotie mit 2D-Western Blots untersucht. Bei 8 Spendern konnten beide allelischen Formen nachgewiesen werden, was einer Frequenz von 20%

entspricht und das Ergebnis von Goldstein et al. bestätigte. Daraus lässt sich eine Häufigkeit der selteneren Form von 1,2 % errechnen. Mit 7% waren daher bei Goldsteins Untersuchungen die für die variante L-Plastin Form homozygoten Spender überproportional vertreten.

Abbildung 4.2.3

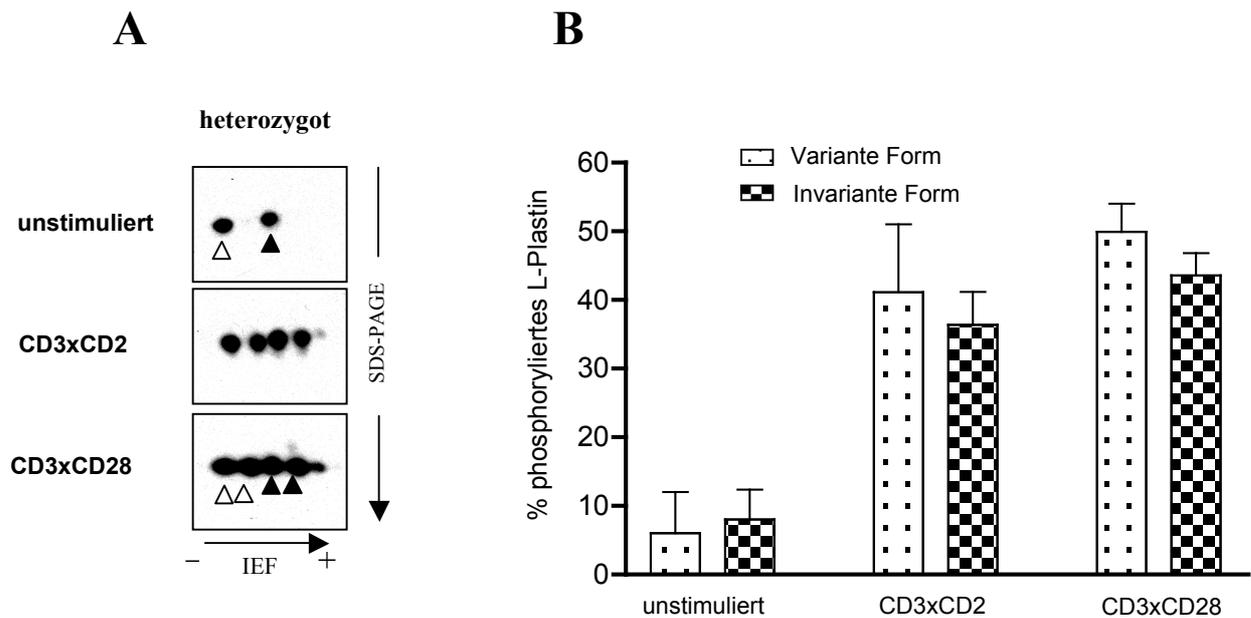


Abb. 4.2.3 Phosphorylierung der allelischen L-Plastin Varianten

Humane PBT, die heterozygot für L-Plastin waren, wurden wie unter Abb. 4.2.1 beschrieben stimuliert und die L-Plastin Phosphorylierung mittels 2D-Western Blots analysiert (A). Die weißen Pfeilspitzen zeigen die variante und die schwarzen Pfeilspitzen die invariante Form an. Die densitometrische Auswertung (B) zeigt die Mittelwerte der L-Plastin Phosphorylierung der beiden Allele von drei Spendern (Fehlerbalken = SE).

Es gab bis dato keine Untersuchungen darüber, ob die selteneren L-Plastin Variante sich in ihrer Phosphorylierbarkeit von der invarianten Form unterscheidet. Daher wurde als nächstes untersucht, ob in PBT nach Kostimulation beide L-Plastin Varianten in gleicher Weise phosphoryliert werden. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, über CD3xCD2 oder CD3xCD28 stimuliert und die Phosphorylierung über 2D-Western Blots analysiert (Abb. 4.2.3 A). Die densitometrische Auswertung der Spots ergab, dass beide

L-Plastin Varianten nach T-Zell-Kostimulation gleich stark phosphoryliert werden (Abb. 4.2.3. B). Somit können heterozygote Spender in Phosphorylierungsstudien einbezogen werden.

4.2.5 L-Plastin wird in PBT an Ser-5 phosphoryliert

Nachdem gezeigt wurde, dass L-Plastin nach Kostimulation phosphoryliert wird, sollte die genaue Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Es war bekannt, dass L-Plastin in humanen T-Zellen an Serin-Resten phosphoryliert wird (Henning *et al.*, 1994). In der Kopf-Domäne des Proteins wurden in Makrophagen zwei potentielle Phosphorylierungsstellen beschrieben, nämlich an Position 5 (Ser-5) und Position 7 (Ser-7) (Shinomiya *et al.*, 1995). Je nach Zelltyp können beide oder nur einer der Serin-Reste phosphoryliert werden. Lin *et al.* zeigten mit cDNA-exprimiertem L-Plastin in der Erythroleukämie-Zell-Linie K562, dass sowohl Ser-5 als auch Ser-7 phosphoryliert werden können. Welche dieser Phosphorylierungsstellen in PBT phosphoryliert wird, war nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass L-Plastin nach T-Zell Stimulation zwei phosphorylierte Spots aufweist, was möglicherweise auf eine doppelt phosphorylierte Form hinweist, die sowohl an Ser-5, als auch Ser-7 phosphoryliert ist. Dies wurde im Folgenden genauer untersucht.

4.2.5.1 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle von endogenem L-Plastin in untransformierten T-Zellen

Um herauszufinden, welche(r) Serin-Rest(e) in PBT phosphoryliert wird/werden, wurde zur zweifelsfreien Identifizierung dieser Phosphorylierungsstelle(n) Massenspektren von den verschiedenen L-Plastin Spots angefertigt (Kooperation mit dem European Molecular Biology Laboratory (EMBL)). Zur Erstellung des Massenspektrums wurden 10 Mio PBT mit 10 nM PMA für 30 Minuten stimuliert, lysiert und die Proteine durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.2.4 A). Alle L-Plastin Spots wurden ausgeschnitten und mit Trypsin vollständig verdaut. Die so erhaltenen Peptid-Gemische wurden mittels Tandem Massenspektrometrie analysiert. Dabei setzten sich alle Spots aus Peptiden zusammen, deren Massen eindeutig L-Plastin zuzuordnen waren (Abb. 4.2.4 B).

Insbesondere wurde nach Peptiden mit einer Masse von 1462 Da oder 1557 Da gesucht. Dieses Molekulargewicht errechnet sich aus einem Peptid von der Position 4 bis 15, das durch einen Trypsin-Verdau erhalten wird und einfach (1462 Da) oder doppelt (1557 Da) phosphoryliert ist. Sowohl in Spot 2 als auch in Spot 3 (Abb. 4.2.4 A) wurde das Peptid mit der Masse 1462 Da gefunden (Abb. 4.2.2 B). Dieses Ergebnis legte nahe, dass tatsächlich Ser-5 oder Ser-7 als Phospho-Akzeptor in PBT fungiert. Zusätzlich wurde ein

Abbildung 4.2.4

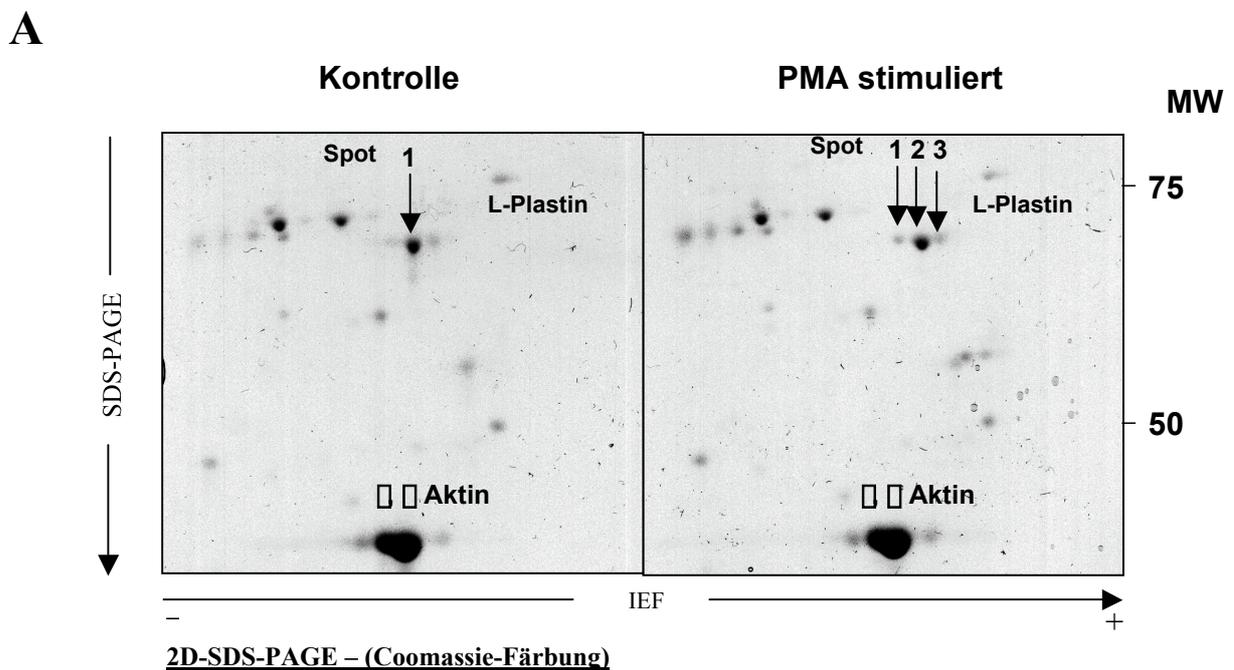


Abb. 4.2.4. Massenspektrometrische Analyse der L-Plastin Phosphorylierung

(A) PBT wurden entweder mit PMA stimuliert (**rechts**) oder unstimuliert (**links**) gelassen. Anschließend wurden die Proteine der postnukleären Lysate mittel 2D-SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidal **Coomassie** gefärbt. Die Pfeile deuten auf die drei L-Plastin Spots. Während Spot 1 unphosphoryliert ist, konnte für Spot 2 und 3 eine Phosphorylierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.2.1 E). (B) Die Tabelle gibt die gefundenen Massen in Dalton und die Position in der L-Plastin Sequenz an. Die rechte Spalte zeigt die ermittelte Aminosäure-Abfolge der sequenzierten Peptide im Einbuchstaben Kode.

MSO = Methionin-Oxidation, P = Phosphorylierung, [pS] = Phospho-Serin

B

Spot	Stimulation	Fragment (Position)	errechnete Masse (Da)	gefundene Masse (Da)	Sequenz
1	-	40-49	1060,56	1060,08	
		362-373	1405,79	1405,78	
		473-488	1675,83	1676,81	
1	PMA	473-488	1675,83	1675,85	
2	PMA	4-15	1461,56(P)	1462,0	G[pS]VSDEEMMERL
		4-15	1477,55(MSO), (P)	1479,0	G[pS]VSDEE[MMox]ERL
		69-76	998,51	998,51	
		473-488	1675,83	1675,84	
		264-272	1069,62	1069,62	
		402-412	1303,62(MSO)	1303,59	
		362-373	1405,79	1405,79	
		166-178	1518,74(MSO)	1518,73	
		597-610	1585,84	1586,84	
		52-68	1893,84	1893,84	
		413-432	2367,22	2369,25	
		374-395	2539,22	2540,31	
		546-570	2698,49	2699,50	
3	PMA	4-15	1461,59	1462,0	G[pS]VSDEEMMERL

Peptid mit der Masse 1479 Da gefunden. Auch diese Masse entspricht dem phosphorylierten Peptid von Position 4 bis 15: In diesem Peptid befinden sich zwei Methionin-Reste (Position 11 und 12). Methionin wird durch Luftsauerstoff schnell oxidiert, was zu Peptiden mit der Masse 1479 Da führte. Peptide mit einer Masse von 1557 Da, was einer zweifachen Phosphorylierung des Peptids 4 – 15 entspräche, wurden nicht gefunden.

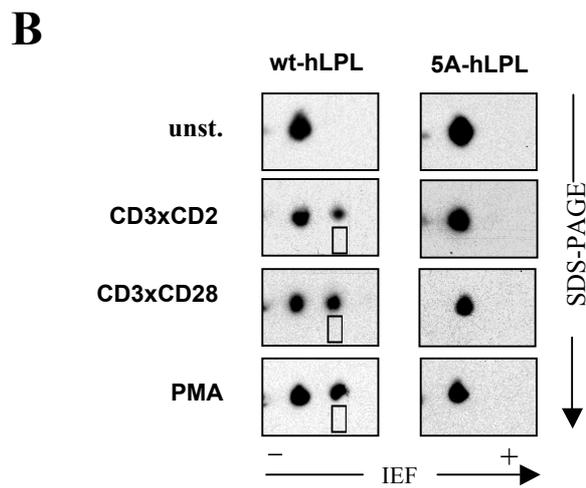
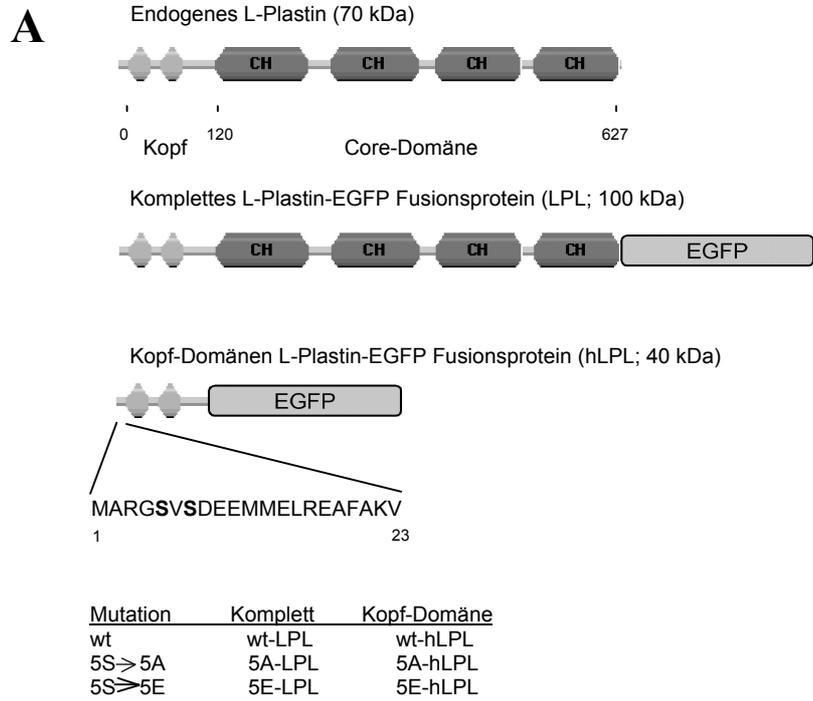
Nachdem diese massenspektrometrischen Analysen darauf hindeuteten, dass die gefundenen L-Plastin Peptide phosphoryliertes L-Plastin sind, wurden sie im Folgenden

zur genaueren Charakterisierung sequenziert (Abb. 4.2.4 B). Daraus ergaben sich eindeutig die Peptide „G[pS]VSDEEMMERL“ (1462 Da) und „G[pS]VSDEE[MMox]ERL“ (1479 Da). Es konnten keine Signale in diesem Spektrum detektiert werden, die auf Ser-7 als Phospho-Akzeptor hinwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Ser-5 als dominante L-Plastin Phosphorylierungsstelle identifiziert. Auch im zweiten phosphorylierten Spot (Abb. 4.2.4 A, Spot 3) konnte ein Peptid mit der Masse 1462 Da und der Sequenz „G[pS]VSDEEMMERL“ detektiert werden. Eine Phosphorylierung an Ser-7 oder eine doppelt phosphorylierte Form war auch in diesem Spot nicht nachzuweisen. Daraus ist zu schließen, dass in humanen PBT L-Plastin nur an Ser-5 phosphoryliert wird. Das Auftreten eines dritten Spots nach PMA Stimulation kann daher nicht durch eine zusätzliche Phosphorylierung erklärt werden. Höchstwahrscheinlich weist diese Form von L-Plastin eine weitere, bisher unbekannte posttranslationale Modifikation auf, für die möglicherweise die Phosphorylierung Voraussetzung ist.

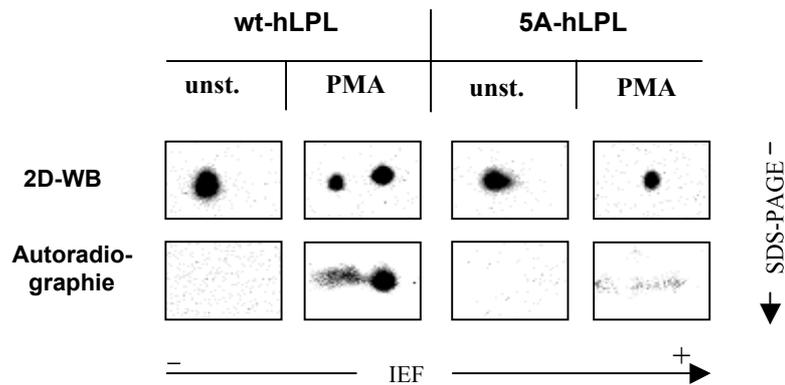
4.2.5.2 Ser-5 zu Ala-5 L-Plastin Mutanten werden in PBT nicht phosphoryliert

Zur weiteren funktionellen Analyse der Phosphorylierung von L-Plastin wurden EGFP-Fusionsproteine verwendet (Abb. 4.2.5 A). Aufgrund der vorangegangenen massenspektrometrischen Analyse wurden L-Plastin Konstrukte verwendet, die an der Position des Ser-5 eine Mutation zu Alanin kodierte. Diese sollten nicht mehr phosphorylierbar sein. Diese L-Plastin Mutanten wurden nicht nur als komplettes Konstrukt (LPL-Konstrukte, 100 kDa) eingesetzt, sondern auch als verkürzte Mutante, die nur die Kopf-Region umfasste (hLPL-Konstrukte, 40 kDa). Letztere eignen sich besonders für Phosphorylierungsstudien durch 2D-Western Blots, weil ihre Expression in primären PBT sehr hoch ist (s. Methoden). Mit diesen Mutanten sollte bestätigt werden, dass tatsächlich Ser-5 als einziger Phospho-Akzeptor dient. Dazu wurden PBT von gesunden Spendern an Tag 1 nach der Isolierung für die Nukleofektion (AMAXA Nucleofactor™ System) verwendet. Nur mit Hilfe dieses Systems war es möglich cDNA kodierte Konstrukte in ruhenden T-Zellen zu exprimieren, weil hierbei die cDNA direkt in den Zellkern eingebracht wird. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden 10 Mio PBT mit je 1 µg (EGFP) oder 5 µg (wt-hLPL und 5A-hLPL) cDNA gemischt und elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend in 3 ml Vollmedium aufgenommen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 nM PMA bzw. über kreuzvernetzte

Abbildung 4.2.5



C



D

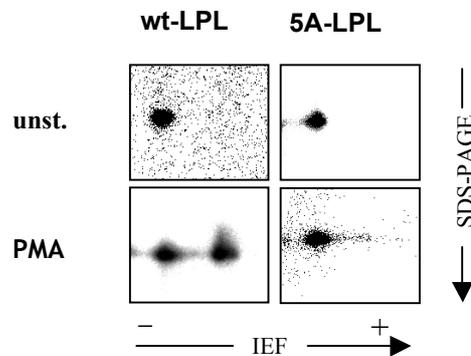


Abb. 4.2.5 Phosphorylierung von cDNA exprimiertem L-Plastin

(A) L-Plastin besteht aus einer Kopf- und einer Aktin-bindenden Kern-Domäne. Zur Transfektion in PBT wurden Konstrukte verwendet, die für L-Plastin-EGFP-Fusionsproteine kodierten, wobei entweder das vollständige L-Plastin (LPL) oder nur die Kopf-Domäne (hLPL) N-terminal an EGFP fusioniert waren.

(B) Transfizierte hLPL Konstrukte konnten in 2D-Western Blots mit L-Plastin spezifischen Antikörpern wie unter Abb. 4.2.1 beschrieben nachgewiesen werden. Die Pfeilspitzen (\square) zeigen die phosphorylierte L-Plastin Form.

(C) ^{32}P -markierte PBT wurden mit cDNA elektroporiert, die für wt-hLPL bzw. 5A-hLPL kodierte. Anschließend wurde mit PMA stimuliert. Die obere Reihe zeigt ein 2D-L-Plastin-Western Blot und die untere Reihe stellt das entsprechende 2D-Autoradiogramm dar.

(D) PBT, die komplette L-Plastin Fusionsproteine (wt-LPL, 5A-LPL) exprimieren, wurden mit PMA stimuliert und anschließend L-Plastin im 2D-Western Blot nachgewiesen.

Antikörper gegen CD3 \times CD2 oder CD3 \times CD28 für 30 Minuten bei 37°C stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen aus den gleichen Elektroporationsansätzen. Die Zellen wurden sodann geerntet, lysiert und die Proteine mittels 2D-Western Blot analysiert. Wie zu erwarten, konnte im unstimulierten Zustand weder für den Wildtyp noch für die

5A-Mutante eine Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 4.2.5 B, oben). Nach der Stimulation tauchte im Falle der wt-hLPL transfizierten Zellen ein weiterer Spot auf, nicht aber bei Zellen, die mit 5A-hLPL-Fusionsprotein transfiziert wurden (Abb. 4.2.5 B, Reihe 2 – 4, weißer Pfeil). Um sicher zu stellen, dass dieser Spot Phospho-L-Plastin darstellt, wurden PBT mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Hierbei wurden die Zellen nach der Elektroporation drei Stunden bei 37°C inkubiert, bevor die radioaktive Markierung über Nacht erfolgte ($100 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{32}P -Orthophosphat). Daraufhin wurden die Zellen für 30 Minuten stimuliert und die Phospho-Proteine durch 2D-Gelelektrophoresen mit anschließender Autoradiographie (Abb. 4.2.5. C, unten) analysiert. Hinterher wurde L-Plastin mittels 2D-Western Blot (Abb. 4.2.5. C, oben) detektiert. Wie Abb. 4.2.5 C zeigt, wurde im Gegensatz zum wt-hLPL die 5A-hLPL Mutante nicht phosphoryliert. Damit war sicher gestellt, dass L-Plastin in der Kopf-Domäne nur an Ser-5 phosphoryliert wird.

Allerdings konnte auf Basis dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, dass in der Core-Domäne weitere Phosphorylierungen stattfinden. Um dies zu überprüfen, wurden die kompletten L-Plastin Konstrukte, wt-LPL und 5A-LPL, in PBT exprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 nM PMA für 30 Minuten stimuliert. Der Phosphorylierungsstatus der L-Plastin Fusionsproteine wurde mittels 2D-Western Blots analysiert. Tatsächlich zeigten auch diese Konstrukte das gleiche Muster, wie schon für die Kopf-Domäne beschrieben (Abb. 4.2.5 D). Während die Stimulation von wt-LPL exprimierenden Zellen zu einem zusätzlichen Spot führte, ist nach der Stimulation mit PMA keine Modifikation für das 5A-LPL Konstrukt nachzuweisen. Dadurch war eindeutig gezeigt, dass L-Plastin in primären PBT nur an Ser-5 phosphoryliert wird. Die kompletten Konstrukte wurden im Folgenden auch für funktionelle Studien eingesetzt werden.

4.2.6 Nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutanten haben einen dominant-negativen Effekt auf die T-Zellaktivierung

Nachdem die Phosphorylierungsstelle von L-Plastin in humanen PBT identifiziert war, sollte ermittelt werden, ob T-Zellen, die eine cDNA kodierte, nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutante (5A-LPL) exprimieren, Defekte in ihrer Aktivierbarkeit zeigen. Obwohl die Nukleofektion die Expression von cDNA-Konstrukten in PBT ermöglicht, ist aufgrund einer hohen Mortalität der Zellen zwei Tage nach der Nukleofektion eine Bestimmung der Proliferation, die nach 72 Stunden gemessen wird, nicht möglich. Es wurde daher ein früher Aktivierungsmarker gesucht, der - wie die L-Plastin Phosphorylierung - abhängig

von Kostimulation ist. CD69 erscheint bereits wenige Stunden nach der Stimulation auf der Zelloberfläche und bleibt für mehrere Tage stabil nachweisbar (Lopez-Cabrera *et al.*, 1993; Marzio *et al.*, 1999). Es wurde daher getestet, ob in primären T-Zellen eine Abhängigkeit der CD69-Expression von Kostimulation besteht. Dazu wurden PBT für 16 Stunden über xCD3, CD3xCD2, CD3xCD28 oder PMA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit PE-markierten Antikörpern gegen CD69 inkubiert. Die durchflußzytometrische Auswertung ergab, dass die Stimulation über xCD3 alleine (Signal 1) nicht ausreichte, um eine CD69-Expression zu induzieren (MFI=10 ± 0,8, s. Abb. 4.2.6 A), wohingegen Kostimulation (Signal 1 plus 2) über CD3xCD2 (MFI=94 ± 32) und CD3xCD28 (MFI=60,5 ± 19) zu einer sechsfach höheren CD69-Expression führte. Im Einklang mit früheren Berichten führte auch eine Phorbolster-Stimulation über PMA zu einer deutlichen CD69-Expression (MFI=142 ± 46) (Taylor-Fishwick und Siegel, 1995). Diese Ergebnisse zeigten, dass die CD69-Expression zur Darstellung von Kostimulation in PBT geeignet war.

Mit diesem System wurde nun getestet, ob die nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutante 5A-LPL die T-Zellaktivierung, gemessen an der CD69-Expression, beeinflusst. Zur Kontrolle wurden in parallelen Ansätzen die Effekte von wt-LPL und EGFP alleine getestet. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Konstrukten wurde eine Ser-5 zu Glu-5 Mutante (5E-LPL) verwendet. Phosphoryliertes Serin und Glutaminsäure (E) ähneln sich in Größe und Ladung, weshalb solch ein Aminosäure-Austausch häufig zur Nachahmung einer konstitutiven Phosphorylierung benutzt wird (Ling *et al.*, 2004). Drei Stunden nach der Nukleofektion wurden die PBT mit oder ohne Platten-gebundene Antikörper gegen CD3xCD2 oder CD3xCD28 bzw. PMA für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, fixiert und mit PE-markierten monoklonalen Maus-Antikörpern gegen CD69-gefärbt. Zur Auswertung der CD69-Expression wurden nur Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für EGFP zwischen 10^1 und 10^2 betrachtet, damit alle Konstrukte unabhängig von der maximalen Expression der verschiedenen Mutanten verglichen werden konnten. Die CD69-Expression der EGFP exprimierenden Zellen wurde gleich eins gesetzt und die der Zellen, die ein Fusionsprotein exprimieren, als relative Werte dazu errechnet. Die wt-LPL exprimierenden Zellen zeigten nach CD3xCD2 ($0,9 \pm 0,08$, relative Expression, Abb. 4.2.6 B) und PMA ($1,1 \pm 0,4$, Abb. 4.2.6 B) Stimulation eine ähnlich starke Expression von CD69 wie EGFP exprimierende Zellen. Bei CD3xCD28-stimulierten Zellen war die CD69-Expression in wt-LPL exprimierenden

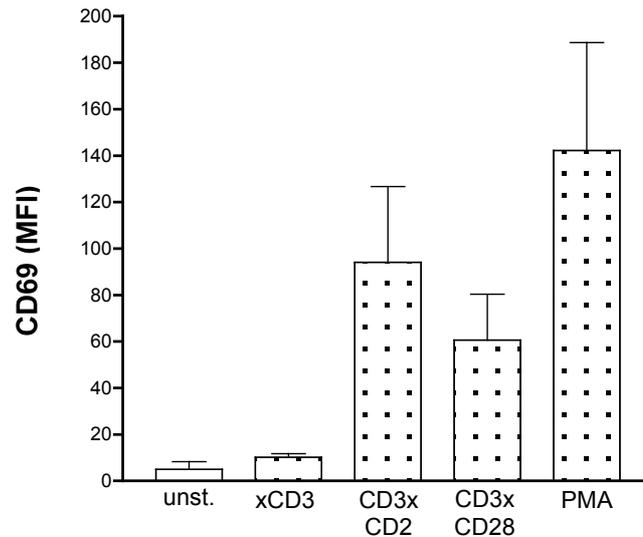
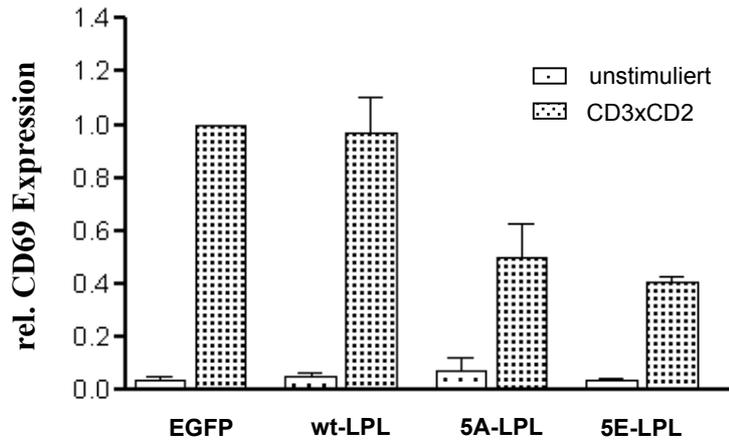
Abbildung 4.2.6

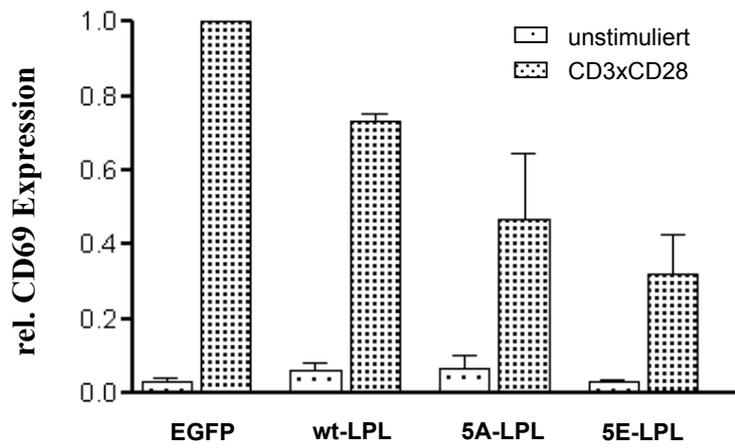
Abb. 4.2.6 Expression von CD69 nach Stimulation untransfizierter bzw. L-Plastin transfizierter PBT
(A) CD69 Expression von PBTs nach Stimulation. PBTs wurden wie angegeben stimuliert und anschließend die CD69 Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität als Mittelwert aus drei Experimenten und die Standardfehler.
(B) EGFP, wt-LPL, 5A-LPL oder 5E-LPL wurden in humanen PBT exprimiert. Anschließend wurden die Zellen für 16 h über CD3xCD2, CD3xCD28 oder PMA stimuliert und danach die CD69 Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt. In der Abbildung ist die relative CD69 Expression gezeigt. Die Werte, die mit stimulierten EGFP exprimierenden Zellen erhalten wurden, wurden gleich eins gesetzt. Die anderen Werte wurden relativ zu diesen Werten angegeben. Die Expression bezieht sich jeweils auf Zellen mit einer MFI für EGFP zwischen 10^1 und 10^2 .

