

Molekulare und zelluläre Funktionen
des Guaninnukleotidaustauschfaktors
Cytohesin-4
im Immunsystem

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Cora Schild

aus Bonn

Bonn, August 2012

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

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2007 bis August 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Waldemar Kolanus am Life & Medical Sciences Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter Prof. Dr. Waldemar Kolanus
2. Gutachter Prof. Dr. Percy Knolle

Tag der Promotion: 10.10.2012

Erscheinungsjahr: 2012

“Per aspera ad astra”

(Seneca)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Weiterhin erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner weiteren Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Einige Experimente wurden in Kooperation mit anderen Personen durchgeführt, dies ist an den entsprechenden Stellen vermerkt.

Bonn, den

Cora Schild

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Quast, T., Tappertzhofen, B., Schild, C., Grell, J., Czeloth, N., Förster, R., Alon, R., Fraemohs, L., Dreck, K., Weber, C., Lämmermann, T., Sixt, M. and Kolanus, W. (2009). *Cytohesin-1 controls the activation of RhoA and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells*. Blood, 113(23):5801-10

Weitere Veröffentlichungen:

Quast T, Eppler F, Semmling V, Schild C, Homsy Y, Levy S, Lang T, Kurts C, Kolanus W. (2011). *CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration*. Blood, 118(7):1818-27

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion in Immunzellen	1
1.1.1	Funktionen und Regulation von GEFs und GTPasen	1
1.1.2	ARF-GTPasen	2
1.1.3	Cytohesine	3
1.1.4	Integrine und die Regulation der Zell-Adhäsion	8
1.1.5	Regulation der Zellmigration	10
1.1.5.1	Chemokin-vermittelte Signaltransduktion	11
1.1.5.2	Mechanismen der Zellmigration	11
1.1.5.3	Die Extravasation von Lymphozyten	12
1.1.5.4	Die Rolle von RhoA in der Zellmigration	13
1.1.6	T-Zell-Rezeptor vermittelte Signalwege	13
1.1.6.1	Aufbau des TCR	13
1.1.6.2	TCR-Aktivierung und Immunologische Synapse	14
1.1.7	Akt als zentrale Schaltstelle in zellulären Signalwegen	17
1.1.8	Die Regulation von Zellproliferation und Zellteilung	20
1.1.8.1	Zell-Zyklus Regulation	20
1.1.8.2	p27 als Inhibitor des Zellzyklus und als RhoA-Aktivator	22
1.2	Dendritische Zellen	23
1.3	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien	29
2.1.4	Kommerzielle Reaktionssysteme	32
2.1.5	Zellkultur-Puffer, - Medien -Serum und -Zusätze	32
2.1.6	Puffer und Stammlösungen	33
2.1.7	Enzyme	35
2.1.8	Taqman-Sonden für die “Real-Time-PCR”	35
2.1.9	siRNA Oligonukleotide	35
2.1.10	PCR-Primer	36
2.1.11	Klonierungsvektoren	37

2.1.12	Antikörper	38
2.1.13	Längenstandards	39
2.1.14	Organismen	40
2.1.15	Software	42
2.2	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.1	Bakterienkultur	42
2.2.2	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	42
2.2.3	Klonierung großer DNA-Fragmente mittels „Recombineering“	43
2.2.4	Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	44
2.2.5	Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Midi-Präparation)	45
2.2.6	Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)	45
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
2.2.8	Fällung von DNA	46
2.2.9	Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.10	Klonierung (Restriktion, Dephosphorylierung, Auffüllen von Überhängen und Ligation von DNA-Fragmenten)	48
2.2.11	DNA-Sequenzierung	49
2.2.12	Agarosegelelektrophorese	49
2.2.13	Elution von DNA aus Agarosegelen mittels kommerzieller Säulchen	49
2.2.14	Isolation genomischer DNA aus Zellen	49
2.2.15	DNA-Hybridisierung nach Southern („Southern Blotting“)	49
2.2.16	Isolation von mRNA	51
2.2.17	cDNA-Synthese	52
2.2.18	Semiquantitative PCR („Real Time PCR“)	52
2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
2.3.1	Herstellung von Protein-Lysaten aus Zellen	52
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
2.3.3	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (SDS PAGE)	53
2.3.4	Protein-Blotting („Western-Blotting“)	54
2.3.5	Immunmarkierung von Protein-Blots	54
2.3.6	Regeneration von Proteinblots	54
2.4	Zellbiologische Methoden	55
2.4.1	Kultivierung von Säugerzell-Linien (Jurkat E6, HeLa, B-End5, ES-Zellen)	55
2.4.2	Isolation primärer PBL, T-Zellen und Monocyten aus „Buffy Coats“ und MACS	55
2.4.3	Isolation und Kultivierung muriner Knochenmarks-Stammzellen und Differenzierung in dendritische Zellen (DC)	56
2.4.4	Transfektion von Jurkat E6 Zellen mit Plasmid-DNA	56
2.4.5	Transfektion von Jurkat E6 Zellen mit siRNA	56

2.4.6	Transfektion von HeLa-Zellen mit DNA-Konstrukten oder siRNA . . .	57
2.4.7	Transfektion muriner DC mit siRNA	57
2.4.8	Transfektion primärer T-Zellen mit siRNA	57
2.4.9	Transfektion von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)	57
2.4.10	LPS-Stimulation von dendritischen Zellen	58
2.4.11	Anti CD3/anti CD28 Stimulation von T-Zellen	58
2.4.12	Differenzierung von ES-Zellen zu Neuronal-Zellen	58
2.5	Funktionale Analysen	59
2.5.1	Untersuchungen zur Zell-Adhäsion unter statischen Bedingungen . .	59
2.5.2	Untersuchungen zur Zell-Adhäsion unter physiologischen Flussbedin- gungen („Flow Assay“)	59
2.5.3	Untersuchungen zur Zell-Adhäsion zwischen DC und T-Zellen . . .	61
2.5.4	Untersuchungen zur Zellmigration im Transwell-System	61
2.5.5	Untersuchungen zur Zellmigration in dreidimensionalen Substraten .	62
2.5.6	Quantifizierung von 3D-Migrationsassays	62
2.5.7	Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus	63
2.5.8	Durchflusszytometrische Analysen („FACS“)	63
2.5.9	GTPase Aktivierungs-Versuche	64
2.5.10	Karyotypisierung von ES-Zellen	64
2.5.11	Statistische Analyse von Daten	64
3	Ergebnisse	67
3.1	Cytohesin-Funktionen in dendritischen Zellen	67
3.1.1	Cytohesin-1 reguliert die Adhäsion von BM-DC an OT-1 T-Zellen .	67
3.1.2	Cytohesin-1 reguliert in murinen dendritischen Zellen die Adhäsion unter Flussbedingungen	68
3.1.3	Cytohesin-1 ist ein positiver Regulator der Migration muriner den- dritischer Zellen in dreidimensionalen Umgebungen	69
3.1.4	Cytohesin-1 reguliert die Aktivierung von RhoA in murinen dendri- tischen Zellen und HeLa-Zellen	73
3.1.5	RhoA vermittelt in BM-DC die Integrin-abhängige Adhäsion unter Flussbedingungen	74
3.1.6	Cytohesin-4 wird in DC nach LPS-Aktivierung herunterreguliert . .	75
3.1.7	Cytohesin-4 ist für die dreidimensionale Migration von DC nicht es- sentiell	77
3.1.8	Cytohesin-1 reguliert die Transmigration von unreifen und reifen mu- rinen DC gegensätzlich, während Cytohesin-4 keinen Einfluss auf die Migration hat	78
3.1.9	Unreife BM-DC exprimieren die Cytohesin-1 Tri-Glycin Spleiß-Variante 80	

3.2	Cytohesin-4 Funktionen in T-Zellen	82
3.2.1	Die Cytohesin-4 Expression auf mRNA-Ebene wird nach T-Zell-Rezeptor Aktivierung reduziert	82
3.2.2	Cytohesin-4 aktiviert die Transkription des Zellzyklusregulators p27	83
3.2.3	Cytohesin-4 fördert die FoxO1-Expression	87
3.2.4	Cytohesin-4 hat keinen nachweisbaren Einfluss auf den Zellzyklus von PBL	87
3.2.5	Cytohesin-4 reprimiert die Akt-Phosphorylierung	89
3.2.6	Cytohesin-4 ist nicht an der Regulation der T-Zell-Adhäsion und -Migration beteiligt	90
3.3	Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-1 “Knock-out” in der Maus	92
3.3.1	Generelle Konstruktion der Targeting-Vektoren	92
3.3.2	Konstruktion des konditionalen Cytohesin-1 Targetingvektors	96
3.3.3	Ergebnisse der PCR-”Screenings” für Cytohesin-1	98
3.3.4	Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen für Cytohesin-1	100
3.3.5	Überprüfung der Funktionalität der Cytohesin-1-Konstrukt-Insertion ohne distalen <i>loxP</i> -Bereich	101
3.3.6	Ergebnisse der Karyotypisierung für die Cytohesin-1 Klone II-64 und 84	102
3.3.7	Optimierung der konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out”-Strategie	103
3.4	Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-4 “Knock-out” in der Maus	105
3.4.1	Konstruktion des konditionalen Cytohesin-4 Targetingvektors	105
3.4.2	Ergebnisse der PCR-”Screenings” für Cytohesin-4-ES-Zell-Klone	107
3.4.3	Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen für Cytohesin-4	108
3.4.4	Ergebnisse der Karyotypisierung für Cytohesin-4-ES-Zell-Klon 173	110
3.4.5	Ergebnisse der Morulae-Injektion für den Cytohesin-4-ES Zell-Klon 173	111
4	Diskussion	113
4.1	Cytohesin-Funktionen in dendritischen Zellen	113
4.1.1	Die Rolle von Cytohesin-1 in der Adhäsion und Migration muriner DC113	113
4.1.2	Expression und Funktionen von Cytohesin-4 in reifen und unreifen DC116	116
4.1.3	Cytohesin-Funktionen in der Migration unreifer DC	118
4.2	Cytohesin-4 Funktionen in T-Zellen	119
4.2.1	Die Rolle von Cytohesin-4 im PI3-Kinase/Akt Signalweg	119
4.2.2	Die Rolle von Cytohesin-4 in T-Zell-Migration und -Adhäsion	125
4.3	Entwicklung genetischer Mausmodelle	127
4.3.1	Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-1 “Knock-out”	127
4.3.2	Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-4 “Knock-out”	129

Inhaltsverzeichnis

5	Ausblick	131
6	Zusammenfassung	133
7	Summary	135
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Literaturverzeichnis	142
	Anhang	165
	Danke...	169

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion in Immunzellen

Die Interaktion mit der Umgebung ist insbesondere für Immunzellen von fundamentaler Bedeutung. So müssen Zellen der angeborenen Immunabwehr nach Pathogenkontakt phagozytotische Prozesse initiieren, Zytokine produzieren und freisetzen. Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) leiten im Rahmen einer Immunantwort Differenzierungsprozesse ein, um dann als hochmotile Zellen in die nächstgelegenen Lymphknoten zu wandern und dort T-Zellen zu aktivieren. Diese gehören zusammen mit B-Zellen zur adaptiven Immunabwehr und zeichnen sich durch eine enorme Rezeptor-Variabilität aus. T-Zellen setzen die Signale der Antigen-Präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) in hochwirksame Immunantworten um. Hierzu gehören ebenfalls Zytokinproduktion, Proliferation und Differenzierung sowie die Aktivierung von B-Zellen, welche wiederum Zytokine sezernieren oder spezifische Antikörper produzieren.

All diesen Immunantworten liegen Rezeptor-Liganden-induzierte Signalwege zu Grunde. Oberflächenrezeptoren oder intrazelluläre Rezeptoren leiten die empfangenen Signale über verschiedene Mechanismen weiter, an denen zum Beispiel GTP-bindende Proteine, Proteinkinasen, Ionenkanäle oder sekundäre Botenstoffe, welche die Signale zum Teil verstärken, beteiligt sind. Letztlich bewirken sie eine Zielgenaktivierung oder auch morphologische Veränderungen der Zelle. Immer wiederkehrende Prinzipien der Regulation von Signaltransduktionsprozessen sind Proteinaktivierungen oder Inhibitionen über Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung oder die Aktivierung von GTPasen über einen Guanindiphosphat/Guanintriphosphat (GDP/GTP) Austausch.

1.1.1 Funktionen und Regulation von GEFs und GTPasen

Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen) sind wichtige Schalterproteine in einer Vielzahl zellulärer Signalwege. Sie können unterteilt werden in die Subfamilien Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf und Ran. GTPasen regulieren Prozesse wie Zellteilung und Differenzierung, Zellformveränderungen und Zellüberleben.

Allen GTPasen liegt ein Aktivierungszyklus zugrunde, der Nukleotid-abhängig ist (Abbildung 1.1). GTPasen zeichnen sich durch eine hohe Affinität für sowohl GDP als auch GTP aus. Ihre Aktivierung erfolgt über sogenannte Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF), die den Austausch von gebundenem GDP zu GTP katalysieren. Die Hydrolyse von GTP zu GDP erfolgt entweder über die intrinsische Aktivität der GTPase oder wird über Guanin-Nukleotid-Aktivierungsproteine (*GTPase*

activating protein, GAP) unterstützt. Die Diversität der GEF und GAP Faktoren übersteigt die ihrer Effektor-GTPasen, sodass diese zu einem großen Teil von unterschiedlichen GEF und GAP Faktoren aktiviert werden können [1].

Eine weitere Gruppe der GTPase-regulierenden Proteine sind die Guanin-Dissoziations-Inhibitoren (*guanine dissociation inhibitor*, GDI). Sie binden an GDP-gebundene GTPasen und verhindern deren Aktivierung, indem sie zum Einen den GDP/GTP Austausch und zum Anderen eine Membran-Bindung unterdrücken und die GTPasen im Zytoplasma halten. So maskieren GDI von Arf-GTPasen das aminoterminal Myristyl-Ende, welches mit der Lipiddoppelschicht interagiert [2]. Insgesamt regulieren GEF, GAP und GDI nicht nur die Aktivität, sondern in den meisten Fällen auch die intrazelluläre Lokalisation der GTPasen. So verfügen viele GEF-Proteine über Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen, mittels derer sie an Membranen translozieren und damit auch ihre Effektorproteine in Membrannähe rekrutieren [3, 4].

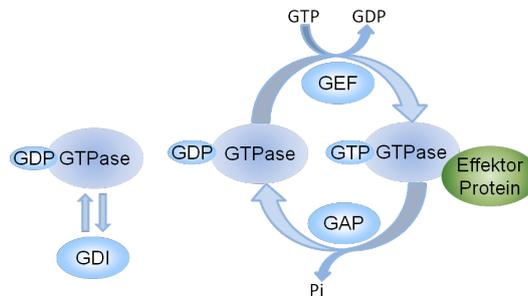


Abbildung 1.1: **GTPase Regulation.** GEFs und GAPs kontrollieren den Nukleotid-abhängigen Aktivierungszustand von GTPasen. Dabei bewirken GEF-Proteine über den GDP/GTP Austausch eine GTPase-Aktivierung. Durch intrinsische GTPase-Aktivität oder durch Unterstützung durch die GAP-Faktoren wird gebundenes GTP hydrolysiert. Oft geht mit der Aktivierung der GTPasen eine Rekrutierung an die Plasmamembran einher. GDI sorgen dafür, dass GTPasen im Zytoplasma und damit inaktiv gehalten werden.

1.1.2 ARF-GTPasen

ARF-Proteine sind Mitglieder der RAS-Familie kleiner GTPasen und sind zum Beispiel in Vesikeltransport und den Aufbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt [5, 6]. Sie können grob in drei Klassen unterteilt werden: Klasse I ARFs (ARF1, ARF2, ARF3), Klasse II ARFs (ARF4 und ARF5) und Klasse III ARFs (ARF6) (zusammengefasst in [7]). ARF-Proteine der Klasse I wurden als Golgi-assoziierte Proteine beschrieben, welche in die Regulation von Vesikeltransporten involviert sind (zusammengefasst in [8]). Klasse II ARF-Funktionen sind bisher kaum beschrieben, sind aber offensichtlich auch an Vesikelformationen beteiligt [9]. Für das Klasse III Protein ARF6 konnte eine Funktion im Membrantransport zwischen Endosomen und der Plasmamembran nachgewiesen werden (zusammengefasst in [10]).

ARF-Proteine können wie andere GTP-bindende Proteine in einer aktiven, GTP-gebundenen oder einer inaktiven GDP-gebundenen Form vorliegen. In ihrer GDP-gebundenen Form scheinen ARF-Proteine hauptsächlich zytosolisch lokalisiert zu sein, aber nach dem GDP zu GTP Austausch binden sie eine Vielzahl intrazellulärer Membranen, wobei ARF6 an die

Plasmamembran rekrutiert wird [11]. Der Austausch von gebundenem GDP durch GTP wird durch GEFs katalysiert und führt zu einer Aktivierung der ARF-Proteine. Dabei werden im Wesentlichen zwei Gruppen von ARF-GEFs unterschieden: Große (ungefähr 200 kDa) Brefeldin A (BFA) sensitive ARF GEFs und kleine (ungefähr 47 kDa) BFA-insensitive ARF GEFs, zu denen die Cytohesine gehören.

1.1.3 Cytohesine

Eine wichtige GEF-Familie für ARF-GTPasen sind die Cytohesine, welche in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine Rolle spielen (zusammengefasst in [12]). Cytohesine sind hoch-konservierte Proteine, von denen es bei Invertebraten (Fliegen, Nematoden) jeweils einen Vertreter gibt, und von denen in Säugetieren bisher vier bekannte Familienmitglieder identifiziert sind, Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO, *ARF nucleotide binding site opener*), Cytohesin-3 (Grp-1; *steppke* in *Drosophila*) und Cytohesin-4.

Erstmals im Zusammenhang mit der Aktivierung des Integrins LFA-1 beschrieben [13], sind Cytohesine mittlerweile als Regulatoren der Adhäsion und Zellmigration, der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion und des Insulin-Signalwegs bekannt [14, 15, 16, 17].

Die grundlegende Gemeinsamkeit der 47 kDa großen Cytohesine ist eine hochkonservierte Domänenstruktur (Abbildung 1.2). Aminoterminal enthalten sie eine Coiled-coil Domäne, welche Interaktionen mit Coiled-coil Domänen anderer Proteine vermitteln und so für eine Rekrutierung in größere Signalkomplexe sorgen kann (zusammengefasst in [12]). Der zentrale Bereich wird von der Sec7-Domäne gebildet, welche den GEF-Austausch katalysiert [18] und über welche für Cytohesin-1 die Interaktion mit LFA-1 beschrieben ist [13]. An die Sec7-Domäne schließt sich die PH-Domäne an, welche verantwortlich für die Rekrutierung an die Plasmamembran ist. Sie ist gleichzeitig die Bindedomäne der ARF-GTPasen [19, 20]. Carboxyterminal existiert eine polybasische Region, welche die Möglichkeit der Phosphorylierung bietet und gemeinsam mit der PH-Domäne die Membranbindung vermittelt. In dieser polybasischen Region unterscheiden sich die Cytohesine untereinander wesentlich. So besitzt Cytohesin-1 zwei Serin- (Serin 393 und Serin 394) und eine Threonin- (Threonin 395) Phosphorylierungsstelle, wohingegen Cytohesin-2 nur ein Serin (Serin 391) besitzt, welches nach Rekrutierung an die Plasmamembran phosphoryliert wird. Bei Cytohesin-3 fehlen diese Phosphorylierungs-Stellen völlig (zusammengefasst in [12]). Für Cytohesin-4 wurde bisher nicht geklärt, ob es phosphoryliert werden kann, aber es ist ein möglicher Serinrest vorhanden.

Alle Cytohesine können in zwei verschiedenen Spleiß-Varianten exprimiert werden, einer Di-Glycin oder einer Tri-Glycin Isoform. Die Diglycin-Isoform besitzt zwei Glycine in der Inositol-Binderegion der PH-Domäne und hat eine sehr starke Binde-Affinität an PIP₃, wohingegen die Affinität der Triglycin-Isoform nur schwach affin für PIP₃ ist [21].

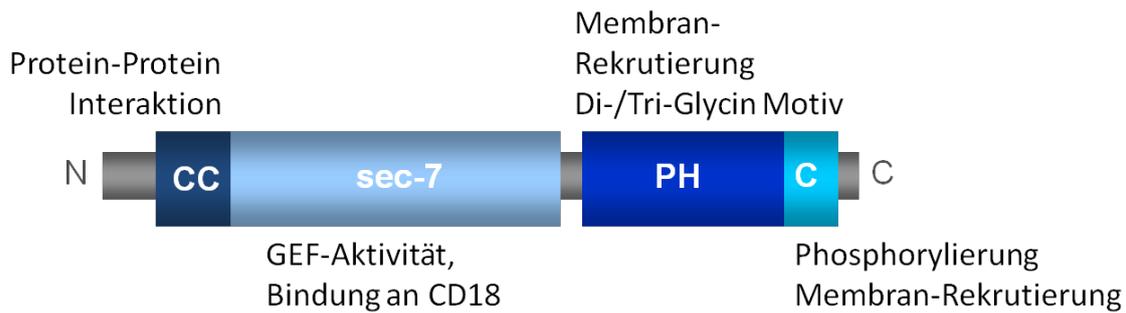


Abbildung 1.2: **Domänenstruktur der Cytohesine.** Aminoterminal (N) liegt die Coiled-coil Domäne (CC), welche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die zentrale Sec7 Domäne (sec-7) besitzt die katalytische GEF-Aktivität und bindet im Fall von Cytohesin-1 und -2 an CD18. Die Pleckstrin-Homologie Domäne (PH) ist zusammen mit der polybasischen C-Domäne (c) für die Membran-Rekrutierung verantwortlich. Innerhalb der PH-Domäne liegt das Di-/Tri-Glycin Motiv. Die carboxyterminale (C) polybasische Region bietet je nach Cytohesin verschiedene Phosphorylierungsmöglichkeiten.

Cytohesin-1 Cytohesin-1 wurde in einem “Yeast-Two-Hybrid Screen” als Interaktor von LFA-1 identifiziert [13]. Es bindet über seine Sec7-Domäne an die β_2 -Kette des Integrins (CD18). Cytohesin-1 wird hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Überexpressionsstudien an T-Zellen zeigten, dass Cytohesin-1 eine Aktivierung des Integrins bewirkt und damit die Adhäsion der T-Zellen an ICAM-1 verstärkt [13]. Die Cytohesin-1-Mutante E157K hat einen Defekt in der Cytohesin-1 GEF-Funktion. Überexpressionen dieser dominant-negativen Mutante zeigten, dass der GEF-abhängige Austausch an ARF-GTPasen *in vitro* gestört ist. Zudem sorgt die E157K-Mutation für eine gestörte Adhäsion an ICAM-1[22].

In dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC) konnten ähnliche Beobachtungen nach Einsatz von RNAi gemacht werden. So konnte in siRNA-basierten Studien an humanen Monozytengenerierten DC nachgewiesen werden, dass Cytohesin-1 als Aktivator von LFA-1 die statische Adhäsion an ICAM-1 reguliert [14, 23]. Durch Überexpression der Cytohesin-1 E157K-Mutante wurde weiterhin entdeckt, dass die Adhäsion von humanen Mo-DC GEF-abhängig von Cytohesin-1 reguliert wird [24]. Bei der Migration von DC ist Cytohesin-1 ein essentieller Faktor und reguliert dabei die kleine GTPase RhoA ([14, 23], Teile dieser Arbeit).

Studien an Neutrophilen belegen, dass Cytohesin-1 positiv auf die LFA-1 vermittelte Adhäsion wirkt aber den gegenteiligen Effekt auf das β_2 -Integrin MAC1 hat. Hier wirkt Cytohesin-1 als Repressor der Adhäsion und der fMLF-vermittelten Zellmigration [25].

Perez *et al.* beschrieben als erste eine Funktion für Cytohesin-1 im TCR-Signalweg. Über ICAM-2 aktiviertes LFA-1 fördert demnach Cytohesin-1-vermittelt den ERK1/ERK2 Signalweg [26]. Zudem zeigen Studien an Herpes-Virus induzierten Signalwegen, dass Cytohesin-1 oberhalb der MAP-Kinasen ERK1/ERK2 im Signalweg lokalisiert ist [27]. Die GEF-Funktion von Cytohesin-1 ist darüberhinaus auch verantwortlich für die Aktivierung des IL-2 Promotors nach TCR-Stimulation [15]. Mit Reporter-gen-Studien konnte nachgewiesen werden, dass Cytohesin-1 nach TCR-Aktivierung für die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors wichtig ist [15]. Dieser zählt zu den Transkriptionsfaktoren, die den IL-2

Promotor regulieren [28]. Dabei vermittelt Cytohesin-1 die Regulation von AP-1 über die Aktivierung von p38/JNK, nicht aber über den ERK1/ERK2 Signalweg der MAP-Kinasen Kaskade [24].

Die Aktivierung der PI3-Kinase bewirkt eine Rekrutierung von phosphoryliertem Cytohesin-1 über die PH-Domäne an die Plasmamembran [29, 30]. Als Faktoren, welche die Phosphorylierung von Cytohesin-1 katalysieren, werden verschiedene PKC-Isoformen sowie der Phorboläther PMA diskutiert [31, 32]. Darüberhinaus fördert die Phosphorylierung von Cytohesin-1 die ARF-GEF Aktivität an ARF1. Zudem wurde beschrieben, dass phosphoryliertes Cytohesin-1 mit kortikalem Aktin assoziiert [33].

In Studien an humanen Lungen-Karzinoma-Zellen wird zudem eine Funktion von Cytohesin-1 in der Aktivierung des EGF-Rezeptors diskutiert, nach denen Cytohesin-1 Konformationsveränderungen des Rezeptors induziert [34].

Cytohesin-2 (ARNO) Cytohesin-2 zeigt GEF-Aktivität an den GTPasen ARF1 und ARF6. Über die Aktivierung von ARF6 reguliert es Migrationsprozesse in Epithelzellen [35]. In Studien an Präadipozyten wurde ebenfalls eine Rolle für Cytohesin-2 in der Migration beschrieben. Dabei unterstützt Cytohesin-2 zusammen mit dem Fokal-Adhäsions-Protein Paxillin migratorische Prozesse [36]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-2 am Recycling der β_1 -Integrine beteiligt ist, Cytohesin-3 hingegen nicht [37]. Dabei werden die gegenteiligen Effekte von Cytohesin-2 und Cytohesin-3 auf die Phospho-Inositid-spezifische Bindung der beiden Cytohesine zurückgeführt, wobei das dritte Glycin in der PH-Domäne von Cytohesin-2 für ein erfolgreiches β_1 -Integrin-Recycling notwendig ist [38].

Über eine direkte Bindung an die Aldolase über die PH-Domäne ist Cytohesin-2 an der Verteilung von Vesikeln beteiligt [39]. Studien an HEK-Zellen zeigten, dass Cytohesin-2 durch Bindung an den A_{2A}-Adenosin-Rezeptor bindet und so G-Protein-unabhängig auf die Aktivierung von MAP-Kinasen Einfluss nimmt [40].

Zudem spielt Cytohesin-2 eine Rolle im Akt-Signalweg. Massenspektrometrische Analysen zeigten kürzlich, dass die Cytohesine-1, -2 und -3 über ihre Coiled-coil Domänen mit dem Gerüstprotein CNK1 (*Connector Enhancer of KSR 1*) interagieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass diese Interaktion wichtig für die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalwegs ist, und insbesondere Cytohesin-2 nach Insulinrezeptor-Stimulation CNK1-vermittelt verstärkt an die Plasmamembran rekrutiert wird [41]. An Pankreaszellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-2 über eine Interaktion mit ARF6 die GTPasen Cdc42 und Rac1 aktiviert und so die Insulinsekretion fördert [42]. Kürzlich publizierte Studien zeigen, dass Cytohesin-2 eine Rolle bei der Angiogenese spielt und die VEGF-abhängige Stimulation von Akt fördert [43].

Cytohesin-3 (Grp-1) Cytohesin-3 wurde erstmals 1998 als GEF für ARF1 beschrieben. Überexpressionsstudien konnten belegen, dass Cytohesin-3 in die Aufrechterhaltung von Strukturen und Funktionen des Golgi-Apparates involviert ist [44]. Es zeigte sich, dass Cytohesin-3 insbesondere in T-Zellen eine wichtige Rolle spielt. So ist bekannt, dass

Cytohesin-3 in anergen T-Zellen verstärkt exprimiert wird [15, 24, 45]. Für Cytohesin-3 im humanen System und dem *Drosophila*-Cytohesin-Homolog *steppke* wurden Funktionen im PI3-Kinase/Akt/FoxO Signalweg nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-3 positiv durch die PI3-Kinase reguliert wird [15], und *steppke* im Signalweg der PI3-Kinase übergeordnet ist und einer transkriptionellen Regulation durch FoxO untersteht [16]. Die transheterozygote Mutante von *steppke* in *Drosophila* bedingt eine massive Reduktion von Körpergröße und Gewicht in allen Entwicklungsstadien [16]. Der Einsatz des Cytohesin-spezifischen Inhibitors SecinH3 an Hepatozyten zeigte darüber hinaus, dass Cytohesin-3 eine frühe und essentielle Komponente im PI3-Kinase-abhängigen Insulin-Signalweg ist [17].

Weiterführende Studien belegten, dass Cytohesin-3 einen Einfluss auf die Aktivierung der MAP-Kinase p38 hat [24]. In Jurkat-T-Zellen reguliert Cytohesin-3 spezifisch die Internalisierung des TCR [Tolksdorf, unveröffentlicht].

Cytohesin-4 Cytohesin-4 wurde 2000 von Ogasawara und Vaughan entdeckt [46] und ist das bisher am wenigsten erforschte Cytohesin. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine weiteren Publikationen, in denen Cytohesin-4 im Mittelpunkt steht. Während die Cytohesine-1, -2 und -3 die geringsten Sequenzunterschiede untereinander aufweisen, zeigt Cytohesin-4 mit lediglich 69 % iger Aminosäure-Sequenzhomologie die größten strukturellen Unterschiede. Über die gewebespezifische Verteilung liegen bisher nur wenige Daten vor. mRNA-Expressionslevel weisen allerdings darauf hin, dass die Cytohesin-4 Expression auf Zellen primärer lymphatischer Organe (Thymus, Milz) und auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt ist ([46]; eigene Daten). Das Expressionsmuster innerhalb der Blutzell-Populationen zeigt, dass Cytohesin-4 hauptsächlich in Monozyten und T-Lymphozyten nachweisbar ist, weniger in Granulozyten und B-Zellen. *In vitro* konnte für Cytohesin-4 eine Bindung an ARF1 und ARF5, nicht aber an ARF6 nachgewiesen werden [46]. Kürzlich konnte auch für Cytohesin-4 eine Interaktion mit dem Cytohesin-interagierenden Protein CYTIP (*cytohesin interacting protein*) nachgewiesen werden [Molt, unveröffentlicht]. Das humane Cytohesin-4 weist eine putative homologe Phosphorylierungs-Stelle am Serin 392 auf, das murine Cytohesin-4 hat hingegen keine phosphorylierbaren Aminosäurereste in der polybasischen C-Region [uniprot.org].

Genstrukturen von Cytohesin-1 und Cytohesin-4 In der Maus ist das Cytohesin-1 Gen auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 13 Exons (Abbildung 1.3). Der gesamte Genbereich erstreckt sich über 116.5 kb. Das zusätzliche Exon 10 von Cytohesin-1 codiert ein weiteres Glycin. Durch alternatives Spleißing kann Cytohesin-1 so entweder als Di-Glycin oder als Tri-Glycin Variante exprimiert werden.

Cytohesin-4 liegt auf Chromosom 15 und verfügt über 13 Exons. Der Cytohesin-4 Locus erstreckt sich über 25 kb und ist damit mit wesentlich kleineren Introns als das Cytohesin-1 Gen versehen (Abbildung 1.3).

	Cytohesin-1	Cytohesin-2	Cytohesin-3	Cytohesin-4
erstmalig beschrieben	1996 Kolanus [13]	1996 Chardin [18]	1998 Franco [44]	2000 Ogasawara [46]
Expression	hauptsächlich hämatopoetisch [13]	beinahe ubiquitär [BioGPS.org]	beinahe ubiquitär [BioGPS.org]	hämatopoetisch [46]
GEF Aktivität	ARF1 [47, 44], ARF3 [48], ARF 5 [48], ARF6 [49, 50, 51]	ARF1 [18, 52], ARF6 [53]	ARF1 [44, 54], ARF6 [49]	ARF1, ARF5 [46]
Phosphorylierungsstellen	Ser393 [32], Ser394, Thr395 [33]	Ser391 [55]	keine [33]	putativ Ser392
Funktion in Adhäsion	aktivierend [13, 14, 22, 23](TC, DC), inhibierend (NP) [56]	aktivierend [36, 37]	inhibierend [37]	nicht bekannt
Funktion in Migration	aktivierend (TC, DC) [12, 14, 23], inhibierend (NP) [56]	aktivierend [35]	inhibierend [37]	nicht bekannt
Funktion in				
TCR-Signalweiterleitung	aktivierend [15, 24, 26]	nicht beschrieben	Anergie [15, 24, 45]	nicht bekannt, blockt IL-2 [15]
Interaktion mit LFA-1	ja [13]	nicht beschrieben	ja [45]	bekannt, unveröffentlicht
Interaktion mit CYTIP	ja [57, 58, 59]	ja [58]	ja [58]	ja [60]
Secin H3 sensitiv	ja [17]	ja [17]	ja [17]	nein [17]
“Knock-out” Maus	nicht verfügbar,	verfügbar, EMMA	verfügbar, KOMP	nicht verfügbar,
	diverse ES-Zell-Linien verfügbar (z.B. Eucomm)			ES-Zell-Linie (Eucomm)

Tabelle 1.1: Cytohesine: Eine Übersicht.

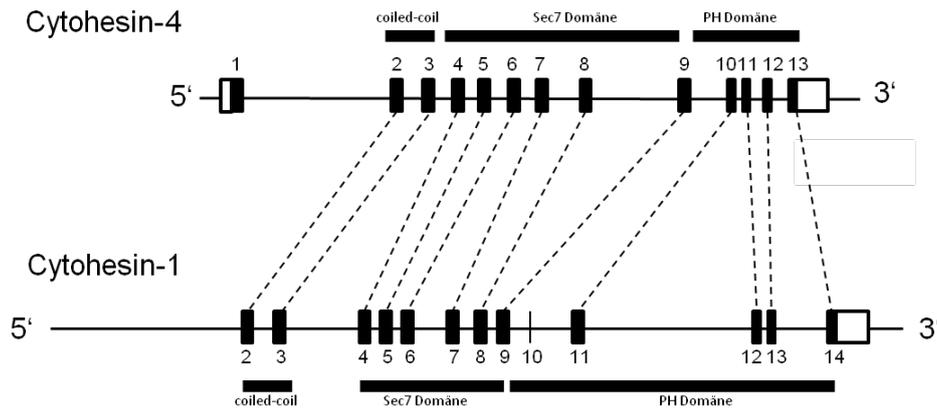


Abbildung 1.3: Vergleich der Genstrukturen von Cytohesin-1 und Cytohesin-4. Cytohesin-1 liegt auf dem Maus-Chromosom 11 und verfügt über 14 Exons, Cytohesin-4 liegt auf Chromosom 15 und verfügt über 13 Exons. Die Exons kodieren funktionell für die gleichen Proteindomänen. Cytohesin-1 erstreckt sich über eine Bereich von 116.5 kb, der Cytohesin-4 Locus erstreckt sich über 25 kb. Quelle: Ogasawara *et al.*, 2000; Ensembl Genome Browser.

1.1.4 Integrine und die Regulation der Zell-Adhäsion

Zielproteine verschiedener Cytohesine sind die Integrine. Integrine haben eine duale Funktion in der Zelladhäsion und der Signaltransduktion. Für die stabile Adhäsion von Immunzellen an das hohe Endothel oder für Zell-Zell-Kontakte im Rahmen der immunologischen Synapse (IS) sind Integrine die wesentlichen Adhäsions-Proteine. Darüberhinaus sind sie fähig, durch bidirektionale Signaltransduktion über die Plasmamembran Zell-Proliferation, Aktivierung, Zellmigration und Homöostase zu induzieren (zusammengefasst in [61]).

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die sich aus einer nicht kovalent verbundenen α - und einer β - Einheit zusammensetzen. Die einzelnen Untereinheiten verfügen über einen großen, extrazellulär gelegenen N-terminalen Teil gefolgt von einer kurzen Transmembran-Domäne sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Über die konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} Bindestelle MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) kann durch zweiwertige Kationen eine Aktivierung der Integrine erzielt werden. Ebenso verfügt die β -Kette über ein extrazellulär gelegenes MIDAS-Motiv sowie im zytoplasmatischen Teil über ein NPXY/F Motiv, welches eine Bindung an das Zytoskelett-assoziierte Protein Talin vermittelt.

Durch die Kombination von 18 α - und 8 β -Untereinheiten sind bisher 24 verschiedene Integrin-Heterodimere bekannt [62]. Die β_1 -Integrine werden beinahe ubiquitär auf allen Zelltypen exprimiert, wohingegen β_2 - und β_7 -Integrine Immunzell-spezifisch sind. Leukozyten exprimieren β_1 -, β_2 -, β_3 - und β_7 -Integrine. Dabei sind β_2 -Integrine am stärksten vertreten, von denen vier beschrieben sind: LFA-1 (*leucocyte functional antigen-1*; CD11a/CD18, α_L/β_2), Mac-1 oder CR3 (CD11b/CD18, α_M/β_2), CR4 (CD11c/CD18, α_x/β_2) und $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18). Die Krankheit LAD (Leukozyten-Adhäsionsdefizienz) beruht auf einem Expressionsdefekt der β_2 -Integrine und zeigt, wie wichtig diese für die Immunabwehr sind. LAD-Patienten sterben meist im frühen Alter an wiederkehrenden Infektionen, da ihre

Leukozyten nicht aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe auswandern und Infektionsherde erreichen können [63, 64].

Das bekannteste Immunzell-Integrin ist das $\beta_2\text{-}\alpha_L$ Integrin LFA-1, dessen natürlicher Ligand ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*; CD54) ist. Über LFA-1 wird bei der Extravasation die feste Adhäsion der Leukozyten an die hohen Endothelzellen vermittelt [65, 66]. Zudem gehört LFA-1 als wichtiger Bestandteil zum peripheren Bereich (pSMAC) der immunologischen Synapse [67]. Weitere Liganden von LFA-1 sind ICAM-2 bis ICAM-5 sowie JAM-1 (*junctional adhesion molecule 1*) [68, 69].

Das wichtigste Funktionsmerkmal der Integrine ist ihre induzierbare Konformationsänderung. Integrine können transient in verschiedenen, unterschiedlich Liganden-affinen Zuständen vorliegen (Abbildung 1.4). Diese Konformitätsänderungen werden über zwei unterschiedliche Prozesse gesteuert, zum Einen das sogenannte “Inside-out-Signaling”, zum Anderen über das “Outside-in-Signaling”. Beim “Inside-out-Signaling” erfolgt die Aktivierung der Integrine über intrazelluläre Signalkaskaden, die letztlich an der zytosolischen Integrin-Domäne enden und zur Aufrichtung des Integrins führen. Beim “Outside-in-Signaling” hingegen bewirkt die direkte Bindung eines extrazellulären Liganden von aussen wie zum Beispiel aktivierende Antikörper, oder andere Auslöser wie PMA, Mg^{2+} oder Mn^{2+} die Integrin-Aktivierung und damit verbundene Tyrosin-Phosphorylierungen. Hierdurch werden verschiedene Kinasen wie die SRC-Kinase oder die PI3-Kinase aktiviert.

In der geknickten Konformation liegt keine Integrin-Aktivität vor. Im aktivierten Zustand gibt es mindestens zwei Konformationen, die durch spezifische Antikörper detektiert und voneinander unterschieden werden können. Durch divalente Kationen, aktivierende Antikörper wie KIM185 oder MEM48 sowie intrazelluläre Signale wird das hochaffine Stadium ausgelöst [70]. Auch Phorboläther wie PMA oder Calciumionophore lösen eine transiente Integrinaktivierung aus. Ebenso können aber auch Chemokine und Zytokine eine Integrin-Aktivierung induzieren [71]. Darüber hinaus gibt es eine Reihe intrazellulärer Signalmoleküle, die LFA-1 regulieren, wie zum Beispiel Talin [72, 73], die GTPase Rap1 aus der Ras-Superfamilie [74, 75] und Cytohesin-1 [13].

Die Affinität ist die Bindekraft eines einzelnen Integrin-Heterodimers an seinen Liganden. Gruppieren sich Integrine durch laterale Bewegung in bestimmten Membranregionen, erhöht sich die Avidität, welche die Gesamtbindestärke des sogenannten Integrin-“Clusters” bezeichnet (zusammengefasst in [74])(Abbildung 1.4).

Weiterhin ist beschrieben, dass unter Flussbedingungen Scherkräfte eine Aktivierung der Integrine induzieren können [76]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass nicht nur externe Scherkräfte eine Rolle bei der Integrin-Aktivierung spielen, sondern auch interne mechanische Kräfte auf die Integrin-Aktivierung wirken. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Interaktionen der zytoplasmatischen Integrin-Bereiche mit Signalproteinen wie Talin, Kindlin, Vinculin und Aktin interne Kräfte und Spannungen auslösen [77, 78].

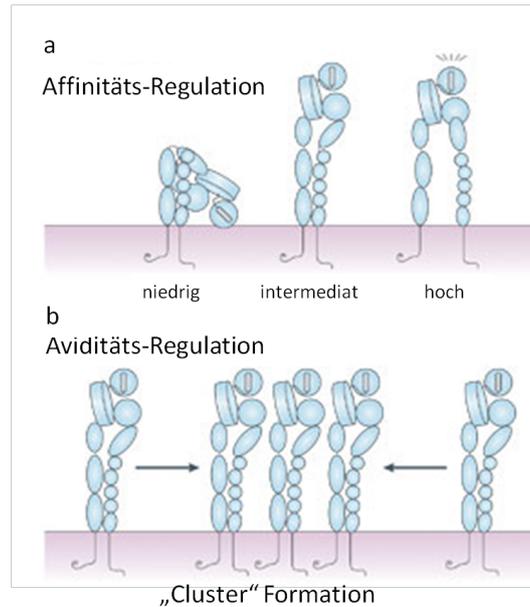


Abbildung 1.4: **Affinitäts- und Aviditätsregulation der Integrine.** Integrine liegen in unterschiedlichen Affinitäts-Zuständen vor. Die abgeknickte Konformation ist niedrig affin und inaktiv, wohingegen das aufgerichtete Integrin einen intermediaten oder hoch-affinen Zustand aufweisen kann (a). Über die Gruppierung einzelner Integrine zu sogenannten "Clustern" kann die Avidität von Integrinen reguliert werden (b). Quelle: verändert nach Kinashi, Nature Review Immunology, 2005.

1.1.5 Regulation der Zellmigration

Zellmigration ist ein hoch koordinierter Prozess, welcher eine Vielzahl von Signalwegen umfasst, ausgelöst von löslichen oder membrangebundenen Signalstoffen aber auch von Matrix-Interaktionen. Die zielgerichtete und auch schnelle Migration der Immunzellen ist eine essentielle Voraussetzung für die Funktion von Immunantworten. So müssen zum Beispiel APCs nach Pathogenkontakt und Antigen-Aufnahme in den nächstgelegenen Lymphknoten migrieren, um dort naive T-Zellen aktivieren zu können. Zudem müssen Lymphozyten in der Lage sein, über die hohen Endothelzellen in die Lymphknoten zu gelangen oder als aktivierte Lymphozyten mittels transendothelialer Migration aus den Blutgefäßen in umliegendes entzündetes Gewebe zu migrieren (Extravasation, Diapedese).

Immunzell-Migration wird durch Chemokine und ihre Rezeptoren gesteuert. Bei den Chemokinen lässt sich eine grobe Unterteilung in inflammatorische und homöostatische Chemokine treffen. Die inflammatorischen Chemokine werden bei Entzündungsreaktionen von zum Beispiel Makrophagen freigesetzt und haben die Aufgabe, Immunzellen an den Entzündungsherd zu rekrutieren. Inflammatorische Chemokine sind beispielsweise CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5/RANTES. Homöostatische Chemokine werden im Gegensatz dazu konstitutiv exprimiert und dienen dazu, den Weg zu lymphoiden Organen zu weisen. Zu diesen Chemokinen gehören beispielsweise CCL18, CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13 und CXCL14 [79]. Ein wichtiger Aspekt ist die Ausbildung eines Gradienten, welchen die Zellen über die Oberflächenverteilung ihrer Chemokin-Rezeptoren erkennen und so zielgerichtet migrieren können. Die Chemokin-Gradienten sind dabei nicht immer löslich. Durch

ihre meist positive Ladung können Chemokine an negativ-geladene Glycosaminoglycane auf Endotheloberflächen binden und steuern so die transendotheliale Migration der Lymphozyten ins Gewebe.

1.1.5.1 Chemokin-vermittelte Signaltransduktion

Chemokin-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs), welche aufgrund ihrer Struktur auch als 7-Helix-Transmembranrezeptoren bezeichnet werden. GPCRs aktivieren indirekt über G-Proteine entweder Ionenkanäle oder aber membranständige Enzyme. Die Ligandenbindung befähigt den GPCR dazu, als GEF für das assoziierte heterotrimere G-Protein zu fungieren. Der GDP/GTP Austausch führt zu einer Konformationsänderung des G-Proteins, die eine Dissoziation der α -Untereinheit von der β/γ -Untereinheit zur Folge hat (zusammengefasst in [80]). Die aktivierten Untereinheiten wirken nun als sekundäre Botenstoffe und können die Signale ins Zellinnere weiterleiten. So wird zum Beispiel die membranständige Phospholipase C aktiviert, welche ihr Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP₃ wirkt als sekundärer Botenstoff auf die Freisetzung von Calcium-Ionen (Ca²⁺) aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und aktiviert über Calcineurin letztlich den Transkriptionsfaktor NF-AT, während DAG die Proteinkinase C (PKC) und damit schließlich NF κ B aktiviert. Die Aktivierung von GPCRs spielt in Immunzellen insbesondere bei der Zellmigration und bei der Aktivierung von Integrinen eine wesentliche Rolle [81, 82].

1.1.5.2 Mechanismen der Zellmigration

Die zelluläre Grundlage für die Zellmigration stellt das Aktin-Zytoskelett mit seinen assoziierten Proteinen dar. Die auf Aktin basierten Membranprotrusionen wie Lamellipodien und Filopodien sind wesentliche zelluläre Ausläufer zur Vermittlung von Migrationsprozessen. Lamellipodien sind flächig ausgestreckte Protrusionen, welche ein dreidimensionales Aktin-Filament-Netz enthalten [83], wohingegen Filopodien dünn, zylindrisch und nadelförmig sind und parallel angeordnete dicht gepackte Aktinbündel enthalten. Durch die Chemokin-Rezeptor-Interaktion wird eine Signalkaskade ausgelöst, die letztlich zu einer Aktin-Umstrukturierung führt, sodass die Zelle polarisiert und Lamellipodien ausbildet [84].

Die Migration von Immunzellen unterscheidet sich von der Migration stark adhärenter Zellen wie Fibroblasten. Anhand von Fibroblasten wurde das Stufenmodell für den Ablauf von Migrationsprozessen beschrieben. Dabei ist der erste Schritt eine Polarisierung der Zelle, wobei polymerisierendes Aktin das Ausstülpfen von Membranprotrusionen bewirkt. Im zweiten Schritt adhären die Lamellipodien, dabei vermitteln Proteine der Integrin-Familie eine feste Verankerung mit dem Substrat. Im dritten Schritt kommt es zur Aktin/Myosin basierten Kontraktion des Zellkörpers. Über die Integrine wird für eine Weiterleitung der kontraktilen Kräfte gesorgt, welche über MyosinII auf das Aktin-Netzwerk

ausgeübt werden. So kommt es zum Vorwärtsziehen der Zelle. Im terminalen vierten Schritt werden die Adhäsionsstrukturen am Uropod aufgelöst und die fest verankerten Integrine zum Teil auf dem Substrat zurückgelassen [85]. Mit ungefähr 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ ist die Migration von Fibroblasten im Vergleich mit der Immunzell-Migration relativ langsam.

Die wesentlich schnellere Migration von Immunzellen beruht auf anderen Mechanismen. Die Leukozytenmigration kommt mit nur schwacher Adhärenz oder teilweise ohne Adhärenz aus und beruht auf raschen Formveränderungen der Zellen. Sie wird auch als amöboide Migration bezeichnet und wird [86]. Zellen, die sich auf diese Weise fortbewegen, können Geschwindigkeiten von bis zu 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ erreichen. Neuere Studien zeigen, dass für die Migration von Immunzellen in dreidimensionalen Geweben die Adhäsion über Integrine überhaupt nicht nötig ist, da dendritische Zellen, in denen die Integrine genetisch deletiert wurden, ohne Einschränkung in Geweben migrieren können. So bewegen sich dendritische Zellen vielmehr amöboidartig in dreidimensionalen Strukturen fort und nutzen die durch Aktin-Netzwerk Ausweitungen hervorgerufenen morphologischen Veränderungen zu einer fließenden oder kontraktilen Bewegungsform. Dabei ist allein die Aktin-Polymerisation die treibende Kraft, wohingegen MyosinII-abhängige Kontraktionen für das Überwinden enger Zwischenräume notwendig sind, um den rigiden Zellkern entsprechend zu verformen [87]. Für die zweidimensionale Migration wie beispielsweise bei der Extravasation oder auf den Stromazellen in den Lymphknoten sind aber auch in Immunzellen Integrine und Adhäsionsprozesse notwendig.

Darüber hinaus ist beschrieben, dass wichtige Signalwege des TCR-Signalgeschehens ebenfalls Einfluss auf Migrations-Prozesse nehmen. So zeigt eine kürzlich publizierte Studie, dass in T_{H1} -Zellen die Migration über CTLA-4 vermittelt durch die PI3-Kinase und Akt positiv reguliert wird [88].

1.1.5.3 Die Extravasation von Lymphozyten

Um an Entzündungsherde im Gewebe gelangen zu können, müssen zirkulierende Lymphozyten in der Lage sein, an entsprechender Stelle sekundenschnell auf Signale des Endothels reagieren zu können um den Blutstrom zu verlassen [66]. Der erste Kontakt zwischen Lymphozyt und Endothel verläuft über die Selektine. Diese eher schwache Adhäsion ist sehr kurzlebig und dient im Wesentlichen dazu, die Geschwindigkeit der Lymphozyten zu reduzieren, und sie in engeren Kontakt mit den Liganden des Endothels zu bringen, sodass die typische Rollbewegung auf der Gefäßwand einsetzt. Im nächsten Schritt bewirken an der Endothelzellschicht haftende Chemokine über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, dass über das "Inside-out Signaling" die Integrine aktiviert werden (s.a. 1.1.4). Diese vermitteln dann über die Bindung an ICAM-1 den festen Halt auf dem Endothel. Erst nach dieser festen Adhäsion können sich die Lymphozyten durch die Zwischenräume der Endothelzellen zwängen, um so in das entzündete Gewebe zu gelangen. Dieser Schritt wird auch als Diapedese bezeichnet [89].

1.1.5.4 Die Rolle von RhoA in der Zellmigration

Sowohl Zell-Substrat-Interaktionen als auch morphologische Aktin-basierte Zellverformungen unterliegen Regulationsmechanismen, die über Rezeptor-Ligand Interaktionen ausgelöst werden. Zentrale Schaltstellen in den Signalwegen der Zellmigration sind die kleinen GTPasen der Rho-Familie, wie RhoA, Rac1 und Cdc42. Das Ras Homolog A (RhoA) übt als hoch konserviertes Protein vielfältige Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen aus (zusammengefasst in [90]). Es kann in einem GDP- oder GTP-gebundenen Zustand vorliegen und erfährt durch die unterschiedlichen Bindungen Konformationsänderungen, durch die es wiederum Effektorproteine binden und regulieren kann. RhoA wird wie alle GTPasen durch GEFs aktiviert und durch GAPs inaktiviert. Es induziert im Wesentlichen morphologische Veränderungen des Zytoskeletts, insbesondere im Uropod der Zelle in Fokalkontakten während migratorischer Prozesse. Dabei führt sowohl die Rezeptorbindung eines Zytokins oder Chemokins als auch die Bindung von Matrix-Proteinen an Integrine zu einer Aktivierung von Rho-GTPasen [91].

Ein wichtiges Effektorprotein von RhoA ist die Kinase ROCK [92]. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung von Fokaladhäsionen. ROCK phosphoryliert die leichte Kette von MyosinII und ist damit ein wesentlicher Aktivator von MyosinII-vermittelten Kontraktionen. Es aktiviert zudem das Formin homologe Protein Dia1, welches mit Profilin interagiert. Profilin rekrutiert globuläres Aktin in Zellbereiche mit hoher RhoA-Aktivität und ist für die Ausbildung von Stressfasern mitverantwortlich [93].

Neben RhoA haben noch zwei weitere kleine GTPasen wichtige Funktionen bei der Zellmigration. Die GTPase Cdc42 aktiviert N-WASP und ist mit an der Ausbildung des ARP2/3 Komplexes beteiligt und somit für die Ausbildung von Filopodien mitverantwortlich. Zudem hat Cdc42 Einfluss auf die Zellpolarisierung und die Zellmigrationsrichtung indem es die Ausrichtung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) kontrolliert.

Rac1 aktiviert über WAVE den Arp2/3-Komplex und ist für die Ausbildung der Lamellipodien verantwortlich.

1.1.6 T-Zell-Rezeptor vermittelte Signalwege

Die Aktivierung von naiven T-Zellen geschieht in peripheren Lymphorganen und erfordert den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen einer APC und der T-Zelle mit dem passenden Rezeptor für das präsentierte Antigen. Die Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor (*t-cell receptor*, TCR) erfolgt nach Aktivierung über MHC-gebundene Peptide in Kombination mit kostimulatorischen Signalen, welche ebenfalls von der APC bereitgestellt werden.

1.1.6.1 Aufbau des TCR

Der TCR fungiert als Komplex aus mehreren Untereinheiten. Der konventionelle TCR ist ein Hetero-Dimer, das aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut ist, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Daneben existiert zudem ein geringer Prozentsatz an T-Zellen,

welche einen alternativen TCR exprimieren. Dieser setzt sich aus γ/δ -Untereinheiten zusammen [94]. Alle TCR-Untereinheiten gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie und besitzen eine N-terminale extrazelluläre variable Domäne, über welche die MHC-gebundenen Peptide erkannt werden und welche die Grundlage für die enorm diverse Antigen-Spezifität bildet. An die variable Region schließt sich die konstante Domäne an, gefolgt von einer Transmembran-Domäne. Der zytoplasmatische Teil ist verhältnismäßig kurz. Er ist konstitutiv mit zwei ζ -Ketten assoziiert, welche über jeweils drei ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) verfügen und letztlich zusammen mit dem CD3-Komplex die intrazelluläre Signalweiterleitung vermitteln.

Der CD3-Komplex setzt sich aus vier Ketten zusammen, einer γ -CD3-Kette, einer δ -CD3 Kette und zwei ϵ -CD3 Ketten, wobei jede Kette jeweils ein ITAM besitzt (zusammengefasst in [95]). ITAMs besitzen eine konservierte Aminosäureabfolge und können über Tyrosinkinase an zwei Positionen phosphoryliert werden (zusammengefasst in [96]).

1.1.6.2 TCR-Aktivierung und Immunologische Synapse

Die Aktivierung des TCR erfolgt durch Bindung des Peptid-beladenen MHC-Komplexes in Kombination mit der Aktivierung von kostimulatorischen Molekülen. Hierzu zählt CD28, welches von CD80/CD86 der APC gebunden wird (Abbildung 1.5).

Der enge und bis zu 24 Stunden andauernde Kontakt zwischen APC und T-Zelle wird nicht nur über den TCR und kostimulatorische Bindungen vermittelt. So trägt zum Beispiel das Leukozyten-Integrin LFA-1 über die Bindung an ICAM-1 zu einer entscheidenden Stabilisierung des APC-T-Zell Kontakts bei. Die Ausbildung dieses Zell-Zell-Kontakts und die Rekrutierung der verschiedenen beteiligten Rezeptoren und ihrer assoziierten zytoplasmatischen Signalproteine wird auch als immunologische Synapse (IS) bezeichnet [97]. Dabei bilden TCR und CD3-Komplex zusammen den zentralen Bereich, welcher c-SMAC (*central supramolecular activation cluster*) genannt wird. Hierzu zählen ebenfalls die nach Aktivierung rekrutierten zytoplasmatischen Signalproteine wie ZAP-70, Lck, Fyn, LAT und SLP76. Auch die Korezeptoren CD4 oder CD8 und kostimulatorische Rezeptoren wie CD28 zählen zum c-SMAC. Der umgebende Bereich, p-SMAC (*peripheral SMAC*) genannt, umfasst insbesondere die ringförmig angeordneten Verbindungen aus LFA-1 und ICAM-1 (zusammengefasst in [98]). Um den p-SMAC ist der d-SMAC (*distal SMAC*) lokalisiert. Zur Ausbildung der immunologischen Synapse gehören weiterhin F-Aktin Relokalisierungen (Bunnell *et al.*, 2001) und Mikrotubuli-Ausrichtungen [99], welche eine deutliche Polarisierung beider Zellen zum Bereich der Synapse hin bewirken. Darüberhinaus konnte beobachtet werden, dass auch Mitochondrien eine Relokalisation nach der Synapsenbildung zeigen und sich in Synapsennähe anordnen [100].

Nach der Antigenbindung werden in einem ersten Schritt die ITAMs der ζ -Ketten und des CD3-Komplexes phosphoryliert, ein Vorgang, welcher in ruhenden Zellen normalerweise durch die Phosphatase CD45 unterdrückt wird. CD45 ist aufgrund seiner relativen Länge aus dem zentralen Synapsen Bereich ausgeschlossen und ist im p-SMAC lokalisiert.

Durch die Ausbildung der immunologischen Synapse nach MHC/TCR-Kontakt wird CD45 räumlich vom TCR-Komplex getrennt, sodass die ITAM-Phosphorylierung erleichtert wird [101].

Die ITAM-Phosphorylierungen werden durch die Src-Kinase Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) vermittelt, welche durch Assoziation mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 in räumliche Nähe der ITAMs gebracht wird. Die Phosphorylierung der ITAMs dient wiederum als Rekrutierungsplattform für das Syk-Protein ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*). An die ITAMs rekrutiertes ZAP-70 wird von Lck phosphoryliert und damit aktiviert. So kann ZAP-70 verschiedene Proteine wie beispielsweise LAT (*linker of activated t-cells*) und SLP-76 (*SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa*) rekrutieren. Diese dienen als zentrale Adapter-Proteine, welche wiederum weitere Proteine des TCR-Signalwegs rekrutieren, so zum Beispiel GEFs wie Ras und Vav oder die Phospholipase C [102, 103].

Das Adapterprotein LAT rekrutiert SOS (*son of sevenless*) an die Membran. SOS wiederum vermittelt im Komplex mit Grb2 die Aktivierung von Ras und initiiert so den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen Signalweg, welcher schließlich die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt. Ras aktiviert die MAP-Kinasen Kaskade über Raf-1, MEK, ERK1/2 und ELK, sodass Fos, eine Untereinheit von AP-1, vermehrt gebildet wird. Ras ist auch ein Aktivator der PI3-Kinase, welche wiederum über den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav zur Aktivierung der GTPase Rac-1 und damit der Aktivierung c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) führt, welche mit Jun den zweiten Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors bildet (s.a. Abbildung 1.5).

Ein weiterer MAP-Kinasen Signalweg wird durch die Aktivierung der Rho-GTPasen Rac oder Cdc42 initiiert. Beide werden über den GEF Vav aktiviert und stimulieren ihrerseits wieder die MAP Kinasen Kinasen MKK3 und MKK6, die letztlich p38 phosphorylieren. p38 aktiviert die Transkriptionsaktivatoren Elk-1 und ATF-2. So trägt auch p38 zu einer AP-1 Aktivierung bei (zusammengefasst in [104]).

Die Rekrutierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) an LAT ist Vav-abhängig und sorgt für eine Spaltung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP₂) in die sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP₃) und Di-Acylglycerol (DAG). IP₃ vermittelt über Rezeptorbindung an das endoplasmatische Reticulum eine Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung ins Zytoplasma. Dies aktiviert die Phosphatase Calcineurin, deren Substrat NF-AT ist. Die Dephosphorylierung des Transkription-Faktors NF-AT bedingt dessen Kerneintritt. Der Botenstoff DAG ist unter anderem ein Aktivator verschiedener Isoformen der Proteinkinase C (PKC). PKC wird in die immunologische Synapse rekrutiert und induziert dort eine Signalkaskade, welche die Aktivierung von NF κ B zur Folge hat. Zudem fördern PKCs die Aktivierung der GTPase Ras und damit verbunden auch den MAP-Kinasen Signalweg über Raf, MEK und ERK1/2, welcher in einer AP-1 Aktivierung resultiert (zusammengefasst in [105]).

Die Stimulation von T-Zellen bewirkt letztlich, dass die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-AT und NF κ B die Transkription von Zielgenen einleiten. Dadurch werden Prozesse

wie Zytokin-Produktion (zum Beispiel IL-2), finale T-Zell-Differenzierung und die klonale Expansion initiiert.

Um zu verhindern, dass T-Zellen über Selbst-Antigene aktiviert werden, ist neben dem spezifischen Signal über das MHC-präsentierte Peptid auch ein nicht-Antigen-spezifisches Signal seitens der APC zur vollen Aktivierung der T-Zelle erforderlich, um so zum Beispiel die Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen einzuleiten, aber auch um die zeitliche Begrenzung der T-Zellaktivierung zu steuern und um autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu kontrollieren. Diese doppelte Aktivierung verhindert eine nicht-APC-vermittelte TCR-Aktivierung durch Selbst-Antigene, welche in Autoreaktivität resultieren könnte [106]. Wichtige Korezeptoren der B7/CD28 Familie sind CD28 und CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*). Die Kostimulation erfolgt zum Beispiel über die Bindung von CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) an den CD28-Rezeptor der T-Zelle [107, 108]. Auch die Bindung von ICOS (*Inducible Costimulator*) an den Liganden ICOS-L kann dieses kostimulatorische Signal liefern [109]. PD-1 (*Programmed Death*) und CTLA-4 gehören zu den ko-inhibitorischen Rezeptoren. All diese Rezeptoren und ihre Liganden sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I und Mitglieder der Ig-Superfamilie. In ihren zytoplasmatischen Regionen enthalten sie potentielle SH2- und SH3-Bindedomänen, welche die Signalweiterleitung in das Zell-Innere vermitteln. Das Ausbleiben dieser kostimulatorischen Signale bewirkt, dass die T-Zelle anerg wird, also nicht mehr auf aktivierbare Signale reagiert.

