

---

DIE DUALE FUNKTION DER PROTEINE CYTOHESIN-1 UND CYTIP  
IN DER MIGRATION HUMANER DENDRITISCHER ZELLEN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Barbara Tappertzhofen

Köln 2007

---

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

**1. REFERENT:** Prof. Dr. Waldemar Kolanus

**2. REFERENT:** Prof. Dr. Michael Hoch

**EINGEREICHT AM:** 16. AUGUST 2007

**TAG DER PROMOTION:** 26. OKTOBER 2007

DIESE DISSERTATION IST AUF DEM HOCHSCHULSCHRIFTENSERVER DER ULB BONN

[HTTP://HSS.ULB.UNIBONN.DE/DISS\\_ONLINE](http://hss.ulb.unibonn.de/diss_online)

ELEKTRONISCH PUBLIZIERT.

---

**ERKLÄRUNG**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 von Prof. Dr. Waldemar Kolanus betreut.

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind gemäß §6 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 als solche kenntlich gemacht.

Köln, den 16.08.2007

.....  
Barbara Tappertzhofen

PER ASPERA AD ASTRA

---

SENECA

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Grundlagen des Immunsystems von Vertebraten</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Dendritische Zellen</b>	<b>3</b>
1.2.1 Heterogenität humaner dendritischer Zellen	3
1.2.2 Dendritische Zellen verbinden angeborenes und spezifisches Immunsystem	5
1.2.3 Die Interaktion zwischen DC und T-Zelle	6
1.2.4 Das serielle Interaktionsmodell	8
1.2.5 Toleranzinduktion durch DC	10
1.2.6 ‚Monocyte-derived dendritic cells‘	10
<b>1.3 Zellmigration</b>	<b>11</b>
1.3.1 Regulation der Zellmigration	13
1.3.2 Migration von Leukozyten	15
<b>1.4 Integrine</b>	<b>17</b>
1.4.1 Die Struktur der Integrine und ihre Liganden	17
1.4.2 $\beta_2$ -Integrine	19
1.4.3 Regulation der Integrinfunktion (‚inside-out-signaling‘)	20
1.4.4 Signaltransduktion durch Integrine (‚outside-in-signaling‘)	23
1.4.5 Cytohesin-1	23
1.4.6 CYTIP	25
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>27</b>
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien	29
2.1.4 Zellkultur-Puffer, -Medien und -Seren	30
2.1.5 Antikörper	31
2.1.6 Kommerzielle Reaktionssysteme	32
2.1.7 SiRNAs	32
2.1.8 Säugetier-Zelllinien	33
2.1.9 Protein-Inhibitoren	34

2.1.10	Proteinlängenstandard	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
2.2.1	Eukaryontische Zellkultur	35
2.2.2	Funktionale Analysen	37
2.2.3	Zellbiologische Methoden	40
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	42
2.2.5	Elektronische Datenverarbeitung	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung humaner Dendritischer Zellen aus Monozyten (MoDC)</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Phänotypisierung unreifer und reifer MoDC</b>	<b>48</b>
3.2.1	Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen und reifen MoDC	48
3.2.2	Die Expression von $\beta_2$ -Integrinen auf unreifen und reifen MoDC	49
3.2.3	Die Morphologie unreifer und reifer MoDC	50
<b>3.3</b>	<b>Die Expression der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP wird während der Reifung humaner MoDC induziert</b>	<b>51</b>
3.3.1	Interaktion von endogenem CYTIP und Cytohesin-1	52
<b>3.4</b>	<b>Die Protein-Expression von Cytohesin-1 und CYTIP kann mit Hilfe der RNA-Interferenz in reifen moDC reduziert werden</b>	<b>53</b>
3.4.1	RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP hat keinen Einfluß auf die Maturierung von MoDC	54
3.4.2	RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP hat keinen Einfluß auf die Expression der Chemokin- und CXCR4 auf reifen MoDC	55
3.4.3	Cytohesin-1 reguliert die Protein-Expression von CYTIP	56
3.4.4	Die GEF-Funktion von Cytohesin-1 vermittelt die Regulation der CYTIP Protein-Expression	57
<b>3.5</b>	<b>Cytohesin-1 und CYTIP regulieren eine koordinierte Migration reifer MoDC</b>	<b>58</b>
3.5.1	Cytohesin-1 und CYTIP vermitteln die Migration reifer MoDC <i>in vitro</i> (Trans-well)	59
3.5.2	Cytohesin-1 und CYTIP beeinflussen die Migration reifer MoDC auf fibrillärem bovinem Kollagen I (2D)	61
3.5.3	Cytohesin-1 und CYTIP ermöglichen die Migration reifer MoDC in Kollagen (3D)	63
3.5.4	Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Migration muriner DC <i>in vivo</i>	65
<b>3.6</b>	<b>Die Bedeutung von Cytohesin-1 und CYTIP für CD18 in reifen MoDC</b>	<b>67</b>
3.6.1	CCL19 induziert eine Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP an die Plasmamembran und Co-Lokalisation mit CD18	67
3.6.2	Cytohesin-1- und CYTIP 'knock-down' vermitteln die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 auf reifen MoDC	69
3.6.3	Cytohesin-1 und CYTIP haben keinen Einfluß auf die Expression von CD18 auf reifen MoDC	71

3.6.4	Cytohesin-1 vermittelt die statische Adhäsion reifer MoDC an $\beta_2$ - und $\beta_1$ -Integrin-Liganden	72
3.6.5	CYTIP ist essenziell für die Adhäsion reifer MoDC an Endothelzellen unter Flussbedingungen	74
<b>3.7</b>	<b>Die Bedeutung von CD18 für die Migration reifer MoDC auf fibrillärem Kollagen (2D) und innerhalb Kollagens (3D)</b>	<b>75</b>
3.7.1	RNAi von CD18 induziert eine leichte Steigerung der Migrationsrate reifer MoDC im Kollagen-Gel (3D)	75
3.7.2	CD18 blockierende Antikörper erhöhen die Migration reifer MoDC auf fibrillärem Kollagen (2D) und innerhalb Kollagens (3D)	77
3.7.3	BM-DC, die keine Integrine exprimieren, zeigen erst nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP eine gestörte Migration	79
<b>3.8</b>	<b>Die Bedeutung der Phosphatidylinositol-3-Kinase für die Funktion von Cytohesin-1 und CYTIP in reifen MoDC</b>	<b>83</b>
3.8.1	Die PI3-Kinase reguliert die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin	83
3.8.2	Die PI3-Kinase vermittelt die Migration reifer MoDC auf fibrillärem Kollagen (2D) und innerhalb Kollagens (3D)	84
3.8.3	Die PI3-Kinase vermittelt die statische Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 und	86
3.8.4	Die PI3-Kinase vermittelt die Chemokin-induzierte Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP vom Zytoplasma an die Plasmamembran	87
3.8.5	Die PI3-Kinase ist für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 erforderlich	89
<b>3.9</b>	<b>Die Regulation der Rho-GTPasen RhoA und Rac1 durch Cytohesin-1 und CYTIP</b>	<b>91</b>
3.9.1	RhoA reguliert die Migration reifer MoDC	91
3.9.2	Rac1 koordiniert die Migration reifer MoDC	92
3.9.3	Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1	94
<b>3.10</b>	<b>Die Funktion von Cytohesin-1 und CYTIP und das Zytoskelett reifer MoDC</b>	<b>97</b>
3.10.1	Cytohesin-1 und CYTIP haben keinen Einfluß auf die Polymerisation und Anordnung von Aktin-Filamenten	97
3.10.2	Cytohesin-1 und CYTIP haben keinen Einfluß auf die Polymerisation und die Anordnung des mikrotubulären Zytoskelettes	99
<b>3.11</b>	<b>RhoA vermittelt die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 in reifen MoDC</b>	<b>101</b>
<b>3.12</b>	<b>Ezrin und Moesin regulieren die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18</b>	<b>102</b>

---

3.13	<b>Hemmung von ERK1/2 reduziert die Migrationsrate reifer MoDC <i>in vitro</i> (Transwell)</b>	<b>104</b>
3.13.1	Cytohesin-1 vermittelt die Aktivierung von ERK1/2 in reifen MoDC	105
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>108</b>
4.1	<b>Cytohesin-1 reguliert die Expression von CYTIP über die GEF-Funktion der <i>sec7</i>-Domäne</b>	<b>109</b>
4.2	<b>Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Affinität von CD18 in reifen MoDC</b>	<b>110</b>
4.2.1	Cytohesin-1 reguliert die statische Adhäsion reifer MoDC	110
4.2.2	CYTIP koordiniert die Adhäsion reifer MoDC unter Flussbedingungen, nicht jedoch unter statischen Bedingungen	111
4.2.3	Die PI3-Kinase, Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Affinität von CD18 für ICAM-1	114
4.2.4	Die GTPase RhoA, sowie Ezrin und Moesin sind in die Chemokin-induzierte Aktivierung von $\beta_2$ -Integrinen involviert	115
4.2.5	Modell für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 in reifen MoDC	117
4.3	<b>Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Migration reifer MoDC über zwei alternative Wege</b>	<b>119</b>
4.3.1	Integrin-abhängige Regulation der Migration reifer MoDC durch Cytohesin-1 und CYTIP	119
4.3.2	Integrin-unabhängige Regulation der Migration reifer MoDC durch Cytohesin-1 und CYTIP	121
4.3.3	Die PI3-Kinase, der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex sowie RhoA und Rac1 regulieren Integrin-unabhängige Migration reifer MoDC	124
4.3.4	Modell des dualen Funktionsmechanismus des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes in der Migration reifer MoDC	128
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>130</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungen</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>139</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 GRUNDLAGEN DES IMMUNSYSTEMS VON VERTEBRATEN

Zur Aufrechterhaltung ihrer Integrität verfügen Vertebraten über ein sehr effizientes Immunsystem. Dieses Überwachungs- und Abwehrsystem richtet sich einerseits gegen krankheitserregende Mikroorganismen, die in den Organismus eingedrungen sind (Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten), andererseits gegen körpereigene, entartete Zellen.

Das Immunsystem der Vertebraten kann in ein angeborenes (nicht-adaptives) und ein spezifisches (adaptives) System unterteilt werden. Beide Formen der Immunabwehr werden durch weiße Blutzellen (Leukozyten) vermittelt. Sie werden kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet.

Die angeborene Immunität ist eine universelle und evolutionär ältere Form der Immunabwehr. Sie dient einer unspezifischen und schnellen Verteidigung gegen eindringende Pathogene und wird durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Granulozyten, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen und NKT-Zellen) vermittelt. Diese Zellen exprimieren eine limitierte Anzahl Keimbahn-kodierter Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren, welche konservierte Produkte des mikrobiellen Metabolismus erkennen und deren Aktivierung zur Initiation einer inflammatorischen Antwort führt. Zusätzlich können Plasmaproteine des Komplementsystems Phagozyten bei der Aufnahme und Zerstörung von Pathogenen unterstützen (Beutler 2004).

Sind diese ersten Verteidigungsmechanismen nicht in der Lage das Pathogen zu eliminieren, wird eine adaptive, der Natur des Pathogens entsprechende Immunantwort ausgelöst (Janeway und Medzhitov 2002).

Adaptive Immunität wird durch Lymphozyten vermittelt, welche sich durch eine hohe Spezifität, Diversität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses auszeichnen. Letzteres gewährleistet bei einer erneuten Infektion mit demgleichen Erreger eine schnelle und gezielte Abwehr. In vielen Fällen kann sogar eine lebenslange Immunität gegen ein Pathogen erworben werden (Janeway und Medzhitov 2002).

Aufgrund ihrer Funktion werden zwei Hauptgruppen von Lymphozyten unterschieden: B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen). B- und T-Vorläuferzellen stammen von einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle im Knochenmark ab. B-Zellen reifen im Knochenmark aus, unreife Thymozyten hingegen wandern für ihre vollständige Reifung in den Thymus.

Reife B- und T-Zellen zirkulieren zwischen Blutkreislauf und peripheren lymphatischen Geweben und patrouillieren kontinuierlich durch die Gewebe. Sie zeichnen sich durch ihre

Antigenspezifität aus, das heißt, jede Zelle exprimiert klonale Antigenrezeptoren, welche jeweils ein spezifisches Antigen erkennen. Somatische Rekombination verschiedener, zufällig zusammengesetzter Gen-Segmente während der Reifung von B- und T-Zellen führt zu einem Repertoire möglicher Antigen-Rezeptoren, welches bei B-Zellen in einer Größenordnung von  $10^{14}$ , bei T-Zellen von  $10^{20}$  liegt. Diese hochgradige Diversität der B- und T-Zellrezeptoren gewährleistet, dass eine enorme Vielfalt von Antigenen durch das adaptive Immunsystem spezifisch erkannt werden kann. Die Bindung eines Antigens induziert eine Aktivierung von B- und T-Zellen, welche klonale Expansion und Differenzierung zu den entsprechenden Effektorzellen umfaßt. Rezeptoren, die körpereigene Antigene erkennen, werden bereits in einem frühen Entwicklungsstadium klonal deletiert (Borghesi und Milcarek 2007).

Naive B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, welche Antikörper sezernieren und auf diese Weise eine humorale Immunantwort vermitteln. Antikörper können sowohl das Komplementsystem aktivieren als auch durch Bindung an Pathogene oder pathogene Toxine, deren Wechselwirkung mit T-Zellen verhindern und sie auf diese Weise neutralisieren. Zusätzlich unterstützen Antikörper die Phagozytose von Pathogenen durch Oponierung, dem Einhüllen von Krankheitserregern. Die konstante Region ( $F_c$ -Anteil) der Antikörper wird daraufhin von  $F_c$ -Rezeptoren der Phagozyten erkannt, welche auf diese Weise das ‚markierte‘ Pathogen eliminieren können. Die humorale Immunantwort kann somit nur Pathogene erreichen, welche sich im Blut, in der Lymphe oder in den Extrazellularräumen befinden (Kelsoe 2000).

T-Zellen hingegen vermögen Immunantworten gegen intrazelluläre Pathogene auszulösen. Sie werden aktiviert, wenn ihre Rezeptoren Peptid-Fragmente von Proteinen erkennen, die durch den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) an der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC-Moleküle sind transmembrane Glykoproteine und werden in zwei Klassen unterteilt:

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren Peptide aus dem Zytosol der Zelle, welche von Viren oder wenigen intrazellulären Bakterien abstammen. Der Peptid:MHC-I-Komplex wird von CD8-positiven, zytotoxischen T-Zellen erkannt, welche die Zell-vermittelte Immunität vermitteln. Ihre Aktivierung führt zur direkten Abtötung der infizierten Zelle. Da sich Viren in fast allen Zellen replizieren können, sind MHC-I-Moleküle nahezu ubiquitär exprimiert (Russell und Ley 2002).

MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen präsentieren Peptide pathogener Proteine, welche endozytotisch in das vesikuläre Kompartiment einer Zelle aufgenommen wurden. Der Peptid:MHC-II-Komplex wird von CD4-positiven T-Zellen erkannt. Diese werden in inflammatorische  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen oder T-Helferzellen unterteilt.  $T_H1$ -Zellen aktivieren infizierte Makrophagen dazu intravesikuläre Pathogene zu eliminieren, wohingegen  $T_H2$ -Zellen in die B-Zell-Aktivierung involviert sind (Agnello *et al.* 2003).

Die Differenzierung einer naiven T-Zelle zu einer bewaffneten T-Effektorzelle wird nur ausgelöst, wenn ein sekundäres, co-stimulierendes Signal von einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle (*antigen presenting cell*, APC) erfolgt. Nur APCs exprimieren beide Klassen von MHC-Molekülen und zusätzliche co-stimulatorische Moleküle wie die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) und sind daher in der Lage, die klonale Expansion naiver T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen zu steuern. Zu den APCs gehören Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (Janeway und Medzhitov 2002).

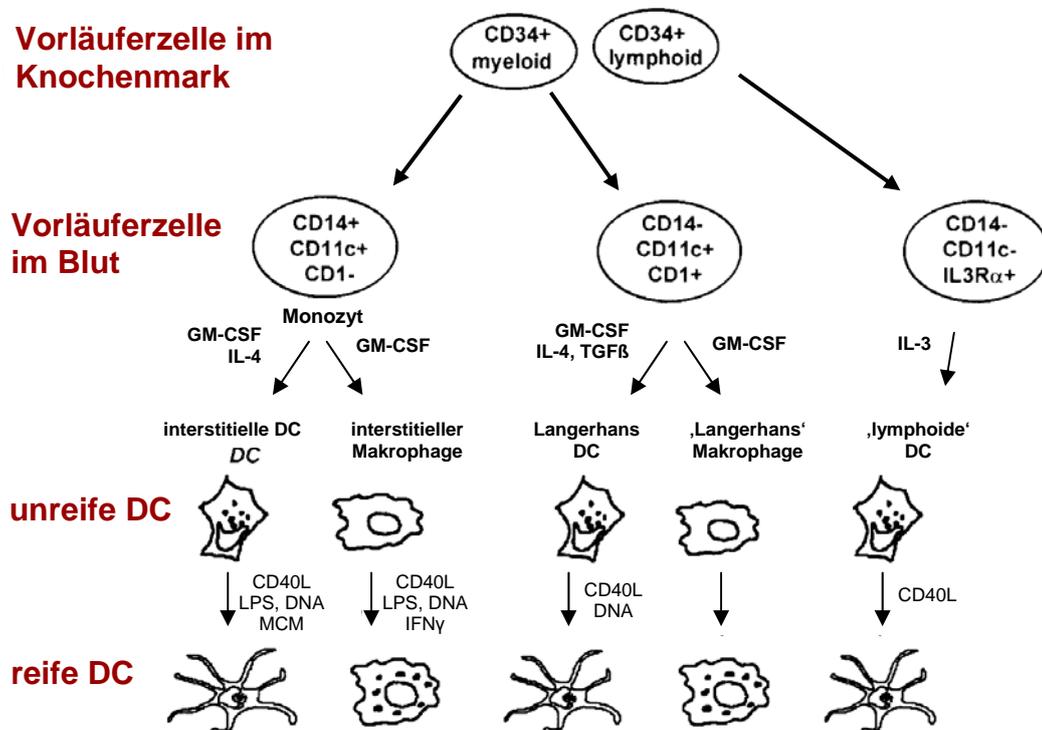
## 1.2 DENDRITISCHE ZELLEN

1973 charakterisierten Steinman *et al.* erstmalig eine Zelle aus der murinen Milz, welche sich in ihren Eigenschaften von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten unterschied und bezeichneten sie, aufgrund ihrer sternförmigen Morphologie, als dendritische Zelle (Steinman und Cohn 1973). Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) bilden eine höchst komplexe Population Antigen-präsentierender Zellen und sind in der Lage, sowohl B- als auch T-Zellen zu aktivieren (Gluckman *et al.* 2002) als auch Toleranz oder Immunität zu induzieren (Steinman *et al.* 2003). Sie regulieren damit maßgeblich die Richtung einer Immunantwort. Entscheidend für den Ausgang einer Immunantwort sind sowohl die Ontogenese einer DC als auch Faktoren, welche ihre Aktivierung auslösen (Saas und Tiberghien 2002).

### 1.2.1 HETEROGENITÄT HUMANER DENDRITISCHER ZELLEN

Die Verbindung zwischen dem Antigen-unspezifischen, angeborenen und dem Antigen-spezifischen, adaptiven Immunsystem wird durch die enorme Plastizität dendritischer Zellen ermöglicht. Diese Plastizität bezieht sich sowohl auf die Fähigkeit spezialisierter dendritischer Vorläuferzellen auf unterschiedliche Pathogene (Bakterien, Viren) zu reagieren als auch auf differenzielle Funktionen, welche DC in verschiedenen Reifungsstadien ausführen. Diese ermöglichen es Vorläuferzellen oder unreifen DC, im Rahmen einer Antigen-unspezifischen Immunität, sowohl große Mengen proinflammatorischer und antiviraler Zytokine wie IL-12 sowie Typ I und Typ II Interferone zu sezernieren als auch pathogene Antigene zu prozessieren. DC können zusätzlich NK und NKT-Zellen, Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, welche gezielt infizierte Zellen eliminieren und inflammatorische Zytokine produzieren können, aktivieren (Mellman und Steinman 2001). Reife DC hingegen aktivieren und modulieren die Antwort von B- und T-Zellen und sind somit maßgeblich an adaptiver Immunität beteiligt (Hackstein und Thomson 2004). Die enorme Heterogenität humaner DC erstreckt sich über mehrere Ebenen. So können dendritische Zellen sowohl von myeloiden als auch von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen. Beide sind CD34<sup>+</sup> und befinden sich im

Knochenmark. Myeloide Vorläuferzellen wiederum können sich zu Monozyten ( $CD14^+$ ,  $CD11c^+$ ,  $CD1^-$ ) oder zu  $CD14^-$ ,  $CD11c^+$ ,  $CD1^+$ -Vorläuferzellen weiter entwickeln. Beide Zelltypen befinden sich im Blut. Monozyten differenzieren in Anwesenheit der Zytokine IL-4 (*Interleukin-4*) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor*) zu unreifen dendritischen Zellen. M-CSF (*macrophage-colony-stimulating factor*) alleine induziert die Differenzierung der Monozyten zu interstitiellen Makrophagen. Sowohl unreife dendritische Zellen als auch interstitielle Makrophagen sind in peripheren Geweben lokalisiert. Inflammatorische Zytokine, CD40-L (CD40-Ligand) und pathogene Bestandteile wie LPS (*Lipopolysaccharid*, Hauptbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien) oder bakterielle/virale DNA induzieren die Entwicklung zu reifen dendritischen Zellen bzw. Makrophagen (Steinman und Inaba 1999).



**Abb. 1.1 DC-Populationen und verwandte Makrophagen.** Myeloide  $CD34^+$ -Vorläuferzellen differenzieren zu Monozyten ( $CD14^+$ ,  $CD11c^+$ ), welche sich entweder zu unreifen DC oder zu Makrophagen entwickeln (interstitieller Weg). Myeloide Vorläuferzellen können außerdem zu  $CD14^-$ ,  $CD11c^+$ -Zellen differenzieren, welche sich weiter zu Langerhans-Zellen oder 'Langerhans'-Makrophagen entwickeln können. Die  $CD14^-$ ,  $CD11c^-$ ,  $IL-3R\alpha^+$ -Vorläuferzelle (auch lymphoide oder plasmazytoide DC genannt) stammen von einer lymphoiden  $CD34^+$ -Vorläuferzelle ab. Sie entwickeln sich zu IFN- $\alpha$ -sezernierenden DC und vermitteln so anti-virale Immunantworten.

$CD14^-$ ,  $CD11c^+$ ,  $CD1^+$ -Vorläuferzellen differenzieren in Gegenwart der Zytokine GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$  zu Langerhans-Zellen (*Langerhans cells, LC*). M-CSF alleine induziert dagegen die Entwicklung zu 'Langerhans'-Makrophagen. Beide, Langerhans-Zellen und 'Langerhans'-

Makrophagen, befinden sich in peripheren Geweben. Als Antwort auf CD40-L und pathogene DNA entwickeln sie sich zu reifen Langerhans- Zellen bzw. Makrophagen (Shortman und Liu 2002).

Die lymphoiden CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen im Knochenmark differenzieren zu CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>-</sup>, IL-3Rα<sup>+</sup>-DC-Vorläuferzellen, welche sich im Blut befinden. Sie sezernieren großen Mengen IFN-α (*Interferon-α*) und sind daher für antivirale Immunantworten entscheidend. In Anwesenheit des Zytokins IL-3 entwickeln sie sich zu einer ‚lymphoiden‘ oder ‚plasmazytoiden‘ DC (pDC). Die Bindung des CD40-L an CD40 induziert hier die Entwicklung zu einer reifen DC (Banchereau *et al.* 2000; Banchereau und Steinman 1998).

Zudem unterscheiden sich dendritische Zellen in ihrer anatomischen Lokalisation. Es existieren epidermale Langerhans-Zellen in der Haut, dermale (interstitielle) DC (intDC), marginale DC in der Milz, interdigitierende DC in der T-Zell-Zone lymphoider Organe, DC in der B-Zell-Zone lymphoider Organe (‚germinale centre DC‘), DC im Thymus, in der Leber und im Blut (Banchereau *et al.* 2000).

### 1.2.2 DENDRITISCHE ZELLEN VERBINDEN ANGEBORENES UND SPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM

Der Lebenszyklus einer dendritischen Zelle beginnt im Knochenmark. DC-Vorläufer wandern aus dem Knochenmark über das Blut in periphere, nicht-lymphoide Gewebe. Dort entwickeln sie sich zu residenten, immaturren DC. Die Anwesenheit eines pathogenen Antigens führt zu einer zusätzlichen Akkumulation zirkulierender DC (Banchereau *et al.* 2000). Am Ort einer Inflammation werden Chemokine wie CCL20 (MIP-3α, *macrophage inflammatory protein-3α*), CCL3 (MIP-1α) oder RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) gebildet, deren Rezeptoren (CCR1, CCR5 und CCR6) auf unreifen DC exprimiert werden und die APC-Vorläufer so anziehen (Dieu *et al.* 1998). Unreife dendritische Zellen weisen eine sehr effektive und kontinuierliche endozytotische Aktivität auf (Steinman und Swanson 1995).

Die Endozytose eines pathogenen Antigens, sowie Migration und Maturierung von DC sind eng miteinander verbunden. Die Aktivierung einer dendritischen Zelle infolge der Pathogen-Aufnahme führt zu zahlreichen phänotypischen und funktionellen Veränderungen, welche zu einem vollständigen Übergang einer Antigen-aufnehmenden- zu einer Antigen-präsentierenden Zelle führen (Mellman und Steinman 2001). Neben Pathogenen und deren Produkten, wie LPS, CpG DNA oder dsRNA, können auch proinflammatorische Zytokine wie TNF-α oder IL-1β, sowie die Bindung von CD40-L an CD40 die Maturierung einer DC auslösen (Kaisho und Akira 2001). Die Maturierung führt zum Verlust endozytotischer Aktivität (Banchereau *et al.* 2000). Außerdem wird ein drastischer Anstieg von MHC- und co-stimulatorischen Molekülen

wie CD80, CD86, CD40 und CD58 auf der Plasmamembran ausgelöst (Inaba *et al.* 2000; Turley *et al.* 2000).

Zusätzlich werden morphologische Veränderungen ausgelöst, welche zum Verlust adhäsiver Strukturen, einer Reorganisation des Zytosklettes, sowie zu einer stark ausgeprägten zellulären Mobilität führen (Winzler *et al.* 1997). Dieser migratorische Phänotyp sowie ein verändertes Chemokin-Rezeptor-Expressionsprofil löst die Migration einer reifen DC zum nächst gelegenen sekundären lymphatischen Organ (SLO) aus. DC verlieren im Laufe ihrer Reifung die Sensitivität für Chemokine, welche die Wanderung unreifer DC regulieren. Sie entziehen sich so dem lokalen Chemokin-Gradienten innerhalb peripherer Gewebe. Im Gegensatz dazu steigt die Expression von CCR7, dem Rezeptor für CCL19 und CCL21. CCL19 und CCL21 sind Chemokine, welche in lymphoiden Organen gebildet werden (Dieu *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998; Sozzani *et al.* 1999). Daher verlassen reife DC über die Lymphgefäße, welche ebenso CCL21 exprimieren, den Ort der Entzündung und dringen in den Parakortex der T-Zell-Zone eines Lymphknotens ein (Chan *et al.* 1999; Gunn *et al.* 1998; Saeki *et al.* 1999). Die neu ankommenden DC werden selbst eine Quelle für CCL19 und CCL21, so dass eine Amplifikation und Persistenz des Chemokin-Gradienten erreicht wird (Ngo *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998; They und Amigorena 2001). Beide Chemokine locken nicht nur DC, sondern auch naive T-Zellen an. CCL19 und CCL21 spielen somit eine Schlüsselrolle im Zusammentreffen einer Antigen-tragenden DC und einer Antigen-spezifischen T-Zelle (Campbell *et al.* 1998; Gunn *et al.* 1998; Ngo *et al.* 1998).

Die Reifung einer dendritischen Zelle infolge des Zusammentreffens mit einem Pathogen ist eine nicht-adaptive Immunantwort, welche zur Auslösung einer adaptiven Immunreaktion führt. Dendritische Zellen stellen auf diese Weise die wichtigste Verbindung zwischen angeborener und spezifischer Immunität dar (Fujii *et al.* 2004).

### **1.2.3 DIE INTERAKTION ZWISCHEN DC UND T-ZELLE**

Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen ist sowohl für die Induktion von Toleranz/Immunität als auch für die Homöostase von T-Zellen essenziell (Lanzavecchia und Sallusto 2004). Unter nicht-pathogenen Umständen migrieren wenige gewebe-residente DC spontan zum nächsten Lymphknoten. Sie tragen Antigene, die sie im peripheren Gewebe aufgenommen haben. Aufgrund der geringen Frequenz des Antigens und fehlender Co-Stimulation lösen sie keine Effektorfunktion, sondern Toleranz aus (Sallusto und Lanzavecchia 2002). Im Falle einer Infektion wird eine große Anzahl an DC aktiviert, die zum Lymphknoten migriert (Vendetti *et al.* 2000). Die Halbwertszeit von T-Zellen im Blut beträgt ungefähr 30 Minuten. Dann gelangen sie über spezialisierte Mikrogefäße, den hoch-endothelialen Gefäßen (*high endothelial venules*, HEV) in SLO, in denen sie sich circa einen Tag aufhalten. Lymphknoten bestehen aus einem

Netzwerk aus Kollagenfasern und reticulären Stromazellen (*fibroblastic reticular cells*, FRC). Sobald T-Zellen in das lymphatische Organ gelangt sind, krabbeln sie in einem amöboiden Modus an diesen Stromazellen, auf der Suche nach Antigenen, entlang. Endogene, Lymphknoten-residente DC bilden ein dichtes Netzwerk im Parakortex. Sie sind eng mit dem Stromnetzwerk verbunden und präsentieren Antigene, die von den FRC abstammen. Periphere, migrierende DC sind dagegen nicht mit dem Stroma verbunden. Nach ihrem Eintritt in den Lymphknoten über afferente Lymphbahnen, durchqueren sie den Parakortex und sammeln sich um die HEV. So kommen Lymphozyten bei ihrem Eintritt in das lymphoide Organ zunächst mit DC in Kontakt, die selbst erst kürzlich aus den Geweben gekommen sind (Henrickson und von Andrian 2007). Reife DC haben eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen. Aufgrund dieser kurzen Lebensspanne, reflektieren periphere DC, die sich im SLO befinden, sehr dynamisch die Bedingungen des nahegelegenen Gewebes.

Nur wenige T-Zellen erkennen ein auf dendritischen Zellen präsentiertes Epitop ( $\sim 1$  von  $10^6$ - $10^7$  Zellen). Residente und periphere DC bilden innerhalb der SLO ein extensives Netzwerk, reich an MHC- und co-stimulatorischen Molekülen (Lanzavecchia und Sallusto 2004). Damit eine DC mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle zusammentreffen kann, muss jede DC mit vielen T-Zellen interagieren. Lange ‚dendritische‘ Fortsätze und Membranfalten, welche DC im Laufe ihrer Reifung entwickeln, erhöhen weiterhin die Wahrscheinlichkeit der Interaktion mit spezifischen T-Zellen (Sallusto und Lanzavecchia 2002). T-Zellen adhären anfangs nur transient an DC und tasten in dieser Zeit deren Oberfläche nach passenden Peptid:MHC-Komplexen ab. Dieser Vorgang ist Antigen-unabhängig (de la Fuente *et al.* 2005) und wird durch gering-affine Interaktionen zwischen CD2/LFA-3, LFA-1/ICAM-1,-3 oder ICAM-3/DC-SIGN vermittelt (Dustin und Cooper 2000). Die Auslösung einer produktiven Immunantwort benötigt jedoch eine stabile Interaktion zwischen DC und T-Zelle (Mempel *et al.* 2004; Stoll *et al.* 2002). Sobald die T-Zelle ein spezifisches Antigen bindet, sinkt ihre Motilität. Der Kontakt zwischen DC und T-Zelle wird damit Antigen-abhängig. An der Kontaktstelle von T-Zelle und DC wird eine immunologische Synapse gebildet, ein spezialisierter, hoch-geordneter Bereich, der zahlreiche Peptid:MHC-Komplexe, co-stimulatorische- und Adhäsionsmoleküle enthält (Monks *et al.* 1998). Diese sind in supramolekularen Aktivierungs-Clustern (SMACs) organisiert. Ein zentraler SMAC besteht aus Molekülen, die Antigen-abhängige Interaktionen vermitteln wie der T-Zell-Rezeptor, CD28, CD3, CD2, sowie intrazellulären Signalmolekülen wie PKC- $\theta$ , Lck, Fyn. Ein peripherer SMAC dagegen enthält Moleküle, die Antigen-unabhängige Adhäsionen vermitteln wie LFA-1 oder Talin (Cemerski und Shaw 2006).

T-Zellen benötigen für eine vollständige Aktivierung zwei Signale. Das erste Signal wird durch die Bindung eines Peptid:MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor ausgelöst, das zweite Signal stammt von co-stimulatorischen Molekülen wie den B7-Molekülen CD80 (B7.2) und CD86 (B7.1). Dies sind Liganden für CD28, welches konstitutiv auf T-Zellen exprimiert wird. Die

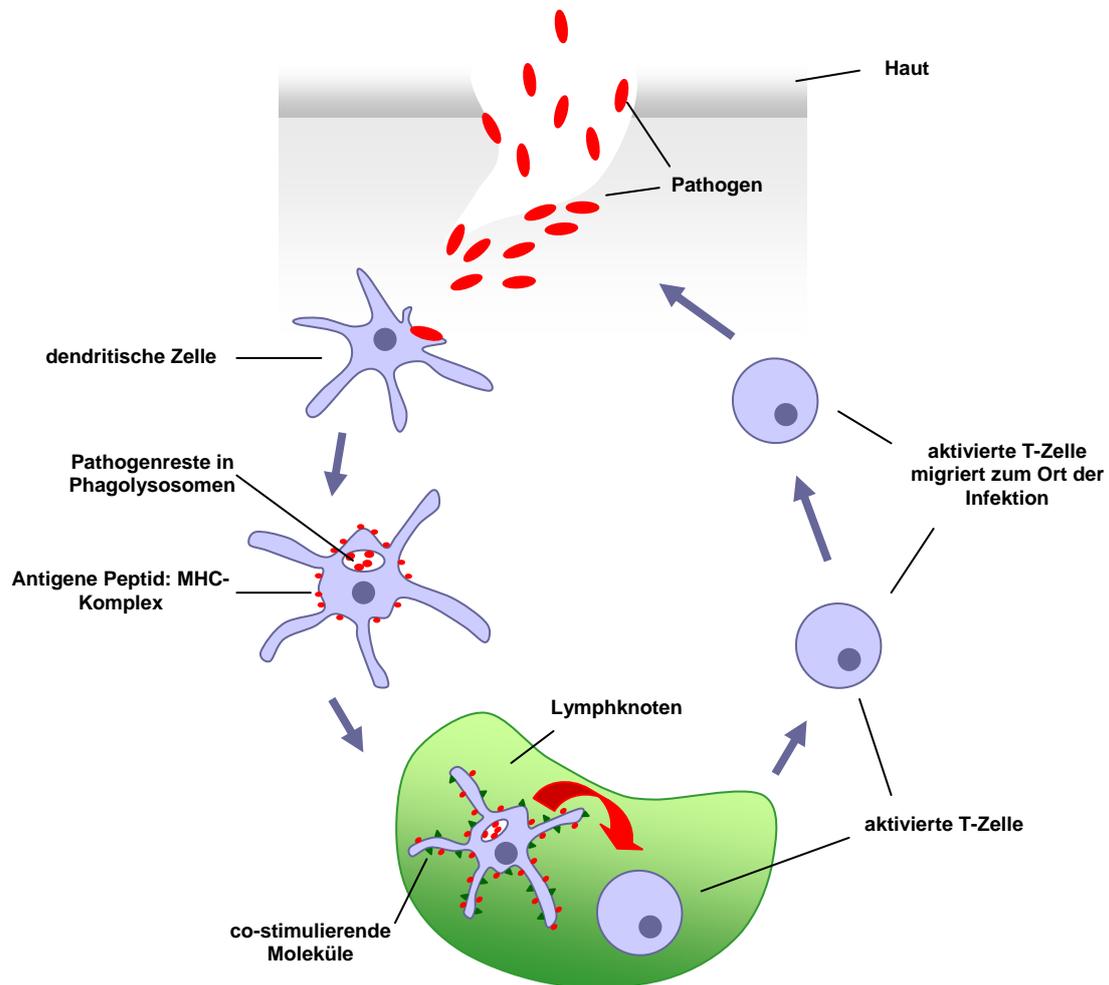
Bindung an die B7-Moleküle ist notwendig für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen (Guermonez *et al.* 2002). Die Aktivierung einer T-Zelle führt zu klonaler Expansion und Differenzierung zu Effektorzellen (Friedl *et al.* 2005). Auf aktivierten T-Zellen wird die Expression von CTLA-4 induziert. Es hat im Vergleich zu CD28 eine deutlich höhere Affinität zu den B7-Molekülen. Die Bindung von CTLA-4 an die B7-Moleküle induziert ein negatives Signal ins Zellinnere und stoppt so die T-Zell-Proliferation, so dass die Antwort einer T-Zelle auf ein Antigen limitiert ist (Guermonez *et al.* 2002). Die Bindung aktivierter T-Zellen über den CD40-Liganden (CD40L) an CD40 auf DC erhöht zusätzlich deren Lebensspanne als auch, über eine Steigerung der Expression von CD80 und CD86, ihre Kapazität T-Zellen zu stimulieren (Vendetti *et al.* 2000). Zusätzlich prägen DC T- Effektorzellen derart, dass sie zum Ort der Infektion wandern (Dudda *et al.* 2005; Mora *et al.* 2003).

Die Länge der T-Zell-Stimulation zusammen mit sezernierten polarisierenden Zytokinen bestimmen die weitere Differenzierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen. (Sallusto und Lanzavecchia 2002). Die Zytokin-Produktion von DC ist genau reguliert. Unterschiedliche Maturierungsstimuli induzieren funktionell differenzielle Effektor-DC-Populationen. Je nach aktivierenden Maturierungssignal lösen DC somit selektiv bestimmte T-Zellantworten aus. So sind IL-12, IL-23, IL-27 und Typ I Interferone bekannt für die Induktion von T<sub>H</sub>1-Zellen. T<sub>H</sub>2-polarisierende Zytokine sind MCP-1 (*monocytic chemotactic protein-1*) und OX40L (*OX40-ligand*) (Kapsenberg 2003).

#### 1.2.4 DAS SERIELLE INTERAKTIONSMODELL

Im Gegensatz zu der Hypothese, dass eine stabile und anhaltende Interaktion zwischen DC und T-Zelle notwendig ist, um Proliferation und Differenzierung letzterer auszulösen, zeigten Gunzer *et al.*, dass die Interaktion zwischen DC und T-Zelle in einem 3D-Kollagengel hoch-dynamisch und kurzzeitig ist. In diesem Modell migrieren T-Zellen auf der Oberfläche von DC und erhalten dadurch sequenziell Signale, welche die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöhen. Die Erhöhung der Calcium-Konzentration geht mit einer Aktivierung von T-Zellen einher. T-Zellen verändern dabei kontinuierlich ihr Form sowie Position relativ zur DC und haben eine hohe Migrationsgeschwindigkeit von 2-19  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Gunzer *et al.* 2000). In diesem Modell kommt es zur Ausbildung einer dynamischen Immunologischen Synapse (Friedl und Störöm 2004). Sobald sich die T-Zelle von der DC löst, kann sie anschließend migratorische Kontakte zu benachbarten DC aufnehmen, so dass sequenziell Signale und Interaktionszeit akkumuliert werden. Aktivierung und Proliferation der T-Zelle resultiert damit aus migratorischen, kurzzeitigen und sequenziellen Interaktionen mit multiplen DC. Dieses serielle Interaktionsmodell impliziert einen Schwellenwert für eine erfolgreiche T-Zell:APC Interaktion.

Wenn dieser Schwellenwert nicht erreicht wird, wird Toleranz induziert (Friedl und Gunzer 2001).



**Abb. 1.2 Lebenszyklus einer dendritische Zelle.** Zirkulierende Vorläuferzellen dringen in periphere Gewebe ein und residieren hier als unreife DC. Diese patrouillieren in den Geweben und überwachen so die Anwesenheit eines pathogenen Antigens. Eindringene Pathogene werden durch unreife DC endozytiert. Dieses aktiviert die Reifung einer DC, welche es der Zelle ermöglicht, das Gewebe zu verlassen und über lymphatische Gefäße zum nächstgelegenen lymphoiden Organ zu wandern. Zusätzlich entwickeln sich DC im Laufe der Maturierung zu sehr effektiven T-Zell-Stimulatoren - sie exprimieren eine große Anzahl des antigenen Peptid:MHC-Komplexes sowie der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Sobald sie mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle zusammentreffen, aktivieren sie ihre Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen. Aktivierte T-Zellen migrieren daraufhin zum Ort der Infektion und bekämpfen sie. Nach der Interaktion mit T-Zellen sterben DC durch Apoptose.

---

### 1.2.5 TOLERANZINDUKTION DURCH DC

Dendritische Zellen nehmen auch Antigene auf, welche gewöhnlich keine Immunreaktion auslösen, wie körpereigene (Huang *et al.* 2000) und aus der Umgebung durch Inhalation oder Nahrungsaufnahme in den Organismus gelangte Proteine (Vermaelen *et al.* 2001). Die Erkennung eines Peptid:MHC-Komplexes induziert bei fehlender Co-Stimulation Toleranz (Henrickson und von Andrian 2007). Die Endozytose und Präsentation von Antigenen in Abwesenheit einer Infektion, induziert Toleranz gegen ‚selbst‘- bzw. ungefährliche Antigene aus der Umgebung. Periphere Toleranz kann über verschiedene Mechanismen, wie die Auslösung von Apoptose, von T-Zell-Anergie, der Aktivierung von IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen (Tregs) oder der Verschiebung einer T<sub>H</sub>1- zu einer tolerogenen T<sub>H</sub>2-Antwort verwirklicht werden (Thomson und Lu 1999).

### 1.2.6 ‚MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS‘

Sallusto und Lanzavecchia zeigten erstmalig, dass humane periphere Monozyten *in vitro* in Gegenwart der Zytokine IL-4 (Interleukin-4) und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) zu myeloiden dendritischen Zellen differenzieren. Diese stimmen mit dendritischen Zellen *in vivo* in charakteristischen Merkmalen wie der Morphologie, der Antigen-Prozessierung und der Expression von MHC-I, -II, CD1, FcγRII, CD40, B7, CD44 und ICAM-1, sowie dem Fehlen von CD14 überein (Sallusto und Lanzavecchia 1994). Diese sehr effektive Methode der DC-Gewinnung und -Kultivierung hat die Untersuchung humaner dendritischer Zellen in den letzten Jahren maßgeblich vereinfacht (Leon *et al.* 2005). Zudem bilden sogenannte ‚monocyte-derived dendritic cells‘, kurz MoDC, die Grundlage für die Entwicklung von Immuntherapien wie DC-basierter Vakzine z.B. gegen Tumorantigene (Cerundolo *et al.* 2004).

Die genauen Bedingungen unter denen Monozyten *in vivo* zu DC differenzieren ist äußerst komplex und noch weitgehend ungeklärt. Hingegen sind die Voraussetzungen für die *in vitro* Generierung humaner DC aus Monozyten im Wesentlichen geklärt. Das Zytokin IL-4 unterbindet die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. GM-CSF wird für das Überleben der Zellen benötigt. Es findet keine Proliferation statt. Im Laufe von 5 bis 7 Tagen differenzieren Monozyten zu unreifen DC, welche sich durch Zugabe inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder pathogener Produkte wie LPS sowie die Ligation von CD40 innerhalb von 24 bis 48 Stunden zu reifen DC entwickeln (Leon *et al.* 2005).

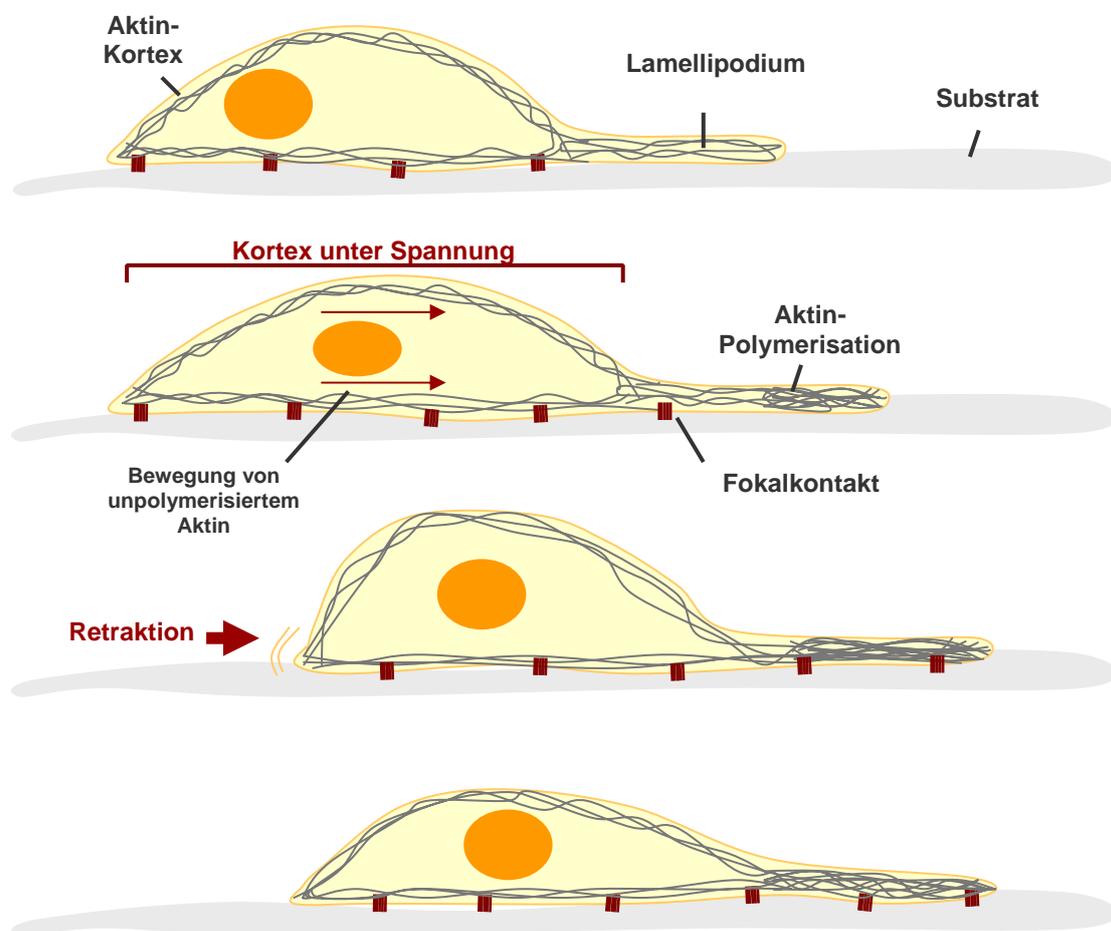
---

### 1.3 ZELLMIGRATION

Die Zellmigration ist ein essenzieller Vorgang bei verschiedenen biologischen Prozessen wie Embryogenese, Wundheilung, Geweberegeneration und Immunantworten. Die Ausbildung von Metastasen im Laufe von Tumorerkrankungen spiegelt Migration unter pathologischen Bedingungen wider (Horwitz und Parsons 1999). Zellmigration wird durch Zell-Substrat-Interaktionen sowie durch die Perzeption stimulierender oder inhibierender Reize, wie etwa in Form löslicher Mediatoren reguliert. Ein koordinierter und kontinuierlicher Umbau des Zytosklettes und damit assoziierter Proteine während der Migration führt zu einer gerichteten Vorwärtsbewegung des Zellkörpers (Pollard und Borisy 2003). Voraussetzung ist eine Polarisierung der Zelle mit einem vorderen und hinteren Zellbereich mit distinkten und funktionell unterscheidbaren Strukturen. Zell-Polarisierung beinhaltet zusätzlich eine asymmetrische Verteilung von Signalmolekülen, des Zytosklettes und einen gerichteten Membranverkehr (Watanabe *et al.* 2005).

Der Vorgang der Zellmigration kann als ein Zyklus von vier Einzelschritten betrachtet werden (Sheetz 1994) und ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt. Im vorderen Bereich der Zelle, der ‚leading edge‘, erfolgt durch Aktin-Polymerisation die Ausbildung von Membranprotrusionen wie Lamellipodien und Filopodien. Lamellipodien sind flächige, Filopodien sind fingerartige Ausstülpungen der Lamelle (Nicholson-Dykstra *et al.* 2005). Die Lamelle ist eine organellfreie Region, die den organellreichen Zellkörper, das Perikaryon, umgibt. Auf der Lamelle werden Membranfalten („membrane ruffles“) gebildet. Die Dynamik der Membranprotrusionen wird als Lamellendynamik oder Motilität bezeichnet (Small *et al.* 2002). Das dendritische Nukleationsmodell beschreibt die Dynamik des Aktins und assoziierter Proteine im Bereich der ‚leading edge‘. Im distalen Bereich, der ‚leading edge‘, sind die Aktin-Filamente mit ihren schnell-wachsenden Plus-Enden nach außen gerichtet. Bestimmte Signalwege aktivieren polymerisationsfördernde Proteine wie die Wiskott-Adrich-Syndrom-Familie (WASP und N-WASP) (Takenawa und Suetsugu 2007) sowie die Freisetzung globulären Aktins aus dem zellulären G-Aktin-Pool. Der Arp2/3-Komplex dient als Nukleationspunkt für die Polymerisation neuer Aktin-Filamente (Mullins *et al.* 1998). Die Stabilität eines Aktin-Filaments wird am Plus-Ende durch das Capping-Protein und Gelsolin, am Minus-Ende durch ADF/Cofilin reguliert (Mejillano *et al.* 2004). Die Basis eines Lamellipodiums enthält hauptsächlich lange, unverzweigte Aktin-Filamente, die durch die Anlagerung von Tropomyosin stabilisiert werden (Pollard und Borisy 2003). Der ständige Einbau von Aktin-Monomeren an den Plus-Enden schiebt die Zellmembran weiter vor. Die Ausbildung des dendritisch-verzweigten Aktin-Netzwerkes verhindert, dass sich die Filamente durch den mechanischen Widerstand der Membran verbiegen (Small *et al.* 2002).

Neben diesem Modell der Aktin-abhängigen Lamellipodien Bildung wird zusätzlich noch die Bedeutung von Membranfluß wie der Transport von Membranmaterial an die ‚leading edge‘ sowie hydrodynamischen und mechanischen Eigenschaften der Plasmamembran diskutiert (Bretscher 1996; Schmoranzner *et al.* 2003). Eine Erhöhung der Membranrigidität verringert die Ausbildung von Protrusionen (Raucher und Sheetz 2000). Weiterhin wird vorgeschlagen, dass Protrusionen infolge osmotischen Drucks entstehen und Aktin-Filamente nur eine unterstützende Funktion haben. Möglicherweise ist die Ausbildung von Lamellipodien von beiden Faktoren abhängig, wohingegen die Bildung von Filopodien ausschließlich von der Polymerisation des Aktins abzuhängen scheint (Condeelis 1993).



**Abb. 1.3 Modell der Fibroblasten-Migration.** Der Vorgang der Zellmigration wird als ein Zyklus aus vier Einzelschritten beschrieben. 1. Schritt Protrusion: Im Frontbereich der Zelle erfolgt durch Aktin-Polymerisation die Ausbildung von Membranprotrusionen, den Lamellipodien und Filopodien. 2. Schritt Adhäsion: Im Bereich der neugebildeten Protrusionen entstehen neue, stabilisierende Kontakte zur extrazellulären Matrix. 3. Schritt Kontraktion: Durch Myosin II-vermittelte Kontraktionskräfte erfolgt die Translokation des Zellkörpers. 4. Schritt Ablösung: Zuletzt werden die Zell-Matrix-Kontakte am hinteren Ende der Zelle durch mechanische Kräfte oder durch proteolytische Spaltung gelöst.

Im Bereich der neugebildeten Protrusionen entstehen neue, stabilisierende Zell-Kontakte zur extrazellulären Matrix in Form von Fokalahäsionen. Man unterscheidet kleine, punktförmige Fokalkomplexe und große, längliche Fokalkontakte. Sie werden von Integrinen gebildet, welche auf der extrazellulären Seite an Bestandteile der extrazellulären Matrix und intrazellulär über Adapterproteine an das Zytoskelett binden (DeMali *et al.* 2003). zzz

Das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (*microtubule-organizing-centre*, MTOC) und der Golgi-Apparat sind zur ‚leading edge‘ hin orientiert. Mikotubuli werden temporär in der Nähe der ‚leading edge‘ stabilisiert und ermöglichen so einen direktionalen vesikulären Transport (Watanabe *et al.* 2005). Die Translokation des Zellkörpers erfolgt durch Myosin-2 vermittelte Kontraktionskräfte in Richtung der neuen Zell-Matrix-Kontakte. Zuletzt werden am hinteren Ende der Zelle Zell-Matrix-Kontakte durch mechanische Kräfte oder proteolytische Spaltung der daran beteiligten Proteine gelöst. Dieser Zyklus aus Protrusion, Adhäsion, Kontraktion und Ablösung führt zu einer relativ zum Substrat betrachteten Gesamtbewegung der Zelle (Sheetz 1994).

### 1.3.1 REGULATION DER ZELLMIGRATION

Lamellendynamik und Zell-Substrat-Adhäsionen unterliegen Regulationsprozessen, welche durch intrazelluläre und extrazelluläre Signale gesteuert werden. Diese Signale stammen sowohl von Konstituenten der extrazellulären Matrix als auch von löslichen Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen (Moser *et al.* 2004). Transmembran-Rezeptoren perzipitieren diese Signale und aktivieren intrazelluläre Signalwege (DeMali *et al.* 2003). Die kleinen GTPasen der Rho-Familie wie Rac1, RhoA und Cdc42 stellen zentrale Schaltstellen in der Signaltransduktion während der Zellmigration dar. Sowohl die Bindung eines Zytokins oder Chemokins an seinen Rezeptor als auch die Bindung von Proteinen der ECM an Integrine führt zur Aktivierung der Rho-GTPasen. Rho-GTPasen werden durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert und durch GTPase-Aktivierungsproteine (GAPs) inaktiviert. Im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand interagieren sie mit ihren Effektorproteinen (Ridley 2001).

RhoA reguliert die Kontraktilität der Zellen, die Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten (Burridge und Wennerberg 2004). Rac1 hingegen stimuliert die Bildung von Lamellipodien und Fokalkomplexen (Rottner *et al.* 1999) und Cdc42 die Bildung von Filopodien (Etienne-Manneville 2004). Die Transformation der Fokalkomplexe zu Fokalkontakten im Bereich des Lamellipodiums wird durch RhoA reguliert (Mittra *et al.* 2005).

Die Aktivität der Rho-GTPasen wird sehr lokal reguliert. Aktives RhoA ist in migrierenden Fibroblasten hauptsächlich in den Lamellipodien, im distalen Bereich der ‚membrane ruffles‘ und am hinteren Ende der Zelle lokalisiert. Die Aktivität von Rac1 sowie Cdc42 ist im Bereich

---

der ‚leading edge‘ und in ‚membrane ruffles‘ am höchsten (Kraynov *et al.* 2000; Watanabe *et al.* 2005).

Entscheidende, die Lamellendynamik beeinflussende Effektorproteine von Rac1 und Cdc42 sind Proteine der WAVE und WASP Familien (Steffen *et al.* 2006). N-WASP wird durch Cdc42 aktiviert und induziert daraufhin die Arp2/3-abhängige Aktin-Polymerisation zur Ausbildung von Filopodien. Rac1 aktiviert über WAVE ebenfalls den Arp2/3-Komplex, jedoch kommt es durch zusätzliche Stimulation von IRSp53 zur Ausbildung eines dendritisch-verzweigten Aktin-Netzwerkes und damit zur Lamellipodienprotrusion (Nakagawa *et al.* 2003). Rac1 und Cdc42 aktivieren zusätzlich PAK, welches Stathmin phosphoryliert. Stathmin ist ein Protein, welches Mikrotubuli destabilisiert und durch Phosphorylierung gehemmt wird. Rac1 und Cdc42 tragen damit über PAK und Stathmin zur Stabilisierung von Mikrotubuli bei (Watanabe *et al.* 2005). Ein weiterer Effektor von Rac1 und Cdc42 ist IQGAP1. Dieses interagiert mit CLIP-170, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein. IQGAP1 co-lokalisiert mit Aktin-Filamenten an der ‚leading edge‘, an die CLIP-170 assoziierte Mikrotubuli rekrutiert werden. Rac1 und Cdc42 bieten so den plus-Enden der Mikrotubuli über die Interaktion von IQGAP1 und CLIP-170 eine Andockstelle in der Nähe der ‚leading edge‘ (Fukata *et al.* 2002). Cdc42 ist zusätzlich notwendig für die Orientierung des MTOC in Richtung der Migration (Etienne-Manneville 2004).

Die wichtigsten Effektoren des Rho-Signalweges sind die Rho-Kinasen der ROCK-Familie. ROCK aktiviert die Myosin-Light-Chain-Kinase und inaktiviert die Myosin-Light-Chain-Phosphatase. Auf diese Weise reguliert ROCK Myosin-vermittelte Kontraktilität. Zusätzlich aktiviert ROCK die LIM-Kinase, die durch Phosphorylierung Cofilin inaktiviert und damit die Dynamik des Aktin-Filamentsystems reguliert (Worthylake und Burridge 2003).

RhoA führt außerdem zur Aktivierung von Dia1 aus der Familie der Formin-homologen Proteine. Dia1 interagiert mit Profilin, welches globuläres Aktin bindet, damit eine Polymerisation verhindert und es an Orte hoher RhoA-Aktivität rekrutiert. Im Gegensatz zu verzweigten Aktin-Filamentnetzwerken fördert Dia1 die Ausbildung von unverzweigten Aktin-Filamentbündeln wie man sie in Stressfasern und ähnlichen Aktomyosin-Bündeln vorfindet. Das Zusammenspiel von ROCK und Dia1 stellt somit einen Rho-abhängigen Signalweg zur Ausbildung kontraktile Aktomyosin-Bündel dar (Mitra *et al.* 2005). Dia1 ist zusätzlich für die longitudinale Ausrichtung von Mikrotubuli parallel zu Aktinbündeln notwendig (Watanabe *et al.* 2005). ROCK interagiert mit den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen MAP-2 und Tau. Dia1 und Rock regulieren somit unter der Kontrolle von RhoA die Dynamik und Organisation von Mikrotubuli (Watanabe *et al.* 2005).

### 1.3.2 MIGRATION VON LEUKOZYTEN

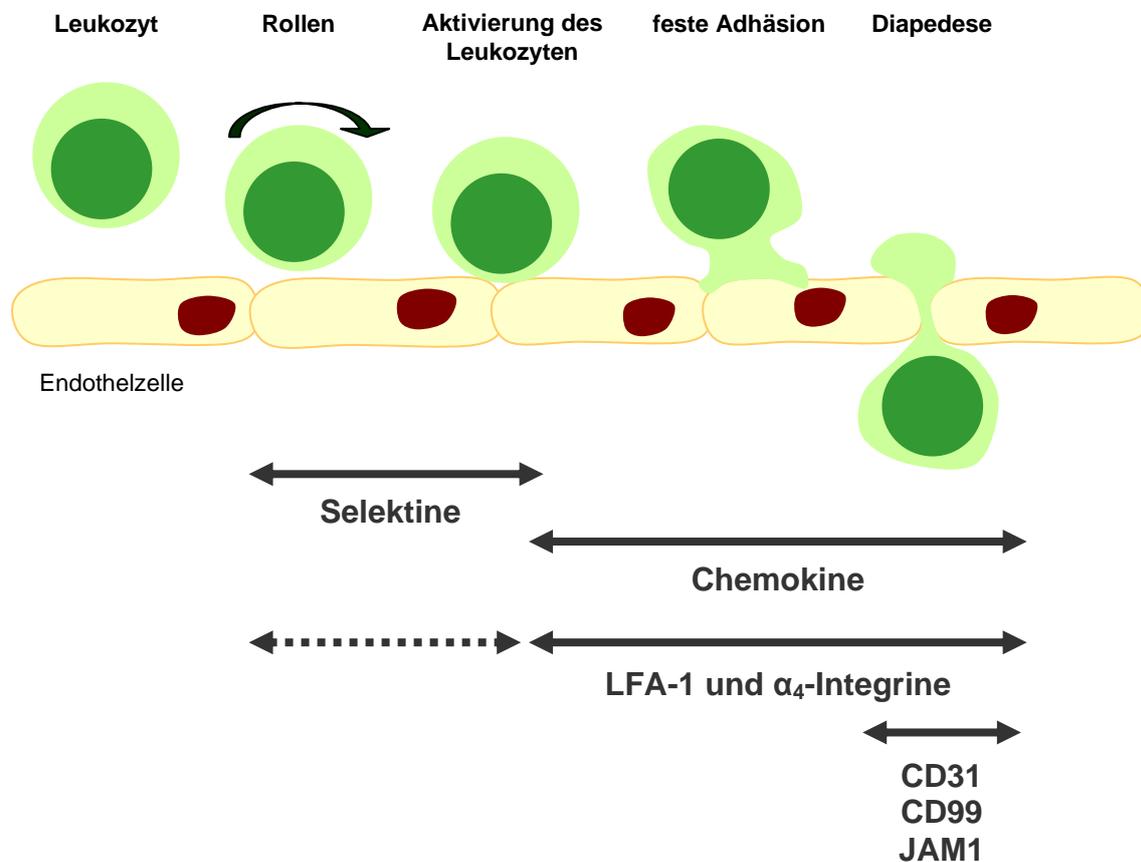
Fibroblasten stellen, im Bezug auf die Migration, den am besten untersuchten Zelltyp dar. Auf diesen Untersuchungen basiert die Entwicklung des vierstufigen Migrations-Modells bestehend aus Protrusion, Adhäsion, Kontraktion des Zellkörpers und Ablösung. Dieses Modell stellt kein stereotypes Programm dar, sondern wird Zelltyp-spezifisch modifiziert (Friedl 2004).