B

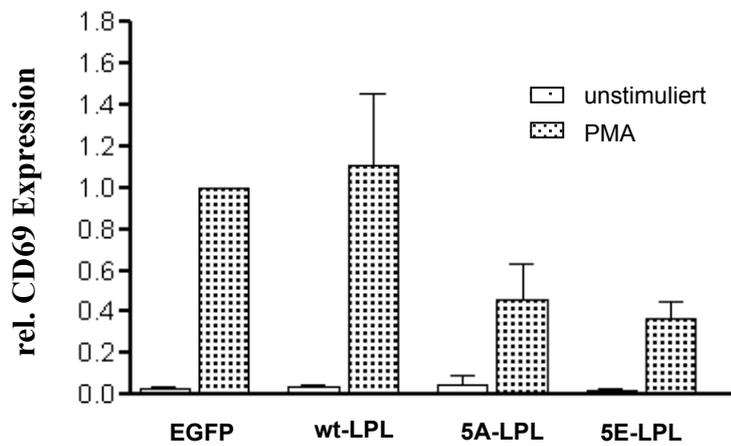
CD3xCD2



CD3xCD28



PMA



Zellen um etwa ein Viertel ($0,5 \pm 0,2$, Abb. 4.2.6 B) niedriger als bei der EGFP transfizierten Kontrolle. Bei allen getesteten Stimulationen war das CD69-Signal bei 5A-LPL exprimierenden Zellen niedriger verglichen mit wt-LPL exprimierenden Zellen. Die Expression reduzierte sich um 51% nach CD3xCD2, 37% bei CD3xCD28 und 58% bei PMA-Stimulation. Daraus ist abzuleiten, dass die 5A-LPL Konstrukte einen dominant-negativen Effekt auf die CD69-Expression der T-Zellen haben. Der inhibierende Effekt ist allerdings nicht quantitativ, was durch die hohe Expression von endogenem L-Plastin erklärt werden kann. Ein ähnliches Resultat wurde mit Zellen erzielt, die vor der CD69-Färbung fixiert und permeabilisiert wurden (Daten nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die Inhibierung der CD69-Expression nicht auf einem gestörten Transport des Proteins auf die Zelloberfläche beruhte, sondern die CD69-Proteinbiosynthese nicht stattfand.

Überraschenderweise war der negative Effekt auf die CD69-Expression auch bei 5E-LPL exprimierenden Zellen zu beobachten. Hier betrug die relative CD69-Expression $0,41 \pm 0,1$ (CD3xCD2), $0,3 \pm 0,01$ (CD3xCD28) oder $0,4 \pm 0,09$ (PMA) (Abb. 4.2.6 B). Weiterhin konnte auch in Anwesenheit dieser Konstrukte in PBT nach alleiniger xCD3-Stimulation keine CD69-Expression erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund zeigte zusätzlich, dass in diesem System die Mutation des Serin-Restes zu Glutaminsäure möglicherweise nicht den gewünschten Effekt hat, nämlich die konstitutive Phosphorylierung, nachzuahmen. Vermutlich wirkt diese Mutante wie die nicht-phosphorylierbare 5A-LPL Mutante.

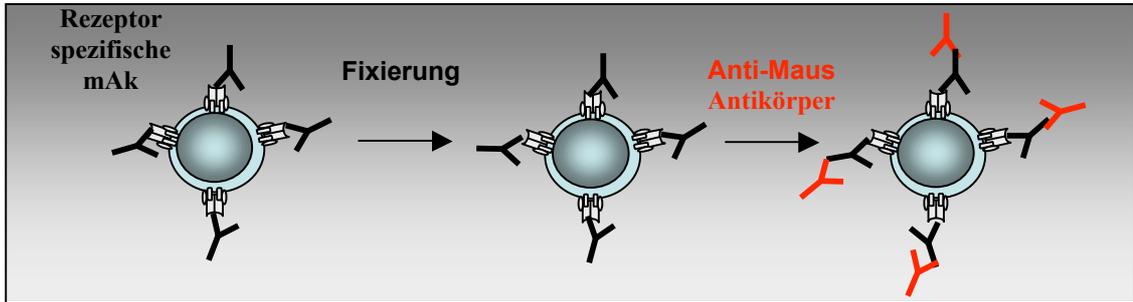
4.3 L-Plastin ist an der Clusterbildung von Rezeptoren auf PBT beteiligt

Bei der Aktivierung von T-Zellen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wird an der Kontaktzone eine hoch strukturierte Aktivierungs- und Effektorzone ausgebildet. Dort befinden sich große Rezeptor-Aggregate, die so genannten SMACs. Die Cluster sind für die Stimulation der T-Zellen sowie die Erfüllung von deren Funktionen essentiell. Für die Ausbildung dieser Cluster an der Kontaktzone von T-Zellen und ihren APZ sind sowohl Kostimulation von T-Zellen als auch die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wichtig. Nachdem gezeigt wurde, dass das Aktin-bündelnde Protein L-Plastin nach

Abbildung 4.3.1

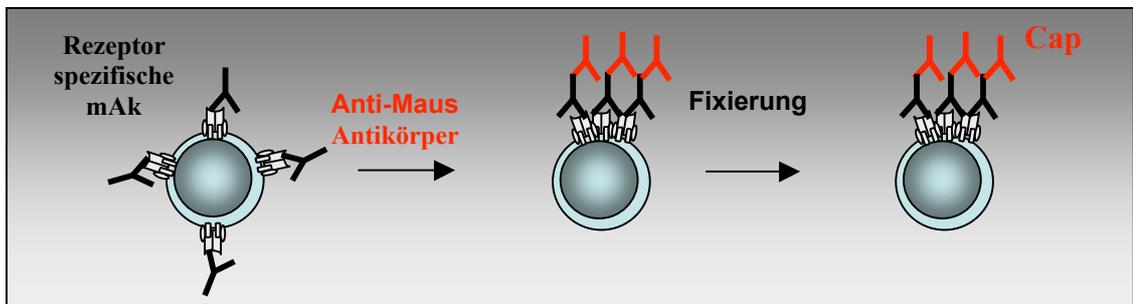
A

Ohne Kreuzvernetzung

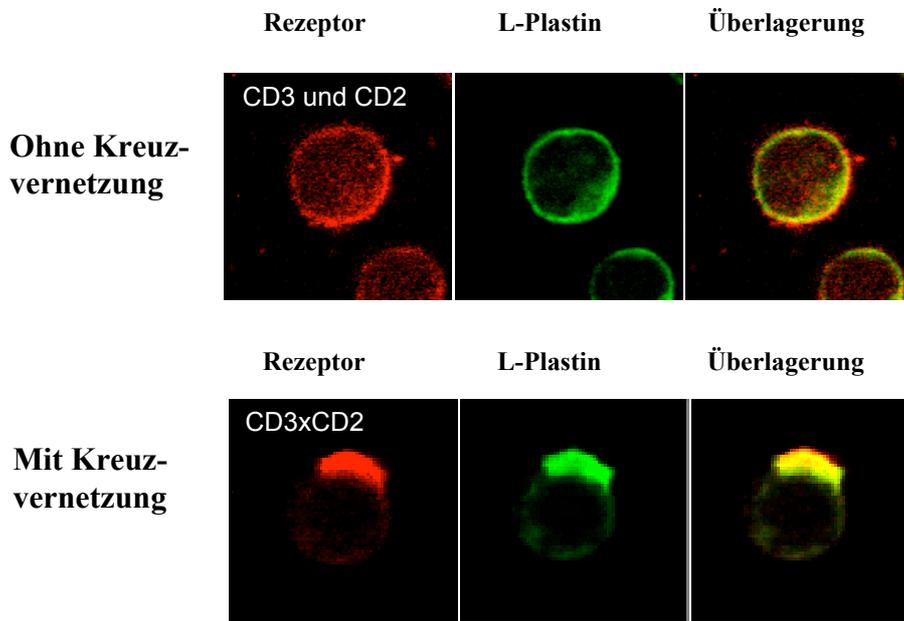


Modell

Mit Kreuzvernetzung



B



LSM Bild

Abb. 4.3.1 Rezeptor-Caps

(A) Der obere Abschnitt zeigt das experimentelle Vorgehen zur Analyse von Rezeptor-Caps. T-Zellen werden mit monoklonalen Maus-Antikörpern (Y) gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül beladen und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Ziege-Anti-Maus Antikörpern (Y) inkubiert. Werden die Zellen vor Inkubation des Zweitantikörpers fixiert, erhält man eine normale Oberflächenfärbung (**oben**). Wenn die Zellen vor der Inkubation mit den Sekundärantikörpern nicht fixiert werden, entstehen große Rezeptor-Kluster (Caps) an einem Pol der Zelle (**unten**). (B) Konfokale Laserscan-Mikroskopie (**LSM**) Bilder solcher Experimente sind im unteren Abschnitt gezeigt. Die Rezeptoren (hier: CD3 und CD2) ist rot (**links**) und L-Plastin grün (**Mitte**) gefärbt. Kolo-kalisation erkennt man in der Überlagerung (**rechts**) als gelbe Färbung.

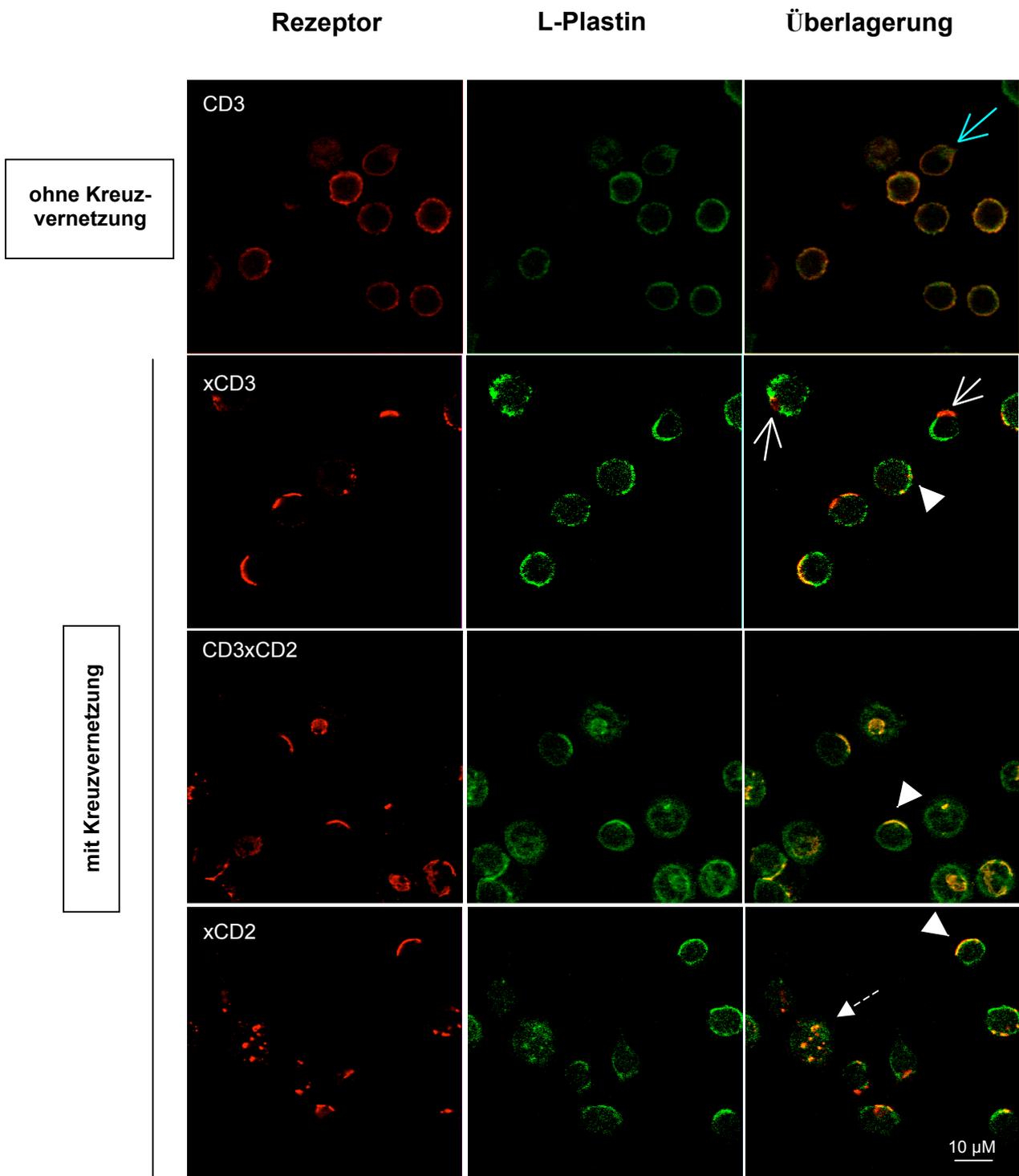
Kostimulation von T-Zellen phosphoryliert wird, lag die Vermutung nahe, dass es auch an der Ausbildung oder Stabilisierung von Rezeptor-Klustern beteiligt sein könnte. Eine Methode, um das Klustern von Rezeptoren zu untersuchen, ist die Induktion von Rezeptor-Caps (oder Caps). Dabei werden Rezeptor-Kluster mit Antikörpern, die gegen Oberflächenrezeptoren gerichtet sind, induziert (Abb. 4.3.1 A). Durch eine Kreuzvernetzung der Rezeptoren, die in unstimulierten Zellen gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind, können an einem Pol der Zelle größere Rezeptor-Aggregationen induziert werden. In einem konfokalen Laserscan Mikroskopie-Bild stellt sich ein solches Cap je nach optischer Schnittebene und Größe bzw. Lage des Caps als „Sichel“ oder als ein bis zwei große Kluster dar (Abb. 4.3.1. B).

4.3.1 L-Plastin reichert sich in Rezeptor-Caps an

In dieser Arbeit wurden Rezeptor-Caps auf primären humanen PBT induziert. Dazu wurden die Zellen für 15 Minuten mit Antikörpern gegen Oberflächenrezeptoren inkubiert (CD3 bzw. CD2 alleine oder CD3 und CD2 in Kombination) und diese danach entweder mit Sekundär-Antikörpern kreuzvernetzt und anschließend fixiert (Abb. 4.3.2 A, Reihen 2 - 4) oder direkt mit 4% Paraformaldehyd fixiert (Abb. 4.3.2 A, obere Reihe). Wie zu erwarten, waren Rezeptoren, die nicht vernetzt wurden, auf T-Zellen mit runder Morphologie gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt. Auch L-Plastin zeigte eine gleichmäßige Verteilung. Einige Zellen wiesen jedoch Regionen mit einer lokalen Anreicherung von L-Plastin auf (Abb. 4.3.2, obere Reihe, blauer Pfeil). Diese lokalen Anhäufungen entstanden vermutlich an Membranaustülpungen (Lamellipodien), die unter anderem bei der Zellmigration gebildet werden.

Abbildung 4.3.2

A



B

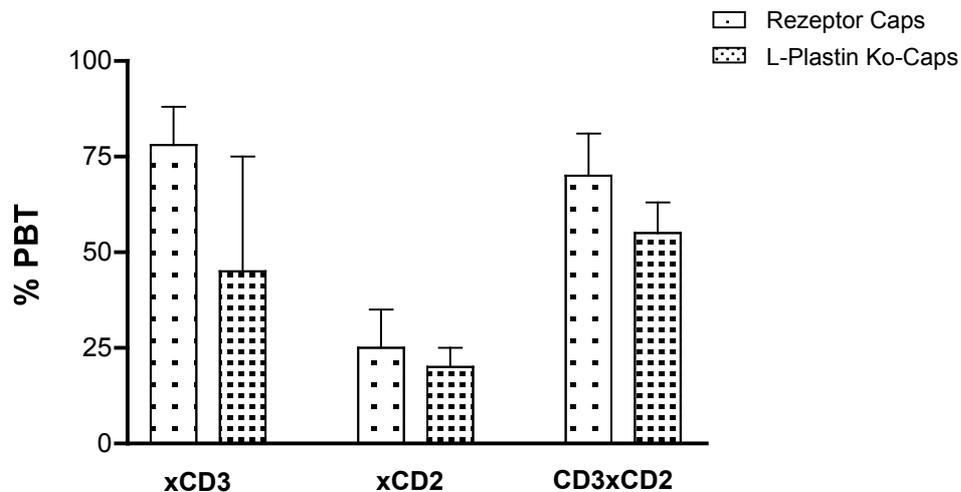


Abb. 4.3.2 L-Plastin in Rezeptor-Caps

(A) Humane PBT wurden mit je 10 µg/ml Maus-anti-CD3, -CD2 oder anti-CD3 plus anti-CD2 (**rot**) inkubiert und entweder direkt fixiert (ohne Kreuzvernetzung) oder zuvor mit Ziege-Anti-Maus Antikörpern vernetzt (mit Kreuzvernetzung). Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und L-Plastin mit spezifischen Kaninchen-Antikörpern und Cy2-markierten Anti-Kaninchen Antikörpern detektiert (**grün**). Die rechte Spalte stellt eine Überlagerung beider Fluoreszenzen dar. Bei Zellen mit einem L-Plastin Ko-Cap spiegelt sich die Rezeptor-Struktur (rot) auch deutlich in der L-Plastin-Färbung (grün) wieder. In der Überlagerung erscheint ein Ko-Cap in der Regel gelb. Mit **Pfeilspitzen** sind Ko-Lokalisierungen markiert, während **durchgehende Pfeile** sich gegenseitig ausschließende Lokalisierungen von L-Plastin und Rezeptor-Klustern anzeigen. Weiterhin ist ein L-Plastin „Hot Spot“ mit **blauem Pfeil** und kleine Rezeptor Cluster mit einem **gestrichelten Pfeil** markiert.

(B) Quantifizierung der Rezeptor-Caps. Gezeigt ist der Mittelwert der Prozentsätze von Zellen mit Cap-Struktur von 5 Spendern, wobei mindestens 100 Zellen pro Spender gezählt wurden. Die Balken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. **Definition Cap:** Mindestens 2/3 der Rezeptoren müssen nach visueller Abschätzung zu einem oder maximal zwei Polen der Zelle verlagert sein.

Nach der Rezeptor-Kreuzvernetzung bildeten sich bei $70 \pm 11\%$ (CD3xCD2), $78 \pm 10\%$ (xCD3) oder $25 \pm 10\%$ (xCD2, mitogene Antikörper) der PBT Rezeptor-Caps aus (Abb. 4.3.2 B). Interessanterweise führte eine Kreuzvernetzung von CD2-Molekülen alleine zur Ausbildung von kleinen, punktförmigen Klustern, die z.T. intrazellulär zu finden waren (Abb. 4.3.2 A, untere Reihe, gestrichelter Pfeil). Ungeachtet dessen war L-Plastin dabei deutlich an den CD3xCD2- und xCD2-Klustern angereichert und ko-lokalisierte dort mit den Rezeptoren (Abb. 4.3.2 A, Reihe 3 und 4, weiße Pfeilspitzen). Die deutliche Anreicherung von L-Plastin in den CD2- bzw. CD3xCD2-Rezeptor-Caps deutet auf eine Beteiligung von L-Plastin an der Ausbildung oder Stabilisierung solcher Rezeptor-Kluster hin.

Im Gegensatz dazu ist L-Plastin bei xCD3-Klusterbildung überproportional häufig nicht in den Rezeptor-Caps angereichert (Abb. 4.3.2 A, zweite Reihe, und B), bzw. zeigt dort sogar eine „Anti-Lokalisierung“, d.h. L-Plastin reichert sich an einer anderen Seite der Zelle ab als die Rezeptor-Caps (Abb. 4.3.2 A zweite Reihe, Pfeile). Der extrem große Standardfehler der Quantifizierung in Abb. 4.3.2 B ist auf interindividuelle Unterschiede zurückzuführen (Abb. 4.3.2 B): Während einige Spender eine Ko-Lokalisierung in fast 80% der Zellen aufwiesen, konnte bei anderen Spendern nur bei 20% der Zellen eine echte Ko-Lokalisierung festgestellt werden. Diese Schwankungen könnten durch unterschiedliche Verhältnisse von Gedächtnis- versus naiven T-Zellen begründet sein. In den folgenden Experimenten wurde dieser Punkt analysiert.

4.3.1.1 L-Plastin reichert sich in xCD3-Rezeptor-Caps von CD45RO-positiven T-Zellen, nicht jedoch von CD45RA-positiven T-Zellen an

Wie bereits erwähnt konnte bei xCD3 Rezeptor-Caps durch interindividuelle Schwankungen keine allgemeingültige Aussage über eine Ko-Lokalisierung von L-Plastin in diesen Klustern getroffen werden. Je nach Spender zeigte eine sehr variable Anzahl von Zellen ein L-Plastin Ko-Cap. Mögliche Ursachen hierfür könnten einerseits in einer unterschiedlichen Voraktivierung der T-Zellen einiger Spender liegen, z.B. durch einen unbemerkten Infekt. Andererseits könnten die Varianzen durch variable Verteilungen von T-Zell Subpopulationen begründet sein. Die letztere Möglichkeit ist sehr wahrscheinlich, da die größten T-Zell Subpopulationen, nämlich die naiven und Gedächtnis T-Zellen, unterschiedliche Anforderungen bezüglich ihrer Aktivierung aufweisen und sich daher auch hinsichtlich der Rezeptor-Caps unterscheiden könnten. Um diese Annahme zu testen wurden aus PBMC eines gesunden Spenders CD45RA- und CD45RO-positive T-Zellen über Magnetsäulen-Separation isoliert. Die gewonnenen Subpopulationen wurden durchflußzytometrisch auf Kontamination mit anderen Zellen überprüft. Die Reinheit betrug mindestens 95%.

Nach der Aufreinigung wurden xCD3 und CD3xCD2 Rezeptor-Caps induziert und per konfokaler Laserscan-Mikroskopie analysiert (Abb. 4.3.3). Während sich L-Plastin nach

Abbildung 4.3.3

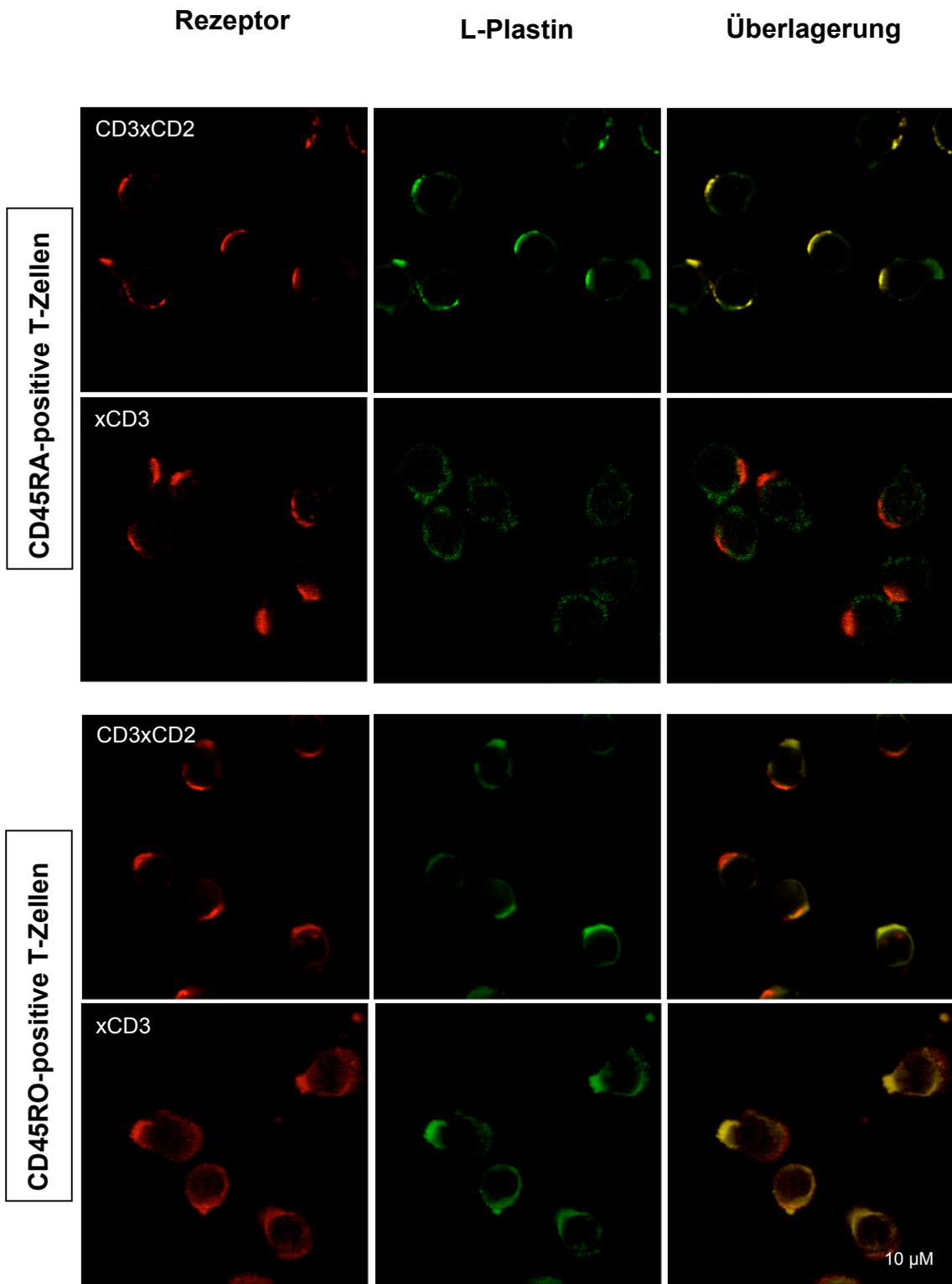


Abb. 4.3.3 Differentielle Ko-Caps in CD45RA- und CD45RO-positiven T-Zellen

Dargestellt sind xCD3 und CD3xCD2 Rezeptor-Caps von **CD45RA-** (oberer Teil) und **CD45RO-positiven T-Zellen** (unterer Teil), die wie in Abbildung 4.3.2 induziert wurden. Die Rezeptoren sind in **rot** dargestellt, während L-Plastin in **grün** abgebildet ist. Die rechte Spalte zeigt eine digitale Überlagerung.

Kostimulation über CD3xCD2 in den Rezeptor-Caps beider Subpopulationen anreicherte und Ko-Caps nachgewiesen werden konnten, ergab sich durch nach Kreuzvernetzung von CD3 in beiden Subpopulationen ein unterschiedliches Bild. In CD45RA-positiven Zellen kam es zu keiner Anreicherung von L-Plastin in und um die xCD3 Kluster. CD45RO-positive Zellen wiesen dagegen bei reiner CD3 Kreuzvernetzung deutliche L-Plastin Ko-Caps auf. Dieser Befund erklärt die interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern bezüglich der xCD3-Caps, denn die Anzahl der CD45RO+ T-Zellen kann zwischen einzelnen Menschen je nach vorangegangenen Infektionen extremen Schwankungen unterliegen.

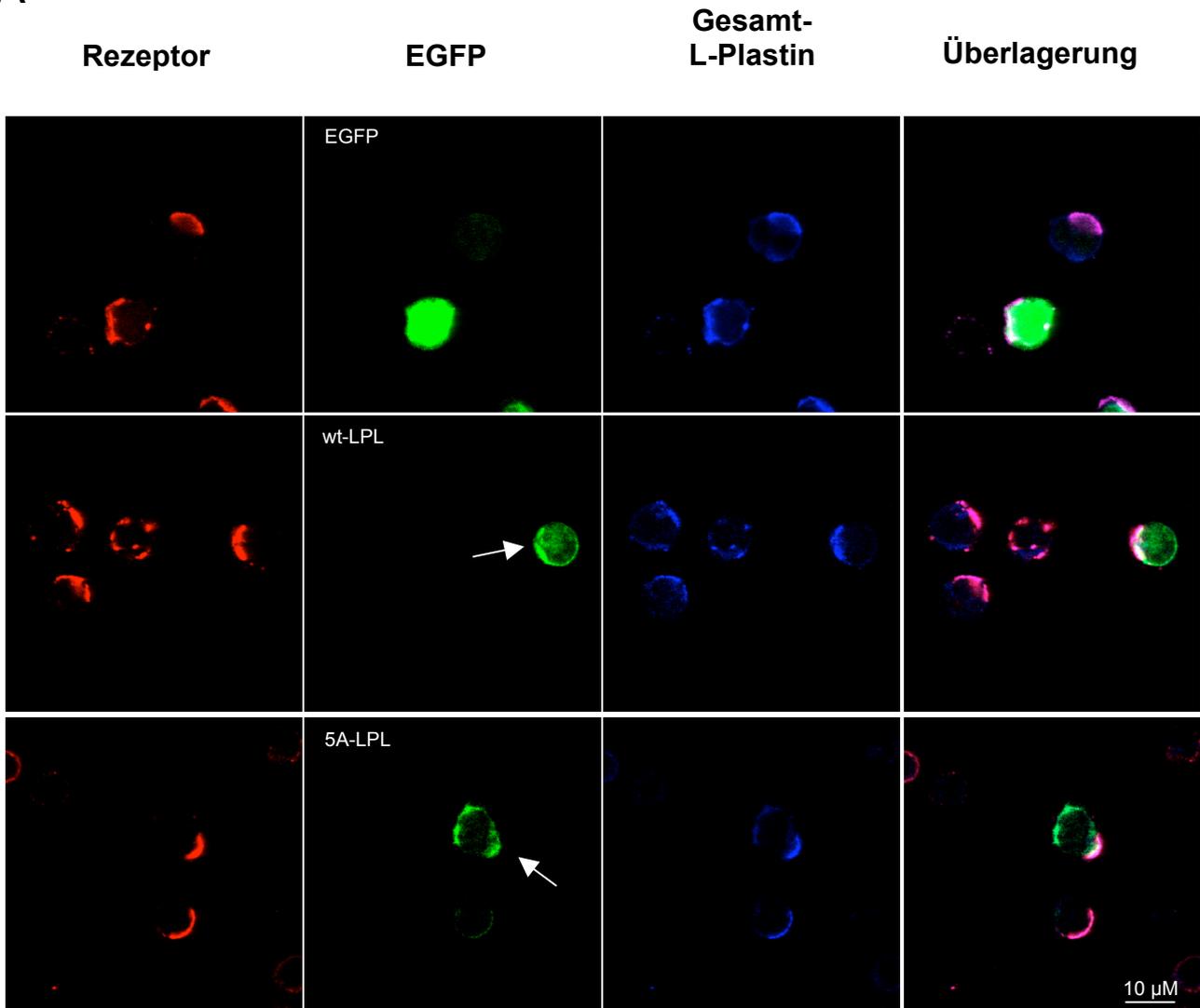
Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Funktion von L-Plastin lag und nicht in der differenziellen Analyse von T-Zell Subpopulationen, wurden im Folgenden nur CD3xCD2 Rezeptor-Kluster untersucht. Eine Aufreinigung von T-Zell Subpopulationen war nicht nötig, da bei CD3xCD2 kein Unterschied zwischen den Populationen feststellbar war.