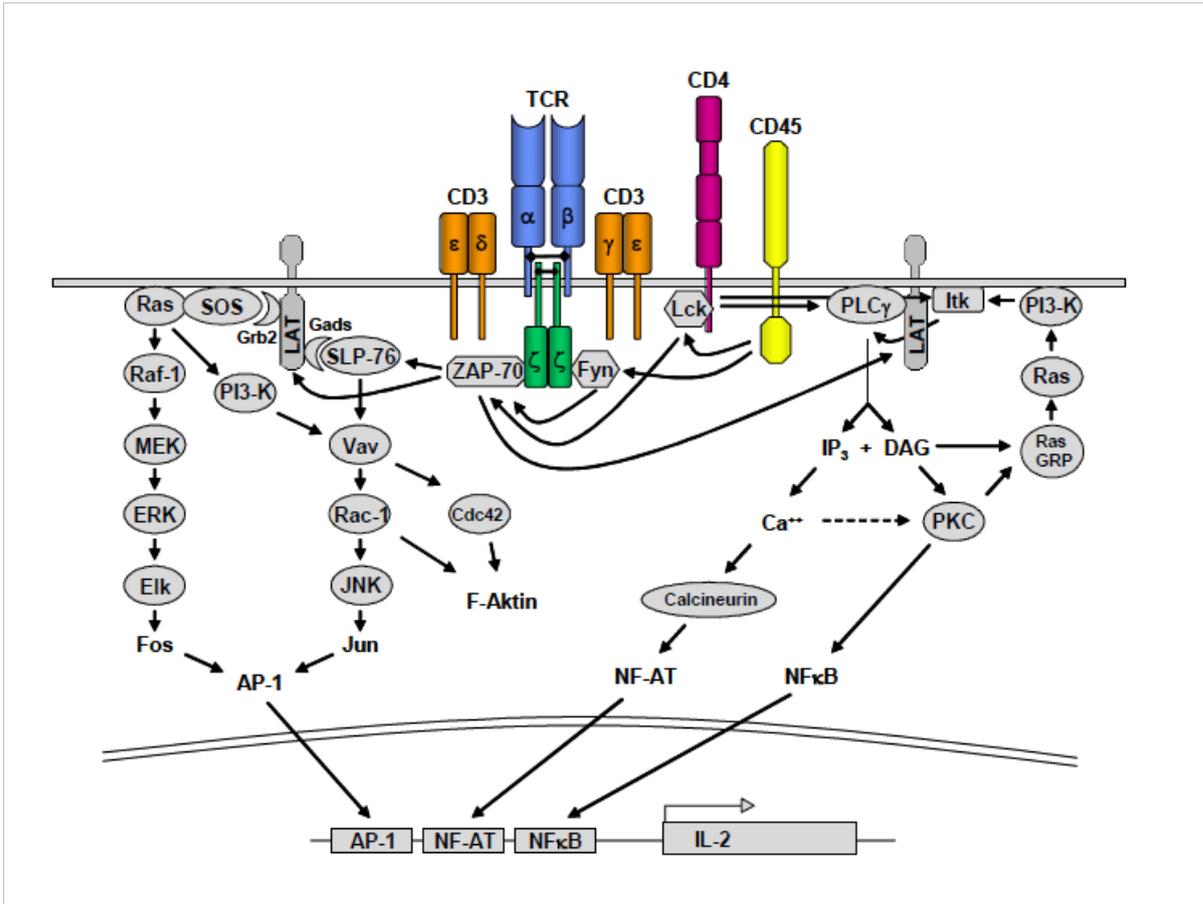


Abbildung 1.5: **Signaltransduktion über den TCR/CD3-Komplex.** Nach Aktivierung werden an die phosphorylierten ITAMs des TCR verschiedene Signalproteine rekrutiert, welche wiederum Adapterproteine rekrutieren. So führt die TCR-Aktivierung über verschiedene Signalketten (s. Text) schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-AT und NFκB. Quelle der Abbildung: Bettina Kellersch, Dissertation 2006.

1.1.7 Akt als zentrale Schaltstelle in zellulären Signalwegen

Akt (auch PKB) ist eine 57-kDa Serin/Threonin Kinase, welche in zahlreiche Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung und anti-apoptotische Prozesse involviert ist. Akt wurde ursprünglich aus dem Provirus Akt8 identifiziert [110]. In der gleichen Studie wird das humane Homolog Akt1 beschrieben, welches aus einem Adenokarzinom isoliert wurde [110]. Kohn *et al.* wiesen als erste nach, dass Akt in den Insulin-Signalweg involviert ist [111]. Es gibt drei Akt-Isoformen (Akt1/2/3), welche eine hoch-konservierte Domänenstruktur haben: Eine aminoterminal PH-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine carboxyterminale Domäne, die über ein hydrophobes Motiv verfügt [112]. Akt1 wird ubiquitär exprimiert und vermittelt Prozesse wie Zellwachstum und Überleben, wohingegen Akt2 vor allem in Muskelzellen und in Adipozyten exprimiert wird, in denen es den Insulinstoffwechsel reguliert. Die Akt3 Expression ist auf Gehirn und Testikel beschränkt [113].

Akt ist das zentrale Effektorprotein der PI3-Kinase. Die Vernetzung des TCR und/oder

die Kostimulation von CD28 aber auch die Bindung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Insulin an ihren Rezeptor induzieren die Aktivierung der PI3-Kinase, welche die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ katalysiert (Abbildung 1.6). PIP₃ wiederum dient als Adapter für Proteine mit PH-Domänen und ist unter anderem für deren Plasmamembran-Rekrutierung verantwortlich.

Die Aktivierung von Akt erfolgt primär über zwei nachfolgende Phosphorylierungen. Zunächst bindet Akt über die Interaktion seiner PH-Domäne mit PIP₂ oder PIP₃ an die Plasmamembran. Dadurch wird eine leichte Konformationsänderung ausgelöst, so dass die Kinase PDK1 (*Phosphoinositid dependent kinase 1*) Akt in der Aktivierungs-Domäne binden kann um den Threonin-Rest 308 (Thr 308) zu phosphorylieren. PDK1 selbst wird ebenfalls durch Interaktion mit PIP₃ an die Plasmamembran rekrutiert. Diese Phosphorylierung am Threonin 308 erleichtert wiederum die nachfolgende Phosphorylierung am Serin 473 im hydrophoben Motiv nahe des Carboxylendes durch den Kinase-Komplex mTORC2 [114].

Aktiviertes Akt dissoziiert ins Cytoplasma und aktiviert oder inaktiviert dort durch Phosphorylierung seine Substrate. Hierzu zählen insbesondere Transkriptionsfaktoren der *Forkhead Box* Familie FoxO1, FoxO2a, FoxO3 oder Kinasen des Zuckerstoffwechsels wie GSK3 β (*glycogen synthase 3 β*), Proteine des Apoptose-Signalwegs, Regulatoren der Proteinbiosynthese, metabolische Enzyme, Lipidkinasen und GTPase-aktivierende Proteine. FoxO-Proteine translozieren Phosphorylierungs-gesteuert zwischen Zytoplasma und Zellkern. Dabei wirken sie auf Zielgene, welche Funktionen wie Zellzyklus, Proliferation und Apoptose steuern (zusammengefasst in [115]). Die Phosphorylierung von FoxO bewirkt dessen Kernausschluss. Akt phosphoryliert FoxO1 am Threonin 24, Serin 256 und am Serin 319. FoxO3a und FoxO4 werden an equivalenten Bereichen phosphoryliert [116, 117]. Als direktes Zielgen von FoxO wird so auch der Zellzyklusblocker p27 inhibiert, sodass die Zelle in die Mitosephase übergehen kann und die Proliferation initiiert wird ([118]; zusammengefasst in [119]).

Die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) agiert als Gegenspieler der PI3-Kinase, da es deren Produkt PIP₃ zu PIP₂ hydrolysiert. Insofern zählt PTEN zu den hemmenden Faktoren von Akt. Ein Verlust von PTEN wird oft in Tumorzell-Linien beobachtet, und korreliert dort mit einer erhöhten Akt-Aktivität [120, 121, 122].

Um die Aktivierung von Akt zu beenden, wird Akt durch zwei Phosphatasen dephosphoryliert: PHLL (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) katalysiert die Dephosphorylierung am Serin 473 und PP2A (*protein phosphatase 2*) dephosphoryliert das Threonin 308 (zusammengefasst in [123]).

Darüberhinaus bewirkt die PI3-Kinase durch Generierung von PIP₃ an der Plasmamembran eine Rekrutierung von Vav und die Aktivierung der Rho-GTPasen Rac und Cdc42, sodass auch Aktin-basierte zytoskelettale Veränderungen der Zelle initiiert werden.

Die PI3-Kinase ist zudem an einer Rekrutierung der Cytohesine an die Plasmamembran beteiligt (siehe auch Abschnitt 1.1.3). Die Cytohesine-1, -2 und -3 binden über ihre PH-Domäne an die von der PI3-Kinase generierten Phosphatidyl-Inositol-Phosphate [54, 124,

125, 126].

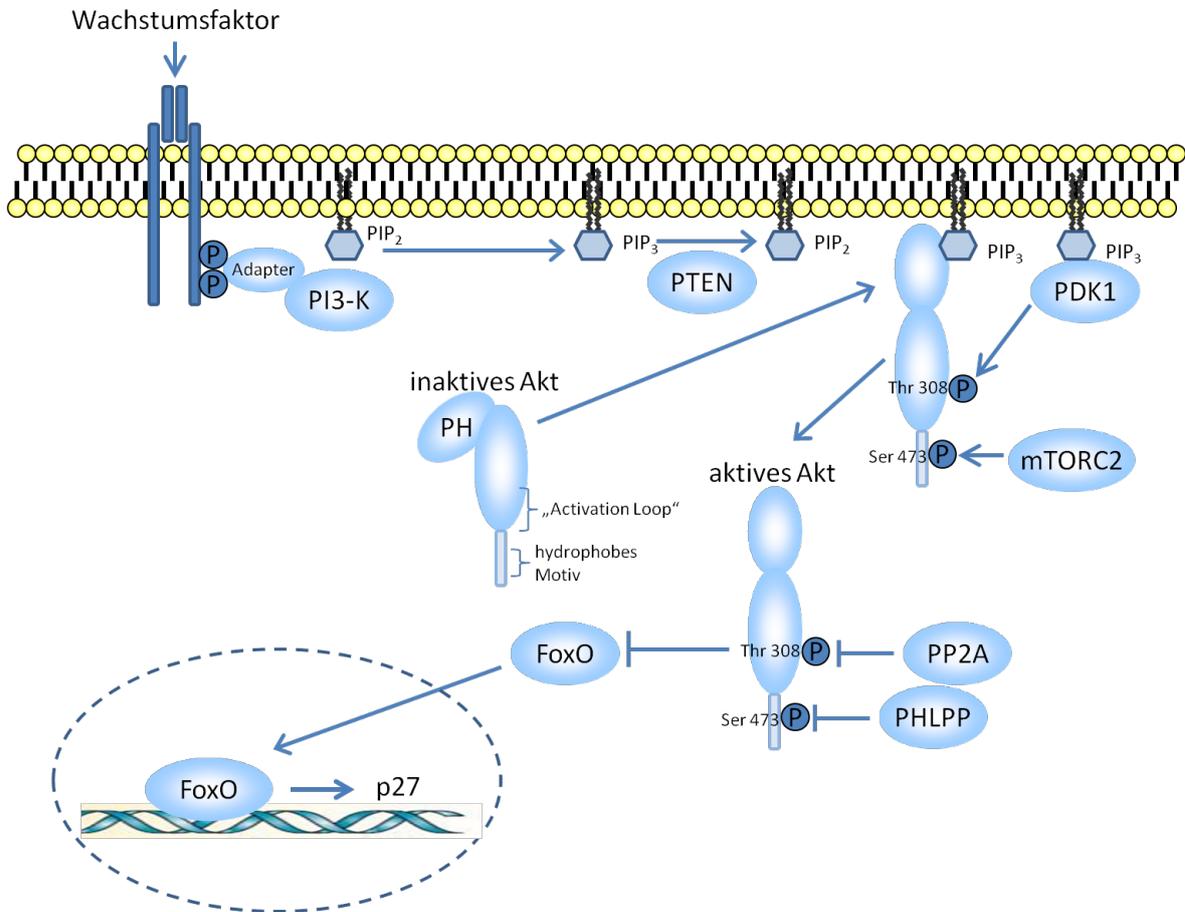


Abbildung 1.6: **Akt Signalwege**. Die Aktivierung der Proteinkinase Akt erfolgt durch zweifache Phosphorylierung über PDK1 und mTORC2. Aktiviertes Akt inhibiert über Phosphorylierung FoxO und hemmt so indirekt wichtige Zellzyklus-Inhibitoren wie p27. Die PI3-Kinase sorgt für die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ und dadurch für die Membranrekrutierung von Akt und PDK1. PTEN agiert als Phosphatase für PIP₃ und Akt. PP2A und PHLPP heben die Aktivierung von Akt wieder auf. Abbildung verändert nach Hers *et al.*, 2011.

mTOR Signalwege mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist in Zellen ein essentieller Regulator von Zellwachstum und anabolischen Prozessen, welcher als eine Art Umweltsensor auf Stoffwechselsituationen, Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine reagiert. Es gehört zur Familie der PIK-verwandten großen Protein-Kinasen [127]. Die mTOR-Signalwege beeinflussen damit Zellprozesse wie Transkription und Translation, Protein- und Lipid-Synthese, Zellwachstum und Zellmetabolismus.

mTOR fungiert in Säugerzellen nicht als singuläres Protein, sondern übt in zwei Multi-Protein-Komplexen jeweils spezifische Aufgaben aus [128]. Diese Komplexe, mTORC1 und mTORC2 genannt, unterscheiden sich in der Proteinzusammensetzung und der zellulären Funktion voneinander. mTORC1 ist sensitiv für den Inhibitor Rapamycin, welcher das Komplex-Protein FKBP12 bindet. mTORC1 setzt sich weiterhin aus den Proteinen GβL und Raptor zusammen, welche beide die Kinase-Aktivität von mTOR unterstützen. DEP-

TOR fungiert als mTOR-Inhibitor, welcher mittels über Ubiquitinierung abgebaut wird und ebenfalls Bestandteil des mTORC1 ist. LST8 bindet als Komplexbestandteil an die Kinase-Domäne von mTOR.

mTORC1 bewirkt eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der S6Kinase, sowie eine Inhibition durch Phosphorylierung des Inhibitors der Translations-Initiation, *4E-binding protein 1* (4E-BP1), und aktiviert so die Proteinbiosynthese. Die p70 S6 Kinase wird über multiple Phosphorylierungs-Ereignisse kontrolliert. Sie steuert das Zellwachstum und die Zellzyklusprogression der G₁-Phase [129], und katalysiert die Phosphorylierung des S6 Proteins der 40S ribosomalen Untereinheit und reguliert darüber die Proteinbiosynthese der Zellen. Zudem aktiviert mTORC1 über die S6Kinase2 rpS6, eine Komponente des 40s Ribosoms (zusammengefasst in [130]).

mTORC2 setzt sich aus mTOR, Rictor, LST8, GβL, DEPTOR, Sin1 und PRR5 zusammen. Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) wird im Gegensatz zu Raptor nicht durch Rapamycin gehemmt. Er fungiert als PKCα-Aktivator und beeinflusst so das Zytoskelett und weitere Signaltransduktionswege [131]. Auch über die Aktivierung der Rho-GTPasen Rho und Rac ist mTORC2 in zytoskelettale Umordnungen involviert [132]. Weitere Regulatoren des mTOR-Signalwegs sind die *tuberous sclerosis Komplexe* TSC1 und TSC2, welche als Inhibitoren von mTORC1 fungieren. Sie inhibieren Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), welches wiederum als Aktivator für mTORC1 beschrieben ist und als Aktivator von mTORC2 diskutiert wird [133]. TSC2 wird von verschiedenen Signalkomponenten inhibiert, so zum Beispiel durch ERK, aber auch durch Akt [134].

1.1.8 Die Regulation von Zellproliferation und Zellteilung

1.1.8.1 Zell-Zyklus Regulation

Die Regulation von Wachstum und Zellteilung wird über die strikte Kontrolle des Zellzyklus reguliert. Die Hauptphasen, die während des Zellzyklus unterschieden werden, sind die Synthese-Phase (S) und die Mitose-Phase (M), welche durch die “Gap” (Lücken-) Phasen Gap₁ (G₁), und G₂ separiert sind (Abbildung 1.7). In der G₀-Phase ruht die Zelle und zeigt weder Wachstum noch Proliferation. Dieser Zustand ist zum Beispiel wichtig bei naiven nicht aktivierten T-Zellen und kann je nach Zelltyp über Jahre andauern, zum Beispiel bei Gedächtniszellen. Bekommt die Zelle Signale zur Proliferation, so tritt sie in die G₁-Phase über. In der G₁-Phase wächst die Zelle, nimmt an Größe zu und dupliziert einen Teil ihrer Organellen. Die Duplikation der Chromosomen erfolgt in der Synthesephase. Die zweite Gap-Phase G₂ dient zur Kontrolle auf Fehler während der Synthese und bietet Zeit für eventuelle Reparaturen. Die Phasen G₀, G₁, S und G₂ werden auch als Interphase zusammengefasst. An die G₂-Phase schließt sich dann die Mitose-Phase an, in welcher es zur Spindelbindung und damit verbundenen Sortierung der Chromosomen kommt. Anschließend erfolgt die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen. Die Mitosephase gliedert sich wiederum in die Prophase, in der die Chromosomen kondensieren, die Prometaphase, in welcher der Kern destabilisiert, die Metaphase, in welcher die Chromosomen äquatorial

angeordnet werden, die Anaphase, in welcher die Schwesterchromatiden in Richtung der Spindelpole gezogen werden und die Telophase, in welcher die Chromosomen in Polnähe wieder decondensieren.

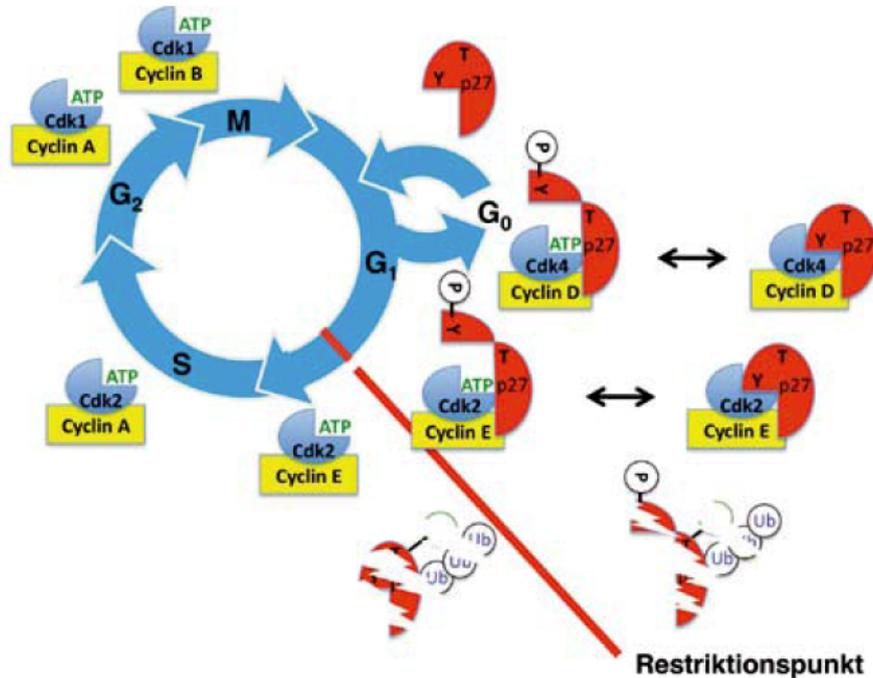


Abbildung 1.7: **Zellzyklus**. Der Zellzyklus wird in die Phasen G₀, G₁, S, G₂, welche als Interphase zusammengefasst werden, und in die Mitose-Phase gegliedert. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) regulieren die Zellzyklusprogression. Der CDK-Inhibitor p27 blockiert ein Fortschreiten des Zellzyklus durch Bindung an den CDK4/CyclinD-Komplex und den CDK2/CyclinE-Komplex. Die Phosphorylierung von p27 am Tyrosin 88 induziert eine Konformationsänderung, die den Cyclin/CDK-Komplex zur Substrat-Phosphorylierung befähigt. Auch p27 gehört in diese Substratgruppe, und die nachfolgende Phosphorylierung durch CDK2 am Threonin 187 leitet die Ubiquitinierung von p27 ein. Die p27 Expression ist im Verlauf der G₁-Phase am stärksten, nimmt dann aber durch proteasomale Degradation ab. Quelle: Hengst und Dohmesen, 2009.

Ob eine Zelle den Prozess der Zellteilung durchlaufen wird, entscheidet sich im Lauf der G₁-Phase. Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt, dem Restriktionspunkt, ist eine Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren nötig, um die Progression des Zellzyklus voran zu treiben. Fehlen diese Signale, gehen die Zellen wieder in die G₀-Phase über. Werden die Zellen allerdings soweit stimuliert, dass sie den Restriktionspunkt überschreiten, gehen sie in die Synthesephase über und durchlaufen den Zellzyklus unabhängig von weiteren Faktoren, da das Überschreiten des Restriktionspunktes irreversibel ist [135].

Die genaue Regulation der G₀/G₁, S-, G₂- und Mitosephase wird über eine Vielzahl kleiner Schaltermoleküle gesteuert, die Cyclinkinasen und Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs). Die Cyclin-abhängigen Kinasen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche aus mindestens zwei Untereinheiten bestehen, der katalytischen CDK-Untereinheit und der zur Aktivierung notwendigen Cyclin-Untereinheit. Die Aktivierung oder Inhibition der CDKs wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert. Zum Einen erfolgt die Regulation über Cyclin-Bindung und Stabilisierung der Untereinheiten, sowie der Lokalisation

des Cyclin/CDK-Komplexes [136, 137]. Zum Anderen können Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der CDK-Untereinheit die Aktivität bestimmen. Eine entscheidende Rolle spielen CDK-inhibitorische Proteine. Sie kontrollieren im Wesentlichen die Übergänge zu den einzelnen Zell-Zyklus-Phasen. In Säugetierzellen wurden zwei Proteinfamilien beschrieben, die als CDK-Inhibitoren fungieren, die Cip/Kip und die Ink4-Proteine [138].

1.1.8.2 p27 als Inhibitor des Zellzyklus und als RhoA-Aktivator

Das Cip/Kip-Protein p27 (auch Kip1) ist ein zentraler Inhibitor der Zellzyklus-Progression. Dabei blockiert p27 durch direkte Bindung der CDK/Cyclin-Komplexe E-CDK2 oder D-CDK4 den Übergang der Zelle von der G₀- zur Synthesephase und das Überschreiten des Restriktionspunkts [139].

p27 wird auf verschiedenen Ebenen in seiner Funktion reguliert. So steuern Transkriptionsfaktoren der *Forkhead box class O* Familie (FoxO) nach Cytokin-Reizen oder im Zuge der Akt-Signalwege die p27 Expression [118, 119]. Darüber hinaus werden sowohl die Translation als auch die Proteinlevel von p27 reguliert. So ist die Translationsrate von p27 in der G₀- und der frühen G₁-Phase maximal, um dann bei Mitogen-Stimulation, wenn die Zelle sich in Richtung der S-Phase bewegt, abzufallen. Die Zellzyklus-abhängige Translation von p27 wird über die 5'-UTR der p27 mRNA vermittelt. Diese enthält eine interne Ribosomen-Eintritts-Stelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), welche für eine dauerhafte Translation von p27 in der Ruhephase des Zellzyklus sorgt [140]. An dieser Stelle können weitere Faktoren in die p27-Translation eingreifen. So bindet das *Polypyrimidin tract binding protein* (PTB) an die p27 IRES und verhindert so die Translation [141]. Auch die 3'-UTR von p27 dient als Regulationseinheit. Durch Bindung an diese Region können RhoA [142] und CDK4 [143] die Translation von p27 inhibieren.

Ein weiterer Regulationsmechanismus von p27 ist seine durch Phosphorylierung eingeleitete Proteolyse [144]. p27 ist im Ruhezustand der Zelle an den CDK2/Cyclin E Komplex gebunden. Nach Aktivierung der Zelle phosphoryliert zum Beispiel die Src-Kinase p27 am Tyrosin-Rest 88 und vermindert so die inhibitorische Wirkung von p27 auf den Cyclin-Komplex. Freiwerdende CDK2/Cyclin E Komplexe können nun ATP binden und katalysieren die Phosphorylierung von p27 am Threonin-Rest 187, ebenso erfolgt hier die Phosphorylierung durch den SCF-Komplex, welcher p27 ebenfalls für den proteasomalen Abbau markiert. Das vermehrte Freiwerden von CDK2/Cyclin E bewirkt zudem in einer Rückkopplungs-Schleife eine weitere Verstärkung des p27-Abbaus. Dies hat zur Folge, dass die Zelle den Restriktionspunkt überschreitet und die weitere Progression des Zellzyklus nicht mehr reversibel ist (zusammengefasst in [145]).

Neben seinen Funktionen in der Arretierung des Zellzyklus sind für p27 auch Zellzyklus-unabhängige Funktionen beschrieben. So wurde von Besson [146] gezeigt, dass p27 über eine Inhibition von RhoA die Migration von Fibroblasten hemmt. Auch in Fibrosarcoma-Zellen und normalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass p27 die Migration inhibiert, indem es an das Mikrotubuli-destabilisierende Protein Stathmin bindet. Dabei

verhindert p27 die Assoziation von Stathmin mit Tubulin und verursacht so eine verstärkte Mikrotubuli-Polymerisierung [147]. Im Gegensatz dazu wurde allerdings in Leber-Karzinom-Zellen ein stimulierender Effekt von p27 auf die Migration beobachtet. So kolo-kalisiert p27 dort mit Aktin-Filamenten und aktiviert die Zellmigration durch Regulation der GTPase Rac [148, 149]. In p27-defizienten Maus-embryonalen Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) ist die Motilität wiederum reduziert, es werden vermehrt Aktin-Stressfasern gebildet und die RhoA-Aktivität ist verstärkt [146].

Der Hauptanteil der p27 Proteine befindet sich in ruhenden Zellen im Zellkern. Eine Akt-vermittelte Phosphorylierung kann die nukleäre Lokalisations-Sequenz von p27 inaktivieren und so zur zytoplasmatischen Lokalisation von p27 beitragen, wo es RhoA aktiviert. Darüber hinaus hat p27 auch komplexe Aufgaben in der Apoptose Regulation. Die Spaltung von p27 und p21 durch Caspasen steigert die Cdk2-Aktivität, dies hat wiederum eine Verstärkung des apoptotischen Programms zur Folge [150]. Zudem wurde gezeigt, dass p27 die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Procaspase-3 verhindern kann [151]. Als zentrales Steuermolekül des Zellzyklus spielt p27 auch in der Krebsentstehung eine Rolle. So wurde in Krebsgeweben eine schwache p27 Expression beschrieben sowie fehlerhafte Lokalisationen innerhalb der Zelle (zusammengefasst in [145]).

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (*Dendritic Cells*, DC) wurden erstmals 1973 von Steinman beschrieben [152]. Sie fungieren als sehr effektive APC und stellen das zentrale Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität dar. DC-Populationen sind sehr heterogen. Eine grobe Einteilung kann zunächst in plasmacytoide und myeloide DC vorgenommen werden. Im klassischen Modell entwickeln sich DC aus Monocyten, welche ihren Ursprung im Knochenmark haben. Die Monocyten zirkulieren nach dem Verlassen des Knochenmarks durchs Blut um dann in periphere Gegebenheiten zu gelangen. Dort wird durch GM-CSF und/oder IL-4 die Differenzierung zu unreifen DC ausgelöst [153]. Darüber hinaus können aber auch andere myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen zu DC differenzieren [154]. Durch den Einsatz der Zytokine IL-4 (*Interleukin-4*) und GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) ist es möglich, humane periphere Monozyten *in vitro* zu myeloiden dendritischen Zellen differenzieren, welche die gleichen Oberflächenrezeptoren (MHC-I, -II, CD1, Fc γ RII, CD40, B7, CD44 und ICAM-1) wie *in vivo* vorkommende DC exprimieren [155]. Für die Generierung von BM-DC aus Knochenmark führt die Kultivierung in GM-CSF haltigem Medien zu einer Differenzierung von ungefähr 60 % der Zellen zu dendritischen Zellen [156].

Als APC haben DC die Aufgabe, Pathogene zu phagozytieren und dann diese über ihre MHCII-Komplexe T-Zellen zu präsentieren. Unreife DC migrieren durch periphere, nicht-lymphatische Gewebe. Sie weisen eine hohe endozytotische Aktivität auf [157]. Unreife DC tragen aufgrund der unterschiedlichen Funktion andere Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche als reife DC. Unreife DC exprimieren die Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und

CXCR1, deren Liganden in Entzündungsreaktionen produziert werden.

Über PR-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) wie TLR, NOD1, NOD2 oder MR werden verschiedenste Pathogene erkannt und die entsprechenden Signalwege initiiert. *In vitro* wird die Reifung von DC durch Zugabe von LPS allein oder von LPS in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ erzielt. Nach Pathogenkontakt produzieren DC inflammatorische Cytokine wie TypI oder TypII Interferone um weitere Leukozyten zu rekrutieren [158]. Darüber hinaus wird in den DC der Prozess der Reifung initiiert, Morphologie und Migrationsverhalten der DC ändern sich drastisch. Insbesondere kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 oder CD86 werden heraufreguliert, die phagozytotische Aktivität schwächt ab und die aufgenommenen Fremdproteine werden über die MHCII-Moleküle präsentiert. Die ausgespreitete, sehr adhärenente Morphologie unreifer DC und ihre schwache Motilität ändern sich zu einem hochmotilen schwach adhärentem Zelltyp mit deutlich ausgeprägten Lamellipodien. Auch Chemokin-Rezeptoren wie zum Beispiel CCR7 oder CXCR4, deren Liganden in lymphoiden Organen produziert werden [159], werden nun exprimiert. So sind die Zellen bereit, in die nächstgelegenen Lymphknoten zu migrieren, um dort als APC zu fungieren.

TLR-induzierte Signalwege Toll-like Rezeptoren (TLR) sind vor allem auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen zu finden und vermitteln Immunantworten der angeborenen Immunität. Als sogenannte "*Pattern recognition receptors*" (PRR) erkennen sie insbesondere konservierte Pathogenstrukturen (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) wie zum Beispiel die Bakterienzellwand-Komponente Lipopolysaccharid (LPS), einzelsträngige RNA oder CpG-DNA. TLRs, ob nun in der Plasmamembran vorliegend wie TLR4 oder aber endosomal vorliegend wie TLR9, aktivieren über Adapter-Proteine letztlich $\text{NF}\kappa\text{B}$. Toll-like-Rezeptoren zeichnen sich zum Einen durch N-terminale leucinreiche LRR-Sequenzen (*leucine rich repeats*) und zum Anderen durch die TIR-Domänen (*Toll/IL-1 R homology domain*) aus. An die TIR-Domänen können nach Rezeptor-Aktivierung Adapter-Moleküle binden, welche ebenfalls TIR-Domänen besitzen, so zum Beispiel MyD88, TRIF/TICAM-1 (*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β*), TIRAP/Mal, TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), und SARM (*Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*) [160, 161].

TLR-Signalwege lassen sich im Wesentlichen in zwei unterschiedliche Wege einteilen, abhängig von der Beteiligung der Adaptermoleküle MyD88 und TRIF. Über TRIF wird letztlich der Transkriptionsfaktor IRF3 aktiviert, über MyD88 erfolgt unter anderem die Initiierung der MAP-Kinasen Kaskade, welche in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 resultiert. Ein weiterer Weg führt über die Aktivierung der $\text{I}\kappa\text{K}$ Kinase IKK. Diese katalysiert die Phosphorylierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Inhibitors $\text{I}\kappa\text{B}$ und bewirkt dadurch die Kernlokalisation von $\text{NF}\kappa\text{B}$. Durch TLR-induzierte Signalwege wird im Wesentlichen die Expression von Genen für $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-12 und E-Selektin reguliert (zusammengefasst in [162]).

Dendritische Zellen zeigen eine besonders hohe TLR 4 Expression (zusammengefasst in [163]). Durch Bindung von LPS an TLR 4 kann sowohl der MyD88-abhängige als auch der

MyD88-unabhängige Signalweg die LPS-induzierte Reifung der DC auslösen [163, 161] .

1.3 Zielsetzung

Cytohesine sind kleine Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren für ARF-GTPasen. Sie sind in unterschiedliche Prozesse wie Zelladhäsion, Zellmigration, TCR-Signalwege oder Insulinstoffwechsel involviert und insbesondere in Immunzellen von Bedeutung. Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung von Cytohesin-1- und Cytohesin-4-Funktionen in dendritischen Zellen und T-Zellen.

Die Identifizierung von Cytohesin-1 als positivem Regulator der Zelladhäsion und Migration dendritischer Zellen erfolgte bislang durch die Analyse humaner Monozytengenerierter DC [23, 14]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von Cytohesin-1 auf die Zelladhäsion und Zellmigration muriner DC untersucht werden, und damit gleichzeitig im Hinblick auf die Analyse der genetischen Maus-Modelle Techniken zur Analyse muriner DC etabliert werden.

Für Cytohesin-4 ist bekannt, dass es Immunzell-spezifisch exprimiert wird [46], aber wesentliche Immunzell-Funktionen von Cytohesin-4 sind unbekannt. Für Cytohesin-4 sollten aus diesem Grund Funktionen in Zelladhäsion und Migration untersucht werden, sowie eine Beteiligung an TCR-Signalwegen, da für die Cytohesine-1 und -3 bekannt ist, dass sie regulatorische Funktionen in der T-Zell-Signaltransduktion haben [26, 45, 15, 24] und erste Hinweise in Jurkat-T-Zell-Studien nahe legen, dass Cytohesin-4 eine reprimierende Rolle in der TCR-Aktivierung spielt [15]. Zudem ist beschrieben, dass Cytohesin-3 positiv durch die PI3-Kinase reguliert wird [15], und das *Drosophila* Cytohesin *steppke* im Signalweg oberhalb der PI3-Kinase lokalisiert ist und einer transkriptionellen Regulation durch FoxO untersteht [16]. Inwieweit Cytohesin-4 in diesen Signalweg involviert ist, ist bislang ebenfalls nicht bekannt und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Für eine umfassende Funktionsanalyse von Proteinen sind genetische Modelle unverzichtbar. Da bisher weder für Cytohesin-1 noch für Cytohesin-4 “Knock-out”-Mäuse existieren, sollten in dieser Arbeit die entsprechenden genetischen Modelle zum konditionalen “Knock-out” in der Maus entworfen werden.

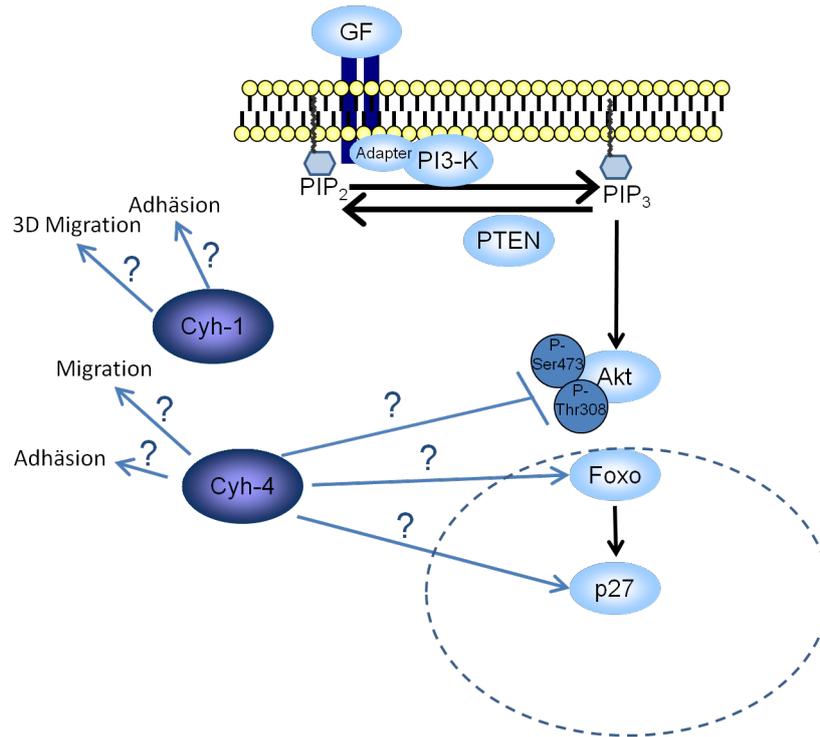


Abbildung 1.8: **Zielsetzung.** Für Cytohesin-4 sollen Funktionen in Zelladhäsion und Zellmigration sowie Funktionen in TCR- und Akt-Signalwegen untersucht werden. In murinen DC soll die Bedeutung von Cytohesin-1 für die komplexe Migration in dreidimensionalen Umgebungen und für die Zelladhäsion analysiert werden.

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)
Automacs pro Separator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Bakterien-Schüttler	VKS-75 control, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Durchflusszytometer (FACS)	BD CantoII, BD Biosciences (Heidelberg)
Drehrad	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Polymehr (Paderborn)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektroporator	GenePulser Xcell + CE-Modul, Biorad (München) Nucleofector I Elektroporator, Amaxa Biosystems (Basel) MicroPulser, Biorad (München)
Elektrowaage	JB2002-G, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Entwicklermaschine	SRX-101A, Konica Minolta (Langenhagen)
Feinwaage	AG285, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Heizplatte	ARE, VELP scientifica (Milan, Italy)
Hybridisierungs-ofen	Model 1012 Hybridization Oven Shel Lab (München)
Magnet-rührer	ARE, VELP scientifica (Usmate, Italien)
Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss (Jena) LASER-Scanning Mikroskop FV-1000, Olympus (Hamburg) Eclipse TE 2000, Nikon (Tokio, Japan) DMIL, Leica (Wetzlar) Nikon Eclipse TS 100
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy HT Multimode-Reader, BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Netzgeräte für Elektrophorese	Elite300Plus, Schütt Labortechnik (Göttingen)

Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Machine	Mycycler; Biorad (München)
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Photometer	Biophotometer, Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA) Eppendorf (Hamburg) ErgoLine, StarLab (Ahrensburg)
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro, Brand (Wertheim)
Präparierbesteck	FST (Heidelberg)
Protein-Minigel-Apparaturen	BioRad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München)
Realtime PCR Cycler	I-Cycler iQ5, Biorad (München)
Schüttelgerät	VKS-75 control, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Spektrophotometer	Nanodrop2000; Thermo (Braunschweig)
Sterilbank	Euroflow, Thermolife (Woerden, Niederlande) BDK (Sonnenbühl-Genzingen)
Vakuumpumpe	AC, HLC BioTech (Bovenden)
Vortexer	Zx3, VELP scientifica (Mailand, Italien)
Wärmeschrank	Binder (Tutlingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Wippe	WS-10, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Zellkulturinkubator	Binder (Great River, USA) Model 381, ThermoForma (Karlsruhe)
Zentrifugen	Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München) Centrifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg) Centrifuge 5810R, Eppendorf (Hamburg) Multifuge 4KR, Heraeus instrument GmbH (München) Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (München) Biofuge pico, Heraeus instrument GmbH (München) Biofuge fresco, Heraeus instrument GmbH (München)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	15 mm Roth (Karlsruhe)
Dentalwachs	Plano GmbH (Wetzlar)
Elektroporationsküvetten	4 mm, Biozym (Wien, Österreich) 2 mm, Amaxa biosystems (Köln)

FACS-Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Filterpapier Whatman Nr. 4	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filterspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
IBIDI-Kammern, μ -Slide I	ibidi GmbH, Integrated BioDiagnostics (München)
Kapillarspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Küvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnetic Beads	Dynal Biotech (Carlsbad, USA)
Mikrotiterplatten	96-Loch Nunc (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nylonmembran für Southern-Blotting	Amersham Hybond-N+, GE Healthcare (Freiburg)
Objektträger	76 x 26 mm Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
PCR-Reaktionsgefäße	200 μ l Thin Wall Tubes, Biorad (München)
Plastikpipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikspitzen	10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l Carl Roth (Karlsruhe)
Polypropylen-Reaktionsgefäße	0,5/1,5/2,0 ml, Starlab (Ahrensburg)
Q-PCR-Folie	Peqlab (Erlangen)
Q-PCR Platten	Peqlab (Erlangen)
Röntgenfilm	GE-Healthcare (Freiburg) Hyperfilm TM MP, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Spritzen und Kanülen	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter	0,2 μ m/0,45 μ m Schleicher & Schuell (Dassel)
Transwell Boyden-Kammer	(\varnothing 5 μ m) Costar, Corning Inc. (New York, NY, USA)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
UV-Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Vacuum-Filtrationssystem	Millipore (Schwalbach)
Verbandmull	Hartmann (Heidenheim)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturplastik	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
	BD Falcon (Heidelberg)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar	BD (Heidelberg)

Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA) (MP-Agarose) NuSieve™, Biozym (Wien, Österreich)
Ammoniumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Antipain	Sigma-Aldrich (Steinbach)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinbach)
ATP	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Steinbach)
1-Butanol	Merck (Darmstadt)
Bicinchoninsäure (BCA) -Kit	Thermo Scientific (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
CCL3 (Mip1 alpha) murin	Peptotech (Hamburg)
CCL19 (Mip3 beta) murin	Peptotech (Hamburg)
CDKII Inhibitor	Calbiochem (Darmstadt)
CFDA-SE	Invitrogen (Karlsruhe)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
CXCL12 (SDF1 alpha) human	Peptotech (Hamburg)
Cyclosporin A	Sigma (Taufkirchen)
DABCO	Sigma (Taufkirchen)
dCTP-PhosphoP32	Hartmann (Braunschweig)
Demecolcine Solution	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
λ-DNA/EcoRI + HindIII Marker Nr.3	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Ladepuffer 6x Loading Dye	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Ladepuffer mit Ficoll 6x	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTP-Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Elektrochemilumineszenz (ECL) -Kit	Thermo Scientific (USA)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	VWR (Frankreich)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fibronectin	Harbor Bio-Products, CellSystems (Norwood, USA)
Ficoll human (Pancoll)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Gelmount	Biotrend (Köln)
Giemsa	Fluka (Sigma)(Steinheim)
Glukose	Carl Roth (Karlsruhe)
2-Glycerolphosphat	Sigma (Taufkirchen)
Glykogen	Roche (Mannheim)

Gö6850 (PKC Inhibitor)	Calbiochem (Darmstadt)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Hot Start Real Time	Peqlab (Erlangen)
Hybridisierungspuffer	RapidHyb Amersham, GE Healthcare (Buckinghamshire)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
ICAM-1	Überstand aus CV1-Zell-Transfektionen
Igepal CA-630	Sigma Aldrich (Steinbach)
Ionomycin	Sigma Aldrich (Steinbach)
Janex1 (Jak Inhibitor)	Sigma (Taufkirchen)
Kollagen PureCol	INAMED Biomaterials (Fremont, USA)
Lachssperm-DNA	Sigma (Taufkirchen)
LB-Agar	Gibco (Eggenstein)
LB-Medium	Gibco (Eggenstein)
Leupeptin	Sigma Aldrich (Steinbach)
LY 294002 (PI3-Kinase Inhibitor)	Sigma (Taufkirchen)
MACS-Puffer	AutoMACS Running Buffer Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) AutoMACS Pro Washing Solution Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-Lysin	Sigma (Taufkirchen)
Phenol	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (Steinbach)
Precision Plus Protein All Blue Standard	BioRad (München)
Propidiumiodid (PI)	Fluka (Sigma)(Steinheim)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Quick Hyb Hybridisierungspuffer	Agilent (Böblingen)
Retinsäure	Sigma (Taufkirchen)
RibonukleaseA (RNase A)	Carl Roth (Karlsruhe)

Salzsäure (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Stat5 Inhibitor	Calbiochem (Darmstadt)
Tetracyclin	Roche (Mannheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIzol Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
UO126 (MAPKinasen Inhibitor)	Calbiochem (Darmstadt)
Wortmannin (PI3-Kinase Inhibitor)	Sigma (Taufkirchen)

2.1.4 Kommerzielle Reaktionssysteme

Human T-cell Nucleofector Kit	Amaxa Biosystems (Köln)
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare (Freiburg)
Megaprime DNA Labeling Kit	GE Healthcare (Freiburg)
Phusion TM High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
PCR-ExtractII	Macherey u. Nagel (Düren)
NucleoBond PC100 Midiprep Kit	Macherey u. Nagel (Düren)
RhoA oder Rac1 G-LISA TM	Cytoskeleton (Denver, USA) über Tebu-Bio (Offenbach)
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.5 Zellkultur-Puffer, - Medien -Seren und -Zusätze

Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma (Taufkirchen)
ES Cell qualified FCS	Invitrogen (Grand Island, USA)
Hank's balanced salt solution (HBSS)	PAA (Cölbe)
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA (Cölbe)
DMEM Low Glucose	PAA (Cölbe)
IMDM	PAA (Cölbe)
Knockout MEM	Gibco (Eggenstein)
OptiMem, phenolfrei	Gibco (Eggenstein)
RPMI 1640	Gibco (Eggenstein)
VLE-RPMI 1640	Biochrom (Berlin)

G-418 Sulfat	PAA (Cölbe)
Gelatine	Sigma (Taufkirchen)
Gentamycinsulfat	PAA (Cölbe)
L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe)
Trypsin-EDTA	PAA (Cölbe)

2.1.6 Puffer und Stammlösungen

10x PBS (pH 6.8)	1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 nM KH ₂ PO ₄
TAE Transferpuffer für Agarosegele	2 M Tris ,1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, A.bidest 1X TAE, Ethidiumbromid 1: 50.000, A.bidest
10x TE (pH 8.0)	100 ml Tris-HCl pH 8.0 (1 M Stock), 20 ml EDTA pH 8.0 (0.5 M Stock). Add. 1 l A.bidest, sterilfiltrieren
Tris-HCL (1 M; pH 9.5, 7.5):	60.57 g Tris in 400 ml A.bidest lösen, mit HCl auf den gewünschten pH-Wert einstellen, mit A.bidest auf 500 ml auffüllen, sterilfiltrieren und autoklavieren.
Puffer für die Proteinbiochemie: Igepal-Lyse-Puffer	10 mM Hepes, 10 mM KCl, 10 mM MgCl, 150 mM NaCl, 1 % Igepal
Kurz vor Gebrauch hinzufügen:	Aprotinin (20 mg/ml), Leupeptin (20 ng/ml), PMSF(1 M), Antipain (2 mg/ml), Benzamidin (1 M)
MRC-Lyse-Puffer(Tris- Triton)	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EGTA pH 8.0; 1 mM EDTA pH8.0; 10 mM Glycerolphosphat; 50 mM Natrium Fluorid; 5 mM Natrium Pyrophosphat; 1 mM Natrium-Vanadat; 0.27 M Sucrose/Saccharose; 1 % Triton; in Aliquots bei -20°C lagern
Kurz vor Gebrauch hinzufügen:	Aprotinin (20 mg/ml), Leupeptin (20 ng/ml), PMSF(1 M), Antipain (2 mg/ml), Benzamidin (1 M)

Laemmlipuffer	15.1 g Tris, 94 g Glycin, add. 900 ml A.bidest, 50 ml 10 % SDS, add. 11 A.bidest
SDS-Gel 5x Probenpuffer	1 M Tris/HCL (pH 6.8), 10 % SDS, 50 mg/l, Bromphenolblau, 86 % Glycerin, 1 M DTT
TBS-T (pH 7.5)	10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20
Westernblot	700 µl Mercaptoethanol, 20 ml 10 % SDS, 6.25 ml
Regenerations-Puffer	1 M Tris pH 6.7, add. 73 ml A.bidest

Lösungen für die Isolation genomischer DNA aus Zellen:

Heinz-Lysepuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM EDTA, 0.5 % SDS, 200 mM NaCl; add. 100 µg/ml Proteinase K frisch
------------------	---

Lösungen für

Southern-Blotting:

10 x TBE:	0.89 M Tris base, 0.89 M Borsäure , 8 mM EDTA pH 8, A.bidest
10 X Probenpuffer:	30 % Ficoll Typ 400, 0.1 M EDTA, 0.25 % , Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol, 0.25 % Orange G
20 X SSC:	175.3 g NaCl, 88.2 g Trisodiumcitrat in 800 ml A.bidest lösen, pH-Wert mit einigen Tropfen 6 M HCl auf 7.0 einstellen, add. 11 A.bidest
Depurinierungspuffer	0.25 M HCl
Denaturierungspuffer	0.5 M NaOH (20 g), 1.5 M NaCl (87.66 g), add 11 A.bidest

Alle Puffer für Southern-Blotting wurden anschließend autoklaviert.

HH-Puffer für den „Flow Assay“:	HBSS (ohne Ca^{2+} + Mg^{2+} von Gibco, Cat. No. 14175-053, 500 ml), 0.5 % BSA, 10 mM HEPES pH 7.4 (Gibco für Zellkultur), 2 mM Mg^{2+} , 2 mM Ca^{2+}
------------------------------------	---

2.1.7 Enzyme

DNaseI	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Peqlab (Erlangen)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot); New England Biolabs (Schwalbach); Roche (Mannheim)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Dream Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Triplmaster®PCR-Polymerase-Mix	Eppendorf (Hamburg)
Phusion™ High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)

2.1.8 Taqman-Sonden für die “Real-Time-PCR”

GAPDH	Hs01922876_u1
18s	Hs03928985_g1
Beta-2-Microglobulin	Hs00984230_m1
HPRT1	Hs01003267_m1
Cytohesin-1	Hs00245092_m1
Cytohesin-2	Hs00244669_m1
Cytohesin-3	Hs00188456_m1
Cytohesin-4	Hs00203581_m1
Foxo1	Hs00231106_m1
p27-Kip1 (CDKN1B)	Hs00153277_m1
PDPK1	Hs00176884_m1
mGAPDH	Mm99999915_g1
mCytohesin-1	Mm00441004_m1
mCytohesin-4	Mm00511435_m1

Alle Taqman Sonden wurden von Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA) bezogen.

2.1.9 siRNA Oligonukleotide

Zielgen	Zielsequenz der cDNA	Hersteller
Cytohesin-1 hs	5'-AATGACCTCACTCACACTTTCTT-3'	Dharmacon (Lafayette, USA)
Cytohesin-2 hs	5'-CCTGGCAGTGCTCCATGCT-3'	Dharmacon (Lafayette, USA)
Cytohesin-3_4 hs	5'-GGAAUCAUCCCGUUGGAAA-3' ?	Dharmacon (Lafayette, USA)
Cytohesin-4_5 hs	5'-CCACGAGTTCGCCAACCTCAA-3'	Qiagen (Hilden)
Cytohesin-1 mm	5'-AATGACCTCACACACACTTTC-3'	Dharmacon (Lafayette, USA)
Cytohesin-4 mm	5'-CCGGATGGCGCAGAAAGAGAA-3'	Qiagen (Hilden)

Fox01a_6 hs	5'-AACCAAGTAGCCTGTTATCAA-3'	Qiagen (Hilden)
Fox03_2 hs	5'-TCCAGAGTGCTTCCAGCATTA-3'	Qiagen (Hilden)
RhoA hs	5'-TAGGCTGTAACACTTTATAA-3'	Qiagen (Hilden)
	5'-TACCTTATAGTTACTGTGTAA-3'	Qiagen (Hilden)
RhoA mm	5'-TTGGATTTCCTAATACTGATA-3'	Qiagen (Hilden)
Renilla	5'-AAAAACATGCAGAAAATGCTGTT-3'	Dharmacon (Lafayette, USA)

2.1.10 PCR-Primer

Oligoname	5'→3'
Cyh-1 cko TK	
pscd1 cko H1 for	AGT AAA TAA ATG AAA GCT TCC CTT GTG TGG
pscd1 cko H1 rev	CAG ATA CTA TGA ATA GCA GAG CCA CG
pscd1 cko H2 for	AAG GAC TTT GTA CCT TTG GGG TTT GG
pscd1 cko H2 rev	GCT TTC TTA AGT GTG CAT CCA TCC
pscd1 cko C1 for	GTG TGT TGC ACA CCC TAT TCT TTT ACT TGC
pscd1 cko C1 rev	CAA AAT GAG CAG TAA AAG GGA CAG C
pscd1 cko C2 for	CAC AAC TGT CCA GCA ATA AGT GAA TGG
pscd1 cko C2 rev	AAT ACA ACA ATC CAC TTA GAG CCA GG
pscd1 cko S1 for new	TAG GAA GGA AGT GGT ATT GGT TCT CC
pscd1 cko S1 rev new	AGG GCT TGC ACC TTG TGT TAA GTC AG
pscd1 cko S2 for new	GGA GAG GTG AGG CCC TTA GAG C
pscd 1 cko S2 rev new	GAT GCT GAA CTC ATC CCT ACA GGA GAC
Umbau C2 neu, loxP näher 5'	
C2 neu loxP for	GCGGGG gaattc TAT ATA GAA CAG GCT GAC CTT GAG C
C2 neu loxP rev	GCGGGG aagctt ATA CAG AGT GGA CAG CAT AGA GGA G
Cyh-4 cko TK	
pscd4 H1 for	GGGG aagctt GAA GGC CAG GAA AGA AAA CC
pscd4 H1 rev	CCCC gaattc CTG AGG GTA CAG GGA CAT GG
pscd4 H2 for	GGGG gaattc TTC CTG TGC CTC AGT GTC TG
pscd4 H2 rev	CCCC ggatcc TTG TCC CAG TCC TGG TAA GG
pscd4 C1 for	GGGG gaattc GTT TAT GGA AGG GGA TGG TG
pscd4 C1 rev	CCCC aagctt CCA GAG CCT ACA ACC CTC CT
pscd4 C2 for	GGGG ggatcc CAG CCA TCC CTG TGG TTA CT
pscd4 C2 rev	CCCC aagctt CCC TGG TCA GAA TTC CTC TG

pscd4 3-Sonde for	GGGG gaattc CCT CTG AGA TAC AGC GGA GG
pscd4 3-Sonde rev	CCCC gaattc GCA GGA ACC TGT GTG GAG TT
pscd4 5-Sonde for	GGGG gaattc CCC TGG TCA TGG AAT TTT GT
pscd4 5-Sonde rev	CCCC gaattc CCA CAG GCA TCT CAT TGC TA
Screening	
pscd1 scr P1 for	AGG GAG CAA GAT GAC CTT AGA AAG C
pscd4 screen for	TGT CAC ACA GGT AAG CGA TAG G
PGK rev	GGA TGT GGA ATG TGT GCG AGG CCA G
neo rev	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA AT
pscd3 screen rev	GGG GAA CTT CCT GAC TAG GG
PTEN-Klonierung	
hs PTEN Mlu for	GCGGGG acgctg ATG ACA GCC ATC ATC AAA GAG
hs PTEN Not rev	GCGGGG gcgccgc TTT ATC AGA CTT TTG TAA TTT GTG TAT GC
Primer zur Klonierung der Triglycin-Region in murinen BM-DC	
mm EcoRI get the g for	GCGGGG gaattc CAT CGC CAT GAA CCG AGG CAT C
mm EcoRI get the g rev	GCGGGG gaattc TGA GAT GCG GTA CAC AGT GTG G

2.1.11 Klonierungsvektoren

Bezeichnung	Größe	Resistenz	Quelle/Referenz
pBlue KSII	2.961 kb	Ampicillin	Fermentas
pBACe3.6 pscd4 (bMQ-305J8)	188 kb	Chloramphenicol	Invitrogen
pBACe3.6 pscd1 (bMQ-129S7AB2)	ca. 230 kb	Chloramphenicol	Invitrogen
PCR [®] -XL-TOPO	3.5 kb	Kanamycin/Zeocin	Invitrogen
pRK5 Flag	3 kb	Ampicillin	Kolanus
pN1-GFP	3 kb	Kanamycin	Kolanus
pL451	4.8 kb	Ampicillin, Kanamycin	Liu et al. 2003 [164]
pL452	4.8 kb	Ampicillin, Kanamycin	Liu et al. 2003 [164]
DTA	4.1 kb	Ampicillin	zur Verfügung gestellt von Dr. J. Degen, LIMES, Universität Bonn

Für Überexpressions-Analysen wurden folgende cDNAs im pRK5 Flag beziehungsweise pN1-GFP verwendet:

Cytohesin-1, Cytohesin-2, Cytohesin-3, Cytohesin-4, PTEN

Die Konstrukte sind so kloniert, dass das Flag- beziehungsweise GFP-Tag aminoterminal am Zielprotein exprimiert wird.

2.1.12 Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α -Actin	Kaninchen	1:1000 (WB)	Sigma Aldrich (Steinbach)
α -CD3 (Klon Okt3)	Maus	5 μ g/ml (Stimulation)	aufgereinigter Überstand
α -Cytohesin-1 (7H2)	Ratte	1:20 (WB)	E. Kremmer (München)
α -Cytohesin-3 (8B4)	Ratte	1:20 (WB)	E. Kremmer (München)
α -Cytohesin-4 (5B8)	Ratte	1:20 (WB)	E. Kremmer (München)
α -Cytohesin-1 murin (2D7)	Ratte	1:20 (WB)	E. Kremmer (München)
α -Cytohesin-4 murin (4B6)	Ratte	1:20 (WB)	E. Kremmer (München)
α -phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling (Schwalbach)
α -phospho-Akt (Thr308)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling (Schwalbach)
α -RhoA (26C4)	Maus	1:1000 (WB)	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
α -phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling (Schwalbach)
α -total-p38	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling (Schwalbach)
α -phospho Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -total Erk	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -Fox01 (C29Ha)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -Fox03a	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -phospho-SAP/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -PTEN (138G6)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -p27 kip1(D69C12)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signalling (USA)
α -Flag	Maus	1:5000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
α -human IgG	Ziege	1:100 (Beschichtung)	Dianova (Hamburg)
FITC anti-Maus CD80 (16-10A1)	Ratte	1:200 (FACS)	ebioscience (USA)
PE anti-Maus CD86 (GL-1)	Ratte	1:200 (FACS)	ebioscience (USA)
FITC anti-Maus MHCII (I-A/I-E) (2G9)	Ratte	1:200 (FACS)	ebioscience (USA)
APC anti-Maus CD11c (N418)	Armenian	1:200 (FACS)	ebioscience (USA)
	Hamster		
anti-Human CD86 (IT2.2)	Maus	1:200 (FACS)	ebioscience (USA)

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
HRP α -Kaninchen-IgG (B1711)	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
HRP α -Ratte-IgG (G2309)	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
HRP α -Maus-IgG (F0710)	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
FITC α -Maus-IgG	Schaf	1:200 (FACS)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
AlexaFluor 488 α -Maus-IgG	Ziege	1:200 (FACS)	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.13 Längenstandards

DNA-Längenstandard

- Lambda DNA/HindIII, Marker 2 (A) - Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3 (B)

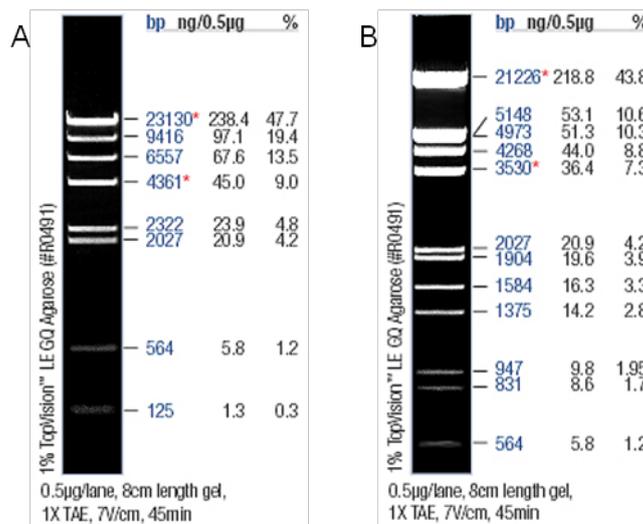


Abbildung 2.1: DNA-Längenstandard (Fermentas)

Protein-Größenstandard

- Precision Plus Protein All Blue standard, BioRad (München)

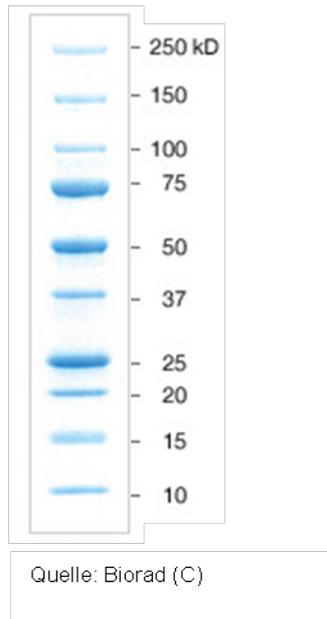


Abbildung 2.2: Protein-Größenstandard (Biorad)

2.1.14 Organismen

E. coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	endA1,hsdR17($r_x^- m_x^+$),supE44,thi1,recA1,gyrA, (Nal ^y),relA1	[165]
MC1061	araD139, Δ (ara-leu)7696,galE15,galK16, Δ (lac) _{X74} , rpsL(Str ^y)hsdRR2($m_x^- m_x^-$),mcrA,mcrB	[166]
DH10B	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 endA1 ara139 (ara, leu)7697 galU galK - rpsL (StrR ^R) nupG	[167]
SW102	Δ galK, ursprünglich aus DY380	[168]
SW106	Δ galK, DY380 (cro-bioA) $\langle \rangle$ araC-PBAD Cre	[168]

Säugetier-Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Jurkat E6.1	humane T-Zell-Linie eines Patienten mit akuter Leukämie	[169]
HeLa	humane Epithel-Zell-Linie einer Patientin mit Cervical-Krebs	[170]
E14	murine embryonale Stammzellen, 129P2/Ola Hintergrund	[171]
IB 10	murine embryonale Stammzellen, 129P2/Ola Hintergrund, Subklon von E14	[172]
bEnd5	murine Endothel-Zell-Linie aus dem Gefäßsystem des cerebralen Cortex von Balb/c Mäusen	[173]

Primäre Zellen

Aus Lymphozytenkonzentraten (*Buffy coats*; bezogen von dem Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn), konnten sowohl Lymphozyten als auch CD4⁺ T-Zellen gewonnen werden. Primäre murine Zellen wurden aus Knochenmark oder Milzen von C57BL/6 Mäusen (Charles River) gewonnen. Die primären Zellen für den T-Zell-DC Adhäsionsversuch wurden aus transgenen OTI-Mäusen (AG Kurts; Bonn) gewonnen.

2.1.15 Software

Software	Hersteller	Funktion
ApE	M. Wayne Davis	Analyse von: Plasmidkarten Sequenzierungsdaten
Excel	Microsoft	Tabellenkalkulation, Grafikerstellung
FACS Diva	BD	FACS-Daten Analyse
FlowJo	Tree Star	FACS-Daten Analyse
Illustrator	Adobe	Grafikerstellung
Image J	Wayne Rasband	Analyse von Migrationsassays
Lyx	Open source	Textverarbeitung
Paint	Microsoft	Grafikerstellung
PowerPoint	Microsoft	Grafikerstellung
Prism	Graphpad	Grafikerstellung, Statistischeauswertung
NIS Elements	Nikon	Mikroskopie
Vector NTI	Invitrogen	Analyse von Plasmidkarten Sequenzierdaten
WinMDI	Joe Trotter	FACS-Daten Analyse

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Die verwendeten *E.coli* Bakterienstämme DH5 α , MC1061, SW102 und SW106 wurden in LB-Medium kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C (SW-Stämme: 30 °C) mit 150 rpm für 16 h geschüttelt. Je nach eingebrachtem Resistenzgen wurden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion auf Agarplatten oder in den Flüssigkulturen eingesetzt. Folgende Antibiotika wurden verwendet: Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Chloramphenicol 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zur langfristigen Lagerung wurden 4 ml Bakterienkultur mit 8 % Glycerol versetzt, 16 h kultiviert und dann zu je 1 ml Aliquots bei -80 °C in Schraubdeckelgefäßen als Glycerolstocks gelagert.