Leukozyten besitzen ein großes Spektrum verschiedenster Migrationsmechanismen (Springer 1994). Sie sind in der Lage auf der Oberfläche anderer Zellen wie etwa retikularen Zellen des Lymphknotens oder Gefäßendothelzellen zu migrieren. Die Extravasation eines Leukozyten erfordert eine Kombination aus Adhäsion sowie Proteolyse und gewaltige Formveränderung des Zellkörpers (Friedl *et al.* 2001). Hingegen verläuft die Migration eines Leukozyten durch ein Gewebe unabhängig von Proteolyse und zeigt nur gering ausgeprägte Interaktionen mit ECM-Bestandteilen (Friedl und Brocker 2000).

Für die Zirkulation von Leukozyten durch Blutgefäße und das Lymphsystem sowie für die Wanderung in periphere Gewebe, müssen sie in der Lage sein, schnell zwischen einem nicht-adhären und einem adhären Zustand zu wechseln. Diese Fähigkeit wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt zu denen Selektine, Integrine sowie die Immunglobulinsuperfamilie gehören (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid 1999). Das Erreichen eines Bestimmungsortes, das sogenannte ‚homing‘ von Leukozyten, wird durch Zytokine und Chemokine ausgelöst. Diese werden entweder kontinuierlich im Gewebe wie den SLO gebildet oder im Fall einer Infektion lokal von Zellen der angeborenen Immunabwehr sezerniert. Im Falle einer Infektion exprimieren Endothelzellen daraufhin P- und E-Selektine.

Leukozyten binden über Kohlenhydratpitope bestimmter Glykoproteine wie Sialyl-Lewis<sup>x</sup> an Selektine. Dies führt zu einer schwachen, reversiblen Adhäsion und so zu einem Entlangrollen („rolling“) von Leukozyten an der Gefäßwand. Auch die Integrine  $\alpha_4\beta_7$  und  $\alpha_4\beta_1$  scheinen einen schwachen, reversiblen Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel zu vermitteln (Berlin *et al.* 1995). Im nicht-infektiösen Fall beim Eintritt in einen Lymphknoten vermittelt die Interaktion von L-Selektin auf Lymphozyten mit Kohlenhydratpitopen von Glykoproteinen auf Endothelzellen das Rollen entlang der HEV. Eine anschließende feste Adhäsion wird durch eine Interaktion von Integrinen, in erster Linie der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) auf Leukozyten und ICAM-1,-2 und -3 auf Endothelzellen vermittelt. LFA-1 ist in erster Linie für den Arrest von Lymphozyten verantwortlich, bei Neutrophilen und Monozyten zusätzlich Mac-1. Zytokine erhöhen dabei die Aktivität der Integrine sowie die Expression der ICAMs. So steigert TNF- $\alpha$  die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen. Für die nachfolgende Diapedese wird neben LFA-1 und Mac-1 das Immunglobulin-ähnliche Molekül CD31 benötigt. Die Basalmembran, eine extrazelluläre Matrix, wird mit Hilfe proteolytischer Spaltung passiert. Leukozyten wandern nun innerhalb eines Gewebes entlang

eines Konzentrationsgradienten zu ihrem Bestimmungsort (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid 1999)



**Abb. 1.4 Die Extravasation der Leukozyten.** Leukozyten gelangen durch Extravasation aus einem Blutgefäß in ein Gewebe. Bei der Extravasation können vier Schritte unterschieden werden. 1. Selektin-vermittelte Wechselwirkungen induzieren eine Verlangsamung der Zellen im Blutstrom, wodurch die Zellen am Endothel entlang rollen. 2. An das Endothel gebundene Chemokine aktivieren die Leukozyten-Integrine. Dies bewirkt einen sofortigen Arrest der Zellen. LFA-1 und Mac1 spielen dabei die wichtigste Rolle. 3. Feste Adhäsion des Leukozyten, welche durch aktivierte Integrine vermittelt wird. 4. Der Leukozyt wandert durch das Endothel in das umgebende Gewebe (Diapedese).

Die Migration von Leukozyten innerhalb eines Gewebes wird als amöboide Migration bezeichnet. Dieser Begriff stammt von der wohl primitivsten, aber in vielerlei Hinsicht auch effektivsten Migrationsform der Amöbe *Dictyostelium discoideum* ab. *D. discoideum* bildet eine ellipsoide Zellform, die sich durch hohe Plastizität auszeichnet und durch schnell alternierende Zyklen aus morphologischer Expansion und Kontraktion transloziert (Fey *et al.* 2002). Dieser ‚kriechende‘ Migrationsmodus ermöglicht es nicht-residenten Zellen sich sehr schnell innerhalb von Geweben fortzubewegen. Amöboid migrierende Zellen zeichnen sich zusätzlich durch relative kurze und schwache Interaktionen mit dem Substrat und infolgedessen hohen Migrationsgeschwindigkeiten von bis zu 30  $\mu\text{m}/\text{min}$  aus (Friedl 2004). Plastizität wird durch

filamentöses Aktin am Zellkortex vermittelt, welches der Zelle sowohl Dynamik als auch Festigkeit verleiht. Reife Fokalkontakte und Stressfasern fehlen. Zell-Matrix-Kontakte werden durch schnelle Rezeptor-Zusammenlagerungen vermittelt. Protease-unabhängige Mechanismen, wie etwa die Anpassung der Zellform an vorgegebene Matrixstrukturen oder die Extension lateraler Protrusionen („elbowing“), dienen der Überwindung der Extrazellulären Matrix, (Friedl und Wolf 2003; Mandeville *et al.* 1997; Wolf *et al.* 2003). Diese kortikale Dynamik wird durch die kleinen GTPasen der Rho-Familie reguliert: RhoA und dessen Effektor ROCK erzeugen Festigkeit und Spannung des Kortex und erhalten die runde Zellmorphologie (Smith *et al.* 2003; Worthylake *et al.* 2001). Zudem rekrutieren Rac1 und Cdc42 Adapterproteine wie WASP, welche dynamische Zellprotrusionen wie Lamellipodien und Filopodien generieren (Haddad *et al.* 2001).

Es besteht zur Zeit kein Konsens darüber, ob Leukozyten, vergleichbar zu Fibroblasten, Integrine als Adhäsionsmoleküle für die Migration innerhalb eines Gewebes benötigen (Fiorini *et al.* 2002; Friedl *et al.* 1998).

## 1.4 INTEGRINE

Integrine bilden eine große Familie heterodimerer, transmembraner Adhäsionsmoleküle, die aus einer  $\alpha$ - und einer nicht kovalent assoziierten  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Sie werden gewebespezifisch von fast allen Zellen des Körpers exprimiert. Charakteristisch für Integrine ist ihre Fähigkeit, Signale bidirektional zwischen dem intrazellulären Raum in den extrazellulären Raum („inside-out signaling“) oder umgekehrt („outside-in signaling“) zu transduzieren. Integrine vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Dustin und Springer 1991) und sind daher bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Wundheilung (Hynes 1992), neuronales Gedächtnis (Jiang *et al.* 1998), Gewebeaufbau (Edelman und Crossin 1991) sowie bei der Embryogenese (Darribere *et al.* 2000), Extravasation von Leukozyten (siehe 1.3.2) und Interaktion von T-Zellen und APC von Bedeutung (siehe 1.2.3).

### 1.4.1 DIE STRUKTUR DER INTEGRINE UND IHRE LIGANDEN

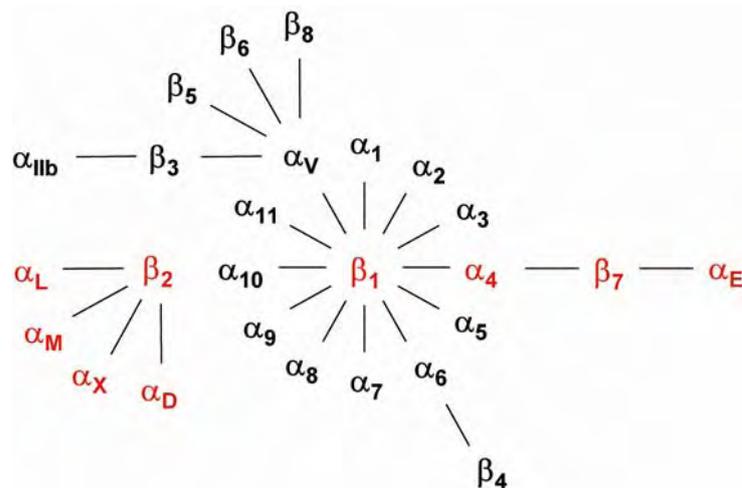
Die vielfältigen Funktionen der Integrine werden in erster Linie durch ihre Struktur bestimmt. Es sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8 verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die zusammen mindestens 24 Heterodimere bilden können (Plow *et al.* 2000). Sie besitzen eine große extrazelluläre Domäne (bis zu 1114 Aminosäuren für die  $\alpha$ - und 678 für die  $\beta$ -Kette) sowie einen kurzen transmembranen und zytoplasmatischen Bereich (15-77 Aminosäuren für die  $\alpha$ - und 46-60 Aminosäuren für die  $\beta$ -Untereinheit; Ausnahme ist die 1000 Aminosäure umspannende zytoplasmatische Domäne von  $\beta_4$ ).

Die zytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Ketten sind wenig homolog. Ausschließlich in der membrannahen Gelenkregion befindet sich eine konservierte KXGFFKR-Sequenz, welche unter anderem eine Bindungsstelle für Calreticulin ist (Lee *et al.* 1995).

Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten im extrazellulären Bereich eine 250 Aminosäure umfassende, konservierte I-ähnliche Domäne, welche ebenfalls ein MIDAS-Motiv beinhaltet, sowie eine Hybrid-Domäne und vier Cystein-reiche EGF (*epidermal growth factor*) – ähnliche Wiederholungen (Lee *et al.* 1995; Loftus *et al.* 1994). In der membrannahen zytoplasmatischen Region der  $\beta$ -Kette befindet sich ein konserviertes KLLIXIHDRR-Sequenzmotiv, welches mit der KXGFFKR-Sequenz der  $\alpha$ -Kette die sogenannte Gelenk-Region bildet. Weiterhin ist der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit ein NPXY/F-Motiv gemein, welches circa 30 Aminosäuren von der transmembranen Domäne entfernt ist und die Interaktion zu dem Aktin-bindenden Protein Talin vermittelt (Kinashi und Katagiri 2005).

Integrine können sowohl verschiedene Liganden erkennen und bestimmte Liganden können von unterschiedlichen Integrinen gebunden werden. Die Ligandenbindung scheint dabei in erster Linie durch das MIDAS-Motiv der I-ähnlichen Domäne und /oder das MIDAS-Motiv der I-Domäne in der N-terminalen Domäne der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit vermittelt zu werden (Plow *et al.* 2000). Auf Integrinen, welche keine I-Domäne besitzen, dienen Kationenbindungsstellen vermutlich als Ligandenbindungsstelle (Takada *et al.* 1997).

Die Tripeptid Sequenz RGD dient zahlreichen Integrinen als Liganden-Erkennungsmotiv. Aber auch Aminosäure-Sequenzen wie GPRP, EILDV und KQAGDV werden von einigen Integrinen erkannt (Hynes 1992).



**Abb. 1.5 Die Familie der Integrine.** Es sind 18 verschiedene Integrin  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die zusammen mindestens 24 Heterodimere bilden können. Bekannte Heterodimere sind durch Verbindungen angezeigt. Die wichtigsten Leukozyten-Integrine sind rot dargestellt.  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine wurden bislang nur auf Leukozyten gefunden.

### 1.4.2 $\beta_2$ -INTEGRINE

Leukozyten exprimieren ausschließlich  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\beta_7$ -Integrine.  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine konnten bisher nur auf Leukozyten nachgewiesen werden und hier stellen  $\beta_2$ -Integrine die am stärksten vertretene Gruppe dar. Bisher sind vier unterschiedliche  $\beta_2$ -Integrine beschrieben worden: LFA-1 (CD11a/CD18,  $\alpha_L/\beta_2$ ), Mac-1 oder CR3 (CD11b/CD18,  $\alpha_M/\beta_2$ ), p150.95 oder CR4 (CD11c/CD18,  $\alpha_X/\beta_2$ ) und  $\alpha_D\beta_2$  (CD11d/CD18). Ihnen allen ist die  $\beta_2$ -Untereinheit, CD18, mit einem Molekulargewicht von 95 kDa gemein.

LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) besitzt eine  $\alpha$ -Kette von 180 kDa und wird auf allen Leukozyten exprimiert. Das Integrin ist in der Vermittlung angeborener und adaptiver Immunität involviert wie in die Aktivierung von NK-Zellen, die Antigen-spezifische Proliferation von T-Zellen, T-Zell vermittelten zytotoxischen Zelltod, sowie die T-Zell abhängige Antikörper-Antwort und die Extravasation (Arnaout 1990; Sigal *et al.* 2000; Springer 1990). Die Liganden für LFA-1 sind ICAM-1, -2, -3, -4 und -5, wobei ICAM-1 den wichtigsten Bindungspartner darstellt (Gahmberg *et al.* 1997; Larson und Springer 1990; Tian *et al.* 2000).

Mac-1 trägt eine  $\alpha$ -Kette von 170 kDa. Es wird primär auf Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen (Natürliche Killer Zellen) exprimiert (Wright *et al.* 1983). Mac-1 wird in intrazellulären Vesikeln gespeichert und durch inflammatorische Zytokine schnell freigesetzt (Hughes *et al.* 1992). Es ist wesentlich bei der Extravasation phagozytierender Zellen und bei der Phagozytose opsonierter Mikroorganismen beteiligt (Arnaout *et al.* 1983). Liganden für Mac-1 sind Fibrinogen, LPS, ICAM-1 sowie iC3B und der Koagulationsfaktor X (Rabb *et al.* 1993).

p150.95 wird auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert. Es kann ebenfalls in intrazellulären Vesikeln gespeichert und durch inflammatorische Stimuli rasch an die Zelloberfläche gelangen. Liganden sind LPS, Fc $\epsilon$ -Rezeptor II (CD23) und iC3b (Arnaout 1990; Lecoanet-Henchoz *et al.* 1995).

$\alpha_D\beta_2$  trägt eine  $\alpha$ -Kette von 155 kDa. Bisher ist bekannt, dass es auf Makrophagen, Granulozyten sowie auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und der roten Pulpa der Milz exprimiert wird. Ligand für  $\alpha_D\beta_2$  ist ICAM-3 (Van der Vieren *et al.* 1995).

Die Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (LAD) verdeutlicht auf drastische Weise die biologische Bedeutung der  $\beta_2$ -Integrine. Diese Erkrankung wird durch einen Defekt in der Synthese der  $\beta_2$ -Untereinheit ausgelöst. Da Leukozyten so nicht mehr aus dem Blut in die Gewebe und damit an der Ort der Infektion gelangen, können bakterielle Infektionen nicht mehr bekämpft werden. Patienten leiden daher unter wiederkehrenden, schweren Infektionen und sterben meist in jungen Jahren (Hogg und Bates 2000; Springer 1990).

INTEGRIN	BEZEICHNUNG	EXPRESSION	LIGAND
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1, CD49a/CD29	Leukozyten	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2, CD49b/CD29	Monozyten	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3, CD49c/CD29	Leukozyten	Kollagen I, Laminin, Fibronectin, Epiligrin
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen,	VCAM-1, Fibronectin
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5, CD49e/CD29	Monozyten, Makrophagen, Gedächtniszellen, T-Zellen	Fibronectin
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6, CD49f/CD29	Monozyten, Gedächtniszellen, T-Zellen	Laminin
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	Monozyten, T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	ICAM-1, -2, -3, -4, -5
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen, FaktorX
$\alpha_X\beta_2$	p150.50, CD11c/CD18	Dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile	Fibrinogen, iC3b, CD23
$\alpha_D\beta_2$	CD11c/CD18		ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	Makrophagen	Vitronectin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen
$\alpha_4\beta_7$	CD49/-	Lymphozyten	MadCAM-1, Fibronectin, VCAM-1
$\alpha_E\beta_7$		Lymphozyten im Epithel	E-Cadherin

**Tabelle 1.1** Übersicht der auf Leukozyten exprimierten Integrine. VLA, *very late activation antigen*; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*; VCAM, *vascular cell adhesion molecule*; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; iC3b, inaktivierte Form von C3b; MAdCAM, *mucosal addressin cell adhesion molecule*.

### 1.4.3 REGULATION DER INTEGRINFUNKTION (,INSIDE-OUT-SIGNALING')

Für einen koordinierten Ablauf der Leukozytenfunktion ist es entscheidend, dass ihre adhäsiven Eigenschaften räumlich und zeitlich genau reguliert werden. Dies wird durch eine dynamische Regulation der Integrinfunktion erreicht. Integrine wechseln zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand und vermitteln so dynamische und transiente Zell-Zell/Zell-Matrix-Interaktionen (van Kooyk und Figdor 2000).

Die Aktivierung von Integrinen kann in erster Linie durch Affinität und Avidität beschrieben werden.

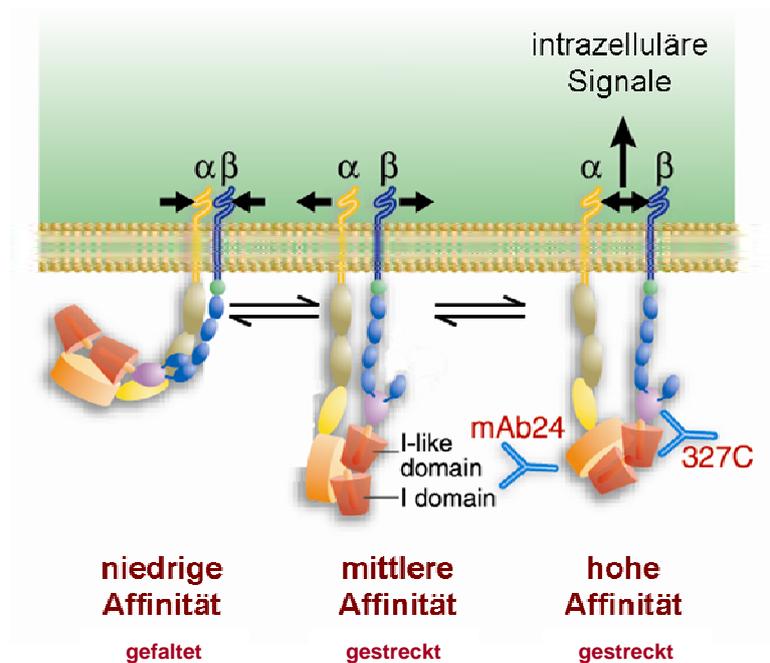
Die Affinität beschreibt den Aktivierungszustand eines einzelnen Integrinmoleküls und wird durch Konformationsänderungen spezifischer Aktivierungsepitope in der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette generiert. Mittels Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass das inaktive Integrin eine geknickte Konformation einnimmt, die durch Ligandenbindung oder intrazelluläre Signale in eine gestreckte Konformation überführt wird (Takagi und Springer 2002). Dieses hochaffine Stadium kann sowohl durch divalente Kationen ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) (Mould 1996) als auch durch aktivierende Antikörper wie die anti-CD18-Antikörper KIM185 oder 327C (Lu *et al.* 2001) und den anti-CD11a-Antikörper MEM83 induziert werden (Landis *et al.* 1993). Der Antikörper mAB24 erkennt hingegen innerhalb der  $\beta_2$ -I-Domäne das Epitop eines aktivierten Integrins, ohne dessen Aktivierungszustand zu beeinflussen (Salas *et al.* 2004). Die Avidität beschreibt eine Veränderung des Aggregatzustandes und die Kooperation von Integrinen, sowie dessen funktionale Auswirkung. Das Zusammenlagern von Integrinen führt zu dessen Aktivierung. Im Fall von LFA-1 kann dies durch den Antikörper mAK NKI-L16 nachgewiesen werden (van Kooyk *et al.* 1994; van Kooyk *et al.* 1991). Integrine können direkt oder über assoziierte Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sein und sind so relativ immobil. Eine temporäre Entkopplung vom Aktin-Zytoskelett führt zu einer Erhöhung ihrer lateralen Mobilität, so dass sie sich zusammenlagern können. Dies führt zu einer Erhöhung der Avidität (Dustin und Springer 1991; van Kooyk und Figdor 2000; van Kooyk *et al.* 1999).

Affinitäts- und Aviditätsveränderungen können auf vielfältige Weise ausgelöst werden. So kann eine Quervernetzung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes (Dustin und Springer 1989) sowie der Co-Rezeptoren CD2, CD7, CD28 und CD31 (Chan *et al.* 1997; Shimizu und Hunt 1996; Shimizu *et al.* 1995; van Kooyk *et al.* 1998; Zell *et al.* 1996) eine Aktivierung von LFA-1 auslösen. Die Quervernetzung induziert eine Signalkaskade, die zur Aktivierung von Ras und Proteinkinasen wie Fyn, Lck und ZAP-70 führt, welche wiederum die Phospholipasen B, C und PI3-Kinasen stimulieren (Shimizu *et al.* 1995). Die Phospholipasen spalten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC),  $IP_3$  induziert die Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Zusätzlich werden  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der T-Zell-Membran geöffnet, so dass extrazelluläres Calcium in die Zelle strömen kann. PKC und  $Ca^{2+}$  führen zu einer transienten Aktivierung von LFA-1 (Kolanus und Seed 1997). Das intrazellulär wirkende Phorbol-ester PMA (Tetradecanoylphorbol-13-acetat), ein Strukturanalogon von DAG, kann *in vitro* die PKC aktivieren. Dies führt zu einer Phosphorylierung der Aminosäure S756 im zytoplasmatischen Bereich der  $\beta$ -Kette und zu einer Erhöhung der Adhäsion (Valmu *et al.* 1999). Der intrazelluläre Calciumspiegel kann durch Calcium-Ionophoren, PLC $\gamma$  oder der PI3-Kinase erhöht werden (Lub *et al.* 1995; Shimizu und Hunt 1996). Auch Zytokine und Chemokine induzieren eine

Aktivierung von  $\beta_2$ -Integrinen (Constantin *et al.* 2000; Kolanus und Seed 1997; Weber *et al.* 1999).

Neben diesen indirekt wirkenden, regulatorischen Elementen, kann die Integrin-Funktion auch durch Proteine beeinflusst werden, die direkt mit dem Rezeptor interagieren. So bindet das Protein Talin an das NPXY/F-Motiv in der  $\beta$ -Untereinheit und spielt dabei eine wichtige Funktion in der Aktivierung von LFA-1 (Kim *et al.* 2003; Shamri *et al.* 2005; Tadokoro *et al.* 2003). Das zur Ras-Superfamilie gehörende G-Protein Rap1 und dessen Effektor RapL sind weitere wichtige Aktivatoren der LFA-1 Aktivität und scheinen auch dessen Lokalisation zu beeinflussen (Kinashi und Katagiri 2005). Ebenfalls regulieren die Proteine ADAP (Griffiths *et al.* 2001) und SKAP55 (Peterson 2003) die Aktivität von LFA-1.

1996 wurde von Kolanus *et al.* Cytohesin-1 entdeckt, ein Protein, welches direkt mit der  $\beta$ -Kette von LFA-1 zu interagieren scheint und so die Adhäsion an ICAM-1 stimuliert (Kolanus *et al.* 1996). Im Kapitel 1.4.5 wird genauer auf Cytohesin-1 eingegangen.



**Abb. 1.6 Variable Affinitäten des  $\beta_2$ -Integrins LFA-1 durch unterschiedliche Konformationen.**

In der niedrig affinen Form ist die Kopf-Domäne zur Membran hin ausgerichtet. Nach Aktivierung streckt sich das Integrin und kann zwei Konformationen mit mittlerer und hoher Affinität annehmen. Die Antikörper mAb24 und 327C erkennen Neo-Epitope, welche nach Integrin-Aktivierung auf der mittel affinen bzw. auf der hochaffinen Form exprimiert werden. Sie können genutzt werden, um den Aktivierungsstatus von  $\beta_2$ -Integrinen zu untersuchen. Abbildung verändert aus Laudanna, 2005.

#### 1.4.4 SIGNALTRANSDUKTION DURCH INTEGRINE (,OUTSIDE-IN-SIGNALING')

Neben ihrer Fähigkeit intrazelluläre Signale zu verarbeiten und als Adhäsionsmoleküle zu fungieren, besitzen Integrine die Eigenschaft Informationen aus dem Extrazellularraum aufzunehmen und weiterzuleiten. Auch eine Quervernetzung von Integrinen durch Antikörper löst die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden aus. Diese Signalkaskaden beginnen mit der Aktivierung von Src-Tyrosinkinasen wie Fgr, Lyn, Hck und Syk (Lowell *et al.* 1996; Yan und Berton 1996; Yan *et al.* 1997), sowie der Stimulation von Proteinen der Familie der Fokaladhäsionskinase (FAK) wie p125FAK, fakB und Pyk2 (Yan und Novak 1999). Aktivierung dieser Proteine löst die Phosphorylierung bzw. Stimulation zahlreicher weiterer Proteine wie den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav (Zheng *et al.* 1996), die extrazellulär-regulierte-Kinase ERK (McGilvray *et al.* 1998) sowie das zytoskelettale Protein Paxillin (Fuortes *et al.* 1994) und damit die Aktivierung vielfältiger Signalkaskaden aus (O'Neill *et al.* 2000). Weiterhin werden die kleinen GTPasen RhoA und Rac1, sowie die PI3-Kinase und Phospholipase C $\gamma$  aktiviert. Letztere führt zur Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration (Axelsson *et al.* 2000; Kanner *et al.* 1993).

Da das Integrin selbst keine intrinsische Enzymaktivität besitzt, ist es unklar, wie die Aktivierung der Tyrosinkinasen durch den zytoplasmatischen Teil der  $\beta_2$ -Kette reguliert wird. Vermutlich vermitteln weitere Proteine wie die Aktin-bindenden Proteine  $\alpha$ -Actinin, Talin, Paxillin oder Spektrin zwischen Integrinen und Tyrosinkinasen (Bennett und Gilligan 1993; Miyamoto *et al.* 1995). Die Bindung der  $\beta_2$ -Kette an Talin ist konstitutiv (Sampath *et al.* 1998), die an Bindung  $\alpha$ -Actinin erfolgt erst nach einer ,Cluster'-Bildung der Integrin-Moleküle (Pavalko und LaRoche 1993).

#### 1.4.5 CYTOHESIN-1

Cytohesin-1 wurde 1996 von Kolanus *et al.* in einem ,Yeast-Two-Hybrid-Screen' als Interaktionspartner der  $\beta$ -Kette von CD18 identifiziert (Kolanus *et al.* 1996). Es ist ein 47 kDa großes, hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiertes Protein. In einigen nicht-hämatopoetischen Zellen wie HeLa, K652 und CV-1 konnte ebenfalls eine Cytohesin-1-Expression festgestellt werden (Geiger *et al.* 2000; Kolanus *et al.* 1996).

Cytohesin-1 gehört zur Familie der BFA (Brefeldin A)-insensitiven Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (guanine-nucleotide-exchange-factor, GEF) der Cytohesine bestehend aus vier Mitgliedern – Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO), Cytohesin-3 (Grp1) und Cytohesin-4. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cytohesin-1 ist in Abb. 1.7 dargestellt. Cytohesin-1 besteht aus einer N-Terminalen  $\alpha$ -helikalen Superhelix (,coiled-coil'-Domäne), welche vermutlich Proteininteraktionen vermittelt und einer zentralen sec7-Domäne. Letztere ist

homolog zu einer kurzen Sequenz des ansonsten nicht näher verwandten Proteins *sec7* aus *S. cerevisiae*, welches dort in den Proteintransport vom ER zum Golgi involviert ist (Achstetter *et al.* 1988). Die *sec7* Domäne von Cytohesin-1 konnte als Interaktionspartner des zytoplasmatischen Bereichs von CD18 identifiziert werden (Kolanus *et al.* 1996). Die membranproximalen Aminosäuren WKA der  $\beta_2$ -Untereinheit stellen dabei das Bindemotiv für Cytohesin-1 dar (Geiger *et al.* 2000).

Zusätzlich katalysiert diese Domäne den Guanin-Nukleotid-Austausch kleiner ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs) der Ras GTPase Superfamilie, welche in den Vesikeltransport und die Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes involviert sind (Honda *et al.* 1999; Norman *et al.* 1998). Es ist bekannt, dass Cytohesin-1 den Nukleotid-Austausch von ARF1 sowie ARF6 katalysiert (Chardin *et al.* 1996; Donaldson und Jackson 2000; Frank *et al.* 1998; Meacci *et al.* 1997).

An die *sec-7*-Domäne schließt sich eine Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne an. Diese PH-Domäne ist in über 100 Proteinen vorzufinden, von denen die meisten in Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Im Allgemeinen vermitteln PH-Domänen die Membranrekrutierung von Proteinen über die Bindung an Membran-ansässige Lipide (Lemmon und Ferguson 1998) wie PIP2 (Frech *et al.* 1997; Garcia *et al.* 1995; Pitcher *et al.* 1995; Zheng *et al.* 1996) oder PIP3 (Franke *et al.* 1997; Franke *et al.* 1997; Salim *et al.* 1996). Die Bindung an PIP3 durch die PH-Domäne von Cytohesin-1 vermittelt dessen Translokation an die Plasmamembran (Nagel *et al.* 1998).

Am C-terminalen Ende von Cytohesin-1 befindet sich weiterhin eine kurze polybasische Region (c-Domäne), welche neben der PH-Domäne für die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 notwendig ist (Nagel *et al.* 1998). Zudem konnten in der polybasischen Region zwei Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden.



**Abb. 1.7 Die Domänenstruktur von Cytohesin-1.** Die Cytohesin-Familie besteht aus vier Mitgliedern (Cytohesin-1 bis -4). Diese enthalten eine kurzen N-terminalen coiled-coil-Domäne (cc; ca. 50 Aminosäuren), einer zentralen *sec7*-Domäne (ca. 200 Aminosäuren), einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH, ca. 120 Aminosäuren) sowie einer kurzen polybasischen Region (pb; ca. 15 Aminosäu-

Eine Überexpression von Cytohesin-1 oder dessen isolierter *sec-7*-Domäne führt zu einer verstärkten Adhäsion der humanen T-Zell-Linie Jurkat an ICAM-1 (Kolanus *et al.* 1996). Weiterhin inhibiert eine Überexpression der Cytohesin-1 GEF-defekten Mutante E157K die Steigerung LFA-1 vermittelter Adhäsion dominant. So konnte gezeigt werden, dass die LFA-1

vermittelte Adhäsion abhängig von der GEF-Aktivität von Cytohesin-1 ist (Geiger *et al.* 2000). Auch eine Überexpression des C-terminalen Teils von Cytohesin-1, welcher die PH- und die polybasische Domäne enthält, inhibiert eine Steigerung der Adhäsion dominant (Kolanus *et al.* 1996).

Das Phorbolester PMA stimuliert die Phosphorylierung der Serine 393 und 394 in der polybasischen Region von Cytohesin-1 (K. Obrusnik, unveröffentlicht). Phosphoryliertes Cytohesin-1 ist mit dem kortikalen Aktin-Zytoskelett assoziiert. Die Phosphorylierung beeinflusst nicht die Bindung von Cytohesin-1 an PIP<sub>3</sub>, steigert jedoch die GEF-Aktivität gegenüber ARF1 (Dierks *et al.* 2001). Da die GEF-Funktion für die LFA-1 vermittelte Adhäsion notwendig ist, ist es möglich, dass auch die Phosphorylierung von Cytohesin-1 hier eine Rolle spielt. Perez *et al.* konnten eine Funktion von Cytohesin-1 in einem LFA-1 'outside-in'-Signalweg zeigen. Die Bindung an ICAM-2 über LFA-1 resultiert in der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und dies soll über phosphoryliertes Cytohesin-1 verlaufen (Perez *et al.* 2003).

#### 1.4.6 CYTIP

Das Cytohesin-interagierende Protein CYTIP (auch Cybr, Cytohesin-1 binder und regulator oder CASP, Cytohesin-associated scaffolding protein) wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die Expression von CYTIP wird in humanen PBL durch die Zytokine IL-2 und IL-12 und während der Reifung dendritischer Zellen induziert (Boehm *et al.* 2003; Tang *et al.* 2002). Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von CYTIP ist in Abb. 1.8 dargestellt.



**Abb. 1.8 Die Domänenstruktur von CYTIP.** CYTIP besitzt eine PDZ-Domäne, eine Leucin-Zipper-Domäne (LZ) sowie eine große C-terminale Domäne unbekannter Funktion.

CYTIP enthält eine 73 Aminosäuren lange N-terminale PDZ-(PSD-95, Discs large, ZO-1)-Domäne, sowie eine 53 Aminosäuren umfassende Leucin-Zipper-Region und eine C-terminale 152 Aminosäuren lange Domäne mit unbekannter Funktion. PDZ-Domänen sind strukturell konservierte Protein-Interaktionsdomänen, welche häufig die Bindung an C-terminale PDZ-Bindemotive vermitteln. Der Leucin-Zipper ist eine Form der coiled-coil-Domäne und

---

ermöglicht die Interaktion mit der coiled-coil-Domäne von Cytohesin-1, -2 und -3 (Mansour *et al.* 2002). Eine Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-4 wurde bislang nicht gezeigt.

Boehm *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von CYTIP in Jurkat-Zellen die LFA-1 vermittelte Adhäsion inhibiert. Diese Funktion hängt von der PDZ- und der Leuzin-Zipper-Region ab (Boehm *et al.* 2003). Der ‚knock-down‘ von CYTIP mittels siRNA führt zu einer verstärkten Adhäsion dendritischer Zellen an Fibronectin und immobilisierte T-Helferzellen (Hofer *et al.* 2006).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 GERÄTE

Agarosegeldokumentation.....	Gel Max, INTAS (Göttingen)
Agarosegel-Elektrophoresekammer .....	Polymehr (Paderborn)
Autoklav .....	Model 135T, H+P (Oberschleißheim)
Blot-Apparatur .....	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Drehrad.....	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Durchflusszytometer .....	Epics XL, Beckman Coulter (München)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE) .....	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektroporationsapparatur .....	- GenePulser Xcell, Biorad (München)
.....	- Nucleofector, Amaxa (Köln)
Elektrowaage .....	College, Mettler Toledo (Gießen)
Entwicklermaschine .....	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte (Wiesbach)
Feinwaage .....	AG 285, Mettler Toledo (Gießen)
Fluoreszenz- und Absorptionsmessgerät .....	Synergy HT, MWG (Ebersberg)
Heizblock .....	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop .....	FV-1000, Olympus (Hamburg)
Lichtmikroskop .....	DMIL, Leica (Wetzlar)
Magnetrührer .....	ARE, VELP scientifica (Usmate, Italien)
Neubauer Zählkammer .....	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Maschine .....	Mycycler, Biorad (München)
pH-Meter .....	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Pipetten P2, P10, P20, P100, P200, P1000 .....	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe .....	Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Photometer .....	Biophotometer, Eppendorf (Hamburg)
Schüttelgerät .....	VKS-75 control, Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Stabsonicator .....	UW/HD 2070, Bandelin Elektronik (Berlin)
Sterilbank für Zellkulturarbeiten .....	Euroflow, Thermolife (Woerden, Niederlande)
Vortex .....	Zx <sup>3</sup> , VELP scientifica (Usmate, Italien)
Vacuum-Zentrifuge .....	Concentrator 5301, Eppendorf (Hamburg)

---

Wasserbad .....	Typ 1004, GFL (Burgwedel)
Wippe .....	Rocky, Fröbel Labortechnik GmbH (Lindau)
Zellkulturinkubator .....	Model 381, ThermoForma (Karlsruhe)
Zentrifugen .....	- Multifuge 4KR, Heraeus instrument GmbH (München)
.....	- Biofuge pico, Heraeus instrument GmbH (München)
.....	- Biofuge fresco, Heraeus instrument GmbH (München)
.....	- Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München)
.....	- Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (München)
Zentrifugen-Rotoren .....	Avanti J-20XP - JLA-8.1000
.....	- JA-14
.....	- JS-5.3
.....	Optima LE-80K Ultrazentrifuge- NVT 100

### 2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Deckgläschen, Ø 15 mm .....	Roth (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten (4 mm) .....	Biozym (Wien, Österreich)
FACS-Röhrchen .....	BD Falcon (Heidelberg)
Fett-Stift .....	Super PAP Pen, Daido Sangyo (Tokyo, Japan)
Filterpapier .....	Whatman Nr. 4, Schleicher & Schuell (Dassel)
Mikrotiterplatten, 96-Loch .....	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran .....	PROTRAN, Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger, 76 x 26 mm .....	Roth (Karlsruhe)
PCR-Reaktionsgefäße .....	200 µl Thin Wall Tubes, Biorad (München)
Reaktionsgefäße .....	0,5/1,5/2,0 ml Starlab (Helsinki, Finnland)
Röntgenfilm .....	Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Spritzen und Kanülen .....	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter 0,2 µm/0,45 µm .....	Schleicher & Schuell (Dassel)
Transwell Boyden-Kammer (Ø 5 µm) .....	Costar, Corning Inc. (New York, NY, USA)
Ultrazentrifugationsröhrchen .....	Beckman (München)
Verbandmull .....	Hartmann (Heidenheim)
Zellkulturplastik .....	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber .....	Sarstedt (Nümbrecht)

**2.1.3 CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN**

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 30%	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
ATP	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Bisbenzimid H33342	
Fluorochrom-Trihydrochlorid	Calbiochem (Bad Soden)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
n-Butanol	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
CCL19, human (rekombinant)	R&D Systems (Wiesbaden)
CXCL12, human (rekombinant)	R&D Systems (Wiesbaden)
DABCO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Darmstadt)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll (human)	Pan Biotech GmbH (Aidenbach)
Gelmount	Biotrend (Köln)
Gentamicinsulfat	Gibco (Eggenstein)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Igepal CA 630	Sigma (Taufkirchen)
Ionomycin	Sigma (Taufkirchen)
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumacetat	Sigma (Taufkirchen)

---

Magnesiumchlorid .....	Roth (Karlsruhe)
Manganchlorid .....	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol .....	Merck (Darmstadt)
Methanol .....	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver .....	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid .....	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS) .....	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid .....	Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd .....	Merck (Darmstadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) .....	Sigma (Taufkirchen)
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA) .....	Sigma (Taufkirchen)
Protein G Sepharose <sup>TM</sup> , 4 fast flow .....	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Rinderserumalbumin (BSA) .....	Roth (Karlsruhe)
Secin H3 .....	Prof. Dr. M. Famulok (Bonn)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) .....	Sigma (Taufkirchen)
Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan .....	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 .....	Roth (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA-Lösung .....	Gibco (Eggenstein)
Tween-20 .....	Roth (Karlsruhe)

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

#### **2.1.4 ZELLKULTUR-PUFFER, -MEDIEN UND –SEREN**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) .....	Gibco (Eggenstein)
Fötales Kälberserum (FCS) .....	Gibco (Eggenstein)
Hank's balanced salt solution (HBSS) .....	Gibco (Eggenstein)
Phosphate buffered saline (PBS) .....	Gibco (Eggenstein)
RPMI 1640 .....	Gibco (Eggenstein)
VLE-RPMI 1640 .....	Biochrom AG (Berlin)
CellGro.....	CellGenix (Freiburg)

## 2.1.5 ANTIKÖRPER

### 2.1.5.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

ANTI-KÖRPER	VERDÜNNUNG	QUELLE
Ratte-anti-human/murin CYTIP (2F9) Hybridoma-Überstand	1:20 (WB) 1:2,5 (IP)	E. Kremmer (GSF, München)
Ratte-anti-human Cyh1 (7H2) Hybridoma-Überstand	1:20 (WB) 1:2,5 (IP)	E. Kremmer (GSF, München)
Maus-anti-human CD11a (MHM24)	1:200 (FACS)	Dako (Hamburg)
Maus-anti-human CD18 (MHM23)	1:200 (FACS)	Dako (Hamburg)
Maus-anti-human CD18 (MEM48)	5 µg/ml (Stimulation)	V. Horejsi (Prag, Tschechien)
Maus-anti-human CD18 (KIM185)	5 µg/ml (Stimulation)	M. Robinson (Celltech, Berkshire, UK)
Maus-anti-human CD18 (327C)	1 µg/ml (FACS)	R.Alon (Rehovot, Israel) C. Weber (Aachen)
Maus-anti-human CD18 (7E4)	10 µg/ml	Immunotech
Maus-anti-human CD11b (Klon ICRF44)	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)
Maus-anti-human CD11c (Klon B-ly6)	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)
Maus-anti-human CD18 (mAB24)	1 µg/ml (FACS)	N. Hogg (London)
Ratte-anti-human Tubulin (Klon MAB1864)	1:100 (IF)	Chemicon (Temecula, CA)
Ziege-anti-human IgG	1:100 (Beschichtung)	Dianova (Hamburg)
Maus-anti-human HLAD/FITC	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)
Maus-anti-human CD80	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)
Maus-anti-human CD86	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)
Maus-anti-human CD83/FITC	1:2,5 (FACS)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Kanninchen-anti-pMAP-Kinase	1:2000 (WB)	Cell Signaling
Kanninchen-anti-Aktin	1:300 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
Maus IgG1 Isotyp-Kontrolle/FITC	1:2,5 (FACS)	R&D Systems

(Klon 11711.11)		(Minneapolis, USA)
Maus IgG2a Isotyp-Kontrolle/FITC	1:200 (FACS)	BD Biosciences PharMingen (San Jose, USA)

### 2.1.5.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG	QUELLE
HRP-Esel-anti-Ratte-IgG	1:10000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:10000 (WB)	Rockland (Gilbertsville, PA, USA)
Alexa Fluor 488-Ziege-anti-Maus-IgG <sub>1</sub>	1:400 (IF)	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
FITC-Ziege-anti-human-IgG	1:200 (IF) 1:200 (FACS)	Dianova (Hamburg)
Cy3-Ziege-anti-Ratte Fab2	1:300 (IF)	Dianova (Hamburg)

### 2.1.6 KOMMERZIELLE REAKTIONSSYSTEME

BCA™ Reagenzlösungen .....	Pierce, Perbio Science (Bonn)
HRP-Detektionssystem .....	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Human T Cell Nucleofector™ Kit .....	Amaxa (Köln)
Lipofectamin 2000™ .....	Invitrogen (Karlsruhe)
Rac/RhoA Activity Assay, G-LISA™ .....	Cytoskeleton Inc., Denver, CO

### 2.1.7 SiRNAs

SiRNAs sind kurze, 19 Nukleotid lange, doppelsträngige RNA-Moleküle, welche zwei Nukleotide Überhang an den 5'-Enden haben. Diese Überhänge können aus Desoxynukleotiden bestehen. SiRNAs bewirken in eukaryontischen Zellen die spezifische Degradation einer komplementären mRNA. Dieser evolutionär konservierte Mechanismus wird als RNA-Interferenz bezeichnet und wird durch den sogenannten RISC-Enzymkomplex katalysiert. Die folgenden siRNAs wurden für den spezifischen „knock-down“ der Expression der bezeichneten Zielgene verwendet.

Die Synthese der mit „†“ gekennzeichnete siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Mit „‡“ gekennzeichneten siRNAs erfolgte durch die Firma Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Die iRNAs wurden mit 1 x siRNA-Puffer in einer Konzentration von 20

$\mu\text{M}$  gelöst. Die Ansätze wurden 1 min bei  $90^\circ\text{C}$  erhitzt und zur Hybridisierung der komplementären Stränge 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

ZIELGEN	BEZEICHNUNG	ZIELSEQUENZ DER CDNA
Luciferase	Luciferase ‡	5'-AA CTT ACG CTG AGT ACT TCG A TT-3'
Renilla	Renilla ‡	5'-AA AAA CAT GCA GAA AAT GCT G TT-3'
Cytohesin-1	754 ‡	5'-AA TGA CCT CAC TCA CAC TTT C TT-3'
CYTIP	474 ‡	5'-AA CGA TAG AGA CTC TTA ATG G AA-3'
RhoA	RhoA1†	5'-TAG GCT GTA ACT ACT TTA T AA-3
	RhoA2†	5'-TAC CTT ATA GTT ACT GTG T AA-3
Ezrin/Moesin	EM1†	5'-GGA ACA UCU CUU UCA AUG TT-3
	EM2†	5'-CCA UGG AUG CAG AGC UGG A TT-3

#### 5x siRNA Puffer

Kaliumacetat ..... 500mM  
 HEPES, pH 7,4..... 150mM  
 Magnesiumacetat..... 10mM

#### 2.1.8 SÄUGETIER-ZELLINIEN

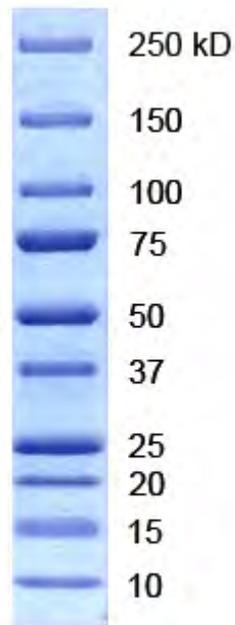
BEZEICHNUNG	ZELLTYP	REFERENZ
COS-7	Fibroblastenähnliche Affennierenzellen ( <i>African green monkey</i> ) mit integriertem replikationsdefektem SV40-Genom	[Gluzman, 1981]
Jurkat E6.1	Humane T-Zelllinie eines Patienten mit akuter Leukämie	[Weiss et al, 1984]

### 2.1.9 PROTEIN-INHIBITOREN

PEPTID	SEQUENZ
biotinyliertes dominant-negatives Rac1-TAT Peptid	YARAAARQARAGCPPPVKKRKRK
biotinyliertes dominant-negatives Rac1-TAT Kontrollpeptid	YARAAARQARAGRKKKCRPKPVP
dominant-negatives RhoA-Penetratin Peptid	RQIKIWFQNRRMKWKKGIVFSKDQFPEVYVPTVFE
Dominant-negatives RhoA-Penetratin Kontrollpeptid	RQIKIWFQNRRMKWKKGEPVSEVQVFTDIFPVYFK

### 2.1.10 PROTEINLÄNGENSTANDARD

Precision Plus Protein™ Standards, All blue, Biorad (München)



## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 EUKARYONTISCHE ZELLKULTUR

#### 2.2.1.1 KULTIVIERUNG VON SUSPENSIONSZELLEN

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 10 µg/ml Gentamicinsulfat in Zellkultur-Flaschen im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einem Titer von maximal 1 x 10<sup>6</sup>/ml kultiviert und jeden zweiten bis dritten Tag auf eine Dichte von 2 x 10<sup>5</sup>/ml mit frischem Kulturmedium verdünnt. Jede Charge wurde höchstens 40 mal passagiert.

#### 2.2.1.2 TRANSFEKTION VON SUSPENSIONSZELLEN

Die Transfektion von Suspensionszellen mit Plasmid-DNA oder siRNA erfolgte durch Elektroporation. Zur Transfektion von Jurkat-E6-Zellen wurden 1 – 1,5 x 10<sup>7</sup> Zellen in 400µl RPMI 1640/50 FCS mit 25 µg Plasmid-DNA gemischt. Die Zellen werden in 4 mm Elektroporationsküvetten gegeben und bei 240 Volt und 1500 µF elektroporiert. Anschließend werden die Zellen in 10 ml Kulturmedium überführt und bis zur Verwendung bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.1.3 PRÄPARATION HUMANER MONOZYTEN UND LYMPHOZYTEN (PBL) AUS PERIPHEREM BLUT

Die Isolation von Monozyten und Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) erfolgte aus Leukozyten angereicherten „buffy-coats“ gesunder Spender. *Buffy coats* (lat. *Crusta phlogistica*, der Leukozytenfilm) sind angereicherte Leukozytenfraktionen, die bei der Präparation von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut für Transfusionszwecke zurückbleiben. Aus dem Lymphozytenkonzentrat lassen sich die mononukleären Zellen des Blutes isolieren (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC). Die Gewinnung der PBMC-Fraktion erfolgt durch eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der die PBMCs mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (Dichte 1,077 g/ml) von den restlichen Blutzellen abgetrennt werden. Anschließend werden enthaltene Monozyten (ca. 40% der mononukleären Zellen) durch Adhäsion an Plastik depletiert.

Für die Dichtegradienten-Zentrifugation werden 10 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/l) in 50 ml-Zentrifugengefäße vorgelegt. Das Ficoll wird nun langsam mit 40 ml buffy-coat-Inhalt bzw. einer 1:1 Blut/PBS Mischung überschichtet. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation mit 800 x

g bei 18 – 20°C ohne Bremse, um eine Verwirbelung des Gradienten zu verhindern. Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich bei der Zentrifugation am Boden des Röhrchens, da sie eine höhere Dichte als das Ficoll besitzen. Mononukleäre Zellen und Blutplättchen wandern nicht in die Ficoll-Phase ein, da sie geringerer Dichte sind. Die mononukleären Zellen bilden bei der Zentrifugation eine sichtbare weiße Schicht auf der Ficoll-Phase aus (siehe Abbildung).

Die PBMC-Schicht wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Zentrifugengefäß überführt. Um enthaltene Blutplättchen und Erythrozyten abzutrennen, werden die Zellen 3 - 4 mal in einem Volumen von 50 ml mit PBS/2mM EDTA gewaschen. Die Zentrifugation der einzelnen Waschschrte erfolgt bei RT für 7 min mit 650 x g. Danach sollte der Überstand klar und das Zellpellet weiß erscheinen. Die so erhaltenen PBMC werden in VLE-RPMI 1640/10% (v/v) FCS/1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert, gezählt und im gleichen Medium auf einer Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Je 5 ml der Zellsuspension werden in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben. Während einer Inkubation für 2 h bei 37°C adhären die enthaltenen Monozyten auf dem Plastik. Anschließend werden nicht-adhärenente Zellen (PBL) abgenommen, in eine neue Zellkulturflasche überführt und bis zur Verwendung, maximal 3 Tage, bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.1.4 GENERIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN AUS MONOZYTEN**

Zu den über Adhärenz gewonnenen Monozyten wird nach den vier Waschrten in VLE-RPMI 1640/10% (v/v) FCS/1% Penicillin/Streptomycin mit 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml GM-CSF gegeben. Unter diesen Bedingungen differenzieren die Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen. Zwei Tage später wird die Hälfte des Mediums abgenommen und abzentrifugiert (200 x g, 7 min). Das Zellpellet wird in frischem Medium mit Zytokinen (20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml GM-CSF) resuspendiert und wieder auf die 6-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Drei bis vier weitere Tage später werden die Zellen entweder als unreife dendritische Zellen für einen Versuch verwendet oder für zwei Tage mit einem Reifungscocktail (1 µg/ml LPS + 50 ng/ml TNF-α) stimuliert, um reife dendritische Zellen zu erhalten.

### **2.2.1.5 ELEKTROPORATION DENDRITISCHER ZELLEN MIT siRNA**

Die Transfektion von dendritischen Zellen mit siRNA erfolgt durch Elektroporation, einer physikalischen Methode mit deren Hilfe DNA, RNA oder andere Makromoleküle in lebende Zellen eingebracht werden können. Die Elektroporation basiert auf der Beobachtung, dass die Durchlässigkeit von Biomembranen kurzfristig durch elektrische Pulse erhöht werden kann, ohne die Membranstrukturen nachhaltig zu zerstören. Dadurch kann ein kurzfristiger Stoffaustausch erfolgen. Am fünften oder sechsten Tag nach der Zellisolierung können unreife dendritische Zellen zur Elektroporation verwendet werden. Die Zellen werden hierzu zunächst in Falcons überführt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 7 min) und mit vorgewärmtem (37°C) PBS gewaschen. Pro Elektroporationsansatz werden  $4 \times 10^6$  Zellen benötigt. Die entsprechende Zellmenge wird abzentrifugiert (200 x g, 7 min) und anschließend in 100 µl vorgewärmtem (37°C) OptiMem pro Elektroporationsansatz aufgenommen. Die benötigte siRNA Menge wird in die Elektroporationsküvette (4 mm) vorgelegt. Anschließend werden die Zellen auf die siRNA gegeben. Nach 3-minütiger Inkubation werden die Zellen mit einem Square Wave-Protokoll bei 1000V, 0,5 ms und 2 Pulsen elektroporiert. Die Zellen werden dann in 5 ml Medium VLE-RPMI 1640/10% (v/v) FCS/1% Penicillin/Streptomycin mit 10 ng/ml IL-4 und 10 ng/ml GM-CSF mit überführt und weiter kultiviert. Zwei Tage nach Elektroporation werden die Zellen mit einem Reifungscocktail (1 µg/ml LPS + 50 ng/ml TNF- $\alpha$ ) stimuliert. Vier Tage nach der Elektroporation werden die transfizierten Zellen für funktionelle Versuche verwendet.

## **2.2.2 FUNKTIONALE ANALYSEN**

### **2.2.2.1 ADHÄSIONSTEST AUF ICAM-1 UND FIBRONEKTIN**

Zur Analyse von Zell-Adhäsion werden Zelladhäsionstests auf immobilisiertem ICAM-1 und Fibronectin in 96-Loch-Schalen durchgeführt.

#### **Beschichtung mit ICAM-1**

Ein anti-humaner-IgG Antikörper wird an das Plastik einer 96-Loch-Schale adsorbiert. Dieser bindet anschließend ein ICAM-1-Fc Fusionsprotein. Diese Anordnung gewährleistet die korrekte Orientierung des Fusionsproteins. Für die Beschichtung wird zunächst der Ziege-anti-human-IgG Antikörper mit 50 mM Tris/HCl, pH 9,5 auf eine Konzentration von 1,8 µg/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 50 µl pro Vertiefung in eine 96-Loch-Schale pipettiert. Nach 90-minütiger Inkubation bei RT werden die Vertiefungen zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf dem Plastik werden die Vertiefungen mit 100 µl PBS/1% (w/v) BSA befüllt und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C

inkubiert. Anschließend werden 100 µl eines ICAM-1-Fc-haltigen Kulturüberstands in die Vertiefungen gegeben und die Schale für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Der Kulturüberstand stammt von CV-1 Zellen, die nach Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus das ICAM-1-Fc Fusionsprotein überexprimieren und sezernieren.

#### **Beschichtung mit Fibronektin**

Die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte werden mit 50 µg/ml Fibronektin (Harbor Bio Products, Norwood, MA) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend werden sie 2 x mit PBS gewaschen und können für Adhäsionstests genutzt werden.

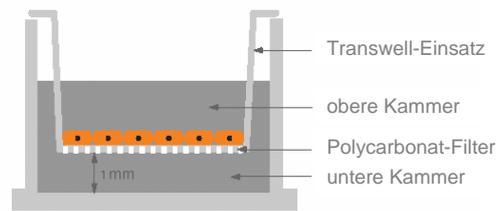
#### **Adhäsionstest**

Die Zellen werden in Kulturmedium mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 mit einer Endkonzentration von 12 µg/ml für 30 min bei 37°C markiert. Anschließend werden sie einmal mit HBSS gewaschen und in HBSS resuspendiert. Pro Ansatz werden  $5 \times 10^4$  Zellen verwendet, wobei pro Ansatz drei Vergleichswerte analysiert werden. Die ICAM-1 beschichteten Vertiefungen werden zweimal mit HBSS gewaschen und mit 100 µl der Zellsuspensionen befüllt. Die Zellen werden mit 50ng/ml PMA, 5µg/ml MEM48 oder 5µg/ml KIM185 stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Zellen werden nun zur Adhäsion für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden nicht adhärierende Zellen durch vorsichtiges Waschen der Vertiefungen mit 37°C warmem HBSS entfernt. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgt durch Messung der Fluoreszenz-Emission bei 485 nm mit einer Anregung bei 360 nm. Als 100%-Referenz dient der Messwert der eingesetzten Zellen.

#### **2.2.2.2 TRANSWELL-MIGRATIONSTEST**

Im Transwell-Migrationstest wird die Fähigkeit von Zellen untersucht, durch eine poröse Membran in Richtung eines Chemokin-Gradienten zu wandern. Der Migrationstest wird in modifizierten Transwell-Boyden-Kammern durchgeführt (Abb. 2.1). Die Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine poröse Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 5 µm getrennt sind. Es werden pro Ansatz  $1,5 \times 10^5$  Zellen verwendet, welche in VLE-RPMI 1640/0,5% FCS aufgenommen. 300 µl der Zellsuspension werden in das obere Kompartiment einer Kammer überführt. Das untere Kompartiment ist mit 700 µl des gleichen Mediums befüllt. Während einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C setzen sich die Zellen auf der Membran ab. Anschließend wird der Einsatz in 700 µl VLE-RPMI 1640/0,5% FCS mit 200ng/ml CCL19 bzw. 200 ng/ml CXCL12 umgesetzt. Als Kontrolle dient je ein Ansatz mit Medium ohne Chemokin. Die Kammern werden nun für 4 h bei 37°C inkubiert, währenddessen die Zellen durch die poröse Membran transmigrieren. Nach dieser Inkubationszeit werden die Einsätze aus den Kammern entfernt und die transmigrierten Zellen

in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Migrationsrate wird prozentual zur eingesetzten Zellzahl ausgewertet.



**Abb. 2.1 Modifizierte Boyden-Kammer.** Die modifizierte Boyden-Kammer besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Die obere Kammer wird durch einen Transwell-Einsatz gebildet, welcher in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte eingesetzt wird. Am Boden des Einsatzes befindet sich ein Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 5 µm. Die untere Kammer enthält Hungermedium mit dem entsprechenden Chemokin.

### 2.2.2.3 MIGRATION REIFER MODC AUF EINEM 2-DIMENSIONALEM SUBSTRAT

Die optische Analyse von lebenden Zellen erfolgt in IBIDI-Kammern (Abb. 2.2). In dem Kanal zwischen den beiden Reservoiren, lassen sich Zellen leicht kultivieren und über einen langen Zeitraum beobachten. Der Kanal wird hierzu zunächst über Nacht entweder mit 30 ng/ml bovinem Kollagen I (Pure Col, Inamed) oder mit 50 µg/ml Fibronectin (Harbor Bio Products, Norwood, MA) beschichtet und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.  $1 \times 10^5$  Zellen werden in 100 µl VLE-RPMI 1640/0,5% FCS aufgenommen und vorsichtig in den Kanal ausgesät. Der Kanal wird hierzu leicht gekippt. Das überschüssige Medium wird an der gegenüberliegenden Seite des Kanals abgenommen. In die beiden Reservoirs werden je 500 µl Hungermedium gegeben, um ein Austrocknen des Kanals zu verhindern.



**Abb. 2.2 IBIDI-Kammer.** IBIDI-Kammern haben die Größe eines Objektträgers und bestehen aus mikroskopierbarem Plastik. In dem Kanal zwischen den beiden Reservoiren lassen sich Zellen leicht kultivieren und längere Zeit beobachten. Das Volumen des Kanals umfasst 100 µl. (Quelle: ibidi-GmbH (München))

Es folgt eine 60-minütige Inkubation im Brutschrank. In dieser Zeit adhären die Zellen am Boden des Kanals. Anschließend wird an einer Seite 1 µg/ml CCL19 in VLE-RPMI 1640/0,5% FCS hinzugegeben und die Migration der Zellen im Nikon TE Eclipse analysiert. Hierzu

---

werden jede Minute über einen Zeitraum von 2 Stunden Phasenkontrastaufnahmen erstellt, die später zu einem Film zusammengestellt werden.

#### **2.2.2.4 MIGRATION REIFER MODC INNERHALB EINES 3-DIMENSIONALEN KOLLAGEN-GELES**

Um die Migration von Zellen innerhalb eines Gewebes zu untersuchen, werden Migrationsexperimente in einem 3-dimensionalen Kollagen-Gel durchgeführt. Hierzu werden in die bereits erwähnte IBIDI-Kammer (siehe 2.2.2.3) bovines Kollagen I in einer Konzentration von 4,5 mg/ml zusammen mit  $1,5 \times 10^5$  der zu untersuchenden Zellen gegeben und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit polymerisiert das Kollagen zu einem 3-dimensionalen Gerüst. Anschließend wird an einer Seite der Kammer 1  $\mu\text{g/ml}$  CCL19 in VLE-RPMI 1640/0,5% hinzugegeben und die Migration der Zellen im Nikon TE Eclipse analysiert. Hierzu werden alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 5 Stunden Phasenkontrastaufnahmen erstellt, die später zu einem Film zusammengestellt werden.