4.3.2 Rezeptor-Caps können durch cDNA exprimierte L-Plastin Mutanten nicht inhibiert werden

In Kapitel 4.2 wurde gezeigt, dass 5A-LPL exprimierende PBT eine reduzierte CD69-Expression nach Ko-Stimulation aufweisen. Daher sollte untersucht werden, ob die Expression von nicht-phosphorylierbaren Mutanten die Ausbildung der Rezeptor-Caps inhibiert. Dazu wurden in PBT aus gesunden Spendern entweder EGFP-markierte L-Plastin Konstrukte (wt-LPL, 5A-LPL) oder als Kontrolle EGFP alleine exprimiert und anschließend Rezeptor-Caps induziert. EGFP alleine war sowohl im Zytoplasma als auch im Kern gleichmäßig verteilt (Abb 4.3.4 A, grüne Färbung in der oberen Reihe). Im Gegensatz dazu waren die 100 kDa großen EGFP-L-Plastin Fusionsproteine, wt-LPL und 5A-LPL, weitgehend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.3.4 A, mittlere und untere Reihe). Dort reicherten sie sich wie das endogene L-Plastin in den Rezeptor-Caps an und ko-lokalisierten mit dem endogenen L-Plastin (Abb. 4.3.4, blaue Färbung). Interessanterweise

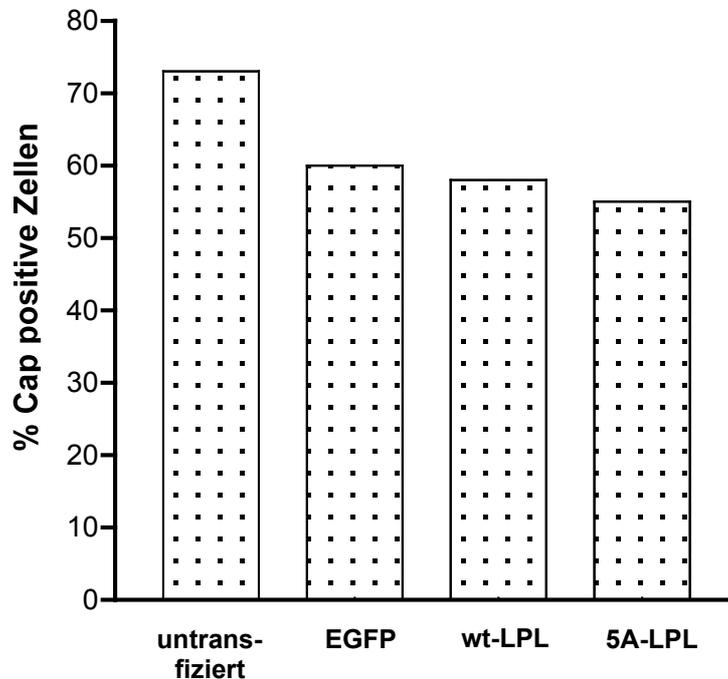
Abbildung 4.3.4

A

**Abb. 4.3.4 CDNA exprimiertes L-Plastin in Rezeptor-Caps**

CDNA kodiertes L-Plastin wurde in PBT transfiziert und anschließend wurden Rezeptor-Caps (CD3xCD2) induziert. Die Caps sind in der linken Spalte in **rot** dargestellt, EGFP in **grün** und die L-Plastin Antikörperfärbung (endogenes plus cDNA exprimiertes L-Plastin) in **blau** (**A**). Eine Überlagerung aller drei Fluoreszenzen erscheint bei Ko-Lokalisierung in weiß. Das Histogramm (**B**) zeigt die Quantifizierung von einem von zwei Experimenten. Gezeigt ist der Prozentsatz Cap-positiver transfizierter Zellen.

B



war kein Unterschied bezüglich der Re-Lokalisierung von L-Plastin zwischen wt-LPL und der 5A-LPL Mutante feststellbar. Da auch das nicht-phosphorylierbare 5A-LPL Konstrukt im Cap zu finden war, kann man davon ausgehen, dass die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Anreicherung von L-Plastin in Rezeptor-Caps hat.

Eine Auszählung der Rezeptor-Caps ergab, dass 73% der untransfizierten Zellen Rezeptor-Caps ausbildeten (Abb. 4.3.4 B). Im Ansatz, bei dem nur der Kontrollvektor (pEGFP-N1) transfiziert wurde, waren immer noch 60% Rezeptor-Caps zu finden. Die Expression von wt-LPL oder 5A-LPL zeigte keinen Unterschied in der Ausbildung von Rezeptor-Caps verglichen mit EGFP-exprimierenden Zellen. Für dieses Ergebnis gibt es zwei Interpretationsmöglichkeiten: Entweder hat die L-Plastin Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Ausbildung von Rezeptor-Klustern oder die Konstrukte sind nicht dominant negativ, wie es für die Inhibierung der CD69-Expression beobachtet wurde.

4.3.3 Defekte Ausbildung von Rezeptor-Caps durch BPB-induzierte L-Plastin Inhibierung

Als nächstes wurde ermittelt, ob L-Plastin per se an der Ausbildung von Rezeptor-Klustern beteiligt ist. Da es keine L-Plastin negativen T-Zellen gibt, musste eine andere Technik gefunden werden, mit der L-Plastin *in vivo* inhibiert werden konnte. Eine solche Möglichkeit bietet die niedermolekulare Substanz Bromo-Phenacylbromid (BPB). In niedrigen Konzentrationen bindet BPB spezifisch an L-Plastin (Rosales *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass man aus Lysaten von Zellen, die mit 1 μM BPB vorbehandelt wurden, ausschließlich L-Plastin mit BPB ko-immunpräzipitieren kann. Die Bindung von BPB an L-Plastin ist hierbei kovalent (Rosales *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Tatsache lag es nahe, zu untersuchen, ob Rezeptor-Caps durch Bindung von BPB an L-Plastin spezifisch inhibiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst PBT mit 1 μM BPB für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden Rezeptor-Caps induziert. Während Zellen, die lediglich mit dem Lösungsmittel (Ethanol) behandelt worden sind, normale Rezeptor-Caps bei $70 \pm 12\%$ der Zellen ausbildeten (Abb. 4.3.5 A, obere Reihe), waren bei BPB-vorbehandelten Zellen nur noch maximal 1/5 der Zellen ($15 \pm 5\%$) fähig, große Rezeptor-Kluster zu bilden (Abb. 4.3.5 B). Der Rest der Zellen bildete lediglich sehr kleine, auf der Zelloberfläche verteilte Kluster (Rezeptor-Patches) (Abb. 4.3.5 A, mittlere Reihe). Interessanterweise reicherte sich L-Plastin nicht in diesen Rezeptor-Patches an, sondern blieb diffus im Zytoplasma verteilt.

Für BPB wurde außer der Bindung an L-Plastin auch eine inhibitorische Wirkung auf Phospholipase A2 (PLA2) beschrieben (Roberts *et al.*, 1977). Anders als in oben dargelegten Experimenten, in denen 1 μM BPB zur L-Plastin Inhibierung verwendet wurde, musste die Substanz jedoch in wesentlich höheren Konzentrationen (bis zu 550 μM) eingesetzt werden, um PLA2 zu inhibieren. PLA2 ist ein wasserlösliches Enzym, das die Spaltung der Esterbindung bestimmter Phospholipide katalysiert, wodurch Arachidonsäure freigesetzt wird. Aus dieser wiederum entstehen inflammatorische Metabolite, die Leukotriene und Prostaglandine (Stryer, 1996). Es gibt bis dato keine Hinweise darauf, dass diese Eicosanoide an frühen Aktivierungsprozessen, insbesondere der Clusterung von Rezeptoren, beteiligt sind. Weiterhin liegt die Konzentration, die für eine PLA2 Inhibierung durch BPB nötig ist, um mindestens den Faktor 500 über der hier benutzten Konzentration. Um dennoch zweifelsfrei auszuschließen, dass die Effekte von

Abbildung 4.3.5

A

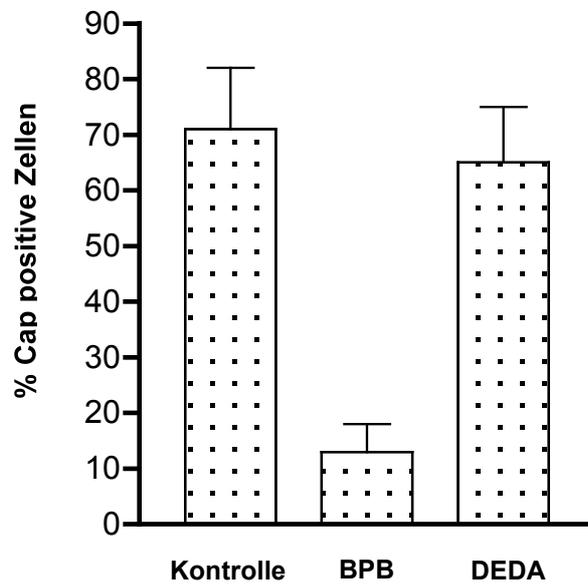
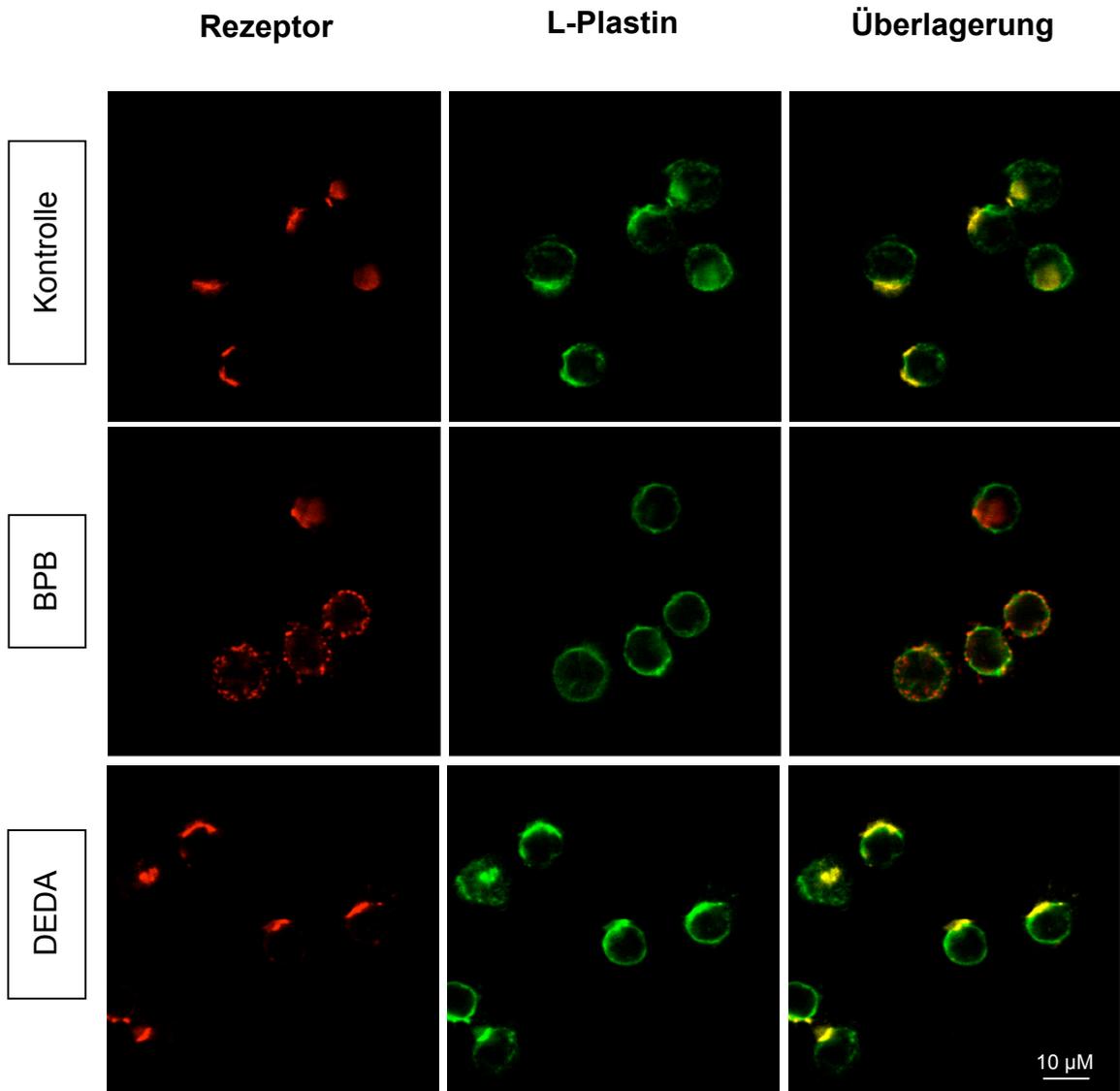


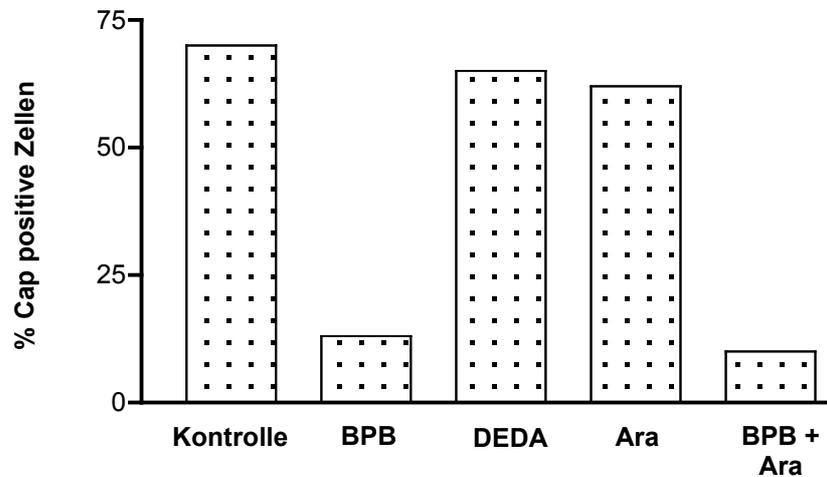
Abb. 4.3.5 Inhibierung von Rezeptor-Caps durch BPB

(A) PBT wurden mit oder ohne 1 μM BPB oder mit 50 μM DEDA für 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden CD3 \times CD2 Rezeptor-Caps induziert. Die Caps sind in **rot** dargestellt und L-Plastin in **grün**. Die Quantifizierung (B) zeigt die Mittelwerte des Prozentsatzes an Zellen mit Cap-Struktur aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Es wurden pro Experiment mindestens 100 Zellen gezählt.

BPB auf Rezeptor-Caps auf eine Inhibierung der PLA2 zurückzuführen sind, wurde in parallelen Ansätzen die Wirkung des PLA2-Inhibitors 7,7-Dimethyleicosadiensäure (DEDA) auf die Ausbildung der Caps untersucht. DEDA ist ein nicht-metabolisierbares Substrat der PLA2 und hat einen IC_{50} von 16 μM . Eine vollständige Hemmung der PLA2 wurde mit 50 μM beschrieben (Lister *et al.*, 1989; Oskarsson *et al.*, 1999). Mit dieser Konzentration wurden PBT für 30 Minuten inkubiert und anschließend Rezeptor-Caps induziert. In der Abbildung 4.3.5 A (untere Reihe) ist zu sehen, dass weder die Ko-Lokalisierung von L-Plastin in den Rezeptor-Caps, noch die Anzahl der Caps (Abb. 4.3.5 B) durch DEDA beeinflusst wurde. Da eine Hemmung der PLA2 mit einer Inhibierung der Proliferation von T-Zellen einhergeht (Roshak *et al.*, 2000), wurde in einem Parallelansatz die Wirkung von DEDA durch Messung der Proliferation von PBT sichergestellt (s.u.).

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die Inhibierung der Rezeptor-Caps durch Arachidonsäure rekonstituiert werden kann. Arachidonsäure ist das Endprodukt der PLA2 und es wurde bereits von Lefkowitz *et al.* gezeigt, dass durch Zugabe von Arachidonsäure eine BPB-induzierte Hemmung der PLA2 übergangen werden kann (Lefkowitz *et al.*, 1991). Um diesen Rekonstitutionseffekt auf die Ausbildung von Rezeptor-Caps zu untersuchen, wurden PBT mit 1 μM BPB, 50 μM DEDA, 1 μM Arachidonsäure oder 1 μM BPB plus 1 μM Arachidonsäure für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend Rezeptor-Caps induziert. Wie in Abbildung 4.3.6 zu sehen ist, konnte die BPB-induzierte Inhibierung der Rezeptor-Caps jedoch nicht durch Zugabe von Arachidonsäure umgangen werden. Aufgrund der in Abb. 4.3.5 und 4.3.6 gezeigten Daten kann praktisch ausgeschlossen werden, dass der inhibitorische Effekt von BPB auf der Hemmung von PLA2 beruht. Offensichtlich beeinflusst BPB die subzelluläre Lokalisation von L-Plastin und hemmt möglicherweise dadurch die Ausbildung von Rezeptor-Caps.

Im Folgenden wurde untersucht, ob BPB neben der Cap-Inhibierung auch zu einer Beeinträchtigung der Aktivierbarkeit von PBT führt. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von 1 μM BPB oder 50 μM DEDA 72 Stunden über plattengebundene

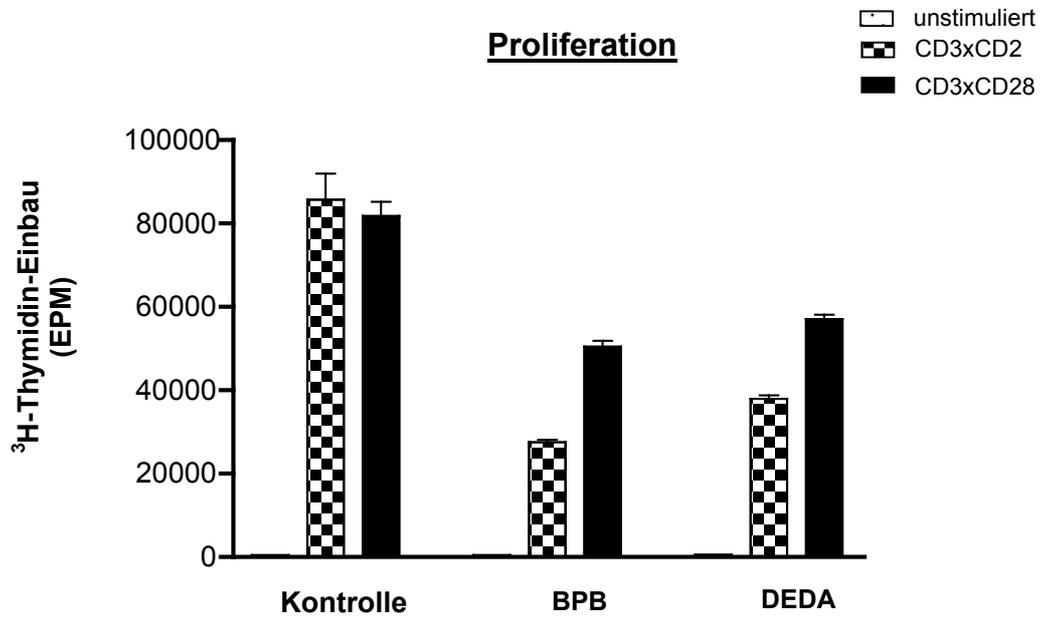
Abbildung 4.3.6**Abb. 4.3.6 Die BPB-induzierte Cap-Inhibierung wird nicht durch Arachidonsäure gerettet**

PBT wurden mit 1 μ M BPB, 50 μ M DEDA, 1 μ M Arachidonsäure (Ara) oder mit BPB in Kombination mit Ara für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden (CD3xCD2) Rezeptor-Caps induziert und ausgezählt. Pro Ansatz wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet. Gezeigt ist der Prozentsatz an Zellen mit Cap-Struktur.

Antikörper (CD3xCD2 oder CD3xCD28) stimuliert. In der Abbildung 4.3.7 A ist eine repräsentative Dreifachmessung der Proliferation dargestellt. Als Maß für die Proliferation diente der Einbau von 3 H-Thymidin in die DNA der Zellen. Auf der Ordinate ist die Einbaurrate als Ereignisse pro Minute (EPM) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass BPB einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung der Zellen hatte. Auch der PLA2 Inhibitor DEDA führte zu einer Inhibierung der Proliferation nach T-Zell-Kostimulation. Dadurch war gleichzeitig sicher gestellt, dass DEDA in dem verwendeten System funktionierte (vergleiche Abb. 4.3.5). Parallel dazu wurde untersucht, ob die verwendeten Inhibitoren die Lebensfähigkeit der Zellen beeinflussen (Abb. 4.3.7 B). Dazu wurden die Zellen für 3 bzw. 72 Stunden mit 1 μ M BPB oder 50 μ M DEDA inkubiert. Anschließend wurden 250 ng/ml Propidium Iodide (PI) zugegeben, wodurch tote Zellen angefärbt wurden. PI durchdringt ausschließlich die Membran toter Zellen. Dort interkaliert es in toten Zellen in die DNA und kann mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. In

Abbildung 4.3.7

A



B

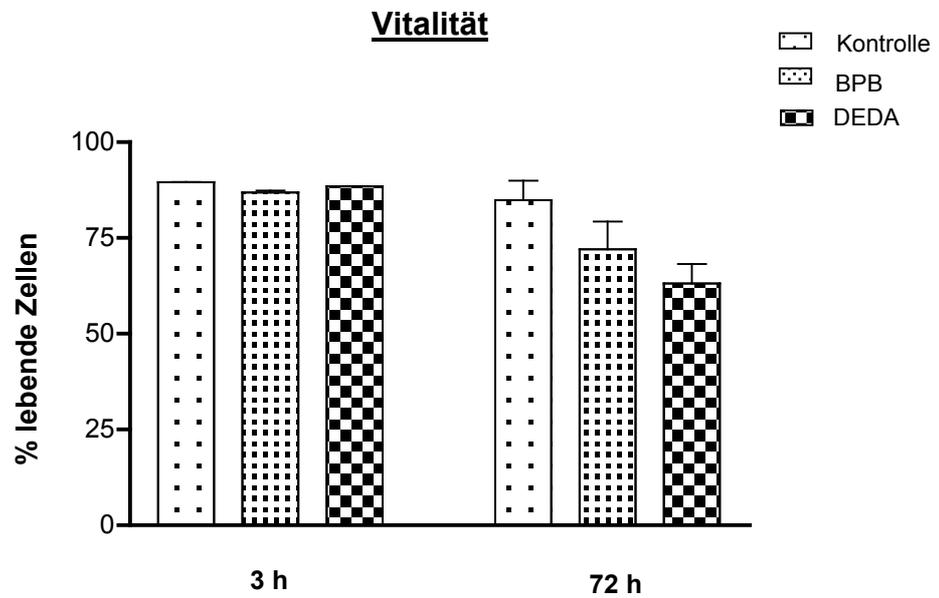


Abb. 4.3.7 BPB inhibiert die Proliferation von PBT

Zur Messung der Proliferation (A) wurden die Zellen mit oder ohne 1 μM BPB bzw. 50 μM DEDA für 56 Stunden über CD3xCD2 oder CD3xCD28 stimuliert und weitere 16 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der ^3H -Thymidin-Aufnahme als Ereignisse pro Minute (EPM) einer repräsentativen Dreifachbestimmung mit Standardfehler. (B) Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 1 μM BPB oder 50 μM DEDA für 3 (**links**) oder 72 (**rechts**) Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid für 10 Minuten inkubiert und die Aufnahme mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

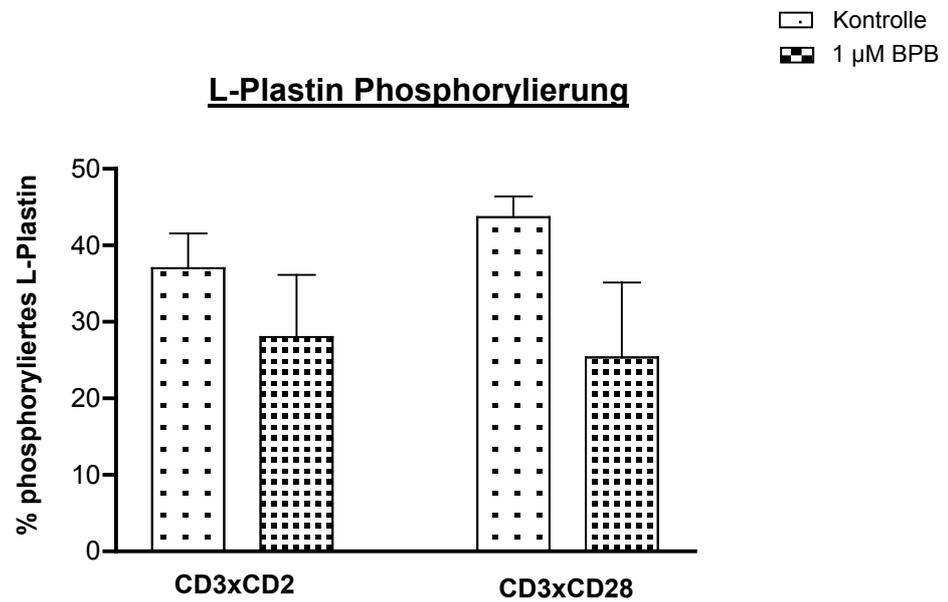
Abbildung 4.3.7 B ist dargestellt, dass nach 3 Stunden weder BPB noch DEDA eine Toxizität aufwiesen. Nach 72 h waren im Kontroll-Ansatz $84,8 \pm 8,7\%$ der Zellen PI negativ, d.h. lebend. Die Anzahl verringerte sich durch BPB ($72 \pm 12,2\%$) nur gering. Nach Inkubation mit DEDA lebten noch $63,2 \pm 8,7\%$ der Zellen.

4.3.3.1 Die Phosphorylierung von L-Plastin wird durch BPB nur schwach inhibiert

Der Mechanismus, über den L-Plastin durch BPB gehemmt wird, ist nicht bekannt. Es ist lediglich sicher, dass BPB kovalent an L-Plastin bindet (Rosales *et al.*, 1994). Ein möglicher Mechanismus, über den BPB wirken könnte, ist die Inhibierung der L-Plastin Phosphorylierung. Daher wurde der Einfluss von BPB auf die Phosphorylierung von L-Plastin getestet. Hierzu wurden PBT mit 1 μM BPB oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend über plattengebundene Antikörper gegen CD3 in Kombination mit CD2 oder CD28 für 30 Minuten stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und der Phosphorylierungs-Status von L-Plastin über 2D-Western Blots dargestellt. Gleichzeitig wurde die Phosphorylierung der Src-Kinase Lck an Ser-59 durch 1D-Western Blots analysiert. Die Phosphorylierung von Lck an Ser-59 wird nur durch T-Zell-Kostimulation erreicht (Schroeder *et al.*, 2000) und eignet sich daher zur Kontrolle von Phosphorylierungsereignissen, die von Kostimulation abhängig sind. Die Ser-59 Phosphorylierung korreliert mit einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-Gelen. Durch diese Änderung der elektrophoretischen Mobilität erscheint das 59 kDa große Protein (p56Lck) bei scheinbaren 60 kDa (p60Lck); dies wird als Lck-Shift bezeichnet.

Abbildung 4.3.8

A



B

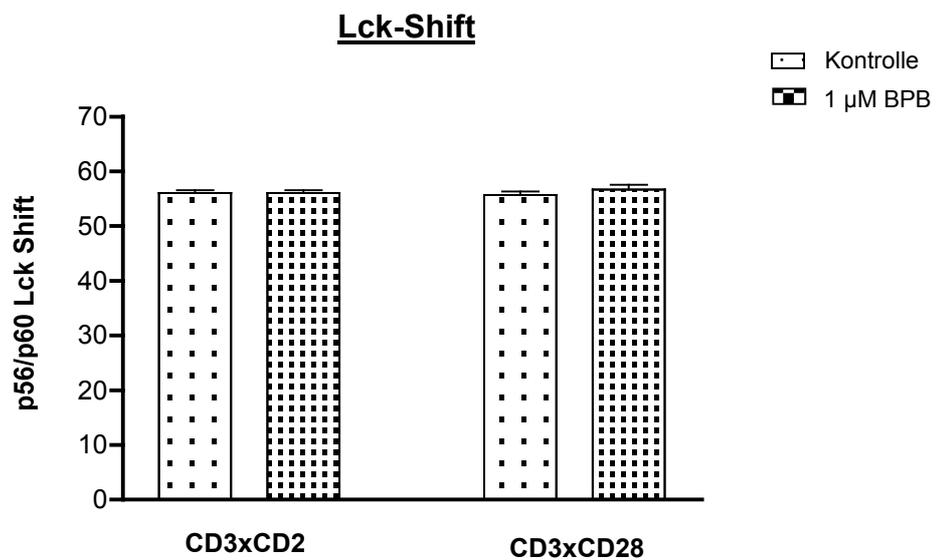


Abb. 4.3.8 BPB inhibiert die L-Plastin Phosphorylierung

Zur Darstellung des Einflusses von BPB auf die L-Plastin Phosphorylierung wurden PBT mit 1 μ M BPB für 30 Minuten vorinkubiert und danach über CD3xCD2 oder CD3xCD28 für 30 Minuten stimuliert. Die L-Plastin-Phosphorylierung wurde mittels 2D-Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung ermittelt. Die Abbildung zeigt die L-Plastin Phosphorylierung aus drei unabhängigen Experimenten (A). Der untere Graph zeigt die gleichzeitige Messung des Lck-Shifts in 1D-Gelen (B). Angegeben ist das Verhältnis aus p56Lck und Gesamt-Lck.

In Abbildung 4.3.8 A ist zu sehen, dass 37 ± 4 % (CD3xCD2) bzw. 44 ± 3 % (CD3xCD28) des L-Plastins nach Kostimulation von PBT phosphoryliert wurden. Die Vorbehandlung mit BPB ergab eine L-Plastin Phosphorylierung, die mit $28,8 \pm 8$ % (CD3xCD2) und 25 ± 10 % (CD3xCD28) geringfügig unter den Werten ohne BPB lagen. Der Unterschied war nur bei CD3xCD28-, nicht aber bei CD3xCD2-Stimulation signifikant (überlappende Fehlerbalken). Die gleichzeitige Messung des Lck-Shifts zeigte, dass BPB keinen Einfluss auf die Phosphorylierung dieses Proteins hatte (Abb. 4.3.8 B). Die Hemmung der L-Plastin Phosphorylierung beruht daher nicht auf einer allgemeinen Inaktivierung der Zellen. Allerdings kann diese relativ schwache Hemmung der L-Plastin Phosphorylierung alleine auch nicht die profunde Cap-Inhibierung durch BPB erklären.