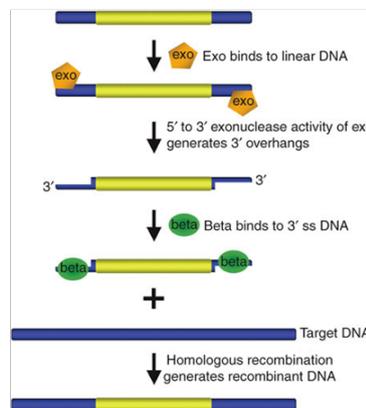
2.2.2 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Die *in vivo* Amplifikation gewünschter Plasmide erfolgte in chemisch- oder elektrokompenten *E.coli* Stämmen, wie z.B. MC1061, DH5 α oder SW102. Hierfür wurden 100 μl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 μl des Ligations-Ansatzes versetzt und für 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit kann die DNA an die Bakterienzellwand binden. Bei der chemischen Transformation werden die Bakterien mittels Hitzeschock für die DNA durchlässig gemacht. Dieser erfolgt bei 42 °C für

30 Sekunden. Bei der Elektroporation wurden die Bakterien in eine 2- μ m Küvette überführt und bei 2,5 kV mit dem BioRad Protokoll EC2 elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium überführt und für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Kultur erfolgt auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht. Die Transfektion der SW102 und SW106 Stämme erfolgte wie unter 2.2.3 „Recombineering“ beschrieben.

2.2.3 Klonierung großer DNA-Fragmente mittels „Recombineering“

Zur Klonierung sehr großer DNA-Fragmente für die Homologiebereiche der Targeting-Vektoren wurde die Methode der homologen Rekombination in Bakterien verwendet [174]. Vorteil dieser Methode ist das Restriktionsschnittstellen-unabhängige Gewinnen großer DNA-Bereiche. Als primäre genomische DNA-Quelle wurden „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) Klone verwendet. Das Prinzip der homologen Rekombination in Bakterien (auch „Recombineering“, für Recombination-mediated genetic engineering) beruht auf drei Phagen-Genen, die stabil in das *E. coli* Genom der Stämme SW102 und SW106 inseriert wurden und dort unter induzierbaren Promotoren die homologe Rekombination steuern können. Das Phagen-Gen *exo* codiert eine 5'-> 3' Exonuclease, die an linearisierte DNA-Enden bindet und einzelsträngige Überhänge produziert. Das Gen *bet* codiert ein „capping“ Protein, welches die einzelsträngigen Überhänge schützt und den Rekombinationsvorgang mit unterstützt. *Gam* codiert für einen Inhibitor der *E. coli* Proteine RecBCD und verhindert damit einen Abbau der eingebrachten linearisierten DNA [174].



(Quelle: Sharan *et al.*, Nature Protocols 2009)

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des „Recombineering“: Die beiden Phagen-codierten Proteine *Exo* und *Bet* katalysieren den Prozess der homologen Rekombination durch Bindung an einzelsträngige DNA. (Quelle: Sharan *et al.*, Nature Protocols, 2009)

Diese drei Gene liegen alle unter der Kontrolle eines Hitze-induzierbaren Promotors. Um ungewollte Rekombinationsereignisse zu vermeiden, wurden die entsprechenden Bakterienstämme bei 30 °C kultiviert. Da *Exo* und *Bet* nur an linearisierte DNA binden, wurden für die Versuche entsprechend restringierte DNA-Fragmente in die Bakterien eingebracht. Für den Rekombinationsprozess wurden 70 ml LB₀ mit 700 μ l einer 4 ml Bakterien-Über

Nacht-Kultur inokuliert und bei 30 °C und 165 rpm bis zu einer $OD_{600}=0.4$ kultiviert. Zur Induktion der Rekombinationsgene wurden 60 ml der SW102-Kultur für 15 Minuten im 42 °C-Wasserbad geschwenkt und anschließend für 10 Minuten im Eisbad abgekühlt. 10 ml wurden als nicht-induzierte Kontrolle weiterverwendet. Anschließend wurden die Zellen über mehrere Wasch-Schritte mit eiskaltem A.bidest elektrokompent gemacht. Hierzu wurden die Zellen pro 10 ml Kultur mit je 10 ml eiskaltem A.bidest gewaschen (dreimal bei 4000 rpm im vorgekühlten Rotor), dann dreimal in je 1 ml in Eppendorf-Gefäßen gewaschen und schließlich in 200 µl A.bidest für die Transformation aufgenommen. 1-100 ng linearisierte DNA wurde in vorgekühlte 2 mm Küvetten vorgelegt, mit 200 µl Bakterien-Suspension versetzt und bei 2.5 kV elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien sofort in vorgewärmtes SOC-Medium überführt und bei 30 °C für eine Stunde bei 165 rpm ohne Selektionsdruck inkubiert. Die anschließende Selektion erfolgte auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten bei 30 °C für 16-24 Stunden. Die Induktion der *Cre*-Aktivität der SW106-Stämme wurde durch den Zusatz von 0.1 % Arabinose erzielt. Bei einer $OD_{600}=0.4$ wurden die Zellen mit frisch angesetzter Arabinose versetzt und für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert und anschließend je nach Bedarf wie beschrieben kompetent gemacht oder in eingengtem Volumen auf die entsprechenden Selektionsnährböden plattiert und bei 30 °C für 16 Stunden kultiviert.

2.2.4 Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Zur schnellen Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien-Kulturen für analytische Zwecke wurden sogenannte DNA-Minipräparationen durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Zellen und der Fällung der DNA nach vorheriger Phenol-Chloroform Behandlung zur Extraktion der Proteine. 4 ml der Übernacht-Kulturen wurden zunächst in zwei Schritten in 2 ml-Reaktionsgefäßen pelletiert (5 min bei 11.400 x g). Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung I resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 400 µl Lösung II unter mehrfachem Invertieren des Eppendorf-Gefäßes. Durch Zugabe von 300 µl Lösung III wurde das Lysat neutralisiert. Anschließend wurden die Proben bei 11.400 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer und wässrige (DNA-haltige) Phase voneinander zu trennen. Die wässrige Phase wurde mit 300 µl Phenol-Chloroform (1:1) gründlich auf dem Vortexer vermischt, um Proteine aus der Lösung zu fällen. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min; 11.400 x g) befand sich die DNA in der oberen wässrigen Phase. Diese wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem 1.2 fachen Volumen Isopropanol versetzt und gründlich gemischt, um die DNA auszufällen. Diese wurde bei 11.400 x g für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet 10 Minuten bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet je nach Größe in 50-75 µl A.bidest oder TE-Puffer unter Zugabe von 0.5 µl RNase A resuspendiert.

Lösung I	Lösung II	Lösung III
pH 8	pH 13	pH 5
10 mM EDTA	200 mM NaOH	2,5 M KAc
50 mM Glukose	1 % (v/v) SDS	2,5 M HAc
25 mM Tris/HCl		

2.2.5 Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Midi-Präparation)

Die Bakterien wurden wie in 2.2.1 kultiviert und pelletiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über alkalische Lyse mit dem Midi-Kit NucleoBond PC100 nach den Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel). Die RNA wurde bereits im ersten Schritt durch die im Puffer I enthaltene RNase degradiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer mittels Zentrifugation (10 min, 11.400 x g, RT) wurde der DNA-haltige Überstand auf eine Säule aufgetragen, die über eine Silika-Membran die negativ-geladene DNA bindet. Die folgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 6800 x g für je 5 Minuten durchgeführt. Nach Bindung der DNA wurden 4 ml eines ethanolhaltigen Puffers zum Waschen der DNA über die Säule gegeben. Die DNA wurde mit 5 ml A.bidest oder TE-Puffer eluiert und anschließend mit Isopropanol gefällt (30 min, 11.400 x g) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 200-700 µl A.bidest aufgenommen.

2.2.6 Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)

Um große und besonders reine Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde die DNA über einen Cäsiumchlorid (CsCl)-Gradienten aufgereinigt. Die Zentrifugation im CsCl-Gradienten bewirkt eine Trennung von DNA-Molekülen, die trotz identischer Molekülmassen große Dichteunterschiede aufweisen, da sie abhängig von ihrem Spiralisierungszustand unterschiedliche Mengen des zugesetzten Ethidiumbromids aufnehmen. Ein Liter Bakterien-Übernacht-Kultur wurde bei 4.000 x g 20 Minuten pelletiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in der Minipräparation (2.2.4). Es wurden 40 ml Lösung I zum Resuspendieren des Pellets verwendet, 80 ml Lösung II zur Lyse und 40 ml Lösung III zur Neutralisation. Die Zelltrümmer wurden durch 10 minütige Zentrifugation (4.000 x g) vom Plasmid-haltigen Überstand getrennt. Der Überstand wurde mit dem 1.2fachen Volumen Isopropanol unter kräftigem Schütteln vermischt, um die DNA zu fällen. Diese wurde durch Zentrifugation bei 4.000 x g pelletiert und nach einmaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol in 4 ml Lösung I resuspendiert. Hierzu wurden 5.5 g Cäsiumchlorid, 100 µl Igepal (10 %) und 500 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und im Wasserbad für fünf Minuten inkubiert, um das Cäsiumchlorid zu lösen. Anschließend wurde die Lösung kurz abzentrifugiert, um feste Bestandteile abzutrennen. Die klare Phase wurde in ein Beckman QuickSeal Ultrazentrifugengefäß überführt. Dieses wurde anschließend luftblasenfrei verschweißt. Die Probe wurde nun bei 80.000 rpm für 3.5 h (beziehungsweise bei 55.000 rpm über Nacht) zentrifugiert. Dabei sollte die Temperatur während der Zentrifugation nicht unter 25 °C liegen, um ein Ausfallen des Cäsiumchlorids und somit eine

Zerstörung des Gradienten zu verhindern. Die Trennung von chromosomaler und Plasmid-DNA erfolgt während der Zentrifugation in Gegenwart von Ethidiumbromid. Dieses interkaliert in doppelsträngige DNA, wobei die geschlossene ringförmige Form weniger Ethidiumbromid aufnehmen kann als lineare DNA oder relaxierte Plasmide. Daraus ergibt sich ein Unterschied in der Dichte der Moleküle, der eine Auftrennung im Gradienten ermöglicht. Protein-Ethidiumbromid-Komplexe haben eine wesentlich geringere Dichte als die einzelnen DNA-Ethidiumbromid-Komplexe, so dass die Proteinbanden sehr weit oben im Gradienten bleiben. RNA-Ethidiumbromid-Komplexe zeigen eine deutlich größere Dichte als die maximale Dichte des Gradienten, so dass diese Komplexe am Boden oder am Rand des Zentrifugengefäßes pelletieren. Die Plasmidbande wurde mittels einer Kanüle abgezogen, in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit je 10 ml wassergesättigtem Butanol gewaschen, um das Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen 1 M Ammoniumacetat und 1.2-fachem Volumen 96 %igem Ethanol gefällt. Die DNA wurde pelletiert, einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Pelletgröße in 200-600 µl A.bidest oder TE-Puffer gelöst.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA, Plasmid-DNA oder von RNA wurde entweder ein Eppendorf Photometer entsprechend Hersteller-Protokoll benutzt (UV-Absorption) oder ein NANODROP Spektrometer der Firma Thermo. Dabei wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Hierzu wurde eine 1:50 Verdünnung der DNA-Lösung in A.bidest hergestellt und in eine Küvette überführt. Es gilt, dass bei einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml die gemessene Extinktion bei 260 nm=1 ist; so kann das Gerät die DNA-Konzentration unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnung und des Hintergrunds (Blank) direkt berechnen. Das Verhältnis der Extinktionen 260/280 ist ein direktes Maß für die Reinheit der DNA-Lösung. Dabei ist ein Relationswert von 1.8 oder größer ein Zeichen für eine proteinfreie, reine DNA-Lösung. Für die Messung im Nanodrop wurde 1 µl unverdünnte DNA oder RNA eingesetzt. Zudem wurden Mengenabschätzungen auch durch Auftragen von 1 µl DNA auf 1 % Agarose und Vergleich mit mitlaufendem Standard definierter Konzentration vorgenommen.

2.2.8 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA bewirkt eine erhöhte Reinheit, die zum Beispiel für Klonierungen oder Sequenzierungen nötig ist. Der Ansatz wurde mit A.bidest auf ein Volumen von 400 µl gebracht und dann mit 0.75-fachem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gut durchmischt, um enthaltenes Protein zu extrahieren. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 11.000 x g wurde die obere (DNA-haltige) Phase mit 0.1-fachem Volumen 3 M Natriumacetat, 1.2-fachem Volumen 96 %igem Ethanol und 1 µl Glycogen ausgefällt. Dabei entziehen das eingesetzte Salz und der Alkohol der DNA die Hydrathülle, so dass sie präzipitiert. Das Glycogen sorgt während der folgenden Zentrifugation (10 min bei 11.000 x g) für eine

stärkere Konzentrierung der DNA im Pellet und macht dieses später sichtbarer. Das Pellet wird ein- bis zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und kann anschließend in A.bidest oder TE-Puffer resuspendiert werden.

2.2.9 Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerasekettenreaktionen (polymerase chain reactions, PCRs) wurden sowohl für die Klonierung gewünschter DNA-Abschnitte verwendet, als auch zum sogenannten "Screening" von ES-Zell Klonen eingesetzt. In beiden Fällen wurde der gewünschte DNA Abschnitt durch ungefähr 20-25 bp lange Oligonukleotide (Primer) flankiert. Die Primer hybridisieren an den komplementären Einzelsträngen und bilden so den doppelsträngigen Startpunkt für die Polymerase. Während der Reaktion folgen wiederholt Denaturierungs-, Anlagerungs- und Elongationsschritte hintereinander. Zunächst wird die Matrizen-DNA bei einer Temperatur von mindestens 95 °C reversibel denaturiert. Darauf folgt die spezifische Bindung der Primer bei einer Anlagerungs-Temperatur, die abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer zwischen 50 °C und 68 °C liegt. Anschließend erfolgt, je nach verwendeter Polymerase, bei 68 °C bis 72 °C die Elongation der Primer an ihrem 3'-OH-Ende durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Durch die Wiederholung des Zyklus ergibt sich eine exponentielle Anreicherung der zwischen den Primern gelegenen Matrizen-DNA. Zur Amplifikation wurde in den meisten Fällen die Phusion Taq Polymerase gemäß den Hersteller-Angaben verwendet. Bei PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als Matrize wurden zusätzlich 3 % DMSO in den Ansatz gegeben. Exemplarischer Ansatz einer PCR mit Phusion Taq Polymerase (NEB): 100-200 ng Matrizen-DNA, 4 µl 5x Puffer, 1.5 µl Mg-Cl, 1 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl Primer for (25 pM), 0.5 µl Primer rev (0.25 pM), 0.2 µl Phusion Taq Polymerase, add. 20 µl A.bidest. Exemplarisches Programm einer Standard PCR mit Phusion Taq Polymerase (NEB):

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Vordenaturierung	98 °C	3 min	1x
Denaturierung	98 °C	30 s	30x
Anlagerung der Oligonukleotide	54-68 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Endsynthese	72 °C	10 min	1x

Für Klonierungszwecke wurden in den Primern Restriktionssequenzen und Bindestellen für Restriktasen mit codiert. Die Analyse der PCRs erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Die "Screening"-PCRs für Cytohesin-4 Klone erfolgten mit Dream Taq (Fermentas). Als Matrize wurden 1.5 µl genomische DNA eingesetzt, 2 µl Puffer, je 1 µl Vorwärts- (pscd4 screen for) und Revers "Primer" (pscd3 screen rev), 2 µl 10 mM dNTPs, 0.8 µl DMSO und 0.25 µl DreamTaq in einem 20 µl Ansatz. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 93 °C für

3 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 30 s bei 93 °C, 30 s bei 64 °C und 1 min bei 72 °C und der finalen Elongation bei 72 °C für 10 min.

2.2.10 Klonierung (Restriktion, Dephosphorylierung, Auffüllen von Überhängen und Ligation von DNA-Fragmenten)

Zur Klonierung und zur Überprüfung von Klonierungsprodukten wurde PCR- oder Plasmid-DNA mit Restriktions-Enzymen spezifisch geschnitten. Für die Klonierung entstehen so komplementäre Schnittstellen, die dann in der Ligation miteinander verbunden werden können. Für die Restriktion von Plasmiden wurden für analytische Restriktionen 1 µg DNA eingesetzt, für Klonierungen 3-5 µg DNA. 10 Einheiten (units) des entsprechenden Restriktionsenzym wurden mit dem korrespondierenden 10x Puffer und A.bidest auf ein Volumen von 20-30 µl gebracht und für 1-3 h bei entsprechender Optimum-Temperatur inkubiert. Eine Inaktivierung der Restriktasen ist über Hitze-Inaktivierung möglich. Um eine Religation des geschnittenen Vektors mit sich selbst zu verringern, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen enzymatisch entfernt. Insbesondere bei ungerichteten Klonierungen, bei denen der Vektor mit nur einem Enzym geschnitten wurde und somit zueinander komplementäre „sticky ends“ aufweist, wird so der Anteil an religierten Vektoren ohne Insert in der Klonierung verringert. Zu einem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz wurde 0.1 faches Volumen Phosphatasepuffer, 1 µl der Shrimp Alkaline Phosphatase (1 u/µl) und A.bidest zugegeben. Der Ansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65 °C für 15 min inaktiviert. Auffüllen von 3'- oder 5'- Überhängen: Nicht jede Klonierungsstrategie für komplexe Konstrukte kann mit komplementären Ligationen gelöst werden. Um Fragmente zu klonieren, die nicht komplementäre Schnittstellen zueinander aufweisen, wurden diese zunächst aufgefüllt und dann anschließend „blunt“, also ohne Überhang kloniert. Hierzu wurden die 5'-' oder 3'-Enden mit Phusion Taq oder Klenow Enzym unter Zugabe von 2 mM dNTPs aufgefüllt. Der Vorgang erfolgte für 10-30 min bei entsprechender Optimum-Temperatur des Enzyms. Die Insertion eines DNA-Fragments, z.B. eines PCR-Produkts oder eines Inserts aus einer Subklonierung, kann entweder gerichtet oder zufällig erfolgen. Für eine directionale Klonierung ist ein vorheriger Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen notwendig. Bei einer ungerichteten Klonierung durch Schneiden mit nur einem Enzym gibt es zwei Möglichkeiten der Orientierung des Inserts. Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit einer „blunt“-Klonierung, bei der weder Vektor noch Insert Überhänge haben und so ebenfalls ungerichtet ligiert werden können. Die Reaktion erfolgte in ATP-haltigem Ligase-Puffer und wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym knüpft eine neue Phosphodiester-Bindung zwischen einem freien 3'-Hydroxylende und einem 5'-Phosphat-Ende. Die Ligation erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht. Ein Parallelansatz ohne PCR-Produkt beziehungsweise Insert-DNA diente zur Bestimmung des Verhältnisses von erfolgreicher Klonierung des Inserts zur Religation des Vektors.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter Plasmide und PCR-Produkte erfolgte durch die Firma GATC, Konstanz. Die zu sequenzierende DNA wurde entsprechend den Anforderungen des Unternehmens aufbereitet und verschickt.

2.2.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Überprüfung von Restriktionsanalysen, PCR-Produkten, der Mengenabschätzung von DNA sowie der Auftrennung genomischer DNA für Southern-Blot Analysen angewendet. Die DNA wandert aufgrund ihrer negativ-geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode. Je nach Fragmentgröße der DNA wurde ein Agarosegel mit einer Prozentigkeit von 0.7-2.0 % verwendet, in welchem die DNA-Fragmente mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl ihrer Basenpaare wandern und somit ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Visualisierung wird durch Zusatz von Ethidiumbromid im Gel und im Laufpuffer ermöglicht. Unter Anregung von UV-Licht (250-310 nm) wird die Interkalation des Ethidiumbromid in die DNA-Doppelhelix zur Fluoreszenz gebracht und somit sichtbar. Durch den Vergleich eines zusätzlich auf dem Gel aufgetragenen Längenstandards kann eine Größenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgen. DNA-Proben wurden vor dem Gel-Lauf mit 6x Ladepuffer versetzt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe des Gels zwischen 70-120 Volt bei konstanter Spannung. Die Elektrophorese für Southern-Blots wird in Abschnitt 2.2.15 beschrieben.

2.2.13 Elution von DNA aus Agarosegelen mittels kommerzieller Säulchen

Für die Isolation von Restriktionsfragmenten für nachfolgende Klonierungen oder für die Aufreinigung von Sonden für den Southern-Blot wurden DNA-Fragmente nach erfolgter Gel-Elektrophorese mit einem Skalpell herausgeschnitten und mittels PCRII-Gel-Elutions-Kit gemäß den Hersteller-Angaben eluiert.

2.2.14 Isolation genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolation genomischer DNA wurden ES-Zellen aus 6-Loch-Platten geerntet, pelletiert und in 500 µl Heinz-Lysepuffer resuspendiert und bei 37-55 °C für mindestens eine Stunde lysiert. Anschließend wurde die genomische DNA mit zweifachem Volumen Isopropanol gefällt. Hierzu wurde das Eppendorf-Gefäß mehrfach vorsichtig invertiert und die Probe anschließend bei 16.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30-100 µl TE bei 55 °C gelöst.

2.2.15 DNA-Hybridisierung nach Southern ("Southern Blotting")

Zur Überprüfung der korrekten homologen Rekombination des Targeting-Konstruktes in das ES-Zell Genom wurden DNA-Hybridisierungen nach Southern durchgeführt („Southern

Blotting“). Die positive und korrekte Insertion des Targeting-Vektors wurde mittels spezifischer Restriktionsstrategien überprüft. Durch Einbringen oder Zerstören von Schnittstellen in der targetierten Region ändern sich die DNA-Fragment Größen und geben so Aufschluss über den entsprechenden Gen-Lokus. Das Prinzip beruht auf einer Detektion (radioaktiv-) markierter DNA-Einzelstrang-Sonden, welche mit der membrangebundenen DNA hybridisieren. Die dafür verwendete genomische DNA wird entsprechend mit Restriktasen verdaut und später zu einzelsträngiger DNA denaturiert, bevor sie auf die Membran transferiert wird. Für die Restriktion wurden 8-20 µg genomische DNA (isoliert wie in 2.2.14 beschrieben) mit 60 u Restriktionsenzym bei entsprechender Optimum-Temperatur über Nacht inkubiert. Nach zwei Stunden wurden nochmals 10 u Enzym mit entsprechendem Puffervolumen nachgegeben, um einen möglichst vollständigen Verdau der DNA zu erzielen. Die Konzentration eingesetzter Plasmid-DNA im Southern lag bei 1-10 ng. Das Endvolumen der Restriktionsansätze lag bei 70 µl. Die Restriktionen wurden mit je 7 µl Ladepuffer und 1 µl 20 % SDS abgestoppt und für fünf Minuten bei 70 °C erhitzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in 0.7%igen Agarosegelen aufgetrennt. Bei großen Gelen lag die Laufzeit mit 30 Volt bei ungefähr 16 Stunden. Die Auftrennung erfolgte in Ethidiumbromid-haltigem TBE-Puffer. Der Gel-Lauf wurde bei 70 %iger UV-Stärke und angelegtem Zentimetermaß dokumentiert. Die Agarosegele wurden anschließend zwecks Depurinierung für 8 Minuten in einer 0.25 molaren HCL-Lösung inkubiert und anschließend kurz mit A.bidest gespült. Danach erfolgte in basischem pH-Bereich (0.5 M NaOH/1.5 M NaCl) (zweimal 15 Minuten unter Wippen) die Denaturierung der aufgetrennten DNA in Einzelstränge um die Hybridisierung komplementärer Sonden zu ermöglichen. Der pH-Wert der Gele wurde mittels 0.5 M Tris[pH 7.5]/1.5 M NaCl wieder neutralisiert (zweimal 15 Minuten unter Wippen). Zum Aufbau des Kapillarblots wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine Filterbrücke und zwei zusätzliche Lagen aus Whatman Papier gelegt. Die positiv-geladene Nylonmembran (Hybond N⁺) wurde passgenau darauf platziert. Drei weitere in 20 x SSC getränkte Whatman Papiere wurden luftblasenfrei darüber gelegt. Die Kapillarwirkung wurde durch einen Stapel Papiertücher erzielt, welche mit einem Gewicht von ungefähr 200-400 g beschwert wurden. Der Transfer erfolgte für mindestens 18 Stunden. Die Geltaschen wurden nach erfolgtem Transfer mit Bleistift auf der Membran gekennzeichnet und die Membran zur abschließenden DNA-Fixierung bei 80 °C für 1 Stunde gebacken.

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte in Glasröhren unter Rotation bei 68 °C mit Quick-Hyb Puffer (Agilent) oder Hybridisierungspuffer (2 ml 20xSSC, 1 ml 5 % Milchpulver, 1 ml 5 % SDS, 1 ml Lachsperm-DNA [10 mg/ml], 5 ml A.bidest). Dieser Puffer enthält zum Blocken unspezifischer Bindungen einzelsträngige Lachs-Sperm DNA. Die DNA-Sonden wurden entweder mittels PCR generiert oder aus Plasmiden mittels Restriktion herausgetrennt und über kommerzielle Gel-Elutions-Säulchen nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt und mit A.bidest eluiert. Die Konzentrationsbestimmung so gewonnener linearisierter DNA wurde durch Messung am Nanodrop-Photometer bestimmt. 50-200 ng dieser Sonden-DNA diente anschließend in der Klenow-katalysierten „Labeling“ Reaktion als Matrize und wur-

de über zufälliges Anlagern (“Random-Priming”) von Hexamer Oligonukleotiden bei 37 °C für 45 min amplifiziert (Megaprime DNA Labeling Kit [GE Healthcare]), anschließend wurde die Reaktion mit 150 µl TE abgestoppt. Zu dem dNTP-Mix aus dATP, dGTP und dTT wurde p32-markiertes dCTP eingesetzt, so dass die synthetisierten DNA-Fragmente radioaktiv markiert waren. Es wurden 7 µl radioaktives dCTP eingesetzt, entsprechend 2.59 Megabecquerel. Die Abtrennung ungebundener dNTPs erfolgte über Sephadex Säulchen nach Hersteller-Angaben (Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns; GE Healthcare). Die so generierte DNA-Sonde wurde für 5 Minuten bei 99 °C denaturiert und zu 10 ml Hybridisierungspuffer (Quick-Hyb Puffer (Agilent) oder Hybridisierungspuffer (2 ml 20xSSC, 1 ml 5 % Milchpulver, 1 ml 5 % SDS, 1 ml Lachsperm-DNA [10 mg/ml], 2 ml 50 % Dextran-sulfat, 3 ml A.bidest) in die Glasröhren gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Rotation bei 68 °C Hybridisierungstemperatur für 20 Stunden. Anschließend wurden die Membranen in separaten Plastikschaalen für drei-bis fünfmal für 15 Minuten mit 2x SSC/0.1 % SDS; 1.5x SSC/0.1 % SDS; 1x SSC/0.1 % SDS; 0.5 x SSC/0.1 % SDS und 0.1x SSC/0.1 % SDS bei 65 °C gewaschen, bis die Strahlung ungefähr 150 ips (Impulse pro Sekunde) betrug. Die Membranen wurden in Folie eingeschweißt, bevor sie in die Filmkassetten gelegt wurden. Es wurde ein radiosensitiver Film für 1-5 Tage exponiert, dabei lagerten die Filmkassetten bei -80 °C, um die Signalschärfe zu maximieren. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte über Abmessen und Vergleich mit einem mitgelaufenen DNA-Standard. Die Markierungseffizienz wurde durch Messung der Probe und der zu diesem Zweck nochmals von der Säule eluierten losen dNTPs mittels Scintillationsmessung bestimmt.

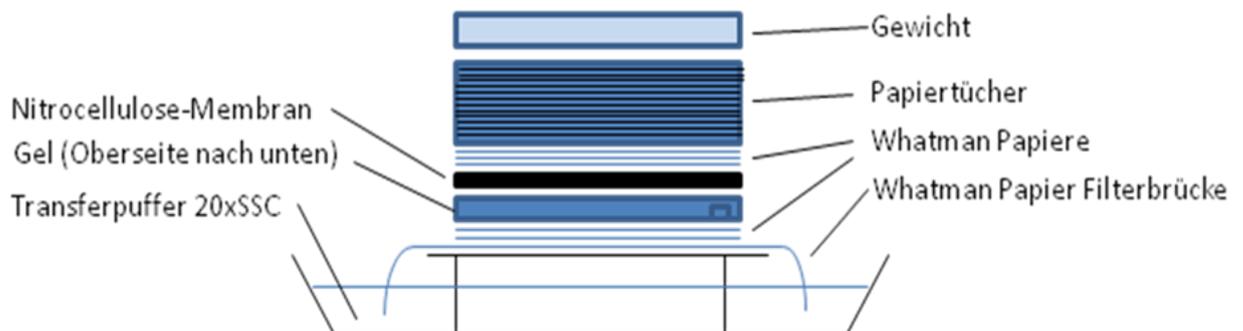


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Blotaufbaus beim DNA-Transfer von Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen („Southern-Blotting“).

2.2.16 Isolation von mRNA

Die Isolation von RNA erfolgte mittels Trizol gemäß den Hersteller-Angaben. Hierzu wurden die pelletierten Zellen in 1 ml TRIzol aufgeschlossen. Die Präzipitation der Proteine erfolgte mit 200 µl Chloroform. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 11.000 x g wurde der wässrige Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt, 15 Sekunden geschüttelt und die RNA bei 11.000 x g für 15 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden einmal in 70 % Ethanol/RNase-freiem A. bidest gewaschen und dann kurz getrocknet. Anschließend wurden die RNA-Pellets in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für

30 Minuten bei 37 °C mit DNaseI inkubiert. Die DNaseI wurde dann für 10 Minuten bei 85 °C inaktiviert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit einem Nanodrop Spektrometer der Firma Thermo. Die RNA wurde unmittelbar in die cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

2.2.17 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Hersteller-Angaben verwendet. Es wurden pro Reaktion 1 µg RNA in die cDNA-Synthese in 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der linearen Amplifikation nach Anlagerung von zufällig codierten Hexamer-Primern.

2.2.18 Semiquantitative PCR ("Real Time PCR")

Für die Überprüfung von RNAi-Effizienzen auf mRNA-Level, die Analyse der p27 Expression sowie die Analyse von mRNA-Leveln in heterozygoten ES-Zellen wurde zur mRNA Quantifizierung die Real-Time PCR verwendet. Die semiquantitative Real-Time PCR wurde mit Taqman-Sonden sowie einem Real-Time Mastermix der Firma Peqlab durchgeführt. Es wurden jeweils 20 µl Reaktionsansätze in Triplikaten in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Matritze dienten 1-1.3 µg cDNA. Als interne Quantifizierungsreferenz wurden die Gene Beta-2-Microglobulin und HPRT1 verwendet, beziehungsweise GAPDH und 18s. Für die Real-Time PCR wurde ein I-Cycler der Firma BioRad verwendet. Es wurde folgendes Programm verwendet: 95 °C-3 min (1x), 95 °C-20 s, 55 °C-30 s (40x). Zu Beginn des 55 °C Anlagerungs-Schritts erfolgte die optische Aufnahme der Fluoreszenz. Die Auswertung wurde mittels der BioRad I-Cycler Software durchgeführt. Das Prinzip der Quantifizierung über Taqman-Sonden beruht auf der Fluoreszenzdetektion während der exponentiellen Phase der PCR. Die Sonden enthalten einen Quencher und am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM). Baut die Taq-Polymerase während der Synthese aufgrund ihrer zusätzlichen 5'-3' Exonuklease-Aktivität die Sonde am 5' Ende des Gegenstrangs ab, entfernen sich Fluorophor und Quencher, und dieser FRET (Fluoreszenz-Energy Transfer) wird am Ende der Elongation in jedem Zyklus gemessen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten aus Zellen

Zur Analyse der Proteinexpression beziehungsweise der Proteinphosphorylierung wurden Säugerzellen nach entsprechender Stimulation mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellpellets in 50-100 µl Igepal- oder MRC-Lysepuffer resuspendiert. Zum Nachweis von Phosphorylierungen wurde der MRC-Lysepuffer verwendet, die Lysate wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Auftauen erfolgte auf Eis. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 11.000 x g wurden Zelltrümmer pelletiert und das klare Lysat in frische

Eppendorfggefäße überführt. Duplikate von 3 µl wurden für die anschließende Proteinbestimmung eingesetzt. Je 20 µg wurden für den nachfolgenden Proteinblot mit 5x Probenpuffer bei 99 °C für 5 min erhitzt und auf ein Polyacrylamidgel geladen oder bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell-Lysaten erfolgte mittels BCA-Test. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu 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 wurden 3 µl Zellysate mit 200 µl BCA-Reagenz in einer 96-Loch-Platte für 30 Minuten bei 37 °C oder für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Als Referenzprotein zur Quantifizierung diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.3.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (SDS PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Hierfür wurden die Proteine in SDS-haltigem Probenpuffer für 5 Minuten bei 99 °C aufgeköcht. Natriumdodecylsulfat (SDS) sorgt für die Denaturierung der Proteine, indem es hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein-Untereinheiten aufhebt. Durch die negative Ladung von SDS wird die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt, wobei die negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe proportional zur Masse des Proteins ist. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS/Proteinkomplexe in einem Polyacrylamidgel allein abhängig von ihrem Molekulargewicht. SDS hat keinen Einfluss auf vorhandene Disulfidbrückenbindungen. Diese werden durch Zugabe von DTT, welches ebenfalls im SDS-Probenpuffer (1 M Tris-HCl pH 6.8; 10 % SDS; 50 mg/l Bromphenolblau; 86 % Glycerin; 1 M DTT) enthalten ist, aufgespalten.

Um für eine optimierte Bandenschärfe zu sorgen, wurde mit einem diskontinuierlichen Puffersystem gearbeitet, bei dem über das eigentliche Trenngel ein weiteres Sammelgel gegossen wurde, welches zur Konzentrierung der Proteine dient. Das Sammelgel hat eine niedrigere Polyacrylamidkonzentration als das Trenngel und einen leicht sauren pH-Wert. Die Proteine werden zu einer scharfen Bande fokussiert. Beim Eintritt in das Trenngel erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wird zusätzlich zu den Proben ein Proteinstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 Volt.

5 %iges Sammelgel	10 %iges Trenngel
1 M Tris/HCl (pH 6.8) 375 µl	1 M Tris/HCl (pH 8.8) 1.25 ml
10 % SDS 30 µl	10 % SDS 50 µl
10 % APS 30 µl	10 % APS 50 µl
TEMED 3 µl	TEMED 2 µl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 500 µl	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 1.5 ml
A.bidest 2.05 ml	A.bidest 2 ml

2.3.4 Protein-Blotting („Western-Blotting“)

Beim Western-Blotting werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Durch Immobilisierung auf dieser Membran können die Proteine anschließend mit Antikörpern nachgewiesen werden (siehe 2.3.5). Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde das Nassblot-Verfahren genutzt. Nitrocellulosemembran, Gel, 3MM-Whatman Filterpapiere und Schwamm wurden zunächst ausreichend in Transferpuffer getränkt. Auf einen Schwamm wurden drei Filterpapiere, das Gel, die Membran, drei weitere Filterpapiere und ein zweiter Schwamm gelegt. Luftblasen wurden vorsichtig von der Mitte her mit einer 10 ml-Pipette herausgestrichen. Diese Anordnung wurde in eine Nassblot-Kammer eingesetzt, welche anschließend mit Transferpuffer gefüllt wurde. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 2 Stunden bei 4 °C. Die Proteine wandern dabei aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran.

2.3.5 Immunmarkierung von Protein-Blots

Die zuvor für mindestens 1 Stunde mit 5 % Milchpulver geblockten Membranen wurden kurz mit TBST gespült und dann über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper auf der Wippe inkubiert. Dabei wurden Hybridoma-Überstände 1:20 in 5 % Milchpulver verdünnt, primäre Antikörper der Firma Cell Signalling 1:1000 in TBST oder wie in der Antikörperliste (2.1.12) beschrieben eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Blots 3x 15 Minuten mit TBST auf der Wippe gewaschen. Die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Antikörper (siehe Sekundärantikörper) erfolgte mit 1:5000 facher Verdünnung in TBST bei Raumtemperatur auf der Wippe. Nach 3 x 15 Minuten Waschen erfolgte die Behandlung mit ECL-Reagenz von Pierce zur Aktivierung der HRP. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit Licht-sensitiven Röntgenfilmen.

2.3.6 Regeneration von Proteinblots

Um bereits immunmarkierte Protein-Blots für eine weitere Immunmarkierung zugänglich zu machen, wurden die Membranen für 12 min in 55 °C warmem SDS- und beta-Mercaptoethanol-haltigem Trispuffer (0.7 % β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 6.25 % 1 M Tris pH 6.7) inkubiert, um so die spezifische Bindung zwischen Antikörper und membrangebun-

denem Protein zu lösen. Anschließend wurden die Blots auf der Wippe für 3x 15 Minuten mit TBST gewaschen und vor der erneuten Immunmarkierung mit 5 % Milchpulver in TBST geblockt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von Säugerzell-Linien (Jurkat E6, HeLa, B-End5, ES-Zellen)

Jurkat E6.1 Zellen wurden in RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 50 µg/ml Gentamycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden die Zellen 24 h zuvor auf einen Zelltiter von 2x10⁵ Zellen/ml eingestellt. HeLa-Zellen wurden in DMEM Low Glucose-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert. Bend5 murine Endothelzellen wurden in DMEM High Glucose mit 50 µg/ml Gentamycin, 10 % FCS; 1 % L-Glutamin, NonEssentialAminoAcids 5 ml, 1 % Sodium Pyruvate 5 ml) und 1 % 1-Thioglycerol kultiviert. Embryonale Stamm-Zellen (ES-Zellen) wurden in einem separaten Inkubator in Knock-out-MEM mit 15 % FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin; L-Glutamin, β-Mercapto-Ethanol, Non-essential amino acids und LIF (Leucemia Inhibitor Factor, 1:250 aus COS-Zell-Überstand) kultiviert. Die Stammzellen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:6 passagiert.

2.4.2 Isolation primärer PBL, T-Zellen und Monocyten aus „Buffy Coats“ und MACS

Humane Periphere Blut-Lymphozyten (PBL) oder primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mittels Pancoll Dichtezentrifugation aus „Buffy coats“ isoliert. Das Blut wurde zunächst 1:1 mit 2 mM EDTA/PBS verdünnt und dann im Verhältnis 2:1 auf das Pancoll geschichtet. Nach 30 minütiger ungebremster Zentrifugation bei 800 x g wurde die weiße PBMC-haltige Phase oberhalb des Pancoll abgenommen und 3-5 mal bei sinkender g-Zahl (640 x g, 600 x g, 500 x g, 400 x g, 300 x g; je 7 min) mit 50 ml 2 mM EDTA/PBS gewaschen. Zur Gewinnung von PBL wurden die Zellen in VLE-RPMI (+10 %FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und in einem Titer von 5x10⁶ Zellen/ml mit 5 ml pro Loch in 6-Loch Platten ausgesät. Monocyten adhäreren während der 60 minütigen Inkubationszeit am Plattenboden und können auf diese Weise von den PBL separiert werden. Für die Separation von CD4⁺ T-Zellen wurde die Leukocyten-haltige Phase nach der Dichtezentrifugation zweimal gewaschen und 3x10⁸ Zellen in 600 µl PBE (PBS, 0.5 % FCS, 2 mM EDTA) mit dem Antikörper-Cocktail nach Herstellerangaben (Human CD4⁺T-Cell Isolation Kit II; Miltenyi) gefärbt. Dabei handelt es sich um eine Mischung Biotin-konjugierter Antikörper gegen z.B. CD8, CD14, CD16, die nicht-CD4⁺ T-Zellen markieren. Nach der Färbung wurde die Zellsuspension mit 450 µl PBE und 300 µl anti-Biotin Beads vermischt. Die Beads sind magnetisch und ermöglichen so die nachfolgende Auftrennung im MACS-Separator. Nach einem 10 minütigen Wasch-Schritt bei 300 x g in 30 ml wurden die Pellets in 2 ml

PBE resuspendiert und mittels eines magnetischen Feldes im MACS Separator aufgereinigt. Die erhaltenen CD4⁺T-Zellen sind aufgrund der verwendeten Negativ-Selektion frei von Antikörpermarkierungen. Die Zellen wurden in VLE-RPMI (10 % FCS; 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Durch Zugabe von 20 ng/ml humanem GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 wurden aus den Monocyten innerhalb von 7 Tagen dendritische Zellen (DC) generiert.

2.4.3 Isolation und Kultivierung muriner Knochenmarks-Stammzellen und Differenzierung in dendritische Zellen (DC)

Zur Gewinnung muriner dendritischer Zellen wurden sieben Wochen alte C57BL/6 Mäuse mittels cervicaler Dislokation getötet, um anschließend Femur und Tibia zu entnehmen. Die Knochen wurden an den Enden geöffnet und unter sterilen Bedingungen mehrfach mit PBS gespült, und die so gewonnenen Zellen mittels eines Zellsiebes von Geweberesten befreit und bei 400 x g für 10 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Titer von 5×10^5 Zellen in 10 ml VLE RPMI (10 % FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) in 10 cm Bakterien-Plastikschalen kultiviert. Die Differenzierung zu dendritischen Zellen aus den Knochenmarksstammzellen wurde durch Zugabe von 10 ng/ml murinem GM-CSF erzielt. Die Zellen wurden ab Tag 7 für funktionelle Versuche verwendet. Die Reifung dendritischer Zellen wurde durch Zugabe von 200 ng/ml LPS für 24-48 h erzielt. Das Medium wurde alle 48 h zur Hälfte gegen frisches Medium ausgetauscht.

2.4.4 Transfektion von Jurkat E6 Zellen mit Plasmid-DNA

Um Proteine in Jurkat-Zellen zu überexprimieren, wurden die Zellen mit Flag- oder GFP-fusionierten DNA-Konstrukten transfiziert. 1×10^7 Zellen wurden nach einmaligem Waschen in PBS in 400 µl Transfektionsmedium (50 % FCS/RPMI) aufgenommen, mit 20 µg Plasmid-DNA gemischt und in einer 4 mm-Küvette bei 240 Volt, 1500 µF, unendlichem Widerstand und exponentiellem Spannungsverlauf transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium überführt und nach 24 Stunden für funktionelle Versuche verwendet. Bei Cotransfektionen mit zwei verschiedenen Plasmiden wurden jeweils 15 µg DNA pro Konstrukt eingesetzt.

2.4.5 Transfektion von Jurkat E6 Zellen mit siRNA

Zur Herunterregulation des Proteinlevels mittels RNAi wurden Jurkat E6.1 Zellen mit siRNA über Elektroporation transfiziert. 1×10^7 Zellen wurden in 500 µl Opti-MEM aufgenommen, 3 Minuten mit 10 µg siRNA inkubiert und bei rechteckigem Spannungsverlauf mit 300 Volt und einem Puls von 20 msec in einer 4 mm-Küvette transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Jurkat-Medium (2.4.1) überführt und nach 1-4 Tagen für funktionelle Versuche verwendet. Das Arbeiten erfolgte unter RNase-freien Bedingungen.

2.4.6 Transfektion von HeLa-Zellen mit DNA-Konstrukten oder siRNA

Für die Transfektion von adhärennten Zellen wie HeLa wurde die Plasmid-DNA oder siRNA über Lipofektion eingebracht. Dazu wurden die Zellen bis zu 70-80 %iger Konfluenz ohne Antibiotika-Zusatz kultiviert und dann nach Hersteller-Angaben (Lipofectamine 2000; Invitrogen) weiter behandelt. Für DNA-Konstrukte wurden 20 µg Vektor-DNA eingesetzt, für RNAi wurden 1-5 µg siRNA eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für funktionelle Versuche verwendet.

2.4.7 Transfektion muriner DC mit siRNA

Murine unreife DC wurden mittels 2 mM EDTA/PBS von der Kulturschale gelöst, geerntet und bei 400 x g pelletiert, einmal mit warmem PBS gewaschen, erneut pelletiert und anschließend in vorgewärmtem Opti-MEM resuspendiert. Pro Ansatz wurden 4×10^6 Zellen in 100 µl Opti-MEM verwendet. 5-10 µg siRNA wurden in 4 mm-Küvetten vorgelegt, anschließend wurde die Zellsuspension zugegeben und für 3 Minuten inkubiert. Zwei Elektropulse wurden mittels „Square wave“ bei 1000 Volt für 0.5 msec appliziert. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort in 10 ml Kulturmedium überführt und nach 2-3 Tagen für funktionelle Versuche eingesetzt.

2.4.8 Transfektion primärer T-Zellen mit siRNA

Primäre T-Zellen wurden 16 h nach ihrer Isolation mit 10 µg siRNA transfiziert. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 Minuten pelletiert und einmal mit warmem PBS gewaschen. Pro Transfektions-Ansatz wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl AMAXA Transfektionspuffer pro Ansatz resuspendiert und auf die vorgelegte siRNA in die Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in 2 mm-Küvetten mit der „U14“ Einstellung am AMAXA-Transfektionsgerät. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 5 ml Kulturmedium (VLE-RPMI, 10 % FCS; 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin) überführt. Nach 48 h Kultur wurden die Zellen für funktionelle Versuche verwendet und der „Knock-down“ kontrolliert.

2.4.9 Transfektion von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Für die Transfektion embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) wurden für das Cytohesin-1 Targeting-Konstrukt E14-ES-Zellen, für das Cytohesin-4 Targeting-Konstrukt IB10 ES-Zellen verwendet. Beide Linien haben einen 129 P2/Ola (leicht cremefarbenen) Hintergrund und sind bekannt für ihre gute Keimbahngängigkeit [171]. Bei den IB10 Zellen handelt es sich um einen Subklon der E14-Zellen. Für die Transfektion wurde das Targeting-Konstrukt mit *NotI* linearisiert und anschließend mit 0.8-fachem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und mit 2.5-fachem Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde unter sterilen Bedingungen in A.bidest gelöst, so dass sich eine Konzentration von 1-3 µg/µl ergab. Für die Elektro-

poration wurden ES-Zellen von einer 50-70 % konfluenten T75-Zellkulturflasche geerntet und in 400 μ l PBS aufgenommen, mit 30 μ g des Targeting-Konstrukts gemischt, 5 Minuten inkubiert und in einer 4 mm-Küvette bei 240 Volt, 500 μ F und $\Omega=\infty$ mit einem GenePulser-Xcell von BioRad elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen und dann in 30 ml Kultur-Medium überführt und auf 3 x10 cm-Schalen verteilt. Nach 24 h Kultur wurde dem Medium 400 μ g/ml G418 zugesetzt, um auf Neomycin-resistente Klone zu selektieren. Ungefähr 7-10 Tage nach der Transfektion werden erste Zellklone sichtbar, die mittels einer 100 μ l-Pipette und unter Einsatz eines Phasenkontrast-Mikroskops mit 10x Vergrößerung vorsichtig abgelöst, in die Pipettenspitze aufgesaugt und in gelatinisierte 48-Loch Platten (ein Klon pro Vertiefung) überführt wurden. Dort wurden die Klone expandiert und bei 40-80%iger Konfluenz im Verhältnis 1:2 auf zwei 48-Lochplatten gesplittet. Eine Platte wurde für die spätere Expansion eingefroren (mit je 500 μ l Kulturmedium; 10 % FCS; 10% DMSO pro Vertiefung), die zweite Platte wurde zur DNA-Isolation verwendet.

2.4.10 LPS-Stimulation von dendritischen Zellen

Murine dendritische Zellen (BMDC) wurden zur Reifung für 24 oder 48 Stunden mit 200 ng/ml LPS stimuliert. Dabei wurde die Hälfte des Mediums entfernt und mit LPS-supplementiertem Medium ersetzt. Humane DC wurden durch Zugabe von 1 μ g/ml LPS und 50 ng/ml TNF α für 24 h gereift. Die Reifung der dendritischen Zellen wurde mittels FACS-Analyse der Oberflächenproteine CD80, CD86, CD40 und MHC Klasse II bestätigt. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen wurde anhand der Oberflächenexpression von CD11c überprüft.

2.4.11 Anti CD3/anti CD28 Stimulation von T-Zellen

Zur Stimulation von T-Zellen (primäre CD4⁺ T-Zellen, PBL, Jurkat-Zellen) wurden anti CD3/anti CD28/ MHCII beschichtete Kügelchen („Beads“) verwendet. Diese wurden in Relation zur Zellzahl 1:1 oder 2:1 eingesetzt. Die Stimulation erfolgte an 1-2x10⁶ Zellen in 1 ml Medium. Nach entsprechender Inkubation wurde die Stimulation mit kaltem PBS abgestoppt und die Zellen für Western-Blot Analysen lysiert.

2.4.12 Differenzierung von ES-Zellen zu Neuronal-Zellen

Da ES-Zellen keine Cytohesin-1 und Cytohesin-4 Expression zeigen, wurden ES-Zellen zu Neuronal-Zellen differenziert, welche beide Cytohesine exprimieren. Zu diesem Zweck wurden ES-Zellen ohne LIF (Leucemia-Inhibitor-Factor) kultiviert. Als Differenzierungs-Stimulus wurden dem Medium 10 μ M Retinsäure zugesetzt. Die Zellen wurden eine Woche in Anwesenheit der Retinsäure kultiviert. Erste Differenzierungen sind bereits nach 48 h zu sehen. Die Differenzierung wurde anhand der Zellmorphologie beurteilt. Die Zellen wurden an Tag 7 für mRNA-Analysen geerntet.

2.5 Funktionale Analysen

2.5.1 Untersuchungen zur Zell-Adhäsion unter statischen Bedingungen

Zur Untersuchung der Zell-Adhäsion von Jurkat E6 T-Zellen wurden 2×10^6 Zellen pro Ansatz geerntet und in warmem HBSS gewaschen. Um nur lebende Zellen zu werten, erfolgte das Auszählen mit Trypan-Blau. Der Versuch wurde in 3 cm-Petrischalen durchgeführt, in deren Mitte ein ungefähr 1 cm^2 großer Kreis markiert wurde, in welchem die Beschichtung mit goat anti-human IgG (Dianova) in $50 \mu\text{M}$ Tris pH 9.5 durchgeführt wurde (Antikörperkonzentration: $18 \mu\text{g/ml}$ in $200 \mu\text{l}$ Volumen). Nach zweimaligem Waschen mit Tris-Puffer wurden die Schalen über Nacht bei 4°C mit 3 % BSA/PBS geblockt und am Versuchstag für eine Stunde mit je $500 \mu\text{l}$ ICAM-1 Überstand inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Schalen zweimal mit vorgewärmten HBSS gewaschen. Die Zellen wurden auf die mit ICAM-1 beschichteten 3 cm-Schalen in einem Volumen von 1 ml HBSS ausgesät und unverzüglich mit dem entsprechenden Stimulus versetzt, $3 \mu\text{g}$ Okt3 beziehungsweise 50 ng/ml PMA. Die Adhäsion erfolgte für eine Stunde im Brutschrank. Anschließend wurde mehrmals so lange vorsichtig mit 1 ml HBSS gewaschen, bis im äußeren Kreis nur noch wenige bis keine Zellen adhärirten. Die verbleibenden Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und mittels Mikroskopie (Axiovert, Zeiss) ausgezählt. Pro Ansatz wurden drei Gesichtsfelder innerhalb des inneren Kreises quantifiziert. Je nach Versuchsumfang wurden Duplikate beziehungsweise Triplikate analysiert.

2.5.2 Untersuchungen zur Zell-Adhäsion unter physiologischen Flussbedingungen („Flow Assay“)

Um die Adhäsion von T-Zellen oder dendritischen Zellen unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurden diese durch eine Spezialkammer über eine Endothelzellschicht geleitet. Zur Vorbereitung wurden b-End5 Endothelzellen zwei Tage vor Versuchsbeginn in 3 cm-Schalen (Falcon) ausgesät. Am Vorabend des Versuchs oder mindestens 4 Stunden vorher wurden die Endothel-Zellen mit 10 ng/ml murinem TNF- α stimuliert, um die ICAM-1 Expression zu aktivieren. Hierzu wurde das Medium gegen 3 ml TNF-supplementiertes Medium ausgetauscht. Zwei Stunden vor dem Versuchsstart wurden die Endothel-Zellen mit 500 ng/ml SDF-1 α (oder CCL21) inkubiert, welches an die Proteoglycane der Zelloberfläche bindet. Hierzu wurde das Medium bis auf 500 ml abgenommen und das SDF-1 α zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Für den Versuch sind nur Schalen mit mindestens 90 % Konfluenz geeignet.

Flow Assay: Die spezielle „Flow-Chamber“ wurde mit dem zuführenden Schlauch (Durchmesser: 0.15 cm ; Länge: 17 cm) verbunden und mit 1x HH-Puffer befüllt und mit dem Puffer-Reservoir verbunden (1xHH in einem 15 ml -Plastikröhrchen). Rechts an der Kammer wird der ableitende Schlauch (Durchmesser: 0.15 cm ; Länge: 10 cm) befestigt und der Fluss zum Spülen des Systems gestartet. Vor dem Einsetzen der b-End5-Schale wurde der Fluss gestoppt und die b-End5-Schale kopfüber in die Kammer eingesetzt. Die Flussraten

während des Assays betragen 0.2 ml/min. Es wurde mit 10facher Vergrößerung mikroskopiert. Vor dem Eintritt der ersten dendritischen Zellen wurden an 6 Positionen statische Aufnahmen des Endothels gemacht. Die Positionen wurden mit der Nice Software als Multipoints gespeichert. Zum Versuchsstart wird das Puffer-Reservoir gegen die Zell-Suspension ausgetauscht. Nach Eintritt der ersten dendritischen Zellen in die Kammer wurde genau 3 Minuten gewartet, damit das System stabil läuft. Dann wurde die dreiminütige Video-Aufnahme (100 msec) gestartet. Anschließend wurde der Fluss gestoppt, das Röhrchen mit den Zellen gegen das Puffer-Reservoir getauscht, 6 Minuten mit konstanter Flussrate gespült, und dann über Multipoints erneut die 6 festgelegten Positionen statisch aufgenommen. Zur Auswertung wurden alle DC auf den Statischen Aufnahmen ausgezählt, und eventuell vorhandene DC auf den "Vorher"-Aufnahmen von den Aufnahmen nach dem Fluss subtrahiert. Diese Zellzahl wird dann mit dem Faktor 2.3 multipliziert, sodass man die Zellzahl adhärenter Zellen pro mm^2 erhält. Dieser Faktor gilt für das Nikon TE Eclipse 2000 bei 10facher Vergrößerung (Objektiv: Plan Fluor 10x/0.30).

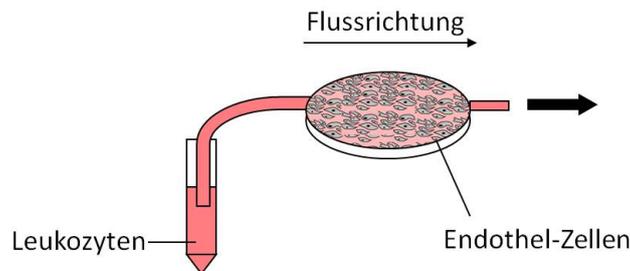


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus beim Flowassay. Die dendritischen Zellen (DC) werden durch Sogwirkung über die Endothelzellschicht aus b-End5 geführt, auf denen sie adhären können.

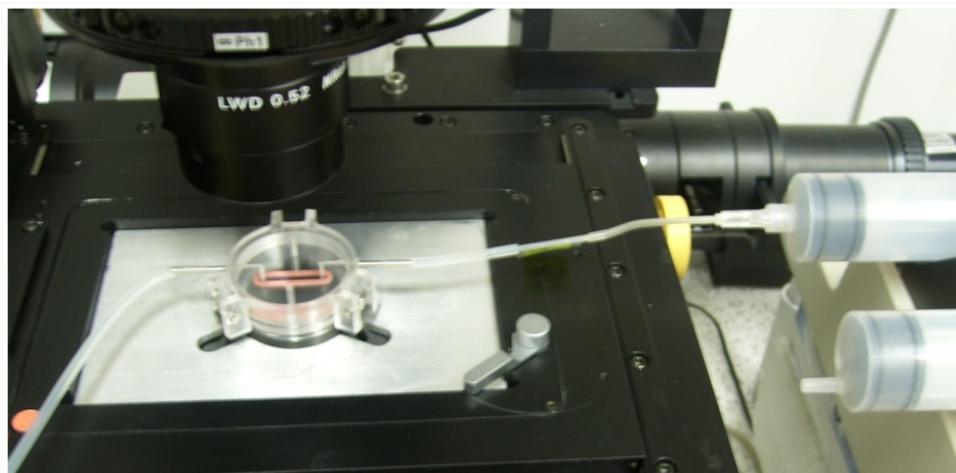


Abbildung 2.6: Versuchsaufbau des "Flow Assays": Über den linken Schlauch werden die DC angesaugt und fließen durch eine Spezialkammer (mitte) über die Endothelzellen, die in einer 3 cm-Schale in die Kammer eingesetzt werden. Im mittleren Bereich der Kammer ist ein mikroskopierbarer Kanal (rote Gummiumrandung). Die Analyse erfolgt über Videomikroskopie sowie über statische "Vorher-Nachher" Aufnahmen mit dem Mikroskop. Rechts im Bild ist die Vorrichtung zum Ansaugen der Zellen zu sehen (Spritzenpumpe), die einen konstanten definierbaren Fluss ermöglicht.

2.5.3 Untersuchungen zur Zell-Adhäsion zwischen DC und T-Zellen

Um die Interaktion zwischen dendritischen Zellen nach “knock-down” von Cytohesin-1 oder RhoA mit T-Zellen zu quantifizieren, wurde ein 96-Loch-Platten Adhäsions-Versuch angewendet. 1.5×10^6 OT1-T-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten 96-Wells (Poly-L-Lysine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 1 h bei Raumtemperatur) für zwei Stunden in RPMI + 0.5 % FCS immobilisiert. Die T-Zellen wurden zuvor frisch aus OT1-Maus Milzen isoliert, die CD4^+ und CD8^+ T-Zellen wurden mit MACS-Microbeads angereichert. Wildtyp BM-DC wurden wie unter 2.4.3 beschrieben isoliert und mit 5 μg Cytohesin-1 siRNA oder 5 μg RhoA siRNA or 5 μg Kontroll siRNA transfiziert und an Tag 2-5 des “Knock-down” verwendet. Die BMDC wurden für zwei Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert, dann mit oder ohne 1 mg/ml OVA-Protein für drei Stunden inkubiert. 1×10^5 BMDC wurden geerntet, mit PBS gewaschen und auf den T-Zellen in RPMI ohne Serum ausgesät und für 45 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, die 100 % Kontrolle wurde nicht gewaschen und diente als Referenz. Adhärenente DC (im Mikroskop durch ihre Größe von den relativ kleinen T-Zellen zu unterscheiden) wurden durch Auszählen am Nikon Eclipse TE 2000 quantifiziert.

2.5.4 Untersuchungen zur Zellmigration im Transwell-System

Zur Quantifizierung der Zellmigration wurden sogenannte Transwell-Filter in 24-Loch-Platten verwendet. Dafür wurden 2×10^5 Zellen in 300 μl serumreduziertem (0.5 % FCS) Kulturmedium in der oberen Kammer ausgesät und 45 Minuten adhärirt. Die untere Kammer enthielt 700 μl des entsprechenden Mediums. Nach der Adhäsionsphase wurden die Filter in chemokinhaltiges Medium (200 ng/ml CXCL12 bei T-Zellen oder 600 ng/ml CCL19 bei reifen DC; 300 ng/ml CCL3 bei unreifen DC) umgesetzt. Die Transmigration der Zellen durch die 5 μm Poren im Polycarbonat-Filter wird nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank mittels Quantifizierung der Zellzahl im unteren Kompartiment ausgewertet. Es wurden jeweils Duplikate angesetzt, sowie Kontrollen ohne Chemokin. Bei unreifen DCs wurden 8 μm -Poren-Filter verwendet und die Quantifizierung erfolgte nach 16 Stunden. Bei stark adhärenenten Zellen wie unreifen DC werden die Filter herausgetrennt, die Zellen mit CFSE gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie der Filter quantifiziert. Die Zellen auf der Filteroberseite wurden mit einem Q-Tip entfernt, um nur die Zellen in den Poren und auf der Unterseite zu quantifizieren. Die Färbung wurde mit 2 μM CFSE/PBS (700 μl) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Filter wurden einmal in PBS gewaschen und dann im 10x Objektiv und mit GFP-Filter analysiert.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Filter mit 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin beschichtet (1 h bei Raumtemperatur).

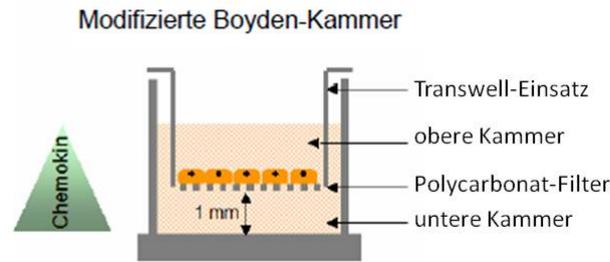


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung einer modifizierten Boyden-Kammer. Der Transwell-Einsatz wird in eine 24-Loch-Platte eingesetzt, sodass eine obere und eine untere Kammer entsteht. Die Zellen adhären oben auf dem Polycarbonat-Filter und wandern anschließend durch die 5 µm großen Poren in Richtung des Chemokingradienten in die untere Kammer.

2.5.5 Untersuchungen zur Zellmigration in dreidimensionalen Substraten

Die Gewebe-abhängige dreidimensionale Migration von dendritischen Zellen wurde in Kollagen-Gelen mittels Video-Mikroskopie analysiert. Hierzu wurden reife dendritische Zellen in einem Titer von 1.5×10^6 /ml in VLE-RPMI/0.5 % FCS und KollagenI-Mix (5.5 % Natrium-Bicarbonat, 11 % 10xMEM (Sigma) und 83 % PureCol (INAMED)) im Verhältnis 1:2 gemischt, sodass die finale Kollagen-Konzentration bei 1.7 mg/ml lag. Das Kollagen-Zell-Gemisch wurde in eine selbstgebaute mikroskopierbare 1-2 mm hohe Kammer gefüllt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37 °C war das Kollagen vollständig polymerisiert. Die Kollagenschicht wurde mit dem Chemokin CCL19 (600 ng/ml) in VLE-RPMI/0.5 % FCS überschichtet. Die Video-Aufnahmen wurden im Phasenkontrast mit einem Nikon TE Eclipse mit Klimakammer in 10 facher Vergrößerung mit einem Bild in 5 min für 3 Stunden durchgeführt.

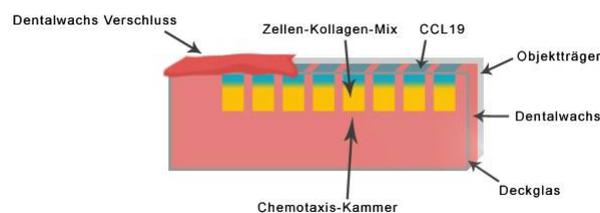


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer selbstgebauten 3D-Migrationskammer. Der Dentalwachs dient als Gerüst und definiert die einzelnen Kammern. Das Glas ist mikroskopierbar, sodass eine videomikroskopische Auswertung möglich ist. Die Zell-Suspension wird zusammen mit dem flüssigen Kollagen-Gemisch eingefüllt und nach Polymerisation mit dem Chemokin-Gemisch überschichtet. Die Kammern werden mit flüssigem Wachs versiegelt. Quelle der Abbildung: Martina Hammel.