### **2.2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN**

#### **2.2.3.1 IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE**

Zur mikroskopischen Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen werden Immunfluoreszenz-Markierungen fixierter Zellen durchgeführt. Dazu werden Deckgläschen (15 mm) mit Fibronectin ( $5\mu\text{g/cm}^2$ ) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  beschichtet und anschließend 2 mal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit HBSS gewaschen und in Hungermedium (VLE-RPMI 1640/0,5% FCS) auf den Deckgläschen ausgesät und für ca. 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Adhäsion inkubiert. Anschließend wird das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen für 10 Minuten bei  $-20^\circ\text{C}$  mit Aceton fixiert. Aceton permeabilisiert zusätzlich die Membran, so dass anschließend die Zellen mit PBS gewaschen werden und 1 Stunde mit einem entsprechenden Antikörper bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Danach werden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und mit einem entsprechenden sekundärem Antikörper für 1 Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gewaschen und luftblasenfrei auf ein mit Gelmount/50mg/ml Dabco bedeckten Objektträger gegeben. Die eingedeckelten Proben werden bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Analyse der Präparate erfolgte im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (FV-1000, Olympus).

### 2.2.3.2 MARKIERUNGEN FILAMENTÖSEN AKTINS MIT PHALLOIDIN

Die Markierung von filamentärem Aktin (F-Aktin) erfolgt mit Phalloidin, dem Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, welches spezifisch an F-Aktin bindet. Durch den an Phalloidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin kann filamentäres F-Aktin unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Hierzu werden Deckgläschen (15 mm) mit Ethanol abgeflammt und für 1 Stunde mit Fibronectin (5 µg/cm<sup>2</sup>) beschichtet. Anschließend werden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Dann werden die Zellen auf den Deckgläschen ausgesät und für ca. 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit adhären die Zellen auf dem Fibronectin und können anschließend mit 4% PFA/PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert werden. Anschließend wird zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 0,1%igem Triton X-100 permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschrissen mit PBS werden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin (1:200) für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wird zweimal mit PBS und einmal mit Aqua bidest gewaschen. Die Proben werden in Gel Mount (+50mg/ml DABCO) eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Die Markierung von F-Aktin in Zellen, welche zuvor in einer 3-dimensionalen Kollagen-Matrix migriert sind, wird genauso durchgeführt. Hier muß jeder Schritt sehr vorsichtig durchgeführt werden, um das Kollagen-Gel nicht zu zerstören. Zusätzlich werden die Zellen nicht eingedeckelt, sondern unmittelbar nach der Markierung im konfokalen Laserscanning-Mikroskop (FV-1000, Olympus) analysiert.

### 2.2.3.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können auf Einzelzellebene Expressionsanalysen von Oberflächenantigenen oder intrazellulären Proteinen durchgeführt werden. Hierbei kann zwischen verschiedenen Zellpopulationen unterschieden werden. Die Zellen werden einzeln mit einem Laser bestrahlt und das abgelenkte Licht bzw. die emittierte Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen analysiert. Auf diese Weise sind Aussagen über Größe und Granularität der analysierten Zellen, über den Anteil fluoreszierender Zellen in einer Population und anhand der Fluoreszenz-Intensität über die Expressionsstärke des analysierten Proteins möglich.

Um Endozytose gebundener Antikörper zu vermeiden, werden alle Schritte auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt.  $1 \times 10^5$  Zellen werden mit PBS gewaschen und in 100µl PBS/1% BSA gegeben, welches eine 1:200 Verdünnung des entsprechenden Antikörpers enthält. Die Zellen werden 20 Minuten auf Eis inkubiert, zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 100µl PBS/1% BSA mit einer 1:200 Verdünnung des entsprechenden sekundären Fluorochromgekoppelten Antikörpers gegeben und auf Eis sowie im Dunklen für 20 Minuten inkubiert.

Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für die Messung in PBS aufgenommen.

Die monoklonalen Antikörper 327C und mAB24 erkennen spezifisch induzierbare Konformationen der CD18 I-ähnlichen Domäne, die mit hoher (327C) bzw. mittlerer (mAB24) Affinität für lösliches ICAM-1 korreliert. Die Markierung des induzierbaren Aktivierungsepitops durch den 327C-Antikörper weicht von vorstehendem Standard-Protokoll ab. Die Induktion des 327-Epitops ist abhängig von divalenten Kationen. Daher wurden alle Markierungs- und Wasch-Schritte in HBSS / 10 mM Hepes, pH 7,4 / 2% BSA (w/v) durchgeführt. Die Zellen werden für 30 Sekunden mit CCL19 und/oder CXCL12 in diesem Medium stimuliert, 327C bzw. mAB24 (beide 10 µg/ml final) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 37°C. Anschließend werden die Zellen mit 4% PFA/PPBS für 10 Minuten bei RT fixiert und mit PBS/2% Glycin (w/v) für 10 Minuten bei RT inkubiert, um überschüssiges PFA abreagieren zu lassen. Anschließend wurde die Markierung mit dem sekundären Antikörper und die Messung wie oben beschrieben durchgeführt.

## **2.2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN**

### **2.2.4.1 HERSTELLUNG VON GESAMTZELL-LYSATEN**

Aufgrund der hohen Aktivität zellulärer Phosphatasen ist eine schnelle Lyse von Zelle für die Untersuchung von Proteinphosphorylierungen erforderlich. Für die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung wurden die Zellen unmittelbar nach 10-minütiger Stimulation mit 5 µg/ml KIM185 bzw. für 30 Sekunden Stimulation mit 1 µg/ml CCL19 oder 1 µg/ml CXCL12 bei RT in 5µl 6 x Probenpuffer und 25 µl PBS aufgenommen. Die Proben wurden lysiert, für 5 Minuten bei 99°C gekocht und anschließend auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

### **2.2.4.2 DETERGENZ-BASIERTE ZELL-LYSE**

Die Zellen werden gewaschen und anschließend mit Igepal-Lysepuffer, welcher mit Proteaseinhibitoren versetzt ist für 30 Minuten auf Eis lysiert. Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C trennt Kerne und nicht lysierte Zellen ab. Der Überstand wird einer Proteinbestimmung unterzogen sowie gleiche Proteinmengen mit 6 x Probenpuffer versetzt und in der SDS-PAGE aufgetrennt

**Igepal-Lysepuffer**

10 mM HEPES, pH 7,5

10 mM KCL

10 mM MgCL

150 mM NaCL

1 % Igepal

**Proteaseinhibitoren**

Antipain..... 20 µg/ml

Aprotinin ..... 10 µg/ml

Benzamidin ..... 20 µg/ml

Leupeptin..... 10 µg/ml

PMSF ..... 1:1000 aus einer gesättigten Lösung

**2.2.4.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten erfolgt durch einen BCATest. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Biuret-Reaktion und besteht in der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ , welche durch die Peptidbindungen der Proteine unter alkalischen Bedingungen induziert wird. Reduzierte Kupfer-Ionen bilden mit Bicinchonin-Säure (BCA) einen farbigen, wasserlöslichen Chelatkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen wird. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden 3 µl Zellysat (siehe 2.2.14) mit 200 µl BCA-Reagenz in einer 96-Loch-Platte für 30 min bei 37°C oder für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Als Referenzprotein wird Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

**2.2.4.4 IMMUNPRÄZIPITATION**

Um ein spezifisches Protein aus Gesamtzell-Lysaten zu isolieren, wird die Methode der Immunpräzipitation angewendet. Hierfür wird dem Lysat zunächst ein, für das zu analysierende Protein oder einen Fusionsanteil, spezifischer Antikörper zugefügt. Der Antikörper-Antigen-Komplex wird anschließend mittels, an Sepharose-Kügelchen gekoppeltes Protein A oder G immobilisiert. Für die Präzipitation mit Antikörpern aus Ratte, Maus oder Ziege wird Protein G-Sepharose verwendet. Kaninchen-Antikörper werden mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Zu 500 µl Zellysat werden 300 µl 7H2-Hybridoma-Überstand. Der Ansatz wird für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. 40 µl einer etwa 50%-igen Aufschlammung, mit PBS äquilibrierter Protein G-Sepharose-Kügelchen werden zugefügt und der Ansatz wird für eine weitere Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss werden die Sepharose-Kügelchen 2 Minuten

mit 900 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, 3 x mit 1 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen, mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 C gekocht. Hierbei werden die präzipitierten Proteine von der Sepharose gelöst und können weiter analysiert werden.

#### 2.2.4.5 SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) können Proteinen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteine werden hiefür in SDS-haltigem Probenpuffer aufgekoht. Die Bindung des stark anionischen Detergenz SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine sowie die Maskierung ihrer Eigenladung, wobei die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS/Protein-Komplexe in einem Polyacrylamidgel allein abhängig von ihrem Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach Lämmli mit 10%-igem Trenn- und 5%-igem Sammelgel verwendet. Durch das niedrigprozentige Sammelgel mit leicht saurem pH wird eine Fokussierung der Proteine vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel erreicht, wodurch schärfere Banden entstehen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 120 Volt.

##### Sammelgel 5 %

A. bidest. ....	2,05 ml
1 M Tris/HCl (pH 6,8) ....	375 Öl
10% SDS ....	30 Öl
10% APS ....	30 Öl
TEMED ....	3 Öl
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix ....	0,5 ml

##### 10%iges Trenngel

A. bidest. ....	2 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,8) ....	1,25 ml
10% SDS ....	50 Öl
10% APS ....	50 Öl
TEMED ....	2 Öl
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix ....	1,515 ml

**Lämmli-Puffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1% SDS /w/v)  
Ad 1 l A. bidest.

**2.2.4.6 WESTERN-BLOT**

Durch einen Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran, können Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Hierzu wurde das Nassblot-Verfahren angewendet. Dazu werden zwei poröse Schwämme, 6 Filterpapiere, das Polyacrylamid-Gel und die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt. Darufhin werden drei Filterpapiere, die Membran, das zu blottende Gel, die übrigen drei Filterpapiere und das zweite Schwämmchen in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinander gelegt. Diese werden in eine mit Transferpuffer gefüllte Naßblotkammer gegeben, so dass die Membran auf der Seite der Anode kommt. Der Transfer erfolgt bei konstanter Spannung von 80 V über zwei Stunden. Währenddessen wandern die negativ geladenen Proteine bzw. Protein-SDS-Komplexe aus dem Gel in Richtung Anode zur Membran.

**Transferpuffer**

192 mM Glycin  
25 mM Tris-Base  
20 % Methanol  
0,002 % SDS

**2.2.4.7 IMMUNMARKIERUNG VON WESTERN-BLOTS**

Freie Bindungsstellen der Membran werden zunächst abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindung bei der Immundetektion zu verhindern. Hierfür wird die Membran für 1 h oder über Nacht in 10 ml TBST mit 2% bis 5 % (w/v) Milchpulver geschwenkt. Zum spezifischen Nachweis eines Proteins auf der Membran wird diese nach der Blockade mit einem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Der primäre Antikörper wird mit 10 ml TBST auf die vom Hersteller empfohlene Konzentration verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt für 2 h unter leichtem Schwenken bei RT. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen mit TBST, wird die Membran für 1 h in 10 ml einer 1:5000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wird die Membran 3 mal für 15 min mit TBST gewaschen, einmal kurz mit TBS gespült und für ca. 1 min in 2 ml einer 1:1-Mischung der

ECL-Lösungen 1 und 2 inkubiert. Durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol entsteht Chemolumineszenz, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann.

#### **TBS**

Tris/HCL, pH 7,5 ..... 50mM  
NaCL ..... 140 mM

#### **TBST**

Tween-20 in TBS .....0,05% (v/v)

#### **2.2.4.8 ,STRIPPING' VON WESTERN-BLOTS**

Um Antikörper von einer immunmarkierten Nitrozellulosemembran zu entfernen, wird diese für 20 min in „*Stripping*“-Puffer (55°C) auf der Wippe geschwenkt. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit TBST gewaschen, um den ,Stripping'-Puffer zu entfernen. Vor der erneuten Immunmarkierung wird die Membran mit 2% bis 5% Milchpulver in TBST über Nacht bei 4°C geblockt. Am folgenden Tag kann dann die Membran mit einem anderen Antikörper markiert werden.

#### **,Stripping'-Puffer**

SDS .....2% (w/v)  
Tris/HCl pH 6,7..... 62,5 mM  
2-Mercaptoethanol ..... 100 mM

#### **2.2.5 ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNG**

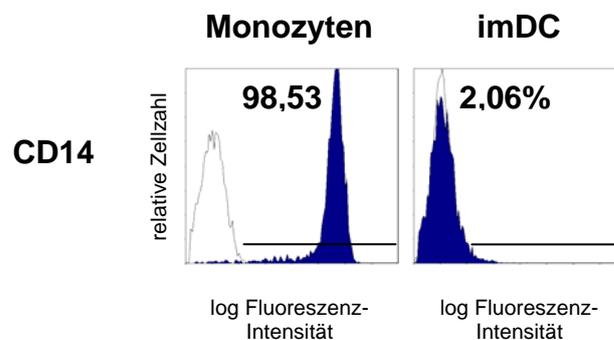
Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Word 2003 (Microsoft) erstellt. Quellenverweise wurden mit EndnoteX eingefügt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Photoshop 7.0 (Adobe). Schemata wurden mit PowerPoint 2003 (Microsoft) angefertigt. Für Tabellenkalkulationen und die Erstellung von Diagrammen wurde Excel 2003 (Microsoft) verwendet. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Expo32 Analysis, Beckmann Coulter.

## 1 ERGEBNISSE

### 1.1 GENERIERUNG HUMANER DENDRITISCHER ZELLEN AUS MONOZYTEN (MODC)

Sallusto *et al.* zeigten 1994, dass humane Monozyten *in vitro* in Gegenwart der Zytokine IL-4 und GM-CSF zu myeloiden dendritischen Zellen differenzieren (Sallusto und Lanzavecchia 1994). Diese Methode der DC-Generierung ist sehr effektiv und hat die Untersuchung dieses Zelltypes seither entscheidend vereinfacht.

Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus „buffy coats“ (Lymphozytenpräparat, welches nach Zentrifugation von Vollblut entsteht) gesunder Spender isoliert. Monozyten werden anschließend durch Adhäsion an Plastik separiert und in Medium kultiviert, welches IL-4 und GM-CSF enthält. IL-4 unterdrückt die Differenzierung der Monozyten zu Macrophagen. Innerhalb von 5 bis 7 Tagen entwickeln sich Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (*immature DC*, imDC). Sie werden als ‚monocyte-derived dendritic cells‘, kurz MoDC, bezeichnet.



**Abb. 3.1 Expression des myeloiden Oberflächenmarkers CD14 auf Monozyten und imDC.** In einer FACS-Analyse kann die Expression des LPS-Rezeptors CD14 nachgewiesen werden. Die Expression von CD14 auf Monozyten wird während der Differenzierung der Zellen zu immaturren DC (imDC) eingestellt.

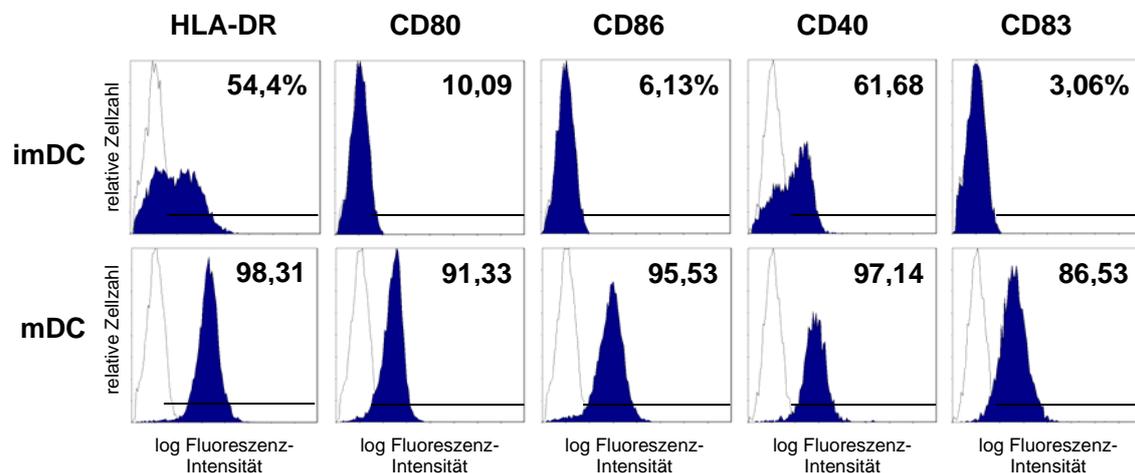
Dieser Differenzierungsprozess wird anhand der Expression des myeloiden Oberflächenmarkers CD14 nachgewiesen. Monozyten weisen eine hohe CD14 Expression auf (Abb. 3.1). CD14 ist der Rezeptor für das bakterielle *Lipopolysaccharid* (LPS), der Hauptbestandteil der Zellwand

gram-negativer Bakterien. Im Plasma bindet LPS an das *LPS-binde-Protein* (LBP). CD14 bindet diesen Komplex aus LPS und LBP und übergibt es an den *Toll-like Rezeptor 4* (TLR4), einen Plasmamembran-Signal-Rezeptor, welcher letztendlich die Aktivierung der Monozyten und damit die Synthese inflammatorischer Zytokine auslöst (Guha und Mackman 2001). Während der Entwicklung der Monozyten zu imDC wird die Expression von CD14 eingestellt (Abb. 3.1).

## 1.2 PHÄNOTYPISIERUNG UNREIFER UND REIFER MoDC

### 1.2.1 EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMARKERN AUF UNREIFEN UND REIFEN MoDC

Entscheidend für das Verständnis der DC Funktion war die Entdeckung, dass DC in zwei Reifungsstadien vorliegen. Demnach residieren unreife imDC in nicht-lymphoiden Geweben, wo sie kontinuierlich Antigene endozytieren und prozessieren. Aufnahme pathogener Antigene aktiviert DC zur Migration, so dass sie das nicht-lymphoide Gewebe verlassen und zum nächstgelegenen Lymphknoten wandern. Diesen erreichen sie als reife DC (*mature DC*, mDC), die keine endozytotische Aktivität mehr aufweisen. Zusätzlich steigt die Expression von MHC- und co-stimulatorischen Molekülen stark an. Die Einteilung in nacheinander geschaltete Reifungsstadien ermöglicht die Ausübung der Funktion als Antigen-Prozessoren und T-Zell-Aktivatoren (Sallusto und Lanzavecchia 1994).



**Abb. 3.2 Maturierung humaner MoDC.** Die Expression von Reifungsmarkern auf der Oberfläche der DC kann mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Die Expression des MHC-II Moleküls HLA-DR, der co-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, sowie von CD83 steigt während der Maturierung an. Diese Oberflächenmoleküle sind unerlässlich für eine Aktivierung von T-Zellen durch mDC.

Die Maturierung von DC kann im Labor mit Hilfe inflammatorischer Zytokine induziert werden. Ein Maturierungscocktail, bestehend aus 50 ng/ml TNF- $\alpha$  und 1  $\mu$ g/ml LPS, wurde zur Reifung der generierten MoDC genutzt. Nach 24 bis 48 Stunden kann die Reifung anhand verschiedener Marker geprüft werden, deren Expressionsgrad auf der Zelloberfläche unreifer und reifer DC, entsprechend ihrer Funktion, unterschiedlich ist (Abb. 3.2).

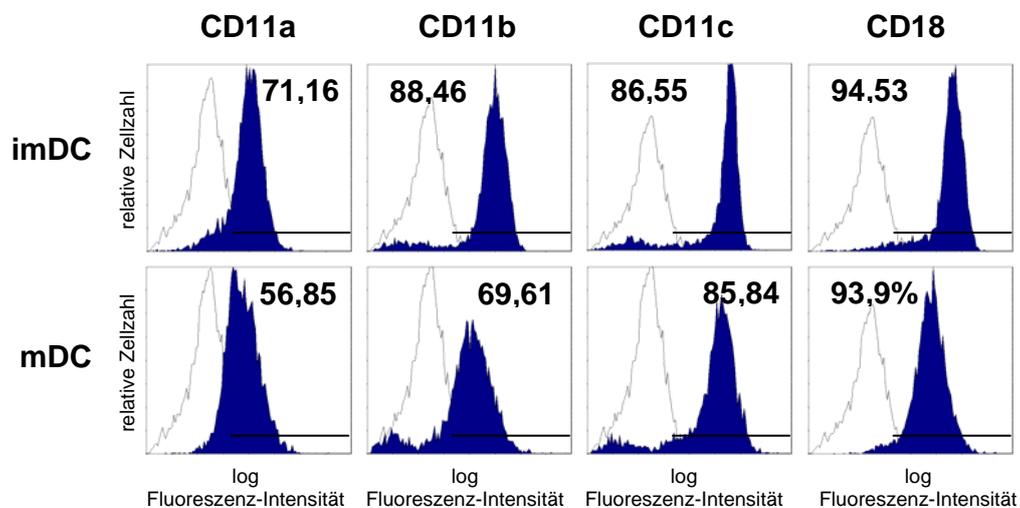
Da unreife DC kontinuierlich auch körpereigene Antigene prozessieren und präsentieren, exprimieren sie bereits 54,4% des MHC-II Molekül HLA-DR. Dessen Expression steigt während der Reifung auf 98,31% an (Abb. 3.2) und erhöht somit die Antigen-präsentierende Funktion der DC. Auch die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, sowie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) werden während der DC-Reifung erhöht. CD40 ist zu 61,68% auf imDC und zu 97,14% auf mDC nachzuweisen (Abb. 3.2). CD40 wird konstitutiv auf nicht aktivierten oder unreifen APCs exprimiert. Die Bindung an seinen Liganden CD40-L erhöht die stimulatorische Kapazität der APC, indem die Expression von MHC-Molekülen, sowie CD80, CD86 und CD54 erhöht wird. Dieser wichtige co-stimulatorische Signalweg in der Aktivierung von T-Zellen kann durch Stimulation der DC mit LPS ersetzt werden (Haase *et al.* 2004). Die Expression der Co-Stimulatoren CD80 und CD86, beides Liganden für CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen (siehe 1.2.3), steigt während der Reifung der DC von 10,09% auf 91,33% bzw. von 6,13% auf 95,53% an (Abb. 3.2). CD83 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker reifer DC (Lechmann *et al.* 2002). Die Expression von CD83 steigt von 3,06% auf imDC auf 86,53% auf mDC an (Abb. 3.2) Eine Funktion von CD83 war zunächst nicht bekannt. Mittlerweile wurde ein Einfluß von CD83 in der T-Zell-Aktivierung und der Entwicklung von Thymozyten nachgewiesen (Prechtel und Steinkasserer 2007).

### **1.2.2 DIE EXPRESSION VON $\beta_2$ -INTEGRINEN AUF UNREIFEN UND REIFEN MoDC**

Integrine sind eine Familie heterodimerer Adhäsionsmoleküle, die aus einer  $\alpha$ - und einer nicht kovalent assoziierten  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Sie vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und sind daher unerlässlich für das 'homing' von Leukozyten oder für die Initiierung einer Immunantwort (van Kooyk und Figdor 2000). Inwieweit Integrine für die Migration von Leukozyten innerhalb eines Gewebes notwendig sind, ist umstritten (Friedl *et al.* 1998). Die  $\beta_2$ -Integrine sind die am stärksten vertretene Gruppe auf Leukozyten. Eines der wichtigsten Leukozyten-Integrine ist LFA-1 (*leucocyte-function-associated-antigen-1*), ein Heterodimer aus CD18 und CD11a. In einer FACS-Analyse wurde die Expression von CD18 und der  $\alpha$ -Ketten CD11a (LFA-1,  $\alpha_L\beta_2$ ), CD11b (Mac-1,  $\alpha_M\beta_2$ ) und CD11c (CR4,  $\alpha_X\beta_2$ ) auf unreifen und reifen DC untersucht.

Abb. 3.3 zeigt die in der FACS-Analyse ermittelten Expressionen der Integrin-Untereinheiten auf unreifen und reifen DC. Auf unreifen DC ist die Expression der Integrin-Untereinheiten bereits relativ hoch. Während der Reifung sinkt die Expression von CD11a und CD11b - LFA-1 und Mac-1 - während die Expression von CD11c und CD18 - CR4 - weitestgehend konstant bleibt.

Die Expression von CD11a zeigt bei verschiedenen Spendern eine stark variierende Expressionstärke zwischen 10% und 70% (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der Expressionstärke sinkt die CD11a Expression jedoch grundsätzlich im Laufe der DC Maturierung.

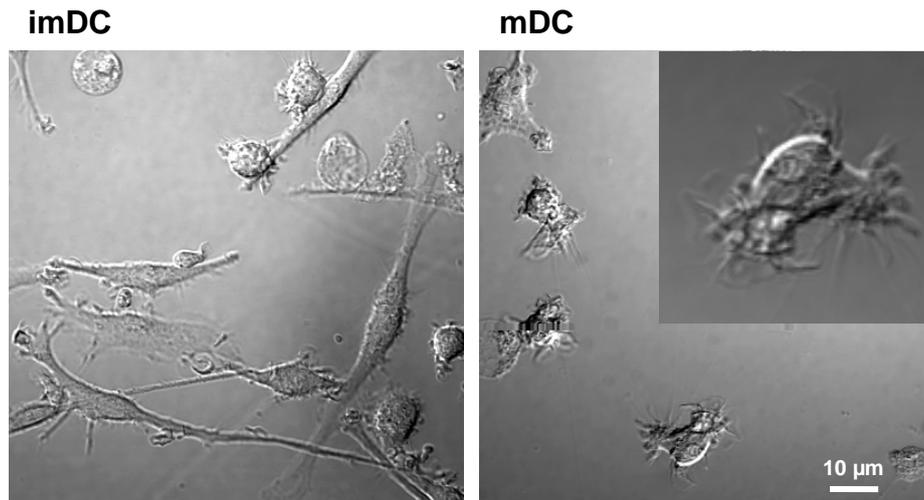


**Abb. 3.3 Expression der Integrin-Untereinheit CD18 und der  $\alpha$ -Ketten CD11a, b und c.** In einer FACS-Analyse wurde die Expression der  $\beta_2$  Kette CD18 und der  $\alpha$ -Ketten CD11a, CD11b und CD11c untersucht. Alle Integrin-Untereinheiten und damit LFA-1, Mac-1 und CR4 werden auf unreifen DC stark exprimiert. Die Expression von CD11c und CD18 - CR4 - ändert sich nicht im Laufe der Reifung der Zellen mit TNF- $\alpha$  und LPS, sinkt jedoch bei CD11a - LFA-1 - und CD11b - Mac-1.

### 1.2.3 DIE MORPHOLOGIE UNREIFER UND REIFER MoDC

DC zeigen hinsichtlich ihrer Morphologie ein sehr heterogenes Erscheinungsbild (Abb. 3.4). Auf Fibronectin zeigen unreife DC die typische ausgespreitete, dendritische Morphologie mit langgestreckten Zellausläufern. Relativ zu reifen MoDC sind sie stärker adhärent und weniger motil.

Im Laufe der Reifung, hier mit TNF- $\alpha$  und LPS induziert, ziehen sich die Ausläufer zurück und die Zellen zeigen eine runde Morphologie mit breitflächigen, fächerartigen Lamellipodien. Die Zellen sind kaum adhärent und sehr motil.

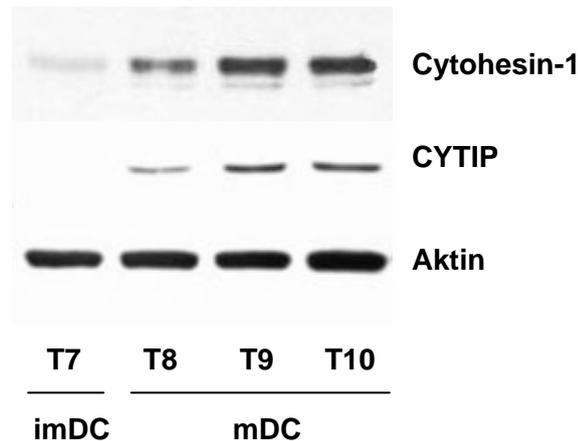


**Abb. 3.4** Differenzial-Interferenz-Kontrast-(DIC)-Aufnahmen von imDC und mDC auf Fibronektin. ImDC zeigen eine typisch dendritische Morphologie mit langen Zellausläufern. Während der Reifung der Zellen ziehen sich die Zellausläufer zurück. Die Zellen zeigen ein rundes Erscheinungsbild mit breiten, fächerartigen Lamellipodien und werden sehr motil.

### 1.3 DIE EXPRESSION DER PROTEINE CYTOHESIN-1 UND CYTIP WIRD WÄHREND DER REIFUNG HUMANER MoDC INDUZIERT

Die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP werden hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und sind an der Regulation der Adhäsion von Leukozyten beteiligt. So aktiviert die Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat-Zellen, vermutlich über eine Bindung an die zytoplasmatische Domäne von CD18, die Adhäsion an ICAM-1 (Geiger *et al.* 2000; Kolanus *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu inhibiert überexprimiertes CYTIP in Jurkat-Zellen die Adhäsion an ICAM-1. Es wird angenommen, dass CYTIP, über die Bindung an Cytohesin-1, eine Membranlokalisation von Cytohesin-1 und damit eine Interaktion mit CD18 verhindert (Boehm *et al.* 2003). Außerdem ist bekannt, dass die Zytokine IL-2 und IL12 in PBLs die Expression von CYTIP induzieren (Tang *et al.* 2002). Genauso konnte ein Anstieg der Expression von Cytohesin-1 und CYTIP während der Reifung humaner DC durch Monozyten-konditioniertes Medium nachgewiesen werden (Boehm *et al.* 2003).

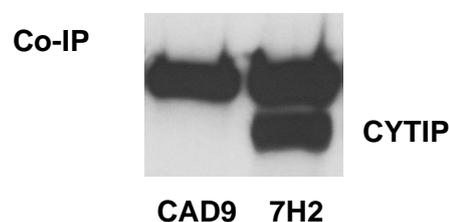
Die Zunahme der Cytohesin-1 und CYTIP Protein-Expression konnte ebenfalls nach Maturierung humaner MoDC mit LPS und TNF- $\alpha$  im Western Blot gezeigt werden (Abb. 3.5). Unreife, 7 Tage alte DC exprimieren kaum nachweisbare Mengen CYTIP und nur wenig Cytohesin-1 (Abb. 3.5, T7, erste Bande). Die Expression beider Proteine steigt nach Zugabe der Reifungsstimuli LPS und TNF- $\alpha$  innerhalb von 48 Stunden kontinuierlich an und bleibt auch 72 Stunden nach Zugabe der Reifungsstimuli konstant (Abb. 3.5, T8, T9, T10, Banden 2 bis 4). Aktin diente als Ladekontrolle.



**Abb. 3.5 Anstieg der Cytohesin-1 und CYTIP Expression während der Reifung humaner MoDC.** Unreife, 7 Tage alte DC (T7) exprimieren nur wenig Cytohesin-1 und CYTIP. Zugabe von LPS und TNF- $\alpha$  induziert die Maturierung der Zellen und parallel einen Anstieg beider Proteine innerhalb von 24 Stunden (Tag 8, T8) und 48 Stunden (Tag 9, T9). 72 Stunden nach erfolgter Reifung (Tag 10, T10) bleibt die Proteinkonzentration konstant. Aktin diente als Ladekontrolle. T: Tag

### 1.3.1 INTERAKTION VON ENDOGENEM CYTIP UND CYTOHESIN-1

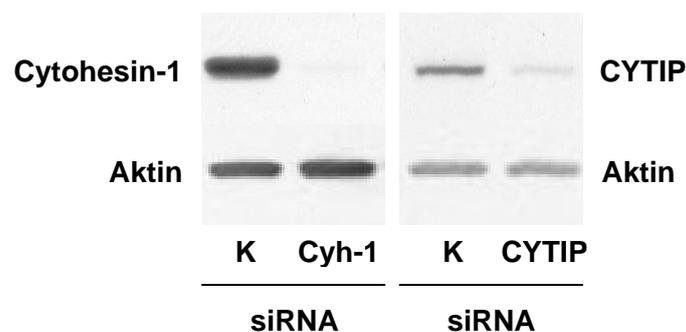
Bereits T. Böhm konnte eine Interaktion zwischen endogenem CYTIP und Cytohesin-1 in Jurkat-, LCL-721-Zellen und PBMC (*periphere Blut-Mononukleäre Zellen*) in einer Co-Immunpräzipitation nachweisen (Boehm *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte die Assoziation beider Proteine in reifen DC bestätigt werden. Cytohesin-1 wurde im Totalzelllysat reifer dendritischer Zellen mit dem Antikörper 7H2 immunopräzipitiert und co-präzipitiertes CYTIP in der Western Blot-Analyse mit dem Antikörper 2F9 detektiert (Abb. 3.6). Der Antikörper CAD9 diente als unspezifische Isotypkontrolle.



**Abb. 3.6 Interaktionsnachweis zwischen endogenem Cytohesin-1 und CYTIP.** Aus Totalzelllysaten wurde endogenes Cytohesin-1 mit dem Antikörper 7H2 immunopräzipitiert und endogenes CYTIP mit dem Antikörper 2F9 in der Western Blot-Analyse detektiert. Als unspezifische Isotypkontrolle wurde der Antikörper CAD9 verwendet.

#### 1.4 DIE PROTEIN-EXPRESSION VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP KANN MIT HILFE DER RNA-INTERFERENZ IN REIFEN MODC REDUZIERT WERDEN

Mit Hilfe der RNA-Interferenz kann die Expression von Genen Sequenz-spezifisch inhibiert und ihre Funktion untersucht werden (Elbashir *et al.* 2002). Hierfür müssen die 21 bis 23 Nukleotid langen, sogenannten 'short interfering RNAs' (siRNAs) in die Zelle transfiziert werden. Die Transfektion von DC ist, wie für Primärzellen üblich, nicht unproblematisch und konnte lange Zeit nur mit Virus-basierten Transduktionsmethoden durchgeführt werden (Mitchell und Nair 2000). Die Transfektion von DNA in DC über nicht-virale Methoden ist immer noch limitiert (Hill *et al.* 2003), wohingegen für die Transfektion von RNA mittlerweile verschiedene Lipid- und Elektroporations-basierte Methoden zur Verfügung stehen (Laderach *et al.* 2003; Zeis *et al.* 2003).



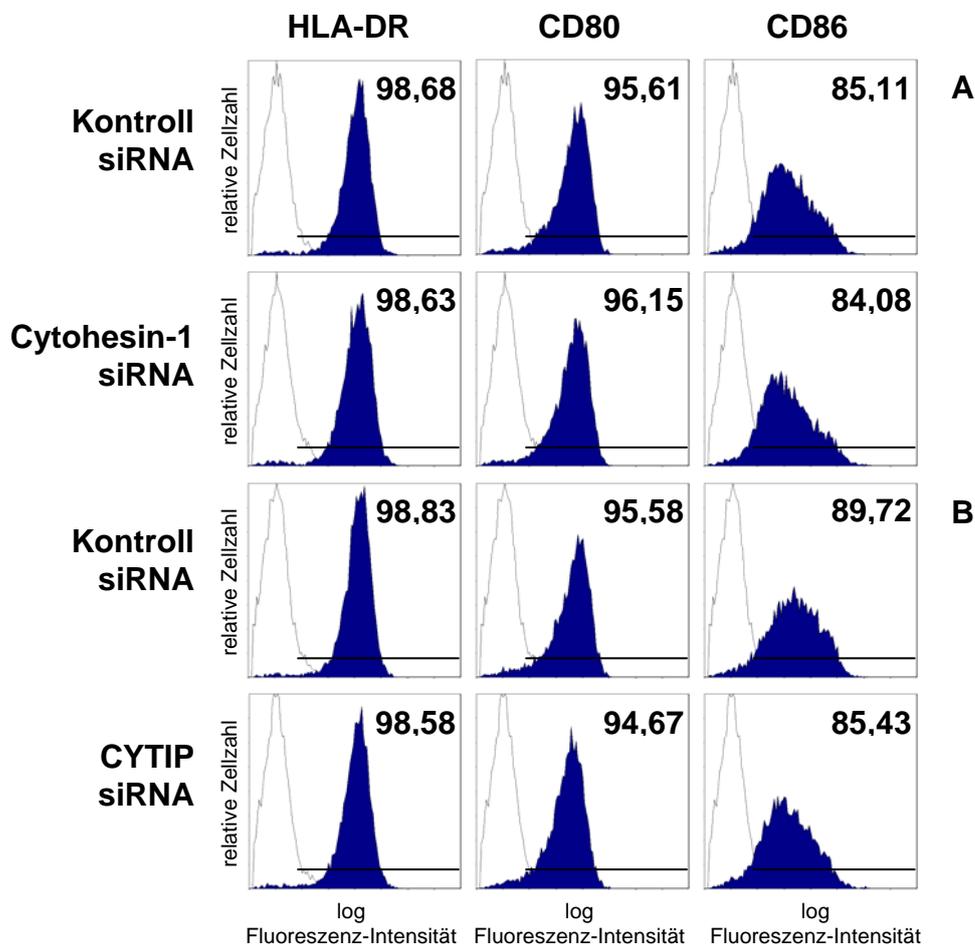
**Abb. 3.7 Reduktion der Protein-Expression von Cytohesin-1 und CYTIP in mDC mittels RNAi.** Die Western Blot-Analyse zeigt, dass die Protein-Expression von Cytohesin-1 und CYTIP, vier Tage nach Elektroporation spezifischer siRNA in mDC, zu fast 100% bzw. 70-80% im Vergleich zu mDC nach Elektroporation mit Kontroll-siRNA reduziert ist. Cytohesin-1 wurde mit dem Antikörper 7H2, CYTIP mit 2F9 detektiert. K: Kontrolle; Cyh-1: Cytohesin-1

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Transfektion von RNA in unreife und reife humane MoDC durch Elektroporation etabliert. Cytohesin-1 oder CYTIP siRNA wurden, parallel zu den entsprechenden Kontrollen, an Tag 5 bis 7 nach der Zellisolation in unreife DC transfiziert. 48 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  und LPS maturiert. Weitere 48 Stunden später konnte ein Maximum des Protein 'knock-downs' festgestellt werden. In Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass die Expression von Cytohesin-1 mit Hilfe der RNAi zu fast 100%, die Expression von CYTIP zu ca. 80-90% reduziert wird (Abb. 3.7). In diesem Stadium wurden die Zellen für funktionelle Untersuchungen genutzt.

### 1.4.1 RNAI VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE MATURIERUNG VON MoDC

Die Maturation dendritischer Zellen induziert eine drastische Erhöhung ihrer Mobilität. Um auszuschließen, dass Cytohesin-1 und CYTIP ‚knock-down‘ die Maturation der MoDC und damit die Entwicklung eines migratorischen Phänotypes verhindern, wurde die Expression von Reifungsmarkern auf Kontroll- und ‚knock-down‘ Zellen in der FACS-Analyse ermittelt.

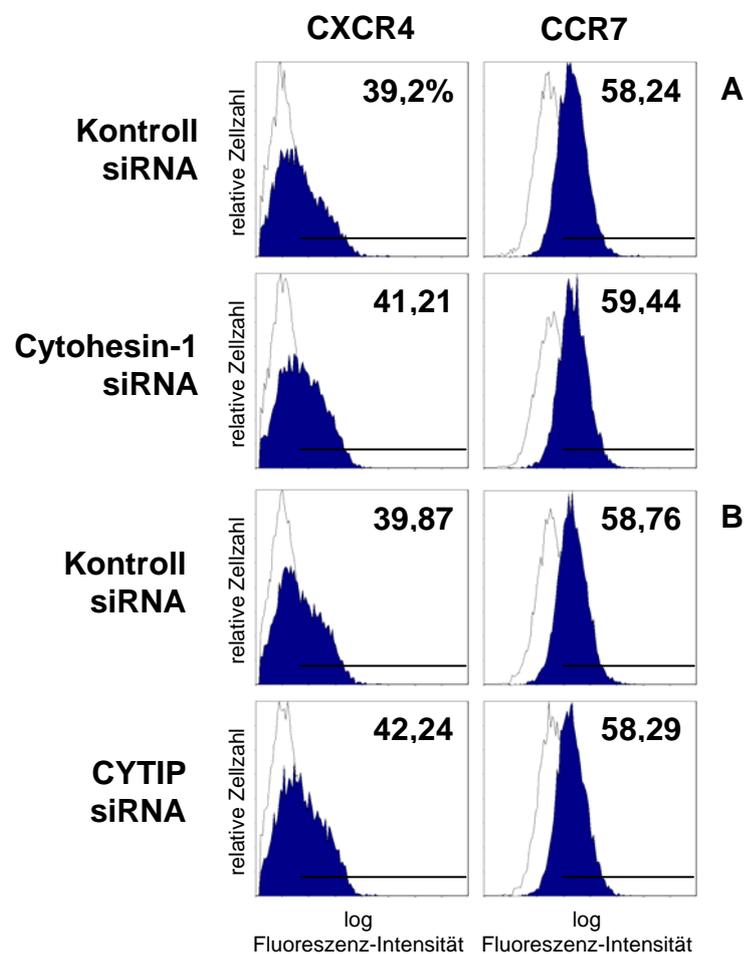
Die Expression des MHC-II Moleküls HLA-DR und der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 ist nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen nicht verändert (Abb. 3.8, A). Auch CYTIP ‚knock-down‘ zeigt keinen Einfluß auf die Expression der Maturationmarker (Abb. 3.8, B). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Migration von DC nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP die Maturation der Zellen verhindert.



**Abb. 3.8 Expression von Reifungsmarkern auf Kontroll- und Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘-Zellen.** Mittels FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Expression der Reifungsmarker HLA-DR, CD80 und CD86 und damit die Maturation von MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 bzw. CYTIP nicht verändert ist.

### 1.4.2 RNAI VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION DER CHEMOKIN-REZEPTOREN CCR7 UND CXCR4 AUF REIFEN MODC

CCL19 und CXCL12 sind zwei relevante Chemokine für die *in vivo* Funktion reifer DC und binden an die Rezeptoren CCR7 bzw. CXCR4. In dieser Arbeit soll die Bedeutung von Cytohesin-1 und CYTIP für die Migration reifer MoDC in Richtung der Chemokine CCL19 und CXCL12 untersucht werden. Zuvor muss festgestellt werden, ob RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP die Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR7 und CXCR4 beeinflusst.



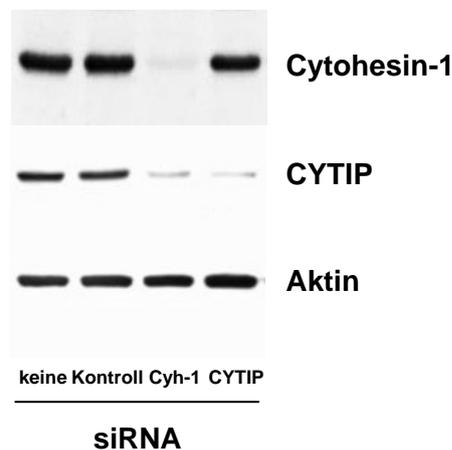
**Abb. 3.9 Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CCR7 auf reifen Kontroll-Zellen sowie Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) 'knock-down' MoDC.** Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 (Rezeptor für CXCL12) und CCR7 (Rezeptor für CCL19) nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP im Vergleich zu Kontroll-Zellen nicht verändert ist.

Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurden die Rezeptoren auf der Oberfläche reifer MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP 'knock down' im Vergleich zu Kontroll-Zellen quantifiziert. Reife MoDC zeigen nach Cytohesin-1 'knock-down' keine veränderte CCR7- und CXCR4-Expression (Abb. 3.9, A). Ebenso verändert CYTIP 'knock-down' die Expression von CXCR4 und CCR7 auf reifen MoDC nicht (Abb. 3.9, B). Die gestörte Migration reifer DC infolge einer reduzierten Expression der Proteine Cytohesin-1 oder CYTIP wird somit nicht durch eine verminderte Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR7 und CXCR4 verursacht.

### 1.4.3 CYTOHESIN-1 REGULIERT DIE PROTEIN-EXPRESSION VON CYTIP

RNAi von Cytohesin-1 führt in mDC, im Vergleich zu Kontroll-Zellen, zu einer fast 100% Reduktion der Protein-Expression (Abb. 3.10, A bis C, oberste Reihe). Eine verminderte Cytohesin-1 Protein Expression führt zusätzlich zu einer Reduktion der CYTIP Protein-Expression (Abb. 3.10, C, zweite Reihe). Im Gegensatz dazu verringert RNAi von CYTIP in mDC im Vergleich zu mit Kontroll-Zellen zwar die CYTIP Protein Expression um ca. 80% (Abb. 3.10, D, zweite Reihe), hat jedoch keinen Einfluß auf die Cytohesin-1 Protein-Expression in diesen Zellen (Abb. 3.10, D, erste Reihe). Aktin diente als Ladekontrolle (Abb. 3.10, dritte Reihe)

Quantitative PCR-Analysen mit PBLs zeigten, dass die Regulation der CYTIP-Expression durch Cytohesin-1 auf transkriptioneller Ebene stattfindet (I. Brillert, Diplomarbeit).

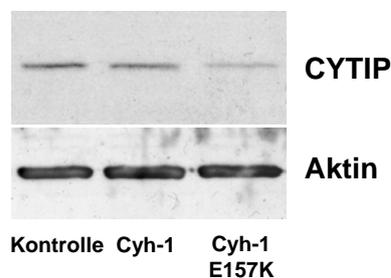


**Abb. 3.10 Cytohesin-1 reguliert die Protein-Expression von CYTIP.** Western Blot-Analysen zeigen, dass RNAi von Cytohesin-1 in mDC auch die CYTIP Protein-Expression vermindert, wohingegen RNAi von CYTIP keinen Einfluß auf die Protein-Expression von Cytohesin-1 hat. Aktin diente als Ladekontrolle.

#### 1.4.4 DIE GEF-FUNKTION VON CYTOHESIN-1 VERMITTELT DIE REGULATION DER CYTIP PROTEIN-EXPRESSION

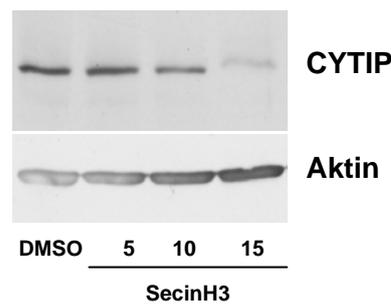
Cytohesin-1 ist ein GEF für verschiedene ARFs (siehe 1.4.5). *In vitro* Studien zeigten, dass die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 den Guanin-Nukleotid-Austausch (GDP/GTP-Austausch) katalysiert (Meacci *et al.* 1997). Das Glutamat 157 liegt im Bereich der SEC7-Domäne und ist kritisch für die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 (Betz *et al.* 1998), so dass die Punktmutation E157K in einem vollständigen Verlust der *in vitro* GEF-Funktion resultiert (Knorr *et al.* 2000).

Um zu untersuchen, ob die GEF-Funktion von Cytohesin-1 für die verringerte CYTIP Synthese infolge der Cytohesin-1 RNAi in mDC verantwortlich ist, wurden Überexpressionsuntersuchungen in PBLs durchgeführt. DC konnten für dieses Experiment nicht verwendet werden, da sie mit Plasmiden nicht zu transfizieren sind. Cytohesin-1 bzw. dessen Mutante E157K wurden in PBLs überexprimiert und die CYTIP-Expression im Western Blot nachgewiesen. Wie Abb. 3.11 zeigt, ist die CYTIP Expression in Cytohesin-1 überexprimierenden PBLs (B) in etwa so stark wie in PBLs, die mit einem Kontroll-Vektor transfiziert wurden (A). Überexpression der E157K Mutante resultiert dagegen in einer Reduktion der CYTIP Protein-Expression (C). Die GEF-Funktion von Cytohesin-1 ist somit für die CYTIP Expression in PBLs erforderlich.



**Abb. 3.11 Die Cytohesin-1 GEF-Funktion ist für die Protein-Expression von CYTIP in PBLs erforderlich.** Die CYTIP Protein-Expression in Cytohesin-1 überexprimierenden PBLs ähnelt denen, die ausschließlich mit einem Kontroll-Vektor transfiziert wurden. Überexpression der Cytohesin-1 Mutante E157K induziert eine Reduktion der CYTIP Protein-Expression. Aktin diente als Ladekontrolle.

Das gleiche Ergebnis konnte mit dem kleinen molekularen Inhibitor SecinH3 in reifen MoDC erzielt werden. SecinH3 bindet an das katalytische Zentrum der SEC7-Domäne der Cytohesine und hemmt dadurch deren GEF-Aktivität. Reife MoDC enthalten fast ausschließlich Cytohesin-1, so dass SecinH3 hier als spezifischer Inhibitor für die Cytohesin-1 GEF-Aktivität genutzt werden kann.



**Abb. 3.12 Die Cytohesin-1 GEF-Funktion ist für die Protein-Expression von CYTIP in reifen MoDC erforderlich.** Inkubation reifer MoDC mit DMSO (Kontrolle), 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M SecinH3 zeigte in der Western Blot-Analyse eine konzentrationsabhängige Reduktion der CYTIP-Expression nach 48 Stunden. CYTIP wurde mit dem Antikörper 2F9 nachgewiesen.

Die Inkubation reifer MoDC mit unterschiedlichen Konzentrationen SecinH3 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M) zeigte bereits nach 48 Stunden eine konzentrationsabhängige Reduktion der CYTIP Expression (Abb. 3.12). Da SecinH3 in DMSO gelöst ist, wurden Kontroll-Zellen mit dem entsprechenden Volumen DMSO inkubiert. Die CYTIP-Expression ist somit auch in MoDC abhängig von der GEF-Aktivität von Cytohesin-1.

## 1.5 CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN EINE KOORDINIERTER MIGRATION REIFER MoDC

Die Entwicklung eines migratorischen Phänotypes im Laufe der DC Maturierung ist essenziell für die Ausübung ihrer Antigen-präsentierenden Funktionen. Eine koordinierte Migration bedarf eines Gleichgewichts an pro- und anti-adhäsiven Kräften (Smith *et al.* 2003). Die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP sind zuvor als pro- und anti-adhäsive Faktoren in der Regulation LFA-1 vermittelter Adhäsion identifiziert worden (Boehm *et al.* 2003; Geiger *et al.* 2000). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die starke Expressionszunahme der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP während der Reifung humaner DC im Zusammenhang mit der Entwicklung eines migratorischen Phänotypes steht. Hierzu wurden reife MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP in verschiedenen Migrationsexperimenten untersucht.

---

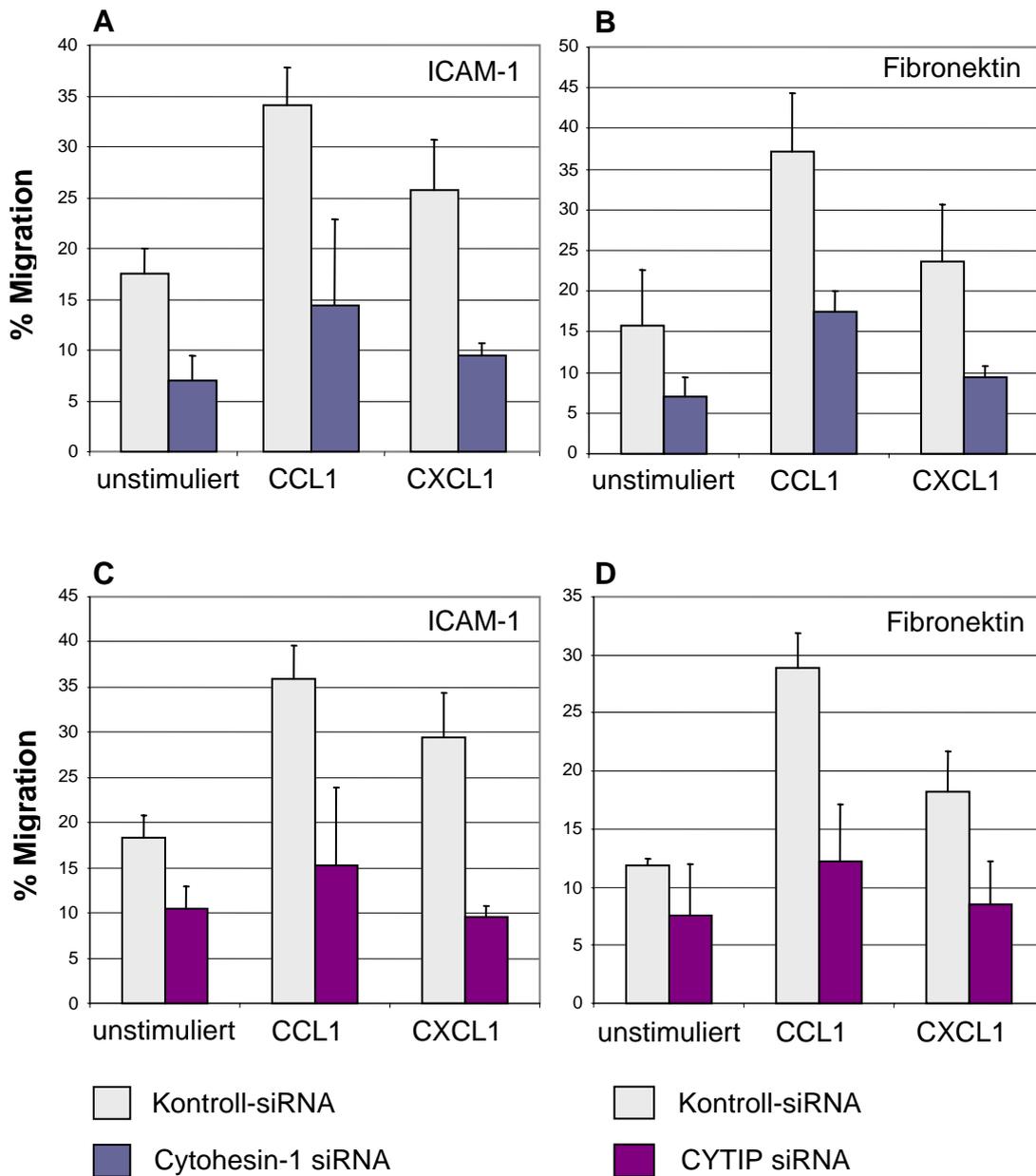
### 1.5.1 CYTOHESIN-1 UND CYTIP VERMITTELN DIE MIGRATION REIFER MoDC *IN VITRO* (TRANS-WELL)

Es wurde untersucht, ob die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP für die Migration reifer MoDC in Richtung der Chemokine CCL19 und CXCL12 auf dem  $\beta_2$ -Integrin-Liganden ICAM-1 und dem  $\beta_1$ -Integrin-Liganden Fibronectin im Trans-well-Versuch mit definierter Porengröße unterhalb des Zelldurchmessers (5  $\mu\text{m}$ ) erforderlich sind. Reife MoDC wurden nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP auf Filter gegeben, welche zuvor entweder mit ICAM-1 oder Fibronectin beschichtet wurden. Die Migration wurden mit 200 ng/ml CCL19 oder 200 ng/ml CXCL12 stimuliert. Als Kontrolle dienten mDC, welche mit einer unspezifischen siRNA elektroporiert wurden. Die Auswertung des Versuches erfolgte nach einer Migrationszeit von vier Stunden.

Es konnte gezeigt werden, dass RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP in reifen MoDC zu einer Reduktion sowohl unstimulierter als auch CCL19 bzw. CXCL12 stimulierter Migration führt. Abb. 3.11 zeigt, dass die Migrationsrate reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin nach CCL19- bzw. nach CXCL12-Stimulation steigt. ‚Knock-down‘ von Cytohesin-1 reduziert die Migrationsrate sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19- bzw. nach CXCL12-Stimulation auf ICAM-1 und Fibronectin (Abb. 3.13, A und B).

Ebenso reduziert RNAi von CYTIP die Migration auf ICAM-1 und Fibronectin sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19- bzw. nach CXCL12-Stimulation (Abb. 3.13, C und D).

Die Reduktion der Migration reifer MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP tritt auch dann ein, wenn unbeschichtete Filter im Trans-well-Versuch genutzt wurden (Daten nicht gezeigt). Auch hier ist eine stark verringerte Reduktion der unstimulierten als auch der CCL19- bzw. CXCL12- stimulierten Migration zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass der Einfluß von Cytohesin-1 und CYTIP auf die Migration reifer MoDC Liganden-unabhängig ist.

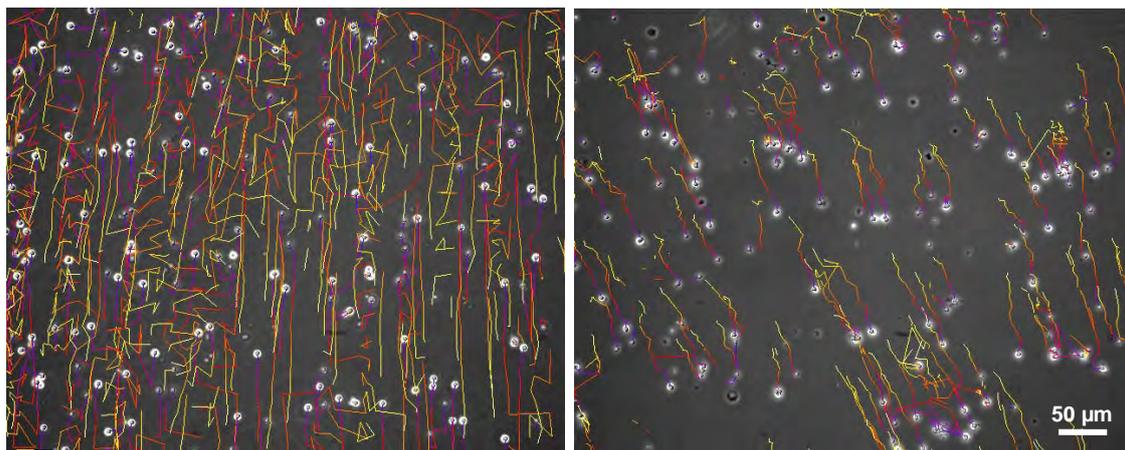


**Abb. 3.13 Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration reifer MoDC im Trans-well-Versuch erforderlich.** Die Migration reifer MoDC in Richtung der Chemokine CCL19 und CXCL12 ist nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen auf ICAM-1 (A) und Fibronectin (B) stark reduziert. Ebenso führt ein CYTIP ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen zu einer drastisch reduzierten Migration in Richtung der Chemokine CCL19 und CXCL12 auf ICAM-1 (C) und Fibronectin (D). Als Kontrolle dienen reife MoDC, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden.

### 1.5.2 CYTOHESIN-1 UND CYTIP BEEINFLUSSEN DIE MIGRATION REIFER MoDC AUF FIBRILLÄREM BOVINEM KOLLAGEN I (2D)

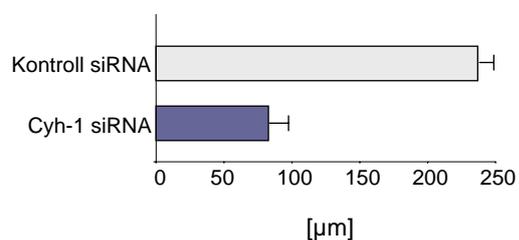
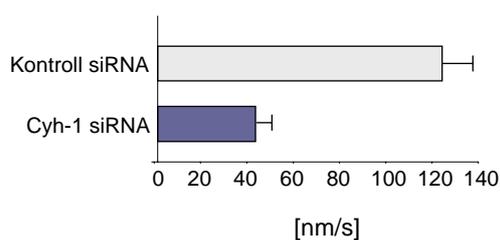
Eine mikroskopierbare Chemotaxis-Kammer ( $\mu$ -Slide VI, IBIDI GmbH, München (Schymeinsky *et al.* 2006)) wurde mit bovinem Kollagen I beschichtet. Reife MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP wurden auf dieses Kollagen-Substrat (2D) gegeben und eine Stunde zur Adhäsion inkubiert. CCL19 wurde an einer Seite der Kammer hinzugegeben, so dass sich ein Chemokin-Gradient in der Kammer aufbauen konnte. Anschließend wurden für 2 Stunden in einem Intervall von einer Minute Phasenkontrastaufnahmen erstellt, die später zu einem Film zusammengestellt wurden (siehe beigelegte CD).

Mit Hilfe einer Software (Imaris 4.5.2, Bitplane AG, Zürich (Witt *et al.* 2005)) wurde die Wanderung der Zellen analysiert, sowie die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Wegstrecke automatisch berechnet. Als Kontrolle dienten reife MoDC, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden.



**A – Kontroll siRNA**

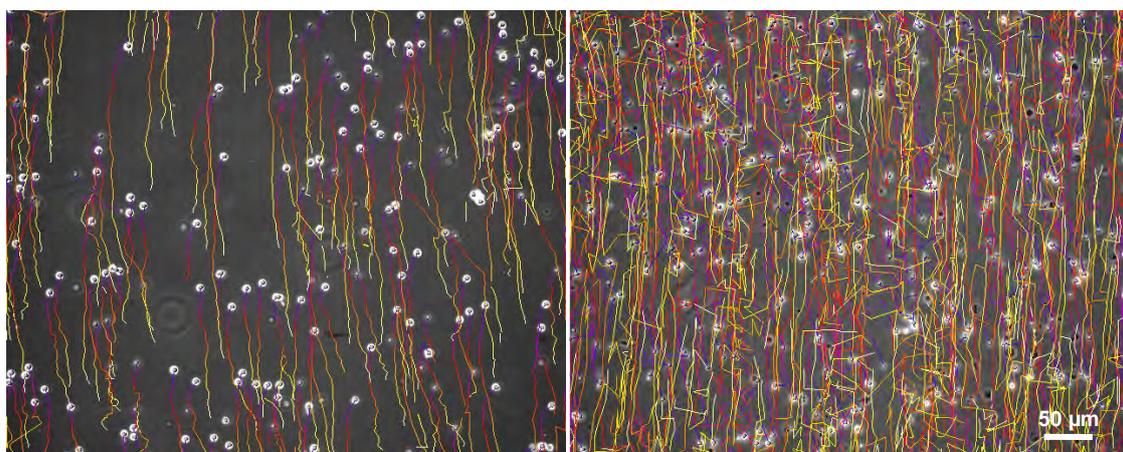
**B – Cytohesin-1 siRNA**



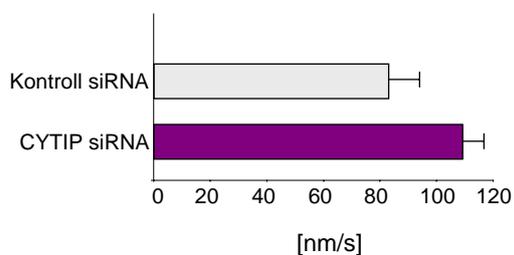
**Abb. 3.14 Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) nach RNAi von Cytohesin-1.** 'Knock-down' von Cytohesin-1 (B) hat keinen Einfluss auf die Direktionalität der Migration reifer MoDC. Jedoch ist nach Cytohesin-1 RNAi die Geschwindigkeit [nm/s] und die zurückgelegte Wegstrecke [µm] im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert (Diagramme). Geschwindigkeit und Wegstrecke wurden mit der Imaris-Software bestimmt.