4.3.4 Umgehung der BPB-induzierten Cap-Inhibierung durch cDNA exprimiertes L-Plastin

Um herauszufinden, ob die Cap-Inhibierung durch BPB wirklich auf eine Hemmung von L-Plastin durch BPB-Bindung zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Rekonstruktions-Ansatz etabliert: Unter der Annahme, dass BPB kovalent an L-Plastin bindet, sollte die Inhibierung der Rezeptor-Caps auch noch nach dem Herauswaschen von ungebundenem BPB nachweisbar sein. Weiterhin müsste dieser Effekt nach dem Herauswaschen transient sein, denn von der Zelle neu synthetisiertes L-Plastin, das nicht an BPB gebunden ist, sollte wieder funktionell sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden PBT für 30 Minuten mit 1 μ M BPB vorinkubiert und danach ungebundenes BPB durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden über 6 Stunden alle 60 Minuten Caps induziert und zusätzlich einmal nach 24 Stunden. Tatsächlich wurde die Cap-Bildung anfangs auch noch inhibiert, wenn die Zellen nach der BPB Inkubation intensiv gewaschen wurden (Abb. 4.3.9, t = 0 h). Die Zeit-Kinetik verdeutlicht, dass dieser

Abbildung 4.3.9

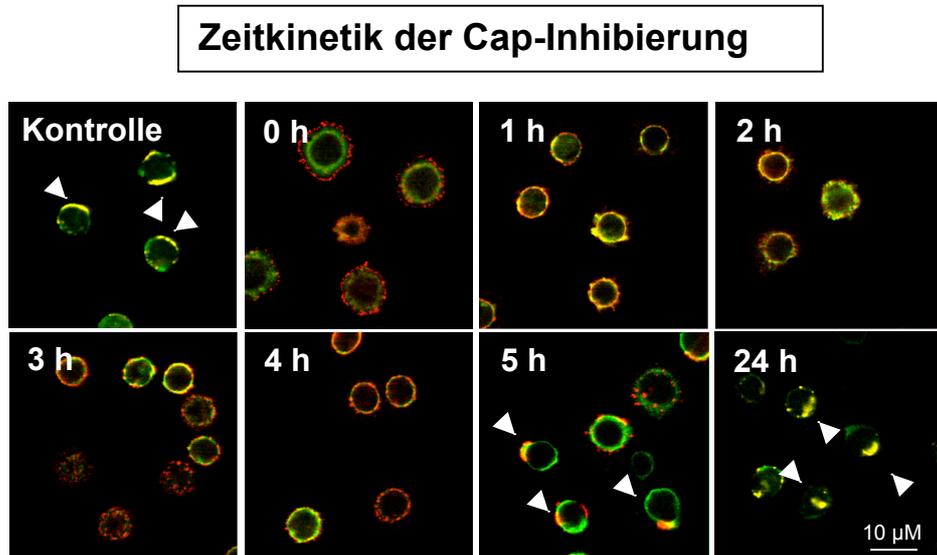


Abbildung 4.3.10

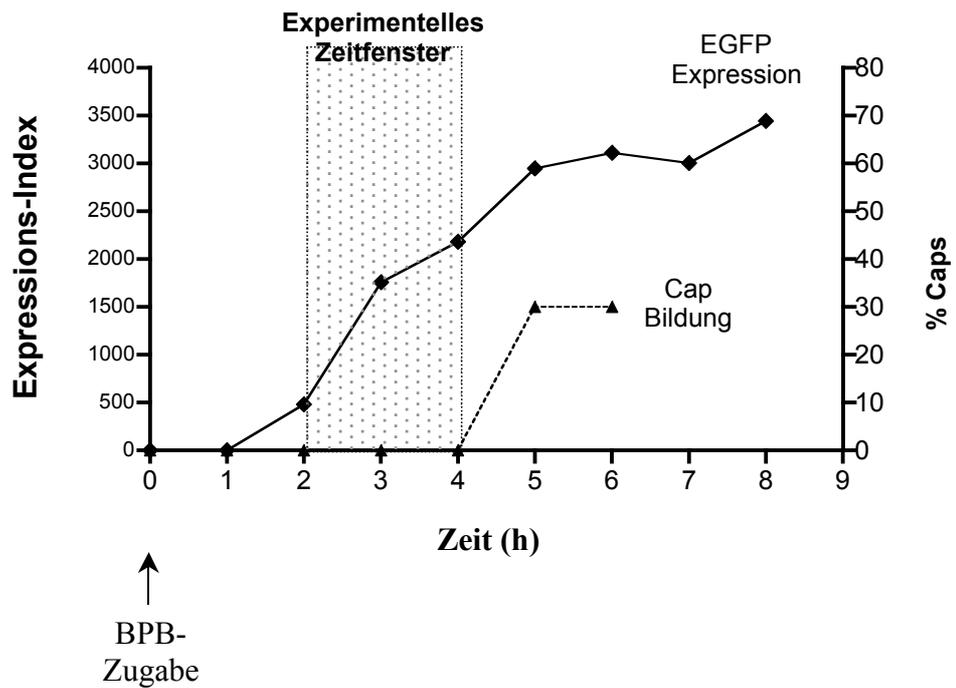


Abb. 4.3.9 Transiente Inhibierung der Cap-Bildung durch BPB

PBT wurden mit 1 μM BPB für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes BPB durch Waschen entfernt und CD3xCD2 Rezeptor-Caps induziert. Die Abbildung zeigt Überlagerungen der Rezeptoren (**rot**) und L-Plastin (**grün**) Färbungen nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 25 Stunden. Zusätzlich wurden Rezeptor-Caps mit unbehandelten Zellen (**Kontrolle**) induziert. Die **weißen Pfeile** deuten auf Rezeptor-Caps.

Abb. 4.3.10 Experimentelles Zeitfenster zur Rettung der BPB-vermittelten Cap-Inhibierung

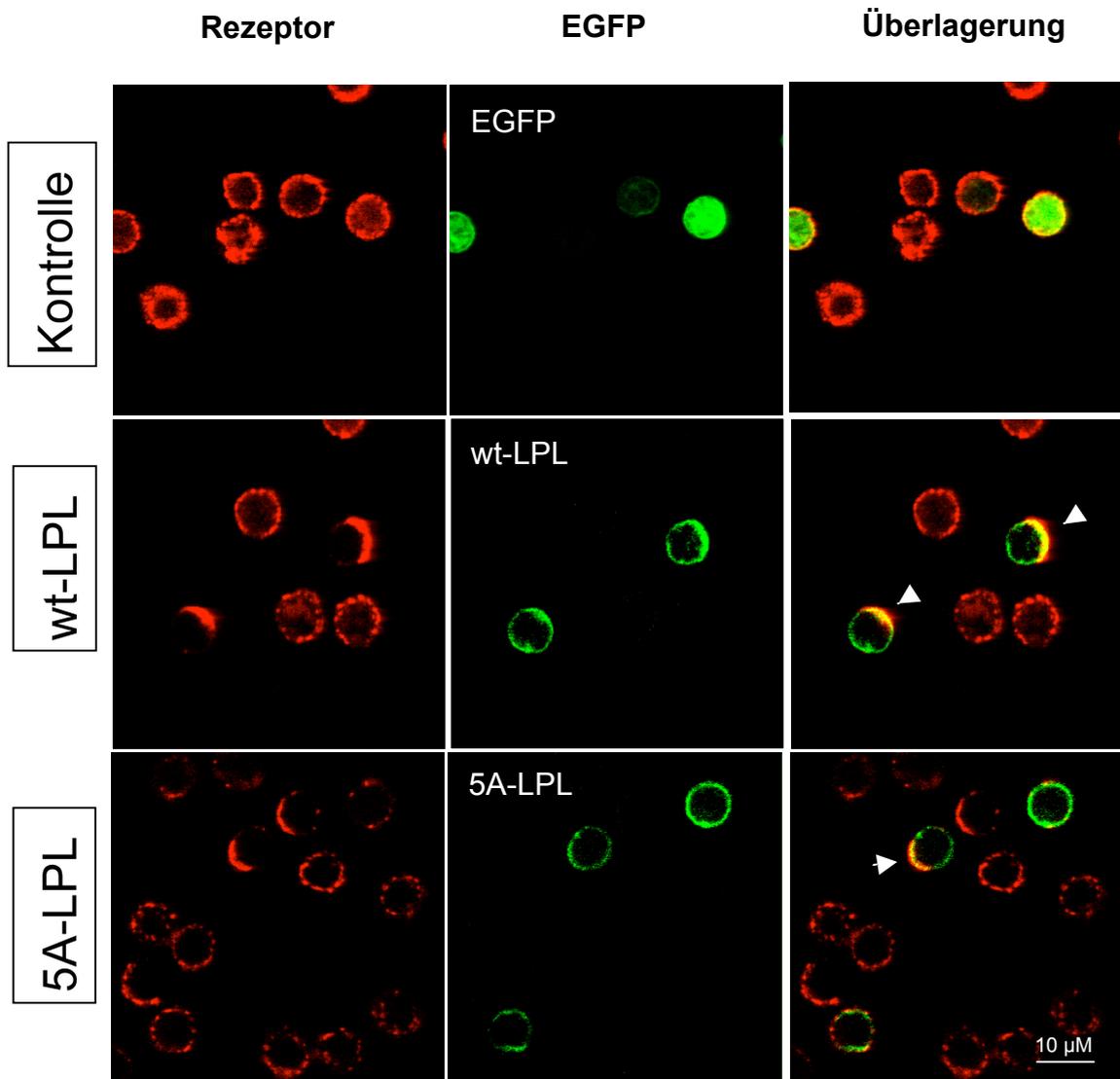
PBT wurden mit EGFP-N1 nukleoporiert und die EGFP-Expression bestimmt. Auf der linken Ordinate ist der EGFP Expressions-Index (Prozent positive Zellen x MFI, s. Material und Methoden) aufgetragen. Die entsprechende Kurve ist mit Rauten (®) dargestellt. Parallel dazu wurden PBT mit 1 μM BPB vorinkubiert und anschließend nicht gebundenes BPB durch Waschen entfernt. Die rechte Ordinate zeigt die Cap-Bildung dieser Zellen in Prozent (▲). Der graue Kasten gibt das experimentelle Zeitfenster an, in dem eine genügend hohe EGFP-Expression bei gleichzeitiger Cap-Inhibierung vorlag.

Effekt jedoch transient war, denn nach 5 Stunden konnte wieder eine signifikante Anzahl Rezeptor-Caps nachgewiesen werden (Abb. 4.3.9, $t = 5\text{h}$, weiße Pfeilspitzen). Nach 24 h waren 70% der Zellen wieder in der Lage Rezeptor-Caps auszubilden. Nach dem Herauswaschen von BPB besteht demnach ein Zeitfenster von 5 Stunden, bevor wahrscheinlich durch Neusynthese von L-Plastin der inhibitorische Effekt von BPB verloren geht. Ziel war es nun zu untersuchen, ob dieser funktionelle „Knock-out“ Zustand durch Expression von wildtyp-L-Plastin (wt-LPL) aufgehoben werden kann. Dies würde beweisen, dass der Effekt von BPB auf die Cap-Induktion ein Resultat der BPB-L-Plastin Wechselwirkung ist.

Interessanterweise gibt es die Möglichkeit in primären T-Zellen EGFP-markierte Konstrukte unter CMV-Promotorkontrolle durch Nukleofektion zu exprimieren. Es wurde daher getestet, ob auf diese Weise eine Expression der cDNA kodierten Konstrukte in dem Zeitrahmen erreicht werden konnte, in dem mit BPB ein funktioneller L-Plastin „Knock Out“ vorlag. Um dies zu testen, wurde zunächst cDNA kodiertes EGFP in primäre PBT transfiziert und stündlich die Expression per Durchflußzytometrie dokumentiert. Zur Darstellung der Transfektionseffizienz wurde ein Transfektions-Index (das Produkt aus der MFI für EGFP und der Anzahl der positiven Zellen in Prozent) errechnet (Abb. 4.3.10, EGFP-Expression). Bereits nach zwei Stunden wurde eine deutliche Expression von EGFP erreicht und diese stieg über 5 Stunden kontinuierlich an. Es ist dabei zu beachten, dass man EGFP nach der Translation nicht direkt nachweisen kann, sondern eine Reifungsphase benötigt wird, ehe eine Fluoreszenz sichtbar ist. Dies zeigte, dass es im Bereich des

Abbildung 4.3.11

A



B

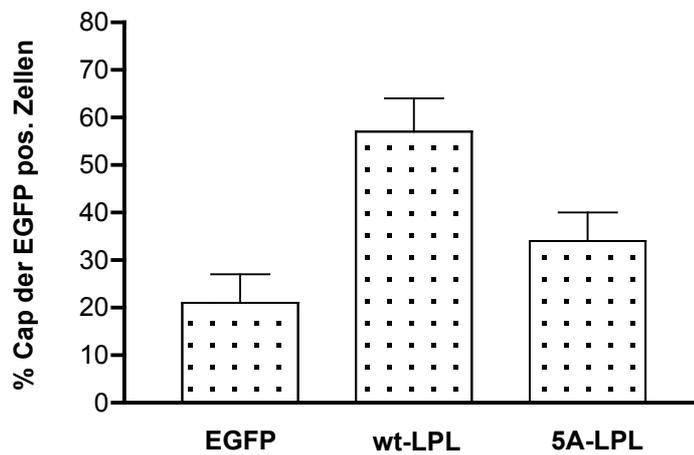


Abb. 4.3.11 Umgehung der BPB-induzierten Cap-Inhibierung durch cDNA exprimiertes L-Plastin

Humane PBT wurden mit 1 μ M BPB für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde nicht-gebundenes BPB entfernt und cDNA's, die für EGFP, wt-LPL oder 5A-LPL kodieren, in die Zellen transfiziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurden CD3xCD2 Rezeptor-Caps induziert. In der linken Spalte (**A**) sind die Rezeptoren (**rot**) dargestellt (**Pfeile zeigen Caps an**), und in der Mitte cDNA exprimierte Proteine (**grün**). In der Überlagerung (**rechts**) ist deutlich zu erkennen, dass wt-LPL und zum Teil 5A-LPL expremierende Zellen wieder Rezeptor-Caps bilden können. Die Quantifizierung (**B**) bezieht sich jeweils auf die Zellen, die das relevante Fusionsprotein bzw. EGFP exprimieren (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten). Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt.

möglichen war, L-Plastin Konstrukte in dem Zeitfenster zu exprimieren, in dem endogenes L-Plastin noch durch BPB inhibiert ist, ohne dass das cDNA exprimierte L-Plastin dem Einfluss von BPB ausgesetzt wird. Das Zeitfenster lag bei 2-4 Stunden nach dem Auswaschen von BPB (Abb. 4.3.10, Kasten). Daher wurden als nächstes PBT mit 1 μ M BPB für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene BPB durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt. Danach wurden die cDNA Konstrukte (EGFP, wt-LPL und 5A-LPL) durch Nukleofektion in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von drei Stunden wurden Rezeptor-Caps induziert. CDNA exprimiertes L-Plastin ist in der konfokalen LSM als Grünfluoreszenz zu sehen. Wie bereits zuvor beschrieben führte eine BPB-Vorbehandlung zu einer deutlichen Verminderung der Anzahl von Rezeptor-Caps (auf $20 \pm 5\%$ der EGFP-exprimierenden Zellen (Abb. 4.3.11 A obere Reihe und Abb. 4.3.11 B)). Im Gegensatz dazu bildeten wt-LPL exprimierende Zellen wieder eine signifikante Menge an Rezeptor-Caps aus ($60 \pm 8\%$) (Abb. 4.3.11 A mittlere Reihe und Abb. 4.3.11 B). Dadurch wurde eindeutig bewiesen, dass die BPB-induzierte Hemmung der Rezeptor-Caps auf einer spezifischen Hemmung von L-Plastin beruht. Die alleinige Expression dieses Proteins konnte die Cap-Bildung wieder herstellen. Interessanterweise wurde auch durch die Expression der nicht-phosphorylierbaren L-Plastin Mutante, 5A-LPL, eine Rettung der Rezeptor-Caps erreicht (Abb. 4.3.11 A, untere Reihe und Abb. 4.3.11 B). Allerdings ist diese Wiederherstellung mit $35 \pm 5\%$ wesentlich ineffizienter, als für wt-LPL beobachtet.

4.4 L-Plastin ist in der reifen IS und der frühen T/B-Zell Kontaktzone lokalisiert

Die Befunde, dass sich L-Plastin in Antikörper-induzierten Rezeptor-Klustern anreichert, lassen vermuten, dass es auch eine Funktion bei der Ausbildung der Kontaktzone zwischen T-Zellen und APZ übernimmt. Dort könnte es durch seine Aktin-bündelnde Fähigkeit an

Reorganisationsprozessen während der T-Zell-Aktivierung bzw. Ausbildung oder Stabilisierung der immunologischen Synapse (IS) beteiligt sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden Zell-Kontakte zwischen PBT und Raji B-Lymphom-Zellen analysiert, die in diesem System als APZ fungierten.

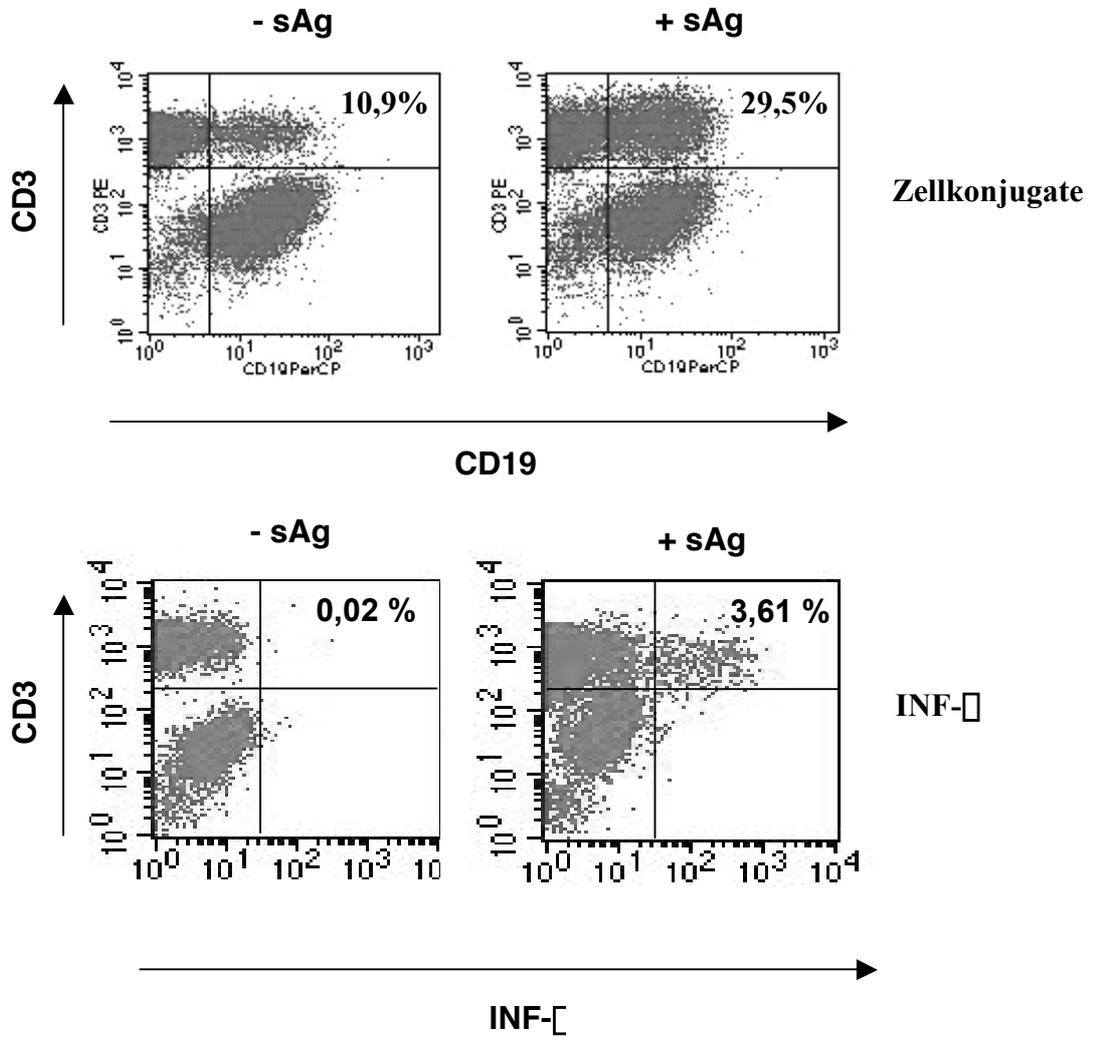
4.4.1 PBT werden durch Superantigen-beladene Raji B-Zellen vollständig aktiviert

Zur Untersuchung von T-Zell/APZ-Kontakten wurden Burkitt Lymphom B-Zellen (Raji) zur Stimulation von humanen PBT verwendet. Sie wurden entweder unbehandelt eingesetzt (Raji) oder zur vollständigen Stimulation der T-Zellen mit Superantigen (je 5 µg/ml *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin F (SEF)) beladen (Raji^{sAg}). Mit diesem System konnte neben der subzellulären Lokalisierung von L-Plastin auch die Adhärenz der PBT auf den Raji Zellen sowie die Produktion von Zytokinen gemessen werden.

Zunächst wurden Zell-Zell Kontakte durchflußzytometrisch analysiert (Abb. 4.4.1). Unbeladene und Superantigen-tragende B-Zellen wurden 1:2 mit den deutlich kleineren PBT gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD19 (PerCP-konjugiert) und CD3 (PE-konjugiert) gefärbt. T-Zellen erscheinen daher im Durchflußzytometer als CD3-positiv (Abb. 4.4.1 A, oberer Teil, oberer linker Quadrant) und B-Zellen als CD19-positiv (Abb. 4.4.1 A, oberer Teil, unterer rechter Quadrant). Zell-Konjugate aus T- und B-Zellen sind demzufolge CD3- und CD19-positiv (Abb. 4.4.1 A, oberer Teil, oberer rechter Quadrant). Ohne Superantigen bildeten in diesen Experimenten $10,58 \pm 3\%$ der PBT einen festen Kontakt mit B-Zellen (Abb. 4.4.1 B, links). In Anwesenheit von SEB und SEF erhöhte sich erwartungsgemäß diese Anzahl um das vierfache auf $39,95 \pm 7,1\%$ der PBT. Aus der Erhöhung der Adhärenz per se können noch keine Rückschlüsse auf die Aktivierung der T-Zellen getroffen werden. Diese kann durch Bestimmung der Zytokin-Produktion der PBT analysiert werden. Um sicher zu stellen, dass die Verwendung der Superantigene SEB und SEF auf B-Zellen zu einer vollständigen Aktivierung der PBT führte, wurde daher die INF- γ -Produktion mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Hierbei wurden PBT erneut mit B-Zellen für 6 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde die Ausschüttung der Zytokine durch Zugabe von Brefeldin A unterdrückt. Diese Substanz verhindert, dass intrazelluläre Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen und dadurch

Abbildung 4.4.1

A



B

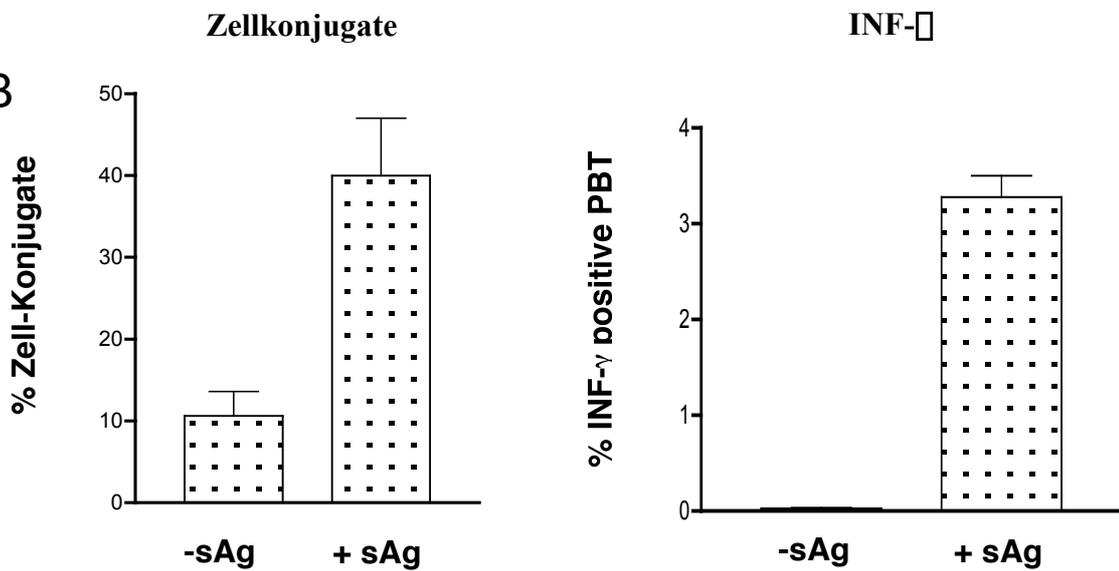


Abb. 4.4.1 Superantigen-induzierte Adhärenz von PBT an Raji B-Zellen

PBT wurden mit Raji B-Zellen vermischt, die entweder unbeladen waren (-sAg) oder die die Superantigene SEB und SEF trugen (+sAg). Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen CD3 (PE-markiert; T-Zellmarker) und CD19 (PerCP-markiert; B-Zellmarker) gefärbt. In der Abbildung (**A, oben**) erscheinen die **Zellkonjugate** aus PBT und Raji B-Zellen im oberen, rechten Quadrant. Die Prozentzahl bezieht sich auf Prozent PBT (=CD3-positiv) mit Zell-Kontakt (CD3- und CD19-positiv, **oberer rechter Quadrant**). In den unteren rechten Quadranten sind die Raji B-Zellen (CD19-positiv) zu sehen. Bedingt durch ihre Größe weisen diese verglichen mit PBT eine stärkere Auto-Fluoreszenz auf, weshalb sie auch in den CD3-PE Kanal fluoreszieren. Dennoch sind sie klar von den CD3-positiven T-Zellen (**oben links**) zu unterscheiden. Das entsprechende Histogramm (**B, links**) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten in Prozent PBT, die Konjugate mit den B-Zellen ausbilden.

PBT wurden mit Raji B-Zellen vermischt, die entweder unbeladen waren oder Superantigene (SEB/SEF) trugen. Die Zellen wurden über 6 Stunden in Anwesenheit von Brefeldin A bei 37°C inkubiert und anschließend eine intrazelluläre Zytokinfärbung mit Antikörpern gegen **INF- γ** durchgeführt (**A, unten**). Auf der Ordinate ist die CD3-Expression aufgetragen, sodass T-Zellen in den **oberen Quadranten** zu sehen sind. **Oben rechts** erscheinen T-Zellen, die **INF- γ** bilden. Im gezeigten Beispiel bildeten in Abwesenheit von SEB/SEF 0,02% der CD3-positiven Zellen **INF- γ** und 3,61% in Anwesenheit von SEB/SEF. Das korrespondierende Histogramm (**B, rechts**) zeigt die Mittelwerte (n=3, Standardfehler) der Anzahl der Zytokin-produzierenden T-Zellen in Prozent.

Zytokine ins Kulturmedium abgegeben werden. Somit konnte die Anzahl der **INF- γ** produzierenden T-Zellen durch eine intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen **INF- γ** festgestellt werden (Abb. 4.4.1 A, unterer Teil). Ohne Superantigen wurde von nur $0,03 \pm 0,006\%$ der T-Zellen **INF- γ** gebildet (Abb. 4.4.1 B, rechts). Die Anzahl stieg um den Faktor 100 auf $3,28 \pm 0,22\%$ durch die Vorbehandlung der B-Zellen mit SEB und SEF. Die Stimulation von PBT mit Raji^{sAg} B-Zellen führte demnach zur T-Zell-Aktivierung.

4.4.2 L-Plastin Phosphorylierung in PBT durch APZ Stimulation

Im Folgenden wurde untersucht, ob L-Plastin in PBT nach Stimulation durch Superantigen-beladene B-Zellen phosphoryliert wird. Da alle hämatopoetischen Zellen L-Plastin exprimieren (s. Kap. 4.1) musste ausgeschlossen werden, dass falsche Phosphorylierungssignale durch die Raji B-Zellen zustande kommen. Daher wurden PBT mit radioaktivem ³²P-Orthophosphat markiert. Als APZs wurden Raji Zellen verwendet, die entweder unbeladen waren oder zuvor mit Superantigenen beladen wurden. Im Gegensatz zu den PBT wurden die B-Zellen jedoch nicht radioaktiv markiert und sollten deshalb auf einem Autoradiogramm zu keinem Signal führen. Bevor die Zellen 1:2 gemischt wurden, wurden die PBT gewaschen, um nicht aufgenommenes ³²P-Orthophosphat zu entfernen. Damit die T-Zellen schnell in engen Kontakt mit den B-Zellen kommen konnten, wurde die Zellsuspension mit 1500 UpM für 20 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde die Stimulation zu den angegebenen Zeitpunkten mit

Abbildung 4.4.2

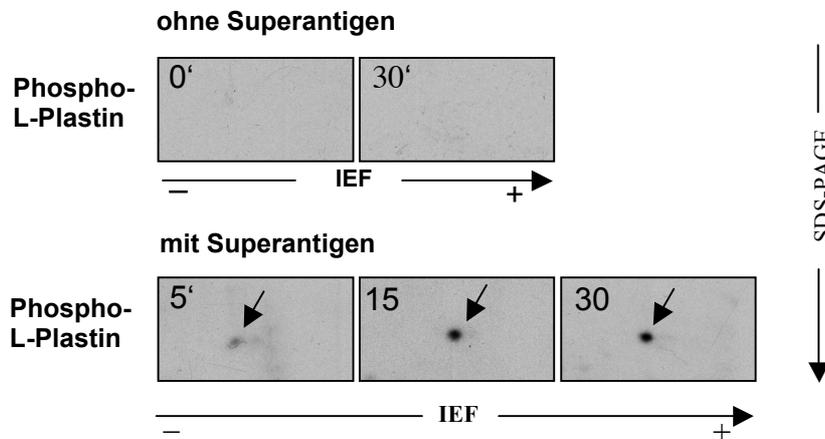


Abb. 4.4.2 L-Plastin Phosphorylierung nach Stimulation durch Raji B-Zellen

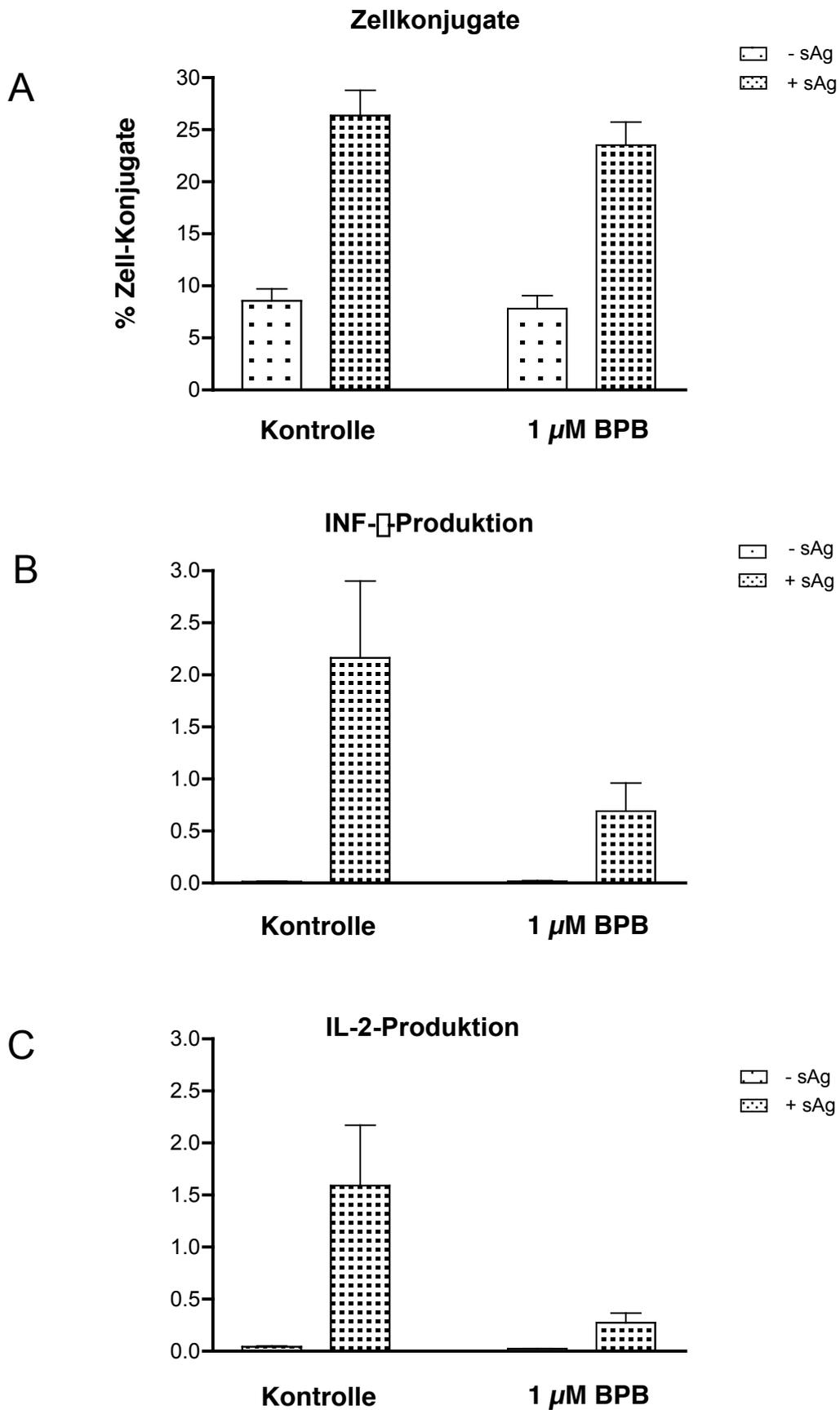
^{32}P -Orthophosphat-markierte PBTs wurden mit unbeladenen (Obere Reihe) oder Superantigen-tragenden (untere Reihe) Raji B-Zellen gemischt und für die angegebenen Zeitpunkte (in Minuten) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Phospho-L-Plastin (**Pfeile**) wie in Abbildung 4.2.1 in einem 2D-Autoradiogramm dargestellt.

eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen lysiert. Die Analyse der L-Plastin Phosphorylierung erfolgte durch 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie (Abb. 4.4.2). L-Plastin wurde durch die Inkubation der PBT mit unbeladenen Raji Zellen in dem beobachteten Zeitraum von 30 Minuten nicht phosphoryliert. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit Raji^{sAg} Zellen zu einer Phosphorylierung, die bereits nach 5 Minuten nachzuweisen war. Sie nahm bis 15 Minuten zu und blieb danach über weitere 15 Minuten konstant. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von T-Zellen über B-Zellen in Abhängigkeit von Superantigenen zu einer L-Plastin Phosphorylierung führt.