2.5.6 Quantifizierung von 3D-Migrationsassays

Filme zur dreidimensionalen Zellmigration wurden mit ImageJ hinsichtlich Richtungslosigkeit, Geschwindigkeit und FMI (Forward Migration Index) analysiert. Hierzu wurden 60 Einzelzellen manuell mit dem „manual tracking plug in“ bearbeitet. Die Zellmotilität wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden analysiert. Die quantitative statistische Aus-

wertung wurde mit dem "IBIDI chemotaxis plug in" durchgeführt.

2.5.7 Untersuchungen zur Regulation des Zellzyklus

Zur Untersuchung des Zell-Zyklus von T-Zellen wurden Jurkat-Zellen, PBL oder CD4⁺ T-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Beads für verschiedene Zeitpunkte von 24-96 h stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und dann mit 70 % Ethanol fixiert. Hierzu wurde das Zell-Pellet auf dem Vortex gelöst und tropfenweise in 1 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol resuspendiert. So wurden die Zellen für mindestens 4 h bei 4 °C inkubiert oder gelagert. Für den Verdau von störender RNA wurden die Proben bei 400 x g für 10 min pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Die RNase wurde in Färbe-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0.01 % NaN₃) verdünnt und mit 1 mg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 100 µl bei 37 °C für mindestens 30 min. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und mit Propidium-Iodid (PI) gefärbt. Das PI wurde mit Färbe-Puffer auf 15 µg/ml verdünnt, die Zellen wurden in 1 ml Volumen für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte ein Wasch-Schritt mit 1 ml Färbe-Puffer. Die Zellen wurden für die FACS-Messung in ungefähr 300 µl Färbe-Puffer aufgenommen und mit linearer Einstellung gemessen, dabei lag die Durchflussrate bei maximal 400 Ereignissen pro Sekunde. Zur Auswertung wurden die Anteile von G₀/G₁-, Synthese- und G₂/Mitose-Phase untereinander verglichen. Der erste Peak repräsentiert dabei die Zellen aus G₀/G₁, mit einfacher DNA-Menge, der zweite Peak bei ungefähr doppelter Fluoreszenz-Intensität die G₂/M-Phase mit doppelter DNA-Menge. Der dazwischenliegende Bereich repräsentiert die Synthesephase.

2.5.8 Durchflusszytometrische Analysen („FACS“)

Die Durchflusszytometrie (auch FACS, für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht eine Hochdurchsatzbetrachtung von Zellen zur Analyse ihrer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Anfärbungen. Der Durchfluss der Zellsuspension erfolgt durch eine Kapillare, so dass jede Zelle einzeln den LASER-Strahl passiert. Der sogenannte Forward scatter empfängt dabei von der Zelle emittiertes Streulicht, welches Rückschlüsse über die Größe der Zelle zulässt. Morphologie und Granularität der Zelle werden von dem Sidescatter erkannt. Nach Markierung von Oberflächenmolekülen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern ermöglicht die Durchflusszytometrie durch Anregung der Fluorochrome und Messung der Fluoreszenzintensität eine Quantifizierung der Oberflächenmarker. Die Durchflusszytometrie wurde zur Phänotypisierung von dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker-Expression eingesetzt, der Überprüfung von GFP-Überexpressions-Effizienzen sowie für Zellzyklus-Analysen mit Propidium-Iodid. Für Oberflächenfärbungen wurden 3x10⁵ Zellen in FACS-Reaktionsgefäßen mit den primären Antikörpern (1:200 in kaltem 1 % BSA/PBS) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1% BSA/PBS erfolgte die 30 minütige Inkubation mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern (1:200). Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Messung der Proben, wobei min-

destens 10.000 Ereignisse gemessen wurden. GFP-transfizierte Zellen wurden ohne Vorbehandlung in die Messung eingesetzt.

2.5.9 GTPase Aktivierungs-Versuche

Um die GTPase Aktivität von RhoA oder Rac1 in BM-DC oder HeLa-Zellen zu messen, wurden kommerzielle ELISAs nach Herstellerangaben verwendet. Das RhoA-GTP Effektor-Protein Rhotekin beziehungsweise das Rac-GTP Effektor-Protein PAK-1 sind am Boden einer 96-Loch-Platte immobilisiert. Die Zellen wurden nach RNAi, Plasmidtransfektion oder Inhibitorbehandlung stimuliert (HeLa für 1 h mit 50 nM EGF) oder unstimuliert belassen, lysiert und für 30 min bei 4 °C auf der Platte inkubiert. In dieser Zeit binden die aktivierten GTPasen an die entsprechende Bindedomäne ihrer Effektor-Proteine und können über einen spezifischen HRP-gekoppelten Antikörper durch Absorbionsmessung mit dem Microplatten-Spektrophotometer bei 485 nm detektiert werden.

2.5.10 Karyotypisierung von ES-Zellen

Für eine erfolgreiche Keimbahngängigkeit injizierter ES-Zellen ist es wichtig, dass diese einen normalen Karyotypen mit 40 Chromosomen aufweisen. Zur Überprüfung des Karyotyps wurden ES-Zellen bis zur Konfluenz einer T25-Flasche kultiviert. Die Zellen erhielten frisches Medium. Vier Stunden später wurde dieses für 50 min gegen 2 ml Kulturmedium mit 0.2 µg/ml Demecolcine (Sigma) getauscht um die Zellen in der Metaphase der Mitose zu arretieren. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin geerntet und für 5 min bei 55 x g pelletiert. Das Zell-Pellet wurden tropfenweise durch vorsichtiges "Anschnipsen" in 0.56 % KCl gelöst. Weitere 3 ml KCl wurden zugefügt, die Zellen wurden 10 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein osmotisch-bedingtes Anschwellen der Zellen, welches später das Aufplatzen der Zellen auf dem Objektträger erleichtert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 1 ml frisch-angeseztem Methanol:Eisessig (2:1) tropfenweise fixiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g pelletiert und noch zweimal wie beschrieben fixiert. Dann wurden die Zellen in 1 ml Methanol/Eisessig resuspendiert und aus verschiedenen Höhen (10 cm-50 cm) auf einen Objektträger getropft. Dabei sollen die Zellen platzen, so dass ihre Metaphase Chromosomen möglichst einzeln zum Liegen kommen. Nach vollständiger Trocknung der Objektträger wurden die Chromosomen für 2 min mit Giemsa-Färbelösung angefärbt und dann zweimal mit Wasser für je 1 min gewaschen. Die Analyse erfolgte am Nikon Eclipse mit 60 facher Vergrößerung. Pro ES-Zell-Klon wurden mindestens 20 Zellen bezüglich ihrer Chromosomenzahl quantifiziert.

2.5.11 Statistische Analyse von Daten

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von erhaltenen Daten wurde die Software Prism (GraphPad) verwendet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz eines Unterschiedes wurde der T-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Ab einem p-Wert von 0.05

wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. Für die verwendeten Balkendiagramme wurde folgende Beschriftung verwendet:: $p < 0.001 = ***$, $p < 0.01 = **$ $p < 0.05 = *$. Die in den Balkendiagrammen verwendeten Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Teile dieser Methoden wurden bereits in der Diplomarbeit von C. Schild (2007) beschrieben.

3 Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden Funktionen von Cytohesin-1 und Cytohesin-4 in Immunzellen beschrieben. Er gliedert sich in folgende vier Schwerpunkte: Der erste Teil beschreibt die Funktionen von Cytohesin-1 und Cytohesin-4 in dendritischen Zellen. Im zweiten Teil wird auf die Rolle von Cytohesin-4 in T-Zell-Signalwegen eingegangen. Die Teile 3 und 4 beschreiben die Entwicklung genetischer Modelle für einen konditionalen Cytohesin-1-beziehungsweise Cytohesin-4-”Knock-out” in der Maus.

3.1 Cytohesin-Funktionen in dendritischen Zellen

3.1.1 Cytohesin-1 reguliert die Adhäsion von BM-DC an OT-1 T-Zellen

Integrin-vermittelte Adhäsionsprozesse spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation von Immunantworten, so zum Beispiel beim Austritt von Leukozyten aus der Blutbahn ins Gewebe oder beim Kontakt zwischen Antigen-präsentierender Zelle (*antigen presenting cell*, APC) und T-Zelle bei der Ausbildung der Immunologischen Synapse. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 die statische Adhäsion von β_2 -Integrinen und β_1 -Integrinen an die Liganden ICAM-1 und Fibronektin reguliert [14, 22, 23, 59]. Darauf aufbauend sollte geklärt werden, ob Cytohesin-1 die Adhäsion von dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) bei APC/T-Zell-Kontakten reguliert. Zu diesem Zweck wurde die Antigen-spezifische Adhäsion von murinen Knochenmarks-generierten DC (*bone-marrow derived DC*, BM-DC) an OT-1 T-Zellen untersucht. OT-1 T-Zellen sind transgen für einen Ovalbumin-spezifischen T-Zell-Rezeptor und eignen sich somit als Modell für Antigen-spezifisch regulierte Zellprozesse [175].

Zur Untersuchung der Rolle von Cytohesin-1 in der Zell-Zell Adhäsion wurden unreife BM-DC mit Cytohesin-1- oder Kontroll-siRNA behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen für zwei Stunden mit LPS stimuliert und anschließend für drei Stunden mit Ovalbumin inkubiert, um die MHC-I-Moleküle mit dem Ova-Peptid zu beladen. Dann wurden die BM-DC für 45 Minuten auf den immobilisierten OT-1 T-Zellen adhärirt. Durch gleichmäßige Wasch-Schritte wurden nicht adhärente BM-DC entfernt, und adhärente Zellen wurden mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskops quantifiziert. Dabei dienten nicht-gewaschene Proben als Referenz der Quantifizierung. Abbildung 3.1 zeigt, dass Ovalbumin-beladene Kontroll-BM-DC spezifisch auf immobilisierten OT-1 T-Zellen adhärrieren, wohingegen unbeladene Kontroll-BM-DC eine um die Hälfte reduzierte Adhäsion zeigen. Weiterhin ist zu sehen, dass die Herunterregulation von Cytohesin-1 mittels RNAi in BM-DC ohne Ovalbumin-Beladung die Zell-Zell-Interaktion nicht beeinflusst. In Ovalbumin-beladenen

BM-DC hingegen hat die Cytohesin-1 RNAi eine ungefähr 60 %ige Verminderung der Antigen-spezifischen Zell-Zell-Interaktion zur Folge. Folglich ist Cytohesin-1 entscheidend an der Ausbildung des Zell-Zell-Kontakts zwischen APC/T-Zelle beteiligt, indem es die Adhäsion der BM-DC an die T-Zellen positiv reguliert.

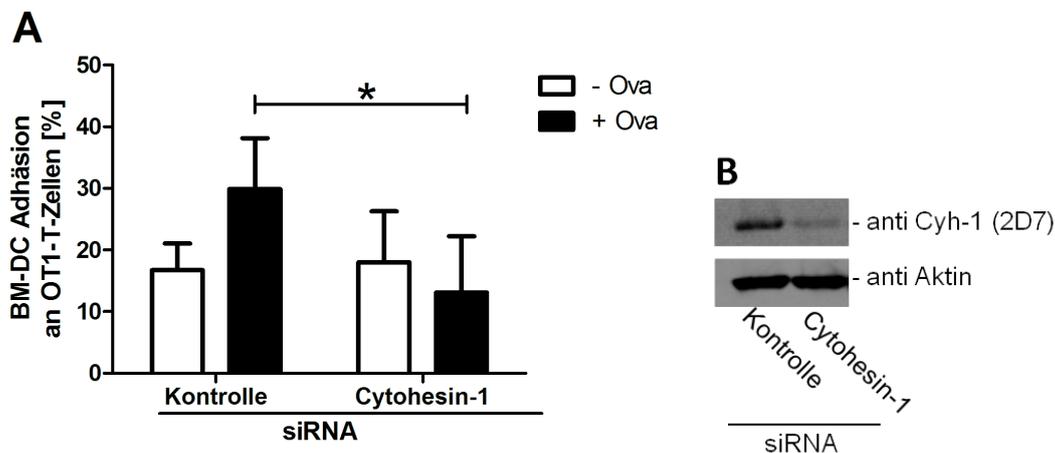


Abbildung 3.1: **Cytohesin-1 reguliert die Adhäsion von BM-DC an OT-1 T-Zellen.** BM-DC-T-Zell-Adhäsionsversuch. BM-DC wurden 6 Tage nach der Isolation als hämatopoetische Stammzellen und anschließender Differenzierung mit GM-CSF mit spezifischer Cytohesin1-siRNA beziehungsweise Kontroll-siRNA behandelt und 48 Stunden später hinsichtlich ihrer Adhäsion an immobilisierte OT1-T-Zellen untersucht. Die BM-DC wurden für zwei Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert, dann mit 1 mg/ml OVA-Protein (schwarzer Balken) oder ohne OVA-Protein (weißer Balken) für drei Stunden inkubiert und anschließend für 45 Minuten auf den T-Zellen adhärirt. Nach mehrfachen Wasch-Schritten wurden die adhärenenten BM-DC mit Hilfe von Phasenkontrast-Mikroskopie quantifiziert und als prozentualer Anteil zur ungewaschenen Kontrolle gesetzt. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche (A). BM-DC wurden 48 Stunden nach siRNA Behandlung lysiert und mittels Western-Blot und spezifischer Antikörperfärbung auf die Cytohesin-1 Expression überprüft. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle (B). (Modifiziert aus Quast *et al.*, 2009)

3.1.2 Cytohesin-1 reguliert in murinen dendritischen Zellen die Adhäsion unter Flussbedingungen

Im vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass Cytohesin-1 die Adhäsion von APC auf T-Zellen vermittelt. Für die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blutstrom ist die Integrin-abhängige Adhäsion unter laminaren Flussbedingungen von zentraler Bedeutung. Entzündliche Chemokine wie z.B. SDF-1 α (CXCL12) binden an die Glykokalix der Endothelzellen und werden so den CCR7- und CXCR4-Rezeptoren der vorbeifließenden Immunzellen präsentiert. Durch die Bindung kommt es zur schnellen Aktivierung von Signalkaskaden, die das sogenannte “Inside-Out-Signaling” der Integrine auslösen und diese in ihre aktive, bindebereite Konformation bringen. Die aktivierten β_2 -Integrine können dann an das ICAM-1 der Endothelzellen binden und bringen so die Leukozyten zum festen Halt (zusammengefasst in [176]). Diese Situation kann mit dem sogenannten “Flow-Assay” *in vitro* nachgestellt werden. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Cytohesin-1 direkt an das β_2 -Integrin LFA-1 bindet [13]. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Cytohesin-1 in humanen Monozyten-generierten dendritischen Zellen (MoDC) ein positiver Regulator der

Adhäsion an ICAM-1 ist, auch unter Flussbedingungen [23].

Um zu überprüfen, ob in murinen Knochenmarks-generierten dendritischen Zellen (BM-DC) Cytohesin-1 an der Integrin-abhängigen Adhäsion beteiligt ist, wurden Knochenmarks-Stammzellen mit GM-CSF zu DC differenziert und mit spezifischer Cytohesin-1-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden mit LPS stimuliert, um die Reifung zu induzieren. Die reifen BM-DC wurden unter kontrollierten Flussbedingungen über aktivierte murine Endothelzellen geleitet und ihre Adhäsion an das Endothel wurde über Phasenkontrast-Mikroskopie quantifiziert. Abbildung 3.2 zeigt, dass Cytohesin-1 “Knock-down“-BM-DC im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine signifikant reduzierte Adhäsion an das aktivierte Endothel aufweisen. Während in der Kontrolle zwischen 15 und 45 Zellen pro Quadratmillimeter adhären, zeigen bei den Cytohesin-1 RNAi behandelten Zellen nur 5-18 Zellen eine starke Adhäsion an das Endothel. Dies entspricht einer Reduktion von ungefähr 60 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cytohesin-1 in reifen BM-DC ein positiver essentieller Regulator der “Inside-Out” vermittelten Integrin-abhängigen Adhäsion ist.

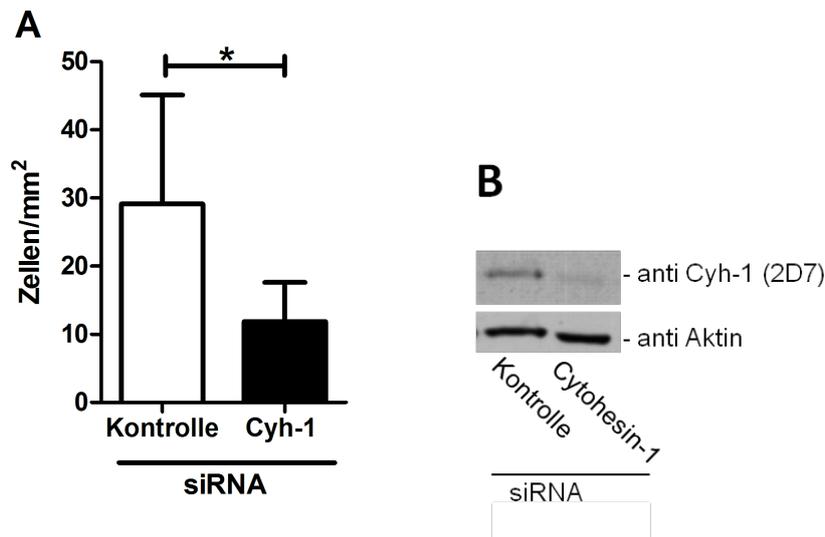


Abbildung 3.2: **Cytohesin-1 reguliert die Adhäsion von BM-DC an Endothelzellen unter Flussbedingungen.** Adhäsionsversuch unter Fluss-Bedingungen (“Flow Assay”). Reife BM-DC wurden nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (weißer Balken) oder Cytohesin-1-siRNA (schwarzer Balken) über TNF α -aktivierte, mit CXCL12 beschichtete Endothelzellen geleitet. Durch die Auswertung statischer Phasenkontrastmikroskopie-Bilder des Endothels nach dem Durchfluss der BM-DC wurden die adhären BM-DC pro mm² quantifiziert (A). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (* = $p < 0.05$). Zur Überprüfung des “Knock-down” auf Proteinebene wurden Zell-Lysate über Western-Blotting mit spezifischem Cytohesin-1-Antikörper analysiert. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle (B). (Modifiziert aus Quast *et al.*, 2009)

3.1.3 Cytohesin-1 ist ein positiver Regulator der Migration muriner dendritischer Zellen in dreidimensionalen Umgebungen

Die beiden vorangehenden Abschnitte zeigen, dass Cytohesin-1 im DC/T-Zell-Kontakt und unter Flussbedingungen die Adhäsion von DC über Integrine positiv reguliert. Aus vorangehenden Arbeiten (Tappertzhofen, Dissertation 2007) ist bekannt, dass Cytohesin-1

die Migration von humanen Mo-DC (*Monocyte derived DC*) fördert. Für die Migration in komplexen dreidimensionalen Umgebungen ist bekannt, dass Integrine für eine schnelle und gerichtete Migration von dendritischen Zellen nicht notwendig sind [87].

Zur Klärung der Frage, inwieweit Cytohesin-1 wichtig für die Migration von DC in komplexen dreidimensionalen Strukturen ist, wurden Cytohesin-1 RNAi behandelte murine Knochenmarks-DC oder Kontrollzellen mit flüssigem Kollagen gemischt und in kleine Glaskammern gefüllt. Nach der Polymerisation des Kollagens befanden sich die DC eingebettet in dreidimensionalem Kontakt zur Kollagenmatrix. Durch Überschichtung des Kollagens mit dem Chemokin CCL19 konnte eine gerichtete Migration der dendritischen Zellen induziert werden. Für jedes 3D-Migrationsexperiment wurde in fünfminütigem Abstand über drei Stunden die Migration durch Videomikroskopie im Phasenkontrast dokumentiert und für jedes einzelne Experiment die zurückgelegten Migrationswege von je 60 individuellen Zellen markiert und mit ImageJ die Migrations-Plots (Abbildung 3.3 A-D), der “Forward Migration Index” (FMI) (E) und die Geschwindigkeit (F) berechnet. Mittels dieser drei definierten Parameter lässt sich die komplexe dreidimensionale Migration der Zellen quantifizieren und somit vergleichbar machen. Die Geschwindigkeit ergibt sich dabei aus der Berechnung der zurückgelegten Distanz im Verhältnis zur Migrationsdauer. Die Direktionalität ist definiert als das Verhältnis der euklidischen Distanz (theoretisch kürzestmögliche Distanz) zur akkumulierten, also tatsächlich zurückgelegten Distanz. Je näher dieser Quotient gegen den Wert 1 geht, desto direktonaler wandern die Zellen. Dabei ist jedoch die Ziel-Richtung nicht mit einkalkuliert. Hierzu dient der FMI, der die Direktionalität in eine definierte Richtung zum Chemokin beschreibt, in diesem Fall der Y-Achsenwert, da das Chemokin von oben appliziert wurde. Abbildung 3.3 (A) zeigt mit Kontroll-siRNA behandelte BM-DC, welche ohne Chemokin-Einfluss lediglich eine ungerichtete Grundmotilität aufweisen. Werden Kontroll-Zellen mit einem Gradienten des Chemokins CCL19 behandelt, dann induziert dies eine gerichtete Migration (B) und der FMI steigt von 0.05 auf 0.6 an (E). Die Behandlung der BM-DC mit Cytohesin-1 siRNA bewirkt eine deutlich verminderte Migrationsgeschwindigkeit der Zellen (F) und eine geringe Direktionalität (C). Darüber hinaus zeigt der FMI bei Cytohesin-1 RNAi-behandelten Zellen einen um 75 % reduzierten Wert im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Die Reduktion des FMI entspricht dabei beinahe dem FMI von unstimulierten Zellen (E). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Cytohesin-1 für eine schnelle und gerichtete Migration in dreidimensionalen Geweben unerlässlich ist.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob Cytohesin-1 RNAi in Integrin^{-/-} BM-DC ebenfalls eine Verminderung der dreidimensionalen Migrationsfähigkeit zur Folge hat. Die Analyse der 3D-Migration von Integrin^{-/-} BM-DC nach Cytohesin-1 “Knock-down” zeigte, dass sich in Integrin-defizienten BM-DC die Migration in komplexen Kollagen-Netzwerken im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Integrin^{-/-} BM-DC nicht unterscheidet, und die Zellen in beiden Fällen gerichtet migrieren (Daten hier nicht gezeigt; s. Quast *et al.*, 2009). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Cytohesin-1 ausschließlich in Integrin-exprimierenden DC entscheidend die Migration in dreidimensionalem

Kollagen fördert.

Da die Migration der BM-DC in diesem Fall nicht auf eine Regulation der Integrine zurückzuführen ist, wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die von Cytohesin-1 im Rahmen der Migration reguliert werden könnten. Die kleine GTPase RhoA wurde als wichtige Komponente zwischen dem Integrin-Signalweg und Cytoskelett-Funktionen beschrieben und ist am Prozess der Zellmigration beteiligt [177]. Es sollte daher geprüft werden, inwieweit die kleine GTPase RhoA für die Migration in dreidimensionalen Umgebungen wichtig ist. Zu diesem Zweck wurden BM-DC mit spezifischen RhoA-siRNA Oligos behandelt, mit LPS gereift und im 3D-Kollagen-Migrations Versuch analysiert. Auch hier zeigt sich, ähnlich dem Cytohesin-1 "Knock-down" Phänotyp, dass der FMI der RhoA-"Knock-down" Zellen um ungefähr 70 % reduziert ist. Die Direktionalität ist mit einem Wert von 0.33 ähnlich stark wie bei Cytohesin-1-"Knock-down"-Zellen perturbiert, und auch die Geschwindigkeit der RhoA-"Knock-down"-Zellen ist um ungefähr ein Drittel im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die GTPase RhoA ein entscheidender Faktor bei der dreidimensionalen Migration von BM-DC ist.

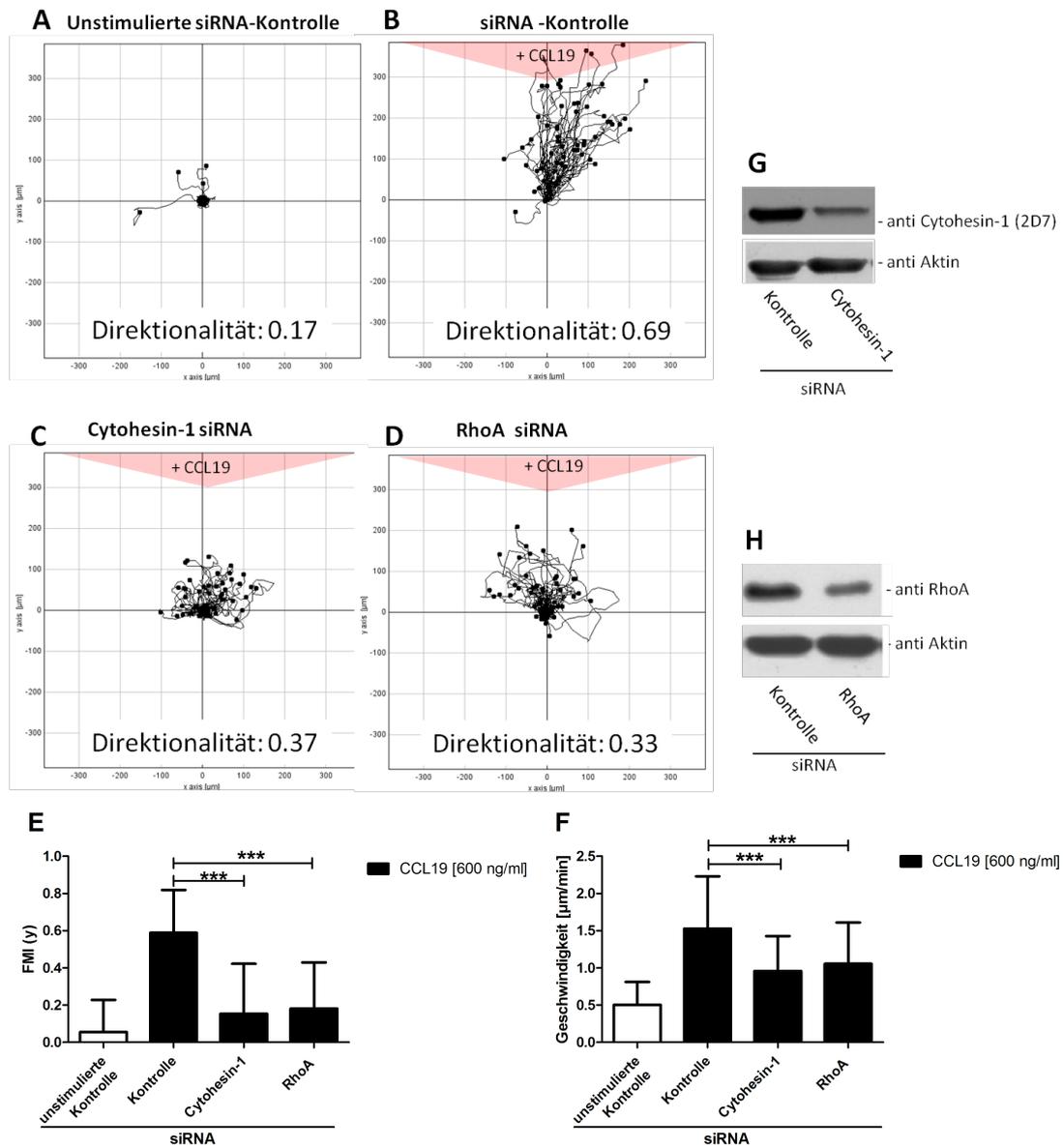


Abbildung 3.3: **Cytohesin-1 und RhoA regulieren die 3D-Migration von BM-DC.** 3D-Kollagen Migrations-Versuch. BM-DC wurden sechs Tage nach der Isolation als hämatopoetische Stammzellen und Differenzierung mit GM-CSF zu DC mit spezifischen Cytohesin-1- beziehungsweise RhoA-siRNA Oligos behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit 200 ng/ml LPS gereift und weitere 24 Stunden später in den 3D-Kollagen-Migrations-Versuch eingesetzt. Die DC wurden nach Polymerisation des Gels mit 600 ng/ml CCL19 stimuliert oder unstimuliert belassen. Für jedes 3D-Migrationsexperiment wurde in fünfminütigem Abstand über drei Stunden die Migration durch Videomikroskopie im Phasenkontrast dokumentiert und für jedes einzelne Experiment die zurückgelegten Migrationswege von je 60 individuellen Zellen markiert und mit ImageJ die Migrations-Plots (A-D), der FMI (E) und die Geschwindigkeit (F) berechnet. Zur Überprüfung des “Knock-down” auf Proteinebene wurden Zell-Lysate über Western-Blotting mit spezifischen Cytohesin-1- (G) und RhoA-Antikörpern (H) analysiert. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (Modifiziert aus Quast *et al.*, 2009)

3.1.4 Cytohesin-1 reguliert die Aktivierung von RhoA in murinen dendritischen Zellen und HeLa-Zellen

Wie in Abschnitt 3.1.3 dieser Arbeit gezeigt wird, ist in murinen reifen DC die Migration nach einem RhoA-“Knock-down” ebenso stark vermindert wie nach einem Cytohesin-1-“Knock-down”. RhoA-GTPasen gehören zur Ras-Superfamilie und sind für wesentliche zelluläre Vorgänge verantwortlich wie zum Beispiel Zellmigration oder Adhäsion (zusammengefasst in [178]), dabei sind für die Migration Veränderungen der Zell-Morphologie durch das Aktin-Zytoskelett essentiell. So beeinflusst RhoA die Zell-Polarisierung, welche Voraussetzung für die chemokingesteuerte Migration ist [179]. Es ist bekannt, dass eine RhoA-Inhibition wie auch der Cytohesin-1 “Knock-down” zu einer verminderten Migrationsfähigkeit bei Mo-DC führen. Auch konnte mittels ELISA ein erster Zusammenhang zwischen Cytohesin-1-“Knock-down” und verminderter RhoA-Aktivität gezeigt werden [23].

Infolgedessen sollte untersucht werden, ob in murinen DC ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Cytohesin-1 und der Aktivität der GTPase RhoA besteht. Zu diesem Zweck wurden BM-DC mit spezifischer Cytohesin-1- oder RhoA-siRNA behandelt und nach dem “Knock-down” im RhoA ELISA hinsichtlich ihrer RhoA-Aktivität quantifiziert. Dabei diente der RhoA-“Knock-down” als Kontrolle für eine maximal erreichbare Aktivitäts-Verminderung. Abbildung 3.4 (A) zeigt, dass der RhoA “Knock-down” in BM-DC eine über 50 %ige Reduktion der RhoA-Aktivität zur Folge hat. Der Cytohesin-1 “Knock-down” bewirkt eine annähernd starke Reduktion um ungefähr 50 %. Um diese Daten weiter zu validieren, wurden HeLa-Zellen als Nicht-Immunzellen nach Cytohesin-1-Überexpression hinsichtlich ihrer RhoA-Aktivität untersucht. Abbildung 3.4 (B) zeigt die RhoA-Aktivität in HeLa-Zellen nach einstündiger Stimulation mit EGF. Die Cytohesin-1 Überexpression bewirkt einen deutlichen Anstieg der RhoA-GTPase Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Wird hingegen die Cytohesin-1 GEF Mutante E157K überexprimiert, so fällt die RhoA-Aktivität sogar noch unter das Niveau der Kontroll-Transfektion zurück. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cytohesin-1 die RhoA-Aktivität in Immunzellen und Nicht-Immunzellen positiv reguliert, und dass zu diesem Zweck die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 von entscheidender Bedeutung ist.

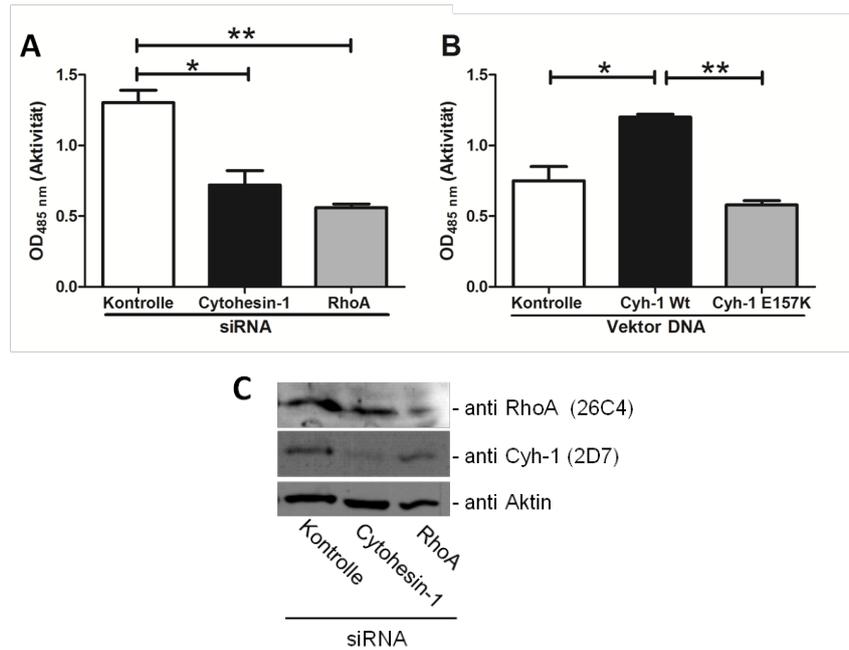


Abbildung 3.4: **Cytohesin-1 reguliert die RhoA-Aktivität in reifen BM-DC (A) und in HeLa-Zellen (B).** RhoA Aktivitäts-ELISA. Reife BM-DC wurden nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (weißer Balken), Cytohesin-1-siRNA (schwarzer Balken) oder RhoA-siRNA (grauer Balken) lysiert. Mittels RhoA-Aktivitäts-ELISA wurde über Absorbionsmessung die RhoA-Aktivität bestimmt. Der RhoA-„Knock-down“ diente als Kontrolle für eine verminderte RhoA-Aktivität (A). HeLa-Zellen wurden mit Überexpressionskonstrukten für Cytohesin-1-Wildtyp (Cyh-1 Wt, schwarzer Balken) oder der Cytohesin-1-GEF-Mutante (Cyh-1 E157K, grauer Balken) transfiziert und 24 Stunden später nach einstündiger Stimulation mit 50 nM EGF lysiert und mittels ELISA hinsichtlich ihrer RhoA-Aktivität untersucht (B). Da die Vektoren eGFP als N-terminales Protein-Tag codieren, erfolgte die Überexpressionskontrolle durch Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden nur HeLa-Zellen mit mindestens 80 % Transfektionseffizienz im ELISA verwendet. Die Abbildungen repräsentieren jeweils drei unabhängige Ergebnisse (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$). Der Western-Blot (C) zeigt exemplarisch einen RhoA-„Knock-down“ und einen Cytohesin-1 „Knock-down“. Zu diesem Zweck wurden die Zellen lysiert und dann mittels Western-Blotting mit einem spezifischen Antikörper für RhoA beziehungsweise Cytohesin-1 angefärbt. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle. (Modifiziert aus Quast *et al.*, 2009)

3.1.5 RhoA vermittelt in BM-DC die Integrin-abhängige Adhäsion unter Flussbedingungen

Im vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass Cytohesin-1 in BM-DC als Aktivator der kleinen GTPase RhoA wirkt. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen an humanen Mo-DC [23] und an T-Zellen [75], dass RhoA-GTPasen an der Integrin-Aktivierung beteiligt sind. Inwieweit RhoA ähnlich wie Cytohesin-1 die Integrin-abhängige Adhäsion von BM-DC beeinflusst, sollte im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden BM-DC mit RhoA-siRNA beziehungsweise Kontroll-siRNA behandelt und 24 Stunden vor dem Adhäsionsversuch mit LPS gereift. Abbildung 3.5 zeigt, dass die RNAi-basierte Verminderung der RhoA-Expression eine ungefähr 30%ige Reduktion der Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen zur Folge hat. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die kleine GTPase RhoA am „Inside-out-Signaling“ zur Integrin-vermittelten Adhäsion von BM-DC beteiligt ist.

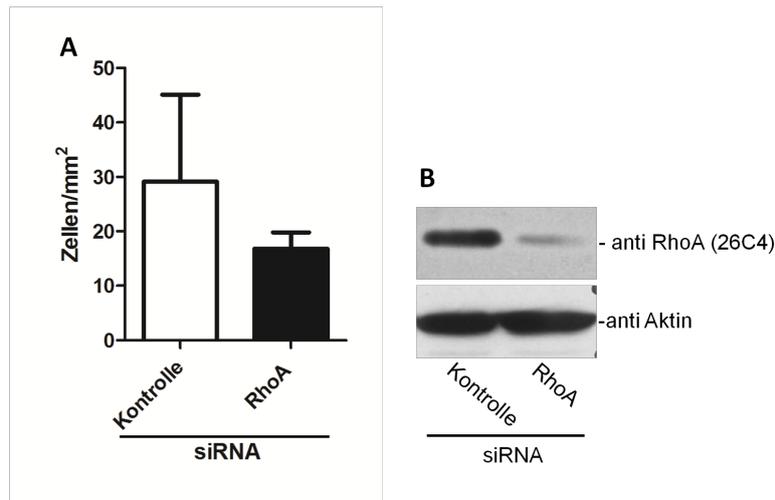


Abbildung 3.5: **RhoA reguliert die Adhäsion von BM-DC an Endothelzellen unter Flussbedingungen.** Adhäsionsversuch unter Fluss-Bedingungen (“Flow Assay”). BM-DC wurden nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (weißer Balken) oder RhoA-siRNA (schwarzer Balken) für 24 Stunden mit 200 ng/ml LPS gereift und über TNF α -aktivierte, mit CXCL12 beschichtete Endothelzellen geleitet. Durch die Auswertung statischer Phasenkontrastmikroskopie-Bilder des Endothels nach dem Durchfluss der BM-DC wurden die adhärenen BM-DC pro mm² quantifiziert (A). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (n=2). Der Western-Blot (B) zeigt exemplarisch einen RhoA-“Knock-down”. Zu diesem Zweck wurden die Zellen lysiert, und dann mittels Western-Blotting mit einem spezifischen Antikörper für RhoA angefärbt. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle. (Modifiziert aus Quast *et al.*, 2009)

3.1.6 Cytohesin-4 wird in DC nach LPS-Aktivierung herunterreguliert

Neben Cytohesin-1 wurde auch die Funktion von Cytohesin-4 in DC untersucht. Cytohesin-4 wird im Gegensatz zu den anderen drei Cytohesinen exklusiv in Zellen hematopoetischen Ursprungs und in lymphoiden Organen exprimiert. Innerhalb der Gruppe der Blutzellen gibt es darüber hinaus auch eine differentielle Expression, so ist Cytohesin-4 insbesondere in T-Zellen und Monozyten exprimiert, weniger in B-Zellen und Granulozyten. Dabei wurde aber lediglich die konstitutive Expression in naiven Zellen untersucht [46]. Über die Expressionsregulation von Cytohesin-4 während der Aktivierung in DC ist bislang nichts bekannt.

Aus diesem Grund sollte geprüft werden, inwieweit Cytohesin-4 einer funktionellen Regulation unterliegt. BM-DC wurden mit 200 ng/ml LPS gereift und über eine semiquantitative PCR die mRNA-Mengen aus unstimulierten oder LPS-stimulierten DC nach 24 Stunden oder 48 Stunden verglichen. Abbildung 3.6 A zeigt, dass die Cytohesin-4 Expression in reifen BM-DC im Vergleich zu unreifen BM-DC um ungefähr 65 % reduziert ist. Insgesamt zeigt sich, dass Cytohesin-4 in BM-DC einer LPS-regulierten Expression unterliegt.

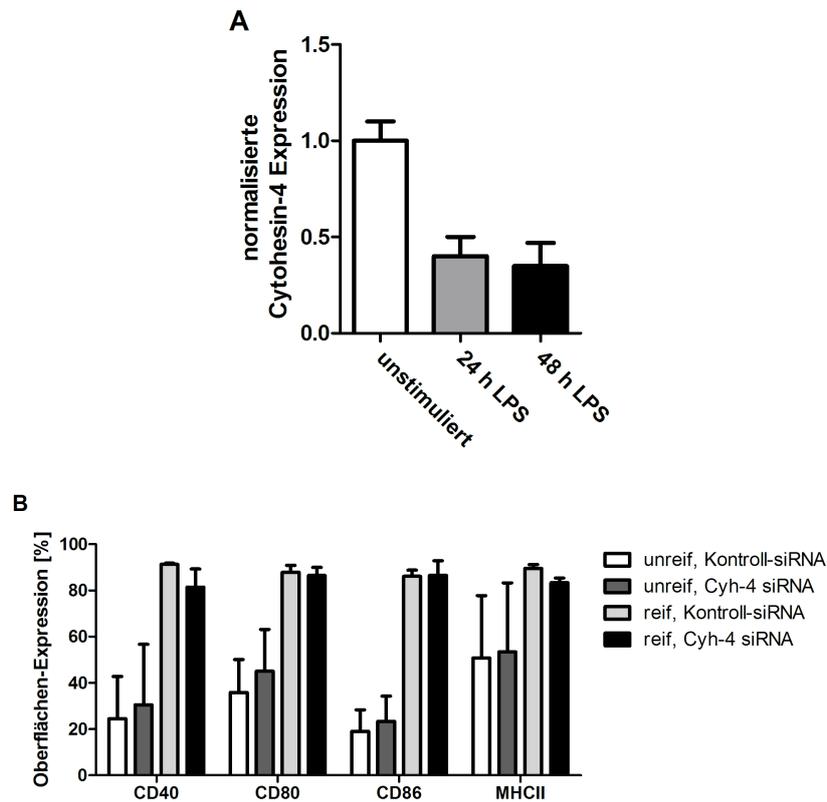


Abbildung 3.6: **Cytohesin-4 wird nach LPS-induzierter Reifung in BM-DC herunterreguliert.** Semiquantitative PCR. BM-DC wurden mit 200 ng/ml LPS für 24 Stunden (grauer Balken) oder 48 Stunden (schwarzer Balken) gereift oder unstimuliert (weißer Balken) belassen. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in semiquantitativer PCR mittels spezifischer Taqman-Sonden die Cytohesin-4 Expression gemessen. Die Normalisierung erfolgte auf die Haushaltsgene 18s und GAPDH, die Cytohesin-4 Expression in unstimulierten BM-DC wurde auf 1 gesetzt (A). FACS-Analyse. BM-DC wurden mit Cytohesin-4-beziehungswise Kontroll-siRNA behandelt, 24 Stunden später mit 200 ng/ml LPS gereift oder ungereift belassen und weitere 24 Stunden später mittels FACS hinsichtlich der Oberflächenexpression der angegebenen Reifungsmarker analysiert (B).

Auch für humane MoDC konnte eine LPS/TNF α -basierte Aktivierungs-Regulation nachgewiesen werden. Der Cytohesin-4 spezifische Antikörper 5B8 zeigt in Western-Blot-Analysen eine deutlich verminderte Cytohesin-4 Expression in humanen DC 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach LPS- und TNF α -induzierter Reifung (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Cytohesin-4 Expression sowohl in murinen als auch in humanen DC Reifungs-induziert herunterreguliert wird.

Die Cytohesin-4 Expression selbst hat keinen Einfluss auf die Maturierung von BM-DC. Die Überprüfung der Oberflächenexpression der Reifungsmarker CD40, CD80, CD86 und MHCII zeigte, dass nach Cytohesin-4 "Knock-down" sowohl in unreifen als auch in reifen BM-DC die Reifungsmarker nicht signifikant abweichend als in Kontrollzellen exprimiert sind (Abbildung 3.6 B).

3.1.7 Cytohesin-4 ist für die dreidimensionale Migration von DC nicht essentiell

Für Cytohesin-1 konnte gezeigt werden (s.a. Abschnitt 3.1.3), dass es maßgeblich an migrationsregulatorischen Prozessen in unterschiedlichen Zelltypen beteiligt ist. Für Cytohesin-4 ist bisher nicht bekannt, ob es ebenfalls in Prozesse der Zellmigration involviert ist. Zur Untersuchung eines Einflusses von Cytohesin-4 auf die Motilität von DC wurde die Migration innerhalb dreidimensionaler Kollagen-Netzwerke untersucht. Hierzu wurden BM-DC sechs Tage nach ihrer Isolation und Differenzierung mit spezifischer Cytohesin-4 siRNA behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen mit LPS für 24 Stunden gereift. Die DC wurden mit Kollagen gemischt, welches bei 37°C polymerisiert und so eine dreidimensionale Umgebung um die Zellen ausbildet. Die Stimulation erfolgte durch Überschichten des Gels mit CCL19. Die Zellen wurden im Phasenkontrast für drei Stunden alle 5 Minuten fotografiert, so dass Zeitrafferfilme generiert wurden, mit deren Hilfe die Zellen hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit, Direktionalität und dem FMI analysiert werden konnten (Abbildung 3.7). Abbildung 3.7 A zeigt unstimulierte Kontroll-Zellen, welche mit 0.34 eine geringe Direktionalität zeigen. Vergleicht man die zurückgelegten Zellpfade von jeweils 60 Einzelzellen, zeigt sich, dass sich die Cytohesin-4 “Knock-down” BM-DC hinsichtlich ihrer 3D-Migration nicht signifikant von CCL19-stimulierten Kontroll-Zellen unterscheiden (B und C). Die Direktionalität der Cytohesin-4 “Knock-down”-Zellen ist mit einem Wert von 0.72 ähnlich der Kontroll-Zell-Direktionalität von 0.8 (B und C). Hinsichtlich der Direktionalität in Richtung des Chemokins (FMI) zeigen Cytohesin-4 “Knock-down”-BM-DC keinen Unterschied zur Kontrolle, die Zellen migrieren mit einem FMI von ungefähr 0.75-0.8 (E). Auch die Geschwindigkeit der Cytohesin-4 “Knock-down”-Zellen entspricht mit 1.25 µm/min der Geschwindigkeit der Kontrollzellen (F). Die Abbildung D zeigt exemplarisch den RNAi-vermittelten “Knock-down” von Cytohesin-4. Mit dem erzielten nicht optimalen Cytohesin-4 “Knock-down” von ungefähr 50 % in BM-DC konnte kein Einfluss von Cytohesin-4 auf die 3D-Migration von reifen BM-DC in Richtung des Chemokins festgestellt werden.

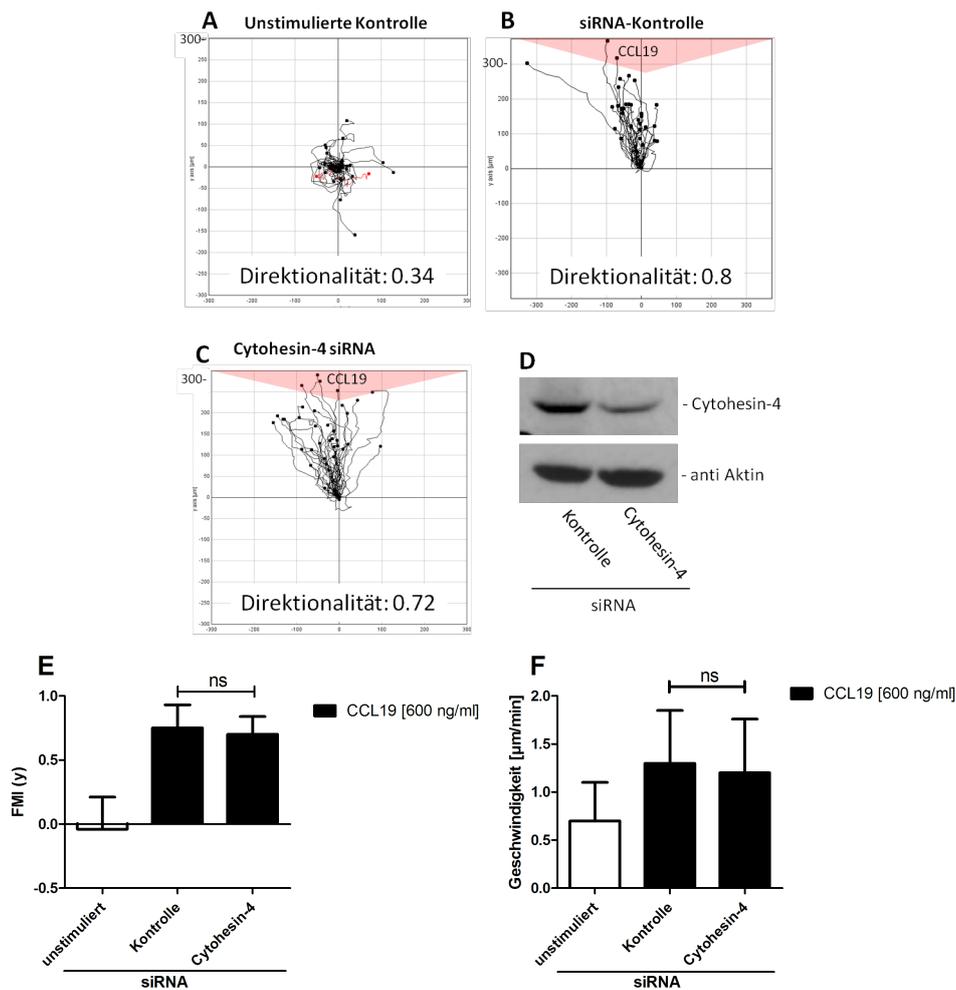


Abbildung 3.7: **Cytohesin-4 ist nicht an der Regulation der 3D-Migration von BM-DC beteiligt.** 3D-Kollagen Migrations-Versuch. BM-DC wurden sechs Tage nach der Isolation als Stammzellen und anschließender Differenzierung mit GM-CSF zu DC mit spezifischen Cytohesin-4-siRNA Oligos behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit 200 ng/ml LPS gereift und weitere 24 Stunden später in den 3D-Kollagen-Migrations-Versuch eingesetzt. Die Zellen wurden nach Polymerisation des Gels mit 600 ng/ml CCL19 stimuliert oder unstimuliert belassen. Für jedes 3D-Migrationsexperiment wurde in fünfminütigem Abstand über drei Stunden die Migration durch Videomikroskopie im Phasenkontrast dokumentiert und für jedes einzelne Experiment die zurückgelegten Migrationswege von je 60 individuellen Zellen markiert und mit ImageJ die Migrations-Plots (A-C), der FMI (E) und die Geschwindigkeit (F) berechnet. Zur Überprüfung des “Knock-down” auf Proteinebene wurden Zell-Lysate über Western-Blotting mit spezifischem Cytohesin-4-Antikörper (D) analysiert. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche (ns=nicht signifikant).

3.1.8 Cytohesin-1 reguliert die Transmigration von unreifen und reifen murinen DC gegensätzlich, während Cytohesin-4 keinen Einfluss auf die Migration hat

In vorangehenden Arbeiten und in Teilen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cytohesin-1 essentiell für die Migration von reifen DC ist ([14, 23]; Abschnitt 3.1.3). In murinen DC ist Cytohesin-1 unabhängig vom Aktivierungsgrad konstitutiv exprimiert (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Cytohesin-4 in unreifen DC (human und murin)

am stärksten exprimiert wird und dann während der Reifung durch LPS deutlich herunterreguliert wird (3.1.6). In unreifen DC ist Cytohesin-4 also am stärksten exprimiert. Da unreife DC aber kaum in dreidimensionalen Kollagengelen wandern (Daten nicht gezeigt), wurde die Migration in einem weiteren Migrations-Versuch mit Hilfe von Transwell-Filtern untersucht. In diesem System ist es möglich, die Migration sowohl von reifen als auch von unreifen DC, welche mit CCL3 stimuliert werden, zu untersuchen. In beiden Fällen wurde durch Anwendung von spezifischen Cytohesin-4-Oligos ein "Knock-down" herbeigeführt (Abbildung 3.8 D). Als Kontrolle diente der Cytohesin-1 "Knock-down", welcher in reifen DC bekannterweise die Migration inhibiert. In dem durchgeführten Transwell-Migrationsversuch zeigt sich, dass RNAi von Cytohesin-4 keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der Migration hat. Sowohl unreife als auch reife Cytohesin-4 "Knock-down"-BM-DC migrieren mit annähernd gleicher Rate wie die Kontroll-Zellen (Abbildung 3.8 A und B). Interessanterweise konnte aber in unreifen murinen DC beobachtet werden, dass der Cytohesin-1-"Knock-down" zu einem signifikanten Anstieg der Transmigrationsrate führte (A), während wie erwartet die Migration reifer BM-DC im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert ist (B). Daraus lässt sich schließen, dass Cytohesin-1 in murinen DC gegensätzliche Funktionen in reifen und unreifen Zellen in Bezug auf die Migration erfüllt.

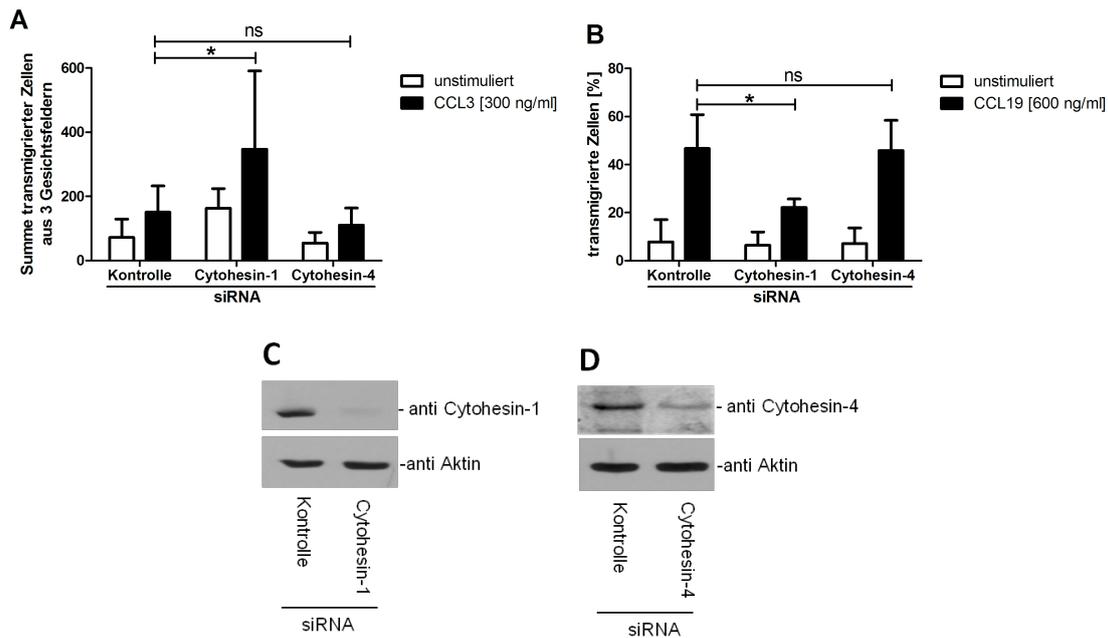


Abbildung 3.8: **Transmigration unreifer und reifer BM-DC nach Cytohesin-1- und Cytohesin-4-RNAi.** Unreife BM-DC wurden mit spezifischen siRNA Oligos gegen Cytohesin-1 oder Cytohesin-4 behandelt. Ein Teil der Zellen wurde mit 200 ng/ml LPS für 24 Stunden gereift (B). Für den Migrationsversuch wurden je $2 \cdot 10^5$ Zellen auf Transwell-Filter ausgesät und für eine Stunde adhärert. Die Stimulation der unreifen BM-DC erfolgte mit 300 ng/ml CCL3 für 16 Stunden (A), die Stimulation der reifen BM-DC mit 600 ng/ml CCL19 für vier Stunden (B). Die Quantifizierung der reifen transmigrierten BM-DC erfolgte durch Bestimmung des Zelltiters im unteren Kompartiment. Bei den unreifen, stark adhärenen BM-DC wurden die Filter herausgetrennt, die Zellen mit CFSE gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops quantifiziert. Die weißen Balken zeigen unstimulierte Proben, die schwarzen Balken Chemokin-stimulierte Proben. Die Ergebnisse der Versuche mit den unreifen BM-DC sind aus sechs unabhängigen Experimenten gemittelt, die Ergebnisse mit den reifen BM-DC aus drei unabhängigen Experimenten. C und D zeigen repräsentative Western-Blots für die Überprüfung der RNAi. 48 Stunden nach siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Western-Blotting die Proteinmenge über Nachweis mit spezifischem Cytohesin-1-(Klon 2D7; C) beziehungsweise Cytohesin-4- Antikörper (Klon 4B6; D) bestimmt. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle.

3.1.9 Unreife BM-DC exprimieren die Cytohesin-1 Tri-Glycin Spleiß-Variante

Die gegensätzliche Wirkung von Cytohesin-1 bei der Migration von reifen und unreifen BM-DC sollte im Folgenden weiter untersucht werden. Es ist bekannt, dass Cytohesin-1 in zwei Protein-Isoformen exprimiert wird, einer Di-Glycin- und einer Tri-Glycin-Variante (ensembl.org; [46]; vergleiche Abbildung 3.9 A). Für Neutrophile ist beschrieben, dass diese Zellen hauptsächlich die Di-Glycin-Variante von Cytohesin-1 exprimieren. In diesem Zelltyp führt RNAi von Cytohesin-1 zu einer verstärkten Migration [25]. Für Leukozyten ist bekannt, dass primär die Tri-Glycin-Variante exprimiert wird ([21]; Kolanus, persönliche Mitteilung).

Daraus ergab sich die Frage, ob unreife DC ähnlich Neutrophilen möglicherweise die Di-Glycin-Variante von Cytohesin-1 exprimieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde "Messenger"-RNA aus reifen und unreifen DC isoliert, in cDNA umgeschrieben und als

Matritze für eine PCR verwendet, deren Primer die Region mit der Glycin-Varianz mit ungefähr 400 bp umfasst. Die PCR-Produkte wurden in einen Basis-Vektor (pBlueKSII) kloniert. Jeweils sechs Klone mit der klonierten Region aus unreifen BM-DC und sechs Klone mit der Region aus unreifen BM-DC wurden sequenziert und auf das Vorhandensein des zusätzlichen Glycin-Exons geprüft. Die Sequenzierung zeigt, dass sowohl in unreifen als auch in reifen DC jeweils die Tri-Glycin-Variante von Cytohesin-1 exprimiert wird (Abbildung 3.9 B). Folglich ist das Di- oder Tri-Glycin Motiv nicht für den unterschiedlichen Migrationsmechanismus, der durch Cytohesin-1 gesteuert wird, verantwortlich.

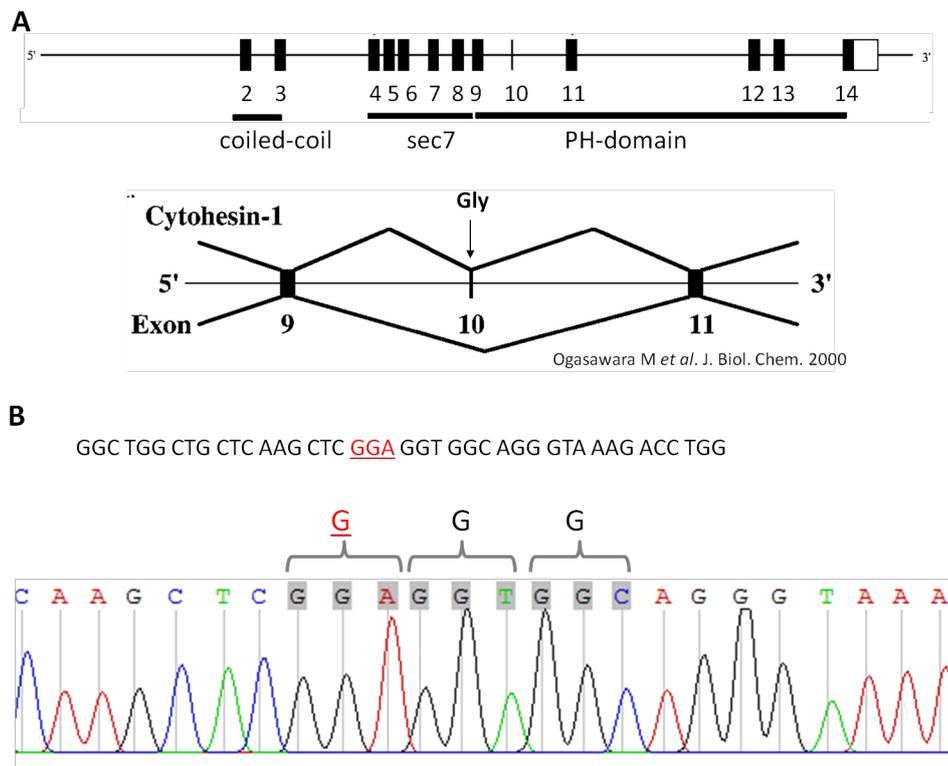


Abbildung 3.9: **Schematische Darstellung der Exon-Struktur des Cytohesin-1 Gens (A)**. Der Cytohesin-1 Genlocus verfügt über ein alternatives Exon (Exon 10), welches ein zusätzliches Glycin codiert. Somit gibt es zwei alternative Spleiß-Produkte der Cytohesin-1-mRNA, die entweder ein Di-Glycin- oder ein Tri-Glycin Motiv codiert (Quelle: Ogasawara; 2000; JBC). **Sequenz-Chromatogramm der Di-/Tri-Glycin Region in unreifen BM-DC (B)**. Dargestellt ist ein exemplarischer Sequenz-Ausschnitt aus sechs unabhängigen Sequenzierungen aus unreifen BM-DC. BM-DC wurden sechs Tage nach der Isolation als Stammzellen und Differenzierung mit GM-CSF mit 200 ng/ml LPS gereift oder ungereift belassen. Die Zellen wurden geerntet, die mRNA wurde isoliert und mit spezifischen Primern, die die Di-/Tri-Glycin Region flankieren als Matritze für die Amplifikation über PCR eingesetzt. Sechs unabhängige PCR-Produkte aus reifen und unreifen BM-DC wurden sequenziert. Das Chromatogramm zeigt die Expression von drei Glycin. G=Glycin

3.2 Cytohesin-4 Funktionen in T-Zellen

3.2.1 Die Cytohesin-4 Expression auf mRNA-Ebene wird nach T-Zell-Rezeptor Aktivierung reduziert

Cytohesin-4 wurde als jüngstes Mitglied der Cytohesin-Familie identifiziert. Es ist beschrieben, dass Cytohesin-4 ausschließlich in Zellen hematopoetischen Ursprungs exprimiert wird, insbesondere in T-Zellen und Monozyten, weniger in B-Zellen und Granulozyten [46]. Somit wurde ein Schwerpunkt der Funktionsaufklärung von Cytohesin-4 auf T-Zellen gelegt. Es ist bekannt, dass Cytohesin-1 und Cytohesin-3 im Rahmen der T-Zell-Rezeptor Aktivierung differentiell reguliert werden [15, 24]. Für Cytohesin-4 hingegen ist bisher nicht untersucht, ob die Expression durch TCR-Aktivierung beeinflusst wird. Um dies zu prüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit $CD4^+$ T-Zellen 16 Stunden nach der Isolation mit anti-CD3/CD28 beschichteten "beads" für verschiedene Zeitpunkte inkubiert, um TCR-induzierte Signalwege zu aktivieren um dann mit Hilfe einer semiquantitativen PCR die relativen Cytohesin-4-mRNA Mengen zu bestimmen. Abbildung 3.10 A zeigt, dass in naiven T-Zellen die Cytohesin-4 mRNA-Level am höchsten sind. Je länger die Zellen über den TCR stimuliert werden, desto mehr nimmt die Cytohesin-4 Expression ab. Nach einem Zeitraum von fünf Stunden wird nur noch ein Drittel der Cytohesin-4 mRNA transkribiert. Die Cytohesin-4 Expression unterliegt demnach einer Repression durch die TCR-Aktivierung.