Reife MoDC zeigen auf fibrillärem Kollagen (2D) eine direktionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.14 und 3.15). Cytohesin-1 'knock-down' in reifen MoDC führt zu einer verringerten Geschwindigkeit und zu einer im Mittel reduzierten Weglänge (Abb. 3.14, A und B, Diagramm). Cytohesin-1 'knock-down' Zellen zeigen jedoch immer noch eine direktionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.14, B).

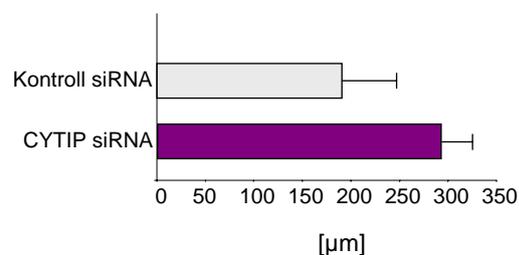
Auch CYTIP 'knock-down' in reifen MoDC hat keinen Einfluß auf die gerichtete Wanderung der Zellen in Richtung des Chemokins (Abb. 3.15). RNAi von CYTIP führt zu einer erhöhten durchschnittlichen Geschwindigkeit und zu einer im Mittel weiter zurückgelegten Wegstrecke (Abb. 3.15, A und B, Diagramm).



**A – Kontroll siRNA**



**B – CYTIP siRNA**

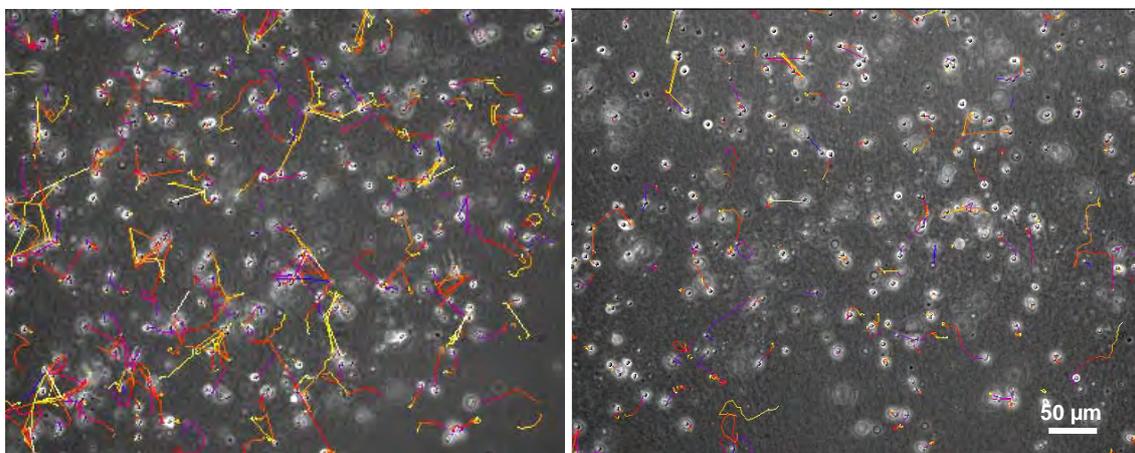


**Abb. 3.15 Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) nach RNAi von CYTIP.** 'Knock-down' von CYTIP (B) hat keinen Einfluss auf die Direktionalität der Migration reifer MoDC. Die Migrationsgeschwindigkeit [nm] und die zurückgelegte Wegstrecke [µm] steigen nach RNAi von CYTIP an (Diagramme). Geschwindigkeit und Wegstrecke wurden mit der Imaris-Software bestimmt.

Die Variationen zwischen beiden Kontroll-Ansätzen (Abb. 3.14, A und 3.15, A) können durch die Verwendung verschiedener Blutspender, aber auch durch die unterschiedliche Menge elektroporierter siRNA - 5 µg für die Cytohesin-1 Kontrolle und 10 µg für die CYTIP-Kontrolle - zustande kommen.

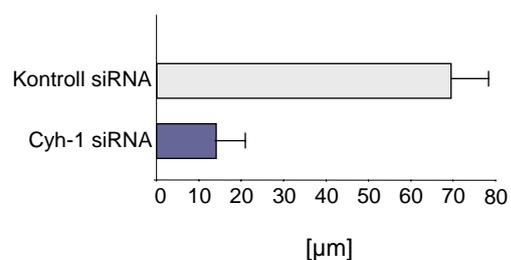
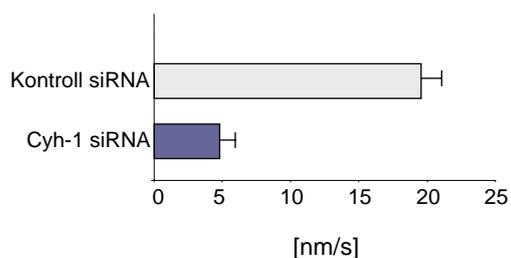
### 1.5.3 CYTOHESIN-1 UND CYTIP ERMÖGLICHEN DIE MIGRATION REIFER MoDC IN KOLLAGEN (3D)

Kollagen wurde zusammen mit reifen MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP in einer mikroskopierbaren Chemotaxis-Kammer (siehe 3.8.2) zu einem Gel polymerisiert. CCL19 wurde an einer Seite der Kammer hinzugegeben. Anschließend wurden für 5 Stunden in einem Intervall von 5 Minuten Phasenkontrastaufnahmen erstellt, die später zu einem Film zusammengestellt wurden (siehe beigelegte CD). Mit Hilfe der Imaris-Software (siehe 3.8.2) wurde die Wanderung der Zellen analysiert, sowie die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Wegstrecke automatisch bestimmt. Als Kontrolle dienten reife MoDC, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden.



**A – Kontroll siRNA**

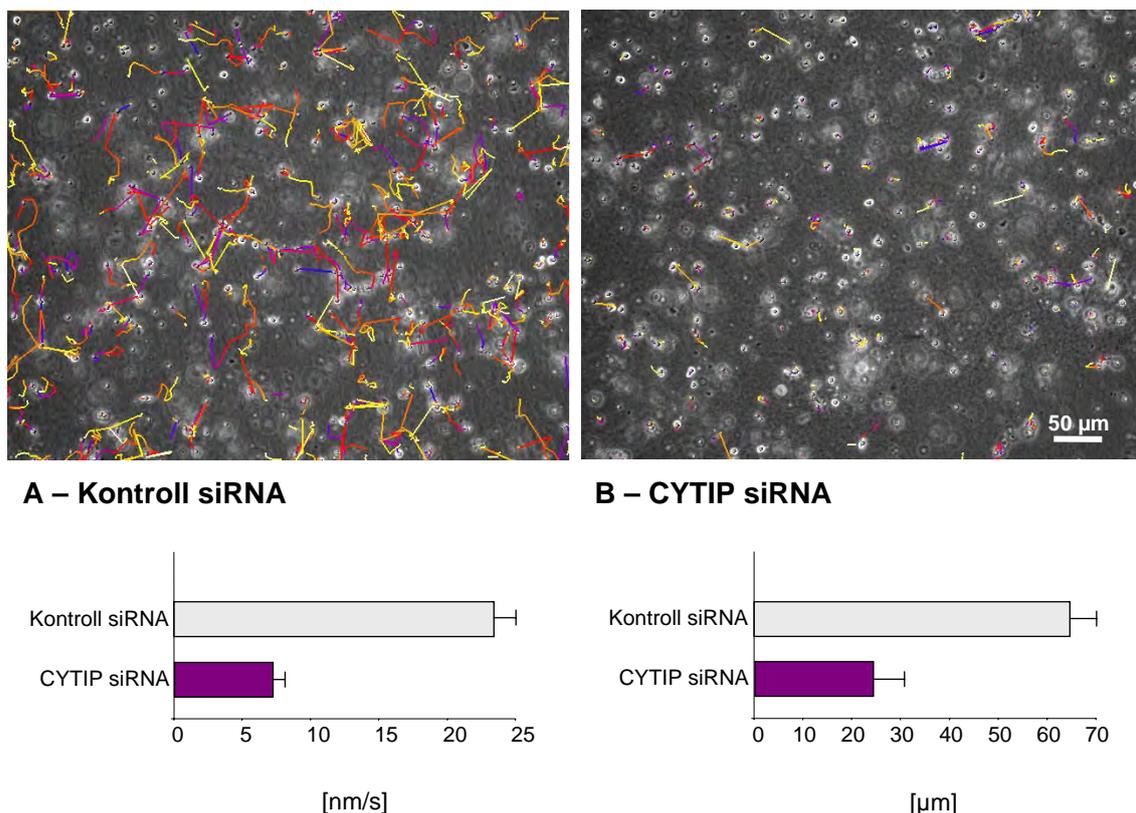
**B – Cytohesin-1 siRNA**



**Abb. 3.16. Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach RNAi von Cytohesin-1 gestört.** 'Knock-down' von Cytohesin-1 (B) führt zu einer starken Inhibition der Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gel. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstreck [µm] wurden mit der Imaris-Software bestimmt und sind nach Cytohesin-1 'knock-down' deutlich reduziert (Diagramme).

Reife MoDC legen innerhalb eines Kollagen-Gels lange Wegstrecken mit hoher Persistenz zurück, zeigen jedoch keine direktionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.16, A und Abb. 3.17, A). Cytohesin-1 'knock-down' in mDC inhibiert die Migration der Zellen fast vollständig (Abb. 3.16, B). Nach 'knock-down' von Cytohesin-1 sind die Zellen zwar immer noch motil, jedoch sind, bis auf wenige Ausnahmen, keine translozierenden Zellen zu detektieren. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind nach RNAi von Cytohesin-1 stark reduziert (Abb. 3.16, A und B, Diagramme).

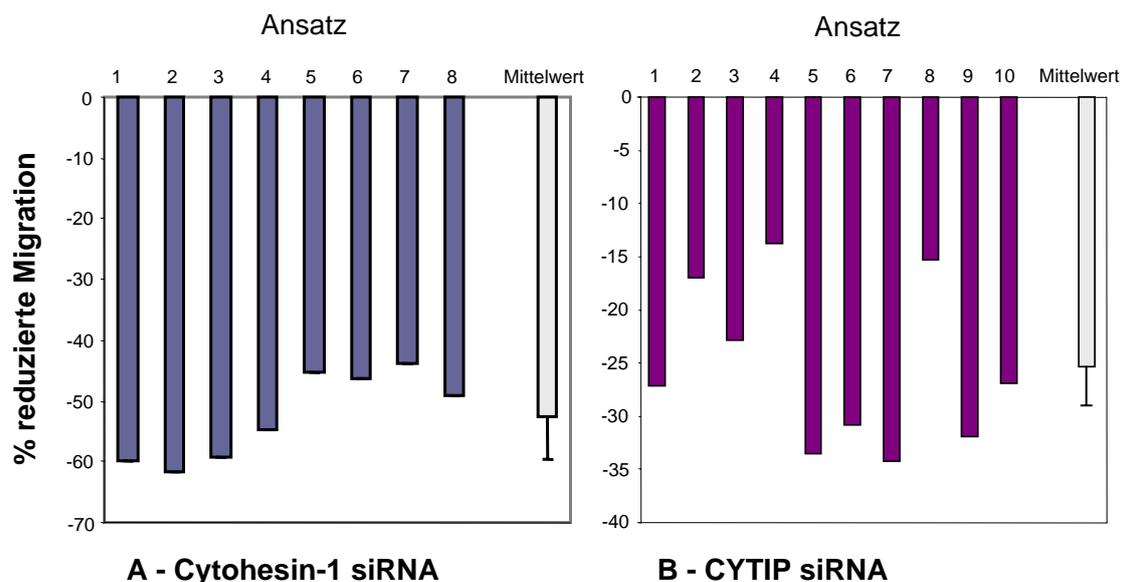
Ebenso verringert CYTIP 'knock-down' in mDC die Migration innerhalb eines Kollagen-Gels deutlich (Abb. 3.17, B), jedoch weniger stark als RNAi von Cytohesin-1. CYTIP 'knock-down' führt dazu, dass nur noch sehr wenige der immer noch motilen Zellen translozieren. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind stark reduziert (Abb. 3.17, A und B, Diagramme).



**Abb. 3.17 Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach RNAi von CYTIP gestört.** 'Knock-down' von CYTIP (B) führt zu einer starken Inhibition der Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [ $\mu$ m] wurden mit der Imaris-Software bestimmt und sind nach CYTIP 'knock-down' stark reduziert (Diagramme).

#### 1.5.4 CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN DIE MIGRATION MURINER DC *IN VIVO*

Murine dendritische Zellen (*Bone-marrow-derived DC*, BM-DC) wurden aus Knochenmarkszellen aus C57/BL6 Mäusen generiert, die für 7 Tage in Gegenwart des Zytokins GM-CSF kultiviert wurden (Ohl *et al.* 2004). Die Zellen wurden entweder mit muriner Cytohesin-1 oder CYTIP siRNA elektroporiert und direkt im Anschluß mit TNF- $\alpha$  maturiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen und die entsprechende Kontrolle differenziell gefärbt – der Kontrollansatz wurde mit dem grünen Farbstoff CFSE, der 'knock-down'-Ansatz mit dem roten Farbstoff TAMRA gefärbt. Bei einer Wiederholung des Experiments wurden die Farbstoffe gewechselt, um einen Einfluß der Färbung auf das Zellverhalten auszuschließen. Eine gleiche Anzahl CFSE und TAMRA gefärbter Zellen wurde in die hintere Pfote der Maus injiziert. Nach 24 Stunden wurde der popliteale Lymphknoten entfernt, eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Anzahl CFSE bzw. TAMRA gefärbter Zellen in der FACS-Analyse bestimmt. Auf diese Weise konnte quantifiziert werden, wieviele reife BM-DC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP 'knock-down' im Vergleich zu Kontroll-Zellen den Lymphknoten erreicht haben.



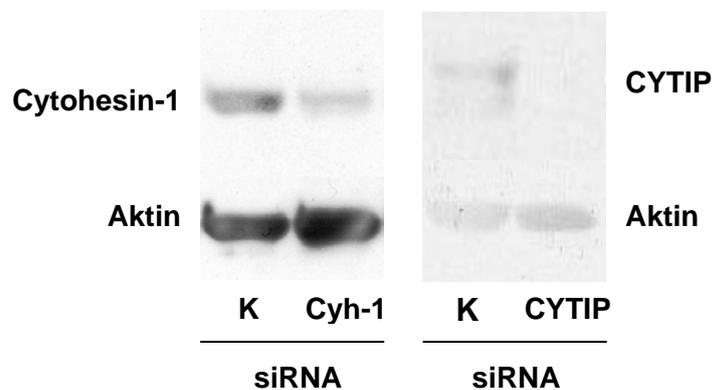
**Abb. 3.18 Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration muriner BM-DC *in vivo* erforderlich.** Die Migration muriner, aus dem Knochenmark generierter DC (BM-DC) von der Pfote zum poplitealen Lymphknoten ist nach Cytohesin-1 'knock-down' zu fast 60% (A) und nach CYTIP 'knock-down' zu 25% (B) reduziert.

Abb. 3.18, A zeigt, dass die Anzahl muriner BM-DC, welche den Lymphknoten erreichen, nach Cytohesin-1 'knock-down' um fast 60% reduziert ist. CYTIP 'knock-down' verringert die Anzahl reifer BM-DC, die den Lymphknoten erreichen um ca. 25% (Abb. 3.18, B).

Die Versuche wurden von Niklas Czeloth in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reinhold Förster, Hannover, durchgeführt.

Die Reduktion von Cytohesin-1 bzw. CYTIP durch spezifische siRNA in murinen BM-DC wurde im Western Blot kontrolliert. Hierzu wurden Totalzelllysate der transfizierten Zellen 48 Stunden nach Elektroporation der siRNAs in der Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Murines Cytohesin-1 kann mit dem Antikörper mAB19, welcher außer für Cytohesin-1 auch noch für Cytohesin-2, -3 und -4 spezifisch ist, erkannt werden. Obwohl alle Cytohesine durch mAB19 detektiert werden, ist eine deutlich schwächere Bande nach Elektroporation muriner Cytohesin-1 siRNA zu detektieren (Abb. 3.19), welche auf die verringerte Expression von Cytohesin-1 zurückzuführen ist. CYTIP wird mit dem Antikörper 2F9 nachgewiesen, welcher für humanes und murines CYTIP spezifisch ist. Hier ist CYTIP nach Transfektion der entsprechenden siRNA im Western Blot nicht mehr nachzuweisen (Abb. 3.19).



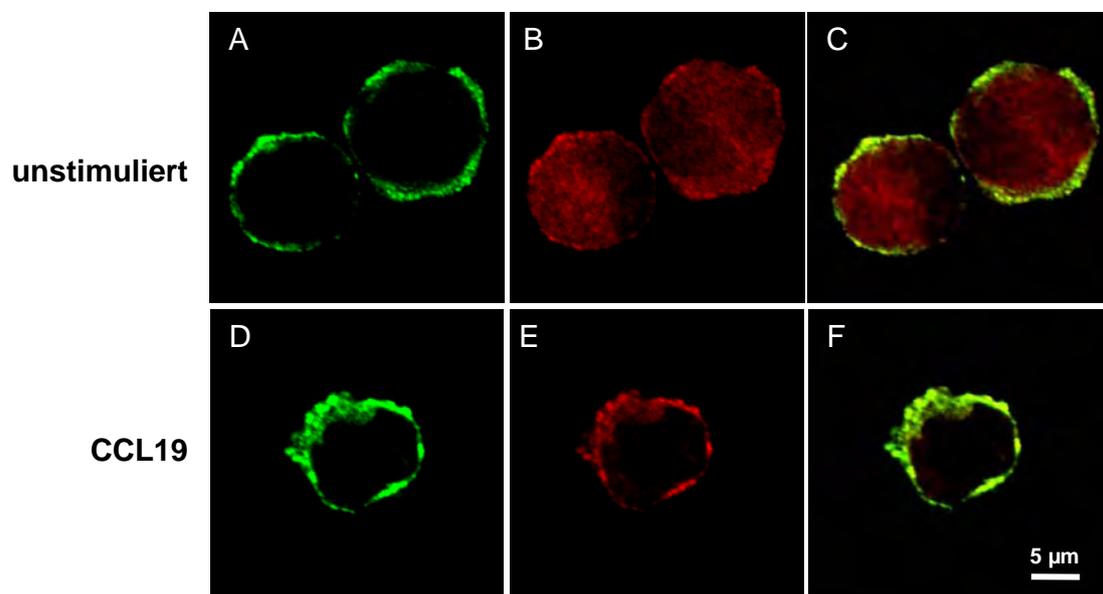
**Abb. 3.19 Western Blot-Analyse der Reduktion von Cytohesin-1 und CYTIP in murinen BM-DC mittels RNAi.** Die Protein-Expression von Cytohesin-1 und CYTIP ist 2 Tage nach Elektroporation spezifischer siRNA reduziert. Murines Cytohesin-1 wurde mit dem Antikörper mAB19 nachgewiesen, welcher außerdem noch Cytohesin-2, -3 und -4 erkennt. Nach RNAi von Cytohesin-1 ist eine eindeutig schwächere Cytohesin-Bande zu erkennen. CYTIP wurde mit dem Antikörper 2F9 nachgewiesen, welcher für humanes und murines CYTIP spezifisch ist. Nach Transfektion der CYTIP siRNA ist das Protein im Western Blot nicht mehr detektierbar. K: Kontrolle; Cyh-1: Cytohesin-1

## 1.6 DIE BEDEUTUNG VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP FÜR CD18 IN REIFEN MoDC

Ein Gleichgewicht an pro- und anti-adhäsiven Kräften ist notwendig für eine koordinierte Migration. Daher sollte die Interaktion beider Proteine mit CD18 und ein möglicher Einfluss über ihre Funktion in der Adhäsionsregulation auf die Migration reifer DC untersucht werden. Es wurde postuliert, dass Cytohesin-1 und CYTIP antagonistisch LFA-1-vermittelte Adhäsion von Jurkat-Zellen regulieren (Boehm *et al.* 2003).

### 1.6.1 CCL19 INDUZIERT EINE TRANSLOKATION VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP AN DIE PLASMAMEMBRAN UND CO-LOKALISATION MIT CD18

Um die Interaktion von Cytohesin-1 und CYTIP mit CD18 zu untersuchen, wurden indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Reife MoDC wurden eine Stunde auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen adhärirt, anschließend mit CCL19 stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden sowohl CD18 als auch Cytohesin-1 bzw. CYTIP in diesen Zellen angefärbt, um eine mögliche Co-Lokalisation der Proteine zu untersuchen. Die Detektion

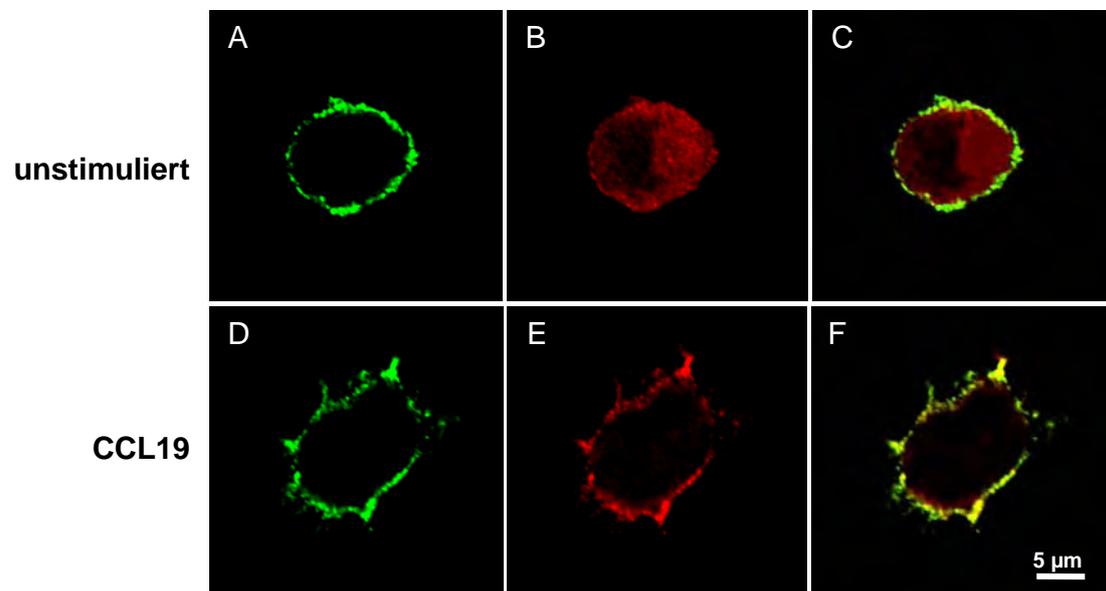


**Abb. 3.20 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CD18 und Cytohesin-1 in reifen MoDC.** Reife MoDC wurden auf Fibronectin adhärirt, fixiert und anschließend mit einem anti-CD18- und einem anti-Cytohesin-1 Antikörper markiert. CD18 befindet sich in unstimulierten (A) und CCL19-stimulierten (D) reifen MoDC an der Plasmamembran. Cytohesin-1 ist in unstimulierten mDC hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (B). Ein geringer Anteil des Proteins befindet sich an der Plasmamembran, wo es mit CD18 co-lokalisiert (C). CCL19-Stimulation induziert eine vollständige Translokation von Cytohesin-1 an die Plasmamembran (E) und Co-Lokalisation mit CD18 (F).

von Cytohesin-1 und CYTIP wurde mit den Antikörpern 7H2 bzw. 2F9 durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter anti-Maus IgG verwendet. CD18 wurde mit dem anti-CD18 Antikörper MEM48 (V. Horejsi, Prag, Tschechien) und dieser mit einem sekundären FITC-gekoppelten anti-Maus IgG detektiert.

CD18 befindet sich an der Plasmamembran reifer MoDC (Abb. 3.20, A und D). Abb. 3.20, B zeigt, dass Cytohesin-1 in unstimulierten, reifen MoDC vorrangig im Zytoplasma lokalisiert ist. Ein geringer Anteil von Cytohesin-1 befindet sich bereits an der Plasmamembran und co-lokalisiert hier mit CD18 (Abb. 3.20, C). Die Stimulation der Zellen mit dem Chemokin CCL19 induziert die vollständige Translokation von Cytohesin-1 an die Plasmamembran (Abb. 3.20, E), wo es zu einer deutlichen Co-Lokalisation mit CD18 kommt (Abb. 3.20, F).

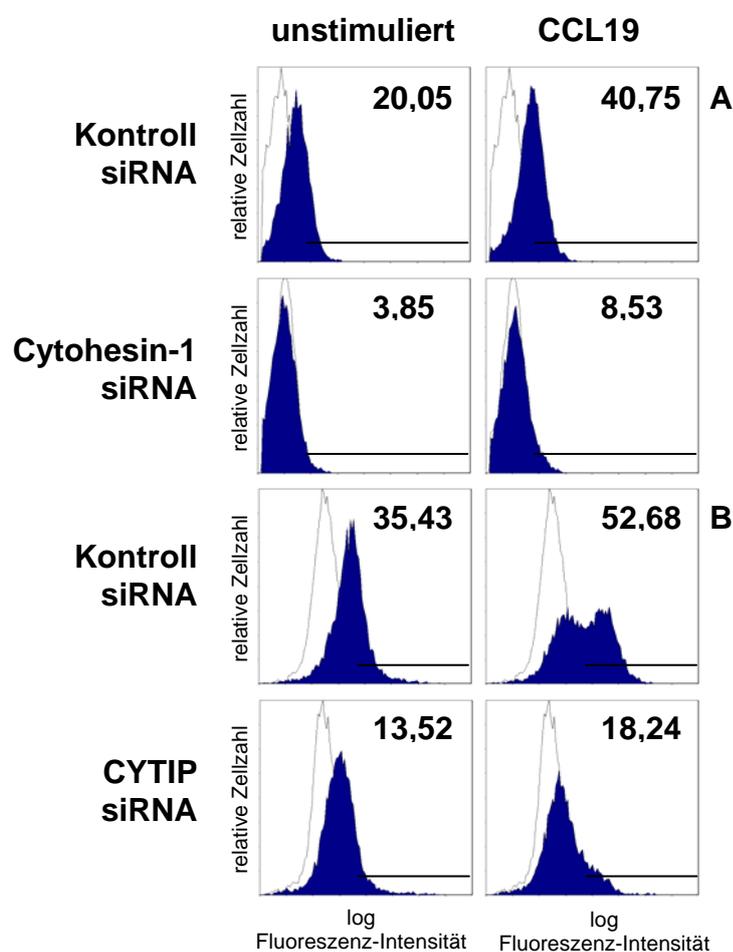
Die parallele Färbung von CYTIP und CD18 in unstimulierten und CCL19 stimulierten reifen MoDC ergab ein identisches Ergebnis. CD18 ist an der Plasmamembran reifer DC lokalisiert (Abb. 3.19, A und D). CYTIP befindet sich in unstimulierten Zellen vornehmlich im Zytoplasma (Abb. 3.19, B). Wie Cytohesin-1 ist ein kleiner Teil von CYTIP bereits in unstimulierten, reifen MoDC an der Plasmamembran zu detektieren, wo es ebenfalls mit CD18 co-lokalisiert (Abb. 3.19, C). CCL19 induziert eine vollständige Translokation von CYTIP an die Plasmamembran (Abb. 3.19, E) und Co-Lokalisation mit CD18 (Abb. 3.19, F).



**Abb. 3.21 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CD18 und CYTIP in reifen MoDC.** Reife MoDC wurden auf Fibronektin adhärirt, fixiert und anschließend mit einem anti-CD18- und einem anti-CYTIP-Antikörper markiert. CD18 befindet sich in unstimulierten (A) und CCL19-stimulierten (D) mDC an der Plasmamembran. CYTIP ist in unstimulierten, reifen MoDC hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (B). Ein geringer Anteil des Proteins befindet sich an der Plasmamembran, wo es mit CD18 co-lokalisiert (C). CCL19-Stimulation induziert eine vollständige Translokation von CYTIP an die Plasmamembran (E) und Co-Lokalisation mit CD18 (F).

### 1.6.2 CYTOHESIN-1- UND CYTIP ‚KNOCK-DOWN‘ VERMITTELN DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CD18 AUF REIFEN MoDC

Integrine liegen nicht konstitutiv aktiv vor. Unterschiedliche Aktivitätszustände von Integrinen ermöglichen es Leukozyten sowohl als nicht-adhärenente Zellen im Blut zu zirkulieren als auch, beim Eintritt in Gewebe, mit Zellen und Matrixbestandteilen zu interagieren. Integrine können durch ‚inside-out‘ Signale aktiviert werden (Hogg *et al.* 2002). So können Chemokine eine rapide Affinitätssteigerung von LFA-1 induzieren, welche ausreicht, um einen Arrest zirkulierender Lymphozyten auf Endothelzellen auszulösen (Constantin *et al.* 2000).

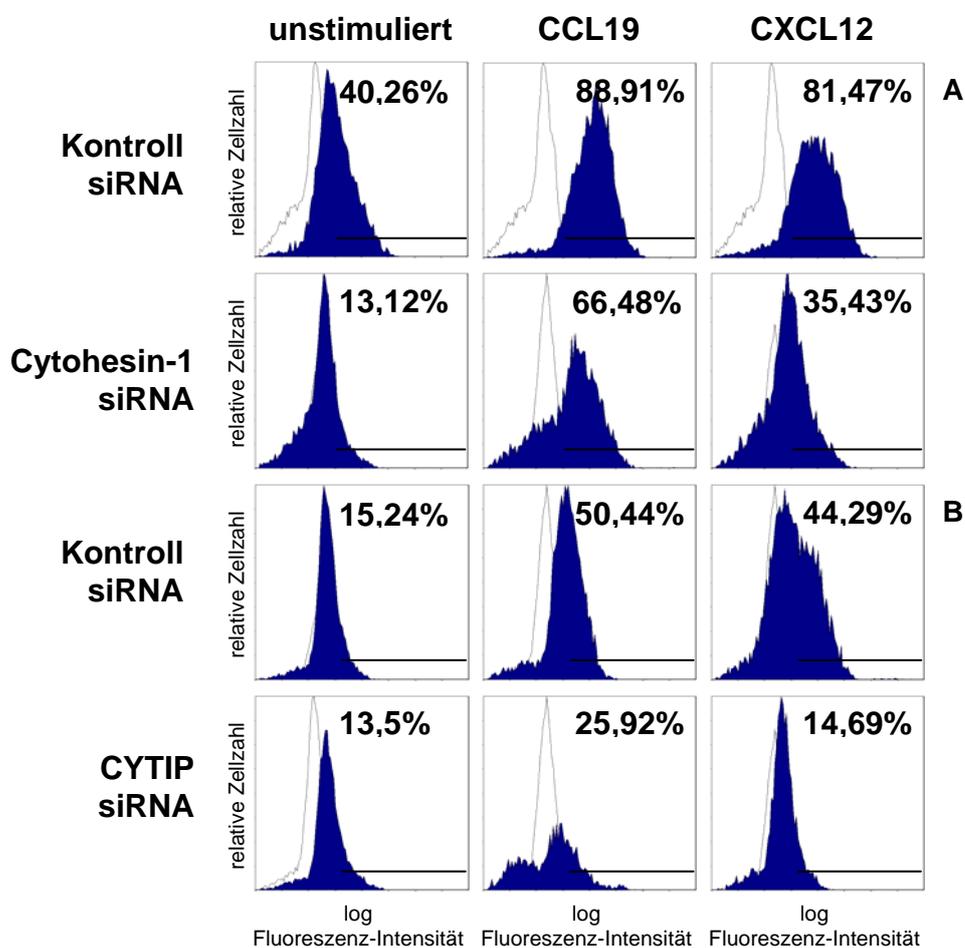


**Abb. 3.22** Expression des 327C-Aktivierungspitopes auf CD18 nach RNAi von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) auf unstimulierten und CCL19-stimulierten mDC. Das von dem Antikörper 327C erkannte Epitop auf aktiviertem CD18 ist bereits auf unstimulierten, reifen MoDC nachzuweisen, wobei die Stärke der Expression Spender-abhängig ist. CCL19 induziert eine Erhöhung der Expression des 327C-Epitopes. Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ führen zu einer verringerten Expression des 327C-Epitopes auf unstimulierten und CCL19-stimulierten, reifen MoDC.

Die Aktivierung von Integrinen wird durch eine Konformationsänderung induziert. Antikörper wie 327C und mAB24 erkennen unterschiedliche Epitope, welche nur nach Aktivierung von

CD18 exprimiert werden (Beals *et al.* 2001; Salas *et al.* 2004). Die erhöhte Expression dieser Aktivierungsepitope wird durch intrazelluläre Signale induziert und korreliert mit einer gesteigerten Zelladhäsion an ICAM-1 (Beals *et al.* 2001).

Es sollte untersucht werden, ob eine Reduktion der Cytohesin-1 bzw. CYTIP Protein-Expression die Expression dieser Epitope auf unstimulierten und Chemokin-stimulierten, reifen MoDC beeinflusst. Abb. 3.22, A zeigt, dass eine verringerte Cytohesin-1 Expression eine reduzierte Ausbildung des 327C Epitopes induziert. Ebenso wirkt sich eine reduzierte CYTIP Protein-Expression auf die Expression des 327C-Epitopes aus. Cytohesin-1 und CYTIP sind somit für die Expression des 327C-Aktivierungsepitopes auf unstimulierten und CCL19-stimulierten, reifen MoDC erforderlich.

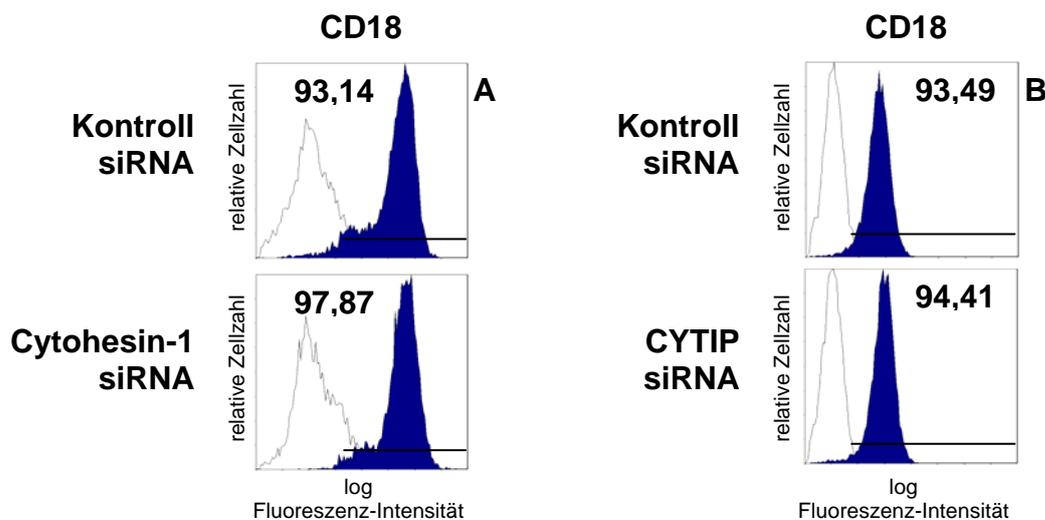


**Abb. 3.23 Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes auf CD18 nach RNAi von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten, reifen MoDC.** Der Antikörper mAB24 erkennt ein Epitop auf CD18, welches nur nach Aktivierung der Integrin-Untereinheit infolge einer Konformationsänderung exprimiert wird. Es ist bereits auf unstimulierten, reifen MoDC nachzuweisen, wobei die Stärke der Expression Spender-abhängig ist. CCL19 und CXCL12 induzieren eine Erhöhung der Expression. Eine reduzierte Expression der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP führt zu einer verringerten Ausbildung des mAB24-Epitopes auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten, reifen MoDC.

Ähnliches konnte beim Nachweis des mAB24-Aktivierungsepitopes in der FACS-Analysen gezeigt werden. Sowohl Cytohesin-1 als auch CYTIP ‚knock-down‘ verringern die Expression des mAB24-Epitopes auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten reifen MoDC (Abb. 3.23).

### 1.6.3 CYTOHESIN-1 UND CYTIP HABEN KEINEN EINFLUß AUF DIE EXPRESSION VON CD18 AUF REIFEN MoDC

Chemokine induzieren die Expression der CD18-Aktivierungsepitope 327C und mAB24 auf reifen MoDC. Cytohesin-1 oder CYTIP ‚knock-down‘ in diesen Zellen inhibiert die Ausbildung dieser Aktivierungsepitope und somit vermutlich die Aktivierung von CD18 (siehe 3.11.2). Es muß ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der Proteine Cytohesin-1 oder CYTIP in reifen MoDC zu einer reduzierten Expression von CD18 auf der Zelloberfläche führt und so die im FACS ermittelte Reduktion der Aktivierungsepitope bewirkt. Hierzu wurde in einer erneuten FACS-Analyse die Expression von CD18 auf der Zelloberfläche reifer MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen ermittelt.



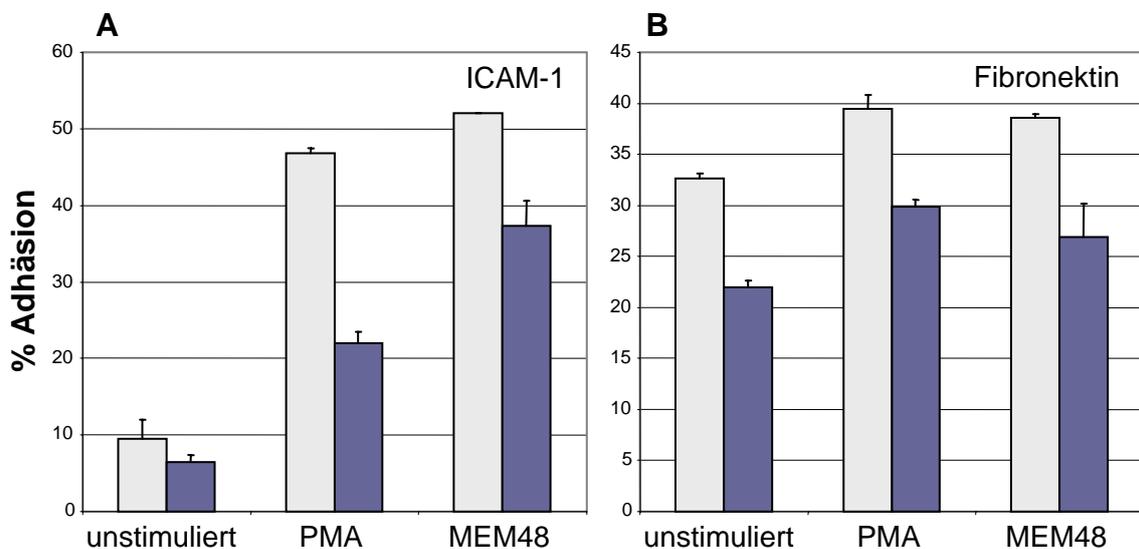
**Abb. 3.24 Expression von CD18 auf reifen MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen.** FACS-Analysen zeigen, dass die Expression von CD18 auf der Zelloberfläche reifer MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) im Vergleich zu Kontroll-Zellen unverändert ist.

Abb. 3.24 zeigt, dass die Expression von CD18 auf der Oberfläche reifer MoDC durch eine reduzierte Protein-Expression von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, nicht verändert wird. Somit kann die verringerte Expression der durch die Antikörper 327C und mAB24 erkannten CD18-Aktivierungsepitope

auf reifen MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP nicht auf eine reduzierte Oberflächenexpression von CD18 zurückgeführt werden.

#### 1.6.4 CYTOHESIN-1 VERMITTELT DIE STATISCHE ADHÄSION REIFER MoDC AN $\beta_2$ - UND $\beta_1$ -INTEGRIN-LIGANDEN

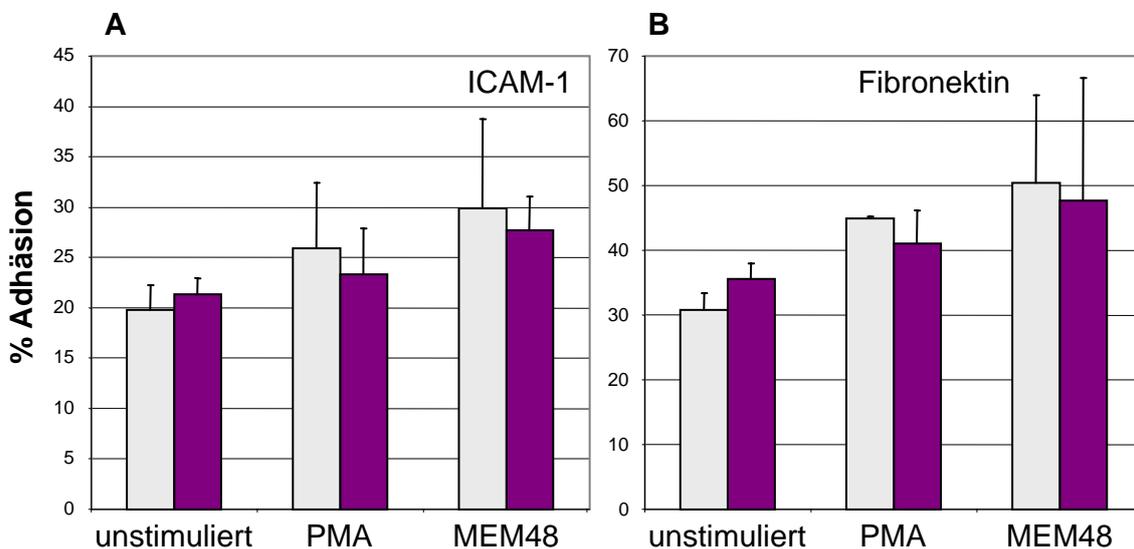
Cytohesin-1 und CYTIP sind in die Regulation LFA-1-vermittelter Adhäsion von Lymphozyten an ICAM-1 involviert (Boehm *et al.* 2003; Geiger *et al.* 2000). LFA-1 ist ein Heterodimer aus CD11a und CD18. Mit Hilfe der Antikörper 327C und mAB24 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von CD18 auf mDC von Cytohesin-1 und CYTIP abhängt (siehe 3.11.2). Die Antikörper 327C und mAB24 erkennen verschiedene Epitope, welche nur nach einer Aktivierung von CD18 exprimiert werden und deren Existenz mit einer gesteigerten Zelladhäsion an ICAM-1 einhergeht (Beals *et al.* 2001). Infolgedessen sollte untersucht werden, ob eine reduzierte Expression von Cytohesin-1 oder CYTIP in mDC eine veränderte Zelladhäsion verursacht. Als Liganden wurden ICAM-1 -  $\beta_2$ -Integrin-Ligand - und Fibronectin -  $\beta_1$ -Integrin-Ligand - verwendet. Die Adhäsion wurde mit dem Phorbolster PMA und dem CD18-aktivierenden Antikörper MEM48 stimuliert.



**Abb. 3.25 Statische Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin nach RNAi von Cytohesin-1 im Vergleich zu Kontroll-Zellen.** In statischen Adhäsionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin durch Stimulation mit dem Phorbolster PMA und dem CD18-aktivierenden Antikörper MEM48 erhöht werden kann. RNAi von Cytohesin-1 in diesen Zellen führt in allen Fällen zu einer Reduktion der Adhäsion.

□ Kontroll-siRNA  
 ■ Cytohesin-1 siRNA

Abb. 3.25, A zeigt, dass die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 nach PMA- bzw. nach MEM48-Stimulation steigt. Die Reduktion der Cytohesin-1 Protein-Expression verringert die Adhäsion sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach PMA-bzw. nach MEM48-Stimulation im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Die Adhäsion reifer MoDC an Fibronectin (Abb. 3.25., B) ist insgesamt sehr viel stärker, da Fibronectin an mehr Integrin-Liganden bindet als ICAM-1, welches ausschließlich mit  $\beta_2$ -Integrinen interagiert. Abb. 3.25, B zeigt, dass die Adhäsion reifer MoDC auf Fibronectin nach PMA- bzw. nach MEM48-Stimulation steigt. Wiederum führt eine reduzierte Cytohesin-1 Protein-Expression im Vergleich zu Kontroll-Zellen zu einer verringerten Adhäsion sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach PMA-bzw. nach MEM48-Stimulation. Cytohesin-1 ist somit für die unstimulierte und stimulierte statische Adhäsion reifer DC an ICAM-1 und Fibronectin erforderlich.



**Abb. 3.26 Statische Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin nach RNAi von CYTIP im Vergleich zu Kontroll-Zellen.** In statischen Adhäsionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin durch Stimulation mit dem Phorbolster PMA und dem CD18-aktivierenden Antikörper MEM48 erhöht werden kann. RNAi von CYTIP führt zu keinem einheitlichen Bild. Die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin steigt leicht unter unstimulierten Bedingungen und sinkt leicht unter PMA- und MEM48-stimulierten Bedingungen. Insgesamt kann kein einheitlicher Einfluß von CYTIP auf die Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin unter statischen Bedingungen festgestellt werden.

□ Kontroll-siRNA  
 ■ CYTIP siRNA

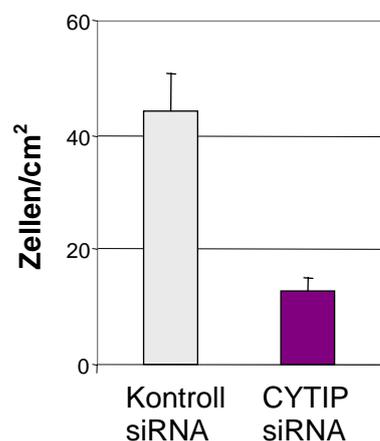
Eine reduzierte CYTIP Protein Expression zeigt kein einheitliches Bild. Wie in Abb. 3.26 zu erkennen ist, führt eine Verringerung der CYTIP-Expression sowohl auf ICAM-1 als auch auf Fibronectin zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Adhäsion im unstimulierten Zustand und zu einer geringen Reduktion der Adhäsion nach PMA- bzw. nach MEM48-Stimulation im

Vergleich zu Kontroll-Zellen. Insgesamt hat CYTIP somit keinen einheitlichen und scheinbar keinen bedeutenden Einfluß auf die statische Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronektin.

### 1.6.5 CYTIP IST ESSENZIELL FÜR DIE ADHÄSION REIFER MoDC AN ENDOTHELZELLEN UNTER FLUSSBEDINGUNGEN

Die Adhäsion von Leukozyten ist unter physiologischen Bedingungen dann von entscheidender Bedeutung, wenn sie am Ort einer Entzündung aus dem Blut in ein Gewebe eintreten müssen. Hier kommt es nach dem ‚rolling‘ der Zellen an der Gefäßwand zu einer sofortigen Adhäsion der zirkulierenden Leukozyten an die aktivierten Endothelien und anschließender Extravasation (siehe 1.3.2). Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch  $\beta_2$ -Integrine vermittelt (Fabbri *et al.* 1999). Mit Hilfe einer Flusskammer können Gefäßbedingungen nachempfunden und dieser Adhäsionsprozess lichtmikroskopisch untersucht werden (Piali *et al.* 1998). Konfluente HUVEC-(human umbilical vein endothelial cells)-Monolayer werden über Nacht mit TNF- $\alpha$  aktiviert Chemokine zu exprimieren. Zusätzliche werden sie zwei Stunden mit CXCL12 inkubiert, welches an die Endothelzellen bindet (Piali *et al.* 1998). Reife MoDC wurden in einer kontinuierlichen an physiologische Bedingungen angepaßte Flussrate von 0,2ml/min hinzugegeben und die Interaktion zwischen DC und Endothelzellen in einem Zeitintervall von 30 Sekunden in sechs verschiedenen Gesichtsfeldern untersucht. Nachdem für CYTIP keine eindeutige Funktion in statischen Adhäsionsassays festgestellt werden konnte (3.12), sollte ge-

prüft werden, ob das Protein für die Adhäsion reifer MoDC an HUVECs unter Flussbedingungen notwendig ist. Die auf der Oberfläche der Endothelzellen gebundenen Chemokine induzieren das Rollen der MoDC. Ein Arrest wurde durch Zählen der fest adhären Zellen bestimmt. Abb. 3.27 zeigt, dass die feste Adhäsion reifer MoDC unter Flußbedingungen – im Gegensatz zu statischen Bedingungen - nach reduzierter CYTIP Protein-Expression stark beeinträchtigt ist. Sie sinkt von durchschnittlich 43 Zellen/cm<sup>2</sup> der Kontroll-Zellen auf durchschnittlich 12 Zellen/cm<sup>2</sup> in reifen MoDC nach RNAi von CYTIP



**Abb. 3.27 Adhäsion reifer MoDC an humane Endothelzellen (HUVEC) nach CYTIP ‚knock-down‘ unter Flussbedingungen.** Die feste Adhäsion reifer MoDC an humane Endothelzellen unter Flussbedingungen sinkt nach reduzierter Expression von CYTIP im Vergleich zu Kontroll-Zellen.

## **1.7 DIE BEDEUTUNG VON CD18 FÜR DIE MIGRATION REIFER MoDC AUF FIBRILLÄREM KOLLAGEN (2D) UND INNERHALB KOLLAGENS (3D)**

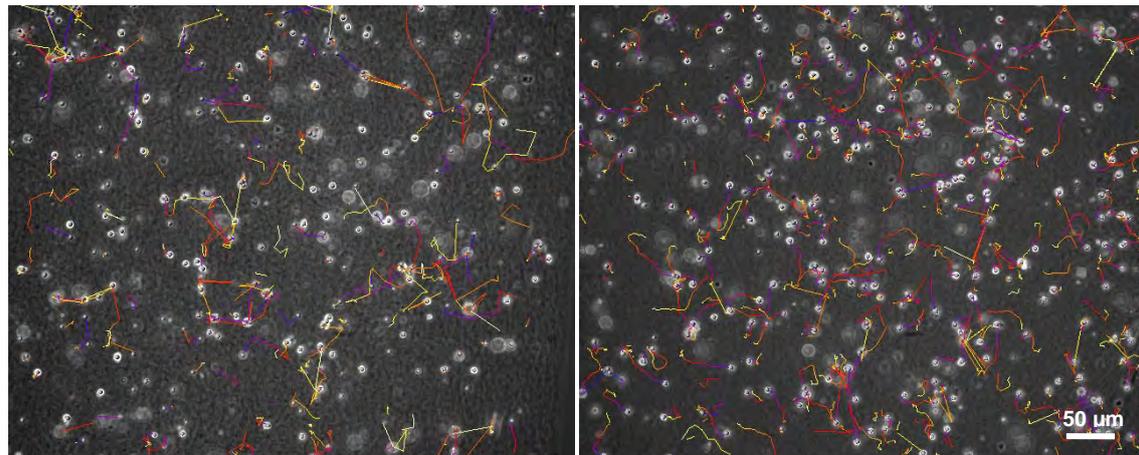
Integrine spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration (Lauffenburger und Horwitz 1996). Die Meinungen, ob Integrine für die Migration von Leukozyten benötigt werden, gehen auseinander. Es ist bekannt, dass Integrinen eine entscheidende Rolle bei der Anheftung von Leukozyten an eine Gefäßwand („rolling“) und anschließender Extravasation zukommt (Laudanna und Alon 2006). Unklar ist jedoch, inwieweit Integrine auch die Migration von Leukozyten in einem Gewebe steuern. Versuche mit blockierenden Antikörpern zeigten, dass die Migration von Lymphozyten im Kollagen-Gel unabhängig von  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\alpha$ -Integrinen ist (Friedl *et al.* 1998). Hingegen zeigen MoDC von LAD (*leucocyte adhesion deficiency*)–Patienten, die einen Defekt in der Synthese der  $\beta_2$ -Kette haben, im Trans-well Migrationsversuch eine gestörte Migration in Richtung des Chemokins CCL19 (Fiorini *et al.* 2002). Dies konnte ebenfalls mit MoDC gesunder Spender nach RNAi von CD18 im Trans-well Migrationsversuch gezeigt werden (Manu Varughese, Diplomarbeit). Um die Bedeutung von CD18 für die Migration reifer MoDC im Kollagen-Gel zu untersuchen, wurde die Migration reifer MoDC sowohl nach CD18 ‚knock-down‘ als auch in Gegenwart eines CD18 blockierenden Antikörpers getestet.

### **1.7.1 RNAI VON CD18 INDUZIERT EINE LEICHTE STEIGERUNG DER MIGRATIONSRATE REIFER MoDC IM KOLLAGEN-GEL (3D)**

In einer Chemotaxis-Kammer wurde die Wanderung reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (siehe 3.8.3) nach RNAi von CD18 getestet. Als Kontrolle dienten reife MoDC, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden. Die erstellten Phasenkontrastaufnahmen wurden zu einem Film zusammengestellt (siehe beigefügte CD) und die Wanderung der Zellen mit Hilfe der Imaris-Software analysiert (siehe 3.8.2).

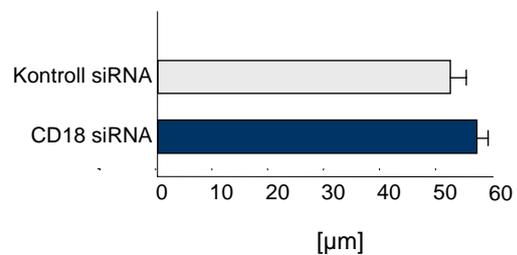
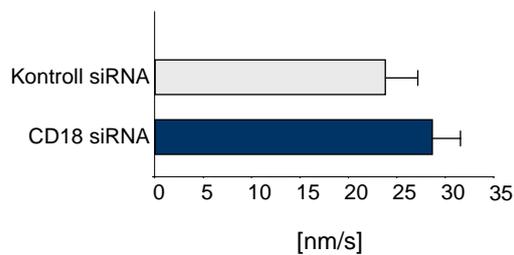
Reife MoDC legen in einem Kollagen-Gel (3D) lange Wegstrecken mit hoher Persistenz zurück, zeigen jedoch keine direktionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.28, A). CD18 ‚knock-down‘ in reifen MoDC inhibiert die Migration der Zellen nicht (Abb. 3.28, B), sondern führt zu einer leicht erhöhten Migrationsgeschwindigkeit und Wegstrecke (Abb. 3.28, A und B, Diagramme).

Die Effizienz des RNAi von CD18 wurde in einer FACS-Analyse ermittelt. Die Reduktion von CD18 auf der Zelloberfläche reifer MoDC liegt bei ca. 18% (Abb. 3.29). Ein vollständiger Verlust von CD18 auf der Zelloberfläche reifer MoDC konnte nicht erzielt werden.

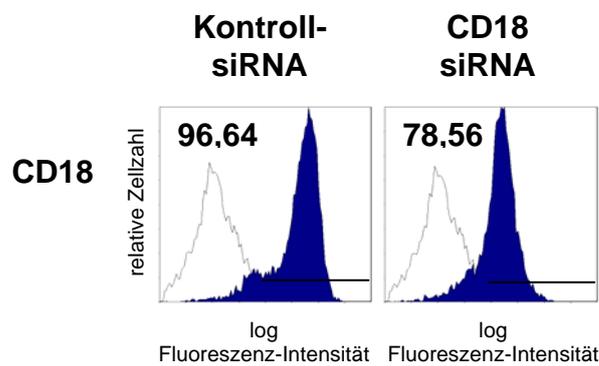


**A – Kontroll siRNA**

**B – CD18 siRNA**



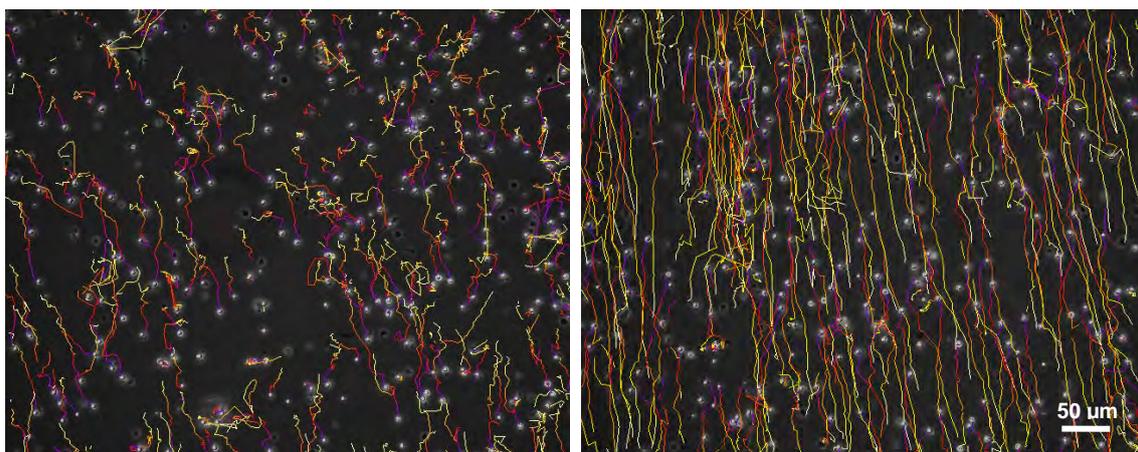
**Abb. 3.28 Die Migration reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (3D) ist nach RNAi von CD18 leicht erhöht.** 'Knock-down' von CD18 (B) führt zu einer leichten Steigerung der Migration reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (3D) im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden (A). Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [µm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt (Diagramme).



**Abb. 3.29 FACS-Analyse der CD18 Expression nach CD18 RNAi in reifen MoDC.** Transfektion spezifischer CD18 siRNA führt im Vergleich zu Kontroll-Zellen zu einer Reduktion, nicht jedoch zu einem Verlust der Integrin-Untereinheit auf der Zelloberfläche reifer MoDC.

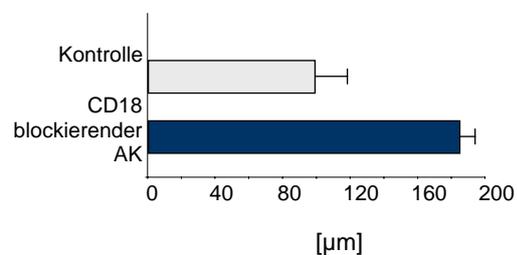
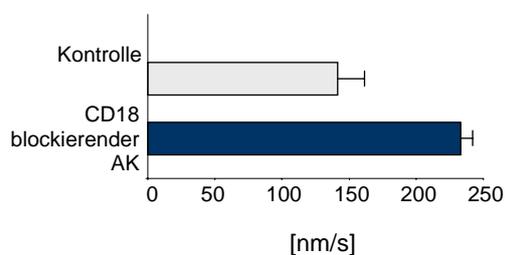
### 1.7.2 CD18 BLOCKIERENDE ANTIKÖRPER ERHÖHEN DIE MIGRATION REIFER MoDC AUF FIBRILLÄREM KOLLAGEN (2D) UND INNERHALB KOLLAGENS (3D)

RNAi von CD18 in reifen MoDC führt zu einer leichten Erhöhung der Migration reifer MoDC innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Geles (siehe 3.14.1). Da es durch RNAi zu keinem vollständigen Verlust von CD18 auf der Zelloberfläche kommt, sollte die Funktion der Integrin-Untereinheit in der Migration reifer MoDC mit Hilfe blockierender Antikörper genauer untersucht werden. Der monoklonale Antikörper 7E4 bindet CD18 und inhibiert LFA-vermittelte Adhäsion an ICAM-1 (Tng *et al.* 2004). Reife MoDC wurden 30 Minuten mit 10  $\mu\text{g}$  7E4 oder 10  $\mu\text{g}$  einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle inkubiert und die Wanderung dieser Zellen Chemotaxis-Kammer auf einem Kollagen-Substrat(2D, siehe 3.8.2) bzw. innerhalb eines Kollagen-Gels (3D, siehe 3.8.3) untersucht. Die erstellten Phasenkontrastaufnahmen wurden zu einem Film zusammengestellt (siehe beigefügte CD) und die Wanderung der Zellen mit Hilfe der Imaris-Software analysiert (siehe 3.8.2). Die Antikörper waren während des gesamten Versuches anwesend.