4.4.3 BPB Inhibiert die Superantigen-abhängige Aktivierung von PBT

BPB inhibiert die Proliferation von PBT nach Kostimulation über CD2 und CD28. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob BPB ebenfalls die Aktivierung von PBT durch B-Zellen oder die Anzahl der Zellkontakte beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden PBT mit BPB oder entsprechender Menge Lösungsmittel für 30 Minuten inkubiert. Anschließend

Abbildung 4.4.3



4.4.3 Effekte von BPB auf Zell-Konjugate

PBT wurden mit Superantigen-tragenden (+sAg) –freien (-sAg) Raji Zellen vermengt und für 30 Minuten (A) oder 6 Stunden (B und C) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Anzahl der Zellkonjugate (A) oder die Anzahl der INF- γ (B) bzw. IL-2 (C) produzierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (n=3; SE).

wurden sie gewaschen und mit Raji bzw. Raji^{sAg} Zellen im Verhältnis 1:2 gemischt. Die Quantifizierung der Zell-Konjugate erfolgte durchflußzytometrisch (s. Kap. 4.4.1). Wie zu erwarten bildeten ohne Superantigen 8 \pm 2% der PBT feste Kontakte mit den Raji Zellen (Abb. 4.4.3 A). Durch die Superantigene wurde die Anzahl der Kontakte um den Faktor 3 auf 25 \pm 3% erhöht. Die Vorbehandlung der PBT mit BPB führte dabei zu keiner Änderung dieser Anzahl, d.h. ohne Superantigen bildeten 7,8 \pm 2% und mit Superantigen 23 \pm 2,8% der PBT stabile Zell-Kontakte.

Nachdem BPB keinen Einfluss auf die Adhärenz von PBT an Raji^{sAg} Lymphoma B-Zellen hatte, sollte untersucht werden, ob die Kontakte produktiv sind, d.h. ob die Stimulation der T-Zellen zur Zytokin-Produktion führt. PBT wurden mit BPB oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel inkubiert und zusammen mit Raji bzw. Raji^{sAg} Zellen für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zytokin-Ausschüttung wurde wiederum mit Brefeldin A verhindert. Anschließend konnten die IL-2- und INF- γ -produzierenden Zellen durch eine Antikörperfärbung und Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Der Graph in Abbildung 4.4.3 zeigt, dass durch die Stimulation mit Raji^{sAg} Zellen 2,2 \pm 0,7% der PBT INF- γ (Abb. 4.4.3 B) und 1,6 \pm 0,6 % der PBT IL-2 (Abb. 4.4.3 C) bildeten. In Anwesenheit von BPB sank die Anzahl der Zytokin-bildenden PBT deutlich unter 1%, nämlich auf 0,66 \pm 0,25% (INF- γ) oder 0,3 \pm 0,15% (IL-2). BPB hemmt somit die Superantigen-induzierte Zytokinproduktion, was jedoch nicht auf eine Blockade der Ausbildung von T-Zell/APZ-Kontakten zurückzuführen ist.

4.4.4 L-Plastin ist in der T-Zell-APZ-Kontaktzone lokalisiert

Nachdem festgestellt wurde, dass humane PBT durch Raji^{sAg} Zellen stimuliert werden können, wurde als nächstes untersucht, ob L-Plastin in diesem System in der reifen T-Zell-Synapse nachgewiesen werden kann. Raji Zellen, die entweder mit oder ohne Superantigen beladen waren, wurden 1:2 mit PBT aus gesunden Spendern vermischt und auf Silan-beschichtete Adhäsionsobjektträger ausgebracht. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Zeit entspricht der postulierten Dauer für die Reifung einer IS. Die Stimulation wurde anschließend mit 4% Paraformaldehyd gestoppt. Nach der

Permeabilisierung der Zellen wurden L-Plastin und CD3 durch eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (Abb. 4.4.4 und Abb. 4.4.5). Sowohl B-, als auch T-Zellen waren positiv für L-Plastin (Abb. 4.4.4 und Abb. 4.4.5, grün). Im Gegensatz dazu wird CD3 nur auf T-Zellen exprimiert (Abb. 4.4.4 und Abb. 4.4.5, rot). Weiterhin waren die Raji B-Zellen durch ihre Größe sehr leicht von den T-Zellen zu unterscheiden (Abb. 4.4.4 B und Abb. 4.4.5). Während einige PBT einen Kontakt zu Raji B-Zellen ausbildeten, blieben die meisten T-Zellen solitär. Eine Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten ergab, dass ohne Superantigen 9% der T-Zellen einen Kontakt mit den B-Zellen aufwiesen und 36% der T-Zellen mit Raji^{sAg} assoziiert waren, was im Einklang mit den durchflußzytometrisch ermittelten Werten stand (vergleiche Kap. 4.4.1).

In den Ansätzen wiesen 91% (ohne Superantigen) oder 64% (mit Superantigen) der PBT keinen Kontakt zu B-Zellen auf (s.o). Diese T-Zellen hatten entweder eine runde Morphologie (Abb. 4.4.4 A, obere Reihe) oder zeigten einen heteromorphen Phänotyp mit lamellipodienartigen Ausstülpungen (Abb. 4.4.4 A, untere Reihe). CD3 war bei beiden Formen gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt, während L-Plastin nur auf den runden Zellen gleichverteilt vorlag. Bei Zellen mit Zellausstülpungen verlagerte sich L-Plastin in diese lamellipodienartigen Strukturen (Abb. 4.4.4 A, untere Reihe, Pfeil).

Nach einem Kontakt der PBT mit unbeladenen Raji B-Zellen (Abb. 4.4.4 B) wurde fast nie (<1%) eine CD3 Anreicherung an der Superantigen-unabhängigen Kontaktzone der Zellen beobachtet. Interessanterweise wurde jedoch eine starke Re-Lokalisierung von L-Plastin bei 36% dieser Superantigen-unabhängigen Kontakte festgestellt (Abb. 4.4.4 B, mittlere Reihe, Pfeil). In diesen Experimenten zeigten einige PBT auch eine Gleichverteilung von L-Plastin (Abb. 4.4.4 B, obere Reihe). Weiterhin findet man Zellkontakte, bei denen die T-Zelle einen größeren Bereich der B-Zelle überspannt. Interessanterweise war L-Plastin bei solchen Zellen deutlich in den Lamellipodien angereichert (4.4.4, untere Reihe, Pfeil). Diese superantigen-unabhängige Verlagerung von L-Plastin könnte im Prozess des „Scannings“, also der Suche von T-Zellen nach dem passenden Antigen auf der APZ eine Rolle spielen.

Abbildung 4.4.4

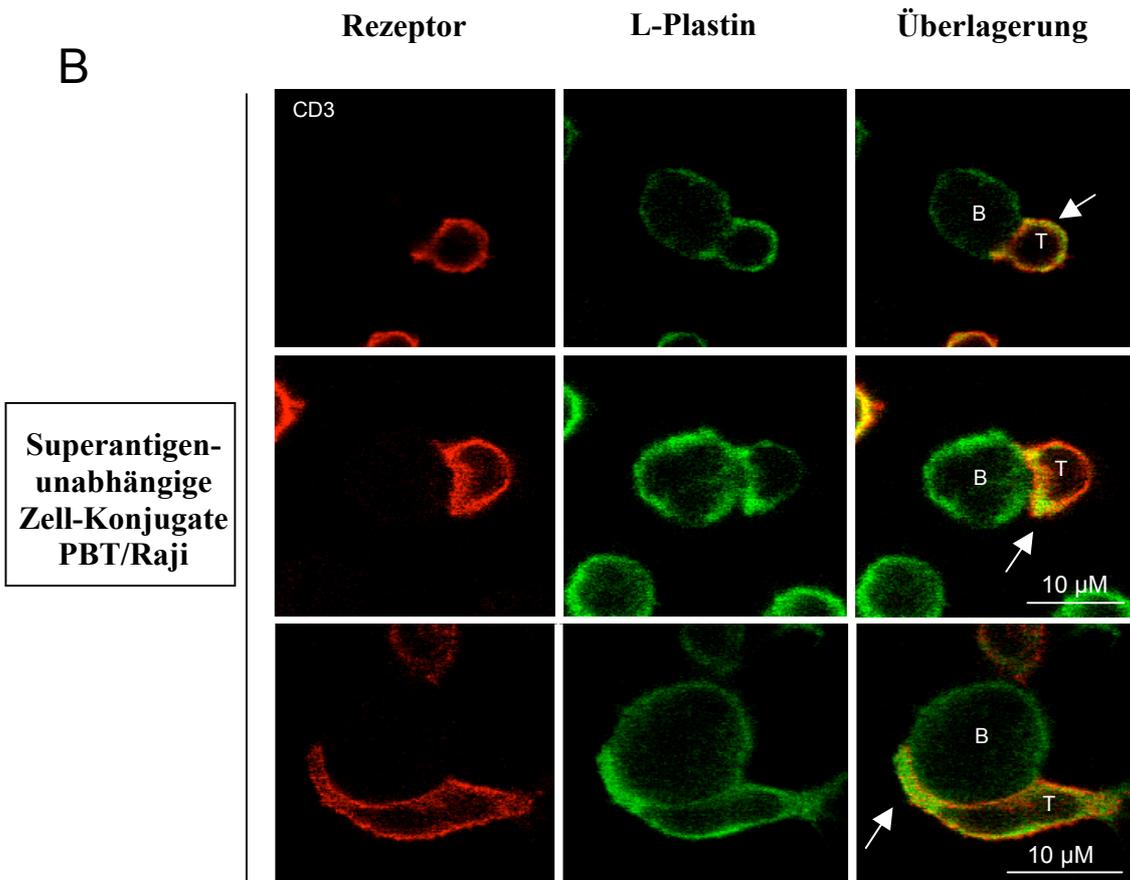
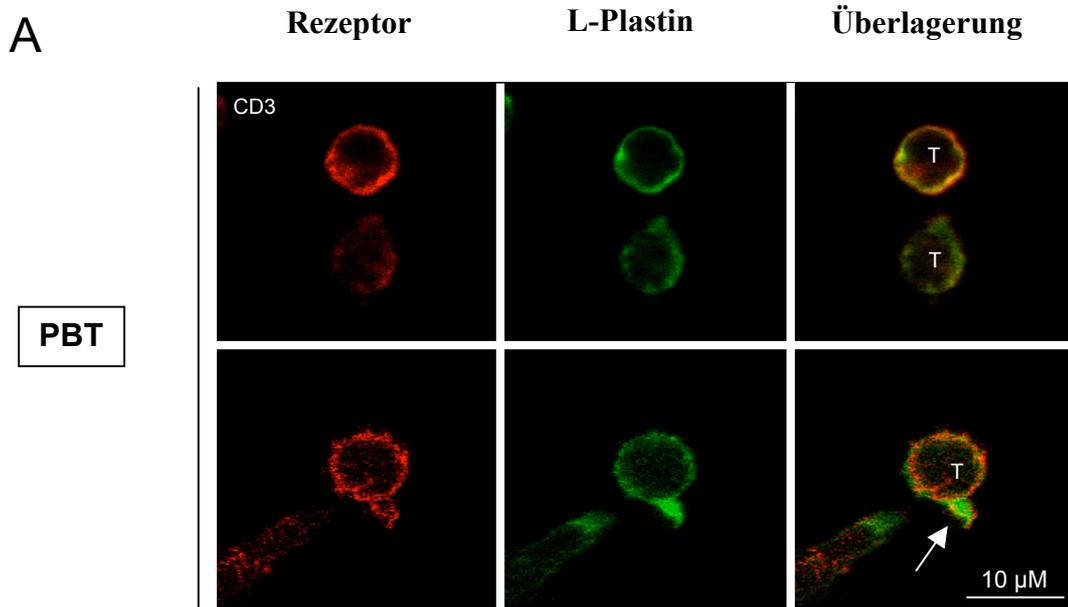


Abb. 4.4.4 Subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin in PBT in Abwesenheit von Superantigenen

Humane PBT (weißes T) wurden mit Raji B-Zellen (weißes B) auf einem Adhäsionsobjektträger gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und CD3 (rot) bzw. L-Plastin (grün) mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Die rechte Spalte entspricht der digitalen Überlagerung der Fluoreszenzen. In diesen Experimenten konnten PBT ohne einen Kontakt zu Raji B-Zellen und mit B-Zell-Kontakt unterschieden werden. Der obere Teil (A) zeigt typische Morphologien von PBT, die keinen Kontakt ausgebildet haben, während der untere Teil (B) PBT mit Kontakten zu B-Zellen aus dem gleichen Ansatz zeigt. Die weißen Pfeile deuten auf die Lokalisierung von L-Plastin hin.

In Anwesenheit der Superantigene SEB und SEF war CD3 bei 30% der Kontakte (entspricht 9% der PBT) am Zell-Interface angereichert (Abb. 4.4.5 A). Weiterhin war in 58% der PBT/ Raji^{sAg} Kontakte fast das komplette zelluläre L-Plastin der T-Zellen zur B-Zelle hin polarisiert (4.4.5 A, Pfeil). Obwohl es meist die komplette Kontaktzone überspannt war die Konzentration an den äußeren Polen der Kontaktzone besonders hoch. Dieser Bereich wird in der Literatur oft als Kragen bezeichnet und ist während des frühen Zell-Kontakts als ein besonders dynamischer Bereich bekannt (Wülfing *et al.*, 1998; Wülfing *et al.*, 2002b). Interessant ist, dass T-Zellen die subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin sehr stark regulieren, während in Raji Zellen keine L-Plastin Re-Lokalisierung zu verzeichnen war. Dieser Befund stimmt mit der Tatsache überein, dass B-Zellen das Aktin-Zytoskelett nicht zur T-Zelle hin orientieren.

Um zu zeigen, dass Zellen mit polarisiertem CD3 bei Antigenerkennung IS-ähnliche Strukturen aufbauen, wurden mindestens 10 optischen Schnittebenen durch die Zellen angefertigt. Aus solchen Z-Stapeln konnten 3D-Rekonstruktionen der Kontaktzone ausgearbeitet werden. Die Abbildung 4.4.5 B zeigt eine solche Rekonstruktion. Tatsächlich war dort CD3 in der Mitte des Kontakts (dem cSMAC der IS) anreichert, während L-Plastin hauptsächlich um diesen Bereich herum konzentriert war. Diese Zone entspricht in der reifen IS dem pSMAC. Demzufolge ist L-Plastin entweder in oder um den pSMAC lokalisiert.

4.4.5 L-Plastin Phosphorylierung an Ser-5 beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin nicht

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob sich nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutanten in ihrer subzellulären Lokalisierung vom Wildtyp unterscheiden. Zur Analyse der cDNA exprimierten L-Plastin Konstrukte in Zellkontakten wurde wt-LPL oder 5A-LPL durch Nukleofektion in PBT exprimiert. Als Kontrolle diente wiederum EGFP allein. Die T-Zellen aus den Transfektionsansätzen wurden mit Raji^{sAg} oder unbeladenen Raji B-Zellen

Abbildung 4.4.5

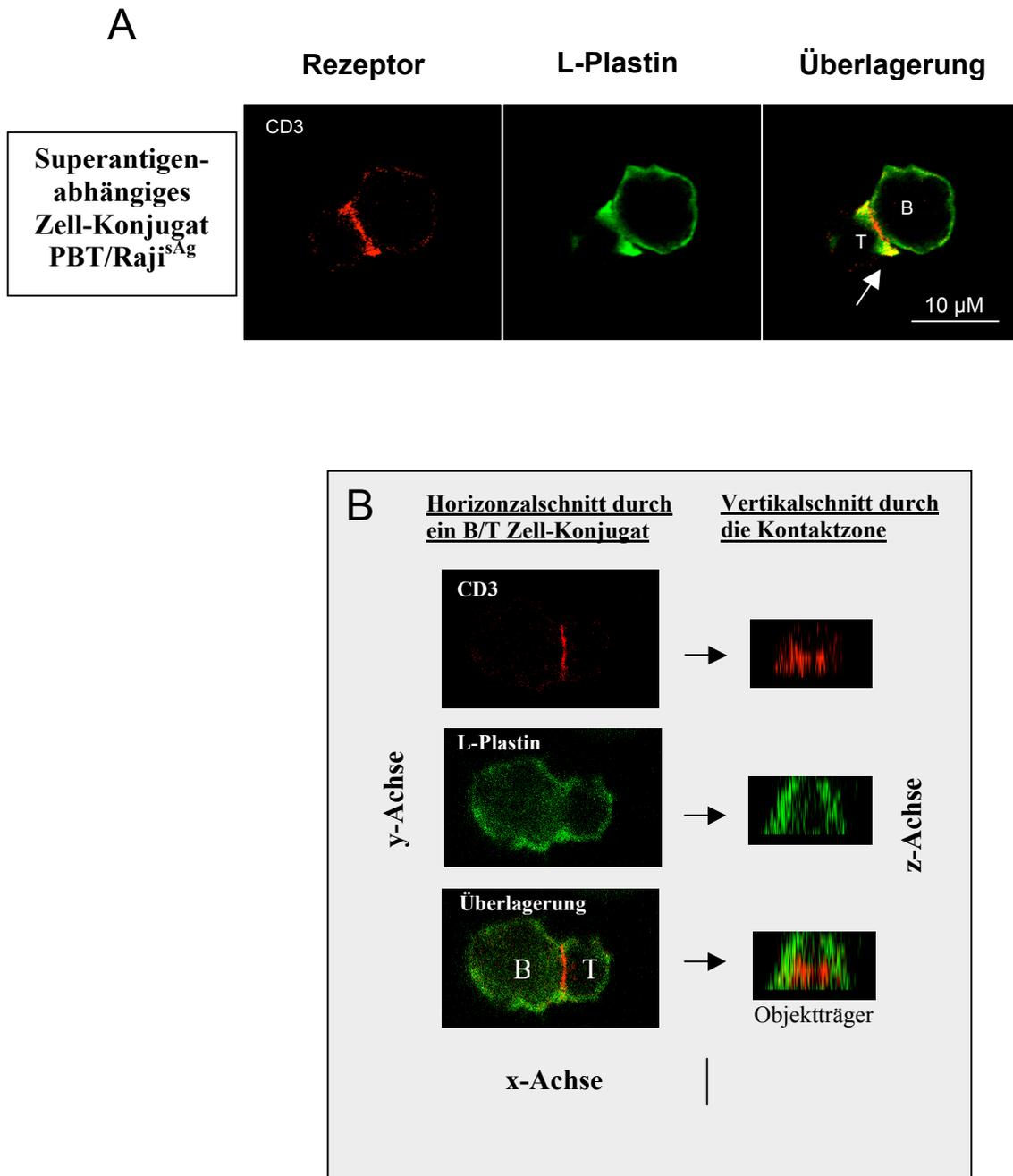


Abb. 4.4.5 In Anwesenheit von Superantigenen lokalisiert L-Plastin im oder um den pSMAC der Immunologischen Synapse

PBTs (**weißes T**) wurden mit Superantigen-tragenden Raji B-Zellen (**weißes B**) vermischt und nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C fixiert. CD3 (**rot**) bzw. L-Plastin (**grün**) wurden mit spezifischen Antikörpern gefärbt (**A**). Der weiße Pfeil weist auf die L-Plastin Lokalisierung im Kragen-Bereich der T-Zelle hin. Durch 3D-Rekonstruktionen konnte die Längsachse durch die Zell-Kontaktzone analysiert werden (**B**). Dabei ist CD3 in der Mitte der kontaktzone konzentriert, während L-Plastin in dem Areal um CD3 herum lokalisiert, das dem pSMAC der reifen IS entspricht.

im Verhältnis 1:2 gemischt und für 30 Minuten bei 37°C auf einem Adhäsionsobjektträger inkubiert. Nach der Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und zusätzlich mit Antikörpern gegen CD3 (Abb. 4.4.6, rot) oder Gesamt-L-Plastin (Abb. 4.4.6, blau) gefärbt. Während EGFP (Abb. 4.4.6 A, grün) in den Zellen gleichmäßig verteilt war, wurde das wt-LPL Fusionsprotein wie erwartet bereits ohne Superantigen an die Kontaktzone verlagert (Abb.4.4.6 A, mittlere Reihe, Pfeil). Eine solche Re-Lokalisierung von L-Plastin konnte auch dann beobachtet werden, wenn das Ser-5 zu Alanin mutiert wurde, also keine Phosphorylierung mehr stattfinden konnte (Abb.4.4.6 A, untere Reihe, Pfeil). CD3 war in diesen Experimenten stets gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt.

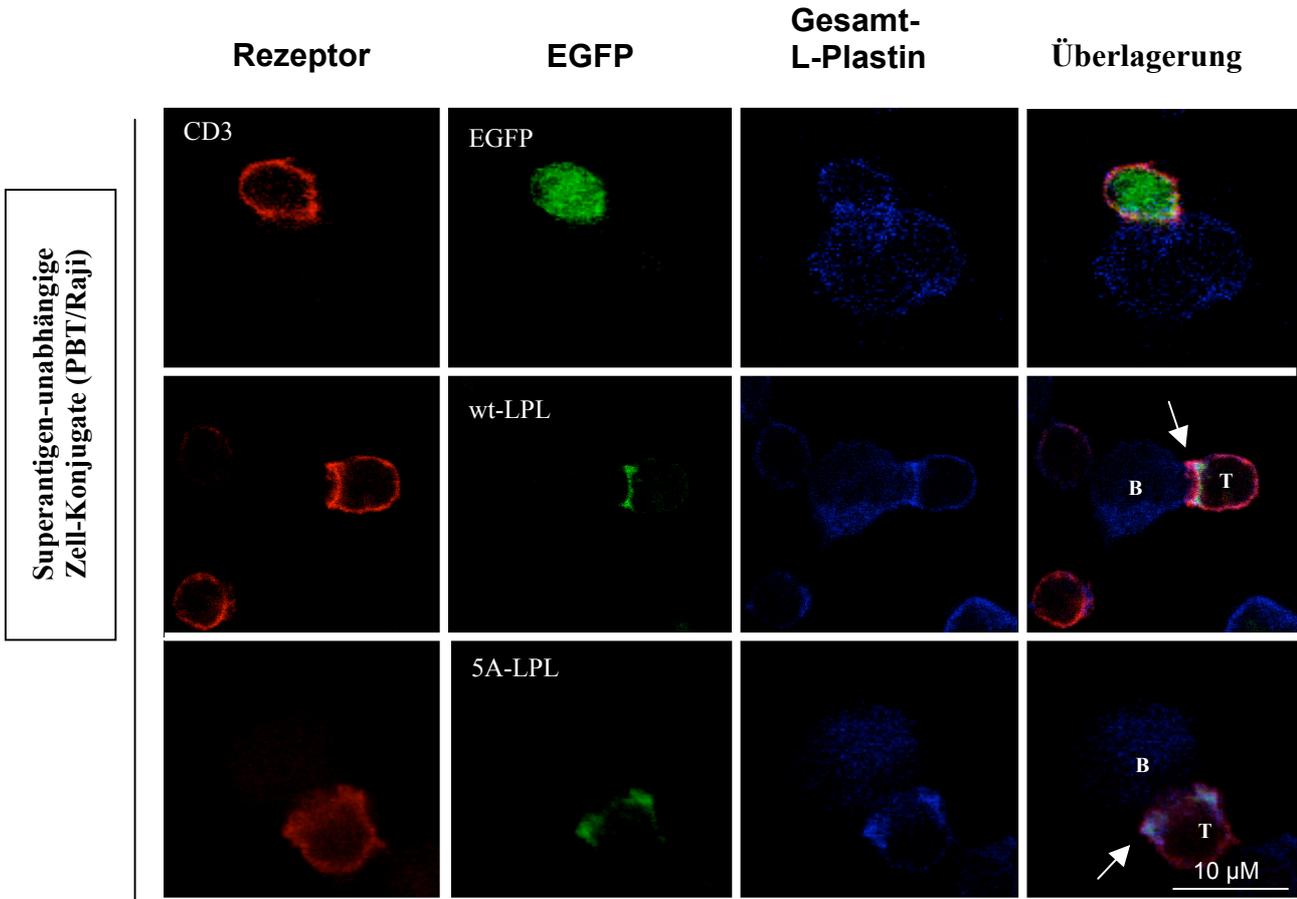
In Anwesenheit von Superantigenen wurde bei einigen Transfektanten eine Verlagerung von CD3 an die Kontaktzone beobachtet (Abb. 4.4.6 B, rot). Auch bei diesen PBT/Raji^{sAg} Konjugaten wurde sowohl das wt-LPL (Abb. 4.4.6 B, mittlere Reihe, grün) als auch 5A-LPL-Fusionsprotein (Abb. 4.4.6 B, untere Reihe, grün) an die Kontaktzone verlagert, während EGFP alleine keine Anreicherung zur B-Zelle zeigte (Abb. 4.4.6 B, obere Reihe, grün). Die L-Plastin-Färbung mit Antikörpern zeigte bei diesen Experimenten eine Verteilung an der Kontaktzone, wie die cDNA exprimierten L-Plastin Fusionsproteine (Abb. 4.4.6 B, blau). Es ist dabei zu beachten, dass die L-Plastin-Färbung mit Antikörpern sowohl das endogene, als auch das transfizierte L-Plastin darstellt. Interessanterweise ist CD3 auch bei den PBT/Raji^{sAg} Konjugaten an die Kontaktzone verlagert, die mit einer 5A-LPL exprimierenden T-Zelle gebildet wurden, was auf einen intakten cSMAC in der IS hindeutet.

Abb. 4.4.6 Subzelluläre Lokalisierung von cDNA kodiertem L-Plastin in Zell-Kontakten

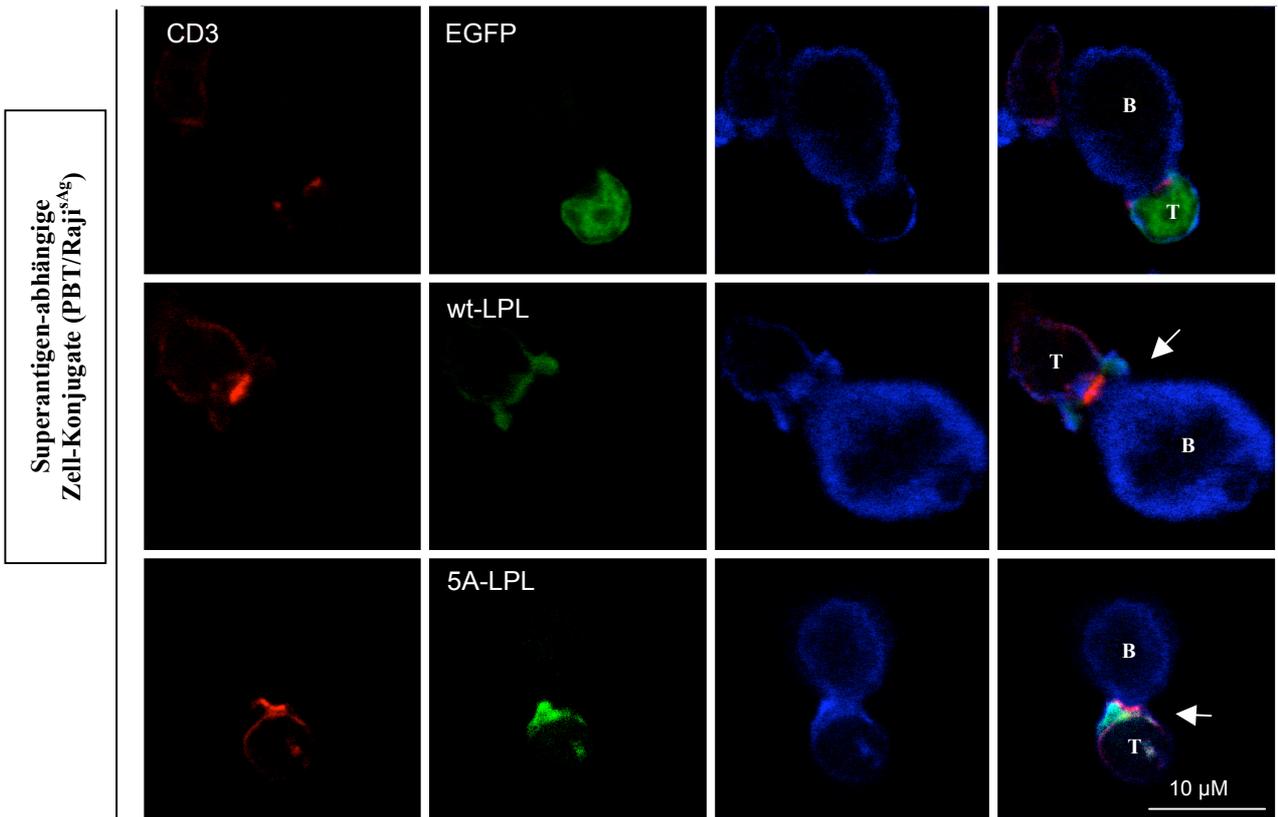
CDNA kodiertes EGFP, wt-LPL oder 5A-LPL wurden in PBT exprimiert und anschließend Zell-Zell-Kontakte mit Raji B-Zellen induziert, die entweder unbeladen waren (**A**) oder die Superantigene SEB und SEF (**B**) trugen. Die Rezeptoren sind in **rot** dargestellt, während EGFP-Fluoreszenz in **grün** und die Gesamt-L-Plastin-Färbung in **blau** abgebildet sind. Die Pfeile deuten auf die Kontaktzonen mit re-lokalisiertem, cDNA exprimiertem L-Plastin.