Desweiteren wurde die Tumor T-Zell-Linie Jurkat E6.1 hinsichtlich ihrer Cytohesin-4 Expression untersucht. Abbildung 3.10 B zeigt, dass die mRNA Level nicht nachweisbar sind, Jurkat-Zellen also kein Cytohesin-4 exprimieren. Die primären naiven PBL hingegen weisen eine Cytohesin-4 Expression auf, die halb so stark wie die Expression des Haushaltsgens GAPDH ist (B).

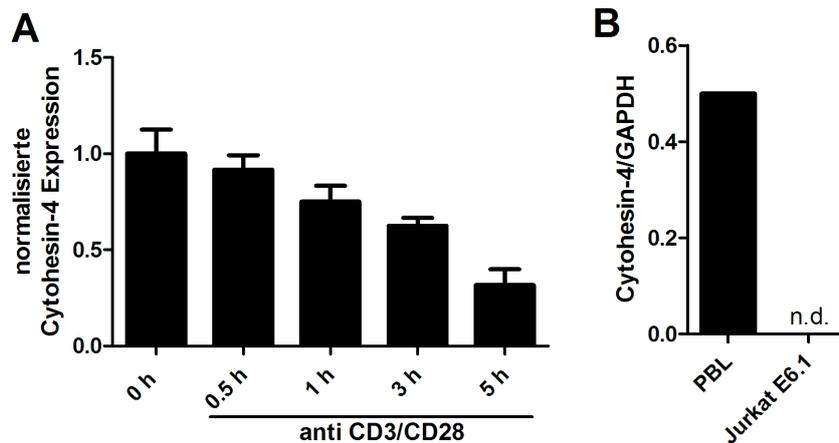


Abbildung 3.10: Die Cytohesin-4 Expression auf mRNA-Ebene wird nach TCR-Aktivierung reduziert (A). Semi quantitative PCR auf CD4⁺ T-Zell-cDNA. CD4⁺ T-Zellen wurden 24 Stunden nach der Isolation mit anti CD3/CD28 beschichteten "beads" für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und anschließend geerntet. Die mRNA wurde isoliert und zu cDNA umgeschrieben und mit einer für Cytohesin-4 spezifischen Taqman-Sonde in der semi quantitativen PCR analysiert. Als Haushaltsgene zur Normalisierung dienten β -2-Microglobulin und HPRT1. Das Experiment repräsentiert zwei unabhängige Ergebnisse (A). **Cytohesin-4 Expression in primären peripheren Blut-Lymphozyten und in der Tumor-T-Zell-Linie Jurkat E6.1 (B).** Semi quantitative PCR. Aus frisch isolierten PBL und Jurkat-Zellen wurde mRNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und in semi quantitativer PCR die Cytohesin-4 mRNA-Mengen über spezifische Cytohesin-4 Taqman-Sonden bestimmt. Die Normalisierung erfolgte in Relation zu GAPDH (B).

3.2.2 Cytohesin-4 aktiviert die Transkription des Zellzyklusregulators p27

Im vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 einer Repression durch die TCR-Aktivierung unterliegt. Ein Kennzeichen erfolgreicher TCR-Aktivierung ist der Anstieg der IL-2 Produktion sowie das Einsetzen der T-Zell Proliferation. Bezüglich der IL-2 Produktion ist bekannt, dass Cytohesin-4 in Jurkat-Zellen in Reporter-Gen Versuchen die IL-2 Produktion stark reprimiert [15, 60]. Das Cytokin IL-2 unterstützt z.B. die Zellteilung aktivierter T-Zellen. Ob Cytohesin-4 einen reprimierenden Einfluss auf die Zellteilung hat, ist bisher nicht bekannt. Daher sollte überprüft werden, ob Cytohesin-4 regulatorisch auf ein Schlüsselprotein des Zellzyklus wirkt, den Zellzyklusinhibitor p27.

p27 ist ein entscheidendes Schalter-Protein im Zellzyklus, der durch FoxO-abhängige Transkription gesteuert durch Komplexbildung mit CyclinE-CDK2 und CyclinD-CDK4 die Progression des Zellzyklus inhibiert. p27 gehört zu den Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin-dependent kinases*; CDKs) und ist Bestandteil des PI3-Kinase-Akt-FoxO Signalwegs (zusammengefasst in [119]).

Um den Einfluss von Cytohesin-4 auf die transkriptionelle Regulation von p27 zu prüfen, wurden primäre humane Blutlymphozyten verwendet, da sie besonders stark Cytohesin-4 exprimieren (s. Abbildung 3.10 B). Die Versuche wurden sowohl mit PBL (peripheren Blut Lymphozyten) als auch mit reinen CD4⁺ T-Zell-Populationen durchgeführt. Mittels AMA-XA-Transfektion wurden Cytohesin-4 spezifische siRNA Oligos in die Zellen eingebracht um die Cytohesin-4 Expression herunterzuregulieren. Die erfolgreiche Herunterregulation wurde für jedes Experiment ebenfalls auf Transkriptionslevel nachgewiesen. Die Abbil-

dungen 3.11 A und 3.11 C zeigen, dass mit diversen für Cytohesin-4 spezifischen Oligos bestenfalls ein „Knock-down“ von 50 % erreicht wird. Diese 50 %ige Reduktion zeigt allerdings deutliche Auswirkungen auf die mRNA-Level des Cyclin-Kinase Inhibitors p27. Bei allen verwendeten Oligos bewirkt die Reduktion der Cytohesin-4 mRNA eine Reduktion der p27 Transkription (Abbildung 3.11 C). Abbildung 3.11 A zeigt die gemittelten Werte aus 11 unabhängigen Versuchen. Dabei zeigt sich, dass eine 50 %ige Reduktion der Cytohesin-4 mRNA im Vergleich zur Kontrolle zu einer ebenso starken Reduktion der p27 Transkript-Level führt. Als Positivkontrolle für diesen Versuch diente der FoxO1 „Knock-down“ (Abbildung 3.11 B). Auch hier konnte über RNAi eine maximale Reduktion der FoxO1-Transkripte um 50 % im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden, und der FoxO1-„Knock-down“ führt zu einer vergleichbaren Reduktion der p27 mRNA wie der Cytohesin-4-„Knock-down“, nämlich um ungefähr 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Da mit dem Cytohesin-4 siRNA Oligo „Cyh-4 4_5“ bestenfalls ein „Knock-down“ von 50 % erzielt wurde, wurden noch drei weitere Cytohesin-4 Oligos einer anderen Firma getestet (Abbildung 3.11 C). Auch diese Oligos können die Cytohesin-4 Expression nicht besser reduzieren. Auch die unterschiedlichen siRNAs für Cytohesin-4 sorgen in allen Fällen für eine mindestens 50 %ige p27-mRNA Reduktion und verhalten sich in dieser Hinsicht gleichwertig. Insgesamt konnte durch diese Versuche Cytohesin-4 als positiver Regulator der p27 Transkription identifiziert werden. Abbildung 3.12 zeigt, dass diese Regulation spezifisch für Cytohesin-4 ist. Ein „Knock-down“ der Cytohesine-1, -2 oder -3 bleibt ohne signifikanten Einfluss auf die p27 Expression.

Desweiteren wurde untersucht, ob sich die transkriptionelle Regulation von Cytohesin-4 auf p27 auch auf Protein-Expressionslevel zeigen lässt. Abbildung 3.13 zeigt, dass die RNAi von Cytohesin-4 die Proteinmenge sowohl 48 Stunden als auch 72 Stunden nach der Transfektion nur schwach reduziert. Die FoxO1-RNAi sorgt hingegen für eine sichtbare Herunterregulation der FoxO1-Protein-Expression. Die Proteinexpression von p27 bleibt allerdings sowohl bei dem qualitativ besseren FoxO1-„Knock-down“ als auch bei dem schwachen Cytohesin-4-„Knock-down“ ungefähr konstant, wenn man die nicht homogene Aktin-Ladekontrolle mit einbezieht. Insgesamt konnte die auf mRNA-Level beobachtete Regulation von p27 durch Cytohesin-4 auf Protein-Ebene nicht bestätigt werden.

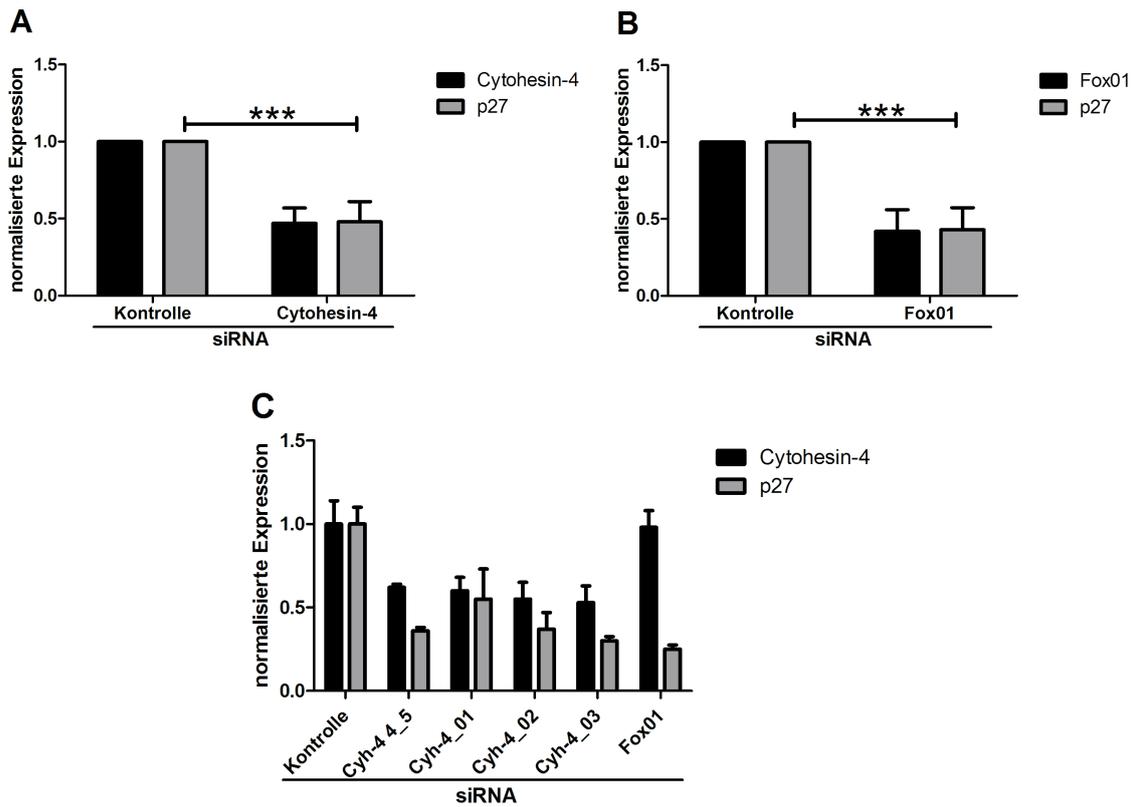


Abbildung 3.11: Cytohesin-4 ist ein positiver Regulator des Zell-Zyklus-Inhibitors p27. Semi-quantitative PCR auf cDNA aus CD4⁺ positiven T-Zellen nach Cytohesin-4 “Knock-down” beziehungsweise FoxO1 “Knock-down”. CD4⁺ positive T-Zellen wurden mit spezifischer Cytohesin-4, FoxO1- beziehungsweise Kontroll-siRNA behandelt und 48 Stunden später geerntet. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben um dann die p27- (grauer Balken) beziehungsweise die Cytohesin-4 Expression (schwarzer Balken, A+C) oder FoxO1 Expression (schwarzer Balken, B) mit spezifischen Taqman-Sonden in der semi-quantitativen PCR zu bestimmen. Als Expressionsreferenz wurden die Haushaltsgene β -2-Microglobulin und HPRT1 verwendet, die Kontrolltransfektionen wurden jeweils auf 1 gesetzt. Die Abbildungen wurden aus elf (A) beziehungsweise acht (B) unabhängigen Experimenten gemittelt (**= $p < 0.001$).

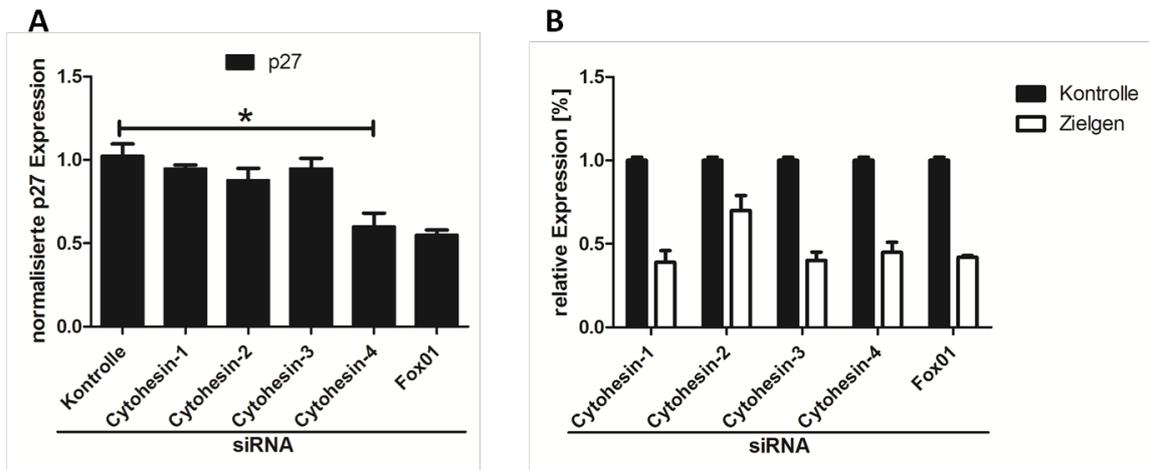


Abbildung 3.12: **Cytohesin-4 ist ein positiver spezifischer Regulator der p27 Expression.** CD4⁺T-Zellen wurden 24 Stunden nach der Isolation mit den spezifischen angegebenen siRNA-Oligos behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet. Die mRNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben und in die semiquantitative PCR eingesetzt. Die Expression des Zell-Zyklusinhibitors p27 wurde mit einer spezifischen Taqman-Sonde gemessen (A; *= $p < 0.05$). Mit spezifischen Taqman-Sonden wurde in semi-quantitativer PCR der korrespondierende "Knock-down" durch die siRNA-Oligos quantifiziert (B; schwarze Balken=Kontroll-siRNA; weiße Balken=spezifischer Zielgen "Knock-down"). Die Normalisierung erfolgte auf die Haushaltsgene β -2-Microglobulin und HPRT1, die siRNA-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

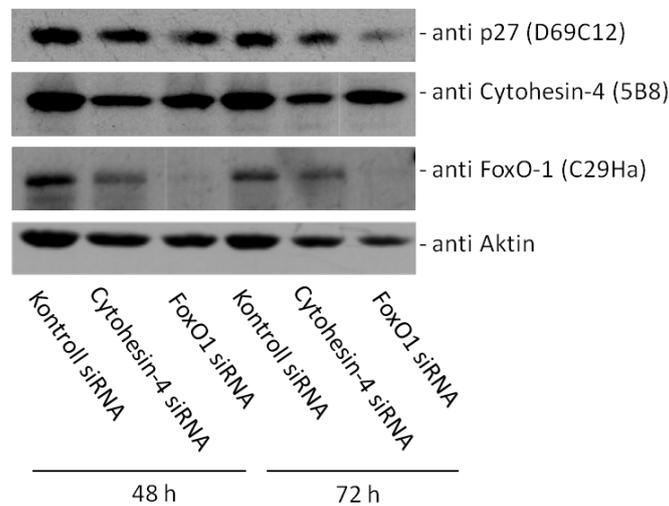


Abbildung 3.13: **Cytohesin-4 reguliert die p27 Expression nicht auf Proteinebene.** CD4⁺T-Zellen wurden 24 Stunden nach der Isolation mit Cytohesin-4-, FoxO1- oder Kontroll-siRNA-Oligos behandelt. 48 Stunden beziehungsweise 72 Stunden später wurden die Zellen geerntet und lysiert. Über Western-Blotting wurden durch einen spezifischen p27-Antikörper die p27-Expression analysiert, sowie über spezifische Antikörper der Cytohesin-4 "Knock-down" beziehungsweise der FoxO1 "Knock-down". Der FoxO1-"Knock-down" diente als Positivkontrolle für die p27 Herunterregulation. Aktin diente als Ladekontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2.3 Cytohesin-4 fördert die FoxO1-Expression

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 die Transkription von p27 fördert. Da p27 als Zielgen von FoxO1 bekannt ist, wurde im Weiteren analysiert, ob Cytohesin-4 möglicherweise positiv regulatorisch auf die FoxO1-Expression wirkt. Da eine maximale Reduktion der Cytohesin-4 Level auf mRNA-Ebene bei 40-50 % lag, wurden verschiedene Cytohesin-4 Oligos über die Überprüfung des eigentlichen Cytohesin-4 "Knock-downs" hinaus auf ihre Wirksamkeit auf die p27-Herunterregulation getestet (vergleiche Abbildung 3.11 C). Bei der Überprüfung (Abbildung 3.14) zeigte sich, dass der Cytohesin-4 "Knock-down" mit verschiedenen Oligos nicht nur eine Reduktion der p27 mRNA-Level zur Folge hat, sondern auch reprimierend auf die Expression des Transkriptionsfaktors FoxO1 wirkt. Das Oligo Cyh-4_5 bewirkt in CD4⁺T-Zellen eine FoxO1 Reduktion von ungefähr 50 %. Die Oligos Cyh-4_02 und Cyh-4_03 zeigen eine um ein Drittel verminderte Expression der FoxO1-mRNA im Vergleich zur Kontrolle, Oligo Cyh-4_01 zeigt eine minimale Reduktion der FoxO1-mRNA Menge (B). Auch wenn die Auswirkung des Cytohesin-4 "Knock-down" die FoxO1-Transkription nicht so stark wie die p27-Transkription beeinflusst, scheint es aber dennoch tendenziell positiv regulatorisch auf die FoxO1-Transkription zu wirken.

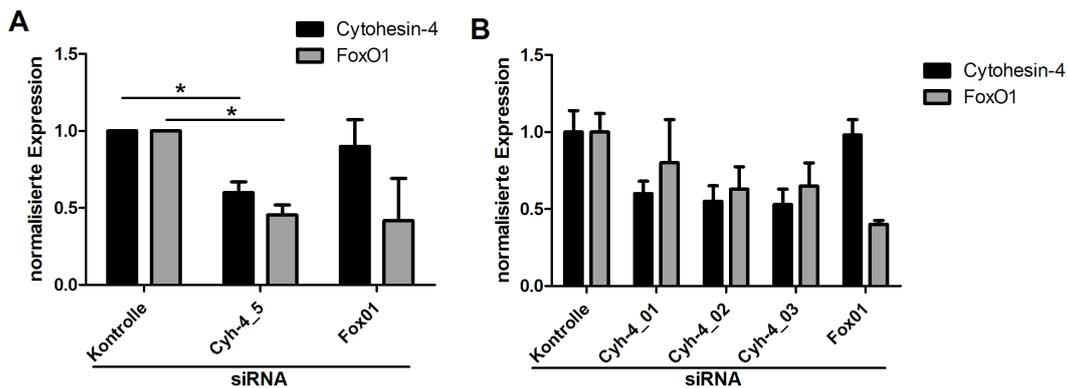


Abbildung 3.14: **Cytohesin-4 hat einen positiven Einfluss auf die FoxO1 Expression in CD4⁺T-Zellen.** CD4⁺T-Zellen wurden 24 Stunden nach der Isolation mit den angegebenen Cytohesin-4 siRNA-Oligos beziehungsweise mit FoxO1- oder Kontroll-siRNA behandelt und 48 Stunden später geerntet. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben um dann die Cytohesin-4 (schwarzer Balken) beziehungsweise die FoxO1-Expression (hellgrauer Balken) mit spezifischen Taqman-Sonden in der semiquantitativen PCR zu bestimmen. Die Normalisierung erfolgte auf die Haushaltsgene β -2-Microglobulin und HPRT1, die siRNA-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Abbildung A zeigt die gemittelten Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen, in Abbildung B werden verschiedene Cytohesin-4 Oligos miteinander verglichen.

3.2.4 Cytohesin-4 hat keinen nachweisbaren Einfluss auf den Zellzyklus von PBL

Wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde, fördert Cytohesin-4 die Transkription des Zellzyklus-Inhibitors p27. Dies wirft die Frage auf, ob Cytohesin-4 nicht nur auf die transkriptionelle Regulation von p27 wirkt, sondern auch auf die Progression des Zellzyklus Einfluss nimmt. Der Zellzyklus wird maßgeblich über den PI3-Kinase-Akt-FoxO-Signalweg gesteuert. Die Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO,

welcher damit aus dem Nukleus ausgeschlossen wird. So wird die Transkription des wichtigen Zell-Zyklus Inhibitors p27 verhindert und die Zelle geht in die Synthese-Phase über. Zur Klärung der Frage, inwieweit Cytohesin-4 eine Funktion im Zellzyklus hat, wurden Zellzyklus-Analysen an Jurkat-Zellen und PBL durchgeführt. Abbildung 3.15 zeigt die drei Zellzyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M von primären, mit siRNA behandelten PBL. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion mit anti CD3/CD28 "Beads" über einen Zeitraum von drei Tagen stimuliert. Anschließend wurden über eine Propidium-Iodid (PI)-Färbung der DNA die Stadien des Zellzyklus quantifiziert (3.15 A). Trotz einer nur 50-60 %igen Reduktion der Proteinmenge (3.15 B) kann beobachtet werden, dass in Cytohesin-4-"Knock-down"-Zellen tendenziell weniger Zellen in der G₀/G₁-Phase verbleiben, sich dafür aber vermehrt in der Synthesephase (S) oder G₂/M-Phase befinden. Die statistische Auswertung zeigte allerdings, dass die Unterschiede nicht signifikant sind. Da die "Knock-down"-Effizienz für Cytohesin-4 bestenfalls bei 60 % lag, wurde die Regulation des Zellzyklus zusätzlich in Jurkat T-Zellen untersucht.

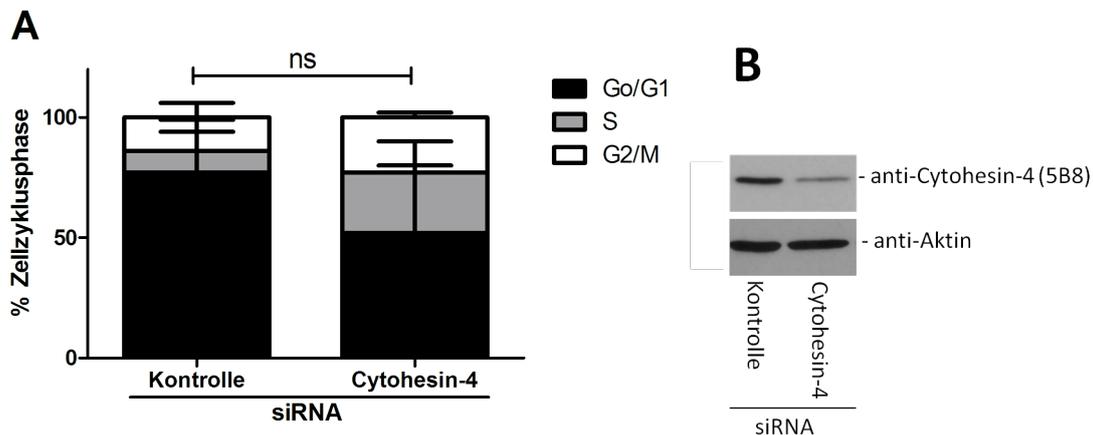


Abbildung 3.15: **RNAi von Cytohesin-4 in PBL fördert die Progression des Zell-Zyklus.** PBL wurden 24 Stunden nach der Isolation mit spezifischen siRNA-Oligos für Cytohesin-4 oder mit Kontroll-siRNA behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit anti-CD3/CD28 beschichteten "beads" für drei Tage stimuliert und dann geerntet und fixiert. Nach RNase-Behandlung wurde die DNA mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre DNA-Mengen analysiert. Gezeigt sind die Prozentwerte der Zell-Zyklus-Phasen G₀/G₁ (schwarz), der Synthese-Phase (S; grau) und der G₂/Mitose-Phase (G₂/M; weiß). Die Abbildung wurde aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt (A). Abbildung B zeigt eine repräsentative "Knock-down"-Überprüfung mittels Western-Blotting und spezifischer Antikörperfärbung für Cytohesin-4. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle.

Hierzu wurde in normalerweise Cytohesin-4-defizienten Jurkat-Zellen (vergleiche Abbildung 3.10 B) Cytohesin-4 überexprimiert. Jurkat-Zellen wurden nach Transfektion mit Cytohesin-4 Konstrukten beziehungsweise Kontroll-Konstrukten für 24 Stunden kultiviert und dann mit anti CD3/CD28 beschichteten „Beads“ über drei Tage stimuliert. Abbildung 3.16 zeigt, dass eine Überexpression von Cytohesin-4 zu keiner Veränderung des Zellzyklus in der Tumor-T-Zell-Linie führt. Trotz starker Regulation des Zellzyklusinhibitors p27 auf transkriptioneller Ebene durch Cytohesin-4 konnte weder in PBL noch in Jurkat-Zellen für Cytohesin-4 eine unmittelbare Repression der Zellzyklus-Progression nachgewiesen werden.

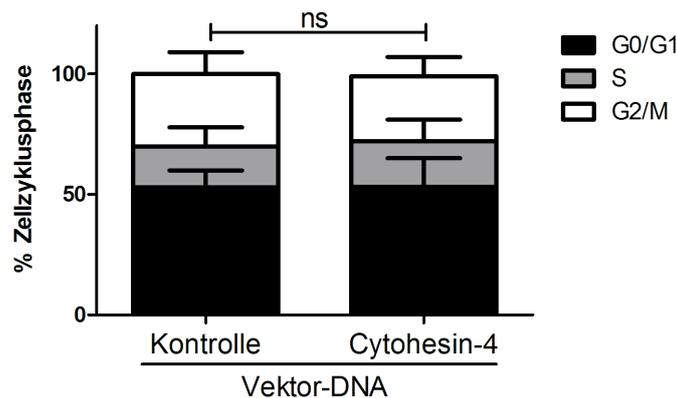


Abbildung 3.16: Die Überexpression von Cytohesin-4 in Jurkat-T-Zellen führt zu keiner Veränderung des Zell-Zyklus. Zell-Zyklus-Analyse mittels PI-Messung im FACS. Jurkat-T-Zellen wurden mit Kontroll- beziehungsweise Cytohesin-4 Überexpressionskonstrukten transfiziert und 24 Stunden später mit anti-CD3/CD28 beschichteten “beads” über fünf Tage stimuliert, anschließend geerntet und fixiert. Nach RNase-Behandlung wurde die DNA mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre DNA-Mengen analysiert. Dargestellt sind die Prozentwerte der Zell-Zyklus-Phasen G0/G1 (schwarz), der Synthese-Phase (S; grau) und der G2/Mitose-Phase (G2/M; weiß). Die Überexpression der Plasmide wurde über GFP-Fluoreszenzmessung durchflusszytometrisch bestimmt und lag für die GFP-Kontrolle bei 50-70%, für das GFP-Cytohesin-4 Konstrukt bei 30-60%. Die Abbildung ist aus sechs unabhängigen Experimenten gemittelt.

3.2.5 Cytohesin-4 reprimiert die Akt-Phosphorylierung

Da Cytohesin-4 aktivierend auf die p27 Transkription wirkt, wurde weiterhin untersucht, ob Cytohesin-4 auch einen Einfluss auf das zentrale Protein des PI3-Kinase/Akt/FoxO Signalwegs, die Proteinkinase Akt, hat. Die Proteinkinase Akt (auch PKB) wird durch erhöhte PIP₃-Konzentrationen an die Plasmamembran rekrutiert. Ebenfalls PIP₃ abhängig kolokalisiert dort PDK-1 (*phospho-inositide dependent protein kinase1*), die Akt am Threonin 308 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung vereinfacht die nachfolgende Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch mTORC-2 (zusammengefasst in [180]).

Um einen Einfluss von Cytohesin-4 auf den Phosphorylierungsstatus von Akt zu untersuchen, wurde in Cytohesin-4 defizienten Jurkat E6 T-Zellen GFP-markiertes Cytohesin-4 überexprimiert. Mittels eines Zellsortierers wurden die GFP-positiven Zellen aufgefangen, so dass eine fast 100% Cytohesin-4 positive Population angereichert wurde. Diese Cytohesin-4 positiven T-Zellen wurden lysiert und im Western-Blot auf ihren Akt-Phosphorylierungs-Status hin untersucht. Abbildung 3.17 zeigt, dass eine Cytohesin-4 Überexpression in Jurkat E6 T-Zellen die sonst konstitutiv vorliegende Phosphorylierung von Akt reduziert. Dies gilt sowohl für die Phosphorylierung an Threonin 308 als auch an Serin 473. Die ribosomale S6-Kinase ist ebenfalls ein Zielprotein des Akt-Signalwegs. Sie wird nach Wachstums-Faktor-Stimulation aktiviert, über Akt und mTOR, und sorgt für verstärkte Proteinexpression und Proliferation (zusammengefasst in [181]). Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass die S6-Kinase nach Cytohesin-4 Überexpression deutlich weniger phosphoryliert wird.

Die Phosphatase PTEN wirkt durch die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ und

durch die Dephosphorylierung von Akt als Gegenspieler des PI3-Kinase/Akt/FoxO Signalwegs. Da Jurkat-Zellen nicht nur für Cytohesin-4, sondern auch für PTEN defizient sind [122], und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Cytohesin-4 zur vollen Funktionsfähigkeit auf die PTEN-Expression angewiesen ist, wurde es in diesem Experiment zusätzlich mit PTEN koexprimiert. Zudem wurde PTEN als Kontrolle einzeln überexprimiert. Abbildung 3.17 zeigt, dass die PTEN Einzelüberexpression einen leichten Rückgang der Akt-Phosphorylierung am Serin 473 und einen etwas stärkeren Rückgang bei der Phosphorylierung am Threonin 308 bewirkt. Die gleichzeitige Überexpression von Cytohesin-4 und PTEN sorgt für eine fast vollständige Dephosphorylierung an beiden Akt-Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung der S6-Kinase ist bei Cytohesin-4 beziehungsweise PTEN-Überexpression reduziert, und fehlt bei Ko-Überexpression beider Proteine fast vollständig. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cytohesin-4 innerhalb des PI3-Kinase/Akt/FoxO Signalwegs entscheidende reprimierende Funktionen ausübt. Der Western Blot ist repräsentativ für 2-6 unabhängige Experimente, wobei für zwei Experimente die Zellen mittels Zellsortierer angereichert wurden.

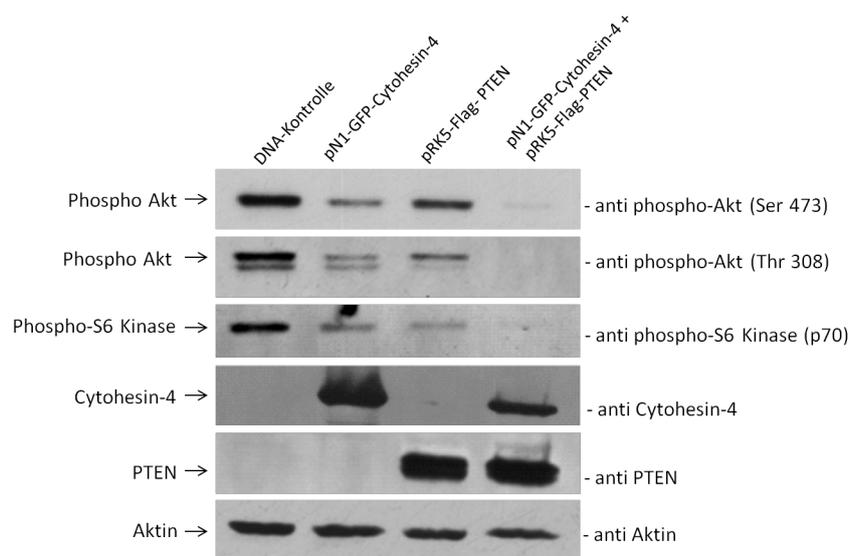


Abbildung 3.17: **Cytohesin-4 ist ein Repressor der Akt-Phosphorylierung.** Western-Blot Analyse. Jurkat-T-Zellen wurden mit Kontroll- beziehungsweise Cytohesin-4 oder PTEN-Überexpressionskonstrukten transfiziert und 24 Stunden später auf GFP-Expression hin sortiert, gerntet und lysiert. Über spezifische Antikörperfärbungen des Protein-Blots wurde die Phosphorylierung von Akt am Serin 473 beziehungsweise am Threonin 308 und an der Phospho-S6-Kinase nachgewiesen. Spezifische Antikörper gegen Cytohesin-4 beziehungsweise PTEN dienen dem Nachweis der Überexpression. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.2.6 Cytohesin-4 ist nicht an der Regulation der T-Zell-Adhäsion und -Migration beteiligt

Neben der Aufklärung von Cytohesin-4 Funktionen in TCR-Signalwegen sollte untersucht werden, ob Cytohesin-4 die Adhäsion oder Migration von T-Zellen reguliert. Für Cytohesin-1 wurde von Kolanus *et al.* (1996) [13] beschrieben, dass es über die direkte Interaktion

mit LFA-1 ein positiver Regulator der T-Zell Adhäsion ist. Auch für Cytohesin-4 konnte eine direkte Interaktion mit dem Integrin LFA-1 nachgewiesen werden (Ming, unveröffentlicht). Infolgedessen sollte geprüft werden, ob Cytohesin-4 die T-Zell Adhäsion reguliert. Zu diesem Zweck wurden PBL nach Cytohesin-4 “Knock-down” hinsichtlich ihrer Adhärenz an den LFA-1 Liganden ICAM-1 untersucht. In Abbildung 3.18 ist die Adhäsion von PBL an ICAM-1 dargestellt. Der Adhäsions-Versuch wurde in 3 cm-Schalen durchgeführt. Die Zellen wurden mit PMA oder dem TCR-aktivierenden Antikörper Okt3 stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Als Positivkontrolle diente Cytohesin-1. Abbildung 3.18 (A) zeigt, dass der Cytohesin-1 “Knock-down” wie erwartet zu einer verminderten Adhäsion an ICAM-1 führt. Der Cytohesin-4 “Knock-down” hingegen zeigt keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen an ICAM-1, es adhären ähnlich viele Zellen wie in der Kontrolle. Insgesamt betrachtet hat in diesem System Cytohesin-4 keinen Einfluss auf die LFA-1 vermittelte Adhäsion an ICAM-1. Die Effizienz des “Knock-down” wurde mittels Western-Blot auf Proteinlevel geprüft und ist in Abbildung 3.18 (B) dargestellt.

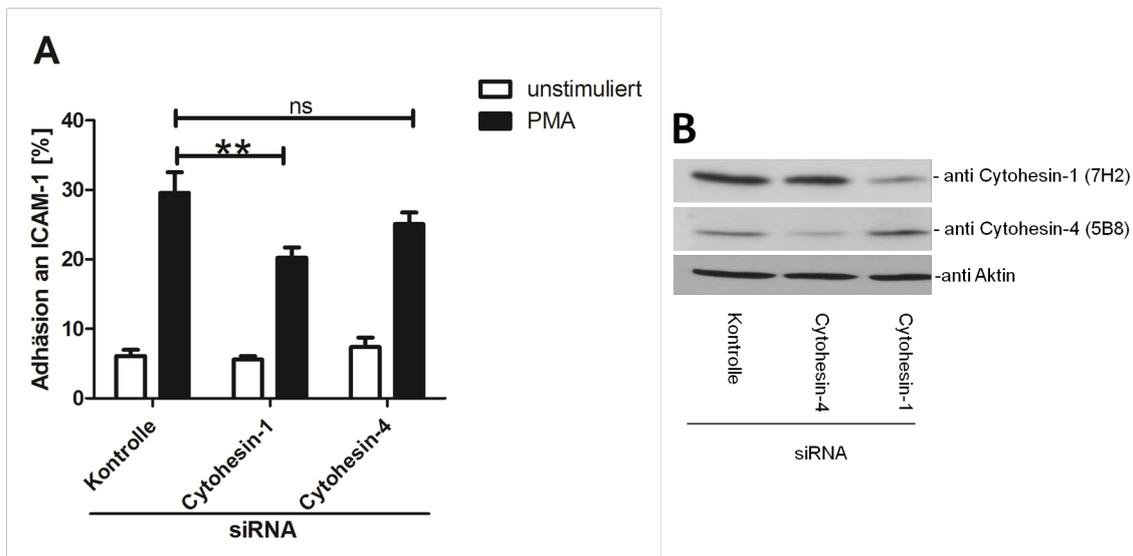


Abbildung 3.18: **Cytohesin-4 ist nicht an der Regulation der Adhäsion von PBL an ICAM-1 beteiligt (A)**. Statischer Adhäsionsversuch. PBL wurden 24 Stunden nach der Isolation mit den angegebenen spezifischen Cytohesin-Oligos beziehungsweise Kontroll-siRNA behandelt und 48 Stunden später hinsichtlich ihrer Adhäsion an ICAM-1 untersucht. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml PMA stimuliert (schwarze Balken) oder unstimuliert belassen (weiße Balken) und wurden nach 45-minütiger Adhäsion mehrfach gewaschen, bis der Referenzbereich kaum noch adhären Zellen zeigte. Die Quantifizierung adhären Zellen erfolgte durch Auszählen mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskops. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche (**= $p < 0.01$; ns= nicht signifikant)(A). 48 Stunden nach siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Western-Blotting die Proteinmenge über Nachweis mit spezifischem Cytohesin-1- beziehungsweise Cytohesin-4-Antikörper (B) bestimmt. Die Aktinfärbung diente als Ladekontrolle.

In Abschnitt 3.1.3 konnte gezeigt werden, dass in DC Cytohesin-1 ein essentieller Regulator der Migration ist. In den Abschnitten 3.1.7 und 3.1.8 wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 hingegen in DC keinen Einfluss auf Migrationsprozesse in 3D-Kollagen-Netzwerken oder im Transwell hat. Ob Cytohesin-4 in T-Zellen die Migration reguliert, sollte im Folgenden geklärt werden. Hierzu wurde GFP-Cytohesin-4 in Jurkat Zellen überexprimiert und

die Transmigration der Zellen in Richtung des Chemokins CXCL12 quantifiziert. Abbildung 3.19 zeigt, dass eine vermehrte Cytohesin-4 Expression in Jurkat-Zellen keine signifikante Änderung des Transmigrationsverhaltens zur Folge hat. Cytohesin-1 diente als Positiv-Kontrolle und zeigt eine leichte Zunahme der Transmigrationsrate sowie eine wie zu erwartende reduzierte Migration nach Überexpression der GEF-Verlust-Mutante E157K. Zusammenfassend konnte für Cytohesin-4 weder in DC noch in T-Zellen ein Einfluss auf die Zellmigration nachgewiesen werden.

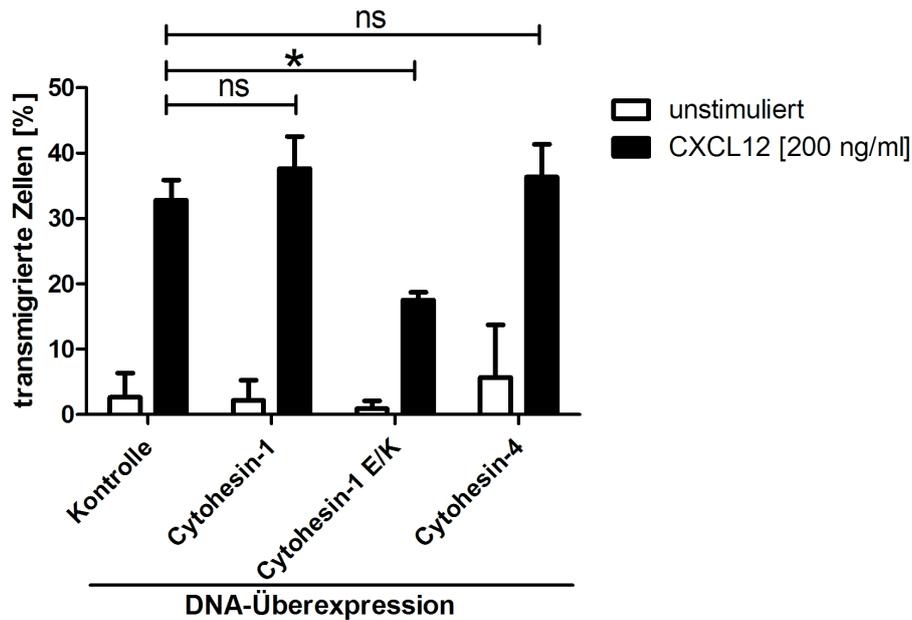


Abbildung 3.19: **Cytohesin-4 ist nicht an der Regulation der Transmigration von Jurkat-T-Zellen beteiligt.** Transwell-Migrations-Versuch. Jurkat-T-Zellen wurden mit Kontroll- beziehungsweise Cytohesin-1- und Cytohesin-4-GFP-Überexpressionskonstrukten transfiziert und 24 Stunden später im Transwell hinsichtlich ihrer Migration untersucht. Nach einstündiger Adhäsion wurden die Zellen mit 200 ng/ml CXCL12 stimuliert (schwarze Balken) beziehungsweise unstimuliert (weiße Balken) belassen. Transmigrierte Zellen wurden durch Auszählen der Zelldichte im unteren Transwell-Kompartiment quantifiziert. Als Positivkontrolle diente Cytohesin-1. Die Überexpression der Proteine wurde über GFP-Quantifizierung durchflusszytometrisch ermittelt und lag bei 30-50 %. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche (*= $p < 0.05$; ns=nicht signifikant).

3.3 Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-1 “Knock-out” in der Maus

3.3.1 Generelle Konstruktion der Targeting-Vektoren

Die Generierung konditionaler oder konstitutiver “Knock-out“-Mäuse ist eine weit verbreitete Methode, um die Funktion eines Gens *in vivo* zu untersuchen. Mittels *Gene Targeting* (englisch: gezielte Veränderung von Genen) wird durch Verwendung eines Targeting-Konstrukts eine Veränderung in das Zielgen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) von Mäusen eingebracht. Dabei wird der zelleigene Prozess der homologen Rekombination aus-

genutzt [182]. Auf positive homologe Rekombination geprüfte ES-Zellen können in Morulae oder Blastozysten injiziert werden und sind dort mit an der Gewebs- und Keimbahnbildung beteiligt. Auf diese Weise kann die Veränderung des Zielgen-Locus an die kommenden Generationen weitergegeben werden.

Je nachdem, ob eine konstitutive oder eine konditionale “Knock-out”-Maus erzeugt werden soll, wird der Ziel-Genbereich entweder deletiert oder mit *loxP*-Bereichen flankiert. Über Transfektion von ES-Zellen wird der linearisierte Targetingvektor eingebracht, so dass er mit der Wildtyp-DNA homolog rekombinieren kann. Dabei steigt die Effizienz einer korrekt targetierten Insertion mit zunehmender Länge der Homologie [182, 183]. Der Prozess der homologen Rekombination ist ein sehr seltenes Ereignis, welches in Säugtieren mit einer Rate von $1:10^6$ - $1:10^5$ pro Zellzyklus stattfindet [184]. Eine Anreicherung stabil transfizierter Klone wird mit Hilfe der integrierten Selektionskassetten erzielt. Das Neomycin-Resistenzgen sorgt dafür, dass nur Zellen, die tatsächlich das Konstrukt aufgenommen haben, unter der G418-Selektion überleben und wachsen können (positive Selektion). Die Einbringung der codierenden Sequenz für das Diphtherietoxin A (DTA) am 5'-Ende des Konstrukts sorgt dafür, dass nur Zellen überleben, in denen das Konstrukt an korrekter Stelle im Genom inseriert hat. Zellen mit ungerichteter Insertion behalten die Sequenz im Genom, wo sie unter zufälliger endogener Promotoraktivität abgelesen wird und das zellgiftige DTA bildet (negative Selektion).

Die Targetingvektoren, die in dieser Arbeit generiert wurden, bestehen aus einem kurzen (5') und einem langen Arm (3') genomischer DNA, die eine mit *frt*-Sequenzbereichen flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette einrahmen, welche 3' einen *loxP*-Sequenz-Bereich trägt. Der distal-flankierende 3' *loxP* Bereich wurde in den 3'-Arm integriert. Im ersten Teil (3.3) des “Knock-out”-Projekts wird die Klonierung des Targetingvektors zur Herstellung einer konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out”-Maus beschrieben, bei der die Exons 2 und 3 mit *loxP*-Sequenz-Bereichen flankiert werden sollen, welche die Deletion des Genbereichs über *Cre*-Aktivität ermöglichen sollen. Nach erfolgter Transfektion mit dem Konstrukt wurde die genomische DNA mausembryonaler Stammzellen über homologe Rekombination manipuliert und die erfolgreiche Integration in den Cytohesin-1-Locus über PCR- und Southern-Blot-Analysen untersucht.

Der zweite Teil (3.4) dieses Projekts beschreibt die Klonierung des Targetingvektors zur Herstellung einer konditionalen Cytohesin-4 Maus. Exons 2 des Cytohesin-4-Gens wurde mit *loxP*-Sequenzbereichen flankiert, welche wiederum die Deletion des Genbereiches über *Cre*-Aktivität ermöglichen sollen.

Die Konstruktion der beiden Targetingvektoren basierte auf der Methode des sogenannten “Recombineering” (*recombination-mediated genetic engineering*), das von Copeland *et al.* [174] beschrieben wurde und sich das Prinzip der Phagen-Gen-basierten homologen Rekombination in speziell konstruierten Bakterien-Stämmen zunutze macht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, sehr große genomische Regionen zu klonieren, ohne dass man auf Restriktionsschnittstellen angewiesen ist. Zum “Recombineering” werden Neomycin/Kanamycin-Selektionskassetten, welche auch die einzubringenden *loxP*-Bereiche

enthalten, mit ungefähr 250 bp langen DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zum gewünschten Integrations-Genlocus sind. Die anschließende Selektion über die integrierte Resistenz erlaubt die Identifizierung solcher Klone, welche die Modifikation integriert haben.

Zur Konstruktion des Targeting-Konstrukts wurde ein pBluescript KSII Vektor verwendet, der mit zwei ungefähr 500 bp langen Homologiebereichen (H1 und H2, Abbildung 3.20-1) versehen war. Die Bereiche wurden über PCR generiert und in den pBluescript KSII kloniert (\rightarrow pBlueH1H2). Sie dienen der Gewinnung der Gesamt-Homologie des Targeting-Konstrukts aus dem entsprechenden BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klon für den gewählten Genlocus. Der BAC-Klon enthält ungefähr 150-250 kb große genomische Bereiche des Zielgenlocus und wurde entsprechend den später verwendeten Stammzellen auf einem genetischen Hintergrund von SV129 gewählt. Der linearisierte pBlueH1H2 wird in die mit dem BAC-Klon transformierten SW102 eingebracht und rekombiniert nach Induktion der "Recombineering"-Gene mit der Zielsequenz. So erhält man den Basis-Vektor auf pBluescript KSII Basis mit der gewünschten Targeting-Homologie (Abbildung 3.20-1). Über das gleiche Prinzip der Bakterien-vermittelten Rekombination wurden nun nachfolgend der distale 3'-*loxP*-Bereich und die *frt-neo-frt-loxP*-Kassette eingefügt. Der distale 3'-*loxP*-Bereich wurde zunächst als *loxP-neo-loxP* Kassette eingebracht (Abbildung 3.20-2) und dann in einem weiteren Schritt über Induktion der *Cre*-Aktivität in den SW106-Bakterien auf eine einzelne *loxP*-"site" reduziert (Abbildung 3.20-3). Im nächsten Schritt erfolgte ebenfalls über homologe Rekombination das Einbringen der *frt-neo-frt-loxP*-Kassette (Abbildung 3.20-4). Der genaue Aufbau der Neomycin-Kassetten ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Das Neomycin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle des eukaryotischen PGK-Promotors und des bakteriellen EM7-Promoters. Das "Bovine growth hormone polyadenylation" Signal (bGHpA) liefert das Stopp-Signal durch Polyadenylierung. Der Resistenzbereich kann später durch die vorliegende Flankierung mit *frt*-"sites" (FRT) deletiert werden. Die *loxP*-"site" (*loxP*) wird zur 5'-Flankierung der Exon-Deletion genutzt. Nach jedem Rekombinations-Ereignis wurden die jeweiligen Konstrukte zwecks Konkatamer-Vermeidung mit *NotI* linearisiert und wieder religiert. Das Einbringen der DTA-Kassette erfolgte über konventionelle Klonierung über *NotI* und *PspOmI*. Die *NotI*-Schnittstelle ermöglicht zudem die Linearisierung der Targeting-Konstrukte (Abbildung 3.20-5).

Klonierungsstrategie für Targeting-Vektoren

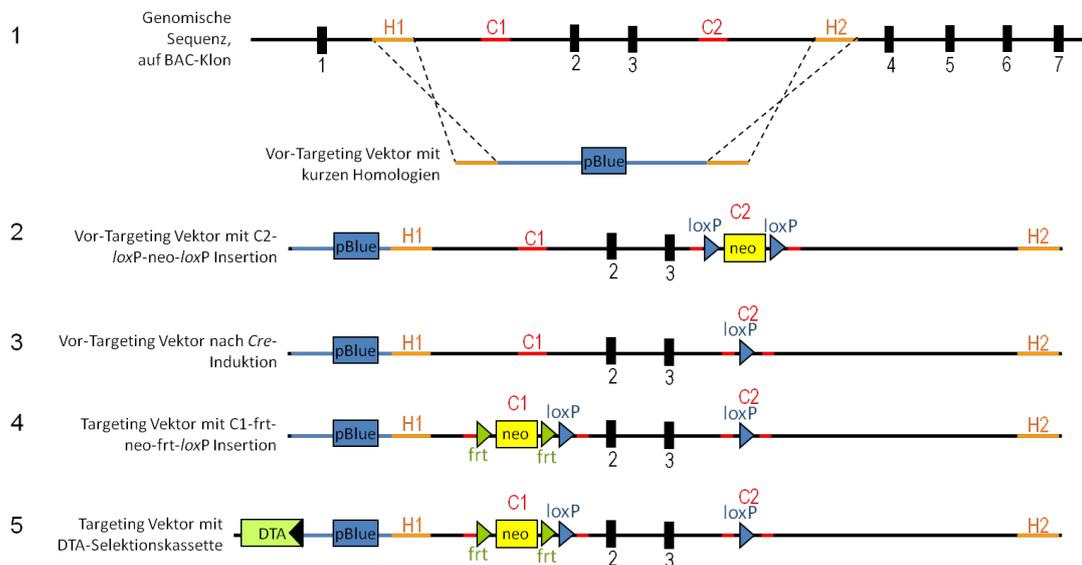


Abbildung 3.20: **Klonierungsstrategie für Targeting-Vektoren.** Als Vor-Targeting-Vektor wird ein pBluescript KSII Hintergrund mit zwei ungefähr 500 bp langen Homologien ausgestattet. Über "Recombineering" in speziellen Bakterienstämmen wird so ein Sequenzbereich von ungefähr 15-17 kb aus einem BAC-Klon in den Vektor kloniert. Dieser Bereich ist die Grundlage für die homologe Rekombination in den ES-Zellen (1). Ziel des konditionalen Austausch-Vektors ist die Flankierung eines oder mehrerer früherer Exons mit zwei *loxP*-sites. Die 3'-*loxP*-site besteht ursprünglich aus zwei *loxP*-sites und einer Resistenzkassette, welche über kurze Homologien in den Zielbereich hinein-rekombiniert wird (2). Unter zu Hilfe-nahme der *Cre*-Funktion des Wirt-Bakterienstamms wird die Selektionskassette entfernt und hinterlässt eine einzelne 3'-*loxP* site (3). Anschließend wird die 5' flankierende *loxP*-site eingebracht. Sie ist Teil einer Kassette mit Selektionsmarker (*neo*), welcher durch die flankierenden *frt*-sites später durch Kreuzung mit Flp-Deleter-Mäusen entfernt werden kann. Die Kassette wird ebenfalls über kurze Homologien in den Zielbereich rekombiniert (4). Der Resistenzmarker dient in den ES-Zellen der Positiv-Selektion. Im finalen Schritt erhält das Targeting-Konstrukt durch Einklonieren des Dyphterie-Toxin A-Gens (DTA) eine negative Selektionskassette, um die Wahrscheinlichkeit von zufälligen Insertionen in das ES-Zell Genom zu vermindern (5). (pBlue= pBluescriptKSII-Vektor-Rückrad mit Ampicillin-Resistenzgen, Origin of Replication, multiple cloning site). Schwarze Balken mit Nummern stehen beispielhaft für Exon-Strukturen im Genom. C1= Homologiebereich für die Insertion der Kassette C1 mit *frt*-*neo*-*frt*-*loxP*, C2=Homologiebereich für die Insertion der Kassette C2 mit *loxP*-*neo*-*loxP*, H1= Homologiebereich, der die Gesamthomologie am 5'-Ende begrenzt, H2= Homologiebereich, der die Gesamt-Homologie am 3'-Ende begrenzt, *neo*=Neomycin beziehungsweise Kanamycin-Resistenzgen.

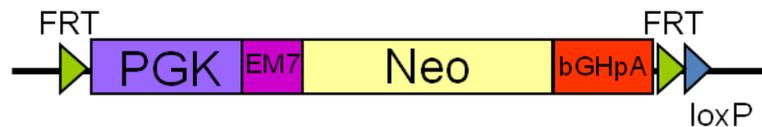


Abbildung 3.21: **Kassette aus pL451.** Das Neomycin-Resistenzgen (*Neo*) steht unter Kontrolle des eukaryotischen PGK-Promotors (PGK) und des bakteriellen EM7-Promotors (EM). Das "Bovine growth hormone polyadenylation" Signal (*bGHpA*) liefert das Stopp-Signal durch Polyadenylierung. Der Resistenzbereich kann später durch die vorliegende Flankierung mit *frt*-sites" (FRT) deletiert werden. Die *loxP*-site" (*loxP*) wird zur 5'-Flankierung der Exon-Deletion genutzt.

3.3.2 Konstruktion des konditionalen Cytohesin-1 Targetingvektors

Der Maus Cytohesin-1 Genlocus liegt auf Chromosom 11 und umfasst 84385 bp. Das Gen besteht aus 14 Exons, von denen Exon 10 nachgewiesenerweise alternativ gespleißt werden kann (Abbildung 3.22). Der offene Leserahmen (open reading frame, ORF) beginnt in Exon 1 (Quelle: ensembl.org genome browser). Der Verlust von Exon 2 und Exon 3 durch *cre*-induzierte Deletion würde zu einem Transkript führen, welches noch 13 Aminosäuren codiert bevor es zum Sequenzabbruch kommt. Es wird nicht erwartet, dass die Expression dieses kurzen Peptids zu funktionellen Effekten führt.

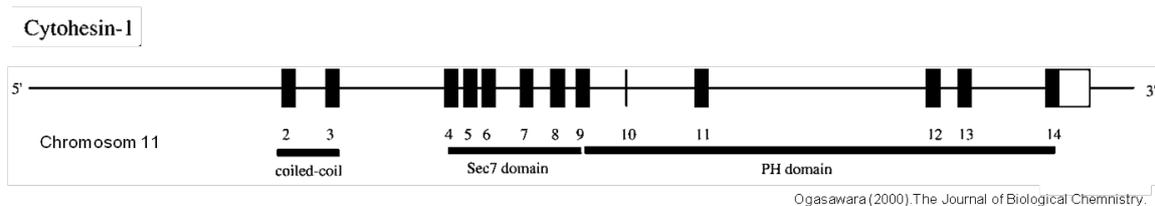


Abbildung 3.22: **Schematische Darstellung der Gen-Struktur von Cytohesin-1.** Das Cytohesin-1 Gen der Maus liegt auf Chromosom 11 und umfasst 14 Exons, wobei Exon 10 alternativ herausgespleißt werden kann. Die Exons 2-3 codieren die aminoternale "coiled-coil"-Domäne, die Exons 4-9 die katalytische Sec7-Domäne, die Exons 9-14 die carboxyterminale PH-Domäne (Quelle: Ogasawara, 2000, JBC).

Der generierte 17816 bp lange Cytohesin-1 Targetingvektor besteht aus einem 2070 bp umfassenden kurzen Arm, welcher im Genom in Intron 1-2 liegt, einer *frt*-flankierten Neomycin/ Kanamycin-Selektionskassette und daran angrenzendem einzelnen *loxP*-Bereich und einem langen Arm von 9588 bp, der zusätzlich den 3'-*loxP*-Bereich enthält, welcher 7094 bp vom 5'-*loxP*-Bereich entfernt liegt, dies entspricht im Genom Intron 3-4.

Die *loxP*-neo-*loxP*-Kassette wurde in die ungefähr 500 bp große C2-Region über konventionelle Klonierung eingebracht. Hierzu wurde die Kassette aus dem Vektor pL452 (s. Anhang; [164]) mittels *XhoI* und *BamHI*-Restriktion herausgetrennt und nach Auffüllen der Überhänge in die endogene *NsiI* Schnittstelle der C2-Kassette kloniert. Die so mit je 250 bp Homologie flankierte *loxP*-neo-*loxP*-Kassette wurde über *BamHI/ClaI/DraI* aus dem Vektor geschnitten und in die Bakterien-Rekombination eingesetzt. Die *frt*-neo-*frt-loxP*-Kassette wurde analog kloniert, über *XhoI* aus dem Vektor pL451 (s. Anhang; [164]) geschnitten und nach Auffüllen der Überhänge *blunt* durch die endogen vorliegende *StuI* geöffnete C1-Region einkloniert. Die so durch jeweils ungefähr 250 bp flankierte *frt*-neo-*frt-loxP*-Kassette wurde *NotI/XhoI/ApaLI* herausgeschnitten und dadurch linearisiert, sodass sie über die in den Bakterien induzierte Rekombination in das Vorkonstrukt eingefügt werden konnte (vergleiche hierzu auch 2.2.3).

Die Strategie sieht weiterhin vor, die genomischen Restriktionsschnittstellen *XbaI* für den 5'-Southern beziehungsweise *EcoRI* für den 3'-Southern zu nutzen. Im Wildtyp Locus ergibt sich durch Markierung mit der 5' Sonde ein Fragment von 6 kb-Länge. Nach erfolgreicher Rekombination des Targeting-Konstrukts wird eine zusätzliche *XbaI*-Schnittstelle eingefügt, welche in der *frt*-neo-*frt-loxP*-Kassette enthalten ist. Damit verkürzt sich der durch die 5'-Sonde markierte genomische Abschnitt auf 4.4 kb. Für die 3'-Strategie er-

gibt die Restriktion mit *EcoRI* ein genomisches Fragment von 6.8 kb Länge, welches durch die 3' Sonde detektiert wird. Durch die Insertion des Targeting-Konstrukts wird durch die *Linker*-Region im 3'-*loxP*-Bereich eine zusätzliche *EcoRI* Schnittstelle eingebracht, so dass sich das detektierte Fragment auf 5.2 kb verkürzt (vergleiche hierzu Abbildung 3.23). Zur Überprüfung der Einzel-Insertion des Targetingvektors in das Genom, also dem Ausschluss einer zufälligen Fehl-Integration, wurde eine interne Neo-Sonde verwendet, welche spezifisch in der Neomycin-Sequenz des Targeting-Konstrukts bindet. Für die Restriktions-Strategie wurde das Enzym *Bam*HI gewählt, welches zum Einen 3' der Neomycin-Sequenz schneidet, zum Anderen aber 5' keine korrespondierende Schnittstelle mehr innerhalb des Targetingvektors hat, sondern ausserhalb der targetierten Region schneidet. Dies ist wichtig, da sonst auch bei Fehlintegrationen immer nur eine Einzelbande detektiert werden würde. Dadurch, dass die 5' Schnittstelle bei Fehl-Insertionen beliebig entfernt sein kann, geben zusätzliche Banden unbekannter Größe einen Hinweis auf Mehrfach-Insertionen des Konstrukts im Genom.

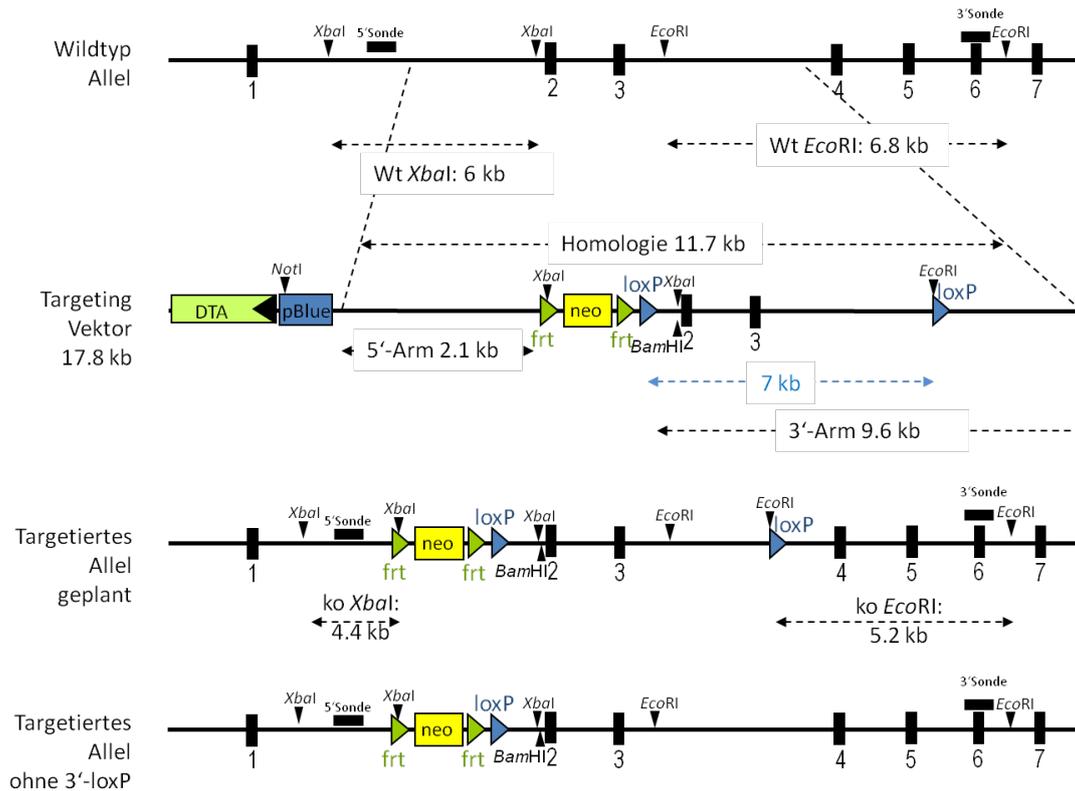


Abbildung 3.23: **Strategie für einen konditionalen Cytohesin-1 "Knock-out"**. Ziel der konditionalen Cytohesin-1 "Knock-out"-Strategie ist es, die Exons 2 und 3 mit *loxP*-sites zu flankieren (siehe Targeting-Vektor). Der Homologie-Bereich des Targeting-Vektors umfasst 11.7 kb der Cytohesin-1 Gen-Sequenz. Die 5'-Southern-Strategie beruht auf einer Restriktion mit *XbaI*, die eine durch die 5' Sonde detektierte Wildtyp-Bande von 6 kb ergibt. Durch die Einbringung der *frt*-*neo*-*frt*-*loxP*-Kassette mit einer zusätzlichen *XbaI*-site wird dieses Fragment im Fall der homologen Rekombination auf 4.4 kb verkürzt. Die 3'-Southern-Strategie basiert auf einer Restriktion mit *EcoRI*, welche im Wildtypfall ein Fragment von 6.8 kb erzeugt. Durch die 3' *loxP*-site wird eine zusätzliche *EcoRI*-site eingebracht, die im Fall der homologen Rekombination das Fragment auf 5.2 kb verkürzt. Der Abstand der beiden *loxP*-sites zueinander liegt bei 7 kb. Die Deletion von Exon 2 und Exon 3 in Verpaarungen mit *Cre*-Mäusen führt zu einer Änderung des *open reading frame* (ORF), welche in einem Stopp-Codon nach 16 translatierten Aminosäuren resultiert. Der Abbruch des Transkripts nach Exon-1 führt zu einem Full-"Knock-out" des Cytohesin-1 Gens.