**A – Kontrolle**

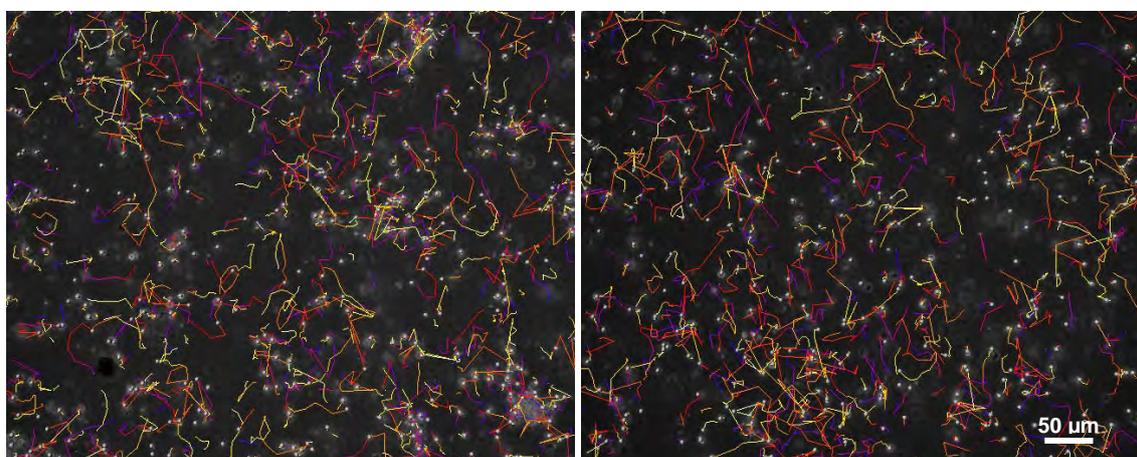
**B – CD18 blockierender AK**



**Abb. 3.30 Die Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) ist nach Inhibition der CD18-Funktion erhöht.** Der monoklonale Antikörper 7E4 blockiert die Funktion von CD18. Inkubation reifer MoDC mit 7E4 (B) führt zu einer Steigerung der Migration auf einer Kollagen-Matrix (2D) im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche mit einer Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden (A). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [μm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

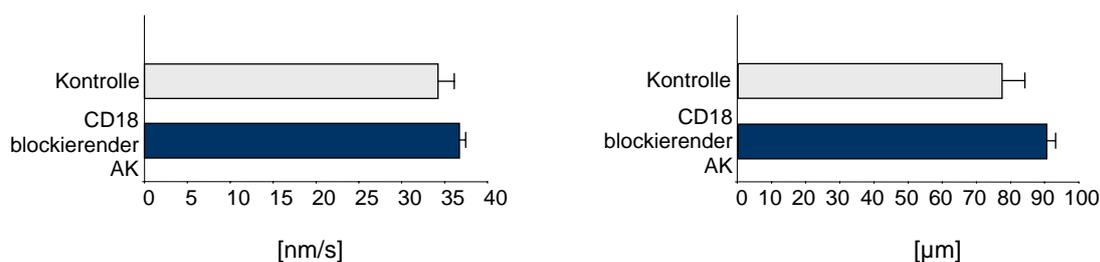
Reife MoDC zeigen, nach Inkubation mit der Isotyp-Kontrolle, auf einer Kollagen-Matrix (2D) eine directionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.30, A). Die Inhibition der CD18-Funktion mittels 7E4 zeigt keinen negativen Effekt auf die Migration reifer MoDC (Abb. 3.30, B), sondern die Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht (Abb. 3.30, A und B, Diagramme).

Reife MoDC legen nach Inkubation mit einer Isotyp-Kontrolle in einem Kollagen-Gel (3D) persistente und lange Wegstrecken zurück, zeigen jedoch keine directionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.31, A). Die Inhibition der CD18-Funktion durch 7E4 stört die Migration reifer MoDC nicht (Abb. 3.31, B). Die Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind im Vergleich zu Kontrollzellen auch innerhalb eines Kollagen-Gels leicht erhöht (Abb. 3.31, A und B, Diagramme).



**A – Kontrolle**

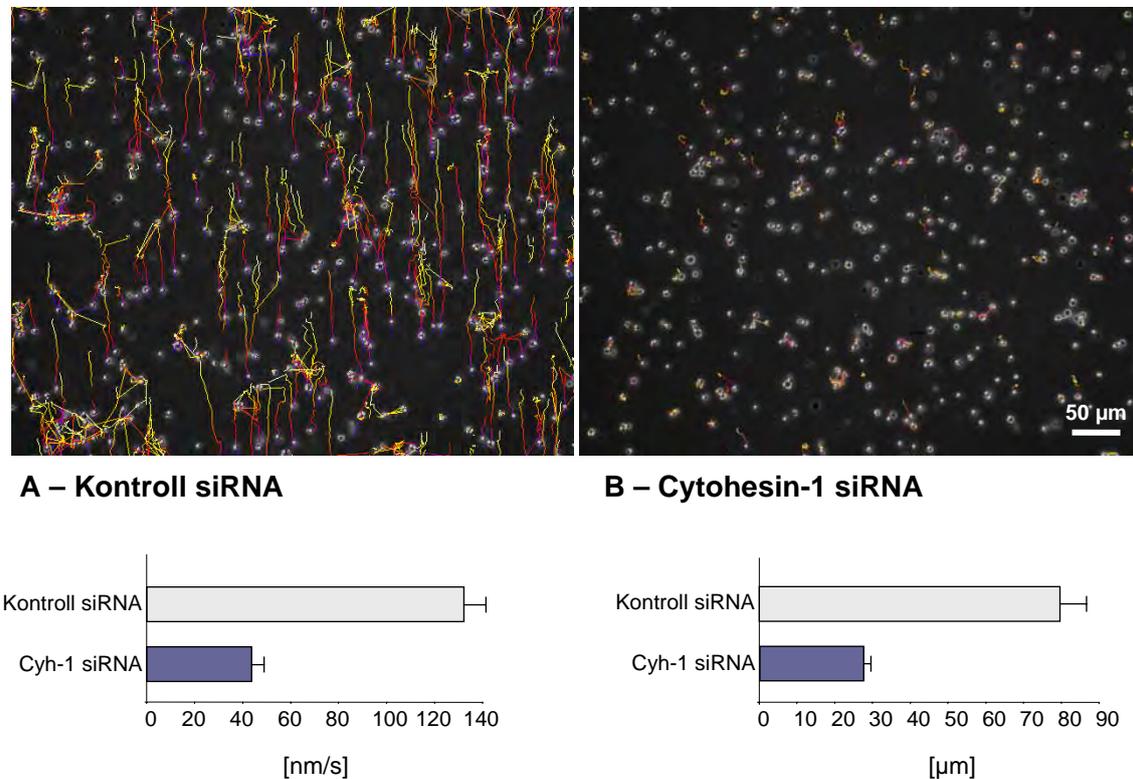
**B – CD18 blockierender AK**



**Abb. 3.31 Die Migration reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (3D) ist nach Inhibition der CD18-Funktion erhöht.** Der monoklonale Antikörper 7E4 blockiert die Funktion von CD18. Inkubation reifer MoDC mit 7E4 (B) führt zu einer Steigerung der Migration innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche mit einer Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden (A). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [µm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

### 1.7.3 BM-DC, DIE KEINE INTEGRINE EXPRIMIEREN, ZEIGEN ERST NACH RNAI VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP EINE GESTÖRTE MIGRATION

Die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration reifer MoDC erforderlich (siehe 3.8). Ebenso regulieren beide Proteine die Aktivität der Integrin-Untereinheit CD18 (siehe 3.11.2). CD18 scheint für die Migration reifer MoDC jedoch nicht von Bedeutung zu sein (siehe 3.14). Um weiterhin auszuschließen, dass der Effekt der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP auf die Migration reifer MoDC unabhängig von CD18 verläuft, wurden Migrationsexperimente mit murinen BM-DC, die von  $\alpha V$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrin ‚knock-out‘ C57/BL6-Mäusen stammen, durchgeführt. Das Knochenmark dieser Mäuse wurde freundlicherweise von M. Sixt zur Verfügung gestellt.

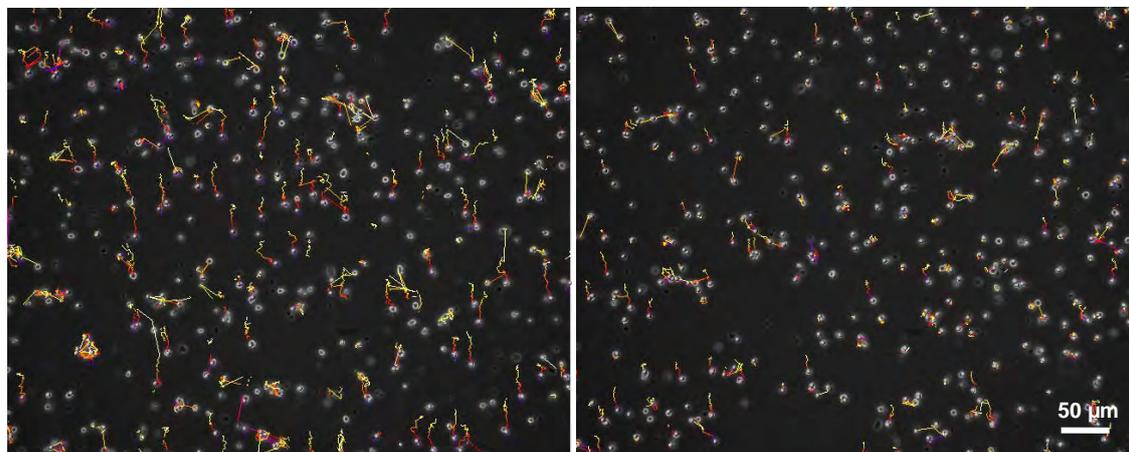


**Abb. 3.32 Vierfach Integrin-,knock-out‘-BM-DC zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) erst nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ eine gestörte Migration.** BM-DC, die von  $\alpha V$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrin ‚knock-out‘-C57/BL6-Mäusen stammen, zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) eine directionale Migration in Richtung des Chemokins CCL19 (A). Cytohesin-1 ‚knock-down‘ in diesen Zellen führt zu einer drastischen Inhibition der Migration auf Kollagen (B). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [ $\mu\text{m}$ ] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

Das Knochenmark der vierfachen Integrin-,knock-out‘-Maus wurde 6-8 Tage in Gegenwart des Zytokins GM-CSF kultiviert. In dieser Zeit differenzierten die Zellen zu DC. Die Zellen wurden daraufhin mit muriner Cytohesin-1- bzw. CYTIP- spezifischer siRNA elektroporiert, nach drei Tagen mit LPS maturiert und 24 Stunden später für Migrationsassay auf (2D, siehe 3.8.2) und

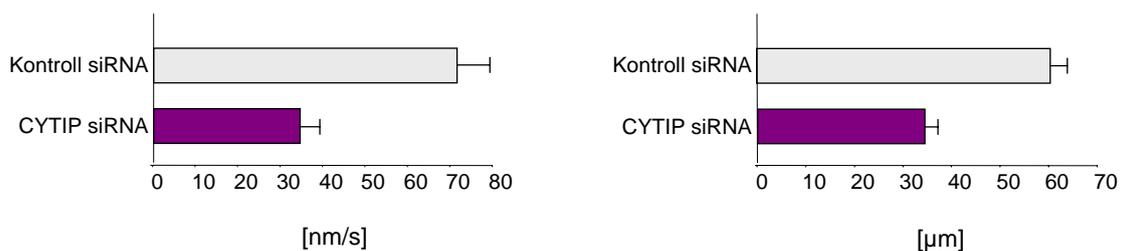
innerhalb (3D, siehe 3.8.3) einer Kollagen-Matrix eingesetzt. Die BM-DC zeigen keine gestörte Migration in einem Kollagen-Gel (3D) im Vergleich zu BM-DC, die von Wildtyp-C57/BL6-Mäusen stammen (Daten nicht gezeigt). Die erstellten Phasenkontrastaufnahmen wurden zu einem Film zusammengestellt (siehe beigefügte CD) und die Wanderung der Zellen mit Hilfe der Imaris-Software analysiert (siehe 3.8.2).

Reife BM-DC, die weder  $\alpha$ V-,  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>- und  $\beta$ <sub>7</sub>-Integrine exprimieren und mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, migrieren auf einer Kollagen-Matrix (2D) direktional in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.32, A). Cytohesin-1 'knock-down' in diesen Zellen inhibiert die Migration auf einer Kollagen-Matrix (2D) fast vollständig - durchschnittliche Geschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Weglänge sind stark reduziert (Abb. 3.32, A und B, Diagramme).



**A – Kontroll siRNA**

**B – CYTIP siRNA**

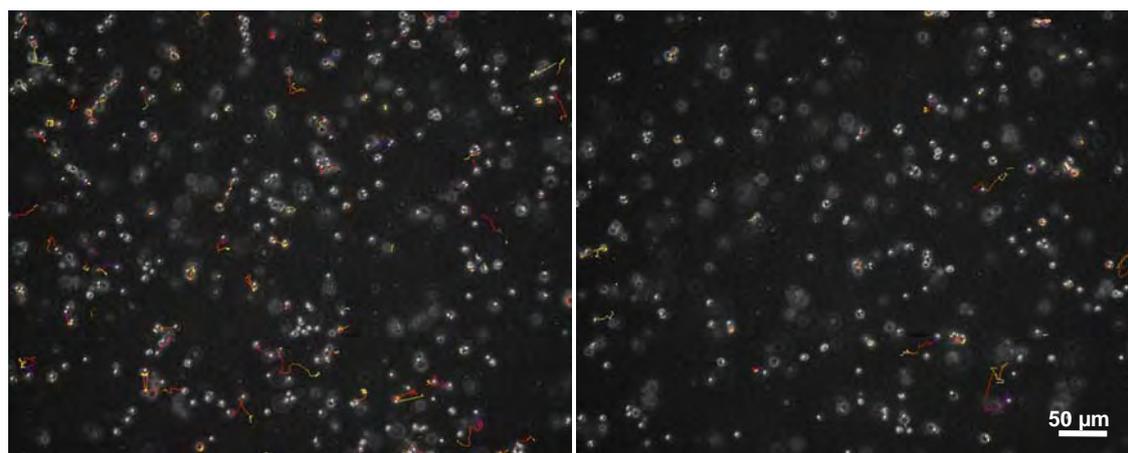


**Abb. 3.33 Vierfach Integrin-,knock-out'-BM-DC zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) erst nach CYTIP ,knock-down' eine gestörte Migration.** BM-DC, die von  $\alpha$ V-,  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>- und  $\beta$ <sub>7</sub>-Integrin ,knock-out' C57/BL6-Mäusen stammen, zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) eine directionale Migration in Richtung des Chemokins CCL19 (A). CYTIP ,knock-down' in diesen Zellen führt zu einer leichten Inhibition der Migration auf Kollagen (B). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [µm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

Auch CYTIP 'knock-down' in reifen BM-DC, die keine  $\alpha$ V-,  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>- und  $\beta$ <sub>7</sub>-Integrine exprimieren, reduziert die Migration der Zellen auf einer Kollagen-Matrix (2D), wenn auch

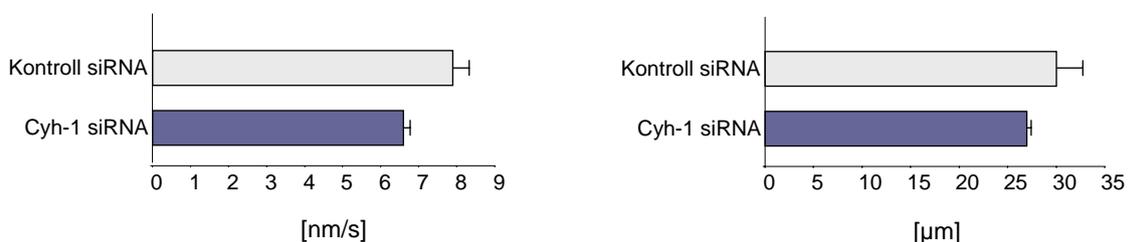
weniger stark als Cytohesin-1. Reife BM-DC, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, migrieren direktional in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.33, A). RNAi von CYTIP führt zu einer gravierend reduzierten Geschwindigkeit und zurückgelegten Wegstrecke (Abb. 3.33, A und B, Diagramme).

Die Variationen zwischen beiden Kontroll-Ansätzen (Abb. 3.32, A und 3.33, A) können durch den Gebrauch unterschiedlicher Mengen elektroporierter siRNA - 5  $\mu\text{g}$  für die Cytohesin-1 Kontrolle und 10  $\mu\text{g}$  für die CYTIP-Kontrolle - zustande kommen.



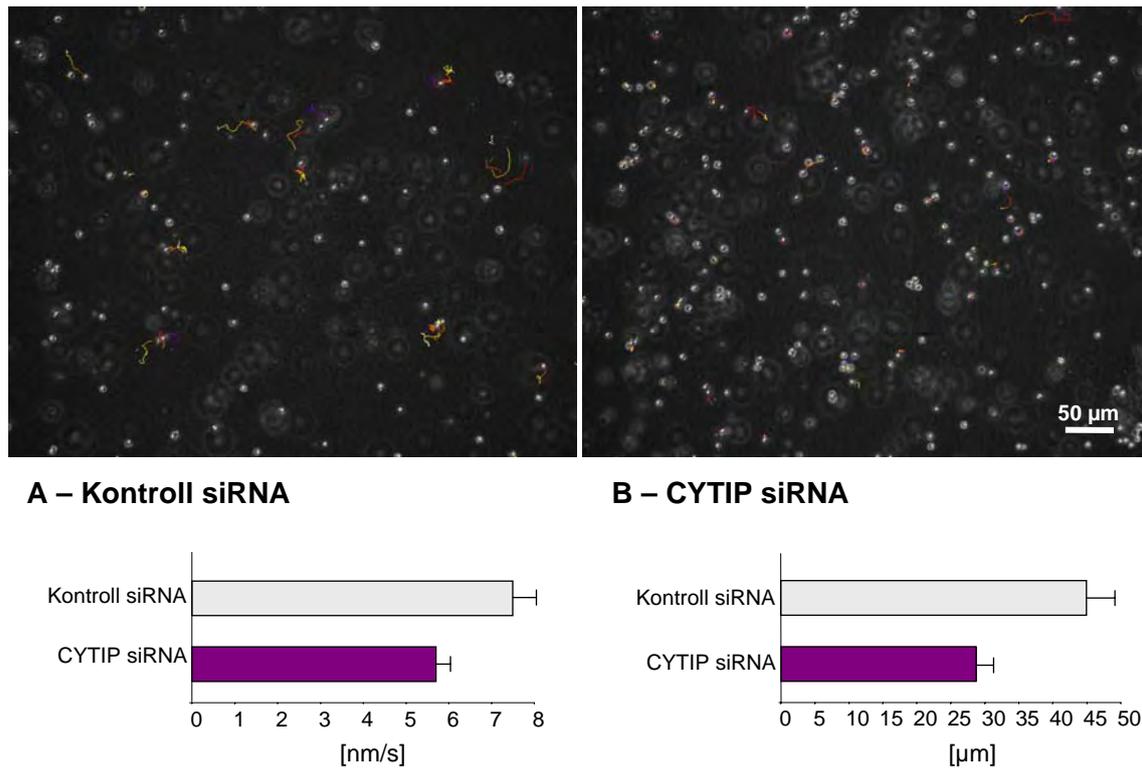
**A – Kontroll siRNA**

**B – Cytohesin-1 siRNA**



**Abb. 3.34 Vierfach Integrin-,knock-out'-BM-DC zeigen innerhalb einer Kollagen-Matrix (3D) nach Cytohesin-1 'knock-down' eine verringerte Migration.** Cytohesin-1 'knock-down' in BM-DC, die von  $\alpha\text{V}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrin 'knock-out' C57/BL6-Mäusen stammen, führt zu einer Inhibition der Migration innerhalb des Kollagen-Gels (B). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [ $\mu\text{m}$ ] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

Innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) weisen reife BM-DC, die keine  $\alpha\text{V}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine exprimieren, eine schwache und nicht direktionale Migration auf (Abb. 3.34, A und 3.35, A). Cytohesin-1 'knock-down' in reifen vierfach Integrin-,knock-out'-BM-DC inhibiert die Migration der Zellen fast vollständig (Abb. 3.34, B). Nach Cytohesin-1 'knock-down' sind die Zellen nur noch wenig motil und bis auf wenige Ausnahme sind keine translozierenden Zellen zu detektieren. Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind reduziert (Abb. 3.34, A und B, Diagramme).



**Abb. 3.35 Vierfach Integrin-,knock-out'-BM-DC zeigen innerhalb einer Kollagen-Matrix (3D) erst nach CYTIP ,knock-down' eine gestörte Migration.** CYTIP ,knock-down' in BM-DC, die von  $\alpha\text{V}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrin ,knock-out'-C57/BL6-Mäusen stammen, führt zu einer Inhibition der Migration innerhalb des Kollagen-Gels (B). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [ $\mu\text{m}$ ] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

Ebenso inhibiert CYTIP 'knock-down' in reifen BM-DC, die keine  $\alpha\text{V}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine exprimieren, die Migration im Kollagen-Gel (3D) deutlich und diesmal im Vergleich zum Cytohesin-1 ,knock-down' stärker. Nach CYTIP ,knock-down' translozieren nur noch sehr wenige der immer noch motilen Zellen - die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind stark reduziert (Abb. 3.35, A und B, Diagramme). Das Experiment zeigt, dass reifer BM-DC trotz fehlender  $\alpha\text{V}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine auf einer Kollagen-Matrix (2D) und innerhalb eines Kollagen-Geles (3D) migrieren können. Erst RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP inhibiert die Migration dieser Zellen fast vollständig.

---

## **1.8 DIE BEDEUTUNG DER PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE FÜR DIE FUNKTION VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP IN REIFEN MoDC**

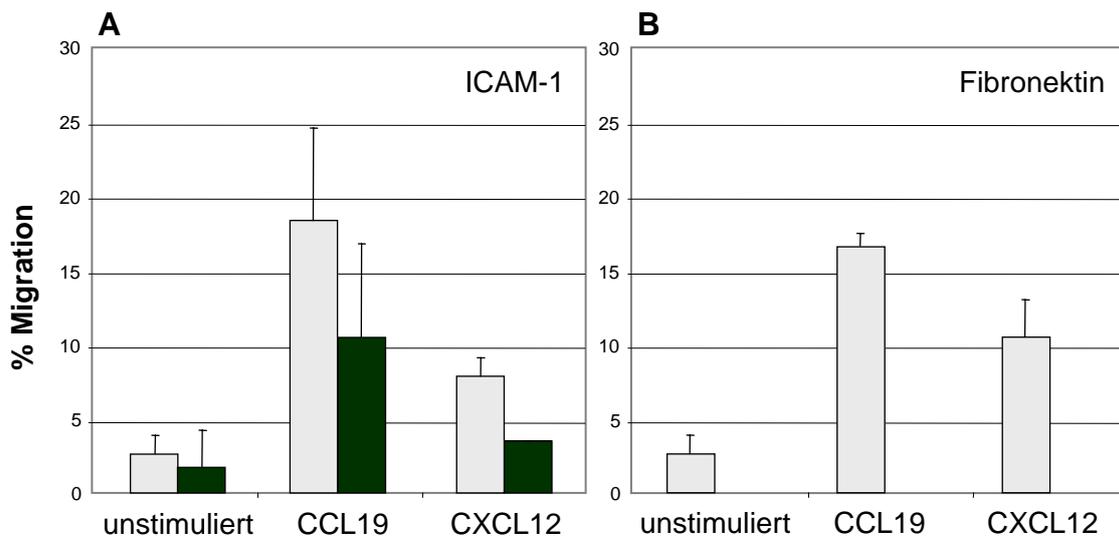
Eine Vielzahl von Chemokin-Rezeptoren, einschließlich CCR7 und CXCR4, aktiviert nach Bindung ihrer Liganden die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), insbesondere PI3-K $\gamma$  (Ward 2004). Ihr kommt eine Schlüsselfunktion zu, da ihre Produkte, die 3-Phosphoinositide, als sogenannte ‚second messenger‘ zahlreiche Signalwege aktivieren, die für die Migration von Zellen wichtig sind. Auf diese Weise kann die PI3-Kinase die Aktivität von AKT/PKB, Rho-GTPasen, ARF-GTPasen und MAP-Kinasen regulieren (Procko und McColl 2005). Die Bedeutung der PI3-Kinase für die Migration und Adhäsion humaner MoDC und eine Beeinflussung der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

### **1.8.1 DIE PI3-KINASE REGULIERT DIE MIGRATION REIFER MoDC AUF ICAM-1 UND FIBRONEKTIN**

Im Trans-well-Versuch wurde untersucht, ob die Migration reifer MoDC auf dem  $\beta_2$ -Integrin Liganden ICAM-1 und auf dem  $\beta_1$ -Integrin Liganden Fibronectin nach Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002 gestört ist.

Reife MoDC wurden nach einstündiger Inkubation mit LY294002 auf Filter gegeben, welche entweder mit ICAM-1 oder Fibronectin beschichtet waren. Die Migration wurden mit 200 ng/ml CCL19 oder 200 ng/ml CXCL12 stimuliert. LY294002 ist in DMSO gelöst, so dass als Kontrolle reife MoDC verwendet wurden, welche mit demselben Volumen DMSO inkubiert wurden. Die Auswertung des Versuches erfolgte nach einer Migrationszeit von vier Stunden.

Abb. 3.36 zeigt, dass die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und auf Fibronectin nach CCL19- bzw. nach CXCL12-Stimulation steigt. Eine Hemmung der PI3-Kinase reduziert die Migrationsrate auf ICAM-1 sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19 bzw. nach CXCL12-Stimulation (Abb. 3.36, A). Auf Fibronectin ist die Migration reifer MoDC nach Inhibition der PI3-Kinase nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 3.45, B).

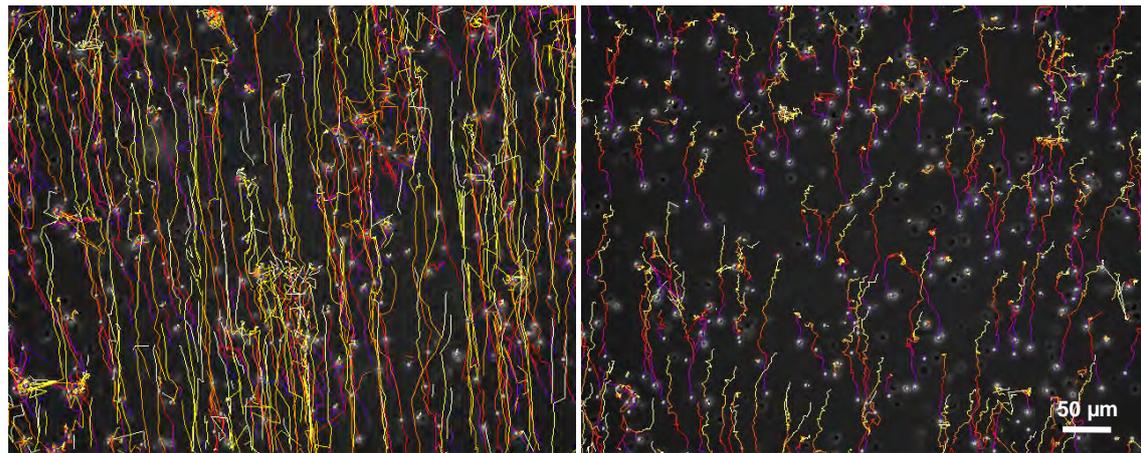


**Abb. 3.36 Die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin im Trans-well Versuch benötigt die Aktivität der PI3-Kinase.** Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 reduziert die Migration reifer DC auf ICAM-1 im unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten Zustand (A). Auf Fibronectin ist keine Migration reifer MoDC nach Hemmung der PI3-Kinase mehr festzustellen (B).

Kontrolle  
 LY294002

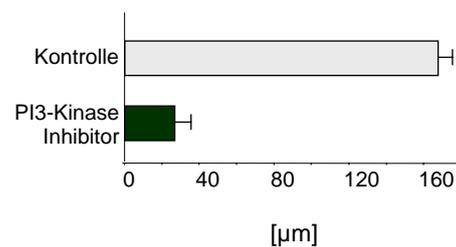
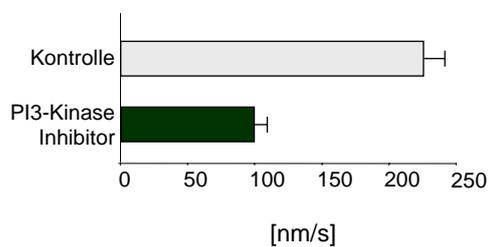
### 1.8.2 DIE PI3-KINASE VERMITTELT DIE MIGRATION REIFER MODC AUF FIBRILLÄREM KOLLAGEN (2D) UND INNERHALB KOLLAGENS (3D)

Die PI3-Kinase ist für die Migration reifer MoDC im Trans-well-Versuch erforderlich. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die PI3-Kinase auch für die Migration der Zellen auf einem Kollagen-Substrat (2D) und innerhalb Kollagens (3D) erforderlich ist. Die erstellten Phasenkontrastaufnahmen wurden zu einem Film zusammengestellt (siehe beigefügte CD) und die Wanderung der Zellen mit Hilfe der Imaris-Software analysiert (siehe 3.8.2). Der Inhibitor war während der Durchführung des gesamten Versuches anwesend. Da Ly294002 in DMSO gelöst ist, dienten reife MoDC, welche mit demselben Volumen DMSO inkubiert wurden, als Kontrolle.



A – Kontrolle

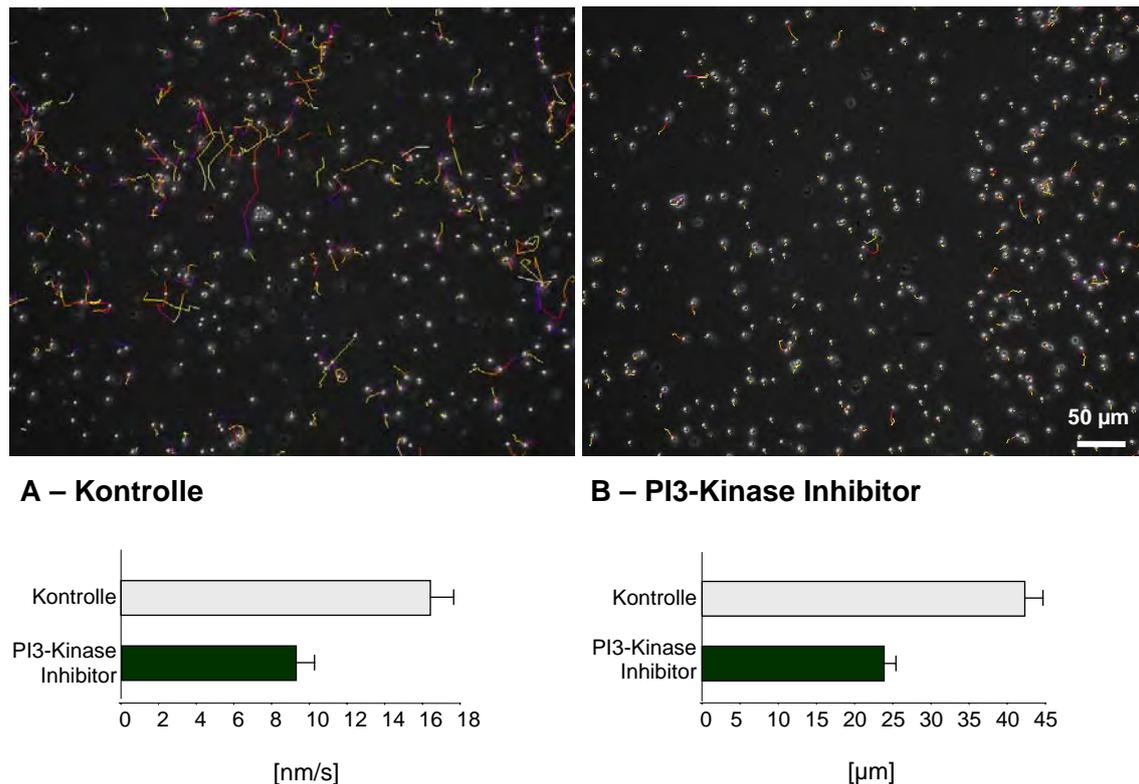
B – PI3-Kinase Inhibitor



**Abb. 3.37 Die Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) ist nach Inhibition der PI3-Kinase verringert.** Reife MoDC migrieren auf einer Kollagen-Matrix (2D) directional in Richtung des applizierten Chemokins (A). Hemmung der PI3-Kinase mit Hilfe des Inhibitors LY294002 führt dazu, dass die Zellen langsamer, aber immer noch directional wandern (B). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [nm/s] und Wegstrecke [µm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

Reife MoDC zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) eine directionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.37, A). Hemmung der PI3-Kinase in reifen MoDC führt zu einer stark verringerten Migration - durchschnittliche Geschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Weglänge sind reduziert (Abb. 3.37, A und B, Diagramme), jedoch zeigen die Zellen immer noch eine directionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins.

Reife MoDC weisen in einem Kollagen-Gel (3D) persistente Wegstrecken auf, zeigen jedoch keine directionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.38, A). Inhibition der PI3-Kinase hemmt die Migration der Zellen fast vollständig (Abb. 3.38, B). Nach Hemmung der PI3-Kinase sind die Zellen nur noch wenig motil und bis auf wenige Ausnahmen sind keine translozierenden Zellen zu detektieren – die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit und die im Mittel zurückgelegte Wegstrecke sind reduziert (Abb. 3.38, A und B, Diagramme).

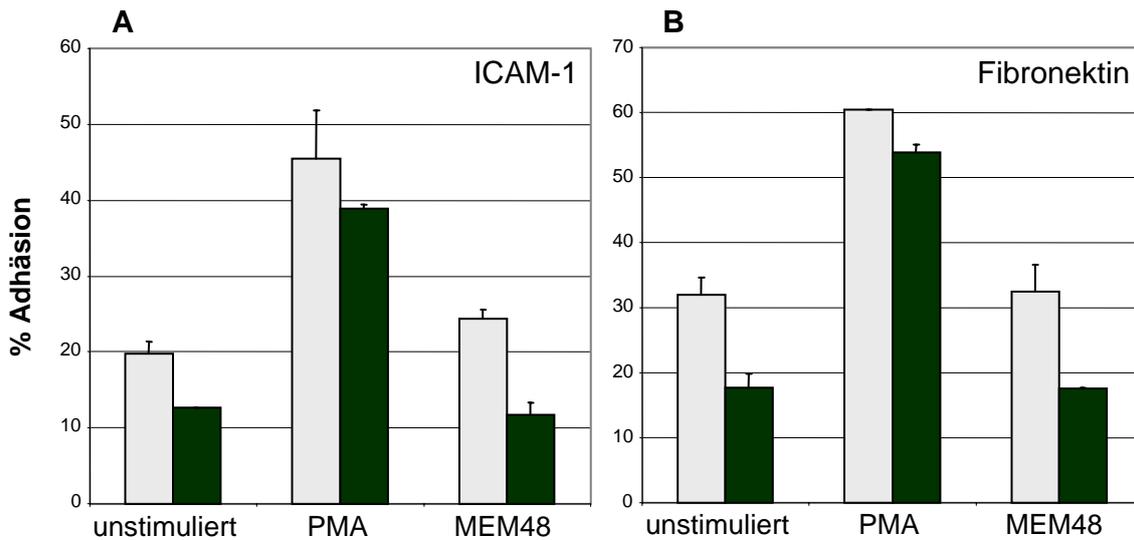


**Abb. 3.38 Die Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach Inhibition der PI3-Kinase gestört.** Reife MoDC migrieren innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) persistent, aber nicht direktional (A). Hemmung der PI3-Kinase mit Hilfe des Inhibitors LY294002 führt dazu, dass die Migration der Zellen stark beeinträchtigt ist (B). Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeiten [nm/s] und Wegstrecken [µm] wurden mit der Imaris-Software ermittelt.

### 1.8.3 DIE PI3-KINASE VERMITTELT DIE STATISCHE ADHÄSION REIFER MoDC AUF ICAM-1 UND FIBRONEKTIN

Es sollte untersucht werden, ob eine Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002 in reifen MoDC eine veränderte statische Adhäsion auf ICAM-1 -  $\beta_2$ -Integrin-Ligand - und auf Fibronectin -  $\beta_1$ -Integrin-Ligand - verursacht. Die Adhäsion wurde mit dem Phorbolster PMA und dem CD18-aktivierenden Antikörper MEM48 stimuliert.

Abb. 3.39 zeigt, dass die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 (A) und Fibronectin (B) nach PMA- bzw. nach MEM48-Stimulation steigt. Die Hemmung der PI3-Kinase reduziert die Adhäsion auf beiden Liganden sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach PMA- bzw. nach MEM48-Stimulation.



**Abb. 3.39 Die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin benötigt die Aktivität der PI3-Kinase.** Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 reduziert die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 (A) und Fibronectin (B) im unstimulierten Zustand und nach Aktivierung von CD18 durch MEM48. Die durch PMA stimulierte Adhäsion an ICAM-1 und Fibronectin ist nach Hemmung der PI3-Kinase nur wenig reduziert.

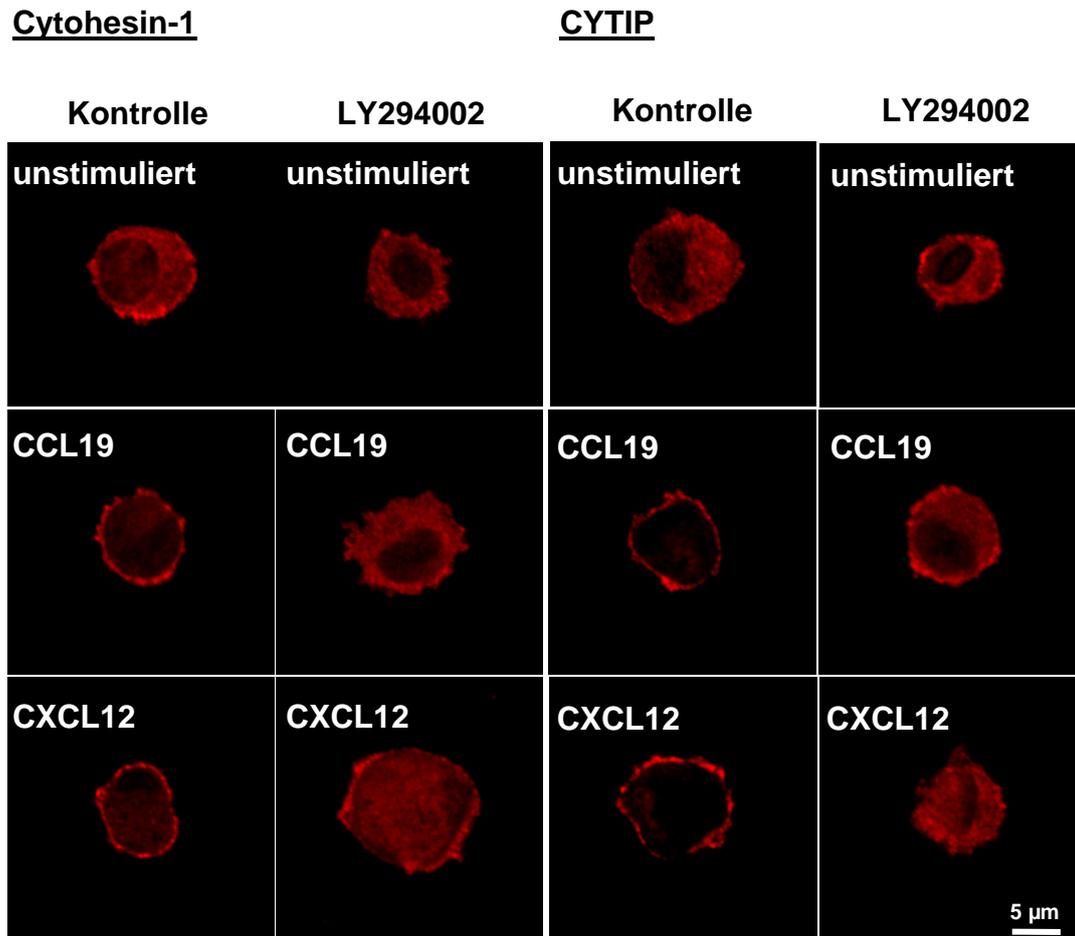
Kontrolle  
 LY294002

#### 1.8.4 DIE PI3-KINASE VERMITTELT DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE TRANSLOKATION VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP VOM ZYTOPLASMA AN DIE PLASMAMEMBRAN

Cytohesin-1 bindet über dessen PH-Domäne an Phosphatidylinositol-(3,4)-bis-Phosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol-(3,4,5)-tris-Phosphat (PIP<sub>3</sub>), die Produkte der PI3-Kinase in der Plasmamembran (Nagel *et al.* 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine konstitutiv aktive PI3-Kinase ausreicht, um die Adhäsion von Jurkat-Zellen an ICAM-1 zu stimulieren. Überexpressionsstudien konnten belegen, dass diese Aktivierung der Adhäsion über Cytohesin-1 verläuft (Nagel *et al.* 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translokation von endogenem Cytohesin-1 und CYTIP infolge einer Chemokin-Stimulation PI3-Kinase abhängig ist. Hierfür wurden reife MoDC eine Stunde mit dem Inhibitor LY294002 inkubiert. Da dieser PI3-Kinase-Inhibitor in DMSO gelöst ist, wurden Kontroll-Zellen mit demselben Volumen DMSO inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen adhärirt, mit CCL19 bzw. CXCL12 stimuliert oder unstimuliert belassen, fixiert und Cytohesin-1 oder CYTIP mit den Antikörpern 7H2 bzw. 2F9 angefärbt.

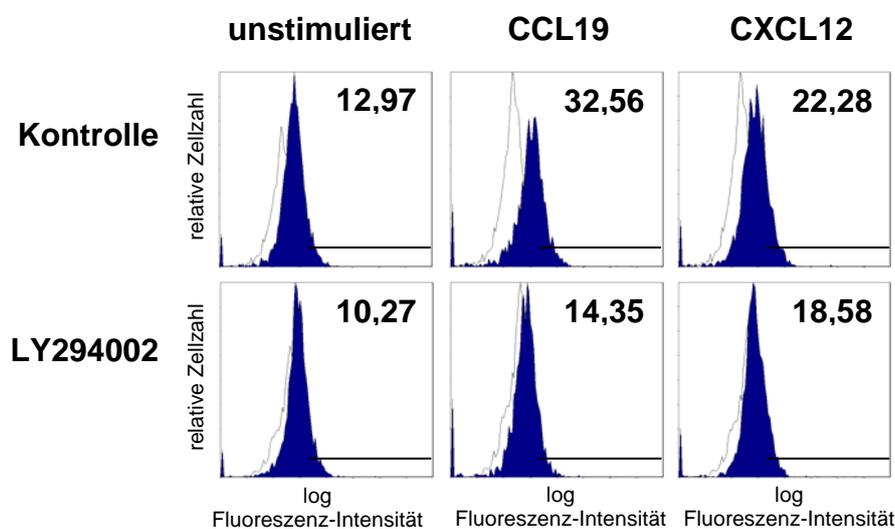
Wie bereits gezeigt, befinden sich Cytohesin-1 und CYTIP in unstimulierten reifen MoDC im Zytoplasma und translozieren nach CCL-19- bzw. CXCL12-Stimulation an die Plasmamembran. Die Hemmung der PI3-Kinase verhindert diese Translokation. Cytohesin-1 und CYTIP verbleiben auch nach erfolgter Stimulation der Zellen mit CCL19 oder CXCL12 im Zytoplasma (Abb. 3.40).



**Abb. 3.40 Immunfluoreszenzaufnahmen von Cytohesin-1 und CYTIP in reifen MoDC nach Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 im Vergleich zu Kontroll-Zellen.** Cytohesin-1 und CYTIP befinden sich in unstimulierten Kontroll-Zellen im Zytoplasma und translozieren nach CCL19- bzw. CXCL12-Stimulation an die Plasmamembran. Die Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 verhindert diese Translokation.

### 1.8.5 DIE PI3-KINASE IST FÜR DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CD18 ERFORDERLICH

Die PI3-Kinase wird durch die Bindung von Chemokinen an ihren Rezeptor aktiviert und diese Aktivierung ist notwendig, damit Cytohesin-1 und CYTIP vom Zytoplasma an die Plasmamembran translozieren (siehe 3.15.4). Die Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP an die Plasmamembran und die folgende Co-Lokalisation mit CD18 scheint entscheidend für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 (siehe 3.11.2). Infolgedessen sollte geprüft werden, ob die Aktivität der PI3-Kinase ebenso für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 in reifen MoDC notwendig ist.



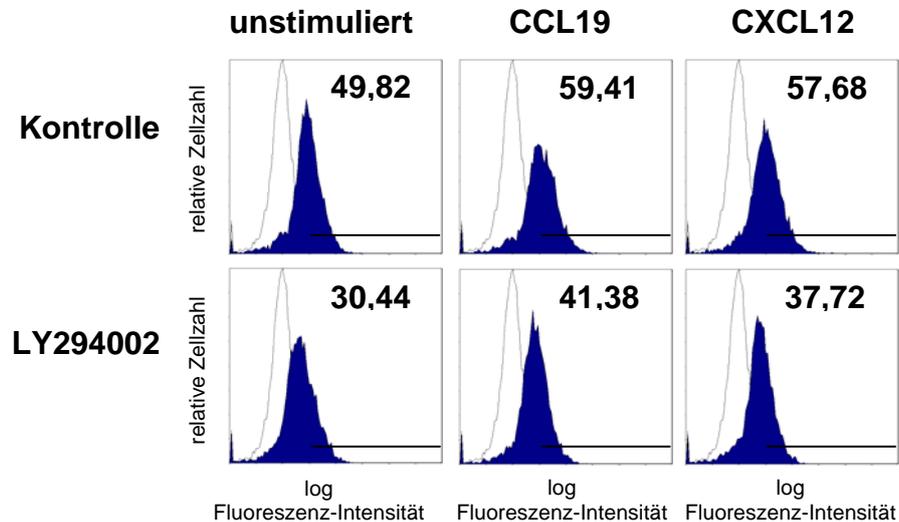
**Abb. 3.41** FACS-Analyse der Expression des 327C-Aktivierungsepitopes von CD18 nach Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002. Die Expression des Aktivierungsepitopes, welches durch den Antikörper 327C auf der extrazellulären Domäne von CD18 erkannt wird, sinkt nach Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten reifen MoDC.

Die Aktivierung von Integrinen wird durch eine Konformationsänderung induziert, welche zur Expression von Eptiopen führt, die von den Antikörpern 327C und mAB24 erkannt werden (Beals *et al.* 2001; Salas *et al.* 2004). Beide Antikörper werden hier verwendet, um die Bedeutung der PI3-Kinase für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 in der FACS-Analyse zu untersuchen.

Reife MoDC werden eine Stunde mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 inkubiert und anschließend mit den Antikörpern 327C bzw. mAB24 gefärbt.

Abb. 3.41 zeigt, dass die Expression des Epitopes, welches durch den Antikörper 327C erkannt wird, nach CCL19- bzw. CXCL12-Stimulation steigt. Die Hemmung der PI3-Kinase reduziert die Expression des 327C-Epitopes sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19-

bzw. CXCL12-Stimulation reifer MoDC. Demnach ist die Expression des 327C-Aktivierungsepitopes nach Hemmung der PI3-Kinase und damit die Aktivierung von CD18 auf reifen MoDC reduziert.



**Abb. 3.42 FACS-Analyse der Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes von CD18 nach Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002.** Die Expression des Aktivierungsepitopes, welches durch den Antikörper mAB24 auf der extrazellulären Domäne von CD18 erkannt wird, sinkt nach Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 auf unstimulierte, CCL19- und CXCL12-stimulierte mDC.

Abb. 3.42 zeigt, dass die Expression des Epitopes, welches durch den Antikörper mAB24 erkannt wird, auf unstimulierten Kontroll-Zellen bereits sehr stark exprimiert wird. CCL19 und CXCL12 erhöhen die Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes weiter. Die Hemmung der PI3-Kinase reduziert die Expression des mAB24-Epitopes sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19- bzw. CXCL12-Stimulation reifer MoDC. Die Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes ist somit nach Inhibition der PI3-Kinase verringert. Dies zeigt, dass die PI3-Kinase für die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 auch in reifen MoDC benötigt wird.

---

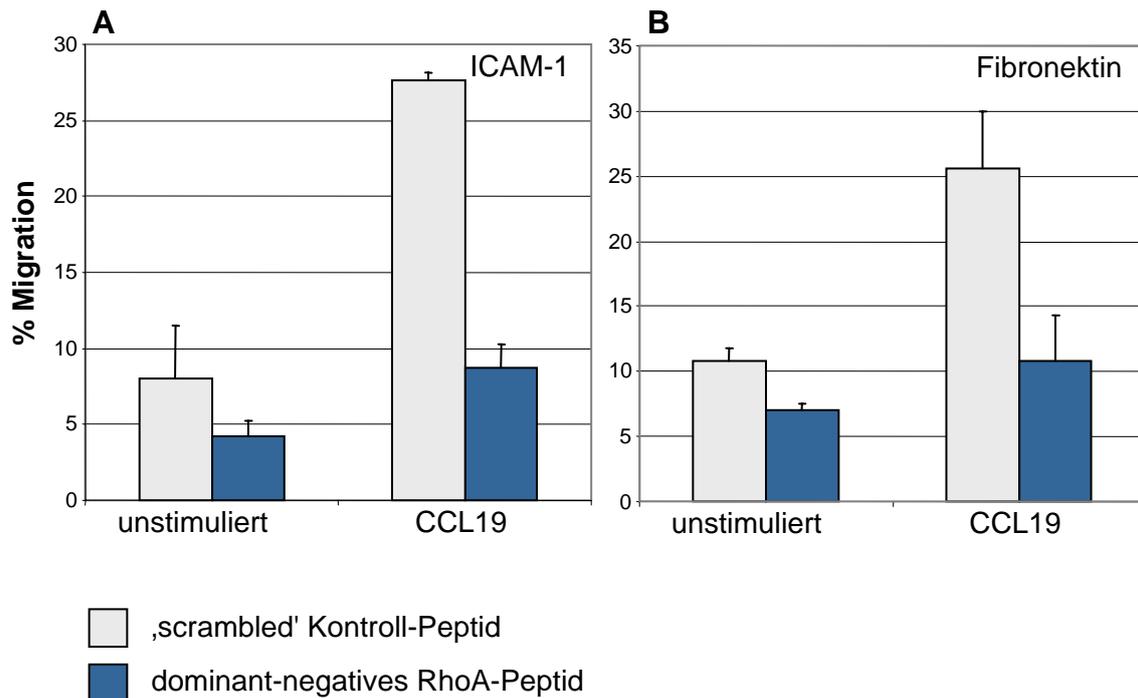
## 1.9 DIE REGULATION DER RHO-GTPASEN RHOA UND RAC1 DURCH CYTOHESIN-1 UND CYTIP

Die kleinen Rho-GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie. Die prominentesten Beispiele sind RhoA, Rac1 und Cdc42 (Bishop und Hall 2000). Sie sind in zahlreiche zelluläre Prozesse wie Migration, Adhäsion, Transkription, Zellzyklus, Zellmorphogenese und Vesikeltransport involviert (Jaffe und Hall 2005; Ridley 2001; Ridley 2006). Am besten ist der Einfluß von Rho GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett während der Zellmigration untersucht (Ridley 2001). Rac1 reguliert die Entstehung von Lamellipodien (Small *et al.* 2002), Cdc42 die Ausbildung von Filopodien (Lauffenburger und Horwitz 1996). RhoA ist in die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik (Small *et al.* 2002) und die Kontraktilität des Aktomyosinsystems involviert (Yoshioka *et al.* 1998). Die Aktivität der Rho GTPasen führt zu einer Polarität der Zelle, die für eine gerichtete Migration essenziell ist (Fukata *et al.* 2003).

Der Verlust der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP in reifen MoDC führt zu einer gestörten Migration. Es sollte untersucht werden, ob die GTPasen RhoA und Rac1 für die Migration humaner MoDC benötigt und ihre Aktivierung durch RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP verändert ist. Weiterhin wurde das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen in reifen MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ untersucht werden.

### 1.9.1 RHOA REGULIERT DIE MIGRATION REIFER MODC

Zunächst wurde in einem Trans-well-Experiment untersucht, ob die GTPase RhoA für die Migration humaner, reifer MoDC in Richtung des Chemokins CCL19 erforderlich ist. Hierzu wurde ein dominant-negatives Peptid verwendet, welches die Funktion von RhoA inhibiert. Dieses Peptid besteht aus einer Domäne des RhoA-Peptides, welche im Bereich der Aminosäuren 23 bis 40 liegt und Effektorfunktionen vermittelt. Diese Domäne inhibiert kompetitiv die Interaktion des endogenen RhoA mit spezifischen Effektoren (Giagulli *et al.* 2004). Damit das Peptid die Zellmembran passieren kann, ist es mit Penetratin fusioniert, der dritten Helix der Homeodomäne des Transkriptionsfaktors Antennapedia aus *Drosophila melanogaster* (Schwarze *et al.* 2000). Penetratin ist eine sogenannte Protein-Transduktions-Domäne (PTD), welche Energie- und Rezeptor-unabhängig Plasmamembranen passieren (Binder und Lindblom 2003). Es wird vermutet, dass basische Arginin-reiche Regionen in PTDs die Interaktion mit der negativ geladenen Plasmamembran vermitteln und es daraufhin, entweder direkt oder über die Bildung einer Mizelle, zur Überquerung der Plasmamembran kommt (Prochiantz 2000). Das Fusionspeptid wurde freundlicherweise von C. Laudanna zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.43 Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin nach Hemmung der RhoA-Aktivität im Trans-well Versuch.** Die Migration reifer MoDC in Richtung des Chemokins CCL19 ist nach Inhibition der RhoA-Aktivität auf ICAM-1 und Fibronectin im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontroll-Peptid („scrambled“-Peptid) inkubiert wurden, stark reduziert.

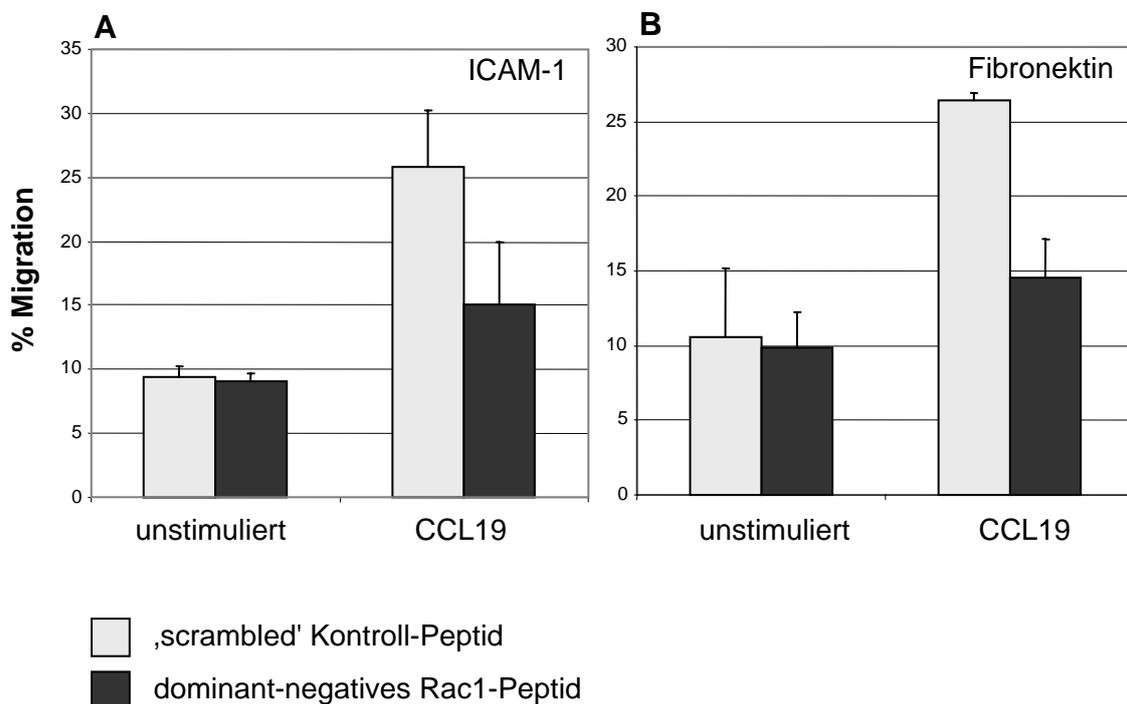
Reife MoDC wurden 1 Stunde mit 50  $\mu$ M des dominant-negativen RhoA-Peptides oder einem „scrambled“-Kontroll-Peptid, bestehend aus dergleichen Aminosäuren, jedoch in willkürlicher Anordnung, inkubiert. Anschließend wurde ein Trans-well-Experiment wie in 3.8.1 beschrieben durchgeführt. Das dominant-negative Peptid bzw. das Kontroll-Peptid waren während der Durchführung des gesamten Experimentes anwesend.

Abb. 3.43 zeigt, die Migration der Zellen auf ICAM-1 und Fibronectin beschichteten Trans-well-Filtern. Die Migration steigt in Anwesenheit des Chemokins CCL19. Wird RhoA durch das dominant-negative Peptid inhibiert, sinkt die Migration sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19-Stimulation. RhoA ist damit für die Migration humaner, reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin essenziell.

### 1.9.2 RAC1 KOORDINIERT DIE MIGRATION REIFER MoDC

Die GTPase RhoA wird für die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin beschichteten Trans-well-Filtern in Richtung des Chemokins CCL19 benötigt (siehe 3.16.1). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die GTPase Rac1 unter dergleichen Versuchsbedingungen ebenso für die Migration reifer MoDC erforderlich ist. Hierzu wurde ein dominant-negatives Rac1-Peptid verwendet, welches die Funktion von Rac1 inhibiert. Dieses

Peptid besteht aus der C-terminalen polybasischen Domäne von Rac1, welche unter den Rho-GTPasen am meisten divergiert. Sie ist für die Lokalisation der GTPasen in der Zelle und spezifische Interaktionen mit Effektoren verantwortlich. Die C-terminale Domäne von Rac1 wurde mit dem TAT-Protein des HI-Virus fusioniert, welches wie Penetratin eine Protein-Transduktions-Domäne (PTD) ist (siehe 3.32) und so das Passieren der Plasmamembran vermittelt. Die Anwesenheit der C-terminalen Domäne von Rac1 inhibiert kompetitiv die Plasmamembran-Lokalisation des endogenen Rac1 und dessen Interaktion mit spezifischen Effektoren (van Hennik *et al.* 2003). Das Fusionspeptid aus der C-terminalen Domäne des Rac1 und des TAT-Proteins wurde kommerziell erworben (BioGenes, Berlin).



**Abb. 3.44 Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronektin nach Hemmung der Rac1-Aktivität im Trans-well-Versuch.** Die Migration reifer MoDC in Richtung des Chemokins CCL19 ist nach Inhibition der Rac1-Aktivität auf ICAM-1 und Fibronektin im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontroll-Peptid („scrambled“-Peptid) inkubiert wurden, reduziert.

Reife MoDC wurden 1 Stunde mit 500 ng/ml des dominant-negativen Rac1-Peptides oder des „scrambled“-Kontroll-Peptides, bestehend aus dergleichen Aminosäuren, jedoch in willkürlicher Anordnung, inkubiert. Anschließend wurde ein Trans-well-Experiment wie in 3.8.1 beschrieben durchgeführt. Das dominant-negative Peptid bzw. dessen Kontrolle waren während der Durchführung des Experimentes anwesend.

Abb. 3.44 zeigt die Migration der Zellen auf ICAM-1 und Fibronektin beschichteten Trans-well-Filtern. Die Migration steigt in Anwesenheit des Chemokins CCL19. Wird Rac1 durch das dominant-negative Peptid inhibiert, sinkt die Migration sowohl im unstimulierten Zustand als

auch nach CCL19-Stimulation. Rac1 ist damit für die Migration humaner, reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin essenziell.

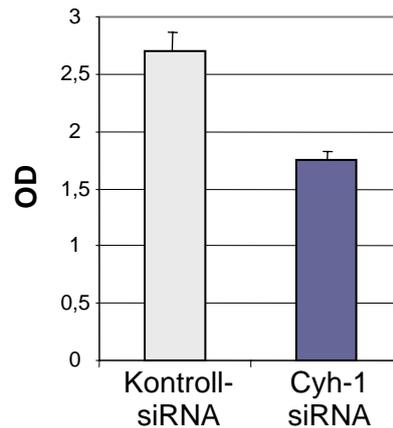
### **1.9.3 CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN DIE AKTIVITÄT DER GTPASEN RHOA UND RAC1**

Die GTPasen RhoA und Rac1 sind für die Migration humaner, reifer MoDC erforderlich (siehe 3.32 und 3.33). Ebenso sind die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP für die Migration dieser Zellen notwendig (siehe 3.8). Es sollte untersucht werden, ob die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP einen Einfluß auf die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1 haben und auf diese Weise die Migration reifer MoDC beeinflussen. Hierzu wurde die Aktivierung der GTPasen infolge einer CCL19 Stimulation in reifen MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP im Vergleich zu Kontroll-Zellen untersucht.