Abbildung 4.4.6

A



B



4.4.6 Time-Lapse-Videomikroskopie (TLV) zur Darstellung der Kinetik der L-Plastin Polarisierung

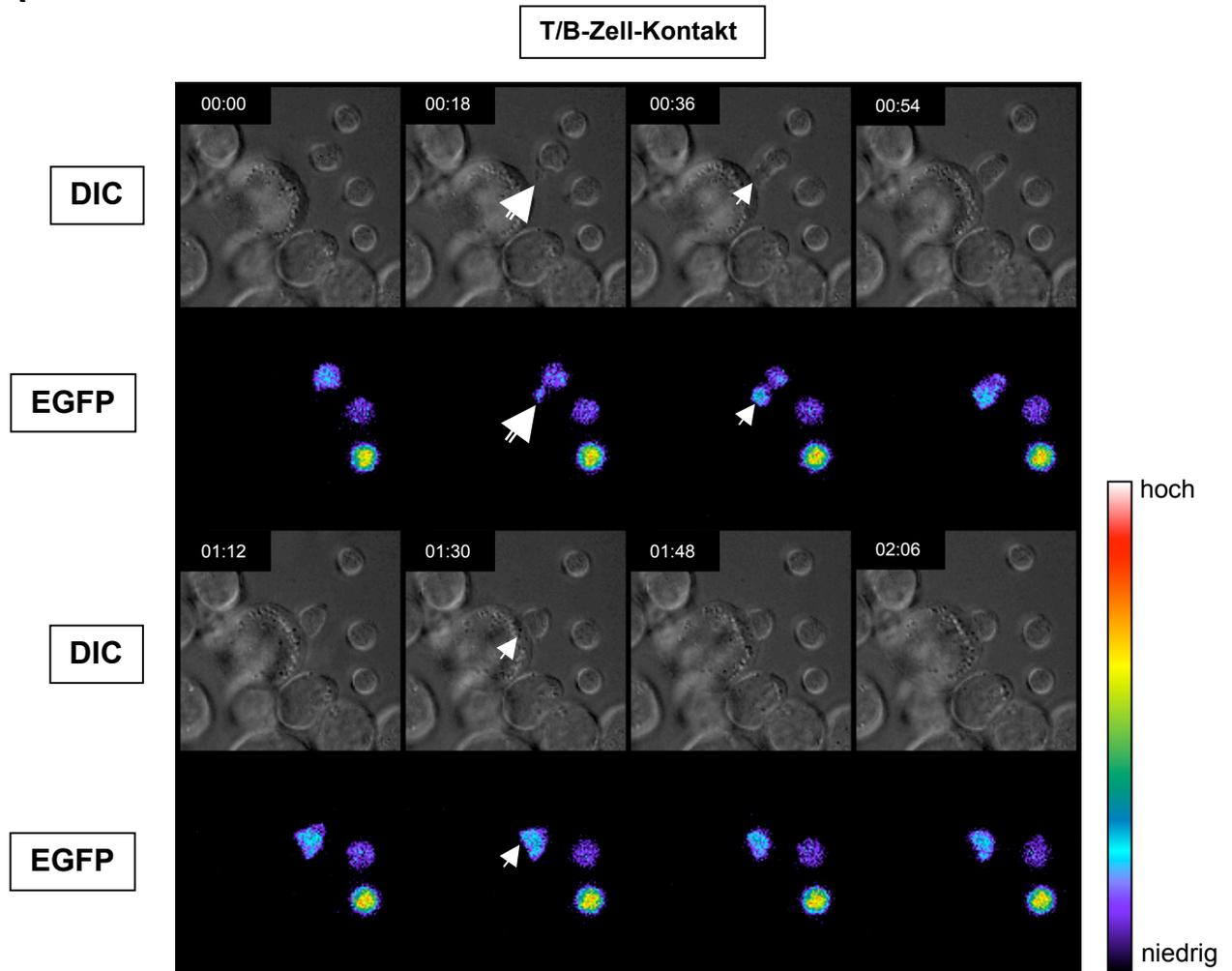
Die Analyse von fixierten Zell-Kontakten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, wie in den Kapiteln 4.4.4 und 4.4.5 beschrieben, ermöglicht eine genaue Darstellung des T/B-Zell-Kontakts und der daran beteiligten Proteine. Allerdings können keine Aussagen bezüglich des zeitlichen Ablaufs, besonders der sehr frühen Phase des Zell-Zell-Kontakts, getroffen werden, da man keine Information darüber hat, wie lange der betrachtete Zellkontakt bereits besteht. Um die Kinetik dieser frühen Ereignisse zu dokumentieren, müssen demgemäß Zell-Zell-Kontakte betrachtet werden, die gerade erst entstehen. Diese Analysen wurden durch Time-Lapse-Videomikroskopie (TLV) mit EGFP-markierten L-Plastin und L-Plastin Mutanten ermöglicht.

4.4.6.1 Polarisierung von L-Plastin bei der Ausbildung von T-Zell/APZ-Konjugaten

Zur Analyse der Dynamik der subzellulären Lokalisierung von L-Plastin wurden cDNA-Konstrukte, die für L-Plastin-EGFP Fusionsproteine kodieren, durch Nukleofektion in PBT eingebracht. Anschließend wurden diese Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten LabTek® Objektträgern ausgesät, auf denen bereits Raji^{sAg}-Zellen aufgebracht waren. Die Zellen wurden während der Aufnahmen stets bei 37°C gehalten. In einem Zeitintervall von 18 Sekunden wurde dann je ein Differential Interferenzkontrast- (DIC) und ein Fluoreszenz-Mikroskopie Bild aufgenommen (Abb. 4.4.7). Die Fluoreszenz wurde in „Falschfarben“ visualisiert, um lokale Anreicherungen in den bewegten Zellen darzustellen. Niedrige lokale Konzentrationen erscheinen bei dieser Darstellung in blauer und grüner Farbe, während rote und weiße Farbtöne eine starke Anreicherung darstellen (Abb. 4.4.7, Farbbalken). In Abbildung 4.4.7 A sind drei EGFP Kontroll-Konstrukt exprimierende T-Zellen zu erkennen, die mit Superantigen-beladenen Raji^{sAg}-Zellen inkubiert wurden. Die oberen zwei Zellen bildeten häufig Lamellipodien aus, ohne sich von der Stelle zu bewegen (Film 4.4.7.1 im ergänzendem Material). Im Gegensatz zu wt-LPL (Abb. 4.4.7 B) wurde EGFP (Abb. 4.4.7 A) in den Lamellipodien nicht angereichert, was an der konstanten blau/grünen Färbung zu erkennen ist. Über eine solche Membranausstülpung kam die obere der drei Zellen mit einer B-Zelle in Kontakt (Abb. 4.4.7 A, Pfeilspitze und Film 4.4.7.1 auf ergänzendem Material). Daraufhin bewegte sich die T-Zelle innerhalb von maximal 18 Sekunden komplett auf die B-Zelle zu. Auch während dieser Phase wurde

Abbildung 4.4.7

A



4.4.7 L-Plastin Dynamik in Zell-Kontakten zwischen PBTs und Raji B-Zellen

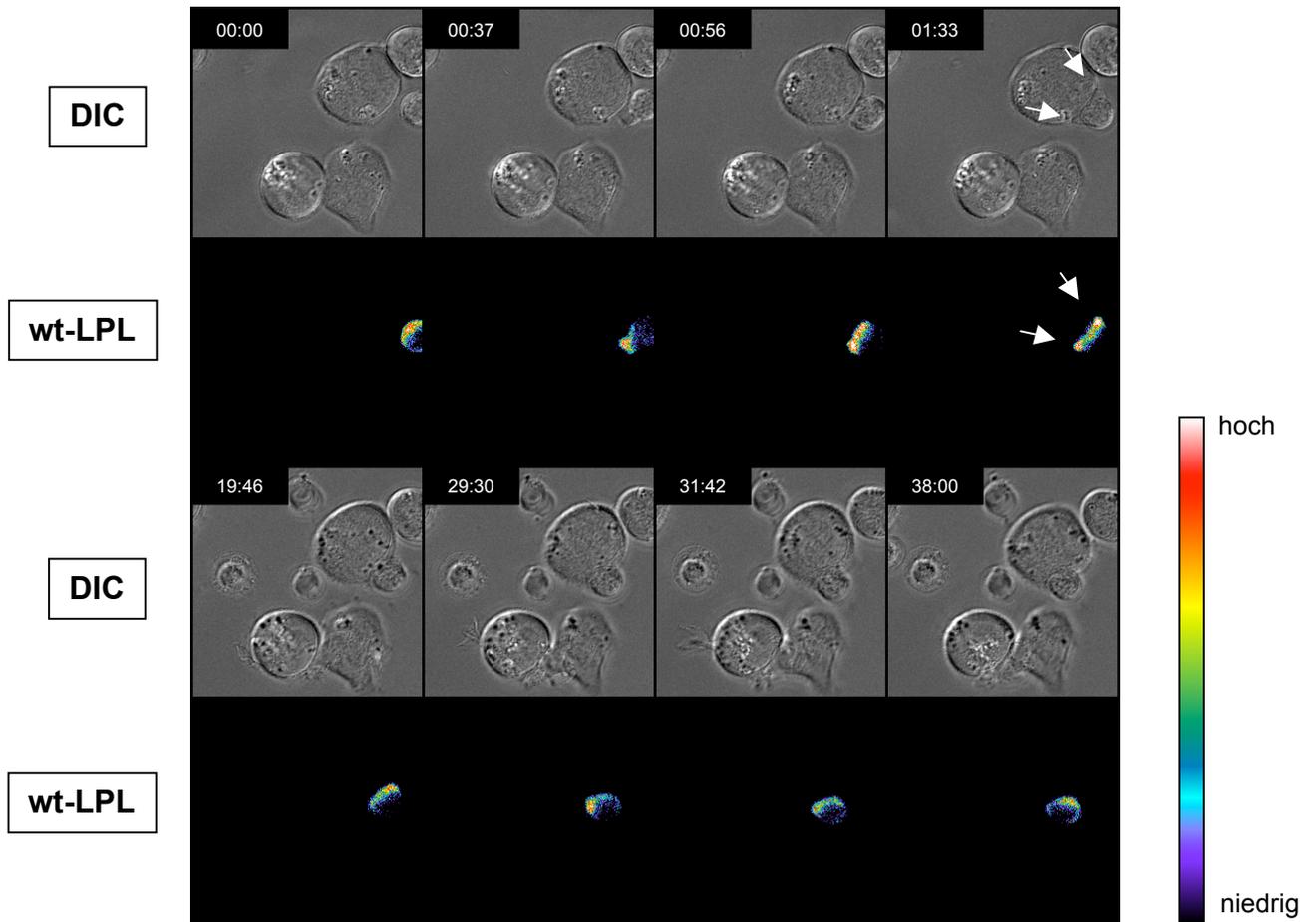
Humane PBTs wurden mit cDNA kodiertem EGFP (A), wt-LPL (B) oder 5A-LPL (C) elektroporiert und anschließend zusammen mit Raji^{sAg} B-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger ausgebracht. Anschließend wurde alle 18 Sekunden ein DIC und Fluoreszenzbild aufgenommen.

In der Abbildung (C) ist eine 5A-LPL exprimierende Zelle gezeigt, die Kontakte zu zwei B-Zellen aufweist. In Zellen mit nur einem Kontakt wird 5A-LPL ähnlich wie wt-LPL an die Kontaktzone verlagert (nicht gezeigt).

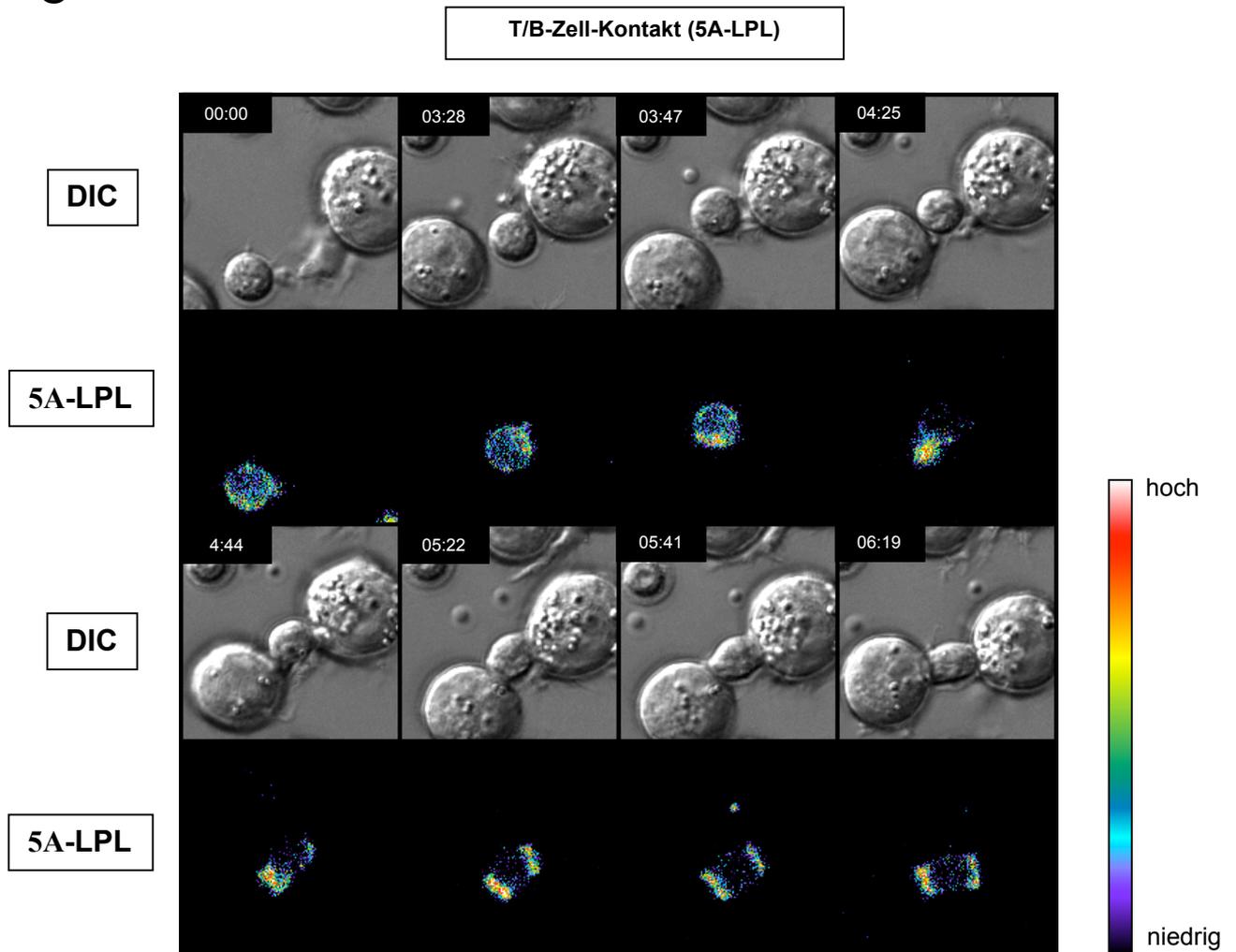
(A: großer Pfeil = Lamellipodium, kleiner Pfeil = erster T/B-Zell-Kontakt; B: Pfeile = seitliche Verlagerung von L-Plastin (Kragen)). Die Zahlen geben die Zeit in Minuten und Sekunden (MM:SS) wieder. Das erste Bild ist zum besseren Verständnis immer auf den Zeitpunkt $t = 00:00$ gesetzt. Die Fluoreszenzfärbung ist in Falschfarben wiedergegeben (s. rechten Balken).

B

T/B-Zell-Kontakt (wt-LPL)



C



keine lokale Anreicherung von EGFP an der Kontaktzone beobachtet (Abb. 4.4.7 A, Pfeil und Film 4.4.7.1 im ergänzenden Material). Im Gegensatz dazu wurde wt-LPL nach der ersten Berührung der PBT mit den B-Zellen innerhalb des kürzesten beobachteten Zeitraums von 18 Sekunden an die Kontaktzone verlagert (Abb. 4.4.7 B, und Film 4.4.7.2 im ergänzenden Material). Die Anreicherung ist an der rot/weißen Färbung deutlich zu erkennen. Die Verlagerung von L-Plastin an die Kontaktzone war dabei quasi quantitativ. An der Schnittstelle wurde L-Plastin innerhalb von maximal 18 Sekunden an die seitlichen Pole des Kontakts verlagert (Abb. 4.4.7 B, Pfeile). Allerdings war diese Verlagerung kein dauerhafter Zustand, sondern das Protein bewegte sich an der Kontaktzone „hin und her“. Die Verlagerung von L-Plastin an die Kontaktzone war in diesen Experimenten während der gesamten Zeit des bestehenden Kontakts, d.h. für mindestens 30 Minuten, zu

beobachten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen in diesem System nicht immer statisch auf den B-Zellen verharren, sondern auf ihnen wandern können (Abb. 4.4.7 B, vgl. Position der T-Zelle oben und unten rechts). Dies ist nicht unbedingt ein Widerspruch mit dem Modell der IS, weil hier keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob die beobachtete T-Zelle die passende V α -Kette zu dem Superantigen besitzen. Weiterhin ist es denkbar, dass selbst eine reife IS auf der APZ bewegt werden kann.

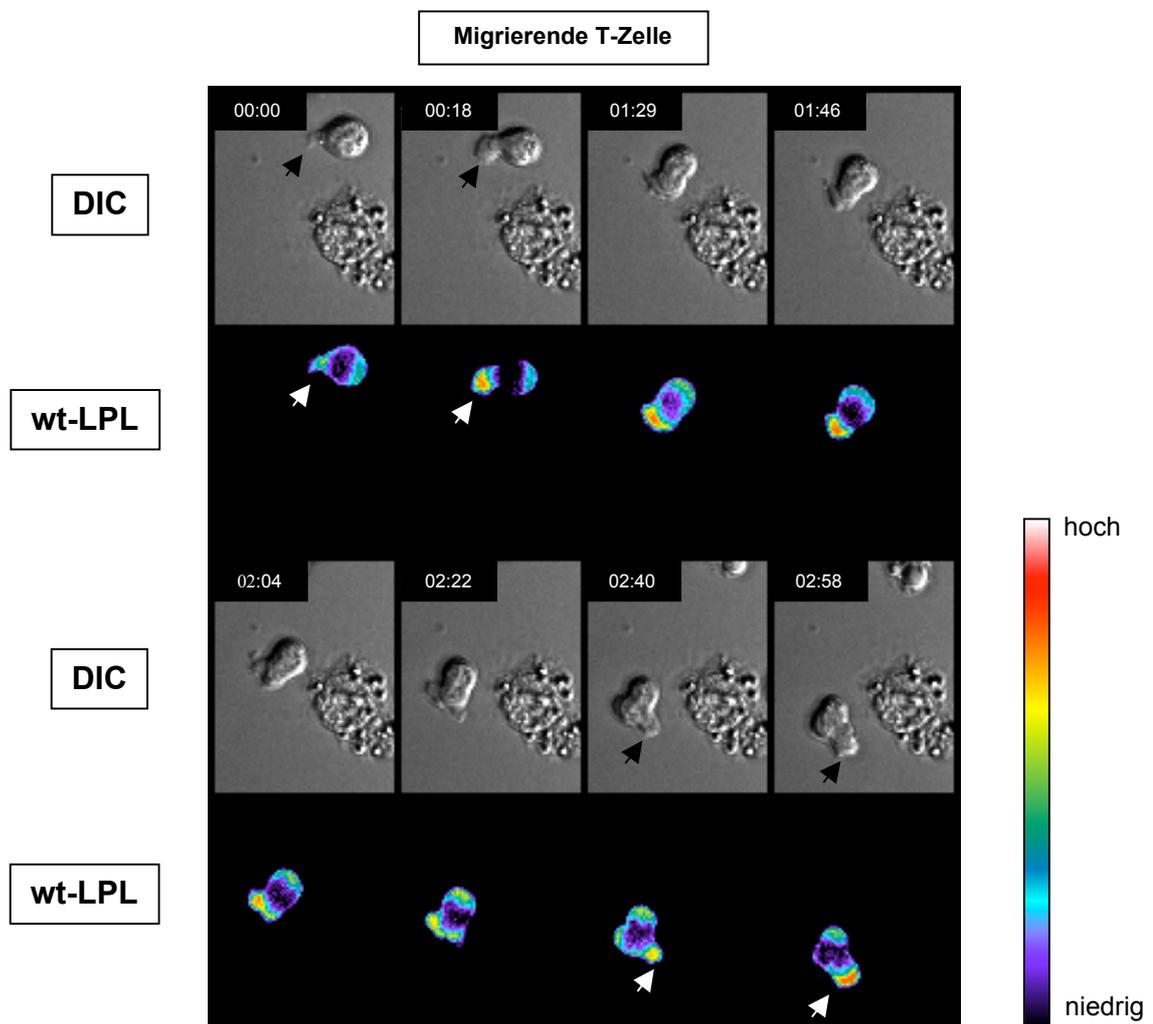
Die extrem schnelle und fast komplette Re-Lokalisierung von L-Plastin an die Kontaktzone zu Raji B-Zellen korreliert nicht mit dem Zeitverlauf der Phosphorylierung von L-Plastin, d.h. sie tritt sehr viel früher auf als die Phosphorylierung von L-Plastin. Zudem wurde bereits über konfokale Laser-Scanning Mikroskopie gezeigt, dass auch nicht phosphorylierbares L-Plastin an der T/B-Zell-Schnittstelle zu finden ist. Um zu bestätigen, dass auch die schnelle Translokation von L-Plastin an die Kontaktzone nicht von der Phosphorylierung abhängt, wurde die nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutante, 5A-LPL, in PBT exprimiert und anschließend die subzelluläre Lokalisierung zeitaufgelöst durch TLV analysiert. Tatsächlich zeigte auch diese Mutante eine schnelle Polarisation an den Zellkontakt, wie es für den Wildtyp oben beschrieben wurde. Dadurch wird verdeutlicht, dass L-Plastin unabhängig von der Phosphorylierung schnell an die Kontaktzone verlagert wird. In dem gezeigten Beispiel bildete eine T-Zelle sogar mit zwei Raji B-Zellen Kontakte aus (Abb. 4.4.8 C und Film 4.4.7.3 auf dem ergänzenden Material). Interessanterweise wurde L-Plastin dabei an beiden Kontaktstellen konzentriert. Daher ist die Verlagerung kein Resultat daraus, dass L-Plastin bereits in Zellausstülpungen, mit denen der Kontakt zur APZ bewirkt wird, angereichert ist. Wäre dies der Fall könnte eine duale Anreicherung von L-Plastin an zwei Kontaktstellen innerhalb einer T-Zelle nicht erklärt werden.

4.4.6.2 Polarisierung von L-Plastin in migrierenden T-Zellen

Auch für die reine Zellmigration ist eine schnelle Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts von wesentlicher Bedeutung. Daher wurde auch die subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin in migrierenden T-Zellen dokumentiert. In der Abbildung 4.4.8 und Film 4.4.8.1 im ergänzenden Material ist eine TLV-Aufnahme einer migrierenden T-Zelle gezeigt. In der jeweils oberen Reihe ist eine DIC Aufnahme und darunter das cDNA exprimierte wt-LPL abgebildet. Während der Fortbewegung bildeten migrierende T-Zellen ständig lamellipodienartige Ausstülpungen aus, die scheinbar wahllos an unterschiedlichen Polen der T-Zelle entstanden (Abb. 4.4.8, Pfeile). Diese Ausstülpungen tauchten innerhalb von

Sekunden auf und gingen immer mit einer massiven Verlagerung von L-Plastin in diese Strukturen einher, was an der roten Färbung in den Zellausstülpungen zu erkennen ist. Diese Beobachtungen passen zu den oben aufgeführten Phänotypen von PBT ohne Kontakt zu B-Zellen, die in der konfokalen Mikroskopie zu sehen waren (vergleiche Abb. 4.4.4 A). Die Funktion von L-Plastin in migrierenden T-Zellen wird in Zukunft näher untersucht werden. Dies ist auch deshalb interessant, weil die Phosphorylierung von L-Plastin bei Vorgängen während der $\alpha 2$ -Integrin-abhängigen Adhäsion eine Rolle zu spielen scheint (Jones *et al.*, 1998; van Kooyk und Figdor, 2000).

Abbildung 4.4.8



4.4.8 Migrierende T-Zelle

PBTs, die cDNA kodiertes L-Plastin-EGFP Fusionsprotein exprimieren, wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgebracht und anschließend mittels TLV alle 18 Sekunden ein DIC und Fluoreszenzbild aufgenommen. Die weißen Pfeile deuten auf gerade entstehende Membran-Ausstülpungen (Lamellipodien). Die Zahlen geben die Zeit in Minuten und Sekunden (MM:SS) wieder. Das erste Bild ist zum besseren Verständnis immer auf den Zeitpunkt $t = 00:00$ gesetzt.

5. Diskussion

Die Antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen durch APZs ist ein Vorgang, der in mehreren, zeitlich gegliederten Stadien abläuft. Jedes Stadium geht mit einer massiven Umstrukturierung der T-Zellen einher, die sowohl die Morphologie als auch die asymmetrische Aufteilung von zytoplasmatischen Proteinen und Oberflächenrezeptoren beinhaltet (Dustin und Chan, 2000). Die dynamische Gestaltung des Aktin-Zytoskeletts ist ausschlaggebend für die Reorganisierung von T-Zellen während der Antigen-abhängigen Aktivierung (Acuto und Cantrell, 2000). Zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zählt dabei nicht nur die Polymerisierung von G-Aktin zu neuen F-Aktin-Fasern bzw. umgekehrt der Abbau von F-Aktin zu G-Aktin, sondern auch die Bildung mehrdimensionaler F-Aktin Netzwerke (Samstag *et al.*, 2003). Diese vernetzten F-Aktin Strukturen haben auf die Morphologie der Zellen großen Einfluss und sind für komplexe Vorgänge, die mit einer Änderung der Zell-Gestalt einhergehen, wie Adhäsion, Migration und Zelleilung, unabdingbar (Bartles, 2000). Besonders stabile F-Aktin-Strukturen sind parallele F-Aktin Bündel. Diese stabilisieren vor allem Zell-Ausstülpungen, die während der Migration oder bei Zell-Zell-Kontakten entstehen (Bartles, 2000; Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003; Wülfing *et al.*, 2002b). Die Regulierung dieser Strukturen über Aktin-bündelnde Proteine muss daher ein wesentliches Element während der Aktivierung von Leukozyten sein. Ein bedeutendes Aktin-bündelndes Protein in Leukozyten ist L-Plastin. Über die Bedeutung von L-Plastin in T-Zellen ist derzeit nur sehr wenig bekannt. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Regulierung von L-Plastin in T-Zellen aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass L-Plastin während der T-Zell-Aktivierung über APZs durch zwei unabhängige Mechanismen reguliert wird. Einerseits wurde L-Plastin Kostimulations-abhängig an Ser-5 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung war nach einigen Minuten nachweisbar und wurde über 30 Minuten verstärkt. Andererseits verlagerte sich L-Plastin phosphorylierungs-unabhängig an die Kontaktzone zwischen T-Zellen und APZ. Diese Re-Lokalisierung ist im Gegensatz zur Phosphorylierung ein sehr schneller Prozess, der innerhalb der ersten Minute nach dem Kontakt der T-Zellen mit den APZ stattfand. Darüber hinaus wurde hier gezeigt, dass L-Plastin für die Aktivierung der T-Zellen unerlässlich ist. Eine Inhibierung von L-Plastin bzw. die Expression einer nicht-phosphorylierbaren Mutante in primären T-Zellen ging stets mit einer reduzierten Aktivierung der T-Zellen einher.

5.1 L-Plastin Expression in Leukozyten und nicht-hämatopoetischen Tumorzellen

L-Plastin gehört zur Familie der Fimbrine. Im humanen System sind drei Fimbrin-Homologe beschrieben: T-, I- und L-Plastin. Fimbrine sind von Hefen bis zum Menschen evolutionär hoch konservierte Aktin-bündelnde Proteine. L-Plastin wird in gesunden Menschen ausschließlich von Leukozyten gebildet (Lin *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1994). Bezüglich der Expression unterscheiden sich T-, B- und NK-Zellen nicht voneinander. Im Unterschied dazu konnte hier jedoch gezeigt werden, dass sich die Expressionsstärke von L-Plastin in Monozyten-Subpopulationen unterscheidet. Monozyten werden in zwei große Untergruppen gegliedert, die sowohl phänotypisch als auch funktionell charakteristische Merkmale aufweisen. Diese können durch die Expression oder das Fehlen des Fc-Rezeptors CD16 unterschieden werden. CD16-positive Monozyten bildeten mehr L-Plastin als CD16-negative Monozyten. Interessanterweise zeigen die CD16-positiven Monozyten auch eine effizientere Transmigration durch ruhende Endothelzelllayer als CD14-positive Monozyten (Randolph *et al.*, 2002). Während dieser transendothelialen Bewegung werden Pseudopodien an der Zellfront gebildet. Da Membranausstülpungen durch Aktin-Bündelung stabilisiert werden, könnte die höhere L-Plastin-Expression in CD16-positiven Monozyten diese transendotheliale Migration unterstützen. Interessanterweise wird L-Plastin auch in neoplastisch transformierten Zellen exprimiert (Goldstein *et al.*, 1985). In diesem Zusammenhang wird eine Korrelation zwischen der Mobilität von Tumor-Zellen und der L-Plastin-Expression diskutiert (Otsuka *et al.*, 2001).