3.3.3 Ergebnisse der PCR-"Screenings" für Cytohesin-1

Für eine Anreicherung positiv-transfizierter ES-Zell-Klone wurden bereits zwei Selektionsmarker in das Targeting-Konstrukt eingebaut. Das Neomycin-Resistenzgen sorgt dafür, dass nur Zellen, die tatsächlich das Konstrukt aufgenommen haben, unter der G418-Selektion überleben und wachsen können. Die Einbringung der codierenden Sequenz für das Dyphterietoxin A (DTA) am 5'-Ende des Konstrukts sorgt dafür, dass nur die Zellen überleben, in denen das Konstrukt an korrekter Stelle im Genom inseriert hat. Zellen mit zufälliger Insertion behalten die Sequenz im Genom, wo sie unter zufälliger endogener Promotoraktivität abgelesen wird und das zellgiftige DTA bildet. Trotz dieser zweifachen Selektion und Anreicherung positiver Klone ist ein schnelles verlässliches "Screening" der ES-Zell-Klone unabdingbar. Zu diesem Zweck wurde eine "Screening"-PCR etabliert,

mit deren Hilfe innerhalb weniger Stunden potentielle positive ES-Zell Klone identifiziert werden konnten. Dieses PCR-„Screening“ wurde dem zuverlässigeren aber zeitintensiveren „Screening“ über Southern Blotting vorangestellt. E14-ES-Zellen (Hintergrund SV129/P2 ola) wurden mit dem linearisierten Cytohesin-1-Targetingvektor elektroporiert und anschließend sieben bis zehn Tage unter G418-Selektion bis zur Klon-Bildung kultiviert und dann über PCR auf homologe Rekombinationsereignisse getestet. Aus ES-Zell-Klonen aus semikonfluenten 48-Lochplatten wurde genomische DNA isoliert und als Matrize in die PCR eingesetzt, die über den kurzen Arm des Targeting-Konstrukts läuft. Der „Primer“ *pscd1 Scr P1 for* bindet ausserhalb der targetierten Region, der „Primer“ *PGK rev* liegt innerhalb der Resistenzkassette. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von 2.6 kb. Zur Positivkontrolle wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die *C1-frt-neo-frt-loxP*-Kassette über homologe Rekombination in das BAC-Klon Plasmid eingebracht wurde. Genomische DNA diente als Negativkontrolle für unspezifische PCR-Produkte. Zur qualitativen Überprüfung der jeweiligen Klon-DNA wurde jeweils parallel eine Wildtyp-PCR mit den Primern *pscd1 Sc P1 for* und *pscd1 C1 rev* durchgeführt, die in jedem Fall ein Produkt von ungefähr 2.5 kb ergeben sollte (nicht gezeigt). Abbildung 3.24 zeigt die aus 800 getesteten vier positiven Klone, welche das erwartete PCR-Produkt bei 2.6 kb aufweisen.

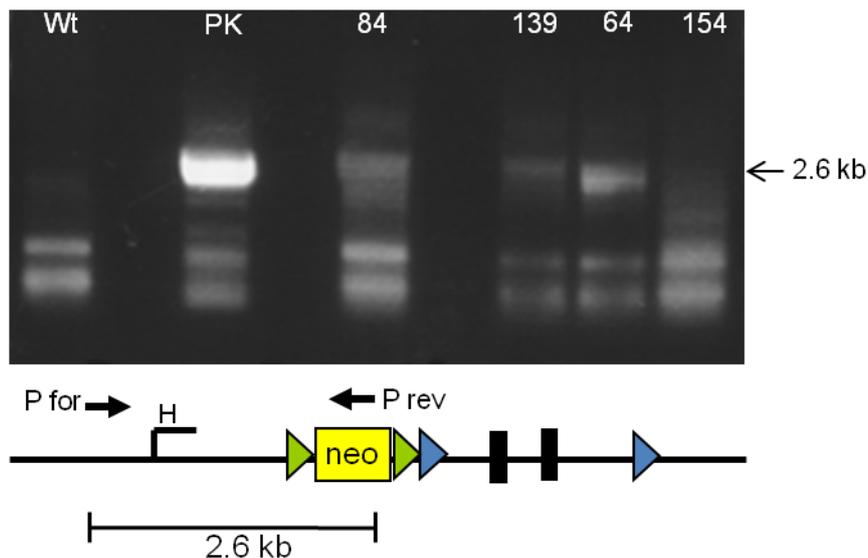


Abbildung 3.24: Ergebnisse der PCR-„Screenings“ für Cytohesin-1 ES-Zell-Klone. Ca. 800 ES-Zell-Klone aus zwei Transfektionen mit dem Cytohesin-1 Targeting-Vektor wurden geerntet, lysiert, die genomische DNA aufgereinigt und in die 5'-„Screening“-PCR eingesetzt. Der „Primer“ *pscd1 Scr P1 for* (P for) liegt 5' ausserhalb der targetierten Region (H; Homologiebereich). Der reverse „Primer“ *PGK rev* (P rev) liegt innerhalb der neo-Selektionskassette. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Größe von ungefähr 2.6 kb. Die Klone I-84, II-139, II-64 und II-154 zeigen das erwartete PCR-Produkt bei 2.6 kb. Als Positivkontrolle (PK) diente ein Konstrukt auf genomischer BAC-Klon-Basis mit integrierter *frt-neo-frt-loxP*-Kassette. Als Negativ-Kontrolle wurde eine PCR auf Wildtyp-DNA (Wt) durchgeführt.

3.3.4 Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen für Cytohesin-1

Die PCR-positiven-Klone (vergleiche Abschnitt 3.3.3) wurden zur Überprüfung der vollständigen Integration des Targetingvektors im Genom über Southern-Blot Analysen weiter verifiziert. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, wurde die vollständige Insertion des 5'-Arms über eine *Xba*I-Restriktions-Strategie geprüft. Für die Klone II-64, I-84 und II-154 detektiert die spezifische 5'-Sonde sowohl das Wildtyp-Fragment bei 6 kb als auch das durch die zusätzlich eingebrachte *Xba*I-Schnittstelle verkürzte "Knock-out"-Fragment bei 4.4 kb (Abbildung 3.25 A). Somit ist in diesen Klonen der 5'-Arm vollständig im Genom integriert. Bei der Überprüfung der Insertion des 3'-Arms wird von der 3'-spezifischen Sonde bei allen Klonen lediglich das auf der *Eco*RI-basierten Strategie generierte Wildtyp-Fragment bei 6.8 kb erkannt. Keiner der Klone zeigt die für die vollständige 3'-Insertion erwartete Bande bei 5.2 kb, die durch Insertion des Vektors zusätzlich entstanden wäre (B). Zur Überprüfung der Einfach-Insertion ins Genom und dem Ausschluss, dass das Konstrukt mehrfach im Genom inseriert hat, wurden die Klone mit einer internen Neo-Sonde basierend auf einer Restriktions-Strategie mit *Bam*HI auf Mehrfach-Insertionen geprüft (C). Hier zeigt sich, dass alle getesteten Klone das erwartete Fragment bei 10 kb aufweisen, und somit das Konstrukt nur jeweils einmal ins Genom aufgenommen haben. Gleichzeitig zeigt dieser Southern, dass die Klone das Konstrukt noch bis zur Selektionskassette aufgenommen haben. Die *Bam*HI-geschnittene Wildtyp-DNA diente als Negativ-Kontrolle und zeigt, dass die Neo-Sonde nicht unspezifisch bindet, da keine Banden detektiert werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es zwar Klone gibt, die bis zur Neo-Kassette positiv targetiert sind, aber nicht den distalen 3'-*lox*P-Bereich tragen.

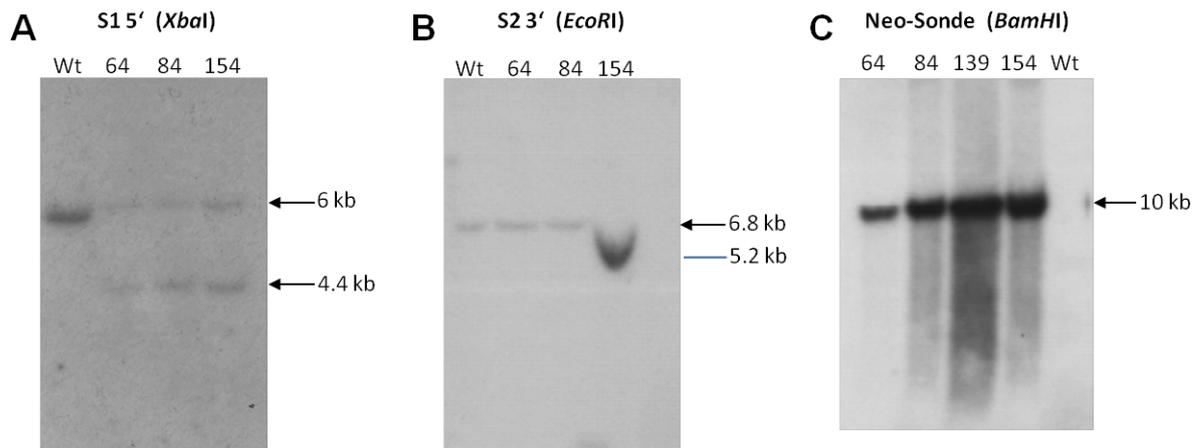


Abbildung 3.25: **Southern-Blot Analysen PCR-positiver Cytohesin-1 ES-Zell-Klone.** Zur Überprüfung der vollständigen Insertion des Targeting-Vektors in den Cytohesin-1 Genlocus wurde genomische DNA aus PCR-positiven ES-Zell-Klonen isoliert und mit den Restriktasen *Xba*I (5'-Strategie) beziehungsweise *Eco*RI (3'-Strategie) und zur Überprüfung von zufälligen Mehrfach-Insertionen mit *Bam*HI über Nacht geschnitten, über 0.7%ige Agarose-Gele aufgetrennt, depuriniert, denaturiert und auf positive Nylonmembranen geblottet. Die Membranen wurden mit radioaktiv-markierten Sonden spezifisch für die 5'-, 3'- oder Neo-Region inkubiert, gewaschen und mit einem radiosensitiven Film inkubiert. Die 5'-Sonde detektiert das Wildtyp-Fragment bei 6 kb, sowie das durch eine zusätzliche *Xba*I-Schnittstelle eingebrachte verkürzte "Knock-out"-Fragment bei 4.4 kb bei den Klonen II-64, I-84 und II-154 (A). Die 3'-Sonde detektiert die wildtypischen *Eco*RI-Fragmente bei 6.8 kb. Das erwartete "Knock-out" Fragment bei 5.2 kb ist in keinem der analysierten Klone vorhanden (B). Die interne Neo-Sonde detektiert nach *Bam*HI-Verdau die bei Einzel-Insertionen zu erwarteten Fragmente bei 10 kb in allen Klonen. Die Wildtyp-DNA (Wt) Restriktion diente als Negativ-Kontrolle.

3.3.5 Überprüfung der Funktionalität der Cytohesin-1-Konstrukt-Insertion ohne distalen *loxP*-Bereich

Die ursprüngliche Strategie zur Generierung eines konditionalen "Knock-out" für Cytohesin-1 wurde nachträglich modifiziert, da keiner der positiv 5'-targetierten Klone eine 3'-Insertion des Konstrukts aufwies. Eine unvollständige Integration der sehr großen Targetingvektoren ist relativ häufig [183] und muss aus diesem Grunde immer mitgeprüft werden. Um die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Integration zu erhöhen, wurde ein neues Targeting-Konstrukt entworfen, in welchem der distale 3'-*loxP*-Bereich näher an den 5'-*loxP*-Bereich herangerückt wird (vergleiche hierzu Abschnitt 3.3.7). Die 5'-positiven Klone wurden für eine "Full-knock-out"-Strategie weiter verwendet. Dies ist möglich, da die 5'-Kassette über einen codierten Transkriptionsstopp verfügt. Die Transkription des Cytohesin-1 Gens wird somit vor Exon 2 unterbrochen und sollte damit einen "Knock-out" zur Folge haben. Um die Funktionalität des Cytohesin-1 Transkriptionsabbruch nachzuweisen, wurde die Cytohesin-1 RNA aus Wildtyp- und Cytohesin-1 targetierten Klonen miteinander verglichen. Allerdings zeigte sich, dass in embryonalen Stammzellen keine Cytohesin-1 mRNA Level detektiert werden und dort offensichtlich nicht exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Zugabe von Retinsäure kann man allerdings ES-Zellen zu Neuronen differenzieren (zusammengefasst in [185]). Abbildung 3.26 zeigt die morphologischen Veränderungen von undifferenzierten ES-Zellen zu differenzierten neuronalen Zellen. Abbildung 3.27 zeigt, dass

Neuronen Cytohesin-1 mRNA enthalten. Dabei sollten die mRNA-Level der 5'-targetierten Klone auf die Hälfte absinken, da noch ein funktionelles wildtypisches Allel vorhanden ist. Die Menge an Cytohesin-1 mRNA ist in Klon 84 signifikant um 70 % reduziert. Auch Klon 64 zeigt eine ungefähr 30 %ige Reduktion der Cytohesin-1 mRNA. Daraus lässt sich ableiten, dass es zu einem Transkriptionsabbruch der mRNA kommt.

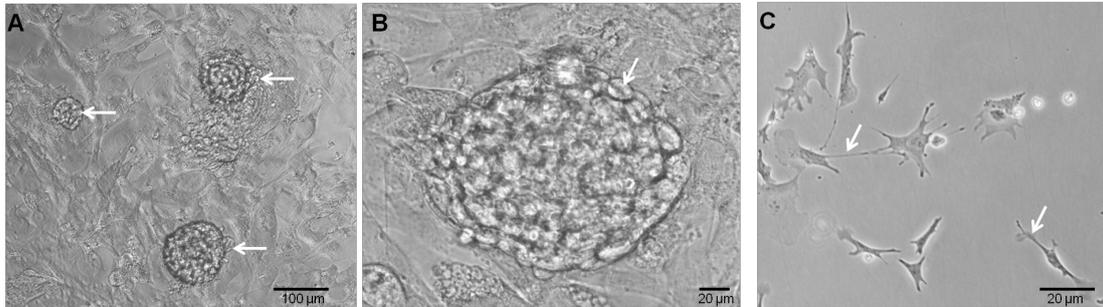


Abbildung 3.26: **Morphologie von undifferenzierten E14 ES-Zellen und neuronal-differenzierten Zellen.** Phasenkontrast-Mikroskopie. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden auf sogenannten "Feeder"-Zellen kultiviert, um eine undifferenzierte Morphologie zu erhalten. Dabei bilden die ES-Zellen kugelförmige Kolonien aus (A; weiße Pfeile; 10 fache Vergrößerung; Maßbalken 100 µm). Die einzelnen Zellen innerhalb einer Kolonie weisen eine runde Morphologie auf (B; weißer Pfeil; 40 fache Vergrößerung; Maßbalken 20 µm). Kultiviert man ES-Zellen ohne "Feeder" Unterlage und ohne Zusatz des Differenzierungshemmers LIF unter Zugabe von Retinsäure, so differenzieren sie binnen weniger Tage zu Neuronen-artigen Zellen mit deutlich sichtbaren Zellfortsätzen (C; weiße Pfeile; 40 fache Vergrößerung; Maßbalken 20 µm).

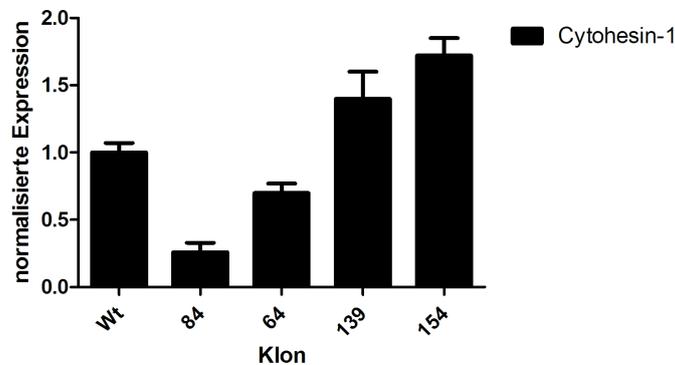


Abbildung 3.27: **Cytohesin-1 mRNA-Level in neuronal-differenzierten Cytohesin-1 Klonen.** Semiquantitative PCR. Cytohesin-1 ES-Zell-Klone wurden mittels Retinsäure zu Neuronen differenziert. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Level von Cytohesin-1 mit spezifischen Taqman-Sonden über semiquantitative PCR ermittelt. Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene 18s und GAPDH verwendet.

3.3.6 Ergebnisse der Karyotypisierung für die Cytohesin-1 Klone II-64 und 84

Um eine gute Keimbahngängigkeit der injizierten ES-Zell-Klone zu gewährleisten, wurden die PCR-positiven Klone auf ihre Chromosomenzahl hin untersucht. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Aufplatzen der osmotisch-vorbehandelten Zellen, um die in der Metaphase arretierten Chromosomen übersichtlich auf einem Objektträger anzuordnen. Nach

Anfärbung mit Giemsa-Lösung ist es mittels Mikroskopie möglich, den jeweiligen Chromosomensatz von Einzelzellen zu quantifizieren. Abbildung 3.28 zeigt die Häufigkeitsverteilung der erwarteten 40 Chromosomen von Klon 84 des Cytohesin-1 “Knock-out”. Dabei besitzen 35 % der Zellen die korrekte Anzahl Chromosomen. Dieser Quantifizierung liegen 20 individuelle Einzelzellen zu Grunde. Der Karyotyp von Klon II-64 weist in 20 % der Zellen die erwarteten 40 Chromosomen auf ($n=25$).

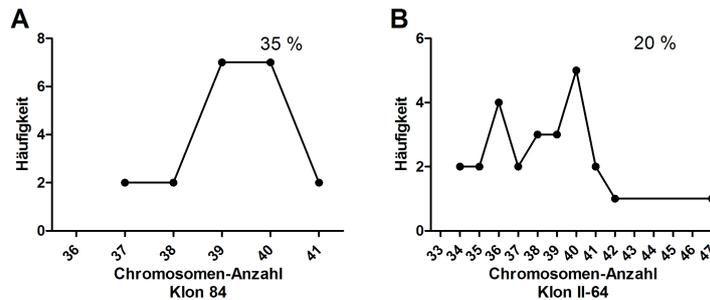


Abbildung 3.28: **Karyotypisierung PCR-positiver ES-Zell-Klone.** Zur Überprüfung des Karyotyps wurden ES-Zellen bis zur Konfluenz in einer 25 cm² Flasche kultiviert. Vier Stunden nach dem Medienwechsel wurde dieses für 50 min gegen 2 ml Kulturmedium mit 0.2 µg/ml Demecolcine getauscht um die Zellen in der Metaphase der Mitose zu arretieren. Die Zellen wurden gerntet und pelletiert, dann wurde das Zell-Pellet tropfenweise in 0.56 % KCl gelöst und für 10 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein osmotisch-bedingtes Anschwellen der Zellen, welches nach drei Fixierungsschritten in Methanol/Eisessig und Tropfen aus 30 cm Höhe das Aufplatzen der Zellen auf dem Objektträger erleichterte, sodass die Metaphase Chromosomen einzeln zum Liegen kamen. Nach vollständiger Trocknung der Objektträger wurden die Chromosomen für 2 min mit Giemsa-Färbelösung angefärbt und dann zweimal mit Wasser für je 1 min gewaschen. Die Analyse erfolgte am Nikon Eclipse-Mikroskop mit 60-facher Vergrößerung. Pro ES-Zell-Klon wurden mindestens 20 Zellen bezüglich ihrer Chromosomenzahl quantifiziert. 35 % der Chromosomensätze von Klon 84 weisen die erwarteten 40 Chromosomen auf ($n=20$)(A). 20 % der Chromosomensätze von Klon II-64 weisen die erwarteten 40 Chromosomen auf ($n=25$)(B).

Für Klon 84 erfolgten Morulae-Injektionen, die jedoch nur in ungefähr 5 %iger Chimärität der Nachkommen resultierten. Für den alternativen Klon II-64 erfolgte eine Blastozysten-Injektion, die in Chimäritäten der Nachkommen von bis zu 90 % resultierte. Ergebnisse der Verpaarungen dieser Chimären stehen zum derzeitigen Zeitpunkt noch aus. Die Injektion der embryonalen Stammzellen erfolgte im HET (Haus für experimentelle Therapie) des Uniklinikums Bonn unter Aufsicht von Dr. Eichelkraut und wurde von Jürgen Schmidt mittels LASER-Injektion in aus C57BL/6-Mäusen gewonnenen Morulae oder Blastozysten durchgeführt. Die Morulae beziehungsweise Blastozysten wurden in scheinträchtige Empfängerweibchen implantiert.

3.3.7 Optimierung der konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out”-Strategie

Da die ursprüngliche Strategie zur Generierung eines konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out” keine Klone hervorbrachte, welche den distalen 3’-loxP-Bereich aufwiesen, und somit kein konditionaler “Knock-out” auf Basis dieser Strategie möglich war, wurde die Strategie für den konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out” weiter optimiert. Um einen Abbruch des langen 3’-Homologiearms während der Insertion ins Genom zu vermeiden, wurde die

distale *loxP*-"site" näher in Richtung der Resistenzkassette verlegt. Durch diese Modifikation verändert sich das Verhältnis 5'-Homologie zu 3'-Homologie von 2.7 kb zu 7.2 kb auf 3 kb zu 4.4 kb. Der Abstand zwischen den beiden *loxP*-"sites" wurde von 7 kb auf 4.4 kb verkürzt, um so die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die 3'-*loxP*-"site" nicht mit rekombiniert. Durch diese Veränderung der *loxP*-"site" Position ist eine Änderung der 3'-Southern-Strategie erforderlich. Die neue Strategie kann mit derselben 3'-Sonde durchgeführt werden wie in der Ursprungsstrategie, lediglich das Restriktionsenzym muss anders gewählt werden. Für die optimierte Strategie wird *EcoRV* verwendet, welches im Wildtyp-Fall ein Fragment von 7.4 kb ergibt. Durch das Zerstören der *EcoRV*-site im neuen Zielbereich der 3'-*loxP*-"site" verlängert sich das detektierte Fragment auf 10.7 kb (vergleiche Abbildung 3.29). Die Grundlagen für den Umbau dieses Konstruktes wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits begonnen.

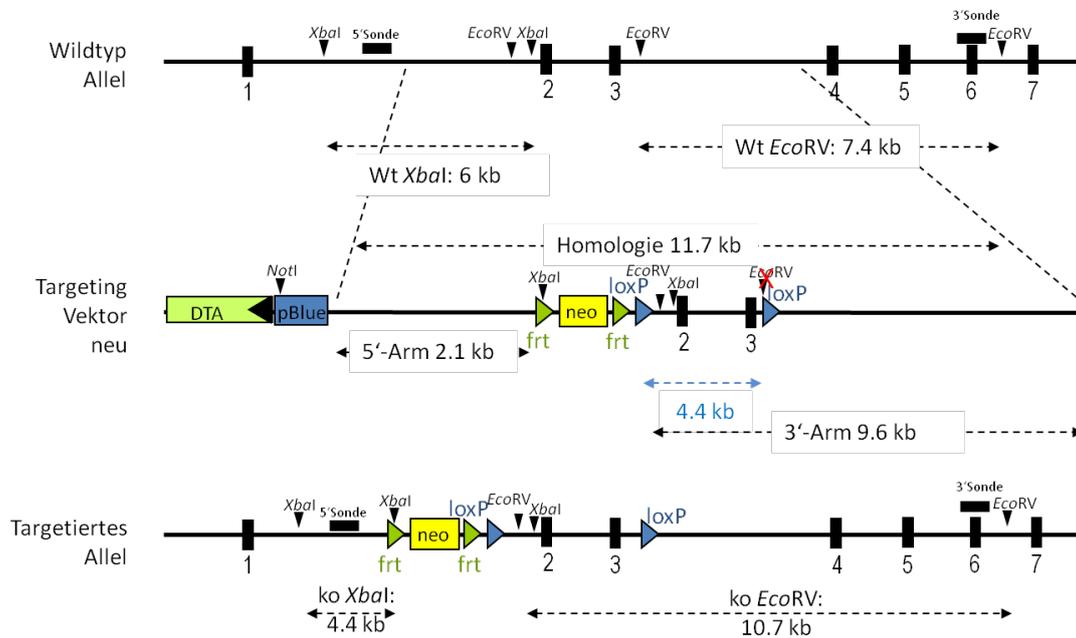


Abbildung 3.29: **Optimierung der konditionalen "Knock-Out"-Strategie des Cytohesin-1 Gens.** Da in keinem der 5'-targetierten Klone das Konstrukt vollständig mit der 3'-*loxP*-"site" inseriert ist, wurde der Targeting-Vektor hinsichtlich der 3'-*loxP*-"site" optimiert. Der Abstand zwischen den beiden *loxP*-"sites" wurde von 7 kb auf 4.4 kb verkürzt, um so die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die 3'-*loxP*-"site" nicht mitrekombiniert. Durch diese Veränderung der *loxP*-"site" Position ist eine Änderung der 3'-Southern-Strategie erforderlich. Die neue Strategie kann mit der selben 3'-Sonde durchgeführt werden wie in der Ursprungsstrategie, lediglich das Restriktionsenzym muss anders gewählt werden. Für die optimierte Strategie wird *EcoRV* verwendet, welches im Wildtyp-Fall ein Fragment von 7.4 kb ergibt. Durch das Zerstören der *EcoRV*-site im neuen Zielbereich der 3'-*loxP*-"site" verlängert sich das detektierte Fragment auf 10.7 kb.

3.4 Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-4 “Knock-out” in der Maus

3.4.1 Konstruktion des konditionalen Cytohesin-4 Targetingvektors

Die zugrundeliegende Überlegung der Flankierung von Exon 2 mit *loxP*-Bereichen geht auf Überlegungen von Phillip Sell und Michael Leitges zurück (Biotech Centre, Oslo, Norwegen). Die Planung der Strategie erfolgte durch Dr. Bettina Jux, LIMES Institut Bonn.

Der murine Cytohesin-4 Genlocus liegt auf Chromosom 15 und umfasst 25972 bp, das Gen besteht aus 13 Exons (Abbildung 3.30). Der ORF beginnt in Exon 1 (Quelle: ensembl.org genome browser). Der Verlust von Exon 2 durch *cre*-induzierte Deletion würde zu einem Transkript führen, welches noch 10 Aminosäuren codiert, von dem nicht erwartet wird, dass funktionelle Effekte entstehen.

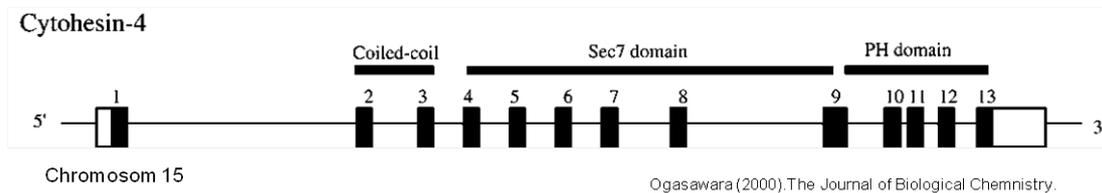


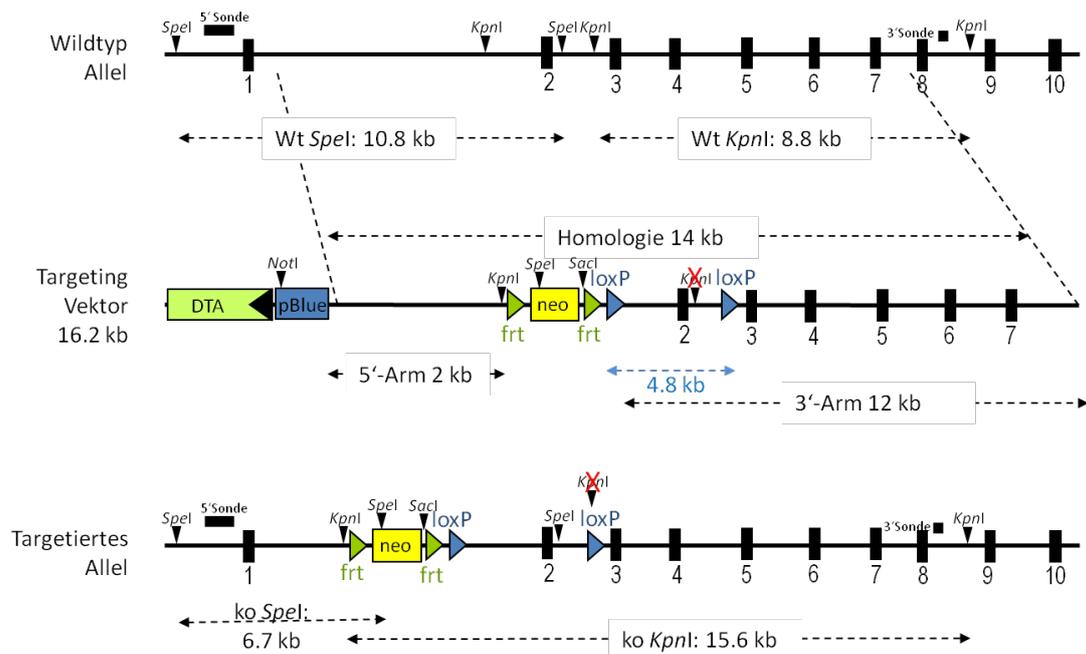
Abbildung 3.30: **Schematische Darstellung der Gen-Struktur von Cytohesin-4.** Das Cytohesin-4 Gen der Maus liegt auf Chromosom 15 und umfasst 13 Exons. Die Exons 2-3 codieren die aminoterminalen “coiled-coil”-Domäne, die Exons 4-9 die katalytische Sec7-Domäne, die Exons 9-13 die carboxyterminale PH-Domäne (Quelle: Ogasawara, 2000, JBC).

Der generierte 16.2 kb lange Cytohesin-4 Targetingvektor besteht aus einem 2 kb umfassenden kurzen Arm, einer *frt*-flankierten Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette und daran angrenzendem einzelnen *loxP*-Bereich und einem langen Arm von 12 kb, der zusätzlich den 3'-*loxP*-Bereich enthält, welcher 4.8 kb vom 5'-*loxP*-Bereich entfernt liegt.

Die *frt*-neo-*frt*-*loxP*-Kassette wurde in die ungefähr 500 bp große C1-Region, welche durch PCR auf dem Cytohesin-4 Locus gewonnen und subkloniert wurde, über konventionelle Klonierung eingebracht. Hierzu wurde die Kassette aus dem Vektor pL451 (s.a. Anhang; [164]) mittels *XhoI*-Restriktion herausgetrennt, aufgefüllt und *blunt* in die durch die endogen vorliegende *PstI*-geöffnete C1-Region inkloniert. Die so durch jeweils ungefähr 250 bp flankierte *frt*-neo-*frt*-*loxP*-Kassette wurde *NotI/XhoI/ApaI* herausgeschnitten und linear in die Rekombination in Bakterien eingesetzt. Die *loxP*-neo-*loxP*-Kassette wurde analog kloniert, über *XhoI* und *BamHI* aus dem Vektor pL452 (s. Anhang; [164]) geschnitten und nach Auffüllen der Überhänge in die endogene *KpnI* Schnittstelle der C2-Kassette kloniert. Die so mit je 250 bp Homologie flankierte *loxP*-neo-*loxP*-Kassette wurde über *BamHI/ClaI/DraI* aus dem Vektor geschnitten und in die Bakterien-Rekombination eingesetzt (Vergleiche hierzu auch 2.2.3).

Für die Southern-Strategie wurden die Schnittstellen für *SpeI* für den 5'-Southern beziehungsweise für *KpnI* für den 3' Southern gewählt. Im Wildtyp Locus ergibt sich durch Markierung mit der 5'-Sonde ein Fragment von 10.8 kb-Länge. Nach erfolgreicher Rekombi-

nation des Targeting-Konstrukts wird eine zusätzliche *SpeI*-Schnittstelle eingefügt, welche in der *frt-neo-frt-loxP*-Kassette enthalten ist. Damit verkürzt sich der durch die 5'-Sonde markierte genomische Abschnitt auf 6.7 kb. Für die 3'-Strategie ergibt die Restriktion mit *KpnI* ein genomisches Fragment von 8.8 kb Länge, welches durch die 3'-Sonde detektiert wird. Durch die Insertion des Targeting-Konstrukts wird die endogene *KpnI* Schnittstelle in der C2-Region zerstört, sodass sich das detektierte Fragment auf 15.6 kb verlängert (Abbildung 3.31). Zur Überprüfung der Einzel-Insertion des Targetingvektors in das Genom, also dem Ausschluss einer zufälligen Fehl-Integration, wurde eine interne Neo-Sonde verwendet, welche spezifisch in der Neomycin-Sequenz des Targeting-Konstrukts bindet. Für die Restriktionsstrategie wurde das Enzym *SacI* gewählt, welches 3' der Neomycin-Sequenz schneidet, aber 5' keine korrespondierende Schnittstelle mehr innerhalb des Targetingvektors hat, sondern ausserhalb der targetierten Region schneidet. Dadurch, dass die 5'-Schnittstelle im Fall einer Fehl-Insertion beliebig entfernt sein kann, geben zusätzliche Banden unbekannter Größe einen Hinweis auf Mehrfach-Insertionen des Konstrukts im Genom.



Strategy by Dr. Bettina Jux

Abbildung 3.31: **Strategie für einen konditionalen Cytohesin-4 "Knock-out"**. Ziel der konditionalen Cytohesin-4 "Knock-out"-Strategie ist es, Exon 2 mit *loxP*-sites zu flankieren (siehe Targeting-Vektor). Der Homologie-Bereich des Targeting-Vektors umfasst 14 kb der Cytohesin-4 Gen-Sequenz. Die 5'-Southern Strategie beruht auf einer Restriktion mit *SpeI*, die eine durch die 5'-Sonde detektierte Wildtyp-Bande von 10.8 kb ergibt. Durch die Einbringung der *frt-neo-frt-loxP*-Kassette mit einer zusätzlichen *SpeI*-Schnittstelle wird dieses Fragment auf 6.7 kb verkürzt. Die 3'-Southern-Strategie basiert auf einer Restriktion mit *KpnI*, welche im Wildtypfall ein Fragment von 8.8 kb erzeugt. Durch die 3'-*loxP*-site wird die endogenen *KpnI*-Schnittstelle zerstört, sodass sich das Fragment auf 15.6 kb verlängert. Der Abstand der beiden *loxP*-sites zueinander liegt bei 4.8 kb. Die Deletion von Exon 2 in Verpaarungen mit *Cre*-Mäusen führt zu einer Änderung des *open reading frame* (ORF), welche in einem Stopp-Codon nach 10 translatierten Aminosäuren resultiert (Strategie geplant von Dr. Bettina Jux).

3.4.2 Ergebnisse der PCR-„Screenings“ für Cytohesin-4-ES-Zell-Klone

Um möglichst viele Klone schnell und zeitsparend zu „Screenen“ wurde der Analyse der ES-Zell-Klone über Southern-Blotting zunächst ein PCR-„Screening“ vorangestellt. Zu diesem Zweck wurde der 5'-Arm des Targeting-Konstruktes mit 2 kb kurz gehalten, sodass hier eine PCR möglich ist, deren Vorwärts-„Primer“ in der endogenen 5' Wildtyp-Sequenz ausserhalb der targetierten Region liegt und einem reversen „Primer“, der innerhalb der Resistenzkassette bindet. Das erwartete Produkt hat eine Größe von 2.4 kb. Als Positiv-Kontrolle diente der Cytohesin-4 BAC-Klon, welcher eine mittels „Recombineering“ eingefügte *frt-neo-frt-loxP*-Kassette trägt. Zur Kontrolle, ob die PCR auf der isolierten genomischen DNA generell funktioniert, wurde eine Wildtyp-PCR mit identischem Vorwärts-Primer und einem Revers-Primer (*pscd4 C1 rev*) mit endogener Binde-Sequenz in der Austausch-Region durchgeführt, deren Produkt ebenfalls 2.4 kb umfasst. Die Transfektion der IB10 ES-Zellen (Hintergrund SV129/P2 ola) mit dem linearisierten Cytohesin-4-„Knock-out“-Konstrukt ergab 212 Klone, davon waren zwei deutlich positiv in der „Screening“-PCR (Abbildung 3.32), die Klone 168 und 173.

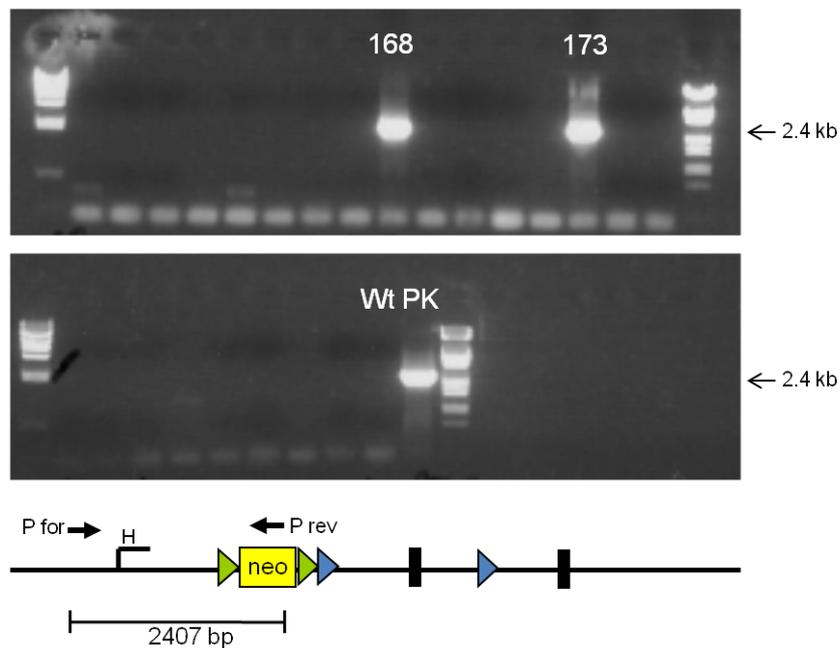


Abbildung 3.32: 5' PCR „Screening“ der Cytohesin-4 Klone. Der Primer *pscd4 screen for* (P for) liegt 5' ausserhalb der targetierten Region (H; Homologiebereich). Der reverse Primer *pscd3 screen rev* (P rev) liegt innerhalb der neo-Selektionskassette. Das erwartete PCR-Produkt hat 2407 bp. Die Klone 168 und 173 zeigen aus 400 Klonen das erwartete PCR-Produkt. Als Positivkontrolle (PK) diente ein Konstrukt auf genomischer BAC-Klon-Basis mit integrierter *frt-neo-frt-loxP*-Kassette. Die PCR auf Wildtyp-DNA (Wt) diente als Negativkontrolle.

Da bei der Größe der Targeting-Vektoren auch immer eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, dass diese nur partiell inserieren und dabei insbesondere die 3'-*loxP*-„site“ verlieren, wurde eine zusätzliche PCR durchgeführt, bei welcher die Insertion der 3'-*loxP*-„site“ geprüft wurde. Zu diesem Zweck wurden „Primer“ gewählt, welche die *loxP*-„site“ flankie-

ren. Durch die Insertion der 3'-*loxP*-"site" über das pL452-Konstrukt wurde nicht nur die *loxP*-Sequenz mit einer Länge von 34 bp inseriert, sondern zusätzliche flankierende Vektorbereiche, sodass das der gesamte eingefügte *loxP*-Bereich insgesamt ungefähr 100 bp umfasst. Dadurch lässt sich eine positive Insertion der 3'-*loxP*-"site" einfach mittels PCR nachweisen, da das entsprechende Produkt 100 bp größer als das Wildtyp-Produkt sein muss. Als "Primer" wurden die endogenen C2-"Primer" gewählt, welche im Wildtyp-Fall einen Bereich von 722 bp flankieren. Nach erfolgreicher Insertion des 3'-*loxP*-Bereich verlängert sich dieses Produkt auf 835 bp und ergibt bei positiv-targetierten ES-Zell-Klonen eine Doppelbande. Abbildung 3.33 zeigt, dass die Klone 168 und 173 die zusätzliche PCR-Bande bei 835 bp vorweisen und somit auch über die 3' *loxP*-"site" verfügen. Folglich liegt hier eine vollständige Insertion des Targeting-Vektors ins Genom vor, welche im Weiteren mittels Southern-Blotting verifiziert werden sollte.

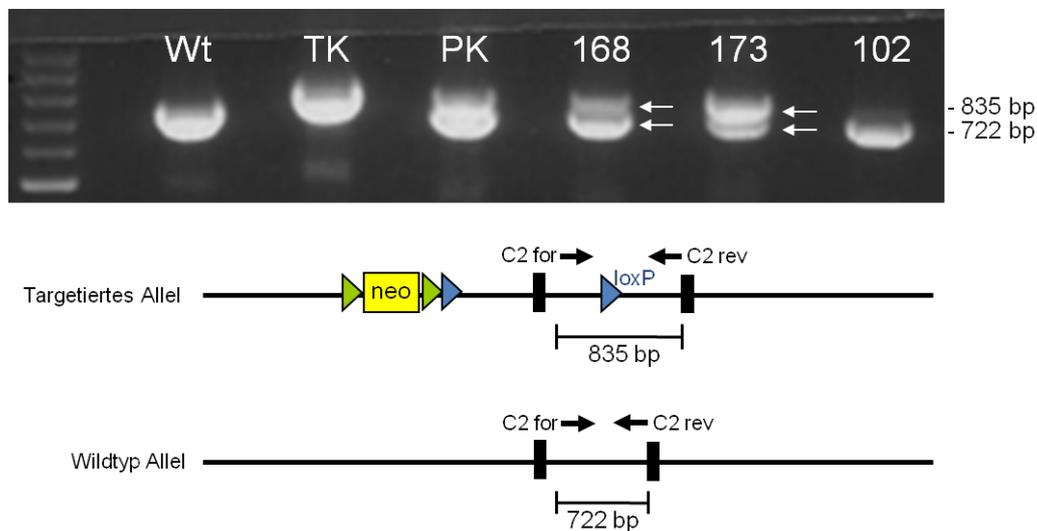


Abbildung 3.33: **3' PCR "Screening" der Cytohesin-4 Klone.** Die Primer *pscd4* C2 for (C2 for) und *pscd4* C2 rev (C2 rev) flankieren den eingebrachten *loxP*-Bereich. Auf dem Wildtyp-Allel ergibt die PCR ein Produkt von 722 bp Länge. Der *loxP*-Bereich umfasst mitsamt der umgebenden Sequenz, die auch zusätzliche Schnittstellen beinhaltet, 113 bp, sodass im Falle der positiven Insertion ein PCR Produkt von 835 bp entsteht. Die Klone 186 und 173 zeigen beide erwarteten Banden und sind somit positiv für den 3'-*loxP*-Bereich. Klon 102 zeigt nur die Wildtyp-Bande, wie in der Wildtyp-DNA-Kontrolle (Wt). Als Positivkontrolle (PK) diente ein Gemisch aus Wildtyp-DNA und dem Targeting-Vektor (TK).

3.4.3 Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen für Cytohesin-4

Zur Überprüfung der vollständigen homologen Rekombination des Targeting-Konstrukts in den Maus Cytohesin-4 Locus wurde aus den PCR-positiven Klonen 168 und 173 genomische DNA isoliert, mit den angegebenen Restriktions-Enzymen inkubiert und über Southern-Blotting analysiert. Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, wird zur Überprüfung der vollständigen 5'-Rekombination eine auf *SpeI*-basierte Strategie verwendet, bei der die spezifische 5'-Sonde ein Wildtyp-Fragment von 10.8 kb und im homolog rekombinierten Allel von 6.6 kb detektiert, da eine zusätzliche Schnittstelle durch das Konstrukt eingebracht wird, die das Fragment verkürzt. Abbildung 3.34 (A) zeigt, dass für beide analysierten Klo-

ne Wildtyp- und “Knock-out”-Fragment spezifisch erkannt werden und somit beide Klone eine vollständige 5'-Insertion des Konstrukts aufweisen. Zur Überprüfung der vollständigen 3'-Integration wurde eine auf *KpnI*-basierte Strategie verwendet. Da in diesem Fall durch Insertion des Konstrukts eine endogene *KpnI*-Schnittstelle zerstört wird, verlängert sich das durch die 3'-Sonde detektierte Fragment von 8.9 kb auf 15.6 kb. Abbildung 3.34 (B) zeigt, dass auch hier beide Klone eine vollständige Integration des Targetingvektors aufweisen, da Wildtyp- und “Knock-out”-Bande vorhanden sind. Zur Überprüfung der Einfach-Insertion ins Genom und dem Ausschluss, dass das Konstrukt mehrfach im Genom inseriert hat, wurden die Klone mit einer internen Neo-Sonde basierend auf einer Restriktions-Strategie mit *SacI* auf Mehrfach-Insertionen geprüft (C). Hier zeigt sich, dass Klon 173 das erwartete Fragment bei 5 kb aufweist, Klon 168 aber noch drei weitere Banden aufweist und somit das Konstrukt zusätzlich an zufälliger Stelle im Genom aufgenommen hat. Das Targeting-Konstrukt diente als Positiv-Kontrolle und zeigt die erwartete Bande bei 6.4 kb. Die *SacI*-geschnittene Wildtyp-DNA diente als Negativ-Kontrolle und zeigt, dass die Neo-Sonde nicht unspezifisch bindet, da keine Banden detektiert werden. Somit konnte Klon 173 als geeigneter Klon weiterverwendet werden, da er das Konstrukt einmal und in den korrekten Locus inseriert hat. Klon 168 wurde aufgrund der Mehrfach-Insertion nicht verwendet.

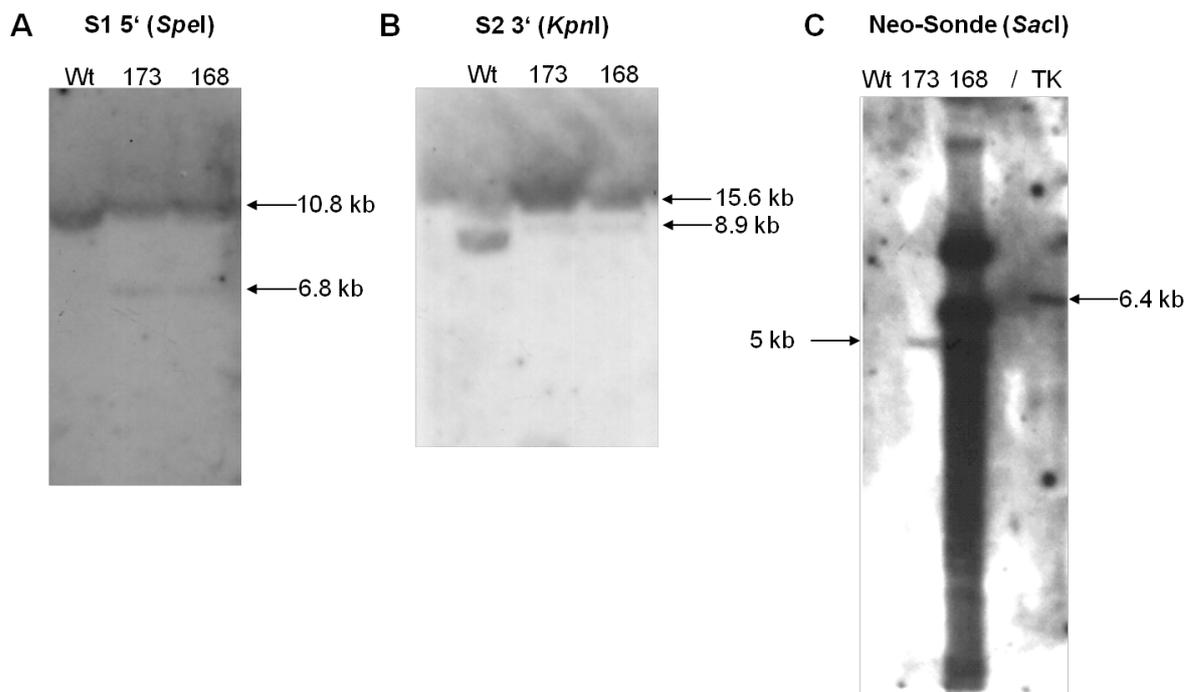


Abbildung 3.34: **Southern-Blot Analysen PCR-positiver Cytohesin-4 ES-Zell-Klone.** Zur Überprüfung der vollständigen Insertion des Targeting-Vektors in das Cytohesin-4 Genom wurde genomische DNA aus PCR-positiven ES-Zell-Klonen isoliert und über Nacht mit den Restriktasen *SpeI* (5'-Strategie) beziehungsweise *KpnI* (3'-Strategie) und zur Überprüfung von zufälligen Mehrfach-Insertionen mit *SacI* geschnitten, über 0.7%ige Agarose-Gele aufgetrennt, depuriniert, denaturiert und auf positive Nylonmembranen gebロットet. Die Membranen wurden mit radioaktiv-markierten Sonden spezifisch für die 5'-, 3'- oder Neo-Region inkubiert, gewaschen und mit einem radiosensitiven Film inkubiert. Die 5'-Sonde detektiert das Wildtyp-Fragment bei 10.8 kb, sowie das durch eine zusätzliche *SpeI*-Schnittstelle eingebrachte verkürzte "Knock-out"-Fragment bei 6.8 kb bei den Klonen 173 und 168 (A). Die 3'-Sonde detektiert die wildtypischen *KpnI*-Fragmente bei 8.9 kb. Durch Zerstören der wildtypischen *KpnI*-Schnittstelle vergrößert sich das *KpnI*-Fragment im "Knock-out"-Locus bei den Klonen 173 und 168 auf 15.6 kb (B). Die interne Neo-Sonde detektiert nach *SacI*-Verdau die bei Einzel-Insertionen zu erwarteten Fragmente bei 5 kb bei Klon 173 und 6.4 kb im Targeting-Konstrukt (TK). Bei Klon 168 werden zusätzliche Banden mit der Neo-Sonde detektiert, die eine Mehrfach-Insertion anzeigen. Die Wildtyp-DNA (Wt) Restriktion diente als Negativ-Kontrolle (C).

3.4.4 Ergebnisse der Karyotypisierung für Cytohesin-4-ES-Zell-Klon 173

Da Klon 174 das Cytohesin-4 Targeting-Konstrukt vollständig und korrekt rekombiniert hat, wurde er für die Morulae-Injektion in Betracht gezogen. Um eine gute Keimbahngängigkeit der ES-Zellen zu gewährleisten, ist es wichtig, dass diese einen korrekten Karyotyp aufweisen. Mittels der Karyotypisierung wurde vorab geprüft, ob Klon 173 die korrekte Chromosomenanzahl besitzt. Zwecks dieser Überprüfung wurden die Zellen in der Metaphase arretiert. Nach osmotischer Behandlung wurden die Zellen auf Objektträger getropft, wo durch das Aufplatzen der Zellen die Chromosomen gut verteilt zum Liegen kommen und mikroskopisch quantifiziert werden können. Für Klon 173 wurden 20 individuelle Zellen ausgezählt. Davon hatten 55% die erwarteten 40 Chromosomen (Abbildung 3.35). Zusammenfassend betrachtet wurde aus 212 ES-Zell-Klonen ein Klon identifiziert, der die Kriterien für die Morula-Injektion voll erfüllt.

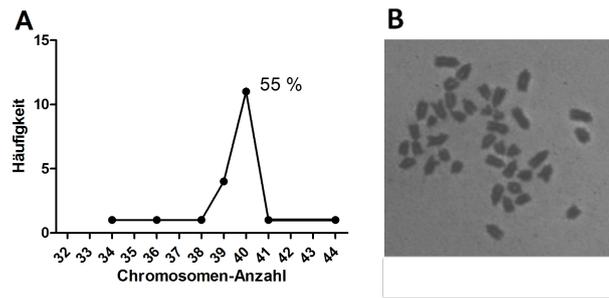


Abbildung 3.35: **Karyotypisierung von Cytohesin-4 ES-Zell-Klon 173.** Zur Überprüfung des Karyotyps wurden ES-Zellen bis zur Konfluenz in einer 25 cm² Flasche kultiviert. Vier Stunden nach dem Medienwechsel wurde dieses für 50 Minuten gegen 2 ml Kulturmedium mit 0.2 µg/ml Demecolcine getauscht um die Zellen in der Metaphase der Mitose zu arretieren. Die Zellen wurden geerntet und pelletiert, dann wurde das Zell-Pellet tropfenweise in 0.56 % KCl gelöst und für 10 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein osmotisch-bedingtes Anschwellen der Zellen, welches nach drei Fixierungsschritten in Methanol/Eisessig und Tropfen aus 30 cm Höhe das Aufplatzen der Zellen auf dem Objektträger erleichterte, sodass die Metaphase-Chromosomen einzeln zum Liegen kamen. Nach vollständiger Trocknung der Objektträger wurden die Chromosomen für zwei Minuten mit Giemsa-Färbelösung angefärbt und dann zweimal mit Wasser für je eine Minute gewaschen. Die Analyse erfolgte am Nikon Eclipse mit 60-facher Vergrößerung. Pro ES-Zell-Klon wurden mindestens 20 Zellen bezüglich ihrer Chromosomenzahl quantifiziert. 55 % der Chromosomensätze von Klon 173 weisen die erwarteten 40 Chromosomen auf (n=20; A). Abbildung B zeigt eine exemplarische Phasenkontrastaufnahme (60x) eines vollständigen Chromosomensatzes von Klon 173.

3.4.5 Ergebnisse der Morulae-Injektion für den Cytohesin-4-ES Zell-Klon 173

Die Injektion der embryonalen Stammzellen des Klons IB10-Cytohesin-4 173 erfolgte im HET (Haus für experimentelle Therapie) des Uniklinikums Bonn unter Aufsicht von Dr. Eichelkraut und wurden von Jürgen Schmidt durchgeführt. Die für die homologe Rekombination positiv getesteten embryonalen Stammzellen wurden mittels LASER-Injektion in aus C57BL/6-Mäusen gewonnenen Morulae injiziert. Die Morulae wurden in scheinträchtige Empfängerweibchen implantiert. Es wurden drei chimäre Tiere geboren, zwei Männchen und ein Weibchen, die anhand ihres gescheckten Fells als Chimären identifiziert wurden. Davon wiesen alle Tiere einen nahezu 100 % igen Fellfarben-Chimärismus auf, bei dem nur wenige schwarze Haare von Zellen der Donor-Morulae stammen und das restliche Fell die creme-braune Färbung der 129/ola-stämmigen ES-Zellen erhalten hat (Abbildung 3.36). Die beiden chimären Männchen wurden im Alter von 6 Wochen mit mehreren C57BL/6-Weibchen verpaart. Im Falle der Keimbahngängigkeit der injizierten ES-Zellen, also der Möglichkeit der Spermiendifferenzierung, sollte ein Teil dieser Nachkommen creme-braunfarbenedes Fell aufweisen. Die Verpaarung des ersten chimären Männchens ergab im fünften Wurf einen Nachkommen mit brauner Fellfarbe und bestätigt somit die Keimbahngängigkeit der verwendeten Stammzellen. Das Ergebnis der Genotypisierung des braunen Nachkommen lag zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht vor.

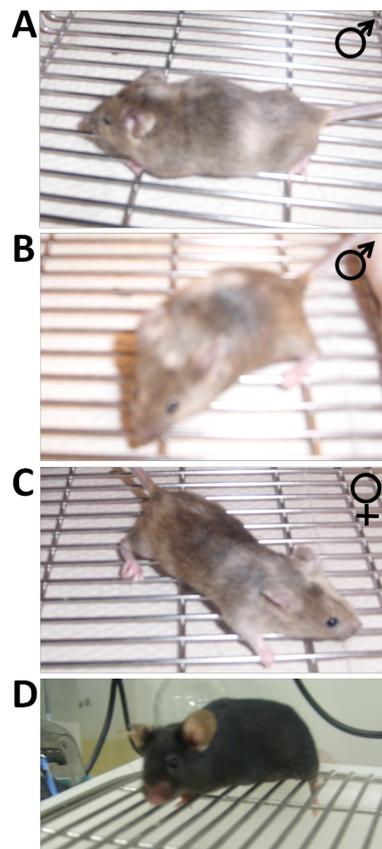


Abbildung 3.36: **Cytohesin-4 Chimären.** Cytohesin-4 “Knock-out” IB10-ES-Zellen (cremefarbener Fellfarbenhintergrund) wurden in Morulae mit C57BL/6 Hintergrund (schwarzer Fellfarbenhintergrund) injiziert, und die Morulae anschließend in scheinträchtige Leihmütter implantiert. Drei Nachkommen (zwei Männchen und ein Weibchen; A-C) eines Wurfs zeigen einen deutlichen Fellfarben-Chimärismus (annähernd 100 %), wohingegen Wildtyp C57BL/6-Mäuse einheitlich schwarzes Fell haben (D).

4 Diskussion

4.1 Cytohesin-Funktionen in dendritischen Zellen

4.1.1 Die Rolle von Cytohesin-1 in der Adhäsion und Migration muriner DC

Integrin-basierte zelluläre Adhäsionsprozesse bilden eine essentielle Grundlage für verschiedene immunregulatorische Vorgänge und sind zum Beispiel bei der Zellmigration auf zweidimensionalen Substraten essentiell, haben aber auch bei direkten Zell-Zell-Kontakten Bedeutung, so zum Beispiel bei der Ausbildung der Immunologischen Synapse (IS) zwischen T-Zelle und APC. Dabei sind die Integrine ein wesentlicher Bestandteil des peripheren Adhäsionsrings der IS [97] und vermitteln den zum Teil bis zu 24 Stunden andauernden Kontakt zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle. Ein wichtiger Aktivator des β_2 -Integrins LFA-1 ist Cytohesin-1 [13], welches sowohl in T-Zellen als auch in humanen Monozytengenerierten DC die Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion fördert [13, 14, 23, 29, 51].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von Cytohesin-1 auf das Zell-Adhäsionsverhalten muriner DC untersucht. Dabei wurden murine DC aus verschiedenen Gründen für die Funktionsaufklärung von Cytohesin-1 verwendet. Zum Einen sind Studien an BM-DC notwendig, um im Hinblick auf die bevorstehende Analyse des genetischen Mausmodells technische Analysemethoden für murine Zelltypen zu etablieren. Zum Anderen entfällt mit murinen DC gleichen genetischen Hintergrunds die Problematik der Spender-Varianz, welche bei der Arbeit mit humanen DC zum Tragen kommt. Für Zellmigrations-Experimente ist ferner die im Vergleich zu humanen Mo-DC bessere Induzierbarkeit der Chemotaxis in murinen DC ein wesentlicher Vorteil. Für die Durchführung des Zell-Zell-Adhäsionsversuches bot zudem das murine System den Vorteil, dass die Zelladhäsion im Hinblick auf die Antigen-spezifität untersucht werden konnte. So wurde für die DC-T-Zell-Adhäsion ein transgenes Mausmodell genutzt, in welchem die T-Zellen einen Ova-Peptid spezifischen TCR konstitutiv exprimieren und auf diese Weise mit Ova-beladenen DC interagieren. Mit diesem BM-DC-Adhäsionsversuch auf transgenen OTI-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 eine entscheidene Rolle bei der Ausbildung des Zell-Zell-Kontakts der DC zur T-Zelle spielt (3.1.1). Dabei kommt die Rolle von Cytohesin-1 allerdings erst dann zum Tragen, wenn die dendritischen Zellen mit Antigen (Ovalbumin) beladen sind und der Zellkontakt spezifisch ist. Im unbeladenen Zustand hat die RNAi von Cytohesin-1 in DC keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion, wohingegen bei Anwesenheit des Ovalbumins die Cytohesin-1 RNAi deutlich die Adhäsion der DC an die T-Zellen reduziert. Folglich zeigt Cytohesin-1 in Antigen-abhängigen Zell-Adhäsionsprozessen einen fördernden Effekt und ist als Aktivator an der Ausbildung

des DC-T-Zellkontakts beteiligt. Darüber hinaus konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass Cytohesin-1 auch in murinen DC die Zell-Adhäsion fördert, da bisherige Daten ausschließlich mit humanen Zellen gewonnen wurden.

Nach der Ausbildung von stabilen Zell-Zellkontakten im Rahmen der Immunologischen Synapse ist Immunzell-Adhäsion insbesondere bei der Extravasation (Diapedese) von Zellen aus Blutgefäßen wichtig. Immunzellen adhärieren dabei an Endothelzellen, um dann mittels Diapedese an Entzündungsherde im Gewebe gelangen zu können. Diese Situation kann *in vitro* durch den sogenannten “Flow Assay” nachgestellt werden. Für das Rollen der Lymphozyten auf Endothelien spielen zunächst Adhäsionsmoleküle wie Selektine eine wichtige Rolle. Die feste Zell-Adhäsion an das Endothel wird dann durch das “Inside-out-Signaling” der Integrine vermittelt, welche über einen Chemokin-Stimulus in ihre aufrechte aktivierte Konformation gebracht werden und so an das ICAM-1 des aktivierten Endothels binden [72]. Inwieweit bei der Adhäsion von BM-DC die durch Cytohesin-1 regulierte Integrin-Aktivierung eine Rolle spielt, wurde durch die Analyse der Adhäsion von Cytohesin-1 RNAi behandelten BM-DC geprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass der siRNA-vermittelte “Knock-down” von Cytohesin-1 in murinen DC zu einer signifikanten Reduktion der Zell-Adhäsion unter dynamischen Flussbedingungen an das aktivierte Endothel führt (3.1.2). Demnach hat Cytohesin-1 eine entscheidende Rolle im Rahmen der Integrin-vermittelten Zell-Adhäsion und der Chemokin-induzierten Integrin-Aktivierung. Dieses Ergebnis bestätigt zudem Daten, die mit humanen DC gewonnen wurden. So wurde durch die Analyse von spezifischen Integrin-Aktivierungsepitopen gezeigt, dass Cytohesin-1 RNAi das durch Chemokin-Stimulation ausgelöste hochaffine Stadium von LFA-1 in humanen DC reduziert [14, 23]. Entsprechend konnte auch unter Flussbedingungen gezeigt werden, dass Cytohesin-1 in humanen DC die Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion steigert [14, 23].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass Cytohesin-1 in murinen DC ähnliche Funktionen in Bezug auf Zell-Adhäsion und Integrin-Aktivierung wie in humanen DC hat und unter verschiedenen Konditionen wie statisch oder in laminarer Strömung die Zell-Adhäsion aktiviert.