Ein kommerziell erworbener ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*; G-LISA™, Cytoskeleton, Denver, USA) wurde verwendet, um die Aktivität der GTPasen zu untersuchen. Der Boden einer 96-Loch Platte war hier mit einer RhoA/Rac-bindenden-Domäne (RBD) der RhoA- bzw. Rac1-Effektor-Familie beschichtet, welche ausschließlich von aktivem RhoA bzw. aktivem Rac1 gebunden wird (G-LISA-Platte). Reife MoDC wurden nach RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP 0,5, 3, 12 oder 30 Minuten mit dem Chemokin CCL19 stimuliert oder unstimuliert belassen und anschließend lysiert. Ebenso wurde mit Kontroll-Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden, verfahren. Totalzelllysate dieser Zellen wurden auf der G-LISA-Platte inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines anti-RhoA-Antikörpers bzw. eines anti-Rac1-Antikörpers und eines sekundären HRP (*horseradish-peroxidase*)-gekoppelten Antikörpers gebundenes RhoA/Rac1 detektiert und die Absorption des durch die Oxidase umgesetzten Substrates im Photometer bestimmt.

#### **1.9.3.1 CYTOHESIN-1 AKTIVIERT RHOA**

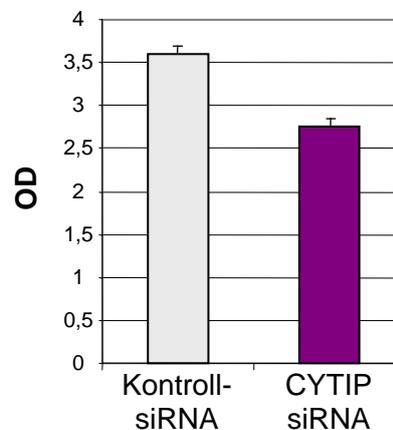
Abb. 3.45 zeigt die Aktivität von RhoA nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ in reifen MoDC im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Die RhoA-Aktivität korreliert mit der im Photometer bestimmten Absorption (siehe 3.16.3). Es wurde eine Zeitreihe mit 0, 0,5, 3, 12 oder 30 Minuten CCL19-Stimulation durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten konnte nach RNAi von Cytohesin-1 einer Verringerung der RhoA-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Zellen detektiert werden. Die Werte des Zeitpunktes, zu dem die RhoA-Aktivität im Kontroll-Ansatz maximal war (12 Minuten), wurden in einem Balken-Diagramm vergleichend dargestellt (Abb. 3.45). Cytohesin-1 ist demnach in die Regulation der RhoA-Aktivität involviert.



**Abb. 3.45 Die RhoA-Aktivität ist nach RNAi von Cytohesin-1 verringert.** In einer ELISA-Analyse wurde die Aktivität von RhoA zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer CCL19-Stimulation ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt war die Aktivität von RhoA nach RNAi von Cytohesin-1 verringert. Dargestellt sind die Werte nach 12 Minuten CCL19-Stimulation, zu dem eine maximale RhoA-Aktivität im Kontroll-Ansatz detektiert werden konnte. Cyh-1: Cytohesin-1

### 1.9.3.2 CYTIP-1 AKTIVIERT RHOA

Abb. 3.46 zeigt die Aktivität von RhoA nach CYTIP ‚knock-down‘ in reifen MoDC im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Die RhoA-Aktivität korreliert mit der im Photometer bestimmten Absorption (siehe 3.16.3).



**Abb. 3.46 Die RhoA-Aktivität ist nach RNAi von CYTIP verringert.** In einer ELISA-Analyse wurde die Aktivität von RhoA zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer CCL19-Stimulation ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt war die Aktivität von RhoA nach RNAi von CYTIP verringert. Dargestellt sind die Werte nach 12 Minuten CCL19-Stimulation, zu dem eine maximale RhoA-Aktivität im Kontroll-Ansatz detektiert werden konnte.

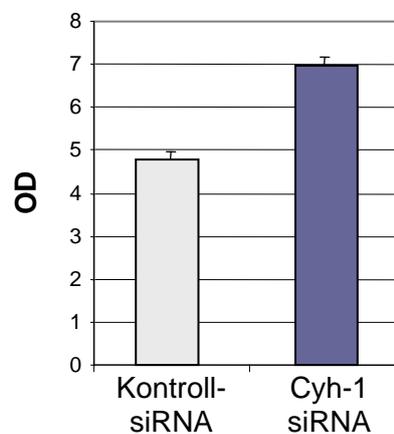
Wie in 3.16.4 beschrieben, wurde eine Zeitreihe mit 0, 0,5, 3, 12 oder 30 Minuten CCL19-Stimulation durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten konnte nach RNAi von CYTIP einer Verringerung der RhoA-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Zellen detektiert werden. Die Werte des Zeitpunktes, zu dem die RhoA-Aktivität im Kontroll-Ansatz maximal war (12 Minuten),

wurden in einem Balken-Diagramm vergleichend dargestellt (Abb. 3.46). Demnach ist CYTIP in die Regulation von RhoA involviert, wenngleich dieser Einfluß im Vergleich zu Cytohesin-1 etwas geringer zu sein scheint (siehe 3.16.4).

### 1.9.3.3 CYTOHESIN-1 HEMMT RAC1

Cytohesin-1 und CYTIP beeinflussen die Höhe der RhoA-Aktivierung (siehe 3.16.4 und 3.16.5). Ein Fehlen beider Proteine resultiert in einer verringerten Aktivität der GTPase. Dieser Effekt ist bei CYTIP nur schwach ausgeprägt. Cytohesin-1 hingegen zeigt einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität von RhoA. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob Cytohesin-1 auch die Aktivität der GTPase Rac 1 beeinflusst.

Abb. 3.47 zeigt die Aktivität von Rac1 nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ in reifen MoDC im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Die Rac1-Aktivität korreliert mit der im Photometer bestimmten Absorption (siehe 3.16.3). Es wurde eine Zeitreihe mit 0, 0,5, 3, 12 oder 30 Minuten CCL19-Stimulation durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten konnte nach RNAi von Cytohesin-1 einer Steigerung der Rac1-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Zellen detektiert werden. Die Werte des Zeitpunktes, zu dem die Rac1-Aktivität im Kontroll-Ansatz maximal war (0,5 Minuten), wurden in einem Balken-Diagramm vergleichend dargestellt (Abb. 3.45). Cytohesin-1 ist demnach in die Regulation der Rac1-Aktivität involviert.



**Abb. 3.47 Die Rac1-Aktivität ist nach RNAi von Cytohesin-1 erhöht.** In einer ELISA-Analyse wurde die Aktivität von Rac1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer CCL19-Stimulation ermittelt. Zu jedem Zeitpunkt war die Aktivität von Rac1 nach RNAi von Cytohesin-1 erhöht. Dargestellt sind die Werte nach 0,5 Minuten CCL19-Stimulation, zu dem eine maximale Rac1-Aktivität im Kontroll-Ansatz detektiert werden konnte. Cyh-1: Cytohesin-1

---

## 1.10 DIE FUNKTION VON CYTOHESIN-1 UND CYTIP UND DAS ZYTOSKELETT REIFER MoDC

Die Proteine Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration reifer MoDC *in vitro* und *in vivo* erforderlich (siehe 3.8). Sie sind in die Aktivierung von RhoA involviert (siehe 3.32.1 und 3.32.2), Cytohesin-1 ist zusätzlich an der Regulation von Rac1 beteiligt (siehe 3.32.3). Die kleinen GTPasen der RhoA-Familie sind entscheidende Regulatoren sowohl der Aktin-Polymerisierung als auch der Mikrotubuli-Dynamik und damit zellulärer Polarität (Ridley 2006). Die Ausbildung einer morphologischen und molekularen Zellpolarität ist unerlässlich für eine koordinierte, gerichtete Migration (Siegrist und Doe 2007).

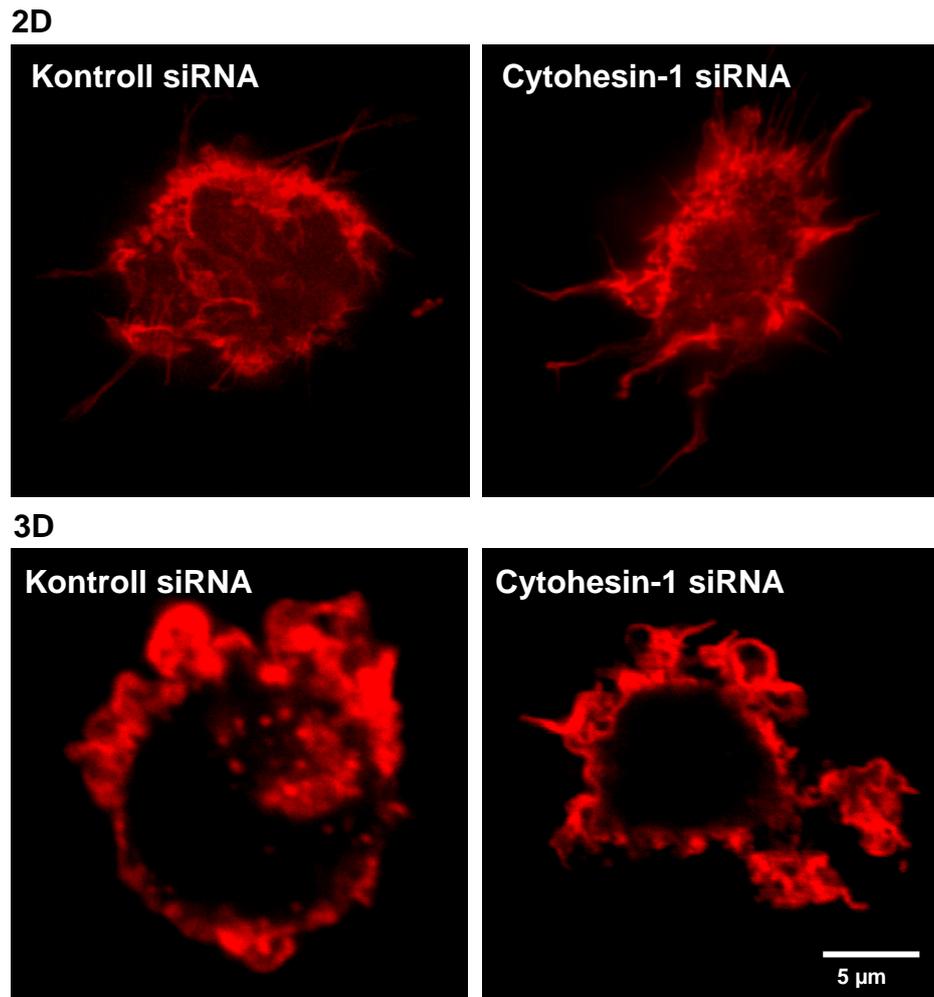
Es soll untersucht werden, ob die Reduktion der Cytohesin-1 oder CYTIP Protein-Expression über die Regulation von RhoA und Rac1 zu Veränderungen des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskelettes in reifen MoDC führt. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen des Aktin- und des Mikrotubuli-Zytoskelettes durchgeführt.

### 1.10.1 CYTOHESIN-1 UND CYTIP HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE POLYMERISATION UND ANORDNUNG VON AKTIN-FILAMENTEN

Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes infolge der RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP könnten zu einer gestörten Migration führen. Um dies zu untersuchen wurden Färbungen des filamentösen Aktins (F-Aktin) mit Cy3-Phalloidin durchgeführt. Phalloidin ist ein Toxin des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet hochaffin an F-Aktin.

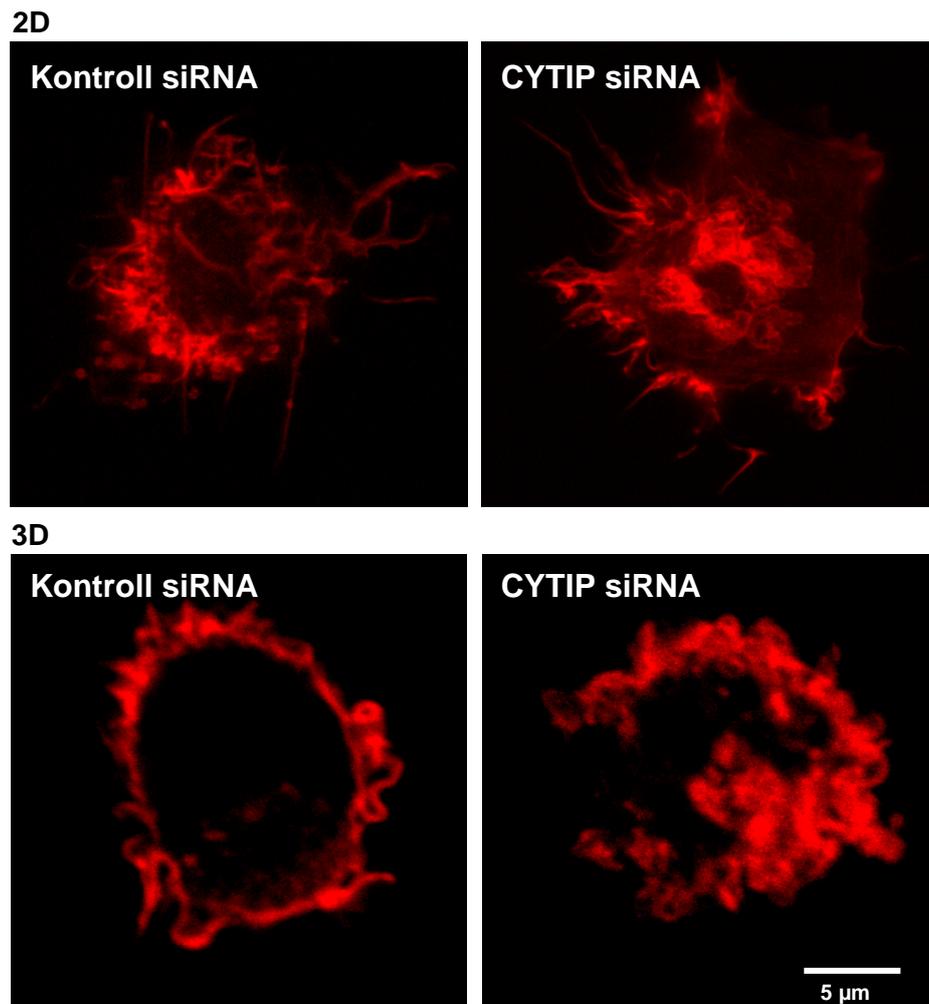
Reife MoDC wurden nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen (2D) adhärirt bzw. mit Kollagen vermengt und dieses zu einem Gel polymerisiert (3D). Es wurde mit CCL19 stimuliert. Entsprechend wurde mit Kontroll-Zellen verfahren, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden fixiert, mit Cy3-Phalloidin gefärbt und anschließend an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM; Olympus, Hamburg) untersucht.

Abb. 3.48 zeigt die Aktin-Markierungen in reifen MoDC nach ‚knock-down‘ von Cytohesin-1 auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D). Filamentöses Aktin ist in reifen MoDC der Kontroll-Zellen ausschließlich unmittelbar unter der Plasmamembran und in Zellfortsätzen zu finden. Dies kann sowohl nach Migration auf einer 2D- als auch auf einer 3D-Matrix festgestellt werden. Auch die Art der Liganden – Fibronectin und Kollagen – scheint hier keinen Einfluß zu haben. Zudem ist zu erkennen, dass der ‚knock-down‘ von Cytohesin-1 keine Veränderungen der Aktin-Anordnung in reifen MoDC verursacht. Aktin-Filamente befinden sich auch hier unterhalb der Zellmembran und in Protrusionen. Das gleiche Ergebnis wurde mit unstimulierten Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.48** Affinitätszytochemische Fluoreszenzaufnahme einer Aktin-Markierung in reifen MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D). Reife MoDC wurden mit CCL19 stimuliert und filamentöses Aktin mit Cy3-Phalloidin detektiert. In reifen MoDC befindet es sich unmittelbar unter der Plasmamembran und in Zellfortsätzen. Es ist kein Unterschied in der Aktin-Verteilung nach Migration reifer MoDC auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D) zu erkennen. Der ‚knock-down‘ von Cytohesin-1 in diesen Zellen zeigt keinen Einfluß auf die Organisation des Aktin-Zytoskelettes.

In Abb. 3.49 ist die Aktin-Markierungen in reifen MoDC nach RNAi von CYTIP auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D) dargestellt. Auch hier ist zu beobachten, dass filamentöses Aktin in reifen MoDC der Kontroll-Zellen ausschließlich unmittelbar unter der Plasmamembran und in Zellfortsätzen zu finden ist. Dies kann sowohl nach Migration auf einer 2D- als auch auf einer 3D-Matrix festgestellt werden. Ebenfalls hat die Art der Liganden – Fibronectin und Kollagen – auch hier keinen Einfluß. Der ‚Knock-down‘ von CYTIP induziert ebenfalls keine Veränderungen der Aktin-Anordnung in reifen MoDC. Aktin-Filamente befinden sich auch hier unterhalb der Zellmembran und in Protrusionen. Das gleiche Ergebnis wurde mit unstimulierten Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).



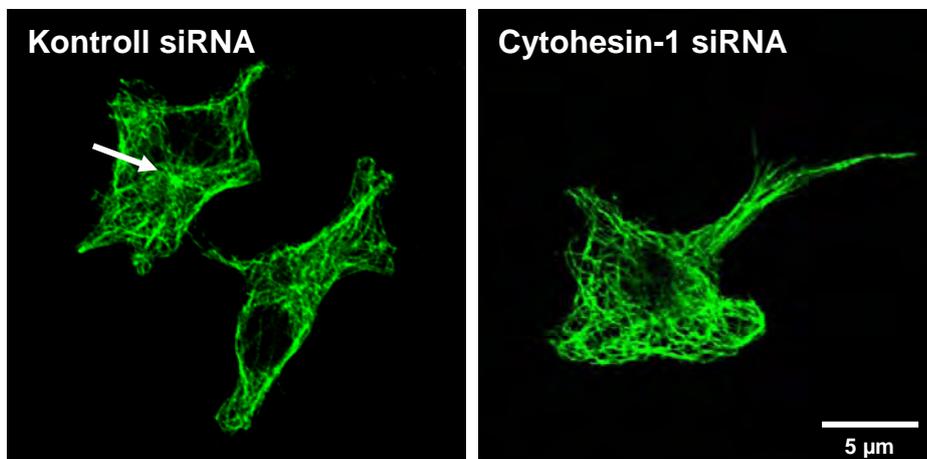
**Abb. 3.49** Affinitätszytochemische Fluoreszenzaufnahme einer Aktin-Markierung in reifen MoDC nach CYTIP ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D). Reife MoDC wurden mit CCL19 stimuliert und filamentöses Aktin mit Cy3-Phalloidin detektiert. In reifen MoDC befindet es sich unmittelbar unter der Plasmamembran und in Zellfortsätzen. Es ist kein Unterschied in der Aktin-Verteilung nach Migration reifer MoDC auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D) zu erkennen. Der ‚knock-down‘ von CYTIP in diesen Zellen zeigt keinen Einfluß auf die Organisation des Aktin-Zytoskelettes.

### 1.10.2 CYTOHESIN-1 UND CYTIP HABEN KEINEN EINFLUß AUF DIE POLYMERISATION UND DIE ANORDNUNG DES MIKROTUBULÄREN ZYTOSKELETES

Veränderungen des Mikrotubuli-Zytoskelettes infolge der RNAi von Cytohesin-1 oder CYTIP könnten die Migration reifer MoDC beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden Immunfluoreszenz-Markierung an reifen MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ durchgeführt. Die Zellen wurden auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen adhärirt, mit CCL19 stimuliert, fixiert und mit einem anti-Mikrotubuli-Antikörper gefärbt. Die Markierungen wurden im LSM analysiert.

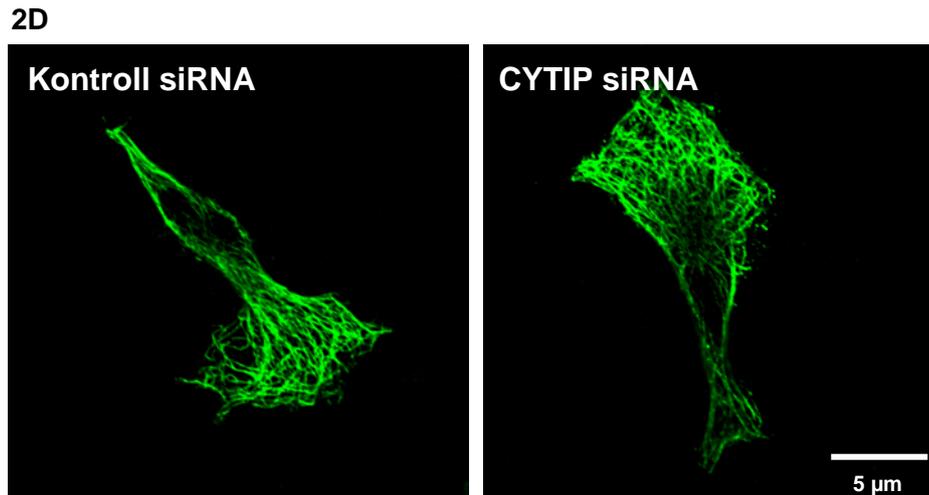
Abb. 3.50 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen des Mikrotubuli-Zytoskelettes reifer MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Es ist kein Unterschied in der Anordnung der Mikrotubuli zu erkennen. Alle Zellen weisen lange Mikrotubuli-Filamente auf, welche sich von der Zellmitte bis in die Peripherie erstrecken. In Einzelfällen, wie exemplarisch an einer Kontrollzelle in Abb. 3.50 (Pfeil) gezeigt, kann auch ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) detektiert werden. In tierischen Zellen bildet das MTOC das Zentrosom, in der Nähe des Kerns. Die Mikrotubuli sind mit ihren minus-Enden in das MTOC ‚eingebettet‘ und werden so stabilisiert. Wie zu erkennen, gehen die Mikrotubuli von diesem in einer sternförmigen Anordnung ab, in der die plus-Enden in Richtung der Zellmembran weisen (Zheng 2004).

2D



**Abb. 3.50 Immunfluoreszenzaufnahme einer Mikrotubuli-Markierung in reifen MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D).** Reife MoDC wurden mit CCL19 stimuliert und Mikrotubuli mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Mikrotubuli bilden lange Filamente, welche sich von der Zellmitte bis in die Peripherie erstrecken. Cytohesin-1 ‚knock-down‘ zeigt keine Veränderungen in der Anordnung der Mikrotubuli. In einer Kontroll-Zelle ist ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) zu erkennen, welches den Mittelpunkt des Mikrotubuli-Wachstums bildet und in der Nähe des Kerns liegt (Pfeil). Die Mikrotubuli weisen von hier aus in sternförmiger Anordnung in die Zellperipherie.

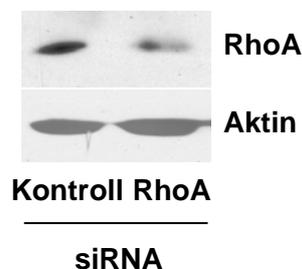
Abb. 3.51 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen des Mikrotubuli-Zytoskelettes reifer MoDC nach CYTIP ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Auch hier ist kein Unterschied in der Anordnung der Mikrotubuli zu erkennen. Alle Zellen weisen lange Mikrotubuli-Filamente auf, welche sich von der Zellmitte bis in die Peripherie erstrecken.



**Abb. 3.51 Immunfluoreszenzaufnahme einer Mikrotubuli-Markierung in reifen MoDC nach CYTIP ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D).** Reife MoDC wurden mit CCL19 stimuliert und Mikrotubuli anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Mikrotubuli bilden lange Filamente, welche sich von der Zellmitte bis in die Peripherie erstrecken. CYTIP ‚knock-down‘ zeigt keine Veränderungen in der Anordnung der Mikrotubuli.

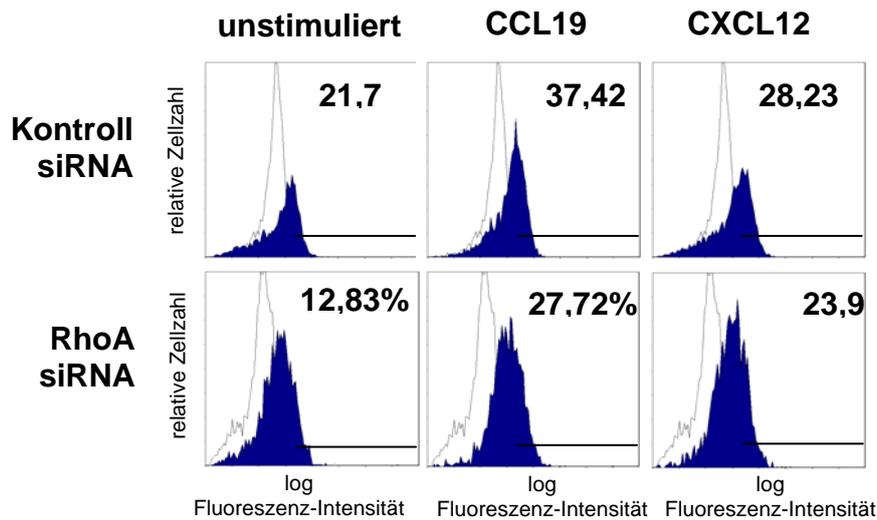
### 1.11 RHOA VERMITTELT DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CD18 IN REIFEN MoDC

Laudanna *et al.* postulierten bereits eine Beteiligung von RhoA in der Chemokin-induzierten Aktivierung von LFA-1 in Lymphozyten (Giagulli *et al.* 2004; Laudanna und Alon 2006). In dieser Arbeit sollte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 327C (siehe 3.11.2) geprüft werden, ob die Aktivierung der  $\beta_2$ -Untereinheit infolge der CCL19- und CXCL12-Stimulation in reifen MoDC abhängig von RhoA ist. Hierfür wurde zunächst die Protein-Expression von RhoA mit spezifischer siRNA reduziert. Die Effizienz der RNAi wurde im Western Blot ermittelt (Abb. 3.52). Die Protein-Expression von RhoA kann mit Hilfe spezifischer siRNA um etwa 50% im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden, reduziert werden.



**Abb. 3.52 Reduktion der RhoA Protein-Expression in reifen MoDC mit RNAi.** MoDC wurden mit spezifischer RhoA siRNA elektroporiert, nach 48 Stunden maturiert und erneute 48 Stunden später für funktionelle Untersuchungen verwendet. Die Effizienz der RNAi wurde im Western Blot untersucht. Spezifische siRNA reduziert die Protein-Expression von RhoA um etwa 50 % im Vergleich zu MoDC, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden.

Die Expression des CD18-Aktivierungsepitopes, welches durch den Antikörper 327C erkannt wird, wurde nach RhoA ‚knock-down‘ im FACS ermittelt. Die Stimulation reifer MoDC mit CCL19 und CXCL12 führt zu einer Erhöhung des Aktivierungsepitopes auf reifen MoDC (Abb. 3.53). RhoA ‚knock-down‘ führt zu einer Reduktion des 327C-Aktivierungsepitopes im unstimulierten Zustand und nach CCL19- bzw. CXCL12-Stimulation. RhoA ist demnach in die Aktivierung von CD18 in reifen MoDC involviert.



**Abb. 3.53 Expression des 327C-Aktivierungsepitopes auf CD18 nach RNAi von RhoA auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten mDC.** Der Antikörper 327C erkennt ein Epitop auf CD18, welches nur nach Aktivierung der Integrin-Untereinheit infolge einer Konformationsänderung exprimiert wird. Es ist bereits auf unstimulierten, reifen MoDC nachzuweisen. CCL19 und CXCL12 induzieren eine Erhöhung der Expression des 327C-Epitopes. Eine reduzierte Expression von RhoA führt zu einer verringerten Ausbildung des 327C-Epitopes auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten, reifen MoDC.

## 1.12 EZRIN UND MOESIN REGULIEREN DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CD18

Die Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) – Familie sind Aktin-bindende Proteine. Sie verbinden integrale Membranproteine mit dem kortikalen Aktin-Zytoskelett und sind an Signaltransduktionen beteiligt, die zu zytoskelettalen Umordnungen führen. Inaktive ERM-Proteine befinden sich unphosphoryliert im Zytosol. Phosphorylierung aktiviert sie und induziert ihre Translokation an die Plasmamembran. ERM-Proteinen und Rho-GTPasen regulieren sich wechselseitig (Ivetic und Ridley 2004). So phosphoryliert und aktiviert die Rho-aktivierte Kinase (ROCK) ERM-Proteine (Matsui *et al.* 1998), wohingegen Rac die Dephosphorylierung der ERM-Proteine induziert (Faure *et al.* 2004). ERM Proteine sind im

Gegenzug in die Aktivierung von RhoA involviert, indem sie mit RhoA-GDI (GDP dissociation inhibitor) interagieren und es so von RhoA entfernen (Takahashi *et al.* 1997). ERM-Proteine werden auch von PKCs (Protein Kinase C) phosphoryliert. Sie sind Effektoren von PKC -Integrin-Komplexen und so in die Regulation von Zellmigration während der Wundheilung involviert (Ng *et al.* 2001). In migrierenden Lymphozyten sind ERM-Proteine für das ‚clustering‘ von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, CD43 und CD44 verantwortlich (Ivetic und Ridley 2004).

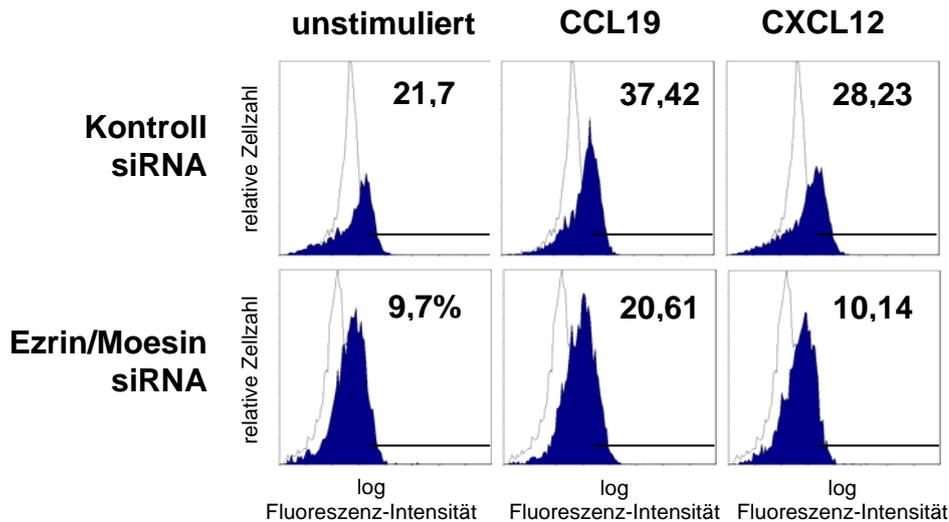
Reife MoDC exprimieren nur Ezrin und Moesin. Beide Proteine sind für die Migration reifer MoDC erforderlich (T. Quast, unveröffentlicht). Da EM-Proteine Effektoren von RhoA sind, soll geprüft werden, ob sie ebenfalls die Aktivierung von CD18 beeinflussen. Hierfür wurde die Expression der Proteine mit Hilfe spezifischer siRNA reduziert und anschließend FACS-Analysen mit dem monoklonalen Antikörper 327C, welcher ein CD18-Aktivierungsepitop erkennt, durchgeführt.



**Abb. 3.54 Reduktion der Ezrin (80kDa) und Moesin (75kDa) Protein-Expression mittels siRNA.** MoDC wurden mit Ezrin- und Moesin-spezifischer siRNA elektroporiert, 48 Stunden später mit TNF- $\alpha$  und LPS maturiert und erneute 48 Stunden später für funktionelle Assays verwendet. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass RNAi die Expression der Proteine um 60-70%, im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden, reduziert.

Abb. 3.54 zeigt die Expression der Proteine Ezrin (80kDa) und Moesin (75 kDa) in reifen MoDC. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass RNAi die Expression von Ezrin und Moesin um 60-70% im Vergleich zu Kontroll-Zellen reduziert. Mit Hilfe des Antikörpers 327C wurde die Aktivierung von CD18 auf diesen Zellen im unstimulierten und nach CCL19- bzw. CXCL12-Stimulation in der FACS-Analyse getestet.

Abb. 3.55 zeigt, dass das Epitop, welches durch den Antikörper 327C erkannt wird nach CCL19- bzw. nach CXCL12 Stimulation steigt. RNAi von Ezrin und Moesin reduziert die Expression des 327C-Epitopes sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19 bzw. nach CXCL12-Stimulation reifer MoDC. Demnach ist die Expression des 327C-Aktivierungsepitopes und damit die Aktivierung von CD18 auf reifen MoDC abhängig von der Expression der Proteine Ezrin und Moesin.



**Abb. 3.55 FACS-Analyse der Expression des 327C-Aktivierungsepitopes von CD18 nach RNAi von Ezrin und Moesin.** Die Expression des Aktivierungsepitopes, welches von dem Antikörper 327C auf der extrazellulären Domäne von CD18 erkannt wird, sinkt nach Reduktion der Ezrin und Moesin Protein-Expression im Vergleich zu Kontroll-Zellen, welche mit einer unspezifischen siRNA elektroporiert wurden.

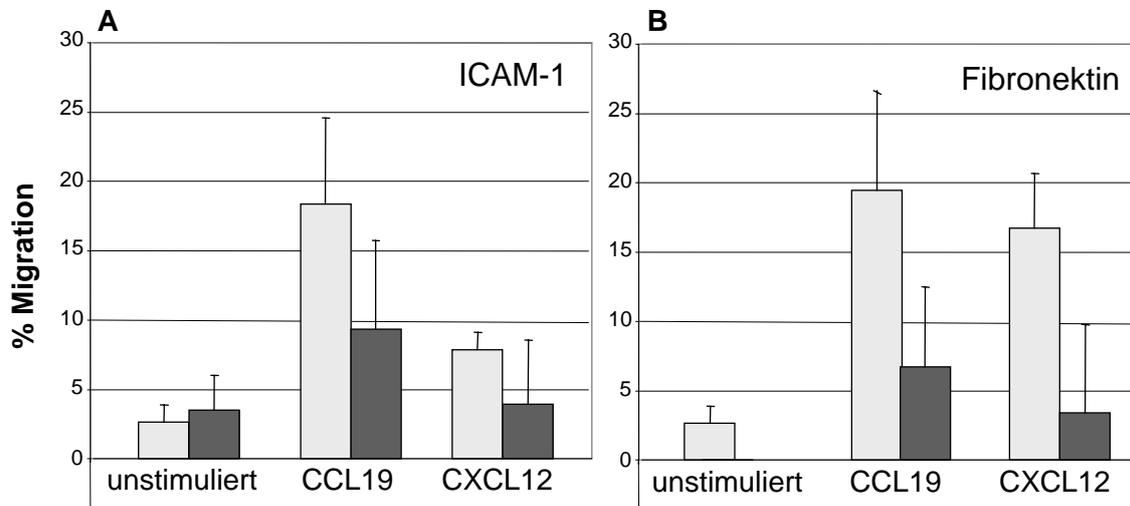
### 1.13 HEMMUNG VON ERK1/2 REDUZIERT DIE MIGRATIONSRATE REIFER MoDC *IN VITRO* (TRANS-WELL)

ERK/MAP-Kinasen werden über PI3-Kinase von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert (Lopez-Illasaca 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass sie in zahlreichen Zellen wie Fibroblasten (Anand-Apte *et al.* 1997), Fibrosarcomazellen (Webb *et al.* 2000) Keratinozyten (Chernyavsky *et al.* 2005) und murinen DC (Iijima *et al.* 2005) für migratorische Prozesse benötigt werden.

Um zu untersuchen, ob ERK1 und ERK2 auch für die Chemokin-stimulierte Migration reifer MoDC benötigt werden, wurden Trans-well Versuche auf ICAM-1 und Fibronectin-beschichteten Filtern durchgeführt. Die Zellen wurden eine Stunde mit dem ERK1/2-spezifischen Inhibitor UO126 inkubiert. Kontroll-Zellen wurden, da UO126 in DMSO gelöst ist, mit dem entsprechenden Volumen DMSO inkubiert. Anschließend wurde ein Trans-well-Versuch wie in 3.8.1 beschrieben durchgeführt. Der Inhibitor war während der gesamten Durchführung des Versuches anwesend.

Abb. 3.56 zeigt, dass die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin nach CCL19- bzw. nach CXCL12-Stimulation steigt. Hemmung der MAP-Kinasen ERK1/2 reduziert die Migration nach CCL19- und CXCL12-Stimulation auf beiden Liganden. Im unstimulierten Zustand steigt die Migration auf ICAM-1 infolge der ERK1/2-Inhibition leicht an, auf Fibronectin ist sie in diesem Fall nicht mehr nachweisbar.

Im Gegensatz dazu zeigt die Hemmung von ERK1/2 mit UO126 keinen Einfluß auf die Migration reifer MoDC auf (2D) und innerhalb (3D) einer Kollagen-Matrix (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.56 Die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin im Trans-well-Versuch benötigt die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2.** Hemmung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch den Inhibitor UO126 reduziert die Migration reifer DC im unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten Zustand auf ICAM-1 (A) und auf Fibronectin (B).

□ Kontrolle  
 ■ UO126

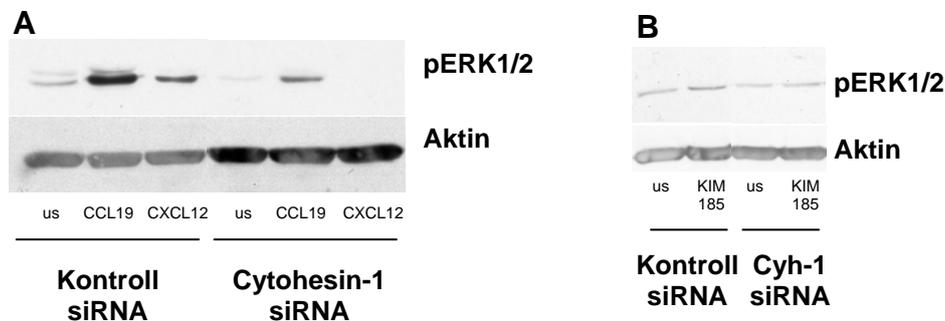
### 1.13.1 CYTOHESIN-1 VERMITTELT DIE AKTIVIERUNG VON ERK1/2 IN REIFEN MoDC

Perez *et al.* zeigten, dass die Aktivierung des Erk1/2-Signalweges durch LFA-1 über Cytohesin-1 verläuft (Perez *et al.* 2003). Genauso konnte Kliche *et al.* zeigen, dass Cytohesin-1 in der Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch den humanen Herpesvirus 8 involviert ist (Kliche *et al.* 2001).

Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung reifer MoDC durch den CD18-aktivierenden Antikörper KIM185 sowie durch die Chemokine CCL19 und CXCL12 von Cytohesin-1 abhängig ist. Hierfür wurden reife MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ mit KIM185, CCL19 oder CXCL12 stimuliert, lysiert und phosphoryliertes ERK 1 (p44 MAP Kinase) und ERK 2 (p42 MAP Kinase) im Western Blot nachgewiesen. Entsprechend wurde mit Kontroll-Zellen verfahren.

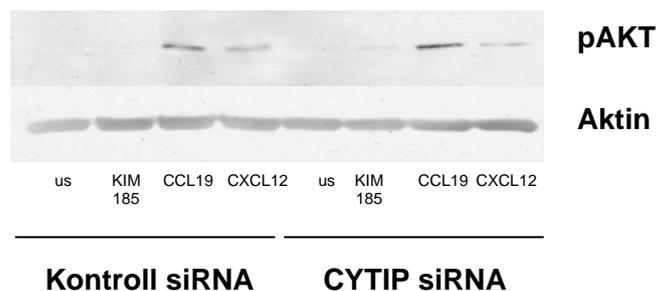
Abb. 3.57 zeigt, dass Cytohesin-1 für die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 erforderlich ist. Sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach CCL19 und CXCL12-Stimulation sinkt die Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach Cytohesin ‚knock-down‘ in reifen MoDC (A).

Zusätzlich wurden reife MoDC mit KIM185, einem CD18-aktivierenden Antikörper, stimuliert. Auch hier ist nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ eine Reduktion von ERK1/2 im unstimulierten als auch im KIM185-stimulierten-Zustand zu erkennen (B).



**Abb. 3.57 Die Aktivierung von ERK1/2 ist abhängig von Cytohesin-1.** Reife MoDC wurden nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ mit CCL19, CXCL12, KIM185 stimuliert oder unstimuliert (us) belassen, lysiert und im Western Blot phosphoryliertes ERK1 (p44) und ERK2 (p42) nachgewiesen. Mit Kontroll-Zellen wurde entsprechend verfahren. In der Western Blot-Analyse ist zu sehen, dass die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK1/2 in allen Fällen nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ reduziert ist. Cyh-1: Cytohesin-1

Weiterhin sollte untersucht werden, ob CYTIP für die Phosphorylierung der ERK-Kinasen erforderlich ist. Reife MoDC wurden nach CYTIP ‚knock-down‘ ebenfalls mit KIM185, CCL19 oder CXCL12 stimuliert, lysiert und phosphoryliertes ERK1/2 im Western Blot nachgewiesen. Entsprechend wurde mit Kontroll-Zellen verfahren.



**Abb. 3.58 Die Chemokin-induzierte Aktivierung von ERK1/2 wird nicht oder nur schwach von CYTIP beeinflusst.** Reife MoDC wurden mit CCL19, CXCL12, KIM185 stimuliert oder unstimuliert belassen, lysiert und im Western Blot phosphoryliertes ERK1 (p44) und ERK2 (p42) nachgewiesen. Wie die Western Blot-Analyse zeigt, geht die Phosphorylierung von ERK1/2 nur im unstimulierten und KIM185-stimulierten Fall nach CYTIP ‚knock-down‘ zurück. Nach CCL19- und CXCL12-Stimulation ist keine oder nur eine sehr geringe Reduktion der Phosphorylierung zu erkennen.

---

Abb. 3.58 zeigt keine eindeutige Beteiligung von CYTIP an der Chemokin- induzierten Aktivierung von ERK1 und ERK2. Im unstimulierten sowie nach KIM185-Stimulation ist deutlich ein Rückgang der ERK1/2-Phosphorylierung nach CYTIP ‚knock-down‘ zu erkennen. Die Phosphorylierung nach CCL19- oder CXCL12-Stimulation ändert sich nach CYTIP ‚knock-down‘ hingegen nicht oder kaum.

## 1 DISKUSSION

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark, emigrieren ins Blut und von dort in periphere Gewebe. Hier residieren sie als sogenannte unreife DC mit einer hohen endozytotischen Aktivität, die es ihnen ermöglicht ihre Umgebung kontinuierlich nach pathogenen Antigenen abzusuchen. Die Aufnahme eines Pathogens induziert ihre Differenzierung zu reifen DC. Die Reifung einer DC ist mit tiefgreifenden phänotypischen Veränderungen verbunden: Die endozytotische Aktivität wird eingestellt, die Prozessierung und Präsentation von Antigenen, sowie die Expression co-stimulatorischer Moleküle steigt an - DC entwickeln sich zu hocheffektiven T-Zell-Stimulatoren und stark migrierenden Zellen. Dies ermöglicht es ihnen, die peripheren Gewebe zu verlassen und über lymphatische Gefäße zu sekundären lymphoiden Organen zu wandern. Hier treffen sie auf Antigen-spezifische T-Zellen, welche sie aktivieren und so eine adaptive Immunantwort auslösen. Die Reifung einer DC ist demnach essenziell für die Verbindung angeborener und adaptiver Immunität.

Die Expression der interagierenden Proteine Cytohesin-1 und CYTIP steigt während der Reifung von DC deutlich an. Beide Proteine sind in die Regulation LFA-1-vermittelter Adhäsion in Jurkat-Zellen involviert. Das Integrin LFA-1 gehört zu der am stärksten auf Leukozyten vertretenen Gruppe der  $\beta_2$ -Integrine (CD18). Cytohesin-1 interagiert über die zentrale sec7-Domäne mit der zytoplasmatischen Domäne von CD18 und aktiviert damit die Adhäsion von Jurkat-Zellen an ICAM-1. Es wurde postuliert, dass die Bindung von CYTIP an Cytohesin-1 dessen Interaktion mit CD18 verhindert und so die Adhäsion von Jurkat-Zellen an ICAM-1 inhibiert (Boehm *et al.* 2003). Kongruent hierzu ist die Beobachtung, dass CYTIP ‚knock-down‘ in dendritischen Zellen zu einer verstärkten Adhäsion an T-Zellen führt (Hofer *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurde die Funktion von Cytohesin-1 und CYTIP in der Migration humaner DC, die aus Monozyten generiert wurden (‚monocyte-derived dendritic cell‘, MoDC) *in vitro* und *in vivo* untersucht. Der Einfluß beider Proteine wurde insbesondere hinsichtlich der Aktivierung von CD18 charakterisiert, dessen Bedeutung für die Migration reifer MoDC innerhalb eines Gewebes im Rahmen dieser Arbeit in Frage gestellt wird. Weiterhin wurde die Funktion von Cytohesin-1 und CYTIP in der Aktivierung der GTPasen RhoA und Rac1 sowie der Mitogen-aktivierten Kinasen ERK1 und ERK2 untersucht.

## 1.1 CYTOHESIN-1 REGULIERT DIE EXPRESSION VON CYTIP ÜBER DIE GEF-FUNKTION DER SEC7-DOMÄNE

Die Expression der interagierenden Proteine Cytohesin-1 und CYTIP steigt während der Reifung dendritischer Zellen deutlich an (Abb. 3.5). Mit Hilfe der RNA-Interferenz wurde die Synthese beider Proteine in reifen MoDC spezifisch reprimiert. Dies gelang für Cytohesin-1 zu fast 100%, für CYTIP zu 70-80% (Abb. 3.7). Überraschend war, dass RNAi von Cytohesin-1 ebenfalls die CYTIP Protein-Expression reduziert (Abb. 3.10). Wie in einer quantitativen PCR gezeigt werden konnte, wird die Expression von CYTIP durch Cytohesin-1 transkriptionell reguliert (I. Brillert, Diplomarbeit). Hierfür scheint die GEF-Aktivität der sec7-Domäne von Bedeutung zu sein, da die GEF-defiziente Cytohesin-1 Mutante E157K in PBLs sowie der GEF-spezifische Inhibitor für Cytohesine SecinH3 in reifen MoDC eine verringerte CYTIP-Expression verursachen (Abb. 3.11 und Abb. 3.12). RNAi von Cytohesin-1 führt somit zum ‚knock-down‘ des gesamten Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes. Der ‚knock-down‘ von CYTIP hat hingegen keinen Einfluß auf die Protein-Expression von Cytohesin-1 (Abb. 3.10).

Der Einfluß von Cytohesin-1 auf die Gen-Expression wurde bereits von Perez *et al.* beschrieben. Sie berichten, dass die Aktivierung von LFA-1 über Cytohesin-1 zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und demzufolge - über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 - zur Synthese von IL-2 in T-Zellen führt (Perez *et al.* 2003). Ebenso induziert die Infektion von Jurkat-Zellen mit dem humanen Herpesvirus eine ERK1/2-Aktivierung, welche über die GEF-Funktion von Cytohesin-1 vermittelt wird (Kliche *et al.* 2001). In unserer Arbeitsgruppe konnte ein Einfluß von Cytohesin-1 in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B und damit in die Synthese von IL-2 nach CD3/CD28-Stimulation von T-Zellen gezeigt werden (B. Paul, Dissertation). Auch in reifen MoDC kann Cytohesin-1 oberhalb von ERK1/2 lokalisiert werden (Abb. 3.57). Die Phosphorylierung von ERK1/2 wird durch den CD18-aktivierenden Antikörper KIM185 sowie durch die Chemokine CCL19 und CXCL12 induziert. RNAi von Cytohesin-1 reduziert die Phosphorylierung von ERK1/2 im stimulierten sowie im unstimulierten Zustand deutlich. Es wäre demnach möglich, dass Cytohesin-1 die Expression von CYTIP über die Aktivierung von ERK1/2 und damit den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert. Allerdings zeigen unstimulierte reife MoDC nur eine sehr schwache ERK1/2-Phosphorylierung. Es müßte geprüft werden, wie sich die Phosphorylierung von ERK1/2 im Laufe der DC-Maturierung entwickelt und ob Inhibitoren wie UO126 die Expression von CYTIP in reifen MoDC beeinflussen.

Cytohesin-1 könnte ebenfalls über die Aktivierung von NF $\kappa$ B die CYTIP-Expression regulieren. In diesem Fall würde die Inhibition von NF $\kappa$ B die Expression von CYTIP unterbinden.

---

## 1.2 CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN DIE AFFINITÄT VON CD18 IN REIFEN MoDC

Integrine binden ihre Liganden nicht konstitutiv, sondern erst nach Aktivierung (Lum *et al.* 2002). Eine Aktivierung kann durch eine Erhöhung der Avidität und/oder der Affinität induziert werden (siehe 1.4.3). Affinitätsveränderungen werden über Konformationsänderungen vermittelt: Ein gefaltetes Integrin ist inaktiv, wohingegen verschiedene ausgestreckte Konformationen sowohl mittlere als auch hohe Affinitäten vermitteln können (Shimaoka *et al.* 2002). Die Antikörper 327C und mAB24 erkennen die ‚I-like‘-Domäne einer ausgestreckten  $\beta_2$ -Untereinheit (Abb. 1.6) - mAB24 erkennt eine Konformation mit mittlerer Affinität, 327C eine Konformation mit hoher Affinität (Laudanna 2005).

Die Expression dieser Aktivierungsepitope kann durch intrazelluläre Signale induziert werden („inside-out signaling“). Diese lösen Veränderungen in der Gelenkregion des Integrins aus, welche zu Konformationsänderungen in der extrazellulären Domäne und so zur Expression der Neo-Epitope führen, die von den Antikörpern 327C und mAB24 erkannt werden. Die Verwendung dieser Antikörper ist daher sinnvoll, um die Transduktion von Signalen an CD18 zu untersuchen. Weiterhin ist die Expression dieser Aktivierungsepitope unabhängig vom Aktin-Zytoskelett (Beals *et al.* 2001).

Cytohesin-1 und CYTIP sind in die Regulation der LFA-1 (CD11a/CD18)-Aktivierung auf Jurkat-Zellen involviert (Boehm *et al.* 2003; Geiger *et al.* 2000). In dieser Arbeit wurde erstmals eine Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 auf reifen MoDC mit Hilfe der Antikörper 327C und mAB24 nachgewiesen (Abb. 3.22, 3.23, 3.41 und 3.42). RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP in reifen MoDC verringert eine CCL19-induzierte Expression des 327C-Neo-Epitopes sowie eine CCL19- und CXCL12-induzierte Expression des mAB24-Neo-Epitopes (Abb. 3.22 und 3.23). Beide Proteine sind demnach in die Chemokin-induzierte Erhöhung der Affinität von  $\beta_2$ -Integrinen auf reifen MoDC involviert.

### 1.2.1 CYTOHESIN-1 REGULIERT DIE STATISCHE ADHÄSION REIFER MoDC

Die Expression der 327C- und mAB24-spezifischen Neo-Epitope korreliert mit einer gesteigerten Adhäsion von  $\beta_2$ -Integrinen an ihre Liganden (Salas *et al.* 2004). Cytohesin-1 bindet die zytoplasmatische Domäne von CD18 und aktiviert so die LFA-1-vermittelte Adhäsion von Jurkat-Zellen (Geiger *et al.* 2000). Entsprechend führt RNAi von Cytohesin-1 in reifen MoDC zu einer reduzierten statischen Adhäsion (Abb. 3.25). Interessant ist, dass die Reduktion der Adhäsion nicht nur auf dem  $\beta_2$ -Integrin-Liganden ICAM-1, sondern auch auf dem  $\beta_1$ -Integrin-Liganden Fibronectin zu beobachten ist. Bisherige Untersuchungen schlossen

Interaktionen zwischen Cytohesin-1 und der  $\beta_1$ -Integrin-Untereinheit (CD29) jedoch aus (Geiger *et al.* 2000; Kolanus *et al.* 1996). In dieser Arbeit wurde eine mögliche Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CD29 in reifen MoDC nicht geklärt. Möglich ist, dass Cytohesin-1, neben der Interaktion mit CD18, einen zusätzlichen generellen Einfluß z.B. auf das Aktin-Zytoskelett ausübt, der auch die  $\beta_1$ -Untereinheit beeinflusst. Eine phosphorylierte Form des Cytohesin-1 interagiert direkt mit dem Aktin-Zytoskelett und dies ist notwendig für eine LFA-1 vermittelte Adhäsion von Jurkat-Zellen an ICAM-1 (Dierks *et al.* 2001). Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Techniken konnten jedoch keine offensichtlichen Veränderungen des Aktin-Zytoskelettes reifer MoDC nach RNAi von Cytohesin-1 festgestellt werden (Abb. 3.48).

### **1.2.2 CYTIP KOORDINIERT DIE ADHÄSION REIFER MODC UNTER FLUSSBEDINGUNGEN, NICHT JEDOCH UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN**

Boehm *et al.* postulierten, dass CYTIP an Cytohesin-1 bindet und so dessen Interaktion mit CD18 sowie die LFA-1-vermittelte Adhäsion inhibiert (Boehm *et al.* 2003). In diesem Fall müßte RNAi von CYTIP einen Anstieg der Expression der 327C- und mAB24-spezifischen Aktivierungsepitope auslösen. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Zusätzlich kann weder eine gesteigerte noch eine verringerte statische Adhäsion reifer MoDC nach RNAi von CYTIP auf  $\beta_2$ - und  $\beta_1$ -Integrin-Liganden festgestellt werden. Die Adhäsion reifer MoDC nach RNAi von CYTIP ist weitestgehend unverändert (Abb. 3.26). Boehm *et al.* verwendeten Jurkat-Zellen und untersuchten den Einfluß von überexprimiertem CYTIP auf die Zelladhäsion. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit der Einfluß von endogenem CYTIP in reifen MoDC untersucht. Es ist möglich, dass die Verwendung eines unterschiedlichen Zelltypes sowie exogenen/endogenen Proteins die verschiedenen Ergebnisse der CYTIP Funktion in der Regulation statischer Adhäsion auslöst. Hofer *et al.* konnten nach RNAi von CYTIP in reifen MoDC eine gesteigerte statische Adhäsion an Fibronectin feststellen (Hofer *et al.* 2006). Die statische Adhäsion reifer MoDC nach RNAi von CYTIP an ICAM-1 wurde von Hofer *et al.* nicht untersucht. Zusätzlich verwendeten sie – im Gegensatz zu dieser Arbeit - eine geringere Konzentration von Fibronectin. Eine unterschiedliche Dichte von Integrin-Liganden kann zu verschiedenen Ergebnissen führen. So induziert Fibrinogen, welches in geringer Dichte vorliegt, in Thrombozyten über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux und Adhäsion, wohingegen derselbe Ligand in hoher Dichte die intrazelluläre Kalzium-Konzentration und die Adhäsion dieser Zellen unbeeinflusst läßt (Jirouskova *et al.* 2007). Auch weisen andere Zelltypen wie Fibroblasten unterschiedliche adhäsive Eigenschaften an Kollagen I auf, wenn es in niedriger, mittlerer oder hoher Dichte vorliegt (Gaudet *et al.* 2003). Ein möglicher Einfluss

unterschiedlicher Fibronectin-Konzentrationen auf die Adhäsion reifer MoDC ist daher denkbar, wurde bis jetzt jedoch noch nicht geklärt.

Es ist bekannt, dass  $\beta_2$ -Integrine - speziell LFA-1 - die Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothelium und die anschließende Transmigration vermitteln (Nguyen *et al.* 2002). Eine schnelle Adhäsion ist entscheidend, damit Leukozyten im Bereich der Entzündung das Gewebe infiltrieren (Campbell *et al.* 1998). *In vitro* kann die Adhäsion und Transmigration an TNF- $\alpha$ -aktivierten Endothelzellen (HUVEC), welche das Chemokin CXCL12 gebunden haben, in einer Flusskammer untersucht werden. Das Chemokin vermittelt das Rollen sowie die Adhäsion von Leukozyten (siehe 1.3.2). Da für CYTIP in dieser Arbeit keine eindeutige Funktion in der Regulation statischer Adhäsion reifer MoDC festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das Protein die Adhäsion der Zellen an HUVECs unter Flussbedingungen beeinflusst. Während der Migration von Leukozyten aus der Zirkulation in periphere Gewebe, müssen Leukozyten trotz der Scherkräfte des Blutflusses mit Endothelzellen interagieren, adhären und transmigrieren (Rose *et al.* 2007). Es ist bekannt, dass Flussbedingungen die Modalitäten der Integrin-Aktivierung verändern (Laudanna 2005). So konnten Weber *et al.* zeigen, dass die GEF-Funktion von Cytohesin-1 für die statische Adhäsion von Leukozyten an ICAM-1 erforderlich ist, hingegen für die Adhäsion der Zellen unter Flussbedingungen nicht benötigt wird (Weber *et al.* 2001). Weiterhin ist Talin – ein Adapterprotein, welches  $\beta_2$ -Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet – für die statische Adhäsion von Lymphozyten an ICAM-1 unerlässlich, wohingegen es für die Adhäsion der Zellen an ICAM-1 unter Flussbedingungen keine Bedeutung hat. Es wird vermutet, dass die Funktion von Talin in diesem Fall von anderen Adapterproteinen wie RapL übernommen wird (Shamri *et al.* 2005). Auch hier bestimmt jedoch nicht nur die Art, sondern auch die Anzahl der Liganden die Adhäsion und die Migration von Leukozyten (Smith *et al.* 2007). Talin ist zum Beispiel nur dann für die Adhäsion von Lymphozyten an die Gefäßwand unter Flussbedingungen unbedeutend, wenn der Ligand ICAM-1 in geringer Dichte vorliegt. Wird die Dichte von ICAM-1 erhöht, wächst auch die Bedeutung Talins für die Adhäsion der Zellen an das Endothel unter Flussbedingungen (Shamri *et al.* 2005).

RNAi von CYTIP verringert die Adhäsion reifer MoDC an aktiviertes Endothel im Fluss (Abb. 3.25). Dies ist kongruent mit der Beobachtung, dass CYTIP überexprimierende Jurkat-Zellen eine verstärkte Adhäsion an aktiviertes Endothel im Fluss aufweisen (L. Fraemohs, unveröffentlicht). Die unterschiedliche Funktion von CYTIP bei der Adhäsion reifer MoDC zeigt, dass Integrine unter Flussbedingungen entweder in einem anderem Aktivierungszustand benötigt oder anders reguliert werden könnten als unter statischen Bedingungen. So wäre es möglich, dass die Funktion von CYTIP unter statischen Bedingungen von einem anderem Adapterprotein übernommen werden kann, so wie es Shamri *et al.* für Talin und RapL unter Flussbedingungen vorschlugen (Shamri *et al.* 2005). Genauso könnte es sein, dass das Integrin

in einem anderen Aktivierungszustand vorliegen muss, um den Scherkräften des Flusses entgegenzutreten. Shamri *et al.* zeigten, dass Lymphozyten nur dann an aktiviertes Endothel unter Flussbedingungen binden, wenn ihre  $\beta_2$ -Integrine eine mittlere Affinität aufweisen – und damit ein von dem Antikörper mAB24 erkanntes Neo-Epitop - wohingegen unter statischen Bedingungen hochaffine  $\beta_2$ -Integrine, welche ein von dem Antikörper 327C-erkanntes Epitopes exprimieren, von Vorteil sind. Sie erklären dies damit, dass unter Flussbedingungen  $\beta_2$ -Integrine für eine Interaktion mit dem Endothel in einer ausgestreckten Konformation mit mittlerer Affinität vorliegen müssen, die von gebundenen Chemokinen induziert wird. Der Arrest von Leukozyten an aktiviertes Endothelium erfordert die simultane Interaktion multipler Adhäsions-Rezeptoren (van Hennik *et al.* 2003). Die räumliche Nähe von gebundenem Chemokin und ICAM-1 auf dem Endothel ermöglicht die Interaktion des gestreckten Integrins mit seinem Liganden ICAM-1 und damit die Überführung in einen hochaffinen Zustand, der eine abrupte Adhäsion ermöglicht (Shamri *et al.* 2005).

Shamri *et al.* erklärten weiterhin, dass die löslichen Chemokine CCL12, CCL21 und CCL9 das von 327C erkannte Aktivierungsepitop induzieren. Hingegen wird das Epitop auf der ausgestreckten Integrin-Untereinheit, welches durch mAB24 erkannt wird, durch die drei löslichen Chemokine nicht induziert. Ausschließlich gebundene Chemokine sind in der Lage auf Lymphozyten das mAB24- sowie das KIM127-Epitop – ein ebenfalls nur auf der ausgestreckten Konformation der  $\beta_2$ -Integrinen mit mittlerer Affinität exprimiertes Epitop - zu induzieren. Shamri *et al.* beantworten nicht die Frage, warum gebundene Chemokine einen anderen Aktivierungszustand von Integrinen auslösen als lösliche Chemokine (Shamri *et al.* 2005). Im Gegensatz zu Shamri *et al.* konnte in dieser Arbeit die Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes nach Stimulation reifer MoDC mit löslichen Chemokinen induziert werden (Abb. 3.23 und 3.42). CYTIP ist weiterhin für die Expression der von den Antikörpern 327C und mAB24 erkannten Aktivierungsepitope erforderlich (Abb. 3.22 und 3.23). Die ausgestreckte Konformation mittlerer Affinität von LFA-1 vermittelt das Rollen von Leukozyten entlang der Gefäßwand, die hochaffine Konformation ist wichtig für die feste Adhäsion der Zellen (Salas *et al.* 2004). Demnach ist CYTIP sowohl für das Rollen reifer MoDC entlang eines Endothels als auch für die feste Adhäsion der Zellen erforderlich.