5.2. Phosphorylierung von L-Plastin nach T-Zell-Kostimulation

Es wurde gezeigt, dass die Funktion von L-Plastin über zwei Regulationsmechanismen gesteuert werden kann: Einerseits weist L-Plastin Kalzium-Bindestellen auf, andererseits wurde eine Phosphorylierung beschrieben (Henning *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1990; Namba *et al.*, 1992; Shiroo und Matsushima, 1990). Durch die Bindung von Kalzium konnte die Assoziation von L-Plastin an F-Aktin *in vitro* deutlich verringert werden (Namba *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu ist über den Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktin-

Bindung bislang nichts bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Integrin-vermittelte Adhärenz von PMN durch phosphorylierte L-Plastin-Peptide beeinflusst werden kann. Es wird daher vermutet, dass über die Phosphorylierung von L-Plastin die Avidität von Integrinen durch reversible Bindung an Aktin gesteuert wird. Über die Funktion von L-Plastin während der T-Zell Aktivierung ist bislang wenig bekannt. Es wurde bisher gezeigt, dass eine Stimulation von T-Zellen über den TZR/CD3-Komplex alleine nicht zu einer L-Plastin Phosphorylierung führt (Henning *et al.*, 1994). Viele Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts finden allerdings erst nach Kostimulation statt, wodurch diese ein wesentliches Element für die Immunantwort darstellt (Samstag *et al.*, 2003; Wülfing und Davis, 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass L-Plastin bei klassischer T-Zell-Kostimulation, d.h. kooperative Stimulation von TZR/CD3 und den akzessorischen Rezeptoren CD2 oder CD28, phosphoryliert wird. Weiterhin konnte eine L-Plastin-Phosphorylierung nach PMA-Stimulation, durch die einige Kostimulations-abhängige Signaltransduktionswege angeschaltet werden, nachgewiesen werden.

Das Prinzip der Kostimulation wurde erstmals 1977 von Lafferty *et al.* vorgeschlagen, jedoch ohne dass die beteiligten kostimulatorischen Rezeptoren identifiziert waren (Lafferty und Woolnough, 1977). Mittlerweile ist bekannt, dass Kostimulation das TZR-vermittelte Kompetenzsignal moduliert, was einerseits zur Polarisierung der T-Zellen beiträgt, z.B. durch Aktin-abhängige Verlagerung von GEM und Rezeptoren an die Kontaktzone (Schwartz, 2003) und andererseits die Produktion von bestimmten Interleukinen, wie IL-2, vermittelt (Eibert *et al.*, 2004; Samstag *et al.*, 1992). Der am besten untersuchte akzessorische Rezeptor ist CD28. Durch die Stimulation von CD28 werden einige Signaltransduktionsmoleküle, wie PI3Kinase, die Serin/Threonin Protein Kinase B (PKB), Vav, sowie Rac und Cdc42 (Frauwirth und Thompson, 2002), aktiviert. Außer CD28 wurden weitere Rezeptoren beschrieben, die kostimulatorische Signale vermitteln. Ein bedeutender Vertreter dieser Rezeptoren ist CD2 (Meuer *et al.*, 1984; Brottier *et al.*, 1985). Obwohl einige Merkmale der CD2-Stimulation redundant mit CD28-Stimulationen zu sein scheinen, gibt es Hinweise darauf, dass Kostimulation über CD2 zu einem anderen Zytokin-Expressionsmuster führt, als jene über CD28. So werden vor allem IL-10, INF- γ und TGF- β durch CD2-Kostimulation gebildet und nur geringe Mengen IL-2. Kostimulation über CD28 führt indes zu großen Mengen an IL-2 (Bullens *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob die L-Plastin Phosphorylierung ein genereller Mechanismus der Kostimulation ist, wurde neben der CD28-Kostimulation jene über CD2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beide Arten der Kostimulation, d.h. CD3xCD2- und

CD3xCD28-Stimulation, zu einer vergleichbar starken L-Plastin Phosphorylierung führen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die L-Plastin Phosphorylierung einen allgemeinen molekularen Mechanismus darstellt, über den Kostimulation vermittelt wird, der unabhängig von den spezifischen Signalwegen der akzessorischen Rezeptoren CD2 und CD28 ist. Aufgrund der Fähigkeit von L-Plastin Aktin zu bündeln ist es denkbar, dass durch die Phosphorylierung eine Stabilisierung von präformierten Aktin-Netzwerken stattfindet.

Einen Hinweis darauf, dass die L-Plastin Phosphorylierung mit stabilisierenden Prozessen korreliert, lässt sich aus deren Kinetik ableiten. Die Phosphorylierung von L-Plastin stellt in der initialen T-Zell-Aktivierung, d.h. direkt nach Rezeptor Stimulation, ein relativ lang anhaltendes Ereignis dar. Sowohl Kostimulation über Antikörper, als auch Superantigen-vermittelte Stimulation mit Raji B-Zellen führte zu einem Phosphorylierungs-Signal von L-Plastin, das nach wenigen Minuten nachweisbar war und stetig über 15 Minuten zunahm. Das Signal blieb über mindestens eine Stunde stabil. Im Unterschied dazu sind viele Tyrosin-Phosphorylierungen bereits nach Sekunden nachweisbar und nur für wenige Minuten beständig. Die Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Lck an Tyr-394 ist beispielsweise nach 30 Sekunden gut nachweisbar, hat ihren Höhepunkt bereits nach 2,5 Minuten und ist nach 7,5 Minuten nicht mehr detektierbar (Danielian et al., 1989, Lee et al., 2002). Der gesamt Phospho-Tyrosin Gehalt der Zelle hat seine stärkste Ausprägung nach 5 Minuten und ist spätestens 15 Minuten nach der Rezeptor-Stimulation nicht mehr vorhanden (Chan *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2002). Die unterschiedlichen Kinetiken der Tyrosin- und L-Plastin Phosphorylierung korrelieren mit unterschiedlichen Phasen der T-Zell Aktivierung. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden mindestens fünf Phasen beschrieben, die während der Antigen-Stimulation von T-Zellen durchlaufen werden. Die Phasen sind durch die T-Zell-Morphologie, sowie die Anordnung von Oberflächenrezeptoren definiert (Dustin und Chan, 2000; Krummel und Davis, 2002). Krummel und Kollegen haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass in der frühen Phase der Antigen-abhängigen Stimulation von T-Zellen eine Oligomerisierung des TZR/CD3-Komplexes an der Kontaktzone stattfindet. Diese präformierten instabilen Kluster bilden sich unabhängig vom Aktin-Zytoskelett und korrelieren mit dem Einstrom von Kalzium-Ionen (Krummel und Davis, 2002). Erst anschließend werden weitere Moleküle (z.B. CD3 ζ) an die Kontaktzone verlagert und stabile Kluster gebildet. Diese Formierung stabiler Kluster ist abhängig von der Re-Organisation des Aktin-Zytoskeletts, die wiederum durch Kostimulation vermittelt wird (Krummel und Davis, 2002; Tskvitaria-

Fuller *et al.*, 2003; Wülfing und Davis, 1998; Wülfing *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von L-Plastin könnte daher auf eine Funktion in der zweiten Phase, der Kluster-Bildung hindeuten. Diese Hypothese wird von Experimenten gestützt, die zeigen, dass über die Phosphorylierung von L-Plastin die Avidität von $\alpha 2$ -Integrinen, d.h. die Aggregation dieser Rezeptoren auf PMN, reguliert wird (Jones *et al.*, 1998; van Kooyk und Figdor, 2000). Eine ähnliche Funktion könnte L-Plastin daher bei der Ausbildung und Stabilisierung der Rezeptor-Aggregate in der IS übernehmen.

5.3 L-Plastin Phosphorylierung an Ser-5

Um die Bedeutung der L-Plastin Phosphorylierung für die T-Zell Aktivierung funktionell zu analysieren, musste die genaue Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Darüber gab es bislang in T-Zellen keine, in anderen Zelltypen keine eindeutigen Daten. Ursprünglich wurde die Phosphorylierung an Serin-Resten beschrieben (Henning *et al.*, 1994; Shinomiya *et al.*, 1995). Eine weitere Analyse von L-Plastin aus adhärennten Makrophagen grenzte die Anzahl der möglichen phosphorylierten Serin-Reste auf zwei im N-Terminus ein: Ser-5 und Ser-7. Diese Reste sind in Konsensus-Sequenzen für die Serin-Kinasen Protein-Kinase A (PKA) und Casein-Kinase II (CKII) enthalten (Shinomiya *et al.*, 1995). Welche dieser beiden Serin-Reste als Phosphorylierungsstelle benutzt wird, scheint sich je nach Zelltypen zu unterscheiden: In Fibroblasten wurde eine Phosphorylierung an Ser-5 gefunden, wohingegen in myeloiden Leukämiezellen (Zellline K562) eine Phosphorylierung von Ser-5 und Ser-7 beschrieben wurde (Shinomiya *et al.*, 1995). Weiterhin wurde von Jones *et al.* Ser-5 als Phospho-Akzeptor von Peptiden, die den N-Terminus von L-Plastin darstellen, in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa nach Okadainsäure-Behandlung dargestellt (Jones *et al.*, 1998). Es konnte jedoch in keinem dieser Experimente ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung von Ser-7 nur nach vorheriger Phosphorylierung an Ser-5 erfolgt.

In dieser Arbeit wurde daher die natürlich vorkommende Phosphorylierungsstelle in primären humanen T-Lymphozyten nach Kostimulation analysiert. Dazu wurden L-Plastin Spots aus 2D-Gelen von Lysaten, die von PMA-stimulierten PBT gewonnen wurden, mittels Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund der Tatsache, dass Ser-5 und Ser-7 die potentiellen Phospho-Akzeptor-Reste darstellen, wurden nur Peptide sequenziert, die den N-Terminus von L-Plastin enthielten. Dabei konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass

Ser-5 in primären T-Zellen phosphoryliert wird. Es wurden keine Hinweise auf eine Phosphorylierung von Ser-7 gefunden. Eine doppelt phosphorylierte L-Plastin Form lag ebenfalls nicht vor. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von L-Plastin cDNA Konstrukten verifiziert, die als Wildtyp und Ser-5 zu Ala-5 Mutanten in primären T-Zellen exprimiert wurden. Dadurch wurde sicher gestellt, dass Ser-5 nicht nur nach PMA-Stimulation, sondern auch nach T-Zell-Kostimulation ausschließlich an Ser-5 phosphoryliert wird. Zusätzlich konnte ausgeschlossen werden, dass weitere, bisher unbekannte Phosphorylierungsstellen, z.B. in der Aktin-Binderegion, vorkommen. Durch die Kombination von massenspektrometrischer Analyse des endogenen L-Plastins aus primären T-Zellen und der Verwendung von Mutanten, die in untransformierten PBT exprimiert wurden, konnte hier zum ersten Mal Ser-5 als einzige Phosphorylierungsstelle in T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Nur durch die genaue Kenntnis der L-Plastin-Phosphorylierungsstelle wurde es ermöglicht, die Funktion und Relevanz der L-Plastin Phosphorylierung für die T-Zell-Aktivierung zu analysieren. Diese Experimente wurden mit cDNA exprimierten L-Plastin-EGFP Fusionsproteinen (entweder als Wildtyp oder nicht-phosphorylierbare Mutante (5A-LPL)) durchgeführt, die in PBT durch Nukleofektion eingebracht wurden. Als Kontrolle diente stets EGFP alleine. Nukleofektion stellt die einzige Möglichkeit dar, in einem nicht viralen System Proteine in primären T-Zellen zu exprimieren. Es konnte jedoch in mehreren Experimenten gezeigt werden, dass PBT nur bis zu zwei Tagen nach der Nukleofektion lebensfähig sind und daher Langzeitexperimente, wie Proliferations-Tests, nicht durchführbar sind (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen musste ein Marker gesucht werden, der abhängig von der Kostimulation ist und bereits kurze Zeit nach der Stimulation nachgewiesen werden kann. CD69 ist einer der frühesten Aktivierungsmarker auf T-Zellen. Dieses 60 kDa große Oberflächenmolekül wird bereits wenige Stunden nach Stimulation exprimiert und bleibt einige Tage stabil auf der Zell-Oberfläche nachweisbar. (Lopez-Cabrera *et al.*, 1993; Marzio *et al.*, 1999). Tatsächlich war die Expression von CD69 nicht alleine durch TZR/CD3 Stimulation zu erreichen, sondern bedurfte eines zweiten Signals über CD2 oder CD28. In PBT, die eine nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutante exprimieren, war die CD69-Expression deutlich reduziert gegenüber wildtyp-L-Plastin-exprimierenden Zellen. Ein möglicher molekularer Mechanismus dieser Suppression könnte im Fehlen von stabilen Rezeptor-Klustern liegen, die für die Aktivierung von T-Zellen essentiell ist (Dustin und Chan, 2000; Negulescu *et al.*, 1994).

Im Folgenden wurde daher die Bedeutung von L-Plastin für die Ausbildung von Rezeptor-Klustern genauer untersucht.

5.4 L-Plastin stabilisiert Rezeptor Kluster

Während der Antigen-abhängigen Stimulation entstehen an der Kontaktzone zwischen T-Zellen und APZ hoch organisierte Rezeptor-Kluster, die für eine vollständige Immunantwort der T-Zellen essentiell sind (Dustin und Chan, 2000; Grakoui *et al.*, 1999). Da für die Bildung solcher Kluster die Kostimulations-abhängige Umorganisation des Aktin Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung ist und die Phosphorylierung von L-Plastin nur nach Kostimulation nachzuweisen war, wurde die Rolle von L-Plastin während dieser Polarisierung von T-Zellen genauer untersucht. Dafür wurden zunächst Antikörper-induzierte Rezeptor-Caps als Modell zur Rezeptor-Kluster-Bildung analysiert. Obwohl sich Rezeptor-Caps in einigen Punkten von echten Zell-Zell-Kontakten unterscheiden, stellen sie ein probates Mittel zur Untersuchung von Molekülen dar, die an der Aggregation von Rezeptoren beteiligt sind (Snapper *et al.*, 1998; Wülfing *et al.*, 2002b). Im Gegensatz zu T-Zell-APZ-Kontakten - bei einer Antigen-Stimulation von primären T-Zellen - lassen sich in diesem System eine große Anzahl von Rezeptor-Kluster-positiven Zellen gleichzeitig darstellen. In Experimenten, bei denen Rezeptor-Caps mit kreuzvernetzenden Antikörpern induziert wurden, konnte gezeigt werden, dass L-Plastin mit CD3xCD2 Rezeptor-Caps kolokalisierte. Damit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Rezeptor-Klustern und einem Aktin-bündelnden Protein hergestellt. Um die Bedeutung von L-Plastin für diese Kluster genauer zu untersuchen, musste allerdings eine Möglichkeit gefunden werden, mit der L-Plastin in seiner Funktion inhibiert werden konnte. Da keine L-Plastin negativen Lymphozyten zur Verfügung standen, wurde ein anderer Weg gefunden, über den L-Plastin inhibiert werden konnte: Die niedermolekulare, membrangängige Substanz BPB inhibiert in PMN bereits in geringen Konzentrationen spezifisch L-Plastin durch eine kovalente Bindung (Rosales *et al.*, 1994). Daher lag die Vermutung nahe, dass BPB L-Plastin auch in humanen PBT inhibieren kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von T-Zellen mit BPB die Ausbildung von Rezeptor-Klustern verhindert. Stattdessen wurden nur kleine Rezeptor Flecken gebildet. Diese könnten durch Kluster entstehen, die eine kurze Halbwertszeit

besitzen und schnell wieder auseinander brechen oder indem das initiale Zusammenfließen von kleinen Klustern verhindert wurde.

Obwohl BPB ursprünglich als Inhibitor der PLA2 aus dem Gift der Cobra (*Naja naja naja*) beschrieben wurde (Roberts *et al.*, 1977), gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die unvollständige Klusterbildung nicht auf einer Hemmung der PLA2 beruht: Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Experimenten wurden zur Hemmung der Cobra PLA2 100 μM BPB eingesetzt (Roberts *et al.*, 1977). Weiterhin wurde beschrieben, dass BPB die sezernierte PLA2 aus den Giftdrüsen der Cobra deutlich besser inhibiert als intrazelluläre PLA2. Lister *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass PLA2 aus Leukozyten erst durch sehr hohen BPB Konzentrationen und dann auch nur teilweise hemmbar ist. Die Membran-assoziierte Kalzium-abhängige PLA2 aus Makrophagen wird beispielsweise mit einer IC_{50} von 550 μM BPB gehemmt (Lister *et al.*, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde eine BPB-Konzentration verwendet, die um den Faktor 550 geringer war als der beschriebene IC_{50} -Wert für PLA2. Darüber hinaus wurde publiziert, dass PLA2 in die IgG-abhängige Phagozytose von Makrophagen involviert ist und auch in diesen Experimenten hatte BPB keinen inhibitorischen Einfluss auf die PLA2 (Lennartz *et al.*, 1993; Rosales *et al.*, 1994). Es ist daher davon auszugehen, dass BPB die Bildung von Rezeptor-Klustern unabhängig von PLA2 inhibiert. Diese Annahme wurde durch die Verwendung eines spezifischen Inhibitors der PLA2 (DEDA) bestätigt. Der Inhibitor besitzt einen IC_{50} von 16 μM und wurde, wie in den Experimenten anderer Arbeitsgruppen (Oskarsson *et al.*, 1999), um Faktor 3 höher eingesetzt, um eine vollständige Inhibierung der PLA2 zu erreichen. DEDA hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der Rezeptor-Kluster. Die Wirksamkeit der Substanzen konnte durch einen Proliferations-Test sichergestellt werden. Weiterhin wurde getestet, ob das Substrat der PLA2, Arachidonsäure, der BPB-Inhibierung von Rezeptor-Caps entgegen wirken kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die Zugabe von Arachidonsäure in das Kulturmedium eine PLA2 Inhibierung überkommen werden kann (Lefkowitz *et al.*, 1991). Wie nach den Experimenten mit DEDA zu erwarten war, konnte Arachidonsäure die BPB-induzierte Inhibierung von Rezeptor-Caps nicht beeinflussen, sodass der BPB-Effekt nicht durch eine Hemmung der PLA2 erklärt werden kann.

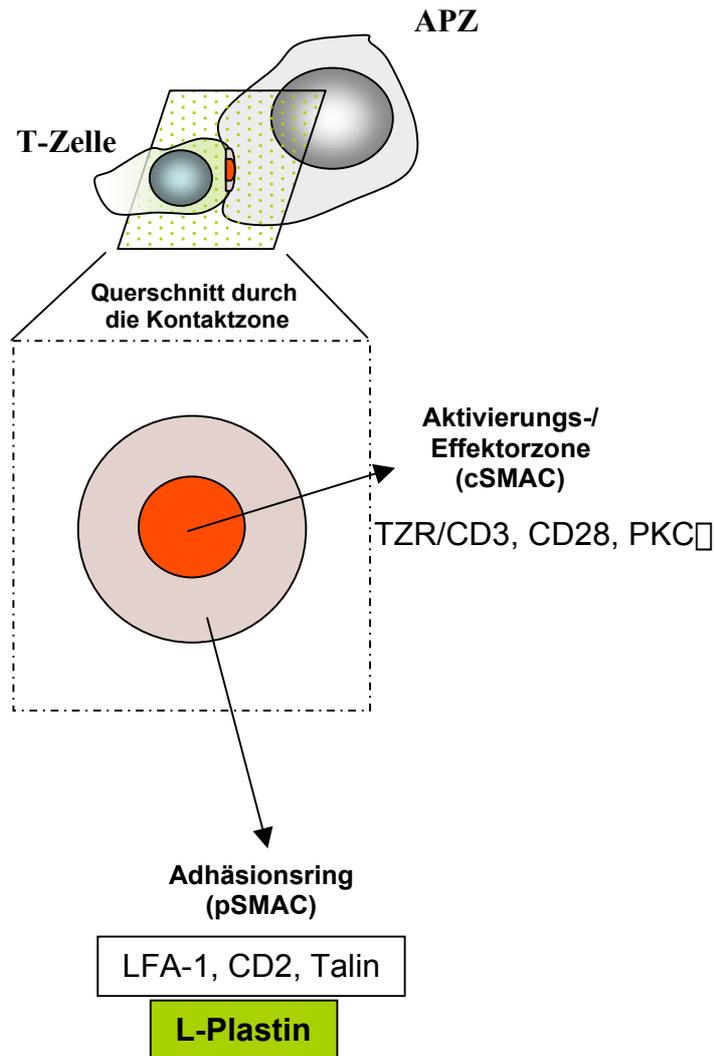
Dadurch, dass BPB kovalent an L-Plastin bindet (Rosales *et al.*, 1994), konnte endogenes L-Plastin durch BPB funktionell ausgeschaltet werden, was zu einer Inhibierung der Cap-Bildung führte. Die Funktion des endogenen L-Plastins konnte in einem bestimmten experimentellen Zeitfenster durch cDNA exprimiertes L-Plastin-EGFP Fusionsprotein

ersetzt werden. Es wurde eine Revertierung der BPB-abhängigen Inhibierung der Rezeptor-Klusterung erreicht, während Zellen, die EGFP-Kontrollprotein exprimieren, weiterhin in der Cap-Ausbildung defizient waren. Folglich konnte zweifelsfrei belegt werden, dass BPB die Cap-Bildung spezifisch durch eine Beeinflussung von L-Plastin hemmt. Interessanterweise konnte in diesem System durch nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutanten nur eine partielle Wiederherstellung der Cap-Bildung erreicht werden. Dieses Resultat ist mit der Hypothese zu erklären, dass die Phosphorylierung von L-Plastin eine stabilisierende Wirkung auf präformierte Protein-Kluster besitzt. Demnach wäre L-Plastin zum einen per se für die Ausbildung von Klustern notwendig, zum anderen würde die nachfolgende Phosphorylierung zu einer Stabilisierung der Kluster führen. Daher könnte die Expression von nicht-phosphorylierbarem L-Plastin ausreichen, um instabile Kluster zu bilden.

5.5 L-Plastin und die Immunologische Synapse

Um nachzuweisen, dass L-Plastin nicht nur in Rezeptor-Caps, sondern auch an der Kontaktzone von T-Zellen und APZ lokalisiert ist, wurden in dieser Arbeit B-Zellen als APZ verwendet, die zur T-Zell Stimulation mit Superantigenen beladen wurden (Alcover *et al.*, 1992). Es ist bekannt, dass an der Kontaktzone zwischen B- und T-Zellen verschiedene Moleküle akkumulieren (Krawczyk und Penninger, 2001). Nach wenigen Minuten werden dort kleine Mikro-Kluster gebildet, die bei T_H-Zellen aus TZR/CD3 und CD4 bestehen (Wetzel *et al.*, 2002; Wülfing *et al.*, 2002a). Diese Rezeptoren bilden einen instabilen Ring, der einen zentralen LFA-1-Kluster umschließt. In diesem Stadium spricht man von einer unreifen IS. Die Synapse reift anschließend, wobei CD4 aus den Klustern verschwindet und die TZR-Kluster eine zentrale Aktivierungszone bilden (cSMAC). LFA-1 befindet sich in diesem Stadium zusammen mit CD2 im peripheren Adhäsionsbereich (pSMAC) rund um den zentralen TZR angeordnet. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass sich L-Plastin an der Superantigen-induzierten Kontaktstelle zwischen T-Zellen und B-Zellen anreicherte. Durch eine digitale 3D-Rekonstruktion von konfokalen Immunfluoreszenz-Bildern wurde eine L-Plastin Anreicherung in und um den pSMAC der IS festgestellt. Diese Lokalisierung entspricht der des CD2-Rezeptors. Dazu passt auch, dass L-Plastin in CD2-enthaltenden Rezeptor-

Abbildung 5.1

Reife Immunologische Synapse**Abb. 5.1 Modell der Immunologischen Synapse**

Im oberen Teil ist ein Zell-Zell-Konjugat, das aus einer T- und B-Zelle besteht, gezeigt. Darunter ist ein Querschnitt durch die Kontaktzone abgebildet, die die Struktur einer reifen IS zeigt. In der inneren Aktivierungs- und Effektorzone ist CD3, CD28 und PKC-Theta lokalisiert. Der pSMAC beinhaltet die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und CD2, sowie den Membran-Anker Talin. In diesem Bereich reichert sich L-Plastin an.

Caps angereichert war. Daher kann das Modell der reifen IS im Bereich des pSMACs erweitert werden und L-Plastin als eines der beteiligten Proteine hinzugefügt werden (Abb. 3.1). Obwohl B-Zellen sich im L-Plastin Expressionsniveau nicht von T-Zellen unterscheiden, konnte eine Akkumulation nur auf der Seite der T-Zellen nachgewiesen werden, während L-Plastin in der Antigen-tragenden B-Lymphomzelllinie Raji immer gleichmäßig im Zytoplasma verteilt war. Diese Beobachtung stimmt mit Berichten überein, dass das B-Zell Zytoskelett keine aktive Rolle bei der Ausbildung der IS spielt (Delon *et al.*, 1998; Wülfing *et al.*, 1998).

Der für die Verlagerung von L-Plastin in T-Zellen zugrunde liegende Mechanismus ist nicht bekannt. Da Aktin ebenfalls an der Kontaktzone angereichert ist (Daten nicht gezeigt und (Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003)), könnte die Verlagerung durch Aktin-Bindung verursacht werden. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass nur etwa 5% des zellulären L-Plastins in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion enthalten waren, während die Re-Lokalisierung an die Kontaktzone fast das gesamte L-Plastin umfasste. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Polarisierung von L-Plastin an der Kontaktzone unabhängig von einer Aktin/L-Plastin Bindung ist.

Die Re-Lokalisierung von L-Plastin ist ein sehr schneller Vorgang. Bereits innerhalb von 30 Sekunden wurde nahezu das gesamte zelluläre L-Plastin an die Kontaktzone verlagert. Interessanterweise wurde L-Plastin bereits in Abwesenheit von Superantigenen an der Kontaktzone nachgewiesen. Da ohne die Superantigene keine L-Plastin Phosphorylierung detektiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die schnelle Verlagerung unabhängig von der L-Plastin Phosphorylierung ist. Dies kann auch indirekt aus der Phosphorylierungskinetik von L-Plastin geschlossen werden. Die Phosphorylierung ist ein langsamer und stetiger Prozess, der über 30 Minuten stattfindet, während die Verlagerung von L-Plastin an die Kontaktzone deutlich schneller, nämlich in weniger als 30 Sekunden, von statten ging. Letztlich wurde die Unabhängigkeit der L-Plastin Translokation vom Phosphorylierungszustand durch die Verlagerung von nicht-phosphorylierbaren L-Plastin Mutanten an die Kontaktzone bestätigt. Dieses Ergebnis entsprach zunächst nicht den Erwartungen, da nach allgemeiner Auffassung die Verlagerung einiger Oberflächenmoleküle und GEM zur Zell-Kontaktzone durch Kostimulation vermittelt wird (Viola *et al.*, 1999; Wülfing und Davis, 1998; Wülfing *et al.*, 2002b). Obwohl L-Plastin abhängig von Kostimulation an Ser-5 phosphoryliert wird, sind andere Mechanismen für die subzelluläre Lokalisierung von L-Plastin verantwortlich. L-Plastin enthält in der Kopf-

Domäne EF-Hand Kalziumbindestellen. Es ist daher möglich, dass die Verlagerung von L-Plastin durch Kalziumbindung vermittelt wird. Hierfür spricht zum Beispiel, dass *in vitro* generierte DC bereits ohne Antigen-Peptid ein Kalzium-Signal in T-Zellen auslösen können (Revy *et al.*, 2001). Durch einen solchen Kalzium-Einstrom könnte der Befund erklärt werden, dass L-Plastin unabhängig von der Phosphorylierung und in Abwesenheit von Superantigenen in die Kontaktzone verlagert wird.

5.6 Amöboide Migration von T-Lymphozyten

Um die oben beschriebenen Zell-Konjugate zu bilden, müssen zu Beginn T-Zellen durch Migration in die Nähe von APZ kommen. Im Folgenden wird die Lokalisation von L-Plastin in migrierenden T-Zellen diskutiert.

Über Time-Lapse-Videomikroskopie wurde gezeigt, dass T-Zellen während der Wanderung ständig lamellipodienartige Membran-Ausstülpungen bildeten (Weiss und Littman, 1994). Diese Art der Fortbewegung wurde als amöboide Migration von T-Zellen beschrieben (Friedl *et al.*, 2001). Die Pseudopodien entstanden meistens in der jeweiligen Wanderungsrichtung der T-Zellen an deren Vorderende. Hier wurde gezeigt, dass L-Plastin stets in diese Membranausstülpungen verlagert wurde. Während dieser Art der Migration war L-Plastin also in der Zellfront zu finden. Die Frage welche Bedeutung diese Verlagerung für die Migration hat, kann derzeit nicht beantwortet werden. Auch bei diesen Prozessen könnte der Kalzium-Einstrom eine Rolle spielen. Physiologisch kommt es in T-Lymphozyten zu oszillierenden Kalzium-Spitzen (Kalzium-Influx ($[Ca^{2+}]_i$)) mit einer Frequenz von bis zu 1,5 Mal in der Minute (Negulescu *et al.*, 1996). Diese Häufigkeit korreliert mit dem beobachteten Auftreten der Pseudopodien. Tatsächlich sind $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen für die Zell-Morphologie von entscheidender Bedeutung. Vorläufige eigene Experimente zeigen tatsächlich, dass L-Plastin durch Behandlung von T-Zellen mit Ionomycin, wodurch ein Kalzium-Einstrom ausgelöst wird, in die Triton X-114 unlösliche Zytoskelett-Fraktion übergeht (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass die subzelluläre Lokalisation von L-Plastin zumindest teilweise durch Kalzium-Ionen reguliert wird.

5.6 Schlussfolgerung: Modell der L-Plastin Regulierung in humanen T Zellen

L-Plastin wird in T-Zellen über zwei getrennte Mechanismen mit jeweils unterschiedlicher Kinetik reguliert (Abb. 5.2): Erstens durch eine schnelle subzelluläre Verlagerung und zweitens durch eine Kostimulations-abhängige Phosphorylierung an Ser-5. In ruhenden T-Zellen ist L-Plastin gleichmäßig in den Zellen verteilt (Abb. 5.2 a). Nach APZ-Kontakt bzw. Aktivierung der T-Zellen kommt es zu einer schnellen Re-Orientierung an einen oder zwei Polen der T-Zelle (Abb. 5.2 b). Diese subzelluläre Lokalisierung wird initial durch ein Phosphorylierungs- und Kostimulations-unabhängiges Ereignis ausgelöst und findet im Zeitraum von Sekunden statt. Damit übereinstimmend ist L-Plastin in der frühen Kontaktzone zwischen T- und B-Zellen zu finden, die ebenfalls Kostimulations-unabhängig gebildet wird. Darüber hinaus ist eine nicht-phosphorylierbare L-Plastin Mutante (5A-LPL) in dieser Kontaktzone zu finden, was unterstreicht, dass eine Kostimulations-abhängige L-Plastin Phosphorylierung für die subzelluläre Lokalisierung dieses Proteins nicht nötig ist. Möglicherweise wird L-Plastin durch Kalzium-Bindung an EF-Hand Kalzium-Bindestellen, die in der Kopfdomäne von L-Plastin zu finden sind, reguliert. Mit der Verlagerung von L-Plastin entstehen in dieser frühen Phase kleine gleichzeitig Rezeptor-Kluster. Die Bildung dieser Mini-Kluster ist allerdings unabhängig von L-Plastin, denn eine Inhibierung von L-Plastin durch BPB verhindert nicht die Ausbildung der kleinen Kluster (Abb. 5.2 b).