In vorangehenden Arbeiten wurde zudem dokumentiert, dass Cytohesin-1 sowohl die Migration von humanen DC *in vitro* als auch von murinen DC *in vivo* fördert [23]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Migrations-Analyse reifer muriner DC in dreidimensionalen Kollagenstrukturen gelegt. Mittels dieser komplexen Zellmigrationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass RNAi von Cytohesin-1 in BM-DC massiv Direktionalität, Geschwindigkeit und den FMI motiler BM-DC inhibiert und damit eine signifikante Störung der chemokin-gesteuerten Zellmigration in dreidimensionalen Kollagen-Netzwerken bewirkt (Abschnitt 3.1.3). Somit konnte Cytohesin-1 als essentieller Faktor in der interstitiellen Migration identifiziert werden. Für die Migration von BM-DC in dreidimensionalen Kollagenstrukturen ist mittlerweile bekannt, dass die Anwesenheit von Integrinen nicht erforderlich ist. Diese Daten wurden mit BM-DC gewonnen, in welchen über einen kombinatorischen genetischen Ansatz sämtliche in Immunzellen exprimierten

Integrine ($\beta_1, \beta_2, \beta_7, \alpha_v$) auf der Oberfläche der DC depletiert sind, diese DC aber dennoch ohne Einschränkung in dreidimensionalen Umgebungen migrieren [87]. Somit stellte sich die Frage, warum das Integrin-regulierende Protein Cytohesin-1 für die DC-Migration in komplexen 3D-Kollagen-Gelen essentiell ist, die Integrine selbst aber offensichtlich für diesen Prozess entbehrlich sind. Interessanterweise zeigten Cytohesin-1 RNAi-behandelte Integrin-defiziente BM-DC eine ebenso schnelle und zielgerichtete Migration wie Wildtyp-Zellen oder mit Kontroll-siRNA behandelte Integrin^{-/-}-BM-DC [14]. Die Herunterregulation von Cytohesin-1 beeinflusst demnach in Integrin-defizienten BM-DC nicht die Zellmigration. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der Zellmigration durch Cytohesin-1 Integrin-abhängig ist. Die Abwesenheit der Integrine könnte bewirken, dass BM-DC von einem Integrin-abhängigen Zellmigrationsmodus zu einem Integrin-unabhängigen Zellmigrationsmodus wechseln können und somit unabhängig von der Integrin-Aktivierung motil bleiben [14].

Lämmermann *et al.* zeigen, dass diese Integrin-unabhängige Zellmigration amöboidartig ist und auf Aktinfluss beruht und somit unabhängig von Adhäsionsstrukturen funktionieren kann [87]. Eine wichtige Komponente der Zellmigration und der damit verbundenen Aktin-Dynamik ist die kleine GTPase RhoA (zusammengefasst in [186]). In dieser Arbeit konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass RhoA die dreidimensionale Zellmigration entscheidend beeinflusst, da RhoA-RNAi in BM-DC mit Integrinen die Zellmigration ähnlich wie der Cytohesin-1 “Knock-down” inhibiert (3.1.3). Die Analyse der RhoA-Aktivität mittels ELISA zeigt zudem, dass Cytohesin-1-RNAi in BM-DC die RhoA-Aktivität deutlich reduziert (3.1.4). Somit ist Cytohesin-1 im Signalweg RhoA vorgeschaltet. Mit diesen Ergebnissen konnten Daten bestätigt werden, welche an humanen DC gewonnen wurden und ebenfalls Cytohesin-1 vor RhoA im Signalweg positionieren [23]. Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Förderung der RhoA GTPase-Aktivität durch Cytohesin-1 keine auf Immunzellen beschränkte Regulation ist, da auch in HeLa-Zellen eine Aktivierung von RhoA durch Cytohesin-1 gemessen werden konnte (3.1.4). HeLa-Zellen wurden zum Einen verwendet, um die in BM-DC gewonnenen Ergebnisse in nicht-Immunzellen zu validieren, zum Anderen aber auch aus dem Grund, dass in DC Überexpressions-Studien nur limitiert durchführbar sind, da die Transfektion primärer DC mit Plasmid-DNA bestenfalls Transfektionseffizienzen von 1-5 % liefert [14]. Durch die Verwendung der E157K-GEF- Mutante von Cytohesin-1 konnte in HeLa-Zellen die Regulation der RhoA-Aktivierung durch Cytohesin-1 weiter aufgeklärt werden. Im Gegensatz zur Cytohesin-1 Wildtyp-Überexpression steigt bei Überexpression der Cytohesin-1 E157K Funktionsverlust-Mutante die RhoA GTPase-Aktivität nicht an (3.1.4). Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA die GEF-Funktion von Cytohesin-1 erfordert.

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass RhoA in T-Zellen die Chemokin-abhängige Modulation von LFA-1-Affinitäten reguliert und über diesen Mechanismus auch Zell-Adhäsions-Prozesse von Lymphozyten positiv steuert [187, 188]. In dieser Arbeit wurde erstmalig über einen siRNA basierten RhoA “Knock-down” nachgewiesen, dass RhoA in BM-DC die

Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion an das aktivierte Endothel vermittelt (3.1.5). Die Verminderung der Zell-Adhäsion nach RNAi von RhoA zeigt, dass RhoA in BM-DC aktivierend auf die Zell-Adhäsion unter laminaren Flussbedingungen wirkt und damit gleichzeitig das CXCL12-vermittelte “Inside-out-Signaling” der Integrine beeinflusst. Zusammengefasst ermöglichen diese Ergebnisse den Entwurf eines Modells, in welchem Cytohesin-1 GEF-abhängig und in Anwesenheit von Integrinen RhoA aktiviert und auf diese Weise die Zellmigration stimuliert. Zudem wurde gezeigt, dass auch in der Integrin-unabhängigen Migration die Zellen auf RhoA angewiesen sind, wie RhoA-Inhibitor Studien an Integrin^{-/-}BM-DC belegen (Quast, unveröffentlicht). Über welchen Mechanismus in der Integrin-unabhängigen Migration RhoA gesteuert wird, ist bislang unklar. Studien von Lämmermann machen für die Integrin-unabhängige Migration in dreidimensionalen Substraten Formveränderungen der Zellen verantwortlich, welche auf Aktin-Fluss beruhen [189].

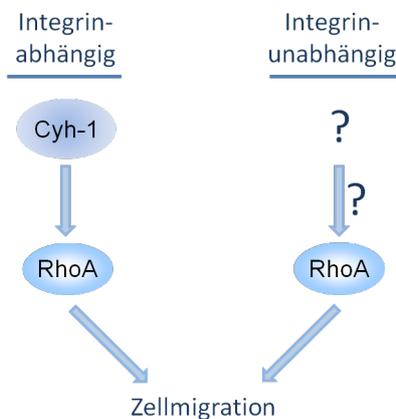


Abbildung 4.1: **Modell für die Regulation der Integrin-abhängigen und Integrin-unabhängigen Migration durch Cytohesin-1.** In Anwesenheit von Integrinen ist die Migration reifer muriner DC abhängig von Cytohesin-1. Dabei reguliert Cytohesin-1 über die Aktivierung von RhoA die interstitielle Migration der DC. Bei Abwesenheit der Integrine können die Zellen unabhängig von Cytohesin-1 migrieren, sind aber auf die RhoA Funktion angewiesen. Der genaue Mechanismus der RhoA-Aktivierung in Abwesenheit von Integrinen ist noch nicht geklärt.

4.1.2 Expression und Funktionen von Cytohesin-4 in reifen und unreifen DC

Dendritische Zellen sind wichtige APC des Immunsystems und haben eine entscheidende Rolle bei der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunität. Unreife DC liegen meist ausgespreitet und mit langen Dendriten im Gewebe vor, um Pathogene abzufangen und zu phagozytieren. Nach Pathogenkontakt wird in DC der Prozess der Reifung ausgelöst, im Wesentlichen über die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) aber auch über inflammatorische Zytokine wie TNF α . Der Reifungsprozess führt dazu, dass die DC zu runden hoch motilen Zellen differenzieren, um Chemokin-geleitet in die Lymphknoten migrieren zu können um dort als APC zu fungieren. Zu diesem Zweck wird die Expression der MHCII-Moleküle heraufreguliert. Ebenso werden kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 verstärkt auf der Oberfläche exprimiert.

Auch für Cytohesin-1 und das Cytohesin-interagierende Protein CYTIP ist beschrieben,

dass sie im Prozess der Reifung von DC differentiell reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Cytohesin-1 als auch CYTIP in humanen DC LPS- und $\text{TNF}\alpha$ -induziert heraufreguliert werden [23, 14].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Cytohesin-4 Expression in murinen DC ebenfalls reifungsabhängig reguliert wird (3.1.6), allerdings nimmt die Expression von Cytohesin-4 im Gegensatz zu Cytohesin-1 und CYTIP [23] nach LPS-Stimulation ab (3.1.6). Ebenso wird in humanen DC nach LPS- und $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Reifung eine Reduktion der Cytohesin-4 Expression induziert (Daten nicht gezeigt). Folglich wird Cytohesin-4 im Verlauf der DC-Reifung gegensätzlich zu Cytohesin-1 und CYTIP reguliert. Inwieweit Cytohesin-4 die Expression von Cytohesin-1 oder CYTIP reguliert, wurde in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht. Es ist bekannt, dass Cytohesin-1 in humanen DC die CYTIP-Expression positiv beeinflusst [23]. Da auch Cytohesin-4 als Interaktor von CYTIP nachgewiesen wurde [60], ist eine gegenseitige Regulation nicht auszuschließen. Auch Daten aus T-Zell Studien unterstützen diese These. Interessanterweise wurde mittels einer genomweiten Gen-Expressionsanalyse in humanen T-Zellen dokumentiert, dass Cytohesin-4 und CYTIP nach Stimulation exakt antagonistisch exprimiert und reguliert werden (J. Schultze, unveröffentlicht).

Ein wesentliches Kennzeichen reifer DC ist ihre hohe Motilität. Obwohl Cytohesin-4 in reifen BM-DC um weniger als die Hälfte als in unreifen BM-DC exprimiert wird (3.1.6), wäre es dennoch vorstellbar, dass Cytohesin-4 in reifen DC die Zellmigration reguliert. Allerdings zeigen die "Knock-down"-Analysen in reifen BM-DC, in denen Cytohesin-4 noch über die LPS-induzierte Expressionsverminderung hinaus weiter herunterreguliert wurde, keine gesteigerte Migration in dreidimensionalen Kollagen-Netzwerken (3.1.7). Insofern konnte diese Hypothese über einen RNAi-basierten Versuch nicht bestätigt werden. Gerade in diesem Zusammenhang wird die zukünftige Analyse von Cytohesin-4 "Knock-out"-DC eine gute Alternative zur RNAi bieten, um eindeutig den Cytohesin-4 Einfluss auf die Migration reifer BM-DC zu untersuchen, da der vollständige "Knock-out" des Proteins der RNAi stets überlegen ist. Interessant wären in diesem Zusammenhang Überexpressionsstudien von Cytohesin-4 in DC, um zu prüfen, ob die Zellmigration nach einer Cytohesin-4 Überexpression blockiert ist. Allerdings ist die Transfektion primärer DC mit DNA nur limitiert realisierbar. Eine relativ neue Methode zu diesem Zweck, das Mikroporieren in Goldküvetten, bewirkt in primären DC bisher bestenfalls Transfektionseffizienzen zwischen 1-5 %, und ist damit nicht ausreichend, um aussagekräftige Hinweise über das Migrationsverhalten in den entsprechenden *in vitro* Studien zu liefern.

Interessanterweise gibt es Studien über die PI3-Kinase hinsichtlich ihrer Regulation des T-Zellmigrationsverhaltens, in denen gezeigt wird, dass in artifiziellen Systemen, wie dem Transwell-Migrationsversuch, die Migration durch Inhibierung der PI3-Kinase gehemmt werden kann, nicht aber in physiologischen Migrations-Studien wie zum Beispiel der transendothelialen Zellmigration [190]. Da Cytohesin-4 möglicherweise über eine Regulation von Akt eine inhibierende Komponente im PI3-Kinase-Signalweg ist (3.2.5), könnte dies erklären, warum in den physiologisch-nachempfundenen 3D-Kollagen-Migrationsversuchen

die Cytohesin-4 RNAi keine Beeinflussung der Zellmigration zeigt.

Da die Cytohesin-4-Expression in unreifen DC sehr stark ist, könnte Cytohesin-4 für typische Funktionen unreifer DC eine Rolle spielen, so zum Beispiel für die Phagozytose. Für den Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor ARF-GEP100/BRAG2 ist kürzlich eine aktivierende Rolle in der Phagozytose monozytischer Phagozyten beschrieben worden, über die Regulation der GTPase ARF 6 [191]. Insofern sollte bei der Analyse der Cytohesin-4 “Knock-out“-Mäuse geprüft werden, ob dendritische Zellen hinsichtlich ihrer phagozytischen Aktivität gehemmt sind. Ebenfalls wäre zu prüfen, ob die Expression der kostimulatorischen Moleküle in unreifen DC im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist und ob die Morphologie unreifer Cytohesin-4 “Knock-out” DC verändert ist.

4.1.3 Cytohesin-Funktionen in der Migration unreifer DC

Für Migrations-Studien an Cytohesin-1 wurden bislang reife DC verwendet, da sie aufgrund ihrer physiologischen Funktion eine deutlich höhere Motilität als unreife DC besitzen. Zudem exprimieren humane DC im reifen Differenzierungs-Zustand deutlich mehr Cytohesin-1 als unreife DC [14, 23]. Der Einfluss von Cytohesin-1 auf die Migration unreifer BM-DC wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

Dabei bildete die Funktionsaufklärung von Cytohesin-4 zunächst die Grundlage für die Analyse unreifer BM-DC. Da Cytohesin-4 in unreifen BM-DC wesentlich stärker als in reifen BM-DC exprimiert wird, wurde bei unreifen DC die Migration im Transwell nach Cytohesin-4 RNAi untersucht (3.1.8) und mit Kontroll-Zellen und Cytohesin-1 “Knock-down” BM-DC verglichen. Obwohl unreife DC wesentlich adhärenter als reife DC sind, kann trotzdem mit Chemokinen wie CCL3 eine gerichtete Zellmigration ausgelöst werden [192]. Chemokine wie CCL19, welche für reife DC verwendet werden, können für unreife DC nicht als Stimulus eingesetzt werden, da der entsprechende Chemokinrezeptor (CCR7) erst während der Reifung heraufreguliert wird. Allerdings muss die Zellmigration von unreifen DC über längere Zeiträume beobachtet werden, da sie relativ langsam und mit starker Adhärenz migrieren. Aber auch in diesem an unreife DC angepasstem System konnte nach Stimulation mit dem Chemokin CCL3 keine Veränderung der Transmigration von Cytohesin-4 siRNA-behandelten Zellen im Vergleich mit Kontroll-Zellen beobachtet werden. Dabei lag die durchschnittliche Reduktion der Cytohesin-4 Expression bei ungefähr 50 %. Insofern wurde durch den Beginn der Generierung der konditionalen Cytohesin-4 “Knock-out” Maus die Grundlage für eine bessere Untersuchung der Cytohesin-4 Phänotypen in BM-DC gelegt, in welchen Cytohesin-4 komplett abwesend sein wird.

Während sich die siRNA-bedingte Verminderung der Cytohesin-4 Expression nicht auf die Transmigration unreifer BM-DC auswirkte, zeigte die RNAi von Cytohesin-1 jedoch überraschenderweise gegenteilige Effekte zur Migration reifer BM-DC und bewirkte eine deutliche Verstärkung der Transmigration (3.1.8). Ein Cytohesin-1 bedingter Rückgang der Zellmigration und damit eine negative Regulation durch Cytohesin-1 wurde bislang nur bei Neutrophilen beobachtet, in welchen der Cytohesin-1 “Knock-down” eine Verstärkung

der Zellmigration zur Folge hat (Bourgoin, persönliche Mitteilung an Prof. Kolanus). Darüber hinaus ist bekannt, dass Neutrophile im Gegensatz zu dendritischen Zellen die stärker Membran-affine Di-Glycin Spleiß-Variante von Cytohesin-1 exprimieren (Bourgoin, persönliche Mitteilung an Prof. Kolanus). Dies warf die Frage auf, ob möglicherweise in unreifen BM-DC ebenfalls diese Spleiß-Variante vermehrt exprimiert wird und ob unreife BM-DC daher in ihrem Zellmigrations-Verhalten ähnlich wie Neutrophile sind. Für die Cytohesine-2 und -3 wurde kürzlich dokumentiert, dass allein die unterschiedliche Expression von zwei oder drei Glycinen in der PH-Domäne die molekulare Basis für die Zelladhäsion an Fibronektin und das β_1 -Integrin-Recycling bildet [38]. So könnte die Expression verschiedener Glycin-Motive in der PH-Domäne die molekulare Grundlage der gegensätzlichen Wirkung von Cytohesin-1 auf die Migration in unterschiedlichen Zelltypen sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Cytohesin-1 mRNA Transkripte aus reifen und unreifen BM-DC untereinander verglichen. Das Ergebnis der Sequenzierung der cDNA der entsprechenden PH-Domänen-Region zeigte jedoch, dass sich reife und unreife DC hinsichtlich des dritten Glycins nicht unterscheiden, sondern in beiden Differenzierungs-Stadien die für DC typische Tri-Glycin Variante von Cytohesin-1 exprimieren (3.1.9). Somit wurde ausgeschlossen, dass die Di-Glycin Expressionsform die Grundlage für das unterschiedliche Migrationsverhalten unreifer und reifer BM-DC nach Cytohesin-1 RNAi ist.

Eine Möglichkeit, die gegensätzliche Wirkung von Cytohesin-1 in reifen und unreifen BM-DC in Bezug auf die Zellmigration zu erklären, wäre eine Untersuchung hinsichtlich der Chemokin-Rezeptor-Expression. Für die Zellmigrations-Experimente an reifen BM-DC wurde das lymphoide Chemokin CCL19 verwendet. Dessen Rezeptor CCR7 wird nachgewiesenermaßen nicht von einer Cytohesin-1 RNAi in reifen BM-DC beeinflusst (Quast, unveröffentlicht). Nicht bekannt ist allerdings, ob der CCL3-Rezeptor CCR1 möglicherweise nach Cytohesin-1 RNAi in unreifen BM-DC vermehrt exprimiert wird, und somit die gesteigerte Transmigrationsrate erklären könnte.

4.2 Cytohesin-4 Funktionen in T-Zellen

4.2.1 Die Rolle von Cytohesin-4 im PI3-Kinase/Akt Signalweg

Im vorherigen Abschnitt wurde die Expressionsverminderung von Cytohesin-4 während der DC-Reifung beschrieben. In T-Zellen konnten ähnliche Beobachtungen zur Cytohesin-4 Expression gemacht werden. Durch die Analyse der spezifischen Genexpression wurde gezeigt, dass die Expression von Cytohesin-4 im zeitlichen Verlauf der TCR-Aktivierung in primären humanen CD4⁺T-Zellen herunterreguliert wird (3.2.1). Dabei ist in nicht-stimulierten ruhenden T-Zellen die stärkste Cytohesin-4 Expression nachweisbar. Dass die Cytohesin-4 Expression abhängig vom Aktivierungszustand der T-Zellen ist, macht zudem die Cytohesin-4 Expression in Tumorzellen im Vergleich zu primären Zellen deutlich. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die stets proliferierende T-Zell-Linie Jurkat E6.1 keine nachweisbare Cytohesin-4 Expression aufweist, primäre Zellen hingegen schon (3.2.1).

Zusammen mit der Reprimierung der IL-2 Produktion [15, 60] lassen diese Daten darauf schließen, dass Cytohesin-4 eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Ruhezustandes von T-Zellen spielt.

Hierfür sprechen auch Daten, die im Rahmen einer Genom-weiten Expressions-Analyse gewonnen wurden. Hier gab es erste Hinweise darauf, dass Cytohesin-4 in humanen CD4⁺-T-Zellen einer Reprimierung nach TCR-Aktivierung unterliegt (Schultze, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse entsprechen auch Daten aus murinen Zellen. So wurde eine maximale Cytohesin-4 Expression in naiven murinen T-Zellen nachgewiesen, welche nach T-Zell-Aktivierung herunterreguliert wird [15].

In der späteren Analyse der Cytohesin-4 “Knock-out”-T-Zellen sollte demnach geprüft werden, ob der Anteil naiver, ruhender T-Zellen erniedrigt ist oder ob die T-Zellen möglicherweise in einem präaktivierten Zustand vorliegen.

Das zentrale Merkmal ruhender T-Zellen ist, dass keine Zellteilung stattfindet. Cytohesin-4 könnte demnach die Zellzyklusprogression und damit assoziierte Signalwege reprimieren und auf diese Weise die T-Zellen in einem inaktiven Zustand halten. Ein zentrales Zielgen der Zell-Zyklus-Inhibition ist der Cyklin-Inhibitor p27 [193]. Um zu prüfen, ob Cytohesin-4 p27 aktiviert, wurde in humanen primären T-Zellen mittels RNAi die Cytohesin-4 Expression herunterreguliert und anschließend die Transkriptmengen von p27 quantifiziert (3.2.2). Dabei zeigte sich trotz eines Cytohesin-4 “Knock-downs” von bestenfalls 50 %, dass die mRNA-Level von p27 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls um die Hälfte reduziert waren (3.2.2). Somit könnte der Ruhezustand der T-Zellen dadurch aufrechterhalten werden, dass Cytohesin-4 den Zellzyklus-Inhibitor p27 aktiviert oder im Signalweg p27 vorgeschaltet ist. p27 ist als direktes Zielgen von FoxO beschrieben und wird durch Wachstums-Stimuli wie Insulin oder nach TCR-Aktivierung über den PI3-Kinase/Akt Signalweg negativ gesteuert. Dabei inhibiert die Kinase Akt den Transkriptionsfaktor FoxO. Die Mitglieder der FoxO-Proteine wirken nicht nur über eine Regulation des Promotors von p27 auf dessen Transkription [118], sondern steuern auch die Lokalisierung und Stabilität von p27. So inhibiert beispielsweise FoxO4 die Proteinkinase Akt und fördert so die nukleäre Lokalisation von p27 und vermindert die Expression von COPS5, einem Protein, welches für den Abbau von p27 verantwortlich ist [194]. FoxM1 reguliert zum Beispiel die Stabilität von p27 [195]. Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3 legen nahe, dass die Aktivierung von p27 durch Cytohesin-4 über FoxO1 gesteuert wird. Denn auch FoxO1 wird in seiner Transkription nach Cytohesin-4 RNAi vermindert (3.2.3). Dass nach Cytohesin-4 RNAi die Transkriptmenge von p27 reduziert ist, nicht aber die Proteinmenge von p27, könnte daran liegen, dass Cytohesin-4 durch die RNAi nicht vollständig depletiert ist, ein Nachteil, welcher zukünftig durch das “Knock-out”-Modell von Cytohesin-4 behoben sein wird. In zukünftigen Experimenten sollte zudem unbedingt ein Einfluss des Cytohesin-4 “Knock-out” auf die p27-Phosphorylierung geprüft werden. Da p27 nach Phosphorylierung proteasomal abgebaut wird, würde man erwarten, dass Cytohesin-4 einer Phosphorylierung von p27 entgegenwirkt. Erste Hinweise darauf liefern die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.4. Da in den primären T-Zellen die Tendenz zu beobachten ist, dass die Zellen nach einem Cytohesin-4

“Knock-down” vermehrt in die Synthese- und Mitosephase übergehen, könnte Cytohesin-4 tatsächlich die Phosphorylierung verhindern. Darüber hinaus könnte Cytohesin-4 auch die zelluläre Lokalisation von p27 steuern. Dies müsste mittels intrazellulärer Färbungen geprüft werden. Ein Einfluss von Cytohesin-4 auf die Phosphorylierung FoxO sollte ebenso weiter untersucht werden wie auch die zelluläre Lokalisation von FoxO. Es wäre zu erwarten, dass Cytohesin-4 die Phosphorylierung von FoxO verhindert und dadurch fördernd auf die Kernlokalisierung von FoxO und p27 wirkt. Insgesamt betrachtet ist Cytohesin-4 in der Signalkaskade wahrscheinlich nicht nur oberhalb von p27, sondern auch oberhalb von FoxO1 zu positionieren.

Cytohesin-4 hat keinen Einfluss auf die Zell-Zyklus-Progression Da Cytohesin-4 mit FoxO1 und p27 zentrale Inhibitoren des Zellzyklus fördert, wurde durch siRNA-verminderte Cytohesin-4-Expression in primären T-Zellen oder durch Überexpression von Cytohesin-4 in Jurkat T-Zellen untersucht, ob Cytohesin-4 eine Progression des Zellzyklus verhindert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine 30-50 %ige Überexpression von Cytohesin-4 keine Wirkung auf den Ablauf des Zellzyklus hat (3.2.4). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass nach erfolgter Proliferation die transient vorliegenden Überexpressions-Konstrukte nicht weitergegeben werden, und das System für eine klare Beurteilung der Proliferation nur limitiert geeignet ist, da die Cytohesin-4 Überexpression nur am Tag der Stimulation maximal ist, im Lauf der Zeit aber wieder abnimmt. Obgleich in der Literatur vielzählige Zellzyklus-Studien an Tumor-Zellen beschrieben sind, sind Krebszellen aufgrund ihres im Vergleich zu primären Zellen veränderten Zellzyklus für derartige Studien stets kritisch zu betrachten.

Hier sind die RNAi-basierten Studien in primären T-Zellen aussagekräftiger. Die Reduktion von Cytohesin-4 in primären T-Zellen zeigt zwar keinen signifikanten Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus, allerdings lässt sich beobachten, dass Cytohesin-4 RNAi tendenziell das Fortschreiten des Zellzyklus verstärkt. Da aber auch in diesen Experimenten der maximal erreichte “Knock-down” die Proteinmengen nicht komplett reduzierte, sollte künftig in Cytohesin-4 “Knock-out”-T-Zellen untersucht werden, ob die Zellzyklusprogression verstärkt ist und ob es Hinweise auf eine vermehrte T-Zell-Proliferation gibt.

Darüberhinaus muss in Betracht gezogen werden, dass der Zellzyklus-Inhibitor p27 nicht nur Funktionen in der Zell-Zyklus-Regulation hat. Da p27 auch Prozesse wie Zellmigration oder Apoptose reguliert, könnte Cytohesin-4 über die Steuerung von p27 möglicherweise Zellmigration oder Überleben regulieren.

Verschiedene Versuche an Jurkat T-Zellen im Rahmen dieser Arbeit machten deutlich, dass eine Anreicherung der Cytohesin-4-überexprimierenden Zellen über Zellsortierung eindeutige Effekte, wie zum Beispiel bei der Akt-Phosphorylierung, forcieren konnte (3.2.5). Eine Vorsortierung der Zellen kann allerdings nicht für alle Versuche genutzt werden, sodass für künftige Analysen die Herstellung stabiler Zell-Linien, welche Cytohesin-4 überexprimieren, die Analyse von Cytohesin-4 Funktionen erleichtern würde.

Cytohesin-4 ist ein Repressor der Akt-Phosphorylierung Die Proteinkinase Akt ist ein zentraler Schalter im PI3-Kinase Signalweg und aktiviert sowohl nach TCR-Stimulation als auch im Rahmen des Insulin-Signalwegs zelluläre Wachstums- und Proliferationsprozesse (zusammengefasst in [196, 197]). Akt wird über Phosphorylierung aktiviert und bindet über PH-Domänen an PIP₂ und PIP₃ in der Plasmamembran. Sie ist ein direktes Zielprotein der PI3-Kinase, welche PIP₃ generiert, an welches wiederum diverse Proteine mit PH-Domänen binden können, so auch Cytohesine. Cytohesin-3 wird von der PI3-Kinase aktiviert, und das *Drosophila* Cytohesin-Homolog *steppke* ist der PI3-Kinase im Signalweg übergeordnet und unterliegt einer transkriptionellen Regulation durch FoxO [16, 17].

Auch für Cytohesin-2 ist eine Beteiligung am Insulin-Signalweg beschrieben [42, 125, 198].

Für Cytohesin-4 war bisher nicht bekannt, ob es ebenfalls ein Faktor des PI3-Kinase Signalwegs ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-4 in die Regulation des PI3-Kinase/Akt Signalwegs involviert ist, indem es die Phosphorylierung von Akt in Jurkat-T-Zellen blockiert (3.2.5). Jurkat T-Zellen verfügen als stark proliferierende Krebszellen über konstitutiv aktives Akt und exprimieren im Gegensatz zu primären T-Zellen weder Cytohesin-4 (3.2.1) noch PTEN [122]. Die Überexpression von Cytohesin-4 in Jurkat-Zellen hat eine deutliche Reduktion der Akt-Phosphorylierung zur Folge, sowohl am Threonin 308 als auch am Serin 473. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese vereinbar, dass Cytohesin-4 im TCR-Signalweg reprimierend wirkt. Eine Akt-Inaktivierung durch Cytohesin-4 erklärt auch den fördernden Einfluss von Cytohesin-4 auf FoxO1 und p27. Cytohesin-4 kann im Signalweg Akt vorangestellt werden. Oberhalb im Signalweg von Akt ist die PI3-Kinase positioniert, welche die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ katalysiert. Ob Cytohesin-4 die PI3-Kinase inhibiert, muss noch untersucht werden. Denkbar wäre, dass Cytohesin-4, eventuell nach Phosphorylierung, Membran-proximal agiert, eine Rekrutierung der PI3-Kinase verhindert und so die Menge an PIP₃ in der Plasmamembran reduziert. In der Literatur sind Analysetechniken beschrieben, die PIP₃-Mengen in Lipid-Doppelschichten zu quantifizieren [199]. Die Lipid-Analyse von Jurkat T-Zellen sollte demnach ergeben, dass in Cytohesin-4-überexprimierenden T-Zellen weniger PIP₃ in der Plasmamembran zu finden ist. Weiterhin könnte Cytohesin-4 auch über die Blockierung von PIP₃-Bindestellen eine Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran verhindern oder einschränken. Cytohesin-4 wird wie Cytohesin-3 in T-Zellen hauptsächlich in der Di-Glycin-Spleißvariante exprimiert. Diese hat eine höhere Affinität zu PIP₃ als die Tri-Glycin-Variante [15]. So könnte in ruhenden T-Zellen Cytohesin-4 die vorhandenen PIP₃-Bindestellen besetzen und so die Membranrekrutierung von Akt erschweren, welches zur Aktivierung an die Membran binden muss.

Kürzlich wurde eine fördernde Rolle von Cytohesin-2 im PI3-Kinase/Akt Signalweg beschrieben. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Interaktion zwischen Cytohesin-2 und dem Gerüstprotein CNK-1 wichtig für die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt Signalwegs ist, und Cytohesin-2 nach Insulinrezeptor-Stimulation CNK1-vermittelt verstärkt an die Plasmamembran rekrutiert wird. Die Cytohesine-1 und -3 binden CNK-1 ebenfalls über ihre

Coiled-coil Domänen, eine Bindung an Cytohesin-4 wurde bisher nicht beschrieben, da die Interaktions-Analysen in Nicht-Immunezellen durchgeführt wurden [41]. Insofern ist es möglich, dass Cytohesin-4 nicht wie die anderen Cytohesine mit CNK-1 interagiert und dadurch im Gegensatz zu Cytohesin-2 die Akt-Aktivierung nicht fördert sondern unterdrückt. Möglicherweise wirken Cytohesin-2 und Cytohesin-4 im Akt-Signalweg als Gegenspieler, ein Prinzip, welches schon für Cytohesin-1 und -3 im TCR-Signalweg und für Cytohesin-2 und -3 beim Integrin-Recycling beschrieben ist [15, 24, 38].

Da die durch PDK1-vermittelte Akt-Phosphorylierung am Threonin 308 der Serin 473-Phosphorylierung durch mTORC2 vorausgeht, könnte Cytohesin-4 im Signalweg oberhalb von PDK1 lokalisiert sein, dies sollte zukünftig analysiert werden.

Interessanterweise wurde die Repression der Akt-Phosphorylierung nach Cytohesin-4 Überexpression in Jurkat-Zellen erst in einer fast 100 %ig positiv transfizierten Population deutlich (3.2.5). Kürzlich wurde ein Regulationsmechanismus für den GEF GIV (auch Girdin) beschrieben [200], welcher über ein spezielles Aminosäuremotiv die Phosphorylierung von Akt fördert. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht auf dem Überschreiten eines Schwellenwertes, welcher sowohl auf einer Kopienzahl von GIV, also dem Expressionslevel, als auch auf der Stärke der Aktivität beruht. Auch Cytohesin-4 könnte ganz ähnlich über Schwellenwerte reguliert sein. Dies würde erklären, warum die Reprimierung der Akt-Phosphorylierung besonders deutlich in maximal Cytohesin-4 positiven Zellen zu beobachten ist.

Ein weiterer Weg, die durch Cytohesin-4-bedingte Inhibition der Akt-Phosphorylierung zu erklären, führt über Integrine. Verschiedene Publikationen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Integrin-Aktivierung und einer Regulation der Akt-Phosphorylierung über PTEN hin [201, 202]. PTEN agiert als direkter Gegenspieler zur PI3-Kinase, indem es die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ katalysiert. Es wurde beschrieben, dass die PTEN-Expression und PTEN-Aktivität nach einer Integrin-Aktivierung reduziert ist [202]. Insgesamt wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen Integrin und Kollagen zu einer Reduktion des Transkriptionsfaktors FoxO3a führt. Dieses bedingt eine verstärkte FoxO3a Inhibition über den PI3-Kinase/Akt Signalweg [202]. Möglicherweise führt ein ähnlicher Signalweg über LFA-1 und Cytohesin-4 zur Reduktion von p27. Dies könnte untersucht werden, indem man mit Hilfe eines "Flow Assays" prüft, ob Cytohesin-4 direkt die Integrin-Aktivierung vermindert. Darüberhinaus könnte man Cytohesin-4-überexprimierende T-Zellen mit blockierenden LFA-1 Antikörpern behandeln und anschließend prüfen, ob die Cytohesin-4 Überexpression dann nicht mehr die Akt-Phosphorylierung blockiert. Auch könnte über die Zugabe des LFA-1 Liganden ICAM-1 eine Integrin-Aktivierung bewirkt werden und nach Cytohesin-4 Überexpression untersucht werden, ob sich die Akt-Phosphorylierung verändert.

Die Aktivität von Akt wird durch zwei verschiedene Phosphatasen terminiert, eine davon ist die Proteinphosphatase 2A (PP2a). PP2a beendet über die Dephosphorylierung von Akt am Threonin 308 die Akt-Aktivität. In Studien an Fibroblasten wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem β_1 -Integrine einen Komplex mit PP2a bilden. Dieser Komplex hat

die mTOR-Signalweg-Komponente TSC2 zum Substrat und aktiviert diesen. Aktiviertes TSC2 führt zu einer Inhibierung der S6Kinase und blockiert den Zellzyklus am Übergang der G1/S-Phase. Dieser Mechanismus hat in Fibroblasten allerdings nur einen geringen Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung [203].

Da PP2a über eine Reihe von Protein-Interaktions-Domänen verfügt, könnte hier ein Angriffspunkt für Cytohesin-4 liegen. Es gibt erste Hinweise, dass Cytohesin-4 mit dem β_2 -Integrin LFA-1 interagiert (O'Long, unveröffentlicht). Im Rahmen dieser Interaktion könnte auch PP2a in einen Integrin-Cytohesin-Komplex rekrutiert werden. Cytohesin-4 würde möglicherweise für Akt und PP2a eine Art Rekrutierungsfunktion übernehmen und damit die Phosphatase-Aktivität von PP2a an Akt fördern. In diesem Modell müsste eine LFA-1 Aktivierung inhibierend auf Cytohesin-4 wirken, beziehungsweise Cytohesin-4 müsste die Integrin-Aktivierung blockieren.

Eine weitere indirekte Möglichkeit, wie Cytohesin-4 PP2a aktivieren könnte, wäre ein Mechanismus, der über IL-2 gesteuert wird. Während der T-Zell-Aktivierung wird PP2a herunterreguliert, und abhängig von niedrigen IL-2 Konzentrationen wird es verstärkt exprimiert [204]. Da Cytohesin-4 die IL-2 Produktion blockiert [15, 60], wäre es denkbar, dass Cytohesin-4 darüber indirekt die Aktivität von PP2a in seiner Funktion als Akt-Phosphatase fördert.

Eine mögliche Aktivierung der PP2a durch Cytohesin-4 wäre auch in DC vorstellbar. So wurde in dieser Arbeit beschrieben, dass die Expression von Cytohesin-4 LPS-induziert herunterreguliert wird. In einer Gen-Expressions-Studie, in welcher die divergente Expression von Genen während der DC-Reifung verglichen wurde, zeigte sich interessanterweise, dass auch die PP2a herunterreguliert wird [205].

In zukünftigen Studien sollte unbedingt in dendritischen Zellen untersucht werden, ob Cytohesin-4 auch hier den Akt-Signalweg blockiert. Vergleichende Studien von DC aus jungen und älteren humanen Spendern zeigten in einer Studie, dass Akt im PI3-Kinase Signalweg in DC aus älteren Spendern durch eine verstärkte Expression von PTEN herunterreguliert wird [206]. Dies führt zu einer verminderten Akt-Phosphorylierung in DC, einhergehend mit eingeschränkter phagozytotischer Aktivität. Möglicherweise erfährt Cytohesin-4 eine ähnliche Regulation und hat mit zunehmendem Alterungsprozess suppressive Funktionen in Immunzellen. Bei der Analyse der Cytohesin-4 "Knock-out"-Mäuse sollte unbedingt in Erwägung gezogen werden, dass möglicherweise mit zunehmendem Alter der Tiere Phänotypen ersichtlich werden, allerdings wahrscheinlich eher mit Monocyten-generierten DC als mit BM-DC, da die Effekte in Stammzell-generierten DC weniger Altersabhängig sind.

Fuss und Hafner konnten in unabhängigen Studien beobachten, dass der Einsatz des Cytohesin-Inhibitors SecinH3 eine reduzierte Akt-Phosphorylierung bewirkt [16, 17]. SecinH3 inhibiert die Cytohesine-1, -2 und -3, eine Inhibition von Cytohesin-4 ist nicht nachgewiesen [17]. Dass Cytohesin-3 und Cytohesin-4 im PI3-Kinase Signalweg gegensätzliche Aufgaben wahrnehmen, könnte an einer Interaktion mit verschiedenen ARF-GTPasen liegen. Cytohesin-3 interagiert zum Beispiel mit ARF6 [49], wohingegen Cytohesin-4 keine *in vitro* Aktivität für ARF6 zeigt ([46], Tabelle 1.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 auch die Phosphorylierung der S6Kinase inhibiert (3.2.5). Nach Cytohesin-4 Überexpression ist ein deutlicher Rückgang der S6Kinasen-Phosphorylierung zu beobachten. Da die S6-Kinase zelluläre Prozesse wie Proteinbiosynthese und Wachstum fördert, stützt dieses Ergebnis die Hypothese, dass Cytohesin-4 T-Zellen im inaktiven Zustand hält und damit auch Wachstumsprozesse limitiert.

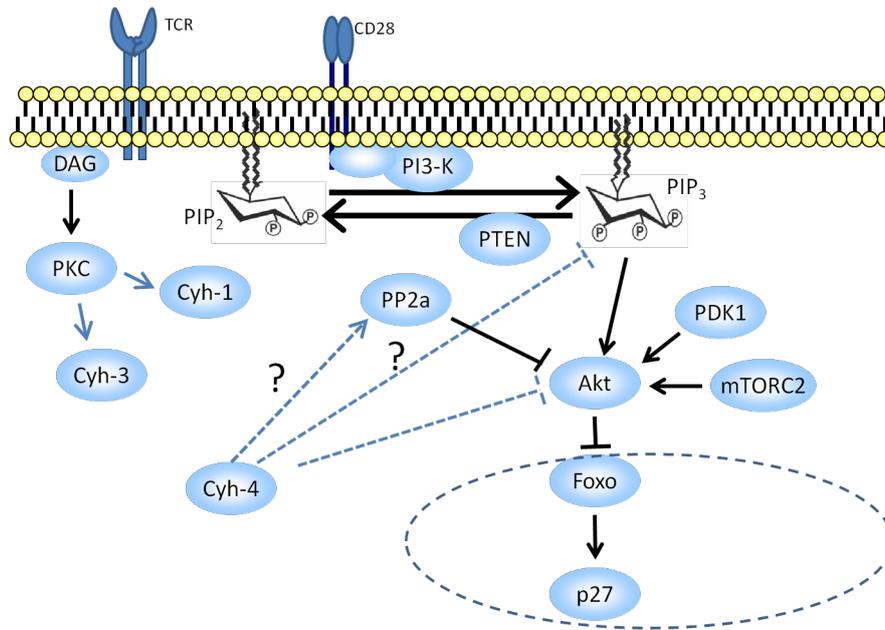


Abbildung 4.2: **Modell zur Einordnung von Cytohesin-4 in den PI3-Kinase Signalweg.** Cytohesin-4 wirkt aktivierend auf mRNA-Level von p27. Ebenso fördert Cytohesin-4 die FoxO-Expression. Nach Cytohesin-4 Überexpression wird die Phosphorylierung von Akt blockiert, sowohl die von PDK1-katalysierte als auch die von mTORC2 induzierte. Cytohesin-4 inhibiert den Akt Signalweg, im Gegensatz zu Cytohesin 3 und *steppke*, welche den Akt Signalweg fördern. Eine Inhibition der PI3-Kinase durch Cytohesin-4 und damit eine Reduktion von PIP₃ sowie ein fördernder Einfluss von Cytohesin-4 auf PP2a sollte zukünftig untersucht werden.

4.2.2 Die Rolle von Cytohesin-4 in T-Zell-Migration und -Adhäsion

Der regulatorische Einfluss verschiedener Cytohesine auf Zelladhäsion und Migration führte zu der Hypothese, dass auch Cytohesin-4 aktivierend oder blockierend in diesen Prozessen wirken könnte. Es gibt erste Hinweise, dass Cytohesin-4 mit LFA-1 kopräzipitiert (Ming und O'Long, unveröffentlicht). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von Cytohesin-4 mittels siRNA in primären humanen T-Zellen keine Änderung des Zell-Adhäsionsverhalten zur Folge hat (3.2.6). Da Cytohesin-1 als starker Aktivator der Zell-Adhäsion über LFA-1 an ICAM-1 beschrieben ist [13, 14, 22, 23], ist es denkbar, dass Cytohesin-1 mögliche Effekte von Cytohesin-4 kompensieren könnte. In zukünftigen Versuchen sollte geklärt werden, ob ein Cytohesin-1/Cytohesin-4 Doppel-"Knock-down" die Zell-Adhäsion kumulativ schwächt. Zudem ist durch den siRNA-vermittelten "Knock-down" die Cytohesin-4 Protein-Expression nicht komplett reduziert, sodass in "Knock-out"-Zellen von Cytohesin-4 Mäusen unbedingt die Zelladhäsion weiter untersucht werden sollte.

Auch bezüglich der Zellmigration konnte keine Beteiligung von Cytohesin-4 nachgewiesen werden. In den Abschnitten 3.1.7 und 3.1.8 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 weder die Zellmigration reifer BM-DC in dreidimensionalen Kollagen-Strukturen noch im Transwell beeinflusst. Gleichmaßen konnte auch in T-Zellen bisher keine Regulation der Jurkat T-Zellmigration durch Cytohesin-4 nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.6). Neuere Daten geben aber mittlerweile Hinweise darauf, dass unter bestimmten Konditionen doch Cytohesin-4 spezifische Effekte in der Zellmigration zu beobachten sind (J. Ratter, unveröffentlicht). So wurde im Rahmen der Analyse der Akt-Phosphorylierung deutlich, dass Effekte von Cytohesin-4 nach einer Anreicherung Cytohesin-4 positiver Zellen verstärkt wurden (vergleiche Abschnitt 3.2.5). Möglicherweise ist eine fast 100 %ige Überexpression von Cytohesin-4 nötig, um eindeutige Aussagen über die Proteinfunktion zu treffen. So zeigen erste Versuche mit Jurkat T-Zellen im Transwell, bei welchen man nur GFP- und damit Cytohesin-4 positive Zellen betrachtet, signifikante Effekte auf das Zellmigrationsverhalten in Richtung des Chemokins CXCL12. So erreichen weniger positiv-transfizierte T-Zellen das untere Kompartiment (J. Ratter, unveröffentlicht). Damit wäre Cytohesin-4 ein Inhibitor der Chemokin-induzierten Zellmigration. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wirkt Cytohesin-4 fördernd auf p27 (s. Abschnitt 3.2.2). Für p27 ist wiederum bekannt, dass es über direkte Bindung RhoA inhibiert [146]. Da Cytohesin-4 keinen nachweisbaren signifikanten Einfluss auf die Zell-Zyklus Regulation zeigt (s. Abschnitt 3.2.4), sind die Auswirkungen von Cytohesin-4 auf die p27 Transkription möglicherweise in der Regulation der Zellmigration zu suchen. Somit würde Cytohesin-4 über die Aktivierung von p27 dessen inhibitorische Wirkung auf RhoA verstärken und so die Zellmigration vermindern. In aktivierten T-Zellen, in denen die Cytohesin-4 Expression vermindert ist, würde so eine Chemokin-induzierte Migration leichter stattfinden. Zudem ist bekannt, dass die PI3-Kinase Zellmigration fördert [207, 208]. Da Cytohesin-4 auf das PI3-Kinase Zielprotein Akt inhibitorisch wirkt, würde auch dies für eine blockierende Rolle für Cytohesin-4 in der Zellmigration sprechen. Dann würde es antagonistisch zu den Cytohesinen-1 und -2 wirken, welche beide starke Aktivatoren der Zellmigration sind (3.1.3; [14, 23, 35, 36]). Für Cytohesin-1 konnte gezeigt werden, dass es in der Regulation der Zellmigration oberhalb von RhoA im Signalweg positioniert werden kann (Teile dieser Arbeit; [14]). Inwieweit Cytohesin-4 einen Einfluss auf die Aktivität auf RhoA hat, müsste in zukünftigen Versuchen noch aufgeklärt werden. Aufgrund der positiven Regulation von p27 wäre eine Inhibierung von RhoA durch Cytohesin-4 zu erwarten.

Da Cytohesin-1 die Migration in den verschiedensten Zell-Systemen deutlich unterstützt, ist es möglich, dass Cytohesin-1 in diesem Zusammenhang eventuell Cytohesin-4-bedingte Modulationen der Zellmigration überdeckt oder für einen Cytohesin-4 Einfluss redundant ist.

4.3 Entwicklung genetischer Mausmodelle

4.3.1 Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-1 “Knock-out”

Für die Generierung der Targeting-Konstrukte wurde die Methode des Bakterien-basierten “Recombineering” gewählt, um unabhängig von Restriktionsschnittstellen möglichst große Homologie-Arme in den Konstrukten generieren zu können.

Recombineering (*recombination-mediated genetic engineering*) ist eine effiziente Methode zur Herstellung von Targeting-Vektoren und Schnittstellen-unabhängigen Klonierungen, welche von Copeland *et al.* [174] beschrieben wurde und sich das Prinzip der Phagen-Gen-basierten homologen Rekombination in speziell konstruierten Bakterien-Stämmen zunutze macht. Es ermöglicht die Klonierung sehr großer DNA-Bereiche, ohne auf Restriktionsschnittstellen oder DNA-Ligasen angewiesen zu sein und erspart die Generierung langer Homologie-Arme über PCR und ermöglicht zudem deutlich größere Homologie-Elemente, als mittels verfügbarer Taq-Polymerasen produzierbar wären.

Die Grundlage dieser Methode sind drei Phagen-Gene, welche in das *E. coli* Genom integriert wurden. Es sind zwei Phagen-basierte Rekombinationssysteme bekannt. Das *Rac-encoded RecET system* und das *λ-encoded Red system*. Das RecET-System wurde zuerst beschrieben und arbeitet mit den Exo und Bet homologen Genen *recE* und *recT*, welche über Überexpressionskonstrukte in die entsprechenden Bakterienstämme eingebracht werden. Das *λ*-System hingegen hat in speziellen Bakterienstämmen den Prophagen ins *E. coli*-Genom inseriert. Mittels dieser Methode wurden unter Verwendung entsprechender BAC-Klone sowohl für Cytohesin-1 als auch für Cytohesin-4 Targeting-Konstrukte mit großen Homologie-Bereichen (ungefähr 12.5 kb beziehungsweise ungefähr 15.5 kb) kloniert.

Die Etablierung eines konditionalen im Gegensatz zu einem konventionellen Cytohesin-1 “Knock-out” hat den Vorteil, dass der Phänotyp nicht embryonal letal ist, wenn das Gen essentiell für die Entwicklung ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das Zielgen Zell- oder auch Gewebe-spezifisch auszuschalten oder zeitlich reguliert in verschiedenen Entwicklungsstadien zu deletieren.

Für den konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out” wurden die Exons 2 und 3 mit *loxP*-Bereichen flankiert. Die Deletion der Exons 2 und 3 durch die Verpaarung mit entsprechenden *Cre Deleter*-Mäusen würde zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens führen. Allerdings konnte diese Strategie mit dem ersten Ansatz der Cytohesin-1 Targetierung nicht verwirklicht werden.

Die Analyse der ES-Zell-Klone des konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out” ergab, dass von ungefähr 800 Klonen vier nachgewiesenermaßen die 5’-*loxP*-”site” tragen. Somit liegt die Frequenz für die 5’-Insertion bei 1:200. Allerdings zeigte keiner dieser Klone eine vollständige Insertion des Targeting-Konstrukts. Damit war die 3’-Rekombination des Targeting-Konstrukts ins Genom nicht erfolgreich. Eine wahrscheinliche Ursache für den Abbruch der Insertion ist die Entfernung der *loxP*-Bereiche zueinander. Die 3’-*loxP*-”site” liegt mit einer Entfernung von 7kb relativ weit entfernt von der Resistenzkassette des Konstrukts. Trotz der langen Homologie und damit verbundenen hohen Rekombinationswahrscheinlichkeit

kann es dadurch zu einer Instabilität und zum Abbruch der Insertion kommen.

Die Klone mit der 5'-Insertion des Targeting-Konstrukts wurden trotz unvollständiger Rekombination weiter verwendet. Die 5'-inserierte Neomycin-Resistenz-Kassette ist mit einem "bovine growth hormone polyadenylation" (bGHpA) Signal versehen, welches für einen Transkriptions-Stop und eine Stabilisierung des mRNA-Transkripts sorgt. Insofern sollte die Insertion dieser Kassette in den Cytohesin-1 Genlokus bewirken, dass im homozygoten Fall kein vollständiges Cytohesin-1 Transkript mehr generiert werden kann, da das Polyadenylierungssignal unter konstitutiver Promotorkontrolle steht.

Um vorab zu prüfen, ob die Transkription durch die Insertion dieser Kassette tatsächlich zum Abbruch kommt, wurden mRNA-Transkripte aus Wildtyp-ES-Zellen und den 5'-targetierten Klonen verglichen. Allerdings zeigt sich, dass in ES-Zellen keine Cytohesin-1 Expression detektierbar ist (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Stammzellen über den Einsatz von Retinsäure zu Neuronen differenziert. In diesen differenzierten Zellen wird Cytohesin-1 exprimiert (3.3.5). Für den Fall, dass die Insertion der Neomycin-Resistenz-Kassette und dem Polyadenylierungssignal tatsächlich funktionell ist, sollten in den targetierten Klonen die mRNA-Transkripte zur Hälfte reduziert sein, da von einem Allel die Transkription normal stattfinden kann, auf dem targetierten Allel aber die Transkription nach Exon 1 abgebrochen wird. Die verwendete Sonde der semi-quantitativen PCR bindet in der 3'-Region des Transkripts. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.5 zeigen, dass die Klone 64 und 84 im Vergleich zum Wildtyp eine ungefähr 50%ige Reduktion der Cytohesin-1 mRNA zeigen. Demnach sollte es möglich sein, die Klone weiter für einen Total-"Knock-out" des Cytohesin-1 Gens zu verwenden. Allerdings enthält die verwendete pL451-Kassette mit dem Stop-Signal keine "Splice-Acceptor"-Sequenz, insofern bleibt ein Restrisiko offen, dass das Polyadenylierungssignal durch das Spleißing überlesen wird und dennoch Cytohesin-1-Protein exprimiert wird. Dies in der erhaltenen "Knock-out" Maus zu prüfen ist unabdingbar. Gleichzeitig deuten allerdings die mRNA-Mengen in den Neuronen darauf hin, dass der Transkriptabbruch zu funktionieren scheint.

Die Karyotypisierung der beiden in Frage kommenden Klone ergab, dass die Chromosomensätze zu 35 % oder 20 % bei 40 diploiden Chromosomen lagen. Dies ist nicht optimal, wurde aber dennoch für nachfolgende Injektionen weiter verwendet. Eventuell besteht ein Nachteil in der Keimbahngängigkeit, dies ist zum derzeitigen Zeitpunkt allerdings noch nicht bekannt.

Bei den verwendeten Stammzellen handelte es sich um die E14-Zell-Linie mit "SV129/P2 ola" Hintergrund. Bei den ersten Morulae-Injektionen zeigte sich, dass die Chimärität der Cytohesin-4 ES-Zellen, bei denen es sich um IB10-ES-Zellen mit ebenfalls "SV129/P2 ola" Hintergrund handelte, viel stärker war (90-100 % im Vergleich zu 5 %). Insofern scheinen in diesem System die IB10-ES-Zellen geeigneter und sollen aus diesem Grund in folgenden Experimenten für den optimierten konditionalen Cytohesin-1 "Knock-out" verwendet werden.

Für die Cytohesin-1 E14-Klone wurden wegen des schwachen Chimärismus im zweiten Ansatz Blastozysten-Injektionen angesetzt. Diese resultierten in einer zum Teil hohen Chi-

märität von bis zu 90 %.

Dennoch stand nach wie vor im Vordergrund, einen konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out” zu generieren. Vergleicht man die unvollständige Insertion des Cytohesin-1 Targeting-Vektors mit der vollständigen Insertion des Cytohesin-4 Konstrukts (Vergleiche Abschnitt 3.4), in welchem die Entfernung der beiden *loxP*-”sites” 4.8 kb beträgt, so könnte dies eine mögliche Erklärung für die unvollständige Insertion des Cytohesin-1 Konstrukts sein. Um dennoch das finale Ziel eines “gefloxten” Cytohesin-1 Genlokus zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives Cytohesin-1 Targeting-Konstrukt geplant und begonnen, bei welchem die distale 3’-*loxP*-”site” näher an die Resistenzkassette gerückt wurde. Dieser Abstand wurde auf 4.4 kb verkürzt und sollte nach den Erfahrungswerten aus dem Cytohesin-4-”Knock-out” eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, vollständig mit beiden *loxP*-”sites” in den Cytohesin-1 Genlokus zu inserieren. Zur Überprüfung der vollständigen Insertion wurde eine alternative Southern-Blotting Strategie entworfen, welche auf einer Restriktion mit *EcoRV* beruht, bei der aber die identische 3’-Sonde verwendet werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, die Insertion der 3’-Homologie zu garantieren, wäre die Verwendung eines zusätzlichen Selektionsmarkers in dieser Kassette, wie zum Beispiel eine Puromycin-Resistenz. Allerdings würden dann die ES-Zellen mit einem weiteren Antibiotikum belastet werden. Insofern müsste der Nutzen einer solchen Strategie genau abgewogen werden.

Die Verpaarung der Cytohesin-1 ^{*lox*}*cyh* – 1^{*lox*} Mäuse sollte zunächst mit *PGK-Cre*-Mäusen erfolgen. Der konstitutiv aktive Promotor der Phosphoglycerat-Kinase (PGK) bewirkt, dass in allen Geweben und Zelltypen das Cytohesin-1 Gen deletiert wird [209]. So können zunächst systemische Effekte des Cytohesin-1 “Knock-out” analysiert werden. Weiterhin sollten zellspezifische “Knock-outs” in DC und T-Zellen generiert werden, da hier die stärkste Cytohesin-1 Expression vorliegt und somit die stärksten Phänotypen zu erwarten sind.

4.3.2 Entwicklung eines genetischen Modells zum Cytohesin-4 “Knock-out”

Die Strategie des konditionalen Cytohesin-4 “Knock-out” sieht vor, das Exon 2 mit zwei *loxP*-Bereichen zu flankieren. Auf diese Weise kann durch nachfolgende *Cre-Deleter* Verpaarungen das Cytohesin-4 Gen in der Maus gezielt zerstört werden. Die Deletion von Exon 2 hat zur Folge, dass sich das Leseraster verschiebt und maximal ein “Nonsense” Peptid mit zehn Aminosäuren entsteht.

Die Transfektion der IB10-ES-Zellen ergab aus insgesamt 212 Klonen zwei PCR-positive Klone. Da die Ergebnisse des Cytohesin-1-”Screening” zeigten, dass trotz einer 5’-Insertion des Targeting-Vektors der 3’-Bereich nicht mit inserierte, wurde für das Cytohesin-4 -”Screening” eine zusätzliche “Screening”-PCR etabliert, mittels derer die Insertion der distalen 3’-*loxP*-”site” nachgewiesen werden konnte (vergleiche hierzu Abschnitt 3.4.2). Diese PCR zeigte, dass beide Klone auch die distale 3’-*loxP*-”site” aufweisen. Dies wurde so-

wohl über eine zusätzliche 3'-"Screening"-PCR als auch über den 3'-Southern nach *KpnI*-Restriktion nachgewiesen (3.4.2 und 3.4.3). Für Klon 168 wurde über eine interne Neo-Sonde im Southern Blot nachgewiesen, dass das Konstrukt mehrfach ins Genom inseriert hatte. Insofern wurde für die Morulae-Injektion Klon 173 verwendet. Dieser wies mit 55 % die 40 Chromosomen in der Karyotypanalyse auf. Der erzielte Chimärismus war mit nahezu 100 % sehr gut, erste braune Nachkommen mit brauner Fellfarbe bestätigten zudem die Keimbahngängigkeit der verwendeten transgenen ES-Zellen.

Um zunächst globale Effekte des Cytohesin-4 "Knock-out" feststellen zu können, liegt es nahe, die Cytohesin-4 ^{lox}*cyh* – 4^{lox} Mäuse mit *PGK-Cre*-Mäusen zu verpaaren. Da Cytohesin-4 hauptsächlich in NK T-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen exprimiert wird, sollten die Tiere weiterhin unbedingt mit den korrespondierenden *Cre*-Tieren verpaart werden, um zellspezifische "Knock-outs" für T-Zellen zu erhalten. Sowohl für Cytohesin-1- als auch für Cytohesin-4 "Knock-out"-Tiere ist es gegebenenfalls sinnvoll, Infektionsstudien durchzuführen, da Immundefekte erwartet werden.

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde mit der Generierung von transgenen ES-Zellen der Grundstein für einen konditionalen Cytohesin-4 “Knock-out” gelegt. Bei der späteren Analyse von Cytohesin-4 “Knock-out” T-Zellen sollte eine Hyperaktivierung der T-Zellen untersucht werden, da *in vitro* Studien belegen, dass Cytohesin-4 die Akt-Phosphorylierung reprimiert. Damit verbunden sollte in den entsprechenden transgenen Tieren auf Hyperproliferation der T-Zellen geachtet werden sowie auf T-Zell-Lymphome.

Der genaue Mechanismus der Akt-Regulation kann weiter aufgeklärt werden, indem eine Wirkung von Cytohesin-4 auf PI3-Kinase Funktionen untersucht wird. Dabei sollte geprüft werden, ob Cytohesin-4 die PIP₃-Mengen in der Plasmamembran reduziert. Auch ein Einfluss von Cytohesin-4 auf die Membranrekrutierung von Akt könnte geprüft werden. Ist Cytohesin-4 möglicherweise direkt an einer Verdrängung von Akt von der Plasmamembran beteiligt, oder gibt es eine indirekte Regulation über die Steuerung der PIP₃-Menge?

Die positive Regulation von FoxO durch Cytohesin-4 wurde bislang lediglich auf RNA-Ebene gezeigt. Hier könnte eine Prüfung auf Protein-Ebene erfolgen, und dabei wäre nicht nur die Analyse der Proteinexpression interessant, sondern auch die Analyse der FoxO-Phosphorylierung sowie die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cytohesin-4 den Cyclin-Kinase Inhibitor p27 in seiner Expression fördert. p27 werden in der Literatur inhibitorische Funktionen auf RhoA und die Zellmigration zugeschrieben. Da neuere Erkenntnisse Cytohesin-4 eine reprimierende Rolle in der T-Zellmigration zuweisen, wäre es aufschlussreich, eine Inhibition der RhoA-Aktivierung durch Cytohesin-4 zu prüfen.

Die hohe Cytohesin-4 Expression in unreifen DC lässt auf eine Beteiligung an typischen Funktionen unreifer DC schließen. Ein bislang nicht analysierter Aspekt ist die Phagozytose-Aktivität. Fördert Cytohesin-4 möglicherweise phagozytotische Prozesse in DC?

Für murine DC konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige technische Systeme zur Untersuchung von Zelladhäsion und Zellmigration etabliert werden. Für die Analyse von DC der konditionalen Cytohesin-1 “Knock-out“-Mäuse, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bis zur Stufe transgener ES-Zellen generiert wurden, können diese Systeme zur Verifizierung der RNAi-Daten genutzt werden.

Um systemische Effekte eines Cytohesin-1 “Full-Knock-out” untersuchen zu können, sollten die transgenen Mäuse mit dem “gefloxten” Cytohesin-1 Genloкус zunächst mit *PGK-Cre-Deleter*-Mäusen verpaart werden. Werden diese Cytohesin-1 “Knock-out“-Mäuse stark immun-defizient sein und unter wiederkehrenden Infektionen leiden? Die Cytohesin-

1 RNAi basierten Daten dieser Arbeit geben Anlass, schwere Defekte in der Immunabwehr der Cytohesin-1 “Knock-out” Tiere zu erwarten, da Antigen-spezifische DC-T-Zell-Adhäsionsprozesse, Diapedese und interstitielle Migration positiv von Cytohesin-1 gesteuert werden.

Auf der anderen Seite ist es durchaus möglich, dass die vier Cytohesine aufgrund ihrer hohen Homologie untereinander wenigstens teilweise in ihren Funktionen redundant sind, sodass Phänotypen erst mit kombinierten Cytohesin-”Knock-outs” zum Tragen kommen. Somit können mit der Verfügbarkeit aller Cytohesin “Knock-outs” verschiedene kombinatorische Kreuzungen entscheidene Fragen beantworten, wie zum Beispiel: Wie sieht der Phänotyp einer Maus aus, in welcher alle vier Cytohesine depletiert sind?

6 Zusammenfassung

Cytohesine sind eine Familie von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) für ARF-GTPasen, die in Säugetieren vier Mitglieder umfasst. Sie sind für grundlegende zelluläre Funktionen wie Zelladhäsion und Integrin-Aktivierung, Zellmigration, T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion und den Insulinstoffwechsel von Relevanz. Für Cytohesin-4 sind bislang nur wenige Funktionen bekannt. Da Cytohesin-4 hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit DC- und T-Zell relevante Cytohesin-4 Funktionen untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Cytohesin-4 in unreifen BM-DC exprimiert wird und im Verlauf der Reifung herunterreguliert wird. Dies konnte auch für T-Zellen nach TCR-Aktivierung gezeigt werden. Sowohl in der Migration unreifer und reifer BM-DC als auch in der Migration und Adhäsion humaner T-Zellen konnte eine funktionelle Rolle von Cytohesin-4 ausgeschlossen werden.