Die Funktion von Cytohesin-1 für die Adhäsion reifer MoDC an aktiviertes Endothel unter Flussbedingungen wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Untersuchungen an Monozyten sowie T-Zell- und Makrophagen-Zelllinien zeigten, dass Cytohesin-1 über die Regulation der Affinität von LFA-1 den Übergang von rollenden zu fest adhätierenden Zellen an aktiviertes Endothel kontrolliert (Weber *et al.* 2001). Weber *et al.* untersuchten zusätzlich die anschließende Transmigration der Zellen und konnten feststellen, dass auch hier Cytohesin-1 über dessen GEF-Funktion an ARF6, von Bedeutung ist (Weber *et al.* 2001).

### 1.2.3 DIE PI3-KINASE, CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN DIE AFFINITÄT VON CD18 FÜR ICAM-1

Chemokine lösen die Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP vom Zytoplasma an die Plasmamembran und eine Co-Lokalisation mit CD18 aus (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Studien mit den CD18-Interaktoren Filamin und  $\alpha$ -Aktinin in humanen Monozyten zeigten ein vergleichbares Co-Lokalisationsmuster (Sharma *et al.* 1995). Es ist möglich, dass die Co-Lokalisation von Cytohesin-1 und CYTIP mit CD18 für die Vermittlung der Chemokin-induzierten Aktivierung der Integrin-Untereinheit notwendig ist. Die Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP an die Plasmamembran und damit die Co-Lokalisation mit CD18 ist abhängig von der Aktivität der PI3-Kinase, da der PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 diese Translokation verhindert (Abb. 3.40). Die PI3-Kinase wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie Chemokin-Rezeptoren aktiviert (Procko und McColl 2005). Signaltransduktionen über die PI3-Kinase sind in die Regulation der Adhäsion von Lymphozyten involviert (Nagel *et al.* 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PI3-Kinase die Chemokin-induzierte Expression der 327C- bzw. der mAB24-spezifischen Neo-Epitope auf reifen MoDC vermittelt (Abb. 3.41 und 3.42). Die Ergebnisse stimmen mit vorherigen Untersuchungen von Nagel *et al.* überein, welche feststellten, dass Cytohesin-1 über dessen PH-Domäne an PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> – Produkte der PI3-Kinase – bindet und dies für die Aktivierung der Adhäsion von Jurkat-Zellen an ICAM-1 notwendig ist (Nagel *et al.* 1998; Nagel *et al.* 1998).

Versuche mit Lymphozyten zeigten, dass die Aktivierung durch CCL19 bzw. CXCL12 sowohl die laterale Mobilität – und damit die Avidität – als auch die Affinität von LFA-1 erhöht (Constantin *et al.* 2000). Untersuchungen von Constantin *et al.* weisen jedoch lediglich auf einen Einfluss der PI3-Kinase auf die Regulation lateraler Mobilität, nicht jedoch der Affinität von LFA-1 hin. Eine mögliche Ursache für diese entgegengesetzten Ergebnisse kann sowohl die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen – reife MoDC versus Lymphozyten – als auch die Nutzung verschiedener Methoden der Affinitätsmessung sein. Constantin *et al.* untersuchten die Induktion der hochaffinen Konformation über die Bindung von löslichem <sup>125</sup>I-markierten ICAM-1 an LFA-1 und nicht über Neo-Epitop-spezifische Antikörper. Die laterale Mobilität von  $\beta_2$ -Integrinen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Mehrere Studien weisen auf eine sehr schnelle Umverteilung von LFA-1, nicht jedoch von Mac-1, auf Leukozyten infolge einer Chemokin-Stimulation hin (Weber *et al.* 1999). Dies spiegelt eine differenzielle Regulation von Integrinen durch Chemokine wider. Im Fall von LFA-1 und Mac-1 – Integrine mit gleicher  $\beta_2$ -Untereinheit – wird diese über die zytoplasmatische Domäne der jeweiligen  $\alpha$ -Kette vermittelt (Weber *et al.* 1999).

Giagulli *et al.* postulieren, dass die PI3-Kinase über eine Aktivierung der atypischen PKC $\zeta$  die laterale Mobilität von LFA-1 in Lymphozyten reguliert (Giagulli *et al.* 2004). Die atypische PKC $\zeta$  wurde bereits zuvor in die Chemokin-induzierte Adhäsion von Leukozyten über  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen impliziert (Laudanna *et al.* 1996; Laudanna *et al.* 1998).

Andere Studien verweisen ebenfalls auf einen Einfluß der PI3-Kinase in der Regulation der Affinität von Integrinen und stimmen damit mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. So induziert die PI3-Kinase eine hochaffine Konformation von Mac-1 auf Monozyten und reguliert auf diese Weise die Adhäsion der Zellen an aktivierte Endothelien und ihre anschließende Transmigration (Harokopakis *et al.* 2006). In Endothelzellen ist die PI3-Kinase für die Expression der hochaffinen Konformation des Integrins  $\alpha\beta_3$  notwendig (Dormond *et al.* 2004).

#### **1.2.4 DIE GTPASE RHOA, SOWIE EZRIN UND MOESIN SIND IN DIE CHEMOKIN-INDUZIERTER AKTIVIERUNG VON $\beta_2$ -INTEGRINEN INVOLVIERT**

Chemokine lösen komplexe intrazelluläre Signalwege aus, die zur Aktivierung von Integrinen führen. Kleine GTP-bindende Proteine besitzen hier eine Schlüsselfunktion (Laudanna und Alon 2006). So ist die GTPase Rap1 in die Chemokin-induzierte LFA-1- und VLA-4-vermittelte Adhäsion von Lymphozyten involviert (Kinashi und Katagiri 2004). Rac1 und Vav1 vermitteln die CXCL12-induzierte Aktivierung von VLA-4 auf Lymphozyten unter Flussbedingungen (Garcia-Bernal *et al.* 2005). Die Chemokin-induzierte Adhäsion von Lymphozyten an VCAM-1 verläuft über die Aktivierung von RhoA (Laudanna *et al.* 1996). Die Aktivierung von LFA-1 über RhoA wird spezifisch durch Chemokine ausgelöst, da die Stimulation des Integrins durch PMA unabhängig von der Aktivität der GTPase ist (Soede *et al.* 2001). Die Bedeutung der GTPasen für die Aktivierung von Integrinen wird in dem genetischen Defekt LAD III deutlich. Hier führt eine gestörte Aktivierung von Rap1 zu einer Adhäsions-Defizienz von Lymphozyten (Alon und Etzioni 2003; Kinashi *et al.* 2004). Die Symptome gleichen denen der bereits erwähnten Erkrankung Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (LAD I), die auf eine gestörte Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit zurückzuführen ist (1.4.2).

In dieser Arbeit wurde ein Einfluss von RhoA auf die Affinität der  $\beta_2$ -Untereinheit auf reifen MoDC mit Hilfe des Aktivierungsantikörpers 327C festgestellt. Eine verringerte RhoA-Expression reduziert hier die Aktivierung von CD18 durch CCL19 und CXCL12 (Abb. 3.53). Dies entspricht Untersuchungen von Giagulli *et al.*, welche die Funktion von RhoA in der Aktivierung von LFA-1 in Lymphozyten untersuchten (Giagulli *et al.* 2004). Sie stellten fest, dass verschiedene RhoA-Effektordomänen sowohl die Affinität als auch die Avidität des Integrins regulieren. Zudem scheint die Rho-Kinase ROCK, eine der wichtigsten Effektoren von RhoA, in diesen Prozess nicht involviert zu sein, da die Hemmung der Kinase keinen Einfluss

auf die Aktivierung des Integrins zeigt (Giagulli *et al.* 2004). Die spezifische Hemmung der RhoA-Domäne, welche die Affinität von LFA-1 reguliert, inhibiert unter Flussbedingungen die feste Adhäsion von Lymphozyten an das Endothel, hat jedoch keinen Einfluß auf das Rollen der Zellen entlang der Gefäßwand (Giagulli *et al.* 2004). Dies entspricht den Beobachtungen von Shamri *et al.*, die besagen, dass das Rollen der Zellen entlang einer Gefäßwand durch eine mittlere Affinität der Integrine vermittelt wird, wohingegen eine hochaffine Konformation für die feste Adhäsion benötigt wird (Shamri *et al.* 2005). RhoA dürfte in diesem Fall keinen Einfluss auf die Expression des Aktivierungsepitopes haben, welches durch den Antikörper mAB24 erkannt wird und eine mittlere Affinität des Integrins aufweist.

Auf welche Weise RhoA Integrine aktiviert, ist weitestgehend ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass RhoA die Plasmamembran-Lokalisation der atypischen PKC $\zeta$  reguliert (Giagulli *et al.* 2004), welche in die Chemokin-induzierte Adhäsion von Leukozyten über  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine involviert ist (Laudanna *et al.* 1996; Laudanna *et al.* 1998). RhoA wirkt hier synergistisch zur PI3-Kinase, welche eine Aktivierung der PKC $\zeta$  auslöst (siehe 4.2.3).

Weitere Effektoren der RhoA-GTPase sind Ezrin, Radixin und Moesin (Ivetic und Ridley 2004). Ezrin, Radixin und Moesin – ERM – verbinden in ihrer aktivierten Form das Aktin-Zytoskelett mit Transmembran-Proteinen wie dem Hyaluron-Rezeptor CD44 (Bretscher *et al.* 1997) und sind in Signal-Transduktionen verwickelt, die zu Zytoskelett-Umordnungen führen (Ivetic und Ridley 2004). Sie können PI3-Kinase-abhängig von PKC $\alpha$  phosphoryliert - damit aktiviert - werden und sind so in die Aktivierung von  $\beta_1$ -Integrinen in humanen Mammacarcinom-Zellen involviert (Ng *et al.* 2001). In Endothelzellen konnte eine Interaktion der ERM-Proteine mit ICAM-1 und VCAM-1 beobachtet werden, welche zusammen eine Art ‚Andockstelle‘ für adhätierende und transmigrierende Leukozyten bilden (Barreiro *et al.* 2002). Dendritische Zellen exprimieren nur Ezrin und Moesin (T. Quast, unveröffentlicht). In dieser Arbeit konnte ein Einfluss beider Proteine auf die Regulation der Affinität der  $\beta_2$ -Integrin-Untereinheit mit Hilfe des Aktivierungsantikörpers 327C nachgewiesen werden. Eine Reduktion der EM-Protein-Expression verringert die CCL19- und CXCL12-stimulierte Aktivierung von CD18 deutlich (Abb. 3.55). Es wäre daher möglich, dass Ezrin und Moesin RhoA-abhängig die Affinität von CD18 regulieren. Dies müßte durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden. So sollte untersucht werden, ob RNAi von RhoA die Phosphorylierung der EM-Proteine verringert. Zusätzlich könnte, wie von Ng *et al.* postuliert, die Hemmung der PI3-Kinase die Phosphorylierung der EM-Proteine unterbinden. In diesem Fall könnte auch RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP zu einer Reduktion der EM-Phosphorylierung führen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cytohesin-1 die Affinität von CD18 nicht nur über direkte Interaktion, sondern auch über die Aktivierung anderer Integrin-Regulatoren wie RhoA sowie Ezrin und Moesin, beeinflusst.

### 1.2.5 MODELL FÜR DIE CHEMOKIN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CD18 IN REIFEN MoDC

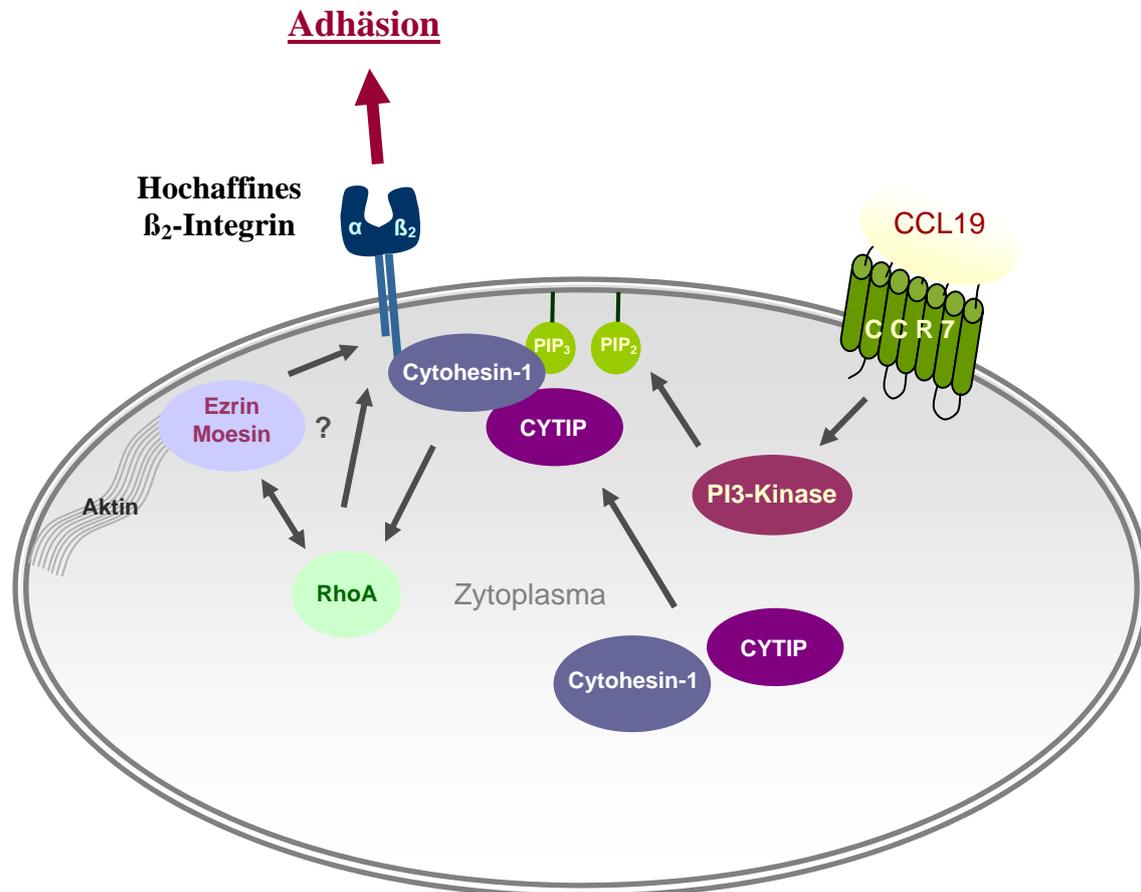
Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die CCL19-induzierte Aktivität von RhoA in reifen MoDC (Abb. 3.45 und 3.46). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen auf folgendes Modell der Chemokin-induzierten Affinitätsregulation von CD18 schließen:

Die Chemokine CCL19 bzw. CXCL12 binden an die Rezeptoren CCR7 bzw. CXCR4. Die Bindung aktiviert die PI3-Kinase, welche die Phosphoinositide PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> in der Plasmamembran phosphoryliert. Cytohesin-1 transloziert aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran und bindet an diese Phosphoinositide. Auch CYTIP gelangt PI3-Kinase-abhängig aus dem Zytoplasma an die Membran. Es ist unbekannt, ob dies über dessen Interaktion mit Cytohesin-1 oder über einen eigenen Rezeptor in der Plasmamembran geschieht. Cytohesin-1 und CYTIP co-lokalisieren mit CD18. Cytohesin-1 kann durch direkte Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von CD18 eine Konformationsänderung induzieren, die zu einem hochaffinen  $\beta_2$ -Integrin führt. Auch CYTIP hat – im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen mit überexprimiertem CYTIP in Lymphozyten – einen positiven Effekt auf die Affinität von CD18. Sowohl Cytohesin-1 als auch CYTIP regulieren die Aktivität der GTPase RhoA, welche ihrerseits die Affinität von CD18 reguliert. Es wurde in dieser Arbeit nicht geklärt, ob der positiv-regulatorische Effekt von Cytohesin-1 und CYTIP auf die Affinität von CD18 in reifen MoDC zusätzlich oder ausschließlich über RhoA verläuft. Da RNAi von RhoA die Aktivierung von CD18 nicht ganz verhindert, ist es möglich, dass Cytohesin-1 und CYTIP über einen zusätzlichen Mechanismus, wie etwa der Interaktion mit CD18, dessen Affinität beeinflussen. Allerdings muss beachtet werden, dass die Effizienz des RhoA RNAi nur bei ca. 50% liegt. Das noch zu 50% vorhandene RhoA in reifen MoDC könnte ausreichen, um die beobachtete restliche hochaffine Konformation von CD18 zu induzieren.

Auch Ezrin und Moesin, zwei Effektoren von RhoA, regulieren die Affinität von CD18. Weiterhin muß geklärt werden, ob Ezrin und Moesin in reifen MoDC auch durch Cytohesin-1, CYTIP und die PI3-Kinase reguliert werden. Genauso ist es unklar, ob RhoA und Ezrin/Moesin für die Regulation der CD18-Affinität zusammenwirken oder einen voneinander unabhängigen Effekt auf das Integrin haben.

Die Bildung der hochaffinen Konformation von LFA-1 durch Chemokine ist sehr transient – das Integrin geht innerhalb weniger Minuten in einen niedrig affinen Status zurück (Constantin *et al.* 2000). Dies konnte ebenfalls in dieser Arbeit festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Giagulli *et al.* erläutern, dass die CCL21-induzierte RhoA-Aktivität bis zu 10 Minuten anhält und somit nicht mit dem rapiden Affinitätsverlust von LFA-1 übereinstimmen kann. Sie vermuten daher, dass Chemokine zusätzliche Signalwege aktivieren, welche der Funktion von RhoA entgegenwirken und das Integrin wieder in eine inaktive Konformation überführen. So

könnte eine Chemokin-induzierte Aktivierung des Ras/Raf/MAP-Kinase-Weges die Inaktivierung von LFA-1 auslösen (Weber *et al.* 2001).



**Abb. 4.1 Modell der Chemokin-induzierten Aktivierung von  $\beta_2$ -Integrinen.** Chemokine binden an ihre Rezeptoren und induzieren so die Aktivierung der PI3-Kinase. Diese phosphoryliert PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> in der Plasmamembran und ermöglicht so die Translokation von Cytohesin-1 an die Membran. Auch CYTIP wird PI3-Kinase-abhängig über einen bislang unbekanntem Mechanismus an die Membran rekrutiert. Cytohesin-1 und CYTIP co-lokalisieren mit CD18 und aktivieren es. Zudem haben beide Proteine einen positiv-regulatorischen Effekt auf die GTPase RhoA, welche ihrerseits die Affinität von CD18 beeinflusst. Es wurde bislang nicht geklärt, ob die Aktivierung von CD18 durch den Cytohesin-1/CYTIP-Komplex ausschließlich oder zusätzlich über RhoA verläuft. Die Proteine Ezrin und Moesin sind Effektoren von RhoA und beeinflussen ihrerseits die Aktivität der GTPase. Beide Proteine sind in die Regulation der Aktivität von  $\beta_2$ -Integrinen involviert. Auch hier ist der genaue Mechanismus sowie ein eventuelles Zusammenwirken mit RhoA oder dem Cytohesin-1/CYTIP-Komplex noch nicht geklärt.

---

### 1.3 CYTOHESIN-1 UND CYTIP REGULIEREN DIE MIGRATION REIFER MODC ÜBER ZWEI ALTERNATIVE WEGE

Die Stärke der Adhäsion zwischen einer Zelle und dem Substrat bestimmt die Migrationsrate einer Zelle (Huttenlocher *et al.* 1996). In der haptotaktischen –adhäsionsabhängigen - Migration auf einem Substrat, wird eine maximale Migration bei einem Gleichgewicht pro- und anti-adhäsiver Kräfte erreicht. Eine zu starke Adhäsion verhindert eine Translokation indem die Zelle zu sehr am Substrat haftet, wohingegen eine zu geringe Adhäsion die Translokation aufgrund des Verlustes an Zell-Substrat-Kontakten inhibiert (Friedl *et al.* 2001). Die Adhäsion wird durch Faktoren wie der Organisation adhäsiver Komplexe, der Substratkonzentration und der Affinität eines Rezeptors bestimmt (Huttenlocher *et al.* 1996).

Cytohesin-1 und CYTIP werden für die Chemokin-induzierte Affinitätsregulation des Integrins CD18 in reifen MoDC benötigt (siehe 4.2). Zudem nimmt die Expression beider Proteine gravierend zu, während die DC im Laufe ihrer Reifung einen stark migratorischen Phänotyp annimmt. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob Cytohesin-1 und CYTIP über die Regulation der  $\beta_2$ -Integrin-Aktivität die Migration reifer MoDC koordinieren.

In verschiedenen Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 und CYTIP für die Migration reifer MoDC notwendig sind. Die Migration reifer MoDC in Trans-well-Versuchen ist nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP reduziert (Abb.3.13). Zudem scheint der Einfluß den Cytohesin-1 und CYTIP auf die Migration reifer MoDC haben, Liganden-unabhängig zu sein, da ICAM-1 –  $\beta_2$ -Integrin-Ligand - und Fibronectin – $\beta_1$ -Integrin-Ligand - beschichtete sowie unbeschichtete Trans-well-Filter keine Unterschiede im Migrationsverhalten reifer MoDC hervorriefen. Dies deutet auf einen Integrin-unabhängigen Einfluss von Cytohesin-1 und CYTIP auf die Migration reifer MoDC hin.

#### 1.3.1 INTEGRIN-ABHÄNGIGE REGULATION DER MIGRATION REIFER MODC DURCH CYTOHESIN-1 UND CYTIP

Leukozyten haben unterschiedliche Migrationsmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, sich in verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Umgebungen fortzubewegen (Friedl und Brocker 2000). Die Natur des Substrates bestimmt das migratorische Verhalten von Zellen. Um das Verhalten von Zellen *in vivo* zu untersuchen, ist es wichtig, den Zellen ein Substrat zu geben, welches annähernd den physikalischen und chemischen Eigenschaften der natürlichen Umgebung entspricht (Schor *et al.* 1983). Entscheidend, sowohl bei der Diapedese als auch bei der Migration innerhalb eines Gewebes, ist die Interaktion mit Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM). So lösen ECM-Bestandteile wie Fibronectin, Kollagen, Laminin und Kollagen eine haptotaktische und

chemotaktische Migration von T-Zellen aus (Hauzenberger *et al.* 1995; Hauzenberger *et al.* 1994). Mehrere Untersuchungen zeigen, dass die Migration von T-Zellen auf einem 2-dimensionalen Substrat wie Kollagen, Fibronectin, Vitronectin oder Laminin von Integrin-vermittelter Adhäsion abhängt und dass eine Hemmung der Integrinfunktion mit der Migration der Zellen interferiert (Friedl *et al.* 1993; Hauzenberger *et al.* 1995; Hauzenberger *et al.* 1994; Lawson und Maxfield 1995; Sixt *et al.* 2001). Migrationsversuche mit reifen MoDC auf fibrillärem, 2-dimensionalem Kollagen zeigen eine direktionale Migration in Richtung des applizierten Chemokins (Abb. 3.14 und 3.15). Dies konnte zuvor ebenfalls mit reifen MoDC (Burns *et al.* 2004) und BM-DC (de Noronha *et al.* 2005) auf Fibronectin gezeigt werden, wohingegen andere Untersuchungen zeigen, dass Leukozyten aufgrund ihrer geringen adhäsiven Eigenschaften nicht auf einer 2-dimensionalen Substrat migrieren können (Haston *et al.* 1982; Schor *et al.* 1983). Burns *et al.* berichten jedoch weiterhin, dass reife MoDC, im Vergleich zu unreifen MoDC, auf einem 2-dimensionalen Substrat zwar kaum adhären und sich nicht ausspreiten („spreading“) und so eine runde Morphologie und keine Polarisierung aufweisen, sie jedoch über die Ausbildung sehr viel kürzerer und feinerer Zellausläufer transient an der Matrix haften können (Burns *et al.* 2004). Dies ermöglicht reifen MoDC einen sehr schnellen und effizienten Migrationsstil (Friedl 2004). Wie erwähnt, wird die Adhäsion, welche Leukozyten auf einem 2-dimensionalen Substrat für die Migration benötigen, über Integrine vermittelt. Reife MoDC zeigen durch Hemmung des  $\beta_2$ -Integrins mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers jedoch keine eingeschränkte Migration (Abb. 3.30). Dies ist in diesem Fall nicht verwunderlich, da  $\beta_1$ -Integrine ebenfalls an Kollagen binden und die Adhäsion der DC vermitteln können. Die Hemmung des  $\beta_2$ -Integrins führt sogar zu einer erhöhten Migrationsrate (Abb. 3.30). Dies weist darauf hin, dass die Adhäsion reifer MoDC auf Kollagen - infolge der Hemmung des  $\beta_2$ -Integrins - in einem Maß verringert ist, welches sich förderlich auf die Mobilität der Zellen auswirkt. Überraschend ist hingegen, dass murine BM-DC, welche aus einer  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_7$  und  $\alpha_v$ -Integrin ‚knock-out‘-Maus generiert wurden, ebenfalls auf 2-dimensionalem Kollagen keine gestörte Migration aufweisen (Abb. 3.32 und 3.33). In diesem Fall könnten andere Kollagen-Rezeptoren wie etwa DDR-1 die Haftung der Zellen an das Substrat übernehmen. DDR-1 (*discoidin domain receptor*) ist ein Kollagenrezeptor, der unabhängig von  $\beta_1$ -Integrinen aktiviert wird und die Migration von Leukozyten vermittelt (Kamohara *et al.* 2001; Vogel *et al.* 2000).

Cytohesin-1 ‚knock-down‘ verringert die Migrationsrate der Zellen (Abb. 3.14). Cytohesin-1 wird für die Chemokin-induzierte Aktivierung des  $\beta_2$ -Integrins benötigt (Abb. 3.22 und 3.23). Es ist möglich, dass RNAi von Cytohesin-1 die Adhäsion – durch eine Hemmung der CD18-Aktivierung – derart verringert, dass die Zellen zu wenige Kontaktstellen zum Substrat ausbilden können und daher langsamer migrieren. Dies impliziert jedoch, dass die Hemmung von CD18 durch einen blockierenden Antikörper nicht vollständig ist. Da sättigende

Konzentrationen des Antikörpers verwendet wurden und so theoretisch jedes  $\beta_2$ -Integrin von einem Antikörper-Molekül gebunden wird, wäre es möglich, dass andere Epitope der  $\beta_2$ -Integrine, welche nicht durch den Antikörper erkannt werden, eine restliche Bindung an Kollagen vermitteln und so die Migration nicht gestört wird (Friedl *et al.* 1998). Es könnte jedoch auch sein, dass Cytohesin-1 zusätzlich andere, für die Migration reifer MoDC notwendige, Prozesse beeinflusst. In den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 wird genauer auf diese Möglichkeit eingegangen.

CYTIP ‚knock-down‘ in reifen MoDC erhöht die Geschwindigkeit der Migrationsrate, ähnlich wie die Hemmung der  $\beta_2$ -Integrine durch den Antikörper (Abb. 3.15). Dies ist zunächst verwunderlich, da CYTIP – wie Cytohesin-1 – für die Chemokin-induzierte Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine benötigt wird (Abb. 3.22 und 3.23). Es muß jedoch bedacht werden, dass RNAi von Cytohesin-1 zu einem doppelten ‚knock-down‘ von Cytohesin-1 und CYTIP führt, wohingegen RNAi von CYTIP sich ausschließlich auf dessen Expression auswirkt und Cytohesin-1 unbeeinflusst läßt. In diesem Fall könnte Cytohesin-1 eine restliche Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine ermöglichen, so dass die Adhäsion der Zellen ebenfalls nur in dem Maße verringert ist, dass die Zelle noch ausreichend Kontaktstellen zum Substrat ausbilden kann, ähnlich der Blockade durch den  $\beta_2$ -Integrin-inhibierenden Antikörper.

### **1.3.2 INTEGRIN-UNABHÄNGIGE REGULATION DER MIGRATION REIFER MoDC DURCH CYTOHESIN-1 UND CYTIP**

Die Funktion von DC *in vivo* hängt von aktiver Migration innerhalb 3-dimensionaler Gewebe ab (Gunzer *et al.* 2000). Kollagen-Fasern sind ein Bestandteil des Stromas, durch welches Leukozyten *in vivo* migrieren (Schor *et al.* 1983). Das Gerüst eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels ist daher eine Umgebung, die sich den physiologischen Bedingungen annähert und genutzt werden kann, um die Migration dendritischer Zellen innerhalb eines Gewebes zu untersuchen (Gunzer *et al.* 2000). DC zeigen in dieser 3-dimensionalen Umgebung eine willkürliche Migration, nicht-direktional, aber entlang von Matrixfasern. Dieser als ‚contact guidance‘ bezeichnete Migrationsstil ist *in vivo* sinnvoll, da die hochorganisierten Fibrillen der ECM – neben Chemokinen – DC den Weg zu den lymphatischen Gefäßen vorgeben können (Gunzer *et al.* 2000). DC verändern die Gewebe-Architektur nicht (Friedl *et al.* 1998). Die rasche und willkürliche Migration der DC innerhalb eines Kollagen-Geles ermöglicht ein schnelles Abtasten der Fasern und so *in vivo* eine effektive Antigen-Aufnahme und ein frühes Zusammentreffen mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle (Gunzer *et al.* 2000). DC weisen innerhalb eines Kollagen-Geles die bekannte dendritische Morphologie auf und entwickeln eine hochdynamische ‚leading edge‘ und ein nachziehendes Uropodium (Friedl *et al.* 1998).

RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP reduziert deutlich die Migration reifer MoDC innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Geles (Abb. 3.16 und 3.17). Interessant ist außerdem, dass RNAi von CD18 bzw. die Hemmung der CD18-Funktion durch einen blockierenden Antikörper die Migration reifer MoDC leicht erhöht (Abb. 3.28 und 3.31), vergleichbar zu den Ergebnissen auf einem 2-dimensionalen Kollagen-Substrat. Die Funktion von CD18 wird demnach für die Migration reifer MoDC auch innerhalb einer 3-dimensionalen Kollagen-Matrix nicht benötigt. Im Gegenteil, eine Verringerung oder Inhibition der  $\beta_2$ -Funktion fördert die Migration reifer MoDC. Es ist nicht viel bekannt über die Migration von Leukozyten in einem Gewebe und die Bedeutung von Integrinen innerhalb dessen. Friedl *et al.* konnten eine inhibierende Funktion eines aktivierenden  $\beta_1$ -Integrin-Antikörpers auf die Migration von  $CD4^+$ -T-Zellen innerhalb eines Kollagen-Geles feststellen (Friedl *et al.* 1998). Zusätzlich konnte die Migration dieser Zellen in einer 3-dimensionalen Umgebung nicht durch blockierende Antikörper gegen  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\alpha v$ -Integrine oder eine Kombination dieser Antikörper inhibiert werden (Friedl *et al.* 1998). Wenige Studien weisen Integrinen für die Migration von Leukozyten *in vivo* eine bedeutende Rolle zu (Brakebusch *et al.* 2002; D'Amico *et al.* 1998), andere sehen eine differenzielle Bedeutung der unterschiedlichen Integrine für die Migration (Werr *et al.* 1998) bzw. der Gewebe, in denen Leukozyten migrieren (Schneeberger *et al.* 2000). Nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen mit  $\beta_2$ - und  $\beta_1$ -Integrin-blockierenden Antikörpern (Daten nicht gezeigt), sind Integrine für die Migration reifer MoDC innerhalb eines Gewebes nicht bedeutend. Die Interaktion der Zellen mit den Kollagen-Fasern könnte über glykosylierte – ‚klebrige‘ – Rezeptoren wie CD44 und CD43 vermittelt werden (Friedl *et al.* 1998).

Versuche mit BM-DC, welche aus einer vierfachen Integrin-, ‚knock-out‘-Maus generiert wurden, migrieren in einem 3-dimensionalen Kollagen-Gel (Abb. 3.34 und 3.35). In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, dass RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP in diesen Integrin-, ‚knock-out‘ Zellen die Migration auf 2-dimensionalem, fibrillärem Kollagen und innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Geles reduziert bzw. sogar ganz inhibiert (Abb. 3.32 bis 3.35). Dies verweist – wie bereits die ersten Ergebnisse der Trans-well-Versuche – auf einen Integrin-unabhängigen Mechanismus der Migrationsregulation durch Cytohesin-1 und CYTIP in reifen DC.

$\beta_1$ -Integrine liegen auf nicht-aktivierten T-Zellen in einer niedrig-affinen Konformation vor (Friedl *et al.* 1998). Ebenso wurde berichtet, dass das  $\beta_2$ -Integrin LFA-1 auf MoDC nicht aktiviert werden kann (van Kooyk und Geijtenbeek 2002). Andere Studien berichten, dass LFA-1 auf Monozyten in ‚Nanoclustern‘ angeordnet ist, welche während der Differenzierung zu dendritischen Zellen verloren gehen (Cambi *et al.* 2006). Im Vergleich zu LFA-1 auf T-Zellen ist sehr wenig über  $\beta_2$ -Integrine auf DC bekannt (Varga *et al.* 2007). In dieser Arbeit konnten  $\beta_2$ -Integrine durch verschiedene Stimuli wie den Phorbolester PMA, den CD18-aktivierenden Antikörper KIM185 (Abb. 3.25 und 3.26) und die Chemokine CCL19 sowie CXCL12 (Abb.

3.22 und 3.23) aktiviert werden. Varga *et al.* berichten von der Aktivierung von CD18 auf BM-DC durch hohe Magnesium-Konzentrationen, welche durch die Anwesenheit eines CD18-aktivierenden Antikörpers zusätzlich gesteigert werden konnte (Varga *et al.* 2007). Sowohl in dieser Arbeit als auch von Burns *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expression der  $\beta_2$ -Integrine auf reifen und unreifen MoDC hoch ist und sich während der Reifung nicht wesentlich verändert (Burns *et al.* 2004). Diese hohe Expression der Integrine muss eine wichtige Bedeutung für die Funktion dendritischer Zellen haben. So wurde von Ammon *et al.* postuliert, dass  $\beta_2$ -Integrine auf DC die Bindung von Bakterien und LPS vermitteln (Ammon *et al.* 2000). In Studien mit CHO-Zellen konnten CD11b und CD11c als LPS-Rezeptoren identifiziert werden (Ingalls und Golenbock 1995). In DC gibt es bis jetzt nur für CD11b/CD18 (Mac-1) Indizien, dass sie als LPS-Rezeptor fungieren (Troelstra *et al.* 1999). Diese Beobachtung konnte in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (M. Varughese, Diplomarbeit).

Es wird vermutet, dass sich Leukozyten in einem 3-dimensionalen Kollagen-Gel durch abwechselnde Expansion von Pseudopodien und anschließende Retraktion ihres Zellkörpers fortbewegen (Haston *et al.* 1982). Während dieser ‚push and pull‘-Migration übernimmt das Uropodium eine stabilisierende Funktion, während die ‚leading edge‘ nach freien Bereichen innerhalb des Kollagen-Gitters sucht und daraufhin den Zellkörper nachzieht. Leukozyten passen ihre Zellform somit den gegebenen Strukturen an und vermögen Integrin-unabhängig einen hochdynamischen, flexiblen und schnellen Migrationsstil durchzuführen (Friedl *et al.* 1998). Die Migration von Leukozyten ähnelt sehr dem Migrationsmechanismus der niedrigen Eukaryote *Dictyostelium discoideum* (siehe 1.3.2). *D. discoideum* exprimiert keine Integrine, zeichnet sich jedoch durch eine dynamische, schnelle, niedrig affine und ‚kriechende‘ Migration mit flexibler oszillatorischer Formveränderung aus (Friedl *et al.* 2001). *D. discoideum* exprimiert zahlreiche Gene mit chemotaktischer Funktion. Sehr interessant ist hier, dass eines dieser Gene – secG – für ein PIP<sub>3</sub>-bindendes Protein mit GEF-Funktion codiert und daher homolog zu Cytohesin-1 sein könnte (Booth *et al.* 2005). In diesem Fall wäre ein Cytohesin-1 homologes Protein bereits in *D. discoideum* - und damit in einem Organismus, welcher noch keine Integrine besitzt - in chemotaktische Prozesse involviert. Untersuchungen mit *D. discoideum* Mutanten werden Aufschluß über die Funktion von secG in der Chemotaxis geben. Kürzlich konnte ein Adhäsionsmolekül in *D. discoideum* identifiziert werden, welches große Ähnlichkeit mit  $\beta_2$ -Integrinen aufweist. SibA (similar to integrin beta) beeinflusst die Phagozytose und die Adhäsion der Zellen und interagiert auf der zytoplasmatischen Seite mit Talin (Cornillon *et al.* 2006). Vor diesem Hintergrund wäre es sehr interessant eine mögliche funktionale Interaktion zwischen SibA und secG zu untersuchen.

### 1.3.3 DIE PI3-KINASE, DER CYTOHESIN-1/CYTIP-KOMPLEX SOWIE RHOA UND RAC1 REGULIEREN INTEGRIN-UNABHÄNGIGE MIGRATION REIFER MoDC

Cytohesin-1 und CYTIP regulieren die Migration von DC innerhalb eines Gewebes unabhängig von ihrer Funktion  $\beta_2$ -Integrine zu aktivieren. Demnach existiert ein alternativer Signalweg, den die Proteine nutzen, um die Mobilität reifer MoDC zu regulieren.

Die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren löst komplexe Signalwege aus, die zu einer koordinierten Aktivierung und Lokalisation von Signalmolekülen führen und so die Chemotaxis einer Zelle ermöglichen (Bardi *et al.* 2003). Chemotaxis wird bestimmt durch Motilität und Direktionalität einer Zelle. Die Ausbildung von Zellpolarität ist Voraussetzung für eine direktionale Wanderung (Bardi *et al.* 2003). Chemokin-Rezeptoren sind über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Eine Polarisierung entsteht durch intrazelluläre Amplifikation eines externen Stimulus. Die PI3-Kinase hat hier eine Schlüsselfunktion inne und wird daher auch als chemotaktischer Kompass bezeichnet (Rickert *et al.* 2000). Die Entstehung eines scharfen intrazellulären Gradienten von PIP<sub>3</sub>, dem Hauptprodukt der PI3-Kinase, ist für die Definierung eines vorderen und eines hinteren Bereiches einer Zelle essenziell (Procko und McColl 2005). PIP<sub>3</sub> und PH-tragende Proteine wie AKT/PKB, Rho-GTPasen, Vav1, Tiam-1, Arfs und ihre Regulatoren wie etwa Cytohesin-1 konzentrieren sich an der ‚leading edge‘ und interagieren bei der Polymerisation von F-Aktin (Procko und McColl 2005).

Die PI3-Kinase ist notwendig für die Migration reifer MoDC in einem Trans-well-Versuch (Abb. 3.36) sowie auf fibrillärem Kollagen (2D, Abb. 3.37) und innerhalb eines Kollagen-Geles (3D, Abb. 3.38). Dies stimmt mit einer Studie von Del Prete *et al.* überein, die berichtet, dass BM-DC aus PI3-, ‚knock-out‘-Mäusen einen gravierenden Migrationsdefekt aufweisen (Del Prete *et al.* 2004). Die PI3-Kinase vermittelt weiterhin die Chemokin-induzierte Translokation von Cytohesin-1 und CYTIP an die Plasmamembran. Beide Proteine aktivieren RhoA (Abb. 3.45 und 3.46). Der Komplex aus Cytohesin-1 und CYTIP inhibiert zusätzlich die Aktivität von Rac1 (Abb. 3.47). Diese reziproke Wirkung des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes auf die Aktivität von RhoA und Rac1 ist sehr interessant, da eine bidirektionale Regulation der GTPasen bereits bekannt ist, der molekulare Hintergrund dessen jedoch noch unklar (Rottner *et al.* 1999; Zuo *et al.* 2006). Die antagonistische Aktivität der GTPasen ist wichtig für die Ausbildung der Protrusionen von DC (Swetman *et al.* 2002) sowie für die Morphologie und Migration von Fibroblasten (Sander *et al.* 1999). Weiterhin ist eine exakt abgestimmte Koordination dieser komplexen Signalwege, sowie eine optimale Stärke der RhoA- und Rac1-Aktivität für die Migration dieser Zellen essenziell (Nobes und Hall 1999). Auch die Ausbildung der Zellpolarität benötigt eine Interaktion der Rac1- und RhoA-Signalwege. Eine Rac1-Aktivierung an der Zellfront verhindert eine lokale RhoA-Aktivierung, wohingegen eine

RhoA-Aktivierung im Uropod eine dortige Rac1-Aktivierung blockiert (Pestonjamas *et al.* 2006). Damit inhibieren sich die Vorder- und die Rückseite einer polarisierten Zelle gegenseitig (Wong *et al.* 2006).

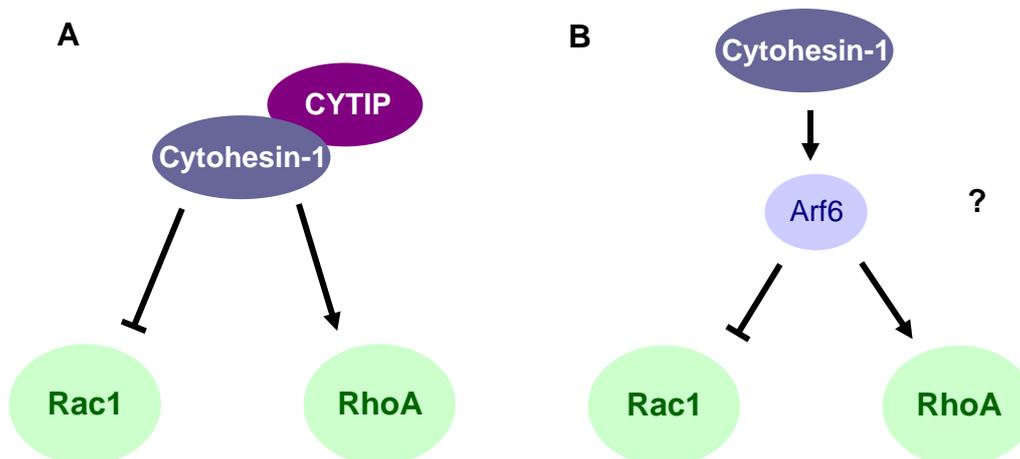
Der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex könnte demnach in reifen MoDC RhoA und Rac1 vorgeschaltet sein und PI3-Kinase-abhängig die exakte Aktivierung der GTPasen sowie die Polarisierung der Zellen steuern. Möglich wäre es auch, dass der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex nur eine GTPase direkt reguliert. So berichten Sander *et al.*, dass sie nur eine unidirektionale Regulation von RhoA durch Rac1 erkennen können, nicht jedoch einen Einfluß von RhoA auf die Aktivität von Rac1 (Sander *et al.* 1999). Cytohesin-1/CYTIP würden in diesem Fall ausschließlich die Aktivität von Rac1 regulieren und so indirekt einen Einfluß auf RhoA haben. Dies kann mit weiteren RNAi-Versuchen untersucht werden.

Rho GTPasen sind entscheidende Regulatoren des Zytoskelettes (siehe 1.3.1). Es ist daher zunächst verwunderlich, warum RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP, welche die Aktivität von RhoA und Rac1 in reifen MoDC regulieren, zu keinen erkennbaren Veränderungen des Zytoskelettes führen (Abb. 3.48 bis 3.51). Swetman *et al.* berichten, dass die Hemmung aller Rho-GTPasen die Morphologie von reifen DC nicht verändert (Swetman *et al.* 2002). Auch zeigt die Inhibition der PI3-Kinase keinen erkennbaren Einfluß auf die Integrität des Zytoskelettes (Procko und McColl 2005) und Rac1-defiziente Neutrophile haben zwar die Fähigkeit zur Chemotaxis verloren, sind jedoch immer noch zur Chemokinese befähigt (Pestonjamas *et al.* 2006). Zahlreiche andere Studien berichten von tiefgreifenden Veränderungen des Zytoskelettes nach Rac-1- oder RhoA-Inaktivierung (del Pozo *et al.* 1999; Fukata *et al.* 2003; Nobes und Hall 1999; Pestonjamas *et al.* 2006). Es ist möglich, dass die Auswirkungen auf das Zytoskelett durch die GTPasen Zelltyp-abhängig sind (del Pozo *et al.* 1999). Genauso ist es denkbar, dass eine restliche Aktivität der GTPasen in einigen Fällen, die Integrität des Zytoskelettes aufrecht erhält, eine dynamische Regulation, welche für eine Zellmigration notwendig ist, jedoch inhibiert.

Die Dynamik des Zytoskelettes und der Transport von Membranbestandteilen sind eng miteinander verbunden (Santy und Casanova 2002). Die Ausbildung von Protrusionen an der ‚leading edge‘ benötigt eine kontinuierliche Zulieferung von Membranbestandteilen sowie die Erneuerung - ‚recycling‘ - bereits genutzter Membrankomponenten (Santy und Casanova 2001). Die GTPasen der Arf-Familie sind entscheidende Regulatoren des zellulären Vesikeltransportes. Es ist wahrscheinlich, dass Interaktionen zwischen Arf- und Rho-GTPasen für die Regulation der Zellmigration entscheidend sind (Venkateswarlu und Cullen 2000), da die Lokalisation von Arf- und Rho-GTPasen an die ‚leading edge‘ zytoskelettale Veränderungen und die Ausbildung von Zellprotrusionen vermittelt (Procko und McColl 2005). Kürzlich wurde eine neue Protein-Familie charakterisiert, ARAP 1 bis 3, die neben fünf PH-Domänen GAP (GTPase activating protein)-Domänen für Arf- und Rho-GTPasen besitzen und auf diese Weise beide Signalwege

parallel regulieren kann (Santy und Casanova 2002). ARAPs werden PI3-Kinase-abhängig an die Plasmamembran rekrutiert und aktivieren unterschiedliche Arf- und Rho-GTPasen. So ist ARAP1 für Arf5 und RhoA spezifisch, wohingegen ARAP3 die GTPase-Aktivität von Arf6, RhoA, Rac1 und Cdc42 aktiviert (I *et al.* 2004). Es ist möglich, dass Cytohesin-1 durch seine GEF-Aktivität bei verschiedenen Arfs wie Arf1 und Arf6 und seiner regulatorischen Funktion auf die RhoA- und Rac1-Aktivität eine ähnliche Funktion zukommt und eine parallele Kontrolle beider Signalwege ermöglicht. Santy *et al.* berichten, dass Cytohesin-2 über dessen GEF-Funktion bei Arf6 die Aktivität von Rac1 reguliert (Santy und Casanova 2001). Sie postulieren, dass Rac1 durch einen Arf6-gesteuerten Vesikeltransport an die Plasmamembran gelangen könnte und es dort aktiviert wird. Genauso wäre es möglich, dass Cytohesin-1 über seinen Einfluß auf Arf6 die Membranrekrutierung von RhoA und/oder Rac1 reguliert.

Eine andere Studie berichtet, dass aktives Arf6 einen transienten Komplex mit Rac-GDP bildet und so eine Aktivierung der Rho-GTPase verhindert wird (Cotton *et al.* 2007). Über diesen Weg könnte Cytohesin-1 einen negativen Einfluß auf Rac1, wie er in dieser Arbeit identifiziert werden konnte, ausüben. Zudem konnten Boshans *et al.* einen reziproken Effekt von Arf6 auf die Aktivität von Rac1 und RhoA zeigen. Rac1 wurde hier durch ein Arf6-vermitteltes endosomales ‚recycling‘ aktiviert, RhoA hingegen inhibiert (Boshans *et al.* 2000). Cytohesin-1 könnte seine antagonistische Wirkung auf die Aktivität beider GTPasen somit über Arf6 ausüben, würde im Fall reifer MoDC jedoch auf Rac1 einen inhibierenden und auf RhoA einen aktivierenden Effekt haben.



**Abb. 4.2 Reziproker Effekt des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes auf die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1.** Cytohesin-1/CYTIP stimulieren die Aktivität von RhoA und hemmen die Aktivität von Rac1 (A). Der Mechanismus dessen ist unklar. Es ist möglich, dass Cytohesin-1 über dessen GEF-Funktion bei Arf6, welches selbst eine entgegengesetzte Wirkung auf RhoA und Rac1 hat, die Aktivität der GTPasen steuert (B).

Wie erwähnt, wird die Polarität einer Zelle maßgeblich durch einen PIP<sub>3</sub>-Gradienten gesteuert. PIP<sub>3</sub> und infolge dessen chemotaktisch wirksame Signalmoleküle konzentrieren sich an der ‚leading edge‘. Wie wird jedoch eine laterale Diffusion von PIP<sub>3</sub> verhindert? PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) verhindert eine Rekrutierung von PIP<sub>3</sub> im hinteren Bereich einer Zelle und an den Seiten. Unklar ist bisher, wie die entgegengesetzte Lokalisierung der PI3-Kinase und der PTEN ausgelöst wird (Fukata *et al.* 2003). Es wurde berichtet, dass PAK1 (p21-activated kinase) durch Chemokine aktiviert wird und sowohl die Lokalisation von PTEN in den hinteren Bereich einer Zelle als auch die Anordnung von Cdc42 in den vorderen Bereich einer Zelle reguliert. Ähnliches könnte für die PI3-Kinase möglich sein (Procko und McColl 2005).

Im Uropod einer Zelle konzentrieren sich RhoA, ROCK sowie Myosin II und vermitteln Akto-Myosin-basierte Kontraktionen, welche eine kombinierte Vorwärts-Bewegung des Nukleus und des Zellkörpers vermitteln (Nobes und Hall 1999). Myosin II besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. RhoA aktiviert ROCK, diese phosphoryliert die MLCK (*myosin light chain kinase*), welche schließlich die leichten Ketten des Myosin II phosphoryliert und damit aktiviert (Klemke *et al.* 1997). Aktiviertes Myosin II interagiert mit kortikalem Aktin, um eine kontraktile Kraft parallel zur Membran auszuüben (Kobayashi *et al.* 2001). Die Anreicherung von Myosin II im hinteren Bereich und an der Seite einer Zelle verhindert so die Ausbildung lateraler Protrusionen (Wong *et al.* 2006). Es wäre möglich, dass Cytohesin-1 über RhoA in die Myosin II-Stimulation und damit in die Zellkontraktion involviert ist. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass RhoA und ROCK für die Ablösung von Leukozyten vom Substrat sowie die Kontraktion des Zellkörpers notwendig sind und dass eine Hemmung von RhoA die Zellmigration verhindert (Alblas *et al.* 2001; Worthylake *et al.* 2001). Für den Fall, dass Cytohesin-1 in reifen MoDC die Kontraktion reguliert, müßte RNAi des Proteins die Chemokin-induzierte Phosphorylierung von Myosin II reduzieren.

Die MAP-Kinasen sind bekannt für ihre regulatorische Funktion in der Zellmigration (Huang *et al.* 2004). Chemokine wie CXCL12 aktivieren den Ras/Raf1-Signalweg, welcher zur Aktivierung von MEK1 und damit zur Phosphorylierung von ERK1/2 führt (Zhao *et al.* 2006). Cortactin wird durch ERK1/2 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Es bindet WASP und N-WASP und aktiviert so die Aktin-Polymerisation (Martinez-Quiles *et al.* 2004). Auch RhoA aktiviert MEK1 und darüber ERK1/2 (Chen und Cobb 2006). PI3-Kinasen aktivieren MAP-Kinasen über ihre intrinsische Serin-Kinase-Aktivität und es gibt Hinweise, dass sie direkt MAP-Kinasen phosphorylieren und aktivieren. Die Phosphorylierung von ERK1/2 kann durch Hemmung der PI3-Kinase in Leukozyten inhibiert werden (Lopez-Illasaca 1998; Procko und McColl 2005). RNAi von Cytohesin-1 in reifen MoDC reduziert die unstimulierte und Chemokin-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 3.57). Es ist jedoch fraglich, ob

ERK1/2 in Leukozyten, speziell in DC, die Chemokin-induzierte Migration regulieren (Bardi *et al.* 2003).

Die Hemmung von ERK1/2 reduziert die Migration reifer MoDC in Trans-well-Versuchen (Abb. 3.56), hat jedoch keinen Einfluß auf die Migration reifer MoDC auf 2-dimensionalem, fibrillärem Kollagen (2D) und innerhalb eines 3-dimensionalem Kollagen-Gerüsts (Daten nicht gezeigt). Entsprechend Widersprüchliches findet sich in der Literatur. Es gibt Berichte die besagen, dass ERK1/2 für die Differenzierung von Monozyten zu unreifen DC sowie das Überleben der Zellen notwendig ist. Die Maturierung und Migration wird jedoch durch die MAP-Kinase p38 induziert (Luft *et al.* 2004). Die Bedeutung von ERK1/2 für das Überleben reifer MoDC konnte im Laufe dieser Arbeit bestätigt werden, da RNAi von Cytohesin-1 die Zellzahl um etwa 40% im Vergleich zu Kontroll-Zellen reduziert (Daten nicht gezeigt). Die Migration reifer MoDC wird durch ERK1/2 jedoch gehemmt (Luft *et al.* 2006). Randolph *et al.* postulieren, dass ERK1/2 für die Entwicklung eines pro-inflammatorischen, IL-12 sezernierenden DC-Typs und p38 zur Differenzierung in einen migratorischen DC-Typ notwendig ist (Randolph *et al.* 2005). Andere wie Li *et al.* berichten, dass ERK1/2 für die Migration reifer MoDC in Richtung der Chemokine CCL19 und CXCL12 benötigt werden (Li *et al.* 2007). Die Summe aller Ergebnisse zeigt, dass die Funktion von ERK1/2 für die Migration reifer MoDC noch nicht eindeutig geklärt ist, jedoch deutet vieles darauf hin, dass den Kinasen für das Überleben der Zelle eine größer Bedeutung zukommt als für die Migration reifer MoDC.

#### **1.3.4 MODELL DES DUALEN FUNKTIONSMECHANISMUS DES CYTOHESIN-1/CYTIP-KOMPLEXES IN DER MIGRATION REIFER MoDC**

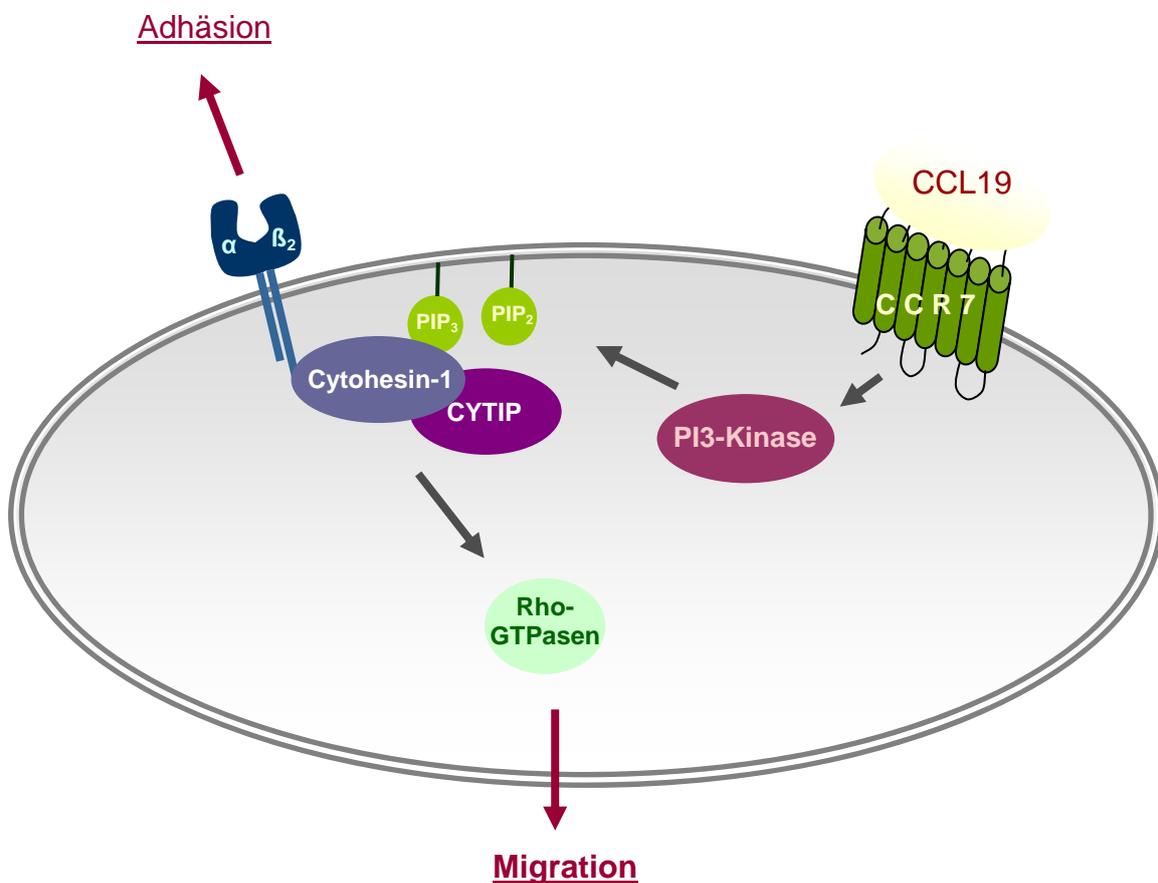
Um die Bedeutung von Cytohesin-1 und CYTIP für die Migration dendritischer Zellen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Maus-Experimente von N. Czeloth in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Förster, Hannover, durchgeführt. Nach RNAi von Cytohesin-1 und CYTIP ist die Anzahl der BM-DC, die von der Pfote in den poplitealen Lymphknoten migrieren, stark reduziert (Abb. 3.18). Demnach besitzen Cytohesin-1 und CYTIP auch *in vivo* eine bedeutende Funktion für die Migration dendritischer Zellen.

Nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen können Cytohesin-1 und CYTIP über zwei alternative, voneinander unabhängige Wege die Migration reifer DC beeinflussen: Ein Integrin-abhängiger Mechanismus verläuft über die Regulation der Affinität von CD18 und damit der Adhäsion der Zellen. Dieser Mechanismus ist in der haptotaktische Migration auf einem 2-dimensionalen ECM-Substrat sowie auf Endothelien von Bedeutung. Ein zweiter, Integrin-unabhängiger Mechanismus verläuft über die Regulation der GTPasen RhoA und Rac1 und ist für die Migration reifer MoDC innerhalb eines Gewebes entscheidend. Auf diese Weise steuert

der Komplex aus Cytohesin-1 und CYTIP zwei unterschiedliche Migrationsmechanismen reifer MoDC.

Da die Funktion von RhoGTPasen auch in der Adhäsion dendritischer Zellen notwendig ist (Daten nicht gezeigt), kann es sein, dass Cytohesin-1 über dessen Einfluß auf RhoA und Rac1 auf diese Weise die statische Adhäsion reifer MoDC an  $\beta_1$ -Integrin-Liganden reguliert.

Untersuchungen von MoDC aus LAD I-Patienten zeigen eine gestörte Migration dieser Zellen durch Endothelzell-beschichtete Trans-well-Filter (Fiorini *et al.* 2002). Dies entspricht der Extravasation von DC aus der Zirkulation, die maßgeblich durch CD18 vermittelt wird. Nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dürfte die Migration dieser Zellen innerhalb eines Gewebes nicht gestört sein.



**Abb. 4.3 Die duale Funktion des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes in der Migration reifer MoDC.** Cytohesin-1/CYTIP beeinflussen die Migration reifer MoDC über einen Integrin-abhängigen und einen Integrin-unabhängigen Weg. Die Regulation der CD18-Aktivität durch den Cytohesin-1/CYTIP-Komplex beeinflusst die Migration der Zellen auf einem 2-dimensionalem Substrat. Der Einfluß des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes auf die Rho-GTPasen steuert einen zusätzlichen Migrationsmechanismus, der für die Mobilität reifer MoDC innerhalb eines Gewebes entscheidend ist.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen (DC) bilden als professionelle Antigen-präsentierende Zellen die wichtigste Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die Aufnahme eines Antigens in peripheren Geweben induziert ihre Maturierung, welche die Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung sowie die Entwicklung eines hocheffizienten Migrationsmechanismus ermöglicht. Auf diese Weise gelangen DC aus der Peripherie in das nächstgelegene lymphoide Organ und lösen hier adaptive Immunität aus.

Eine koordinierte Migration bedarf eines Gleichgewichts an pro- und anti-adhäsiven Kräften, welche durch Integrine vermittelt werden. Die interagierenden Proteine Cytohesin-1 und CYTIP sind in die Regulation LFA-1 (CD11a/CD18)-vermittelter Adhäsion in Jurkat-Zellen involviert und ihre Expression steigt während der DC-Reifung drastisch an. In dieser Arbeit wurde ein Einfluß von Cytohesin-1 und CYTIP in der Migration reifer DC *in vitro* und *in vivo* – insbesondere hinsichtlich der Aktivierung von CD18 - untersucht.

Mit Hilfe von RNAi-Experimenten in DC, welche aus Monozyten generiert wurden (*monocyte derived dendritic cells*, MoDC) konnte gezeigt werden, dass der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex eine duale Funktion ausübt, welche einerseits über die Stimulierung der Integrin-Untereinheit CD18, andererseits über die Regulation der Rho-GTPasen RhoA und Rac1 verläuft.