Die zweite Welle der L-Plastin Regulierung erfolgt über die Kostimulations-abhängige Phosphorylierung an Ser-5 (Abb. 5.2 c). Im Vergleich mit der Kostimulations-unabhängigen Verlagerung ist die Phosphorylierung ein langsamer Vorgang. Es ist daher davon auszugehen, dass L-Plastin erst nach der Re-Lokalisierung phosphoryliert wird und sich dabei bereits in der räumlichen Nähe präformierter, kleiner Kluster befindet. Nachdem L-Plastin dort Kostimulations-abhängig an Ser-5 phosphoryliert wurde, spricht es wahrscheinlich eine Rolle bei dem Zusammenfließen kleiner Kluster und der Stabilisierung großer Rezeptor-Aggregate (Abb. 5.2 c). Dafür spricht die Tatsache, dass BPB die Aggregation der Rezeptoren zu induzierte Inhibierung von Rezeptor-Caps hemmt. Dieser Effekt kann durch Expression von wildtyp-L-Plastin kompensiert werden kann, sodass die Rezeptoren wieder zu großen Aggregaten zusammenfließen können. Durch Expression von

nicht-phosphorylierbarem L-Plastin wird dieser funktionelle L-Plastin "Knock-out" Zustand nur unvollständig kompensiert.

Ceterum censeo – die Regulierung von L-Plastin während der T-Zell-Aktivierung erfolgt in zwei Wellen und stellt ein essentielles Element für und während unterschiedlicher Phasen der T-Zell Aktivierung dar. Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen müssen beide L-Plastin Regulierungssignale (Checkpoints) vorhanden sein.

Abbildung 5.2

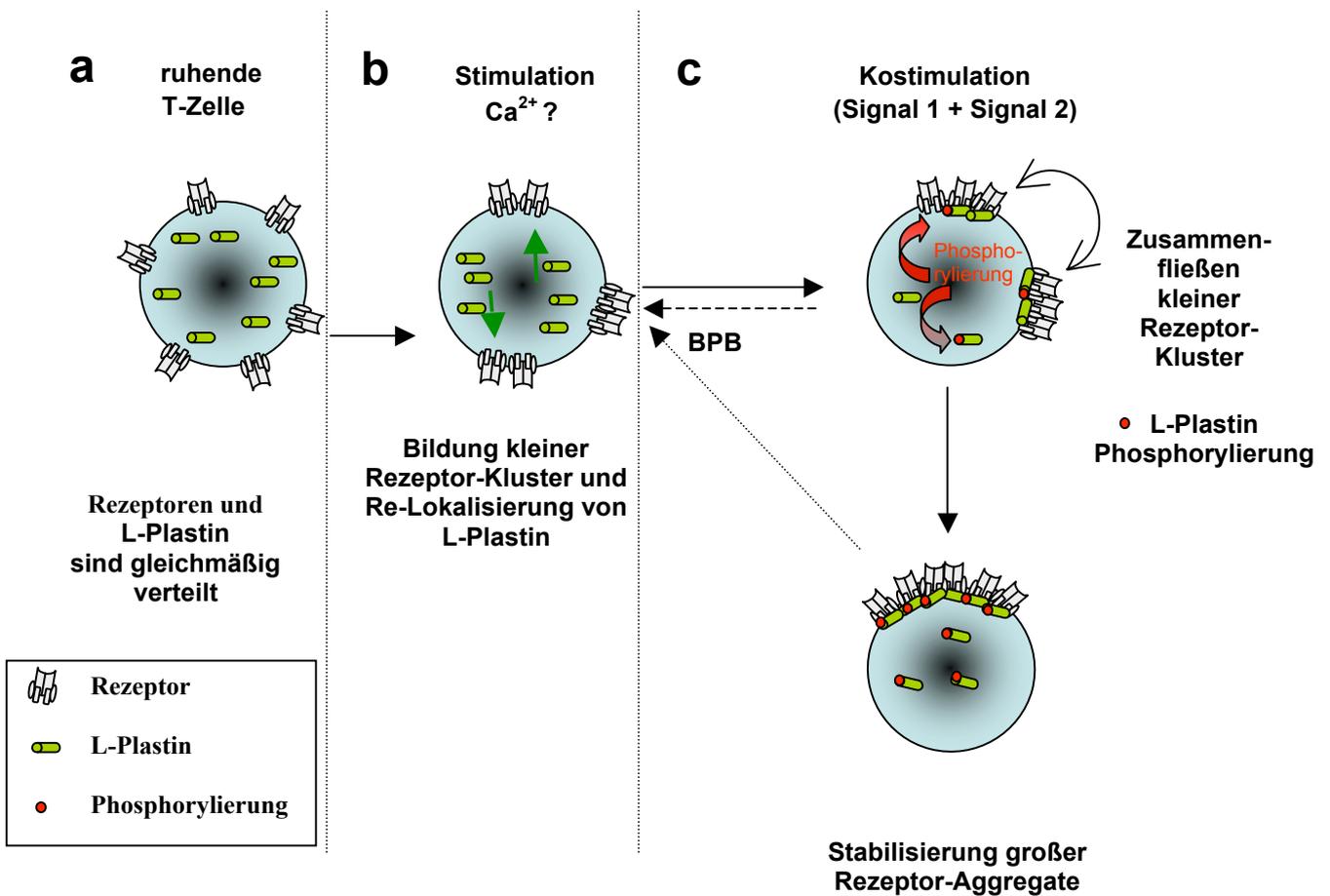


Abb. 5.2 Modell: L-Plastin während der T-Zell Aktivierung

Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell zur Regulierung und Funktion von L-Plastin während der Aktivierung von T-Zellen. (a) In ruhenden T-Zellen sind die Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche und L-Plastin im Zytoplasma gleichmäßig verteilt. (b) Nach der Aktivierung fließen die Rezeptoren schnell zusammen und bilden unabhängig von L-Plastin kleine Kluster. Während dieser Phase wird L-Plastin in der Zelle zu ein oder zwei Zellpolen verlagert (grüne Pfeile). Diese Re-Lokalisierung wird vermutlich durch Kalzium gesteuert. (c) Bei Kostimulation fließen die Kluster zusammen und bilden große Aggregate. Während des Zusammenfließens wird L-Plastin phosphoryliert (rote Punkte, rote Pfeile), was zu einer Stabilisierung der Kluster führt. Eine Inhibierung der Verlagerung von L-Plastin, z.B. durch BPB, verhindert das Zusammenfließen der Rezeptoren und führt nur zu kleinen Klustern (gestrichelter Pfeil). Die Verhinderung der Phosphorylierung von L-Plastin führt ebenfalls zu kleinen Rezeptor-Klustern (gepunkteter Pfeil), wahrscheinlich durch eine fehlende Stabilisierung der Kluster.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

[Ca ²⁺] _i	Kalzium-Influx – Einstrom von Kalzium-Ionen in das Zytoplasma
2D	Zweidimensionale
AA	Aminosäuren
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenz-Farbstoff)
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
Arp2/3	engl. <u>A</u> ctin <u>r</u> elated <u>p</u> roteins
B7.1	Ligand für CD28 und CTLA-4 (CD80)
B7.2	Ligand für CD28 und CTLA-4 (CD86)
BPB	Bromophenacyl Bromid
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zell Rezeptor
CD	engl. Cluster of Differentiation
CD14	Rezeptor für Lipopolysaccharide und lipopolysaccharid-bindende Proteine
CD2	Synonyme: T11, LFA-2; Adhäsions und aktivierender Rezeptor auf T- und NK-Zellen; Ligand: CD58
CD45RA	CD45 Splice Variante, Definiert im humanen System naive hämatopoetische Zellen
CD45RO	CD45 Splice Variante, Definiert im humanen System Gedächtniszellen
CD80	Ligand für CD28 und CTLA-4 (B7.1)
CD86	Ligand für CD28 und CTLA-4 (B7.2)
Cdc42	engl. Cell division cycle 42 (GTP-Bindeprotein, 25k Da)
CKII	Casein-Kinase II
cSMAC	engl. central <u>s</u> upramolecular <u>a</u> ctivation <u>c</u> luster
DC	engl. Dendritic cells
DEDA	7,7-Dimethyleicosadionsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EPM	Ereignisse pro Minute
FACS	engl. Fluorescence activated cell separation
FITC	Fluorescein (Fluoreszenz-Farbstoff)
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GEM	engl. glycosphingolipid-enriched microdomains
EGFP	engl. Enhanced green fluorescence proteine
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin
INF	Interferon
IS	Immunologische Synapse
ITAM	engl. <u>I</u> mmunoreceptor <u>t</u> yrosine-based <u>a</u> ctivation <u>m</u> otif
LAT	engl. <u>L</u> inker for <u>a</u> ktivation of <u>T</u> cells
Lck	engl. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	engl. Lymphocyte function-associated antigen-1
LFA-3	engl. Lymphocyte function-associated antigen-3

LSM	Laserscan Mikroskopie
MHC	engl. Major histokompatibility complex
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBT	Periphere Blut T Lymphozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenz-Farbstoff)
PerCP	Peridinin chlorophyll protein (Fluoreszenz-Farbstoff)
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Protein-Kinase A
PLA2	Phospholipase A2
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
POX	Peroxidase
pSMAC	engl. peripheral supramolecular activation cluster
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raji	Burkitt Lymphom B-Zellen (Raji)
Raji ^{sAg}	Superantigen beladene Burkitt Lymphom B-Zellen (Raji)
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat-Polyacryl Gelelektrophorese
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
SEF	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin F
SLP-76	engl. SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC	supramolekularer Aktivierungskluster
SRBC	Schafserythrozyten
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _H	T-Helfer
T _z	Zytotoxische T-Zellen
TLV	Time-Lapse-Videomikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell Rezeptor
U	Einheit
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vh	Voltstunden
VM	Vollmedium
Wasp	engl. Wiskott-Aldrich syndrome proteine
ZAP-70	engl. ζ-associated protein of 70 kDa

7. Literaturverzeichnis

Acuto, O., und Cantrell, D. (2000). T cell activation and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 165-184.

Albert-Wolf, M., Meuer, S. C., und Wallich, R. (1991). Dual function of recombinant human CD58: Inhibition of T cell adhesion and activation via the CD2 pathway. *Int. Immunol.* 3, 1335-1347.

Alcover, A., Juillard, V., und Acuto, O. (1992). Engagement of major histocompatibility complex class I and class II molecules up-regulates intercellular adhesion of human B cells via a CD11/CD18-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22, 405-412.

Alonso, M. A., und Millan, J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 114, 3957-3365.

Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W., und Ohashi, P. S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7, 549-557.

Bartles, J. R. (2000). Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 72-78.

Bell, G. M., Fargnoli, J., Bolen, J. B., Kish, L., und Imboden, J. B. (1996). The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J. Exp. Med.* 183, 169-178.

Belz, G. T., Carbone, F. R., und Heath, W. R. (2002). Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol.* 22, 439-448.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., und Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x_L. *Immunity* 3, 87-98.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., und Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.

Brottier, P., Boumsell, L., Gelin, C., und Bernard, A. (1985). T cell activation via CD2 (T_Hgp50) molecules: accessory cells are required to trigger T cell activation via CD2-D66 plus CD2-9.6/T11₁ epitopes. *J. Immunol.* 135, 1624-1631.

Brown, D. A., und Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.

- Bullens, D. M., Rafiq, K., Charitidou, L., Peng, X., Kasran, A., Warmerdam, P. A., Van Gool, S. W., und Ceuppens, J. L. (2001).** Effects of co-stimulation by CD58 on human T cell cytokine production: a selective cytokine pattern with induction of high IL-10 production. *Int. Immunol.* *13*, 181-191.
- Butcher, E. C., und Picker, L. J. (1996).** Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
- Campanero, M. R., Sanchez-Mateos, P., del Pozo, M. A., und Sanchez-Madrid, F. (1994).** ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J. Cell Biol.* *127*, 867-878.
- Cannon, J. L., Labno, C. M., Bosco, G., Seth, A., McGavin, M. H., Siminovitch, K. A., Rosen, M. K., und Burkhardt, J. K. (2001).** Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* *15*, 249-259.
- Cantrell, D. (1996).** T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 259-274.
- Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D., und 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.
- Chan, A. Y., Bailly, M., Zebda, N., Segall, J. E., und Condeelis, J. S. (2000).** Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J. Cell Biol.* *148*, 531-542.
- Cherukuri, A., Dykstra, M., und Pierce, S. K. (2001).** Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* *14*, 657-660.
- Cooper, J. A., und Schafer, D. A. (2000).** Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 97-103.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y. H., Goldman, R. D., und Matsudaira, P. (1999).** Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J. Cell Biol.* *146*, 831-842.
- Danielian, S., Fagard, R., Alcover, A., Acuto, O., und Fischer, S. (1989).** The lymphocyte specific protein tyrosine kinase p56lck is hyperphosphorylated on serine and tyrosine residues within minutes after activation via T cell receptor or CD2. *Eur. J. Immunol.* *19*, 2183-2189
- de Arruda, M., Watson, S., Lin, C. S., Leavitt, J., und Matsudaira, P. (1990).** Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J. Cell Biol.* *111*, 1069-1079.

- del Pozo, M. A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., und Sanchez-Madrid, F. (1995).** Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* *131*, 495-508.
- Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R., und Trautmann, A. (1998).** Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur. J. Immunol.* *28*, 716-729.
- DiNubile, M. J., Cassimeris, L., Joyce, M., und Zigmond, S. H. (1995).** Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: the role of capping protein-beta 2. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1659-1671.
- Du, J., und Frieden, C. (1998).** Kinetic studies on the effect of yeast cofilin on yeast actin polymerization. *Biochemistry (Mosc).* *37*, 13276-13284.
- Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A., und Unanue, E. R. (1997).** Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3909-3913.
- Dustin, M. L., und Chan, A. C. (2000).** Signaling takes shape in the immune system. *Cell* *103*, 283-294.
- Dustin, M. L., und Cooper, J. A. (2000).** The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol.* *1*, 23-29.
- Dustin, M. L., und Shaw, A. S. (1999).** Costimulation: building an immunological synapse. *Science* *283*, 649-650.
- Eibert, S. M., Lee, K. H., Pipkorn, R., Sester, U., Wabnitz, G. H., Giese, T., Meuer, S. C., und Samstag, Y. (2004).** Cofilin peptide homologues interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1957-1962.
- Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L. E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., *et al.* (1998a).** Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* *8*, 554-562.
- Fischer, K. D., Tedford, K., und Penninger, J. M. (1998b).** Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin. Immunol.* *10*, 317-327.
- Frauwirth, K. A., und Thompson, C. B. (2002).** Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* *109*, 295-299.
- Friedl, P., Borgmann, S., und Brocker, E. B. (2001).** Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the *Dictyostelium* paradigm of cell movement. *J. Leukoc. Biol.* *70*, 491-509.
- Friedl, P., und Brocker, E. B. (2000).** T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev. Immunol.* *7*, 249-266.

- Germain, R. N. (2001).** The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J. Biol. Chem.* 276, 35223-35226.
- Goldstein, D., Djeu, J., Latter, G., Burbeck, S., und Leavitt, J. (1985).** Abundant synthesis of the transformation-induced protein of neoplastic human fibroblasts, plastin, in normal lymphocytes. *Cancer Res.* 45, 5643-5647.
- Gollob, J. A., und Ritz, J. (1996).** CD2-CD58 interaction and the control of T-cell interleukin-12 responsiveness. Adhesion molecules link innate and acquired immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 795, 71-81.
- Gomez-Marquez, J., Dosil, M., Segade, F., Bustelo, X. R., Pichel, J. G., Dominguez, F., und Freire, M. (1989).** Thymosin-beta 4 gene. Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes. *J. Immunol.* 143, 2740-2744.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., und Dustin, M. L. (1999).** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Harder, T., und Simons, K. (1997).** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., und Allison, J. P. (1992).** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.
- Henning, S. W., Meuer, S. C., und Samstag, Y. (1994).** Serine phosphorylation of a 67kDa protein in human T lymphocytes represents an accessory receptor mediated signalling event. *J. Immunol.* 152, 4808-4815.
- Huang, J., Lo, P. F., Zal, T., Gascoigne, N. R., Smith, B. A., Levin, S. D., und Grey, H. M. (2002).** CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9369-9373.
- Huff, T., Muller, C. S., Otto, A. M., Netzker, R., und Hannappel, E. (2001).** beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 205-220.
- Ichetovkin, I., Grant, W., und Condeelis, J. (2002).** Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12, 79-84.
- Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., und Findell, P. R. (1995).** Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* 270, 7029-7032.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M. (2001).** *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Fifth Edition edn, Garland Publishing).

- Jones, S. L., und Brown, E. J. (1996).** FcγRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* *271*, 14623-11430.
- Jones, S. L., Wang, J., Turck, C. W., und Brown, E. J. (1998).** A role for the actin-bundling protein L-plastin in the regulation of leukocyte integrin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9331-9336.
- June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M., und Thompson, C. B. (1994).** The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* *15*, 321-331.
- Kane, L. P., Lin, J., und Weiss, A. (2002).** It's all Rel-ative: NF-κB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol.* *23*, 413-420.
- Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F. S., und Parkman, R. (1986).** Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* *68*, 1329-1332.
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., und Rosen, M. K. (2000).** Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151-158.
- Kovar, D. R., Staiger, C. J., Weaver, E. A., und McCurdy, D. W. (2000).** AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *24*, 625-636.
- Koyasu, S., Lawton, T., Novick, D., Recny, M. A., Siciliano, R. F., Wallner, B. P., und Reinherz, E. L. (1990).** Role of interaction of CD2 molecules with lymphocyte function-associated antigen 3 in T-cell recognition of nominal antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2603-2607.
- Krawczyk, C., und Penninger, J. M. (2001).** Molecular controls of antigen receptor clustering and autoimmunity. *Trends Cell Biol.* *11*, 212-220.
- Krummel, M. F., und Davis, M. M. (2002).** Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 66-74.
- Lafferty, K. J., und Woolnough, J. (1977).** The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol. Rev.* *35*, 231-262.
- Lakkis, F. G., und Sayegh, M. H. (2003).** Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 2402-2410.
- Lanzavecchia, A., und Sallusto, F. (2000).** From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 92-98.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., und Shaw, A. S. (2002).** T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* *295*, 1539-1542.
- Lee, K. H., Meuer, S. C., und Samstag, Y. (2000).** Cofilin: a missing link between T cell costimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur. J. Immunol.* *30*, 892-899.

- Lefkowitz, J. B., Rogers, M., Lennartz, M. R., and Brown, E. J. (1991).** Essential fatty acid deficiency impairs macrophage spreading and adherence. Role of arachidonate in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *266*, 1071-1076.
- Lennartz, M. R., Lefkowitz, J. B., Bromley, F. A., and Brown, E. J. (1993).** Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. *J. Leukoc. Biol.* *54*, 389-398.
- Lin, C.-S., Lau, A., and Lue, T. F. (1998).** Analysis and mapping of plastin phosphorylation. *DNA Cell Biol.* *17*, 1041-1046.
- Lin, C. S., Aebersold, R. H., Kent, S. B., Varma, M., and Leavitt, J. (1988).** Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 4659-4668.
- Lin, C. S., Aebersold, R. H., and Leavitt, J. (1990).** Correction of the N-terminal sequences of the human plastin isoforms by using anchored polymerase chain reaction: identification of a potential calcium-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 1818-1821.
- Lin, C. S., Park, T., Chen, Z. P., and Leavitt, J. (1993).** Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 2781-2792.
- Lin, C. S., Shen, W., Chen, Z. P., Tu, Y. H., and Matsudaira, P. (1994).** Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2457-2467.
- Ling, Y., Ascano, M., Robinson, P., and Gregurick, S. K. (2004).** Experimental and computational studies of the desensitization process in the bovine rhodopsin-arrestin complex. *Biophys. J.* *86*, 2445-2454.
- Linsley, P. S., and Ledbetter, J. A. (1993).** The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 191-212.
- Lister, M. D., Glaser, K. B., Ulevitch, R. J., and Dennis, E. A. (1989).** Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A2 in vitro and prostaglandin E2 production in vivo of the macrophage-like P388D1 cell. Effects of manoalide, 7,7-dimethyl-5,8-eicosadienoic acid, and p-bromophenacyl bromide. *J. Biol. Chem.* *264*, 8520-8528.
- Lopez-Cabrera, M., Santis, A. G., Fernandez-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1993).** Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* *178*, 537-547.
- Lowin Kropf, B., Shapiro, V. S., and Weiss, A. (1998).** Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* *140*, 861-871.

- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., und Pollard, T. D. (1994).** Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* *127*, 107-115.
- Marzio, R., Mauel, J., und Betz-Corradin, S. (1999).** CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* *21*, 565-582.
- Messier, J. M., Shaw, L. M., Chafel, M., Matsudaira, P., und Mercurio, A. M. (1993).** Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil. Cytoskeleton* *25*, 223-233.
- Mestas, J., und Hughes, C. C. (2001).** Endothelial cell costimulation of T cell activation through CD58-CD2 interactions involves lipid raft aggregation. *J. Immunol.* *167*, 4378-4385.
- Meuer, S. C., Hussey, R. E., Cantrell, D. A., Hodgdon, J. C., Schlossman, S. F., Smith, K. A., und Reinherz, E. L. (1984a).** Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T cell proliferation through an Interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1509-1513.
- Meuer, S. C., Hussey, R. E., Fabbi, M., Fox, D., Acuto, O., Fitzgerald, K. A., Hodgdon, J. C., Protentis, J. P., Schlossman, S. F., und Reinherz, E. L. (1984b).** Alternative pathway of T cell activation: a functional role for the 50kD T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* *36*, 897-906.
- Moser, B., und Loetscher, P. (2001).** Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* *2*, 123-128.
- Mueller, D. L., Jenkins, M. K., und Schwartz, R. H. (1989).** Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* *7*, 445-480.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., und Pollard, T. D. (1998).** The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6181-6186.
- Namba, Y., Ito, M., Zu, Y., Shigesada, K., und Maruyama, K. (1992).** Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *Journal of Biochemistry* *112*, 503-507.
- Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H., und Cahalan, M. D. (1996).** Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* *4*, 421-430.
- Negulescu, P. A., Shastri, N., und Cahalan, M. D. (1994).** Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 2873-2877.
- Nieto, M., Frade, J. M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez-A, C., und Sanchez-Madrid, F. (1997).** Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med.* *186*, 153-158.

- Oskarsson, H. J., Hofmeyer, T. G., Coppey, L., und Yorek, M. A. (1999).** Effect of protein kinase C and phospholipase A2 inhibitors on the impaired ability of human diabetic platelets to cause vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* *127*, 903-908.
- Otsuka, M., Kato, M., Yoshikawa, T., Chen, H., Brown, E. J., Masuho, Y., Omata, M., und Seki, N. (2001).** Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *289*, 876-881.
- Otto, J. J. (1994).** Actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 105-109.
- Pacaud, M., und Derancourt, J. (1993).** Purification and further characterization of macrophage 70-kDa protein, a calcium-regulated, actin-binding protein identical to L-plastin. *Biochemistry (Mosc).* *32*, 3448-3355.
- Parton, R. G., und Simons, K. (1995).** Digging into caveolae. *Science* *269*, 1398-1139.
- Passlick, B., Flieger, D., und Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989).** Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527-2534.
- Paul, W. E., und Seder, R. A. (1994).** Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* *76*, 241-251.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., und Mullins, R. D. (2000).** Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *29*, 545-576.
- Radvanyi, L. G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G. B., und Miller, R. G. (1996).** CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J. Immunol.* *156*, 1788-1798.
- Randolph, G. J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R. M., und Schakel, K. (2002).** The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* *196*, 517-527.
- Reif, K., Burgering, B. M., und Cantrell, D. A. (1997).** Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 14426-14433.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., und Trautmann, A. (2001).** Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* *2*, 925-931.
- Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., und Robbins, K. C. (1995).** Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5725-5731.
- Roberts, M. F., Deems, R. A., Mincey, T. C., und Dennis, E. A. (1977).** Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A2 (*Naja naja naja*). A case of half-site reactivity. *J. Biol. Chem.* *252*, 2405-2411.

- Rohatgi, R., Ho, H. Y., und Kirschner, M. W. (2000).** Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* *150*, 1299-1310.
- Rosales, C., Jones, S. L., McCourt, D., und Brown, E. J. (1994).** Bromophenacyl bromide binding to the actin-bundling protein I-plastin inhibits inositol trisphosphate-independent increase in Ca²⁺ in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3534-3538.
- Roshak, A. K., Capper, E. A., Stevenson, C., Eichman, C., und Marshall, L. A. (2000).** Human calcium-independent phospholipase A2 mediates lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* *275*, 35692-35698.
- Samstag, Y., Bader, A., und Meuer, S. C. (1991).** A serine phosphatase is involved in CD2-mediated activation of human T lymphocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* *147*, 788-794.
- Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., und Wabnitz, G. H. (2003).** Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 30-48.
- Samstag, Y., Henning, S. W., Bader, A., und Meuer, S. C. (1992).** Dephosphorylation of pp19: a common second signal for human T cell activation mediated through different accessory molecules. *Int. Immunol.* *4*, 1255-1262.
- Samstag, Y., und Nebl, G. (2003).** Interaction of cofilin with the serine phosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes. *Adv. Enzyme Regul.* *43*, 197-211.
- Scherberich, J. E., und Nockher, W. A. (1999).** CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* *37*, 209-213.
- Schroeder, A. J., Quehl, P., Mueller, J., und Samstag, Y. (2000).** Conversion of p56lck to p60lck in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on costimulation through accessory receptors: Involvement of Phospholipase C, Protein Kinase C and MAP-Kinases *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* *30*, 635-643.
- Schwartz, R. H. (2003).** T Cell Anergy. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 305-334.
- Sedwick, C. E., Morgan, M. M., Jusino, L., Cannon, J. L., Miller, J., und Burkhardt, J. K. (1999).** TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J. Immunol.* *162*, 1367-1375.
- Serrador, J. M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F., und Sanchez-Madrid, F. (1997).** Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J. Cell Biol.* *138*, 1409-1423.
- Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Kubuschok, B., Girndt, M., Meyerhans, A., und Kohler, H. (2002).** Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J. Virol.* *76*, 3748-3755.

Shaw, S., Luce, G. E., Quinones, R., Gress, R. E., Springer, T. A., und Sanders, M. E. (1986). Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 323, 262-264.

Shevchenko, A., Chernushevich, I., Wilm, M., und Mann, M. (2000). De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods Mol. Biol.* 146, 1-16.

Shimizu, Y., Mobley, J. L., Finkelstein, L. D., und Chan, A. S. (1995). A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J. Cell Biol.* 131, 1867-1880.

Shinomiya, H., Hagi, A., Fukuzumi, M., Mizobuchi, M., Hirata, H., und Utsumi, S. (1995). Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 154, 3471-3478.

Shiroo, M., und Matsushima, K. (1990). Enhanced phosphorylation of 65 and 74 kDa proteins by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2, 13-20.

Simons, K., und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., *et al.* (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* 9, 81-91.

Sobko, A., Ma, H., und Firtel, R. A. (2002). Regulated SUMOylation and Ubiquitination of DdMEK1 Is Required for Proper Chemotaxis. *Dev. Cell* 2, 745-756.

Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., und Griffiths, G. M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.

Stryer, L. (1996). *Biochemie*, 4. Aufl. edn, Spektrum Akademischer Verlag).

Svitkina, T. M., und Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009-1026.

Taylor-Fishwick, D. A., und Siegel, J. N. (1995). Raf-1 provides a dominant but not exclusive signal for the induction of CD69 expression on T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 3215-3221.

Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A. L., Yin, H. L., und Wülfing, C. (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J. Immunol.* 171, 2287-2295.

- Tuosto, L., und Acuto, O. (1998).** CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2131-2142.
- Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan Yx, Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., und Zhan, X. (2001).** Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat. Cell Biol.* *3*, 259-266.
- Valensin, S., Paccani, S. R., Ulivieri, C., Mercati, D., Pacini, S., Patrussi, L., Hirst, T., Lupetti, P., und Baldari, C. T. (2002).** F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur. J. Immunol.* *32*, 435-446.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., und Lanzavecchia, A. (1995).** Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* *181*, 577-584.
- van der Merwe, P. A., und Davis, S. J. (2002).** The immunological synapse - a multitasking system. *Science* *295*, 1479-1480.
- van Kooyk, Y., und Figdor, C. G. (2000).** Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 542-547.
- Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S., und Altman, A. (2001).** Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J. Cell Biol.* *155*, 331-338.
- Viola, A., und Lanzavecchia, A. (1996).** T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104-106.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., und Lanzavecchia, A. (1999).** T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* *283*, 680-682.
- Volkman, N., DeRosier, D., Matsudaira, P., und Hanein, D. (2001).** An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J. Cell Biol.* *153*, 947-956.
- von Andrian, U. H., und Mackay, C. R. (2000).** T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1020-1034.
- Wang, J., Chen, H., und Brown, E. J. (2001).** L-plastin peptide activation of alpha(v)beta(3)-mediated adhesion requires integrin conformational change and actin filament disassembly. *J. Biol. Chem.* *276*, 14474-14481.
- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., und Cooper, J. A. (2001).** Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* *11*, 370-374.
- Weiss, A., und Littman, D. R. (1994).** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* *76*, 263-274.

- Wetzel, S. A., McKeithan, T. W., und Parker, D. C. (2002).** Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J. Immunol.* *169*, 6092-6101.
- Wilm, M., Neubauer, G., und Mann, M. (1996).** Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. *Anal. Chem.* *68*, 527-533.
- Wingren, A. G., Parra, E., Varga, M., Kalland, T., Sjogren, H. O., Hedlund, G., und Dohlsten, M. (1995).** T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit. Rev. Immunol.* *15*, 235-253.
- Wülfing, C., und Davis, M. M. (1998).** A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* *282*, 2266-2269.
- Wülfing, C., Sjaastad, M. D., und Davis, M. M. (1998).** Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6302-6307.
- Wülfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M. D., Wu, L. C., Dustin, M. L., und Davis, M. M. (2002a).** Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat. Immunol.* *3*, 42-47.
- Wülfing, C., Tskvitaria-Fuller, I., Burroughs, N., Sjaastad, M. D., Klem, J., und Schatzle, J. D. (2002b).** Interface accumulation of receptor/ligand couples in lymphocyte activation: methods, mechanisms, and significance. *Immunol. Rev.* *189*, 64-83.
- Zebda, N., Bernard, O., Bailly, M., Welti, S., Lawrence, D. S., und Condeelis, J. S. (2000).** Phosphorylation of ADF/Cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* *151*, 1119-1127.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., und Samelson, L. E. (1998).** LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* *92*, 83-92.
- Zu, Y., Shigesada, K., Nishida, E., Kubota, I., Kohno, M., Hanaoka, M., und Namba, Y. (1990).** 65-kilodalton protein phosphorylated by interleukin 2 stimulation bears two putative actin-binding sites and two calcium-binding sites. *Biochemistry (Mosc).* *29*, 8319-8324.

Danksagung

Diesen Leuten möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für ihre Unterstützung aussprechen:

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Yvonne Samstag für freundliche Bereitstellung des Themas sowie für die Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Meuer danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut unter optimalen Rahmenbedingungen diese Arbeit anfertigen zu können.

Bei Frau Prof. Dr. Martina Trenczek möchte ich mich ganz herzlich für die offizielle Vertretung der Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Giessen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz danke ich für die Mitarbeit in meiner Prüfungskommission an der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Bei Herrn Dr. Thomas Köcher für die Unterstützung bei der Proteinsequenzierung am EMBL.

Ganz besonders möchte ich mich für konstruktiven Hinweise, innovativen Gedankenaustausch sowie Diskussionen und nicht nachlassende Hilfe bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bei Sybille Eibert, Susan Gottwald, Finola Kirstein, Mathias Konstandin, Martin Klemke, Urban Sester und Maria Rafael.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und fortwährend eine Unterstützung waren.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

L-Plastin in humanen T-Lymphozyten: Kostimulations-abhängige Phosphorylierung an Ser-5 und Verlagerung in die Immunologische Synapse

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Heidelberg, 26.06.04