Cytohesin-1 und CYTIP kontrollieren PI3-Kinase-abhängig die Chemokin-induzierte Aktivierung von CD18 und steuern auf diese Weise eine Integrin-abhängige Migration reifer MoDC auf 2-dimensionalem Substrat wie fibrillärem Kollagen sowie die Adhäsion an Endothelien unter Flussbedingungen. Über diesen Integrin-abhängigen Mechanismus kann der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex *in vivo* die Interaktion reifer MoDC mit Endothelzellen - etwa während der Extravasation aus der Zirkulation in Gewebe - regulieren. Weiterhin sind die GTPase RhoA sowie Ezrin und Moesin maßgeblich an der Chemokin-induzierten Aktivierung von CD18 beteiligt. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex die GTPase RhoA aktiviert. Die Aktivierung von CD18 durch Cytohesin-1 und CYTIP kann daher, zusätzlich zu einer Interaktion mit CD18 oder ausschließlich, über RhoA verlaufen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass, entgegen dem allgemeinen Migrationsmodell, welches die Wanderung von Zellen als Integrin-abhängig beschreibt, reife MoDC in einem 3-dimensionalen Gewebe ungeachtet der Aktivität und Expression ihrer Integrine migrieren. Diese Integrin-unabhängige Wanderung reifer MoDC verläuft über

---

flexible, oszillatorische Formveränderungen des Zellkörpers und ist maßgeblich auf die Funktion von Cytohesin-1 und CYTIP angewiesen. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und Rac1 reziprok reguliert – während RhoA durch Cytohesin-1 und CYTIP aktiviert wird, wird Rac1 inhibiert. Diese entgegengesetzte Regulation der GTPase-Aktivität ist entscheidend für eine koordinierte Migration und ermöglicht es Cytohesin-1 und CYTIP die Wanderung reifer MoDC in einer Umgebung zu steuern, in der Integrine nicht von Bedeutung sind.

Die Regulation zweier Signalwege weist Cytohesin-1 und CYTIP eine Schlüsselfunktion in der Wanderung der antigen-präsentierenden Zellen zu. Die Koordination von Integrin-abhängiger und Integrin-unabhängiger Migration reifer MoDC durch Cytohesin-1 und CYTIP gewährleistet einen, an das jeweilige Gewebe angepassten, hocheffizienten Migrationsmechanismus, der für die schnelle Auslösung einer adaptiven Immunantwort essenziell ist.

### 3 ABBILDUNGEN

Abb. 1.1 DC-Populationen und verwandte Makrophagen	4
Abb. 1.2 Lebenszyklus einer dendritische Zelle	9
Abb. 1.3 Modell der Fibroblasten-Migration	12
Abb. 1.4 Die Extravasation der Leukozyten	16
Abb. 1.5 Die Familie der Integrine	18
Abb. 1.6 Variable Affinitäten des $\beta 2$ -Integrins LFA-1 durch unterschiedliche Konformationen	22
Abb. 1.7 Die Domänenstruktur von Cytohesin-1	24
Abb. 1.8 Die Domänenstruktur von CYTIP	25
Abb. 2.1 Modifizierte Boyden-Kammer	39
Abb. 2.2 IBIDI-Kammer	39
Abb. 3.1 Expression des myeloiden Oberflächenmarkers CD14 auf Monozyten und imDC	47
Abb. 3.2 Maturierung humaner MoDC	48
Abb. 3.3 Expression der Integrin-Untereinheit CD18 und der $\alpha$ -Ketten CD11a, b und c	50
Abb. 3.4 Differenzial-Interferenz-Kontrast-(DIC)-Aufnahmen von imDC und mDC auf Fibronektin	51
Abb. 3.5 Anstieg der Cytohesin-1 und CYTIP Expression während der Reifung humaner MoDC	52
Abb. 3.6 Interaktionsnachweis zwischen endogenem Cytohesin-1 und CYTIP	52
Abb. 3.7 Reduktion der Protein-Expression von Cytohesin-1 und CYTIP in mDC mittels RNAi	53
Abb. 3.8 Expression von Reifungsmarkern auf Kontroll- und Cytohesin-1 bzw. CYTIP 'knock-down'-Zellen	54
Abb. 3.9 Expression der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CCR7 auf reifen Kontroll-Zellen sowie Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) 'knock-down' MoDC	55
Abb. 3.10 Cytohesin-1 reguliert die Protein-Expression von CYTIP	56
Abb. 3.11 Die Cytohesin-1 GEF-Funktion ist für die Protein-Expression von CYTIP in PBLs erforderlich	57
Abb. 3.12 Die Cytohesin-1 GEF-Funktion ist für die Protein-Expression von CYTIP in reifen MoDC erforderlich	58
Abb. 3.13 Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration reifer MoDC im Trans-well-Versuch erforderlich	60
Abb. 3.14 Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) nach RNAi von Cytohesin-1	61
Abb. 3.15 Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) nach RNAi von CYTIP	62
Abb. 3.16 Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach RNAi von Cytohesin-1 gestört	63
Abb. 3.17 Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach RNAi von CYTIP gestört	64
Abb. 3.18 Cytohesin-1 und CYTIP sind für die Migration muriner BM-DC in vivo erforderlich	65

Abb. 3.19 Western Blot-Analyse der Reduktion von Cytohesin-1 und CYTIP in murinen BM-DC mittels RNAi _____	66
Abb. 3.20 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CD18 und Cytohesin-1 in reifen MoDC _____	67
Abb. 3.21 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CD18 und CYTIP in reifen MoDC _____	68
Abb. 3.22 Expression des 327C-Aktivierungspitopes auf CD18 nach RNAi von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) auf unstimulierten und CCL19-stimulierten mDC _____	69
Abb. 3.23 Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes auf CD18 nach RNAi von Cytohesin-1 (A) und CYTIP (B) auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten, reifen MoDC _____	70
Abb. 3.24 Expression von CD18 auf reifen MoDC nach Cytohesin-1 bzw. CYTIP ‚knock-down‘ im Vergleich zu Kontroll-Zellen _____	71
Abb. 3.25 Statische Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin nach RNAi von Cytohesin-1 im Vergleich zu Kontroll-Zellen _____	72
Abb. 3.26 Statische Adhäsion reifer MoDC an ICAM-1 und Fibronectin nach RNAi von CYTIP im Vergleich zu Kontroll-Zellen _____	73
Abb. 3.27 Adhäsion reifer MoDC an humane Endothelzellen (HUVEC) nach CYTIP ‚knock-down‘ unter Flussbedingungen _____	73
Abb. 3.28 Die Migration reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (3D) ist nach RNAi von CD18 leicht erhöht _____	76
Abb. 3.29 FACS-Analyse der CD18 Expression nach CD18 RNAi in reifen MoDC _____	76
Abb. 3.30 Die Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) ist nach Inhibition der CD18-Funktion erhöht _____	77
Abb. 3.31 Die Migration reifer MoDC in einem Kollagen-Gel (3D) ist nach Inhibition der CD18-Funktion erhöht _____	78
Abb. 3.32 Vierfach Integrin- ‚knock-out‘ -BM-DC zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) erst nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ eine gestörte Migration _____	79
Abb. 3.33 Vierfach Integrin- ‚knock-out‘ -BM-DC zeigen auf einer Kollagen-Matrix (2D) erst nach CYTIP ‚knock-down‘ eine gestörte Migration _____	80
Abb. 3.34 Vierfach Integrin- ‚knock-out‘ -BM-DC zeigen innerhalb einer Kollagen-Matrix (3D) nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ eine verringerte Migration _____	81
Abb. 3.35 Vierfach Integrin- ‚knock-out‘ -BM-DC zeigen innerhalb einer Kollagen-Matrix (3D) erst nach CYTIP ‚knock-down‘ eine gestörte Migration _____	82
Abb. 3.36 Die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin im Trans-well Versuch benötigt die Aktivität der PI3-Kinase _____	84
Abb. 3.37 Die Migration reifer MoDC auf einer Kollagen-Matrix (2D) ist nach Inhibition der PI3-Kinase verringert _____	85
Abb. 3.38 Migration reifer MoDC innerhalb eines Kollagen-Gels (3D) ist nach Inhibition der PI3-Kinase gestört _____	86
Abb. 3.39 Die Adhäsion reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin benötigt die Aktivität der PI3-Kinase _____	87
Abb. 3.40 Immunfluoreszenzaufnahmen von Cytohesin-1 und CYTIP in reifen MoDC nach Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 im Vergleich zu Kontroll-Zellen _____	88

Abb. 3.41 FACS-Analyse der Expression des 327C-Aktivierungsepitopes von CD18 nach Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002	89
Abb. 3.42 FACS-Analyse der Expression des mAB24-Aktivierungsepitopes von CD18 nach Hemmung der PI3-Kinase durch den Inhibitor LY294002	90
Abb. 3.43 43 Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin nach Hemmung der RhoA-Aktivität im Trans-well Versuch	92
Abb. 3.44 Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin nach Hemmung der Rac1-Aktivität im Trans-well-Versuch	93
Abb. 3.45 Die RhoA-Aktivität ist nach RNAi von Cytohesin-1 verringert	95
Abb. 3.46 Die RhoA-Aktivität ist nach RNAi von CYTIP verringert	95
Abb. 3.47 Die Rac1-Aktivität ist nach RNAi von Cytohesin-1 erhöht	96
Abb. 3.48 Affinitätszytochemische Fluoreszenzaufnahme einer Aktin-Markierung in reifen MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D)	98
Abb. 3.49 Affinitätszytochemische Fluoreszenzaufnahme einer Aktin-Markierung in reifen MoDC nach CYTIP ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D) und in einem Kollagen-Gel (3D)	99
Abb. 3.50 Immunfluoreszenzaufnahme einer Mikrotubuli-Markierung in reifen MoDC nach Cytohesin-1 ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D)	100
Abb. 3.51 Immunfluoreszenzaufnahme einer Mikrotubuli-Markierung in reifen MoDC nach CYTIP ‚knock-down‘ auf einer Fibronectin-Matrix (2D)	101
Abb. 3.52 Reduktion der RhoA Protein-Expression in reifen MoDC mit RNAi	101
Abb. 3.53 Expression des 327C-Aktivierungsepitopes auf CD18 nach RNAi von RhoA auf unstimulierten, CCL19- und CXCL12-stimulierten mDC	102
Abb. 3.54 Reduktion der Ezrin (80kDa) und Moesin (75kDa) Protein-Expression mittels siRNA.	103
Abb. 3.55 FACS-Analyse der Expression des 327C-Aktivierungsepitopes von CD18 nach RNAi von Ezrin und Moesin	104
Abb. 3.56 Die Migration reifer MoDC auf ICAM-1 und Fibronectin im Trans-well-Versuch benötigt die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2	105
Abb. 3.57 Die Aktivierung von ERK1/2 ist abhängig von Cytohesin-1	106
Abb. 3.58 Die Chemokin-induzierte Aktivierung von ERK1/2 wird nicht oder nur schwach von CYTIP beeinflusst	106
Abb. 4.1 Modell der Chemokin-induzierten Aktivierung von $\beta_2$ -Integrinen	118
Abb. 4.2 Reziproker Effekt des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes auf die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1	126
Abb. 4.3 Die duale Funktion des Cytohesin-1/CYTIP-Komplexes in der Migration reifer MoDC	129

## 4 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor ( <i>ADP-ribosylation factor</i> )
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bidest.	zweifach destilliert
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cc	coiled-coil-Domäne
CD	Zelloberflächenmarker ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA
Cyh-1	Cytohesin-1
DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
FACS	fluoreszenzaktivierte Zelltrennung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
Fc	konstante Region der Immunglobuline ( <i>fragment crystallizable</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein

---

GEF	.....Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
GTP	..... Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	..... Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym
HBSS	..... Hank's buffered salt solution
HEPES	..... N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	..... Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IDAS	..... I-domain allosteric site
IF	..... Immunfluoreszenz
IFN	..... Interferon
Ig	..... Immunglobulin
IgG	..... Immunglobulin G
IL	..... Interleukin
IP	..... Immunpräzipitation
IP3	..... Inositol-(1,4,5)-triphosphat
kD	..... Kilodalton
l	..... Liter
LAD	..... Leukozyten-Adhäsionsdefizienz
LFA-1	..... lymphocyte function-associated antigen 1
LZ	..... Leucin-Zipper
M	..... molar (mol/l)
m	..... Meter
mAb	..... monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MAP-Kinase	..... Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	..... Milligramm
MHC	..... Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MIDAS	..... metal ion-dependent adhesion site
min	..... Minute
ml	..... Milliliter
mM	..... millimolar
mRNA	..... messenger RNA
µg	..... Mikrogramm
µl	..... Mikroliter
ng	..... Nanogramm
nm	..... Nanometer
OD <sub>x</sub>	..... optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P	..... Phosphat
PAGE	..... Polyacrylamidgelelektrophorese

---

PBL	.....Lymphozyten des peripheren Blutes (peripheral blood lymphocytes)
PBMC	.....Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	..... Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PDZ	..... PSD-95 (postsynaptic density-95), Dlg (discs large),
PFA	..... Paraformaldehyd
pH	..... negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PH	..... Pleckstrin-Homologie
PI3-	..... Kinase Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	..... Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat oder PtdIns[4,5]P <sub>2</sub>
PIP <sub>3</sub>	..... Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat oder PtdIns[3,4,5]P <sub>3</sub>
PKC	..... Proteinkinase C
PLC	..... Phospholipase C
PLD	..... Phospholipase D
PMA	..... 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (phorbol 12-myristate 13-acetate)
pmol	..... Picomol
PMSF	..... Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	..... Phosphatidylserin
RNA	..... Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	..... Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	..... Raumtemperatur
RT-PCR	..... quantitative PCR ( <i>real time PCR</i> )
SDS	..... Natriumdodecylsulfat
sec	..... Sekunde
SH	..... Src-Homologie
siRNA	..... <i>small interfering RNA</i>
TAE	..... Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	..... Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TBST	..... Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TCR	..... T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TM	..... transmembran
TNF	..... Tumornekrosefaktor
TRITC	..... Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	..... Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UV	..... Ultraviolett
vgl.	..... vergleiche
v/v	..... Volumen pro Volumen

---

WT .....	Wildtyp
w/v .....	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
x g .....	x-fache Erdbeschleunigung
z. B. ....	zum Beispiel

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Achstetter, T., A. Franzusoff, C. Field and R. Schekman (1988). "SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus." J Biol Chem **263**(24): 11711-7.
- Agnello, D., C.S. Lankford, J. Bream, A. Morinobu, M. Gadina, J.J. O'Shea and D.M. Frucht (2003). "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." J Clin Immunol **23**(3): 147-61.
- Alblas, J., L. Ulfman, P. Hordijk and L. Koenderman (2001). "Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes." Mol Biol Cell **12**(7): 2137-45.
- Alon, R. and A. Etzioni (2003). "LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies." Trends Immunol **24**(10): 561-6.
- Ammon, C., S.P. Meyer, L. Schwarzfischer, S.W. Krause, R. Andreesen and M. Kreutz (2000). "Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells." Immunology **100**(3): 364-9.
- Anand-Apte, B., B.R. Zetter, A. Viswanathan, R.G. Qiu, J. Chen, R. Ruggieri and M. Symons (1997). "Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways." J Biol Chem **272**(49): 30688-92.
- Arnaout, M.A. (1990). "Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response." Immunol Rev **114**: 145-80.
- Arnaout, M.A. (1990). "Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18." Blood **75**(5): 1037-50.
- Arnaout, M.A., R.F. Todd, 3rd, N. Dana, J. Melamed, S.F. Schlossman and H.R. Colten (1983). "Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol)." J Clin Invest **72**(1): 171-9.
- Axelsson, L., C. Hellberg, F. Melander, D. Smith, L. Zheng and T. Andersson (2000). "Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase." Exp Cell Res **256**(1): 257-63.

- 
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R.M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bardi, G., V. Niggli and P. Loetscher (2003). "Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes." FEBS Lett **542**(1-3): 79-83.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J.M. Serrador, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr and F. Sanchez-Madrid (2002). "Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes." J Cell Biol **157**(7): 1233-45.
- Beals, C.R., A.C. Edwards, R.J. Gottschalk, T.W. Kuijpers and D.E. Staunton (2001). "CD18 activation epitopes induced by leukocyte activation." J Immunol **167**(11): 6113-22.
- Bennett, V. and D.M. Gilligan (1993). "The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane." Annu Rev Cell Biol **9**: 27-66.
- Berlin, C., R.F. Bargatze, J.J. Campbell, U.H. von Andrian, M.C. Szabo, S.R. Hasslen, R.D. Nelson, E.L. Berg, S.L. Erlandsen and E.C. Butcher (1995). "alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow." Cell **80**(3): 413-22.
- Betz, S.F., A. Schnuchel, H. Wang, E.T. Olejniczak, R.P. Meadows, B.P. Lipsky, E.A. Harris, D.E. Staunton and S.W. Fesik (1998). "Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7909-14.
- Beutler, B. (2004). "Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling." Nature **430**(6996): 257-63.
- Binder, H. and G. Lindblom (2003). "Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes." Biophys J **85**(2): 982-95.
- Bishop, A.L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.
- Boehm, T., S. Hofer, P. Winklehner, B. Kellersch, C. Geiger, A. Trockenbacher, S. Neyer, H. Fiegl, S. Ebner, L. Ivarsson, R. Schneider, E. Kremmer, C. Heufler and W. Kolanus (2003). "Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration." Embo J **22**(5): 1014-24.
- Booth, E.O., N. Van Driessche, O. Zhuchenko, A. Kuspa and G. Shaulsky (2005). "Microarray phenotyping in Dictyostelium reveals a regulon of chemotaxis genes." Bioinformatics **21**(24): 4371-7.

- 
- Borghesi, L. and C. Milcarek (2007). "Innate versus Adaptive Immunity: A Paradigm Past Its Prime?" Cancer Res **67**(9): 3989-93.
- Boshans, R.L., S. Szanto, L. van Aelst and C. D'Souza-Schorey (2000). "ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA." Mol Cell Biol **20**(10): 3685-94.
- Brakebusch, C., S. Fillatreau, A.J. Potocnik, G. Bungartz, P. Wilhelm, M. Svensson, P. Kearney, H. Korner, D. Gray and R. Fassler (2002). "Beta1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response." Immunity **16**(3): 465-77.
- Bretscher, M.S. (1996). "Moving membrane up to the front of migrating cells." Cell **85**(4): 465-7.
- Bretscher, A., D. Reczek and M. Berryman (1997). "Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures." J Cell Sci **110** ( Pt 24): 3011-8.
- Burns, S., S.J. Hardy, J. Buddle, K.L. Yong, G.E. Jones and A.J. Thrasher (2004). "Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence." Cell Motil Cytoskeleton **57**(2): 118-32.
- Burridge, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-79.
- Cambi, A., B. Joosten, M. Koopman, F. de Lange, I. Beeren, R. Torensma, J.A. Fransen, M. Garcia-Parajo, F.N. van Leeuwen and C.G. Figdor (2006). "Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity." Mol Biol Cell **17**(10): 4270-81.
- Campbell, J.J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M.A. Siani, D.A. Thompson and E.C. Butcher (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." Science **279**(5349): 381-4.
- Cemerski, S. and A. Shaw (2006). "Immune synapses in T-cell activation." Curr Opin Immunol **18**(3): 298-304.
- Chen, Z. and M.H. Cobb (2006). "Activation of MEKK1 by Rho GTPases." Methods Enzymol **406**: 468-78.
- Chernyavsky, A.I., J. Arredondo, E. Karlsson, I. Wessler and S.A. Grando (2005). "The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration." J Biol Chem **280**(47): 39220-8.
- Cerundolo, V., I.F. Hermans and M. Salio (2004). "Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic." Nat Immunol **5**(1): 7-10.

- Chan, A.S., J.L. Mobley, G.B. Fields and Y. Shimizu (1997). "CD7-mediated regulation of integrin adhesiveness on human T cells involves tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J Immunol **159**(2): 934-42.
- Chan, V.W., S. Kothakota, M.C. Rohan, L. Panganiban-Lustan, J.P. Gardner, M.S. Wachowicz, J.A. Winter and L.T. Williams (1999). "Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells." Blood **93**(11): 3610-6.
- Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, C.L. Jackson and M. Chabre (1996). "A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains." Nature **384**(6608): 481-4.
- Condeelis, J. (1993). "Life at the leading edge: the formation of cell protrusions." Annu Rev Cell Biol **9**: 411-44.
- Constantin, G., M. Majeed, C. Giagulli, L. Piccio, J.Y. Kim, E.C. Butcher and C. Laudanna (2000). "Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow." Immunity **13**(6): 759-69.
- Cornillon, S., L. Gebbie, M. Benghezal, P. Nair, S. Keller, B. Wehrle-Haller, S.J. Charette, F. Bruckert, F. Letourneur and P. Cosson (2006). "An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin beta features." EMBO Rep **7**(6): 617-21.
- Cotton, M., P.L. Boulay, T. Houndolo, N. Vitale, J.A. Pitcher and A. Claing (2007). "Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration." Mol Biol Cell **18**(2): 501-11.
- D'Amico, G., G. Bianchi, S. Bernasconi, L. Bersani, L. Piemonti, S. Sozzani, A. Mantovani and P. Allavena (1998). "Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells." Blood **92**(1): 207-14.
- Darribere, T., M. Skalski, H.L. Cousin, A. Gaultier, C. Montmory and D. Alfandari (2000). "Integrins: regulators of embryogenesis." Biol Cell **92**(1): 5-25.
- de la Fuente, H., M. Mittelbrunn, L. Sanchez-Martin, M. Vicente-Manzanares, A. Lamana, R. Pardi, C. Cabanas and F. Sanchez-Madrid (2005). "Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecule-mediated initial T-cell scanning." Mol Biol Cell **16**(7): 3314-22.
- DeMali, K.A., K. Wennerberg and K. Burridge (2003). "Integrin signaling to the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 572-82.
- de Noronha, S., S. Hardy, J. Sinclair, M.P. Blundell, J. Strid, O. Schulz, J. Zwirner, G.E. Jones, D.R. Katz, C. Kinnon and A.J. Thrasher (2005). "Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein." Blood **105**(4): 1590-7.

- del Pozo, M.A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J.M. Serrador and F. Sanchez-Madrid (1999). "Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes." Eur J Immunol **29**(11): 3609-20.
- Del Prete, A., W. Vermi, E. Dander, K. Otero, L. Barberis, W. Luini, S. Bernasconi, M. Sironi, A. Santoro, C. Garlanda, F. Facchetti, M.P. Wymann, A. Vecchi, E. Hirsch, A. Mantovani and S. Sozzani (2004). "Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice." Embo J **23**(17): 3505-15.
- Dierks, H., J. Kolanus and W. Kolanus (2001). "Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain." J Biol Chem **276**(40): 37472-81.
- Dieu, M.C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
- Donaldson, J.G. and C.L. Jackson (2000). "Regulators and effectors of the ARF GTPases." Curr Opin Cell Biol **12**(4): 475-82.
- Dormond, O., L. Ponsonnet, M. Hasmim, A. Foletti and C. Ruegg (2004). "Manganese-induced integrin affinity maturation promotes recruitment of alpha V beta 3 integrin to focal adhesions in endothelial cells: evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase and Src." Thromb Haemost **92**(1): 151-61.
- Dudda, J.C., A. Lembo, E. Bachtanian, J. Huehn, C. Siewert, A. Hamann, E. Kremmer, R. Forster and S.F. Martin (2005). "Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments." Eur J Immunol **35**(4): 1056-65.
- Dustin, M.L. and J.A. Cooper (2000). "The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling." Nat Immunol **1**(1): 23-9.
- Dustin, M.L. and T.A. Springer (1989). "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1." Nature **341**(6243): 619-24.
- Dustin, M.L. and T.A. Springer (1991). "Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion." Annu Rev Immunol **9**: 27-66.
- Edelman, G.M. and K.L. Crossin (1991). "Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology." Annu Rev Biochem **60**: 155-90.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber and T. Tuschl (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." Methods **26**(2): 199-213.
- Etienne-Manneville, S. (2004). "Cdc42--the centre of polarity." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1291-300.

- Fabbri, M., E. Bianchi, L. Fumagalli and R. Pardi (1999). "Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules." Inflamm Res **48**(5): 239-46.
- Faure, S., L.I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V.L. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R.N. Germain and J. Delon (2004). "ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation." Nat Immunol **5**(3): 272-9.
- Fey, P., S. Stephens, M.A. Titus and R.L. Chisholm (2002). "SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium." J Cell Biol **159**(6): 1109-19.
- Fiorini, M., W. Vermi, F. Facchetti, D. Moratto, G. Alessandri, L. Notarangelo, A. Caruso, P. Grigolato, A.G. Ugazio, L.D. Notarangelo and R. Badolato (2002). "Defective migration of monocyte-derived dendritic cells in LAD-1 immunodeficiency." J Leukoc Biol **72**(4): 650-6.
- Frank, S., S. Upender, S.H. Hansen and J.E. Casanova (1998). "ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6." J Biol Chem **273**(1): 23-7.
- Franke, T.F., D.R. Kaplan and L.C. Cantley (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." Cell **88**(4): 435-7.
- Franke, T.F., D.R. Kaplan, L.C. Cantley and A. Toker (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." Science **275**(5300): 665-8.
- Frech, M., M. Andjelkovic, E. Ingley, K.K. Reddy, J.R. Falck and B.A. Hemmings (1997). "High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity." J Biol Chem **272**(13): 8474-81.
- Friedl, P., P.B. Noble and K.S. Zanker (1993). "Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories." J Immunol Methods **165**(2): 157-65.
- Friedl, P., E.B. Brocker and K.S. Zanker (1998). "Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells." Cell Adhes Commun **6**(2-3): 225-36.
- Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.
- Friedl, P., S. Borgmann and E.B. Brocker (2001). "Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement." J Leukoc Biol **70**(4): 491-509.
- Friedl, P. and E.B. Brocker (2000). "T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations." Dev Immunol **7**(2-4): 249-66.

- 
- Friedl, P., A.T. den Boer and M. Gunzer (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-45.
- Friedl, P., F. Entschladen, C. Conrad, B. Niggemann and K.S. Zanker (1998). "CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion." Eur J Immunol **28**(8): 2331-43.
- Friedl, P. and M. Gunzer (2001). "Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model." Trends Immunol **22**(4): 187-91.
- Friedl, P. and J. Storim (2004). "Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse." Trends Cell Biol **14**(10): 557-67.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes." Biochem Soc Symp(70): 277-85.
- Fukata, M., M. Nakagawa and K. Kaibuchi (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-7.
- Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A.J. Bonito and R.M. Steinman (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." J Exp Med **199**(12): 1607-18.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez and K. Kaibuchi (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." Cell **109**(7): 873-85.
- Fukata, M., M. Nakagawa and K. Kaibuchi (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-7.
- Fuortes, M., W.W. Jin and C. Nathan (1994). "Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor." J Cell Biol **127**(5): 1477-83.
- Gahmberg, C.G., M. Tolvanen and P. Kotovuori (1997). "Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands." Eur J Biochem **245**(2): 215-32.
- Garcia-Bernal, D., N. Wright, E. Sotillo-Mallo, C. Nombela-Arrieta, J.V. Stein, X.R. Bustelo and J. Teixido (2005). "Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1." Mol Biol Cell **16**(7): 3223-35.
- Garcia, P., R. Gupta, S. Shah, A.J. Morris, S.A. Rudge, S. Scarlata, V. Petrova, S. McLaughlin and M.J. Rebecchi (1995). "The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes." Biochemistry **34**(49): 16228-34.

- Gaudet, C., W.A. Marganski, S. Kim, C.T. Brown, V. Gunderia, M. Dembo and J.Y. Wong (2003). "Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility." Biophys J **85**(5): 3329-35.
- Geiger, C., W. Nagel, T. Boehm, Y. van Kooyk, C.G. Figdor, E. Kremmer, N. Hogg, L. Zeitlmann, H. Dierks, K.S. Weber and W. Kolanus (2000). "Cytoshesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1." Embo J **19**(11): 2525-36.
- Giagulli, C., E. Scarpini, L. Ottoboni, S. Narumiya, E.C. Butcher, G. Constantin and C. Laudanna (2004). "RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing." Immunity **20**(1): 25-35.
- Gluckman, J.C., B. Canque and M. Rosenzweig (2002). "Dendritic cells: a complex simplicity." Transplantation **73**(1 Suppl): S3-6.
- Gonzalez-Amaro, R. and F. Sanchez-Madrid (1999). "Cell adhesion molecules: selectins and integrins." Crit Rev Immunol **19**(5-6): 389-429.
- Griffiths, E.K., C. Krawczyk, Y.Y. Kong, M. Raab, S.J. Hyduk, D. Bouchard, V.S. Chan, I. Koziaradzki, A.J. Oliveira-Dos-Santos, A. Wakeham, P.S. Ohashi, M.I. Cybulsky, C.E. Rudd and J.M. Penninger (2001). "Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap." Science **293**(5538): 2260-3.
- Guermonez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
- Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cell Signal **13**(2): 85-94.
- Gunn, M.D., K. Tangemann, C. Tam, J.G. Cyster, S.D. Rosen and L.T. Williams (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
- Gunzer, M., P. Friedl, B. Niggemann, E.B. Brocker, E. Kampgen and K.S. Zanker (2000). "Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines." J Leukoc Biol **67**(5): 622-9.
- Gunzer, M., A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K.S. Zanker, E.B. Brocker, E. Kampgen and P. Friedl (2000). "Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential." Immunity **13**(3): 323-32.
- Haase, C., B.K. Michelsen and T.N. Jorgensen (2004). "CD40 is necessary for activation of naive T cells by a dendritic cell line in vivo but not in vitro." Scand J Immunol **59**(3): 237-45.

- Hackstein, H. and A.W. Thomson (2004). "Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs." Nat Rev Immunol **4**(1): 24-34.
- Haddad, E., J.L. Zugaza, F. Louache, N. Debili, C. Crouin, K. Schwarz, A. Fischer, W. Vainchenker and J. Bertoglio (2001). "The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis." Blood **97**(1): 33-8.
- Harokopakis, E., M.H. Albzreh, M.H. Martin and G. Hajishengallis (2006). "TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae." J Immunol **176**(12): 7645-56.
- Haston, W.S., J.M. Shields and P.C. Wilkinson (1982). "Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices." J Cell Biol **92**(3): 747-52.
- Hauzenberger, D., J. Klominek, S.E. Bergstrom and K.G. Sundqvist (1995). "T lymphocyte migration: the influence of interactions via adhesion molecules, the T cell receptor, and cytokines." Crit Rev Immunol **15**(3-4): 285-316.
- Hauzenberger, D., J. Klominek and K.G. Sundqvist (1994). "Functional specialization of fibronectin-binding beta 1-integrins in T lymphocyte migration." J Immunol **153**(3): 960-71.
- Henrickson, S.E. and U.H. von Andrian (2007). "Single-cell dynamics of T-cell priming." Curr Opin Immunol **19**(3): 249-58.
- Hill, J.A., T.E. Ichim, K.P. Kusznierek, M. Li, X. Huang, X. Yan, R. Zhong, E. Cairns, D.A. Bell and W.P. Min (2003). "Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA." J Immunol **171**(2): 691-6.
- Hofer, S., K. Pfeil, H. Niederegger, S. Ebner, V.A. Nguyen, E. Kremmer, M. Auffinger, S. Neyer, C. Furhapter and C. Heufler (2006). "Dendritic cells regulate T-cell deattachment through the integrin-interacting protein CYTIP." Blood **107**(3): 1003-9.
- Hogg, N. and P.A. Bates (2000). "Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes." Matrix Biol **19**(3): 211-22.
- Hogg, N., R. Henderson, B. Leitinger, A. McDowall, J. Porter and P. Stanley (2002). "Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes." Immunol Rev **186**: 164-71.
- Honda, A., M. Nogami, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A.J. Morris, M.A. Frohman and Y. Kanaho (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." Cell **99**(5): 521-32.

- 
- Horwitz, A.R. and J.T. Parsons (1999). "Cell migration--movin' on." Science **286**(5442): 1102-3.
- Huang, F.P., N. Platt, M. Wykes, J.R. Major, T.J. Powell, C.D. Jenkins and G.G. MacPherson (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
- Huang, C., K. Jacobson and M.D. Schaller (2004). "MAP kinases and cell migration." J Cell Sci **117**(Pt 20): 4619-28.
- Hughes, B.J., J.C. Hollers, E. Crockett-Torabi and C.W. Smith (1992). "Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion." J Clin Invest **90**(5): 1687-96.
- Hynes, R.O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.
- Huttenlocher, A., M.H. Ginsberg and A.F. Horwitz (1996). "Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity." J Cell Biol **134**(6): 1551-62.
- I, S.T., Z. Nie, A. Stewart, M. Najdovska, N.E. Hall, H. He, P.A. Randazzo and P. Lock (2004). "ARAP3 is transiently tyrosine phosphorylated in cells attaching to fibronectin and inhibits cell spreading in a RhoGAP-dependent manner." J Cell Sci **117**(Pt 25): 6071-84.
- Iijima, N., Y. Yanagawa, J.M. Clingan and K. Onoe (2005). "CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells." Int Immunol **17**(9): 1201-12.
- Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R.N. Germain, I. Mellman and R.M. Steinman (2000). "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli." J Exp Med **191**(6): 927-36.
- Ingalls, R.R. and D.T. Golenbock (1995). "CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide." J Exp Med **181**(4): 1473-9.
- Ivetic, A. and A.J. Ridley (2004). "Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes." Immunology **112**(2): 165-76.
- Jaffe, A.B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.
- Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

- 
- Jiang, Y., W. Ma, Y. Wan, T. Kozasa, S. Hattori and X.Y. Huang (1998). "The G protein G $\alpha$ 12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain." Nature **395**(6704): 808-13.
- Jirouskova, M., J.K. Jaiswal and B.S. Coller (2007). "Ligand density dramatically affects integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3-mediated platelet signaling and spreading." Blood **109**(12): 5260-9.
- Kaisho, T. and S. Akira (2001). "Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice." Trends Immunol **22**(2): 78-83.
- Kamohara, H., S. Yamashiro, C. Galligan and T. Yoshimura (2001). "Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1 $\alpha$ ) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices." Faseb J **15**(14): 2724-6.
- Kanner, S.B., L.S. Grosmaire, J.A. Ledbetter and N.K. Damle (1993). "Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C- $\gamma$  1 activation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7099-103.
- Kapsenberg, M.L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- Kelsoe, G. (2000). "Studies of the humoral immune response." Immunol Res **22**(2-3): 199-210.
- Kim, M., C.V. Carman and T.A. Springer (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." Science **301**(5640): 1720-5.
- Kinashi, T., M. Aker, M. Sokolovsky-Eisenberg, V. Grabovsky, C. Tanaka, R. Shamri, S. Feigelson, A. Etzioni and R. Alon (2004). "LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds." Blood **103**(3): 1033-6.
- Kinashi, T. and K. Katagiri (2004). "Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL." Immunol Lett **93**(1): 1-5.
- Kinashi, T. and K. Katagiri (2005). "Regulation of immune cell adhesion and migration by regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues." Immunology **116**(2): 164-71.
- Klemke, R.L., S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. de Lanerolle and D.A. Cheresh (1997). "Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase." J Cell Biol **137**(2): 481-92.
- Kliche, S., W. Nagel, E. Kremmer, C. Atzler, A. Ege, T. Knorr, U. Koszinowski, W. Kolanus and J. Haas (2001). "Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1." Mol Cell **7**(4): 833-43.
- Knorr, T., W. Nagel and W. Kolanus (2000). "Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation

- factors derived from a mammalian expression system." Eur J Biochem **267**(12): 3784-91.
- Kobayashi, M., E. Azuma, M. Ido, M. Hirayama, Q. Jiang, S. Iwamoto, T. Kumamoto, H. Yamamoto, M. Sakurai and Y. Komada (2001). "A pivotal role of Rho GTPase in the regulation of morphology and function of dendritic cells." J Immunol **167**(7): 3585-91.
- Kolanus, W., W. Nagel, B. Schiller, L. Zeitlmann, S. Godar, H. Stockinger and B. Seed (1996). "Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule." Cell **86**(2): 233-42.
- Kolanus, W. and B. Seed (1997). "Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 725-31.
- Kraynov, V.S., C. Chamberlain, G.M. Bokoch, M.A. Schwartz, S. Slabaugh and K.M. Hahn (2000). "Localized Rac activation dynamics visualized in living cells." Science **290**(5490): 333-7.
- Laderach, D., D. Compagno, O. Danos, W. Vainchenker and A. Galy (2003). "RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells." J Immunol **171**(4): 1750-7.
- Landis, R.C., R.I. Bennett and N. Hogg (1993). "A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain." J Cell Biol **120**(6): 1519-27.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2004). "Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell." Nat Immunol **5**(12): 1201-2.
- Larson, R.S. and T.A. Springer (1990). "Structure and function of leukocyte integrins." Immunol Rev **114**: 181-217.
- Laudanna, C. (2005). "Integrin activation under flow: a local affair." Nat Immunol **6**(5): 429-30.
- Laudanna, C. and R. Alon (2006). "Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes." Thromb Haemost **95**(1): 5-11.
- Laudanna, C., J.J. Campbell and E.C. Butcher (1996). "Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins." Science **271**(5251): 981-3.
- Laudanna, C., D. Mochly-Rosen, T. Liron, G. Constantin and E.C. Butcher (1998). "Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis." J Biol Chem **273**(46): 30306-15.
- Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Lawson, M.A. and F.R. Maxfield (1995). "Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils." Nature **377**(6544): 75-9.

- Lechmann, M., S. Berchtold, J. Hauber and A. Steinkasserer (2002). "CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation." Trends Immunol **23**(6): 273-5.
- Lecoanet-Henchoz, S., J.F. Gauchat, J.P. Aubry, P. Graber, P. Life, N. Paul-Eugene, B. Ferrua, A.L. Corbi, B. Dugas, C. Plater-Zyberk and et al. (1995). "CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18." Immunity **3**(1): 119-25.
- Lee, J.O., P. Rieu, M.A. Arnaout and R. Liddington (1995). "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." Cell **80**(4): 631-8.
- Lemmon, M.A. and K.M. Ferguson (1998). "Pleckstrin homology domains." Curr Top Microbiol Immunol **228**: 39-74.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2005). "Monocyte-derived dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 313-8.
- Li, G., S. Basu, M.K. Han, Y.J. Kim and H.E. Broxmeyer (2007). "Influence of ERK activation on decreased chemotaxis of mature human cord blood monocyte-derived dendritic cells to CCL19 and CXCL12." Blood **109**(8): 3173-6.
- Loftus, J.C., J.W. Smith and M.H. Ginsberg (1994). "Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face." J Biol Chem **269**(41): 25235-8.
- Lopez-Illasaca, M. (1998). "Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades." Biochem Pharmacol **56**(3): 269-77.
- Lowell, C.A., L. Fumagalli and G. Berton (1996). "Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions." J Cell Biol **133**(4): 895-910.
- Lu, C., M. Ferzly, J. Takagi and T.A. Springer (2001). "Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation." J Immunol **166**(9): 5629-37.
- Lub, M., Y. van Kooyk and C.G. Figdor (1995). "Ins and outs of LFA-1." Immunol Today **16**(10): 479-83.
- Luft, T., E. Maraskovsky, M. Schnurr, K. Knebel, M. Kirsch, M. Gerner, R. Skoda, A.D. Ho, P. Nawroth and A. Bierhaus (2004). "Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells." Blood **104**(4): 1066-74.
- Luft, T., E. Rodionova, E. Maraskovsky, M. Kirsch, M. Hess, C. Buchholtz, M. Goerner, M. Schnurr, R. Skoda and A.D. Ho (2006). "Adaptive functional differentiation of dendritic cells: integrating the network of extra- and intracellular signals." Blood **107**(12): 4763-9.

- 
- Lum, A.F., C.E. Green, G.R. Lee, D.E. Staunton and S.I. Simon (2002). "Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow." J Biol Chem **277**(23): 20660-70.
- Mandeville, J.T., M.A. Lawson and F.R. Maxfield (1997). "Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix." J Leukoc Biol **61**(2): 188-200.
- Mansour, M., S.Y. Lee and B. Pohajdak (2002). "The N-terminal coiled coil domain of the cytohesin/ARNO family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein CASP." J Biol Chem **277**(35): 32302-9.
- Martinez-Quiles, N., H.Y. Ho, M.W. Kirschner, N. Ramesh and R.S. Geha (2004). "Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP." Mol Cell Biol **24**(12): 5269-80.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita and S. Tsukita (1998). "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." J Cell Biol **140**(3): 647-57.
- McGilvray, I.D., Z. Lu, A.C. Wei, A.P. Dackiw, J.C. Marshall, A. Kapus, G. Levy and O.D. Rotstein (1998). "Murine hepatitis virus strain 3 induces the macrophage prothrombinase fgl-2 through p38 mitogen-activated protein kinase activation." J Biol Chem **273**(48): 32222-9.
- Meacci, E., S.C. Tsai, R. Adamik, J. Moss and M. Vaughan (1997). "Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1745-8.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina and G.G. Borisy (2004). "Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end." Cell **118**(3): 363-73.
- Mellman, I. and R.M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson and U.H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature **427**(6970): 154-9.
- Mitchell, D.A. and S.K. Nair (2000). "RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy." J Clin Invest **106**(9): 1065-9.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson and D.D. Schlaepfer (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.

- Miyamoto, S., H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Burbelo, S.K. Akiyama and K.M. Yamada (1995). "Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules." *J Cell Biol* **131**(3): 791-805.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky and A. Kupfer (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Mora, J.R., M.R. Bono, N. Manjunath, W. Weninger, L.L. Cavanagh, M. Roseblatt and U.H. Von Andrian (2003). "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells." *Nature* **424**(6944): 88-93.
- Moser, B., M. Wolf, A. Walz and P. Loetscher (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* **25**(2): 75-84.
- Mould, A.P. (1996). "Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes." *J Cell Sci* **109** ( Pt 11): 2613-8.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser and T.D. Pollard (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**(11): 6181-6.
- Nagel, W., P. Schilcher, L. Zeitlmann and W. Kolanus (1998). "The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function." *Mol Biol Cell* **9**(8): 1981-94.
- Nagel, W., L. Zeitlmann, P. Schilcher, C. Geiger, J. Kolanus and W. Kolanus (1998). "Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1." *J Biol Chem* **273**(24): 14853-61.
- Nakagawa, H., H. Miki, M. Nozumi, T. Takenawa, S. Miyamoto, J. Wehland and J.V. Small (2003). "IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena." *J Cell Sci* **116**(Pt 12): 2577-83.
- Ngo, V.N., H.L. Tang and J.G. Cyster (1998). "Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells." *J Exp Med* **188**(1): 181-91.
- Ng, T., M. Parsons, W.E. Hughes, J. Monypenny, D. Zicha, A. Gautreau, M. Arpin, S. Gschmeissner, P.J. Verveer, P.I. Bastiaens and P.J. Parker (2001). "Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility." *Embo J* **20**(11): 2723-41.
- Nguyen, V.A., S. Ebner, C. Furhapter, N. Romani, D. Kolle, P. Fritsch and N. Sepp (2002). "Adhesion of dendritic cells derived from CD34+ progenitors to resting human dermal microvascular endothelial cells is down-regulated upon maturation and partially depends on CD11a-CD18, CD11b-CD18 and CD36." *Eur J Immunol* **32**(12): 3638-50.

- Nicholson-Dykstra, S., H.N. Higgs and E.S. Harris (2005). "Actin dynamics: growth from dendritic branches." Curr Biol **15**(9): R346-57.
- Nobes, C.D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." J Cell Biol **144**(6): 1235-44.
- Norman, J.C., D. Jones, S.T. Barry, M.R. Holt, S. Cockcroft and D.R. Critchley (1998). "ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts." J Cell Biol **143**(7): 1981-95.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster (2004). "CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions." Immunity **21**(2): 279-88.
- O'Neill, G.M., S.J. Fashena and E.A. Golemis (2000). "Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage." Trends Cell Biol **10**(3): 111-9.
- Palecek, S.P., A.F. Horwitz and D.A. Lauffenburger (1999). "Kinetic model for integrin-mediated adhesion release during cell migration." Ann Biomed Eng **27**(2): 219-35.
- Pavalko, F.M. and S.M. LaRoche (1993). "Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin." J Immunol **151**(7): 3795-807.
- Perez, O.D., D. Mitchell, G.C. Jager, S. South, C. Murriel, J. McBride, L.A. Herzenberg, S. Kinoshita and G.P. Nolan (2003). "Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1." Nat Immunol **4**(11): 1083-92.
- Pestonjamas, K.N., C. Forster, C. Sun, E.M. Gardiner, B. Bohl, O. Weiner, G.M. Bokoch and M. Glogauer (2006). "Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis." Blood **108**(8): 2814-20.
- Peterson, E.J. (2003). "The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion." Immunol Rev **192**: 113-21.
- Piali, L., C. Weber, G. LaRosa, C.R. Mackay, T.A. Springer, I. Clark-Lewis and B. Moser (1998). "The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig." Eur J Immunol **28**(3): 961-72.
- Pitcher, J.A., K. Touhara, E.S. Payne and R.J. Lefkowitz (1995). "Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid." J Biol Chem **270**(20): 11707-10.

- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus and J.W. Smith (2000). "Ligand binding to integrins." J Biol Chem **275**(29): 21785-8.
- Pollard, T.D. and G.G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-65.
- Prechtel, A.T. and A. Steinkasserer (2007). "CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells." Arch Dermatol Res.
- Prochiantz, A. (2000). "Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others." Curr Opin Cell Biol **12**(4): 400-6.
- Procko, E. and S.R. McColl (2005). "Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors." Bioessays **27**(2): 153-63.
- Rabb, H., M. Michishita, C.P. Sharma, D. Brown and M.A. Arnaout (1993). "Cytoplasmic tails of human complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18) regulate ligand avidity and the internalization of occupied receptors." J Immunol **151**(2): 990-1002.
- Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz and V. Angeli (2005). "Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 273-87.
- Raucher, D. and M.P. Sheetz (2000). "Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension." J Cell Biol **148**(1): 127-36.
- Ridley, A.J. (2001). "Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility." FEBS Lett **498**(2-3): 168-71.
- Ridley, A.J. (2001). "Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking." Traffic **2**(5): 303-10.
- Ridley, A.J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." Trends Cell Biol **16**(10): 522-9.
- Rickert, P., O.D. Weiner, F. Wang, H.R. Bourne and G. Servant (2000). "Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products." Trends Cell Biol **10**(11): 466-73.
- Rose, D.M., R. Alon and M.H. Ginsberg (2007). "Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration." Immunol Rev **218**: 126-34.
- Rottner, K., A. Hall and J.V. Small (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.
- Russell, J.H. and T.J. Ley (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **20**: 323-70.
- Saas, P. and P. Tiberghien (2002). "Dendritic cells: to where do they lead?" Transplantation **73**(1 Suppl): S12-5.

- Saeki, H., A.M. Moore, M.J. Brown and S.T. Hwang (1999). "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes." J Immunol **162**(5): 2472-5.
- Salas, A., M. Shimaoka, A.N. Kogan, C. Harwood, U.H. von Andrian and T.A. Springer (2004). "Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction." Immunity **20**(4): 393-406.
- Salim, K., M.J. Bottomley, E. Querfurth, M.J. Zvelebil, I. Gout, R. Scaife, R.L. Margolis, R. Gigg, C.I. Smith, P.C. Driscoll, M.D. Waterfield and G. Panayotou (1996). "Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase." Embo J **15**(22): 6241-50.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (2002). "The instructive role of dendritic cells on T-cell responses." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S127-32.
- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin and A. Lanzavecchia (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.
- Sampath, R., P.J. Gallagher and F.M. Pavalko (1998). "Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin." J Biol Chem **273**(50): 33588-94.
- Sander, E.E., J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen and J.G. Collard (1999). "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior." J Cell Biol **147**(5): 1009-22.
- Santy, L.C. and J.E. Casanova (2001). "Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D." J Cell Biol **154**(3): 599-610.
- Santy, L.C. and J.E. Casanova (2002). "GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho." Curr Biol **12**(10): R360-2.
- Schmoranzer, J., G. Kreitzer and S.M. Simon (2003). "Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4513-9.
- Schneeberger, E.E., Q. Vu, B.W. LeBlanc and C.M. Doerschuk (2000). "The accumulation of dendritic cells in the lung is impaired in CD18<sup>-/-</sup> but not in ICAM-1<sup>-/-</sup> mutant mice." J Immunol **164**(5): 2472-8.

- Schor, S.L., T.D. Allen and B. Winn (1983). "Lymphocyte migration into three-dimensional collagen matrices: a quantitative study." J Cell Biol **96**(4): 1089-96.
- Schwarze, S.R., K.A. Hruska and S.F. Dowdy (2000). "Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?" Trends Cell Biol **10**(7): 290-5.
- Schymeinsky, J., A. Sindrilaru, D. Frommhold, M. Sperandio, R. Gerstl, C. Then, A. Mocsai, K. Scharffetter-Kochanek and B. Walzog (2006). "The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration." Blood **108**(12): 3919-27.
- Shamri, R., V. Grabovsky, J.M. Gauguet, S. Feigelson, E. Manevich, W. Kolanus, M.K. Robinson, D.E. Staunton, U.H. von Andrian and R. Alon (2005). "Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines." Nat Immunol **6**(5): 497-506.
- Sharma, C.P., R.M. Ezzell and M.A. Arnaout (1995). "Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18." J Immunol **154**(7): 3461-70.
- Sheetz, M.P. (1994). "Cell migration by graded attachment to substrates and contraction." Semin Cell Biol **5**(3): 149-55.
- Shimaoka, M., J. Takagi and T.A. Springer (2002). "Conformational regulation of integrin structure and function." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 485-516.
- Shimizu, Y. and S.W. Hunt, 3rd (1996). "Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase?" Immunol Today **17**(12): 565-73.
- Shimizu, Y., J.L. Mobley, L.D. Finkelstein and A.S. Chan (1995). "A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen." J Cell Biol **131**(6 Pt 2): 1867-80.
- Shortman, K. and Y.J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Siegrist, S.E. and C.Q. Doe (2007). "Microtubule-induced cortical cell polarity." Genes Dev **21**(5): 483-96.
- Sigal, A., D.A. Bleijs, V. Grabovsky, S.J. van Vliet, O. Dwir, C.G. Figdor, Y. van Kooyk and R. Alon (2000). "The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment." J Immunol **165**(1): 442-52.
- Sixt, M., R. Hallmann, O. Wendler, K. Scharffetter-Kochanek and L.M. Sorokin (2001). "Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation." J Biol Chem **276**(22): 18878-87.

- 
- Small, J.V., T. Stradal, E. Vignal and K. Rottner (2002). "The lamellipodium: where motility begins." Trends Cell Biol **12**(3): 112-20.
- Small, J.V., B. Geiger, I. Kaverina and A. Bershadsky (2002). "How do microtubules guide migrating cells?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 957-64.
- Smith, A., M. Bracke, B. Leitinger, J.C. Porter and N. Hogg (2003). "LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3123-33.
- Smith, L.A., H. Aranda-Espinoza, J.B. Haun and D.A. Hammer (2007). "Interplay between shear stress and adhesion on neutrophil locomotion." Biophys J **92**(2): 632-40.
- Soede, R.D., I.S. Zeelenberg, Y.M. Wijnands, M. Kamp and E. Roos (2001). "Stromal cell-derived factor-1-induced LFA-1 activation during in vivo migration of T cell hybridoma cells requires Gq/11, RhoA, and myosin, as well as Gi and Cdc42." J Immunol **166**(7): 4293-301.
- Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi and A. Mantovani (1999). "The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking." J Leukoc Biol **66**(1): 1-9.
- Springer, T.A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**(6283): 425-34.
- Springer, T.A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.
- Steffen, A., J. Faix, G.P. Resch, J. Linkner, J. Wehland, J.V. Small, K. Rottner and T.E. Stradal (2006). "Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes." Mol Biol Cell **17**(6): 2581-91.
- Steinman, R.M. and Z.A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R.M., D. Hawiger and M.C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R.M. and K. Inaba (1999). "Myeloid dendritic cells." J Leukoc Biol **66**(2): 205-8.
- Steinman, R.M. and J. Swanson (1995). "The endocytic activity of dendritic cells." J Exp Med **182**(2): 283-8.
- Stoll, S., J. Delon, T.M. Brotz and R.N. Germain (2002). "Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes." Science **296**(5574): 1873-6.
- Swetman, C.A., Y. Leverrier, R. Garg, C.H. Gan, A.J. Ridley, D.R. Katz and B.M. Chain (2002). "Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases." Eur J Immunol **32**(7): 2074-83.
- Tadokoro, S., S.J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R.C. Liddington, J.M. de Pereda, M.H. Ginsberg and D.A. Calderwood (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642): 103-6.

- Takada, Y., T. Kamata, A. Irie, W. Puzon-McLaughlin and X.P. Zhang (1997). "Structural basis of integrin-mediated signal transduction." Matrix Biol **16**(4): 143-51.
- Takagi, J. and T.A. Springer (2002). "Integrin activation and structural rearrangement." Immunol Rev **186**: 141-63.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita and Y. Takai (1997). "Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein." J Biol Chem **272**(37): 23371-5.
- Takagi, J. and T.A. Springer (2002). "Integrin activation and structural rearrangement." Immunol Rev **186**: 141-63.
- Takenawa, T. and S. Suetsugu (2007). "The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 37-48.
- Tang, P., T.P. Cheng, D. Agnello, C.Y. Wu, B.D. Hissong, W.T. Watford, H.J. Ahn, J. Galon, J. Moss, M. Vaughan, J.J. O'Shea and M. Gadina (2002). "Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2625-9.
- Thery, C. and S. Amigorena (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **13**(1): 45-51.
- Thomson, A.W. and L. Lu (1999). "Dendritic cells as regulators of immune reactivity: implications for transplantation." Transplantation **68**(1): 1-8.
- Tian, L., P. Kilgannon, Y. Yoshihara, K. Mori, W.M. Gallatin, O. Carpen and C.G. Gahmberg (2000). "Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18." Eur J Immunol **30**(3): 810-8.
- Tng, E., S.M. Tan, S. Ranganathan, M. Cheng and S.K. Law (2004). "The integrin alpha L beta 2 hybrid domain serves as a link for the propagation of activation signal from its stalk regions to the I-like domain." J Biol Chem **279**(52): 54334-9.
- Troelstra, A., L.A. de Graaf-Miltenburg, T. van Bommel, J. Verhoef, K.P. Van Kessel and J.A. Van Strijp (1999). "Lipopolysaccharide-coated erythrocytes activate human neutrophils via CD14 while subsequent binding is through CD11b/CD18." J Immunol **162**(7): 4220-5.
- Turley, S.J., K. Inaba, W.S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R.M. Steinman and I. Mellman (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." Science **288**(5465): 522-7.

- 
- Valmu, L., T.J. Hilden, G. van Willigen and C.G. Gahmberg (1999). "Characterization of beta2 (CD18) integrin phosphorylation in phorbol ester-activated T lymphocytes." Biochem J **339** ( Pt 1): 119-25.
- Van der Vieren, M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T. St John, D.E. Staunton and W.M. Gallatin (1995). "A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3." Immunity **3**(6): 683-90.
- van Hennik, P.B., J.P. ten Klooster, J.R. Halstead, C. Voermans, E.C. Anthony, N. Divecha and P.L. Hordijk (2003). "The C-terminal domain of Rac1 contains two motifs that control targeting and signaling specificity." J Biol Chem **278**(40): 39166-75.
- van Kooyk, Y. and C.G. Figdor (2000). "Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 542-7.
- van Kooyk, Y., M. Lub and C.G. Figdor (1998). "Adhesion and signaling mediated by the cytoplasmic tails of leucocyte integrins." Cell Adhes Commun **6**(2-3): 247-54.
- van Kooyk, Y., S.J. van Vliet and C.G. Figdor (1999). "The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes." J Biol Chem **274**(38): 26869-77.
- van Kooyk, Y., P. Weder, K. Heije and C.G. Figdor (1994). "Extracellular Ca<sup>2+</sup> modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion." J Cell Biol **124**(6): 1061-70.
- van Kooyk, Y., P. Weder, F. Hogervorst, A.J. Verhoeven, G. van Seventer, A.A. te Velde, J. Borst, G.D. Keizer and C.G. Figdor (1991). "Activation of LFA-1 through a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion." J Cell Biol **112**(2): 345-54.
- van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek (2002). "A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions." Immunol Rev **186**: 47-56.
- Varga, G., S. Balkow, M.K. Wild, A. Stadtbaeumer, M. Krummen, T. Rothoef, T. Higuchi, S. Beissert, K. Wethmar, K. Scharffetter-Kochanek, D. Vestweber and S. Grabbe (2007). "Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation." Blood **109**(2): 661-9.
- Vendetti, S., J.G. Chai, J. Dyson, E. Simpson, G. Lombardi and R. Lechler (2000). "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol **165**(3): 1175-81.
- Venkateswarlu, K. and P.J. Cullen (2000). "Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositide 3-kinase." Biochem J **345** Pt 3: 719-24.

- Vermaelen, K.Y., I. Carro-Muino, B.N. Lambrecht and R.A. Pauwels (2001). "Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes." J Exp Med **193**(1): 51-60.
- Vogel, W., C. Brakebusch, R. Fassler, F. Alves, F. Ruggiero and T. Pawson (2000). "Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin." J Biol Chem **275**(8): 5779-84.
- Ward, S.G. (2004). "Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation?" Trends Immunol **25**(2): 67-74.
- Watanabe, T., J. Noritake and K. Kaibuchi (2005). "Regulation of microtubules in cell migration." Trends Cell Biol **15**(2): 76-83.
- Webb, D.J., D.H. Nguyen and S.L. Gonias (2000). "Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion." J Cell Sci **113** ( Pt 1): 123-34.
- Weber, K.S., L.B. Klickstein and C. Weber (1999). "Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains." Mol Biol Cell **10**(4): 861-73.
- Weber, K.S., G. Ostermann, A. Zerneck, A. Schroder, L.B. Klickstein and C. Weber (2001). "Dual role of H-Ras in regulation of lymphocyte function antigen-1 activity by stromal cell-derived factor-1alpha: implications for leukocyte transmigration." Mol Biol Cell **12**(10): 3074-86.
- Weber, K.S., C. Weber, G. Ostermann, H. Dierks, W. Nagel and W. Kolanus (2001). "Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines." Curr Biol **11**(24): 1969-74.
- Werr, J., X. Xie, P. Hedqvist, E. Ruoslahti and L. Lindbom (1998). "beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo." J Exp Med **187**(12): 2091-6.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V.S. Zimmermann, J. Davoust and P. Ricciardi-Castagnoli (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." J Exp Med **185**(2): 317-28.
- Witt, C., S. Raychaudhuri and A.K. Chakraborty (2005). "Movies, measurement, and modeling: the three Ms of mechanistic immunology." J Exp Med **201**(4): 501-4.

- Wolf, K., R. Muller, S. Borgmann, E.B. Brocker and P. Friedl (2003). "Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases." Blood **102**(9): 3262-9.
- Wong, K., O. Pertz, K. Hahn and H. Bourne (2006). "Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3639-44.
- Worthylake, R.A., S. Lemoine, J.M. Watson and K. Burridge (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." J Cell Biol **154**(1): 147-60.
- Worthylake, R.A. and K. Burridge (2003). "RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions." J Biol Chem **278**(15): 13578-84.
- Worthylake, R.A., S. Lemoine, J.M. Watson and K. Burridge (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." J Cell Biol **154**(1): 147-60.
- Wright, S.D., P.E. Rao, W.C. Van Voorhis, L.S. Craigmyle, K. Iida, M.A. Talle, E.F. Westberg, G. Goldstein and S.C. Silverstein (1983). "Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(18): 5699-703.
- Yan, S.R. and G. Berton (1996). "Regulation of Src family tyrosine kinase activities in adherent human neutrophils. Evidence that reactive oxygen intermediates produced by adherent neutrophils increase the activity of the p58c-fgr and p53/56lyn tyrosine kinases." J Biol Chem **271**(38): 23464-71.
- Yan, S.R., M. Huang and G. Berton (1997). "Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen." J Immunol **158**(4): 1902-10.
- Yan, S.R. and M.J. Novak (1999). "Beta2 integrin-dependent phosphorylation of protein-tyrosine kinase Pyk2 stimulated by tumor necrosis factor alpha and fMLP in human neutrophils adherent to fibrinogen." FEBS Lett **451**(1): 33-8.
- Yoshioka, K., F. Matsumura, H. Akedo and K. Itoh (1998). "Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells." J Biol Chem **273**(9): 5146-54.
- Zhao, M., R.G. Discipio, A.G. Wimmer and I.U. Schraufstatter (2006). "Regulation of CXCR4-mediated nuclear translocation of extracellular signal-related kinases 1 and 2." Mol Pharmacol **69**(1): 66-75.
- Zeis, M., S. Siegel, A. Wagner, M. Schmitz, M. Marget, R. Kuhl-Burmeister, I. Adamzik, D. Kabelitz, P. Dreger, N. Schmitz and A. Heiser (2003). "Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological

- 
- malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells." J Immunol **170**(11): 5391-7.
- Zell, T., S.W. Hunt, 3rd, J.L. Mobley, L.D. Finkelstein and Y. Shimizu (1996). "CD28-mediated up-regulation of beta 1-integrin adhesion involves phosphatidylinositol 3-kinase." J Immunol **156**(3): 883-6.
- Zheng, J., S.M. Cahill, M.A. Lemmon, D. Fushman, J. Schlessinger and D. Cowburn (1996). "Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity." J Mol Biol **255**(1): 14-21.
- Zheng, L., A. Sjolander, J. Eckerdal and T. Andersson (1996). "Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8431-6.
- Zheng, Y. (2004). "G protein control of microtubule assembly." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 867-94.
- Zuo, Y., S.K. Shields and C. Chakraborty (2006). "Enhanced intrinsic migration of aggressive breast cancer cells by inhibition of Rac1 GTPase." Biochem Biophys Res Commun **351**(2): 361-7.