Cytohesine sind an essentiellen T-Zell-Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Dabei sind bisher insbesondere die Cytohesine-1 und -3 in aktivierten und toleranten T-Zellen untersucht worden, wohingegen die Rolle von Cytohesin-4 im TCR-Signalweg noch weitgehend ungeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass Cytohesin-4 in den PI3-Kinase/Akt/FoxO Signalweg involviert ist. In der humanen T-Zell-Linie E6 resultierte die Cytohesin-4 Überexpression in einer Reprimierung der Akt-Phosphorylierung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-4 die Expression des Transkriptionsfaktors FoxO1 positiv steuert und den Zellzyklus-Inhibitor p27 in seiner Expression fördert. Dennoch konnte in diesem Zusammenhang keine Blockierung des Zellzyklus durch Cytohesin-4 dokumentiert werden.

Während Cytohesin-1 Funktionen in humanen Zellsystemen umfassend dokumentiert sind, liegen bislang nur wenige Daten für murine Immunzellen vor. Die kontrollierte Adhäsion von Immunzellen in zentralen immun-regulatorischen Prozessen wie bei der Ausbildung der immunologischen Synapse oder bei der Diapedese wird durch Integrine vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Cytohesin-1 Antigen-spezifisch die Zell-Zell-Adhäsion in murinen DC fördert und unter laminaren Flussbedingungen die Zelladhäsion an aktivierte Endothelzellen vermittelt. Darüberhinaus konnte Cytohesin-1 als positiv regulatorisches Protein der Zellmigration in komplexen dreidimensionalen Zusammenhängen charakterisiert werden. Daten dieser Arbeit verifizieren, dass reife murine BM-DC im Gegensatz zu der zweidimensionalen Zellmigration in der dreidimensionalen Zellmigration über einen Integrin-abhängigen und einen Integrin-unabhängigen Migrationsmechanismus verfügen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-1 oberhalb von

RhoA im Signalweg positioniert ist, und dass die RhoA-Aktivierung die GEF-Funktion von Cytohesin-1 erfordert. Diese Ergebnisse demonstrieren die Bedeutsamkeit von Cytohesin-1 bei Zelladhäsion und Zellmigration reifer muriner DC. Ferner konnte die Beteiligung von RhoA an der Chemokin-induzierten Aktivierung der Integrine in BM-DC und damit verbunden bei der Zelladhäsion an das aktivierte Endothel bestätigt werden. Dies ermöglichte die Entwicklung eines Modells, in welchem Cytohesin-1 in Anwesenheit von Integrinen RhoA aktiviert und so die interstitielle Zellmigration reifer BM-DC fördert. Ergebnisse dieser Arbeit haben somit maßgeblich zu einer Funktionsaufklärung von Cytohesin-1 in der Integrin-abhängigen dreidimensionalen Migration beigetragen.

Bislang sind weder für Cytohesin-1 noch für Cytohesin-4 genetische Mausmodelle verfügbar. In dieser Arbeit wurden erstmals konditionale "Knock-out" Modelle für die Cytohesine-1 und -4 entwickelt. Die jeweiligen Targeting-Strategien wurden entworfen und die Targeting-Vektoren kloniert und in ES-Zellen transferiert. Positive ES-Zell-Klone konnten mittels PCR- und Southern-Blot Strategien identifiziert werden und in Blastozysten injiziert werden. Somit wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für die genetischen konditionalen Mausmodelle für Cytohesin-1 und Cytohesin-4 gelegt.

7 Summary

Cytohesins are a family of guanine-nucleotide exchange factors (GEF) for ARF-GTPases and comprise four family members in mammals. They bear fundamental cellular functions in cell adhesion and integrin activation, cell migration, TCR signalling and insulin signalling. Up to now, not much is known about cytohesin-4 functions. As cytohesin-4 expression is restricted to cells of hematopoietic origin, DC and T-cell functions were analysed here.

Cytohesin-4 expression in immature BM-DC and its down-regulation during maturation was proven as well as cytohesin-4 down-regulation upon TCR activation. Cytohesin-4 functions in either immature or mature DC migration as well as the regulation of T-cell adhesion or migration were excluded.

Cytohesins are involved in essential T-cell signalling pathways. Until now, mainly cytohesin-1 and -3 were analyzed in activated or tolerant T-cells, whereas the role of cytohesin-4 in TCR signalling remains elusive. In the present thesis an involvement of cytohesin-4 in the PI3-Kinase/Akt/FoxO pathway is shown for the first time. Cytohesin-4 overexpression in the T-cell line Jurkat E.6 represses Akt phosphorylation. Furthermore, cytohesin-4 was identified to positively regulate FoxO1 transcription and promoting the expression of the cell-cycle inhibitor p27. Still, a blocking function of cytohesin-4 in cell cycle progression could not be proven.

Whereas cytohesin-1 functions are well documented in human cell systems, only few data are available for murine immune cells. The controlled adhesion of immune cells in central immune regulatory processes like in the immunological synapse or within diapedesis is mediated via integrins. In the context of this thesis it was proven that cytohesin-1 promotes the antigen specific cell-cell adhesion of murine DC and that it mediates the adhesion to activated endothelium under laminar flow conditions. Moreover, cytohesin-1 was shown to positively regulate cell migration in complex three-dimensional environments. Mature murine BM-DC possess an integrin-dependent and an integrin-independent migration mode, which is used in three-dimensional migration but not on two-dimensional surfaces. These data demonstrate the importance of cytohesin-1 for cell adhesion and cell migration of mature murine DC. Furthermore, the involvement of RhoA in the chemokine-induced activation of integrins in BM-DC related to the adhesion to activated endothelium was proven. This enabled the development of a model in which cytohesin-1 activates RhoA in the presence of integrins and thus promotes the interstitial cell migration of mature BM-DC. Therefore, findings of this thesis contribute to the elucidation of cytohesin-1 functions in integrin-dependent three-dimensional migration.

Up to now neither for cytohesin-1 nor for cytohesin-4 genetic mouse models are available. In the present thesis conditional knock-out models for cytohesin-1 and -4 were developed for the first time. The corresponding targeting strategies were designed and targeting vectors were cloned and transferred into ES cells. Positive ES cell clones were selected by PCR and Southern-blotting strategies and injected into blastocysts. Thus, with this work, the basics for the genetical conditional mouse models both for cytohesin-1 and cytohesin-4 were placed.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha oder anti
μ	Mikro
A.bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
AP-1	activator protein 1
APC	antigen presenting cell
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren
ARL	<i>ARF-like proteins</i>
ARNO	<i>ARF nucleotide-binding site opener</i>
ARP	<i>ARF-related proteins</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BM-DC	<i>bone-marrow derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CC	<i>coiled-coil</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CE	<i>capacitance extender</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	carboxy-terminal
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreithol
ECL	Elektrochemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum

Abkürzungsverzeichnis

ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
et al.	Et alteres (lat.: und andere)
F	Farad
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLF	N-formyl-Met-Leu-Phe (Chemokin)
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
I α B	Inhibitor von α B
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
k	Kilo
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LFA-1	<i>leukocyte function antigen-1</i>
LSEC	<i>liver sinusoidale epithelial cell</i>
m	Meter; Milli
M	Molarität (mol/l)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mol	Mol
m/v	Masse pro Volumen
n	Nano; Anzahl n der durchgeführten Versuche
n.d.	nicht determiniert
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- α B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

NK	<i>natural killer</i>
NP	Neutrophile
N-terminal	amino-terminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
OKT	<i>Orthoclone</i>
p	Pico
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PDK1	<i>phosphoinositid dependent protein kinase 1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PH	Pleckstrin-Homologie
PI-3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluorid
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
ssDNA	<i>single stranded desoxyribonucleinacid</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBST	<i>tris-buffered saline tween-20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T _H 1	Typ1-T-Helferzellen
T _H 2	Typ2-T-Helferzellen

T_H17	Typ17-T-Helferzellen
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
TIGM	<i>Texas A&M Institute for Genomic Medicine</i>
Tris	Tris-(hydroxymehtyl)aminomethan
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLE	<i>very low endotoxin</i>
v/v	Volumen pro Volumen
xg	x-fache Erdbeschleunigung
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

Literaturverzeichnis

- [1] J. E. Allende. Gtp-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2(8):2356–2367, 1988.
- [2] N. Ohga, A. Kikuchi, T. Ueda, J. Yamamoto, and Y. Takai. Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of gdp from and the subsequent binding of gtp to rhob p20, a ras p21-like gtp-binding protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(3):1523–1533, 1989.
- [3] C. L. Jackson and J. E. Casanova. Turning on arf: the sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in cell biology*, 10(2):60–67, 2000.
- [4] Emi Mizuno-Yamasaki, Felix Rivera-Molina, and Peter Novick. Gtpase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry*, 2012.
- [5] T. Serafini, L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, and J. E. Rothman. Adp-ribosylation factor is a subunit of the coat of golgi-derived cop-coated vesicles: a novel role for a gtp-binding protein. *Cell*, 67(2):239–253, 1991.
- [6] A. Godi, I. Santone, P. Pertile, P. Marra, G. Di Tullio, A. Luini, D. Corda, and M. A. de Matteis. Adp-ribosylation factor regulates spectrin skeleton assembly on the golgi complex by stimulating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochemical Society transactions*, 27(4):638–642, 1999.
- [7] J. G. Donaldson and C. L. Jackson. Regulators and effectors of the arf gtpases. *Current opinion in cell biology*, 12(4):475–482, 2000.
- [8] P. Chavrier and B. Goud. The role of arf and rab gtpases in membrane transport. *Current opinion in cell biology*, 11(4):466–475, 1999.
- [9] Vincent Popoff, Julian D. Langer, Ingeborg Reckmann, Andrea Hellwig, Richard A. Kahn, Britta Brügger, and Felix T. Wieland. Several adp-ribosylation factor (arf) isoforms support copi vesicle formation. *The Journal of biological chemistry*, 286(41):35634–35642, 2011.
- [10] Crislyn D’Souza-Schorey and Philippe Chavrier. Arf proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5):347–358, 2006.

- [11] J. G. Donaldson and R. D. Klausner. Arf: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Current opinion in cell biology*, 6(4):527–532, 1994.
- [12] Waldemar Kolanus. Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunological reviews*, 218:102–113, 2007.
- [13] W. Kolanus, W. Nagel, B. Schiller, L. Zeitlmann, S. Godar, H. Stockinger, and B. Seed. Alpha 1 beta 2 integrin/lfa-1 binding to icam-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, 86(2):233–242, 1996.
- [14] Thomas Quast, Barbara Tappertzhofen, Cora Schild, Jessica Grell, Niklas Czeloth, Reinhold Förster, Ronen Alon, Line Fraemohs, Katrin Dreck, Christian Weber, Tim Lämmermann, Michael Sixt, and Waldemar Kolanus. Cytohesin-1 controls the activation of rhoa and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells. *Blood*, 113(23):5801–5810, 2009.
- [15] Bianca Paul. *Bedeutung von Cytohesin-3 in der Signaltransduktions-Kontrolle der T-Zellaktivierung*. PhD thesis, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 2007.
- [16] Bernhard Fuss, Thomas Becker, Ingo Zinke, and Michael Hoch. The cytohesin steppe is essential for insulin signalling in drosophila. *Nature*, 444(7121):945–948, 2006.
- [17] Markus Hafner, Anton Schmitz, Imke Grüne, Seergazhi G. Srivatsan, Bianca Paul, Waldemar Kolanus, Thomas Quast, Elisabeth Kremmer, Inga Bauer, and Michael Famulok. Inhibition of cytohesins by secinh3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444(7121):941–944, 2006.
- [18] P. Chardin, S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Béraud-Dufour, C. L. Jackson, and M. Chabre. A human exchange factor for arf contains sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608):481–484, 1996.
- [19] Irmgard Hofmann, Amanda Thompson, Christopher M. Sanderson, and Sean Munro. The arl4 family of small g proteins can recruit the cytohesin arf6 exchange factors to the plasma membrane. *Current biology : CB*, 17(8):711–716, 2007.
- [20] Lee Ann Cohen, Akira Honda, Peter Varnai, Fraser D. Brown, Tamas Balla, and Julie G. Donaldson. Active arf6 recruits arno/cytohesin gefs to the pm by binding their ph domains. *Molecular biology of the cell*, 18(6):2244–2253, 2007.
- [21] J. K. Klarlund, W. Tsiaras, J. J. Holik, A. Chawla, and M. P. Czech. Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of grp1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. *The Journal of biological chemistry*, 275(42):32816–32821, 2000.

- [22] C. Geiger, W. Nagel, T. Boehm, Y. van Kooyk, C. G. Figdor, E. Kremmer, N. Hogg, L. Zeitlmann, H. Dierks, K. S. Weber, and W. Kolanus. Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both arf-gef function and interaction with lfa-1. *The EMBO journal*, 19(11):2525–2536, 2000.
- [23] Barbara Tappertzhofen. *Die duale Funktion der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP in der Migration humaner dendritischer Zellen*. PhD thesis.
- [24] Jessica Grell. *The role of guanine nucleotide exchange factors in the regulation of immune cell signaling*. PhD thesis.
- [25] Mohammed-Amine El Azreq, Valérie Garceau, and Sylvain G. Bourgoin. Cytohesin-1 regulates fmlf-mediated activation and functions of the β 2 integrin mac-1 in human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 89(6):823–836, 2011.
- [26] Omar D. Perez, Dennis Mitchell, Gina C. Jager, Sharon South, Chris Murriel, Jacqueline McBride, Lee A. Herzenberg, Shigemi Kinoshita, and Garry P. Nolan. Leukocyte functional antigen 1 lowers t cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and jun-activating binding protein 1. *Nature immunology*, 4(11):1083–1092, 2003.
- [27] S. Kliche, W. Nagel, E. Kremmer, C. Atzler, A. Ege, T. Knorr, U. Koszinowski, W. Kolanus, and J. Haas. Signaling by human herpesvirus 8 kaposin a through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Molecular cell*, 7(4):833–843, 2001.
- [28] E. Serfling, A. Avots, and M. Neumann. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of t lymphocyte activation. *Biochimica et biophysica acta*, 1263(3):181–200, 1995.
- [29] W. Nagel, L. Zeitlmann, P. Schilcher, C. Geiger, J. Kolanus, and W. Kolanus. Phosphoinositide 3-oh kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *The Journal of biological chemistry*, 273(24):14853–14861, 1998.
- [30] W. Nagel, P. Schilcher, L. Zeitlmann, and W. Kolanus. The ph domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Molecular biology of the cell*, 9(8):1981–1994, 1998.
- [31] Bettina Kellersch. *Biochemische und funktionale Charakterisierung der Cytohesin-1-Interaktionspartner CYTIP und GRASP*. PhD thesis.
- [32] Kathrin Obrusnik. *Biochemische Untersuchungen zur Phosphorylierung von Cytohesin-1*. PhD thesis.
- [33] H. Dierks, J. Kolanus, and W. Kolanus. Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain. *The Journal of biological chemistry*, 276(40):37472–37481, 2001.

- [34] Anke Bill, Anton Schmitz, Barbara Albertoni, Jin-Na Song, Lukas C. Heukamp, David Walrafen, Franziska Thorwirth, Peter J. Verveer, Sebastian Zimmer, Lisa Meffert, Arne Schreiber, Sampurna Chatterjee, Roman K. Thomas, Roland T. Ullrich, Thorsten Lang, and Michael Famulok. Cytohesins are cytoplasmic erbb receptor activators. *Cell*, 143(2):201–211, 2010.
- [35] L. C. Santy and J. E. Casanova. Activation of arf6 by arno stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both rac1 and phospholipase d. *The Journal of cell biology*, 154(3):599–610, 2001.
- [36] Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Atsushi Sanbe, Kohji Nishimura, Junji Yamauchi, and Akito Tanoue. Cytohesin-2/arno, through its interaction with focal adhesion adaptor protein paxillin, regulates preadipocyte migration via the downstream activation of arf6. *The Journal of biological chemistry*, 285(31):24270–24281, 2010.
- [37] Seung Ja Oh and Lorraine C. Santy. Differential effects of cytohesins 2 and 3 on beta1 integrin recycling. *The Journal of biological chemistry*, 285(19):14610–14616, 2010.
- [38] Seung Ja Oh and Lorraine C. Santy. Phosphoinositide specificity determines which cytohesins regulate β 1 integrin recycling. *Journal of cell science*, 2012.
- [39] Maria Merkulova, Andrés Hurtado-Lorenzo, Hiroyuki Hosokawa, Zhenjie Zhuang, Dennis Brown, Dennis A. Ausiello, and Vladimir Marshansky. Aldolase directly interacts with arno and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(6):C1442–55, 2011.
- [40] Ingrid Gsandtner, Christoforos Charalambous, Eduard Stefan, Egon Ogris, Michael Freissmuth, and Jürgen Zezula. Heterotrimeric g protein-independent signaling of a g protein-coupled receptor. direct binding of arno/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the a2a adenosine receptor is necessary for sustained activation of the erk/map kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 280(36):31898–31905, 2005.
- [41] Junghwa Lim, Ming Zhou, Timothy D. Veenstra, and Deborah K. Morrison. The cnk1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling. *Genes & development*, 24(14):1496–1506, 2010.
- [42] Bhavaani Jayaram, Ismail Syed, Chandrashekara N. Kyathanahalli, Christopher J. Rhodes, and Anjaneyulu Kowluru. Arf nucleotide binding site opener [arno] promotes sequential activation of arf6, cdc42 and rac1 and insulin secretion in ins 832/13 β -cells and rat islets. *Biochemical pharmacology*, 81(8):1016–1027, 2011.
- [43] Hanna K. Mannell, Joachim Pircher, Daniel I. Chaudhry, Stefan K. C. Alig, Elisabeth G. Koch, Ramona Mettler, Ulrich Pohl, and Florian Krötz. Arno regulates vegf-dependent tissue responses by stabilizing endothelial vegfr-2 surface expression. *Cardiovascular research*, 93(1):111–119, 2012.

- [44] M. Franco, J. Boretto, S. Robineau, S. Monier, B. Goud, P. Chardin, and P. Chavrier. Arno3, a sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for adp ribosylation factor 1, is involved in the control of golgi structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17):9926–9931, 1998.
- [45] U. Korthäuer, W. Nagel, E. M. Davis, M. M. Le Beau, R. S. Menon, E. O. Mitchell, C. A. Kozak, W. Kolanus, and J. A. Bluestone. Anergic t lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(1):308–318, 2000.
- [46] M. Ogasawara, S. C. Kim, R. Adamik, A. Togawa, V. J. Ferrans, K. Takeda, M. Kirby, J. Moss, and M. Vaughan. Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for adp-ribosylation factors. *The Journal of biological chemistry*, 275(5):3221–3230, 2000.
- [47] E. Meacci, S. C. Tsai, R. Adamik, J. Moss, and M. Vaughan. Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for adp-ribosylation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5):1745–1748, 1997.
- [48] G. Pacheco-Rodriguez, E. Meacci, N. Vitale, J. Moss, and M. Vaughan. Guanine nucleotide exchange on adp-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its sec7 domain. *The Journal of biological chemistry*, 273(41):26543–26548, 1998.
- [49] S. E. Langille, V. Patki, J. K. Klarlund, J. M. Buxton, J. J. Holik, A. Chawla, S. Corvera, and M. P. Czech. Adp-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor grp1. *The Journal of biological chemistry*, 274(38):27099–27104, 1999.
- [50] T. Knorr, W. Nagel, and W. Kolanus. Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for adp-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(12):3784–3791, 2000.
- [51] K. S. Weber, C. Weber, G. Ostermann, H. Dierks, W. Nagel, and W. Kolanus. Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct lfa-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Current biology : CB*, 11(24):1969–1974, 2001.
- [52] Jacqueline Cherfils, Julie Ménétrey, Magali Mathieu, Gérard Le Bras, Sylviane Robineau, Sophie Béraud-Dufour, Bruno Antonny, and Pierre Chardin. *Nature*, 392(6671):101–105, 1998.
- [53] S. Frank, S. Upender, S. H. Hansen, and J. E. Casanova. Arno is a guanine nucleotide exchange factor for adp-ribosylation factor 6. *The Journal of biological chemistry*, 273(1):23–27, 1998.

- [54] J. K. Klarlund, A. Guilherme, J. J. Holik, J. V. Virbasius, A. Chawla, and M. P. Czech. Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and sec7 homology domains. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5308):1927–1930, 1997.
- [55] S. R. Frank, J. C. Hatfield, and J. E. Casanova. Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase c and the adp-ribosylation factor nucleotide exchange factor arno. *Molecular biology of the cell*, 9(11):3133–3146, 1998.
- [56] Mohammed-Amine El Azreq and Sylvain G. Bourgoin. Cytohesin-1 regulates human blood neutrophil adhesion to endothelial cells through β 2 integrin activation. *Molecular immunology*, 48(12-13):1408–1416, 2011.
- [57] Pingtao Tang, Tammy P. Cheng, Davide Agnello, Chang-You Wu, Bruce D. Hissong, Wendy T. Watford, Hyun-Jong Ahn, Jerome Galon, Joel Moss, Martha Vaughan, John J. O’Shea, and Massimo Gadina. Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5):2625–2629, 2002.
- [58] Marc Mansour, Stella Y. Lee, and Bill Pohajdak. The n-terminal coiled coil domain of the cytohesin/arno family of guanine nucleotide exchange factors interacts with the scaffolding protein casp. *The Journal of biological chemistry*, 277(35):32302–32309, 2002.
- [59] Thomas Boehm, Susanne Hofer, Patricia Winklehner, Bettina Kellersch, Christiane Geiger, Alexander Trockenbacher, Susanne Neyer, Heidi Fiegl, Susanne Ebner, Lennart Ivarsson, Rainer Schneider, Elisabeth Kremmer, Christine Heufler, and Waldemar Kolanus. Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by cytip, a protein which mediates signal complex sequestration. *The EMBO journal*, 22(5):1014–1024, 2003.
- [60] Sibylle Molt. *Charakterisierung der Funktion von Cytohesin-4 in der Signaltransduktion von Immunzellen*. PhD thesis.
- [61] Richard O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002.
- [62] R. O. Hynes, J. C. Lively, J. H. McCarty, D. Taverna, S. E. Francis, K. Hodivala-Dilke, and Q. Xiao. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 67:143–153, 2002.
- [63] T. A. Springer. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283):425–434, 1990.

- [64] N. Hogg and P. A. Bates. Genetic analysis of integrin function in man: Lad-1 and other syndromes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 19(3):211–222, 2000.
- [65] T. A. Springer. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2):301–314, 1994.
- [66] Ronen Alon and Sara Feigelson. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in immunology*, 14(2):93–104, 2002.
- [67] M. F. Bachmann, K. McKall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D. E. Speiser, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. Distinct roles for lfa-1 and cd28 during activation of naive t cells: adhesion versus costimulation. *Immunity*, 7(4):549–557, 1997.
- [68] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry*, 275(29):21785–21788, 2000.
- [69] Georg Ostermann, Kim S. C. Weber, Alma Zerneck, Andreas Schröder, and Christian Weber. Jam-1 is a ligand of the beta(2) integrin lfa-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature immunology*, 3(2):151–158, 2002.
- [70] Y-J Lu, F. Zhang, and S-F Sui. Specific binding of integrin alphaIIb beta3 to rgd peptide immobilized on a nitrilotriacetic acid chip: a surface plasmon resonance study. *Biochemistry. BiokhimiiĬja*, 67(8):933–939, 2002.
- [71] W. Kolanus and B. Seed. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from pkc and pip3. *Current opinion in cell biology*, 9(5):725–731, 1997.
- [72] Revital Shamri, Valentin Grabovsky, Jean-Marc Gauguet, Sara Feigelson, Eugenia Manevich, Waldemar Kolanus, Martyn K. Robinson, Donald E. Staunton, Ulrich H. von Andrian, and Ronen Alon. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended lfa-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology*, 6(5):497–506, 2005.
- [73] William T. N. Simonsen, Santos J. Franco, and Anna Huttenlocher. Talin1 regulates tcr-mediated lfa-1 function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(11):7707–7714, 2006.
- [74] Tatsuo Kinashi. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 5(7):546–559, 2005.
- [75] Susina Vielkind, Maighread Gallagher-Gambarelli, Manuel Gomez, Heather J. Hinton, and Doreen A. Cantrell. Integrin regulation by rhoa in thymocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(1):350–357, 2005.

- [76] M. B. Lawrence, C. W. Smith, S. G. Eskin, and L. V. McIntire. Effect of venous shear stress on cd18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood*, 75(1):227–237, 1990.
- [77] Armando del Rio, Raul Perez-Jimenez, Ruchuan Liu, Pere Roca-Cusachs, Julio M. Fernandez, and Michael P. Sheetz. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science (New York, N. Y.)*, 323(5914):638–641, 2009.
- [78] Julie C. Friedland, Mark H. Lee, and David Boettiger. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science (New York, N. Y.)*, 323(5914):642–644, 2009.
- [79] Elias J. Fernandez and Elias Lolis. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42:469–499, 2002.
- [80] Kristen L. Pierce, Richard T. Premont, and Robert J. Lefkowitz. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(9):639–650, 2002.
- [81] J. M. Rodríguez-Frade, A. J. Vila-Coro, A. Martín, M. Nieto, F. Sánchez-Madrid, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, C. Martínez-A, and M. Mellado. Similarities and differences in rantes- and (aop)-rantes-triggered signals: implications for chemotaxis. *The Journal of cell biology*, 144(4):755–765, 1999.
- [82] S. M. Short, J. L. Boyer, and R. L. Juliano. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in g protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 275(17):12970–12977, 2000.
- [83] Matthew D. Welch and R. Dyche Mullins. Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology*, 18:247–288, 2002.
- [84] T. D. Coates, R. G. Watts, R. Hartman, and T. H. Howard. Relationship of f-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of cell biology*, 117(4):765–774, 1992.
- [85] P. Y. Jay, P. A. Pham, S. A. Wong, and E. L. Elson. A mechanical function of myosin ii in cell motility. *Journal of cell science*, 108 (Pt 1):387–393, 1995.
- [86] Peter Friedl and Bettina Weigelin. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology*, 9(9):960–969, 2008.
- [87] Tim Lämmermann, Bernhard L. Bader, Susan J. Monkley, Tim Worbs, Roland Wedlich-Söldner, Karin Hirsch, Markus Keller, Reinhold Förster, David R. Critchley, Reinhard Fässler, and Michael Sixt. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191):51–55, 2008.

- [88] Karin Knieke, Holger Lingel, Kathrin Chamaon, and Monika C. Brunner-Weinzierl. Migration of th1 lymphocytes is regulated by cd152 (ctla-4)-mediated signaling via pi3 kinase-dependent akt activation. *PloS one*, 7(3):e31391, 2012.
- [89] A. DELAUNAY. La diapédèse leucocytaire, ses facteurs et son mécanisme. *Revue canadienne de biologie / éditée par l'Université de Montréal*, 12(2):340–346, 1953.
- [90] Rajamani Rathinam, Allison Berrier, and Suresh K. Alahari. Role of rho gtpases and their regulators in cancer progression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 17:2561–2571, 2012.
- [91] A. J. Ridley. Rho gtpases and cell migration. *Journal of cell science*, 114(Pt 15):2713–2722, 2001.
- [92] O. Nakagawa, K. Fujisawa, T. Ishizaki, Y. Saito, K. Nakao, and S. Narumiya. Rock-i and rock-ii, two isoforms of rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS letters*, 392(2):189–193, 1996.
- [93] Satyajit K. Mitra, Daniel A. Hanson, and David D. Schlaepfer. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1):56–68, 2005.
- [94] T. Saito. [t cell antigen receptor—structure, expression and function]. *Human cell : official journal of Human Cell Research Society*, 3(3):183–192, 1990.
- [95] L. E. Samelson and R. D. Klausner. Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. current research on activation via the t cell antigen receptor. *The Journal of biological chemistry*, 267(35):24913–24916, 1992.
- [96] Bernard Malissen. Cd3 itams count! *Nature immunology*, 9(6):583–584, 2008.
- [97] C. R. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in t cells. *Nature*, 395(6697):82–86, 1998.
- [98] Johannes B. Huppa and Mark M. Davis. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews. Immunology*, 3(12):973–983, 2003.
- [99] M. L. Dustin, S. K. Bromley, Z. Kan, D. A. Peterson, and E. R. Unanue. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating t lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8):3909–3913, 1997.
- [100] Ariel Quintana, Christian Schwindling, Anna S. Wenning, Ute Becherer, Jens Rettig, Eva C. Schwarz, and Markus Hoth. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(36):14418–14423, 2007.

- [101] O. Leupin, R. Zaru, T. Laroche, S. Müller, and S. Valitutti. Exclusion of cd45 from the t-cell receptor signaling area in antigen-stimulated t lymphocytes. *Current biology : CB*, 10(5):277–280, 2000.
- [102] Victor L. J. Tybulewicz, Laurence Ardouin, Antonella Prisco, and Lucinda F. Reynolds. Vav1: a key signal transducer downstream of the tcr. *Immunological reviews*, 192:42–52, 2003.
- [103] A. Weiss, B. A. Irving, L. K. Tan, and G. A. Koretzky. Signal transduction by the t cell antigen receptor. *Seminars in immunology*, 3(5):313–324, 1991.
- [104] A. J. Whitmarsh and R. J. Davis. Transcription factor ap-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 74(10):589–607, 1996.
- [105] Jennifer E. Smith-Garvin, Gary A. Koretzky, and Martha S. Jordan. T cell activation. *Annual review of immunology*, 27:591–619, 2009.
- [106] D. J. Lenschow, T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. Cd28/b7 system of t cell costimulation. *Annual review of immunology*, 14:233–258, 1996.
- [107] P. S. Linsley, E. A. Clark, and J. A. Ledbetter. T-cell antigen cd28 mediates adhesion with b cells by interacting with activation antigen b7/bb-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13):5031–5035, 1990.
- [108] C. H. June, J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, and C. B. Thompson. Role of the cd28 receptor in t-cell activation. *Immunology today*, 11(6):211–216, 1990.
- [109] J. L. Riley, P. J. Blair, J. T. Musser, R. Abe, K. Tezuka, T. Tsuji, and C. H. June. Icos costimulation requires il-2 and can be prevented by ctla-4 engagement. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(8):4943–4948, 2001.
- [110] S. P. Staal. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues akt1 and akt2: amplification of akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(14):5034–5037, 1987.
- [111] A. D. Kohn, K. S. Kovacina, and R. A. Roth. Insulin stimulates the kinase activity of rac-pk, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *The EMBO journal*, 14(17):4288–4295, 1995.
- [112] B. Vanhaesebroeck and D. R. Alessi. The pi3k-pdk1 connection: more than just a road to pkb. *The Biochemical journal*, 346 Pt 3:561–576, 2000.
- [113] Zhong-Zhou Yang, Oliver Tschopp, Maja Hemmings-Mieszczak, Jianhua Feng, Daniela Brodbeck, Elias Perentes, and Brian A. Hemmings. Protein kinase b alpha/akt1

- regulates placental development and fetal growth. *The Journal of biological chemistry*, 278(34):32124–32131, 2003.
- [114] D. D. Sarbassov, David A. Guertin, Siraj M. Ali, and David M. Sabatini. Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mtor complex. *Science (New York, N. Y.)*, 307(5712):1098–1101, 2005.
- [115] Xinbo Zhang, Naimei Tang, Timothy J. Hadden, and Arun K. Rishi. Akt, foxo and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(11):1978–1986, 2011.
- [116] W. H. Biggs, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee, and K. C. Arden. Protein kinase b/akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor fkhr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13):7421–7426, 1999.
- [117] G. Rena, S. Guo, S. C. Cichy, T. G. Unterman, and P. Cohen. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member fkhr by protein kinase b. *The Journal of biological chemistry*, 274(24):17179–17183, 1999.
- [118] Marie Stahl, Pascale F. Dijkers, Geert J. P. L. Kops, Susanne M. A. Lens, Paul J. Coffey, Boudewijn M. T. Burgering, and René H. Medema. The forkhead transcription factor foxo regulates transcription of p27kip1 and bim in response to il-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(10):5024–5031, 2002.
- [119] R. H. Medema, G. J. Kops, J. L. Bos, and B. M. Burgering. Afx-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by ras and pkb through p27kip1. *Nature*, 404(6779):782–787, 2000.
- [120] X. Wu, K. Senechal, M. S. Neshat, Y. E. Whang, and C. L. Sawyers. The pten/mmac1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26):15587–15591, 1998.
- [121] P. L. Dahia, R. C. Aguiar, J. Alberta, J. B. Kum, S. Caron, H. Sill, D. J. Marsh, J. Ritz, A. Freedman, C. Stiles, and C. Eng. Pten is inversely correlated with the cell survival factor akt/pkb and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Human molecular genetics*, 8(2):185–193, 1999.
- [122] X. Shan, M. J. Czar, S. C. Bunnell, P. Liu, Y. Liu, P. L. Schwartzberg, and R. L. Wange. Deficiency of pten in jurkat t cells causes constitutive localization of itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to cd3 stimulation. *Molecular and cellular biology*, 20(18):6945–6957, 2000.
- [123] Ingeborg Hers, Emma E. Vincent, and Jeremy M. Tavaré. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 23(10):1515–1527, 2011.

- [124] Z. Hmama, K. L. Knutson, P. Herrera-Velit, D. Nandan, and N. E. Reiner. Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves cd14, lfa-1, and cytohesin-1. regulation by rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*, 274(2):1050–1057, 1999.
- [125] K. Venkateswarlu, P. B. Oatey, J. M. Tavaré, and P. J. Cullen. Insulin-dependent translocation of arno to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Current biology : CB*, 8(8):463–466, 1998.
- [126] K. Venkateswarlu, F. Gunn-Moore, P. B. Oatey, J. M. Tavaré, and P. J. Cullen. Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the adp-ribosylation factor-exchange factor grp1 to the plasma membrane of pc12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the grp1 pleckstrin homology domain. *The Biochemical journal*, 335 (Pt 1):139–146, 1998.
- [127] C. T. Keith and S. L. Schreiber. Pik-related kinases: Dna repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N. Y.)*, 270(5233):50–51, 1995.
- [128] David A. Guertin and David M. Sabatini. An expanding role for mtor in cancer. *Trends in molecular medicine*, 11(8):353–361, 2005.
- [129] R. B. Pearson and G. Thomas. Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Progress in cell cycle research*, 1:21–32, 1995.
- [130] Brian Magnuson, Bilgen Ekim, and Diane C. Fingar. Regulation and function of ribosomal protein s6 kinase (s6k) within mtor signalling networks. *The Biochemical journal*, 441(1):1–21, 2012.
- [131] Valeria Facchinetti, Weiming Ouyang, Hua Wei, Nelyn Soto, Adam Lazorchak, Christine Gould, Carolyn Lowry, Alexandra C. Newton, Yuxin Mao, Robert Q. Miao, William C. Sessa, Jun Qin, Pumin Zhang, Bing Su, and Estela Jacinto. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of akt and protein kinase c. *The EMBO journal*, 27(14):1932–1943, 2008.
- [132] Lei Liu, Yan Luo, Long Chen, Tao Shen, Baoshan Xu, Wenxing Chen, Hongyu Zhou, Xiuzhen Han, and Shile Huang. Rapamycin inhibits cytoskeleton reorganization and cell motility by suppressing rhoa expression and activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(49):38362–38373, 2010.
- [133] Y. J. Kang, M-K Lu, and K-L Guan. The tsc1 and tsc2 tumor suppressors are required for proper er stress response and protect cells from er stress-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*, 18(1):133–144, 2011.
- [134] Andrew R. Tee, Rana Anjum, and John Blenis. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/akt-dependent

- and -independent phosphorylation of tuberin. *The Journal of biological chemistry*, 278(39):37288–37296, 2003.
- [135] A. Zetterberg, O. Larsson, and K. G. Wiman. What is the restriction point? *Current opinion in cell biology*, 7(6):835–842, 1995.
- [136] Natalia G. Starostina and Edward T. Kipreos. Multiple degradation pathways regulate versatile cip/kip cdk inhibitors. *Trends in cell biology*, 22(1):33–41, 2012.
- [137] Jana Cmielová and M. Rezáčová. Protein and its function based on a subcellular localization. *Journal of cellular biochemistry*, 112(12):3502–3506, 2011.
- [138] J. W. Harper. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer surveys*, 29:91–107, 1997.
- [139] Riaan Conradie, Frank J. Bruggeman, Andrea Ciliberto, Attila Csikász-Nagy, Bela Novák, Hans V. Westerhoff, and Jacky L. Snoep. Restriction point control of the mammalian cell cycle via the cyclin e/cdk2:p27 complex. *The FEBS journal*, 277(2):357–367, 2010.
- [140] Ulrich Göpfert, Michael Kullmann, and Ludger Hengst. Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-utr that overlaps with a uorf. *Human molecular genetics*, 12(14):1767–1779, 2003.
- [141] Sungchan Cho, Jong Heon Kim, Sung Hoon Back, and Sung Key Jang. Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase. *Molecular and cellular biology*, 25(4):1283–1297, 2005.
- [142] Anxo Vidal, S. Sean Millard, Jeffrey P. Miller, and Andrew Koff. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *The Journal of biological chemistry*, 277(19):16433–16440, 2002.
- [143] Teresa González, Marcos Seoane, Pilar Caamaño, Juan Viñuela, Fernando Domínguez, and Juan Zalvide. Inhibition of cdk4 activity enhances translation of p27kip1 in quiescent Rb-negative cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(15):12688–12695, 2003.
- [144] Keiichi I. Nakayama and Keiko Nakayama. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(5):369–381, 2006.
- [145] Isabel M. Chu, Ludger Hengst, and Joyce M. Slingerland. The cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 8(4):253–267, 2008.

- [146] Arnaud Besson, Mark Gurian-West, Anja Schmidt, Alan Hall, and James M. Roberts. p27kip1 modulates cell migration through the regulation of rhoa activation. *Genes & development*, 18(8):862–876, 2004.
- [147] Gustavo Baldassarre, Barbara Belletti, Milena S. Nicoloso, Monica Schiappacassi, Andrea Vecchione, Paola Spessotto, Andrea Morrione, Vincenzo Canzonieri, and Alfonso Colombatti. p27(kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer cell*, 7(1):51–63, 2005.
- [148] H. Nagahara, A. M. Vocero-Akbani, E. L. Snyder, A. Ho, D. G. Latham, N. A. Lissy, M. Becker-Hapak, S. A. Ezhevsky, and S. F. Dowdy. Transduction of full-length tat fusion proteins into mammalian cells: Tat-p27kip1 induces cell migration. *Nature medicine*, 4(12):1449–1452, 1998.
- [149] Sandra S. McAllister, Michelle Becker-Hapak, Giuseppe Pintucci, Michele Pagano, and Steven F. Dowdy. Novel p27(kip1) c-terminal scatter domain mediates race-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Molecular and cellular biology*, 23(1):216–228, 2003.
- [150] B. Levkau, H. Koyama, E. W. Raines, B. E. Clurman, B. Herren, K. Orth, J. M. Roberts, and R. Ross. Cleavage of p21cip1/waf1 and p27kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of cdk2: role of a caspase cascade. *Molecular cell*, 1(4):553–563, 1998.
- [151] B. Eymin, M. Haugg, N. Droin, O. Sordet, M. T. Dimanche-Boitrel, and E. Solary. p27kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene*, 18(7):1411–1418, 1999.
- [152] R. M. Steinman and Z. A. Cohn. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. i. morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5):1142–1162, 1973.
- [153] Ken Shortman and Shalin H. Naik. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 7(1):19–30, 2007.
- [154] Gwendalyn J. Randolph. Is maturation required for langerhans cell migration? *The Journal of experimental medicine*, 196(4):413–416, 2002.
- [155] F. Sallusto and A. Lanzavecchia. 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. *The Journal of experimental medicine*, 179(4):1109–1118, 1994.

- [156] Kayo Inaba, William J. Swiggard, Ralph M. Steinman, Nikolaus Romani, Gerold Schuler, and Carine Brinster. Isolation of dendritic cells. In John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, and Warren Strober, editors, *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken and NJ and USA, 2001.
- [157] R. M. Steinman and J. Swanson. The endocytic activity of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 182(2):283–288, 1995.
- [158] I. Mellman and R. M. Steinman. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3):255–258, 2001.
- [159] F. Sallusto, P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*, 28(9):2760–2769, 1998.
- [160] A. Bowie and L. A. O’Neill. The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology*, 67(4):508–514, 2000.
- [161] S. Akira, M. Yamamoto, and K. Takeda. Role of adapters in toll-like receptor signaling. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 3):637–642, 2003.
- [162] Taro Kawai and Shizuo Akira. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *Journal of biochemistry*, 141(2):137–145, 2007.
- [163] T. Kaisho and S. Akira. Dendritic-cell function in toll-like receptor- and myd88-knockout mice. *Trends in immunology*, 22(2):78–83, 2001.
- [164] Pentao Liu, Nancy A. Jenkins, and Neal G. Copeland. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome research*, 13(3):476–484, 2003.
- [165] D. Hanahan. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4):557–580, 1983.
- [166] M. J. Casadaban, J. Chou, and S. N. Cohen. In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *Journal of bacteriology*, 143(2):971–980, 1980.
- [167] S. G. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, and D. Hanahan. Differential plasmid rescue from transgenic mouse dnas into escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12):4645–4649, 1990.

- [168] Søren Warming, Nina Costantino, Donald L. Court, Nancy A. Jenkins, and Neal G. Copeland. Simple and highly efficient bac recombineering using galk selection. *Nucleic acids research*, 33(4):e36, 2005.
- [169] A. Weiss, R. L. Wiskocil, and J. D. Stobo. The role of t3 surface molecules in the activation of human t cells: a two-stimulus requirement for il 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(1):123–128, 1984.
- [170] W. F. SCHERER, J. T. SYVERTON, and G. O. GEY. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. iv. viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of experimental medicine*, 97(5):695–710, 1953.
- [171] M. Hooper, K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter, and M. Monk. Hpvt-deficient (lesch-nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326(6110):292–295, 1987.
- [172] E. Robanus-Maandag, M. Dekker, M. van der Valk, M. L. Carrozza, J. C. Jeanny, J. H. Dannenberg, A. Berns, and H. te Riele. p107 is a suppressor of retinoblastoma development in prb-deficient mice. *Genes & development*, 12(11):1599–1609, 1998.
- [173] E. F. Wagner and W. Risau. Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Seminars in cancer biology*, 5(2):137–145, 1994.
- [174] N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and D. L. Court. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature reviews. Genetics*, 2(10):769–779, 2001.
- [175] S. J. Sterry, J. M. Kelly, S. J. Turner, and F. R. Carbone. T cell receptor v alpha bias can be determined by tcr-contact residues within an mhc-bound peptide. *Immunology and cell biology*, 73(1):89–94, 1995.
- [176] Carlo Laudanna, Ji Yun Kim, Gabriela Constantin, and Eugene Butcher. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews*, 186:37–46, 2002.
- [177] Myrto Raftopoulou and Alan Hall. Cell migration: Rho gtpases lead the way. *Developmental biology*, 265(1):23–32, 2004.
- [178] Pablo Rougerie and Jérôme Delon. Rho gtpases: masters of t lymphocyte migration and activation. *Immunology letters*, 142(1-2):1–13, 2012.
- [179] M. A. del Pozo, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J. M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid. Rho gtpases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal erm components in t lymphocytes. *European journal of immunology*, 29(11):3609–3620, 1999.

- [180] L. Martínez-Gac, B. Alvarez, Z. García, M. Marqués, M. Arrizabalaga, and A. C. Carrera. Phosphoinositide 3-kinase and forkhead, a switch for cell division. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 2):360–361, 2004.
- [181] Qian Yang and Kun-Liang Guan. Expanding mtor signaling. *Cell research*, 17(8):666–681, 2007.
- [182] K. R. Thomas and M. R. Capecchi. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3):503–512, 1987.
- [183] J. Hasty, J. Pradines, M. Dolnik, and J. J. Collins. Noise-based switches and amplifiers for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5):2075–2080, 2000.
- [184] Thomas Helleday. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation research*, 532(1-2):103–115, 2003.
- [185] Chunyu Cai and Laura Gabel. Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(12):3255–3266, 2007.
- [186] A. Hall. Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350):509–514, 1998.
- [187] Cinzia Giagulli, Elio Scarpini, Linda Ottoboni, Shuh Narumiya, Eugene C. Butcher, Gabriela Constantin, and Carlo Laudanna. 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, 2004.
- [188] Ronit Pasvolsky, Valentin Grabovsky, Cinzia Giagulli, Ziv Shulman, Revital Shamri, Sara W. Feigelson, Carlo Laudanna, and Ronen Alon. Rhoa is involved in lfa-1 extension triggered by cxcl12 but not in a novel outside-in lfa-1 activation facilitated by cxcl9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5):2815–2823, 2008.
- [189] Tim Lämmermann and Michael Sixt. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Current opinion in cell biology*, 21(5):636–644, 2009.
- [190] Stephen G. Ward, John Westwick, and Stephanie Harris. Sat-nav for t cells: Role of pi3k isoforms and lipid phosphatases in migration of t lymphocytes. *Immunology Letters*, 138(1):15–18, 2011.
- [191] Akimasa Someya, Joel Moss, and Isao Nagaoka. The guanine nucleotide exchange protein for adp-ribosylation factor 6, arf-gep100/brag2, regulates phagocytosis of monocytic phagocytes in an arf6-dependent process. *The Journal of biological chemistry*, 285(40):30698–30707, 2010.

- [192] C. L. Lin, R. M. Suri, R. A. Rahdon, J. M. Austyn, and J. A. Roake. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *European journal of immunology*, 28(12):4114–4122, 1998.
- [193] A. Koff and K. Polyak. p27kip1, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Progress in cell cycle research*, 1:141–147, 1995.
- [194] Huiling Yang, Ruiying Zhao, Heng-Yin Yang, and Mong-Hong Lee. Constitutively active foxo4 inhibits akt activity, regulates p27 kip1 stability, and suppresses her2-mediated tumorigenicity. *Oncogene*, 24(11):1924–1935, 2005.
- [195] Xinhe Wang, Katherine Krupczak-Hollis, Yongjun Tan, Margaret B. Dennewitz, Guy R. Adami, and Robert H. Costa. Increased hepatic forkhead box m1b (foxm1b) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27kip1 protein levels and increased cdc25b expression. *The Journal of biological chemistry*, 277(46):44310–44316, 2002.
- [196] Lomon So and David A. Fruman. Pi3k signalling in b- and t-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *The Biochemical journal*, 442(3):465–481, 2012.
- [197] Bart Vanhaesebroeck, Len Stephens, and Phillip Hawkins. Pi3k signalling: the path to discovery and understanding. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(3):195–203, 2012.
- [198] Hai-Sheng Li, Kuntala Shome, Raúl Rojas, Mark A. Rizzo, Chandrasekaran Vasudevan, Eric Fluharty, Lorraine C. Santy, James E. Casanova, and Guillermo Romero. The guanine nucleotide exchange factor arno mediates the activation of arf and phospholipase d by insulin. *BMC cell biology*, 4:13, 2003.
- [199] Masahiro Furutani, Toshiki Itoh, Takeshi Ijuin, Kazuya Tsujita, and Tadaomi Takenawa. Thin layer chromatography-blotting, a novel method for the detection of phosphoinositides. *Journal of biochemistry*, 139(4):663–670, 2006.
- [200] Mikel Garcia-Marcos, Patrick S. Kietrsunthorn, Yelena Pavlova, Michelle A. Adia, Pradipta Ghosh, and Marilyn G. Farquhar. Functional characterization of the guanine nucleotide exchange factor (gef) motif of giv protein reveals a threshold effect in signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6):1961–1966, 2012.
- [201] R. S. Nho. Role of integrin-linked kinase in regulating phosphorylation of akt and fibroblast survival in type i collagen matrices through a $\alpha 1$ integrin viability signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28):26630–26639, 2005.

- [202] Richard Seonghun Nho and Judy Kahm. beta1-integrin-collagen interaction suppresses foxo3a by the coordination of akt and pp2a. *The Journal of biological chemistry*, 285(19):14195–14209, 2010.
- [203] Hong Xia, Richard Nho, Jill Kleidon, Judy Kahm, and Craig A. Henke. Polymerized collagen inhibits fibroblast proliferation via a mechanism involving the formation of a beta1 integrin-protein phosphatase 2a-tuberous sclerosis complex 2 complex that suppresses s6k1 activity. *The Journal of biological chemistry*, 283(29):20350–20360, 2008.
- [204] J. C. Crispin, S. A. Apostolidis, M. I. Finnell, and G. C. Tsokos. Induction of pp2a b , a regulator of il-2 deprivation-induced t-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30):12443–12448, 2011.
- [205] F. Le Naour. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21):17920–17931, 2001.
- [206] Anshu Agrawal, Sudhanshu Agrawal, Jia-Ning Cao, Houfen Su, Kathryn Osann, and Sudhir Gupta. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(11):6912–6922, 2007.
- [207] C. Knall, G. S. Worthen, and G. L. Johnson. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7):3052–3057, 1997.
- [208] Y. Sotsios, G. C. Whittaker, J. Westwick, and S. G. Ward. The cxc chemokine stromal cell-derived factor activates a gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in t lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(11):5954–5963, 1999.
- [209] Y. Lallemand, V. Luria, R. Haffner-Krausz, and P. Lonai. Maternally expressed pgk-cre transgene as a tool for early and uniform activation of the cre site-specific recombinase. *Transgenic research*, 7(2):105–112, 1998.
- [210] Hengst L. und Dohmesen C. Das p27-protein ist mehr als eine bremsen des zellzyklus. In *Labor and more*, volume 05/2009, pages 22–25.
- [211] Kent L. Rossman, Channing J. Der, and John Sodek. Gef means go: turning on rho gtpases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(2):167–180, 2005.

- [212] Ali K. Reiter, Tracy G. Anthony, Joshua C. Anthony, Leonard S. Jefferson, and Scot R. Kimball. The mtor signaling pathway mediates control of ribosomal protein mrna translation in rat liver. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(11):2169–2179, 2004.
- [213] A. Ridley. What initiates actin polymerization? *Genome biology*, 1(1):REVIEWS102, 2000.
- [214] R. Medzhitov and C. A. Janeway. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3):295–298, 1997.
- [215] Jason Lowery, Tomasz Szul, Jayaraman Seetharaman, Xiaoying Jian, Min Su, Farhad Forouhar, Rong Xiao, Thomas B. Acton, Gaetano T. Montelione, Helen Lin, John W. Wright, Eunjoo Lee, Zoe G. Holloway, Paul A. Randazzo, Liang Tong, and Elizabeth Sztul. Novel c-terminal motif within sec7 domain of guanine nucleotide exchange factors regulates adp-ribosylation factor (arf) binding and activation. *The Journal of biological chemistry*, 286(42):36898–36906, 2011.
- [216] X. Wang, A. Gjørloff-Wingren, M. Saxena, N. Pathan, J. C. Reed, and T. Mustelin. The tumor suppressor pten regulates t cell survival and antigen receptor signaling by acting as a phosphatidylinositol 3-phosphatase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(4):1934–1939, 2000.
- [217] Noel A. Warfel and Alexandra C. Newton. Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (phlpp): a new player in cell signaling. *The Journal of biological chemistry*, 287(6):3610–3616, 2012.
- [218] S. van Tonder.
- [219] Teet Velling, Anne Stefansson, and Staffan Johansson. Egfr and beta1 integrins utilize different signaling pathways to activate akt. *Experimental cell research*, 314(2):309–316, 2008.
- [220] Yanbo Zhang and Hongyan Wang. Integrin signaling and function in immune cells. *Immunology*, 2012.
- [221] David T. White, Katie M. McShea, Myriam A. Attar, and Lorraine C. Santy. Grasp and ipcef promote arf-to-rac signaling and cell migration by coordinating the association of arno/cytohesin 2 with dock180. *Molecular biology of the cell*, 21(4):562–571, 2010.
- [222] A. T. Ting, F. X. Pimentel-Muiños, and B. Seed. Rip mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of nf-kappab but not fas/apo-1-initiated apoptosis. *The EMBO journal*, 15(22):6189–6196, 1996.

- [223] David P. Siderovski and Francis S. Willard. The gaps, gefs, and gdis of heterotrimeric g-protein alpha subunits. *International journal of biological sciences*, 1(2):51–66, 2005.
- [224] Eric D. Tang, Cun-Yu Wang, Yue Xiong, and Kun-Liang Guan. A role for nf-kappab essential modifier/ikappab kinase-gamma (nemo/ikkgamma) ubiquitination in the activation of the ikappab kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*, 278(39):37297–37305, 2003.
- [225] Wojciech Swat and Keiko Fujikawa. The vav family: at the crossroads of signaling pathways. *Immunologic research*, 32(1-3):259–265, 2005.
- [226] J. Sun, S. O. Marx, H. J. Chen, M. Poon, A. R. Marks, and L. E. Rabbani. Role for p27(kip1) in vascular smooth muscle cell migration. *Circulation*, 103(24):2967–2972, 2001.
- [227] T. A. Springer, M. L. Dustin, T. K. Kishimoto, and S. D. Marlin. The lymphocyte function-associated lfa-1, cd2, and lfa-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annual review of immunology*, 5:223–252, 1987.
- [228] Changsheng Lin, Jason Ear, Yelena Pavlova, Yash Mittal, Irina Kufareva, Majid Ghassemian, Ruben Abagyan, Mikel Garcia-Marcos, and Pradipta Ghosh. Tyrosine phosphorylation of the α -interacting protein giv promotes activation of phosphoinositide 3-kinase during cell migration. *Science signaling*, 4(192):ra64, 2011.
- [229] Janet Dancey. mtor signaling and drug development in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 7(4):209–219, 2010.
- [230] J. E. Darnell, I. M. Kerr, and G. R. Stark. Jak-stat pathways and transcriptional activation in response to ifns and other extracellular signaling proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164):1415–1421, 1994.
- [231] L. P. Ganesan. The serine/threonine kinase akt promotes fc receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70s6 kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52):54416–54425, 2004.
- [232] E. Frengen, D. Weichenhan, B. Zhao, K. Osoegawa, M. van Geel, and P. J. de Jong. A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*, 58(3):250–253, 1999.
- [233] Philippe Bousso. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nature reviews. Immunology*, 8(9):675–684, 2008.
- [234] David J. Adams, Michael A. Quail, Tony Cox, Louise van der Weyden, Barbara D. Gorick, Qin Su, Wei-in Chan, Rob Davies, James K. Bonfield, Frances Law, Sean

- Humphray, Bob Plumb, Pentao Liu, Jane Rogers, and Allan Bradley. A genome-wide, end-sequenced 129sv bac library resource for targeting vector construction. *Genomics*, 86(6):753–758, 2005.
- [235] Robert T. Abraham and Arthur Weiss. Jurkat t cells and development of the t-cell receptor signalling paradigm. *Nature reviews. Immunology*, 4(4):301–308, 2004.
- [236] *Labor and more.*
- [237] Isabel Chu, Jun Sun, Angel Arnaout, Harriette Kahn, Wedad Hanna, Steven Narod, Ping Sun, Cheng-Keat Tan, Ludger Hengst, and Joyce Slingerland. p27 phosphorylation by src regulates inhibition of cyclin e-cdk2. *Cell*, 128(2):281–294, 2007.
- [238] John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, and Warren Strober, editors. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken and NJ and USA, 2001.
- [239] Victoria B. Christie, Daniel J. Maltman, Andrew P. Henderson, Andrew Whiting, Todd B. Marder, Majlinda Lako, and Stefan A. Przyborski. Retinoid supplementation of differentiating human neural progenitors and embryonic stem cells leads to enhanced neurogenesis in vitro. *Journal of neuroscience methods*, 193(2):239–245, 2010.
- [240] S. C. Bunnell, V. Kapoor, R. P. Tribble, W. Zhang, and L. E. Samelson. Dynamic actin polymerization drives t cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor lat. *Immunity*, 14(3):315–329, 2001.
- [241] Tatsuo Kinashi and Koko Katagiri. Regulation of immune cell adhesion and migration by regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues. *Immunology*, 116(2):164–171, 2005.
- [242] J. K. Klarlund, L. E. Rameh, L. C. Cantley, J. M. Buxton, J. J. Holik, C. Sakelis, V. Patki, S. Corvera, and M. P. Czech. Regulation of grp1-catalyzed adp ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 273(4):1859–1862, 1998.
- [243] David A. Guertin, Deanna M. Stevens, Carson C. Thoreen, Aurora A. Burds, Nada Y. Kalaany, Jason Moffat, Michael Brown, Kevin J. Fitzgerald, and David M. Sabatini. Ablation in mice of the mtorc components raptor, rictor, or mlst8 reveals that mtorc2 is required for signaling to akt-foxo and pkcalpha, but not s6k1. *Developmental cell*, 11(6):859–871, 2006.
- [244] Y. Jiang, J. D. Woronicz, W. Liu, and D. V. Goeddel. Prevention of constitutive tnf receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5401):543–546, 1999.

- [245] H. Hsu, J. Xiong, and D. V. Goeddel. The tnf receptor 1-associated protein tradd signals cell death and nf-kappa b activation. *Cell*, 81(4):495–504, 1995.

Anhang

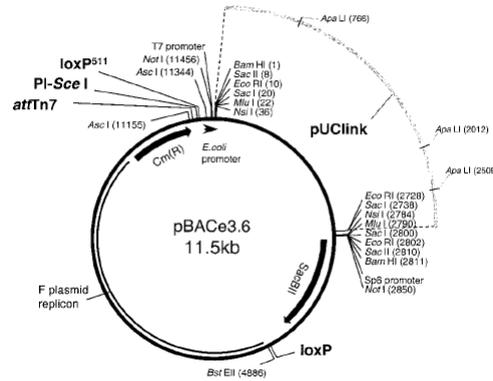


Abbildung 7.1: pBACe3.6. Vektorgerüst der verwendeten bMQ-BAC-Klone. Quelle: Frengen *et al.*, 1999 [232].

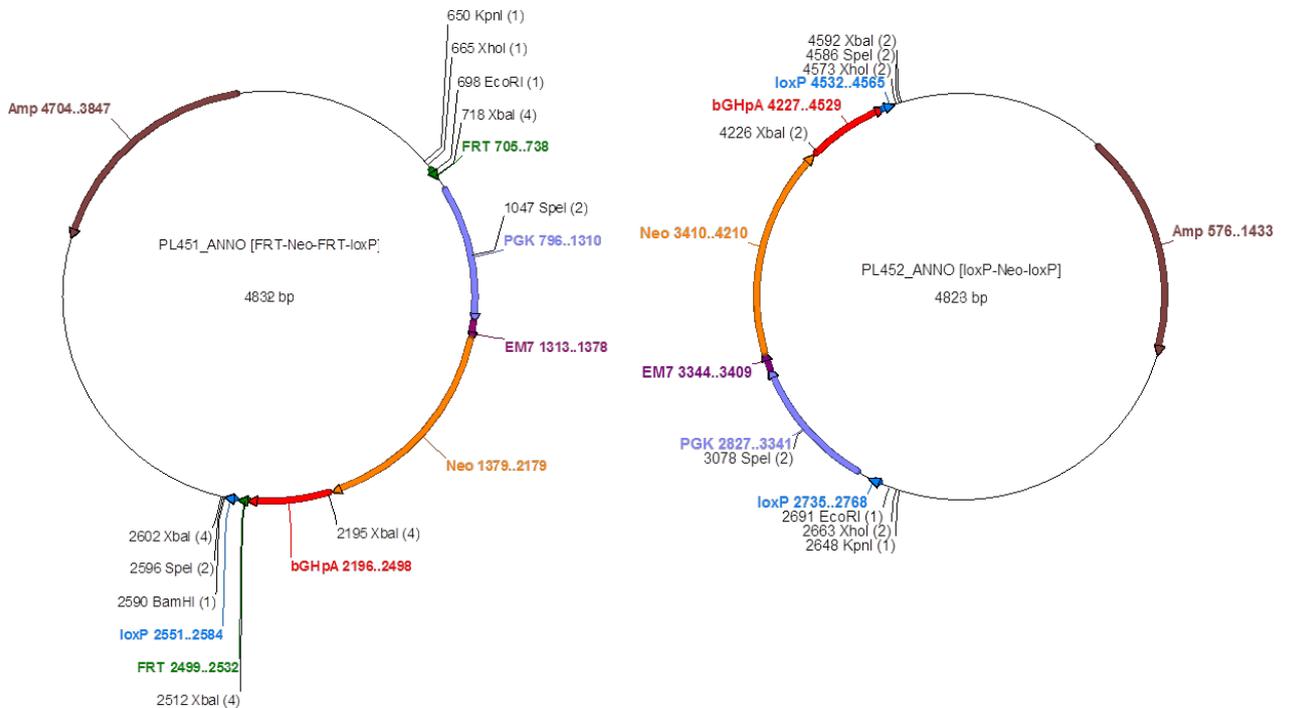


Abbildung 7.2: Vektorkarten der Plasmide pL451 und pL452. Die Vektoren dienen als Donor für die Frt-flankierte Neo-Kassette (pL451; linke Abbildung) beziehungsweise für die loxP-flankierte Neo-Kassette (pL452; rechte Abbildung). [164]

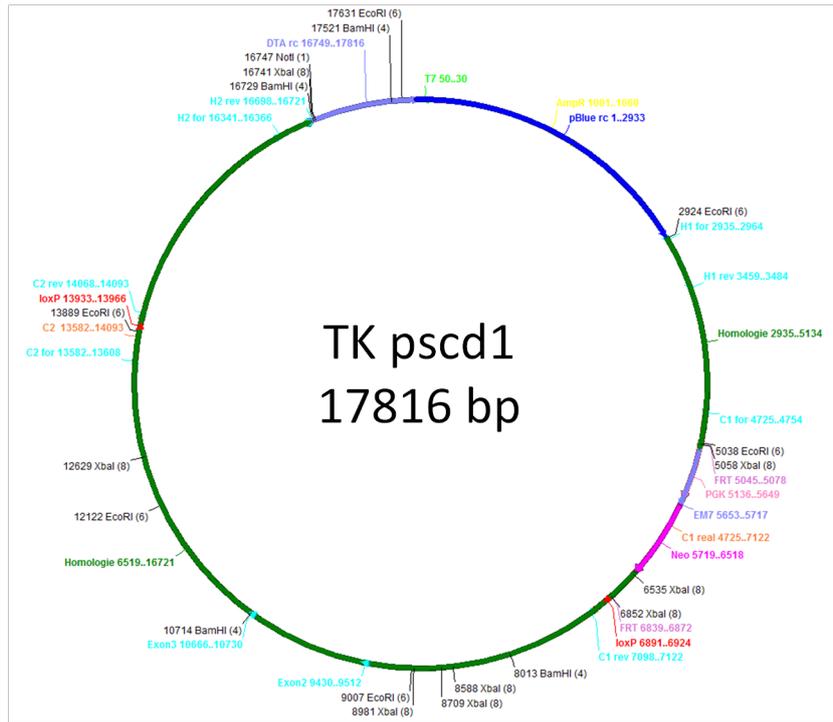


Abbildung 7.3: Targeting-Konstrukt für Cytohesin-1 konditional.

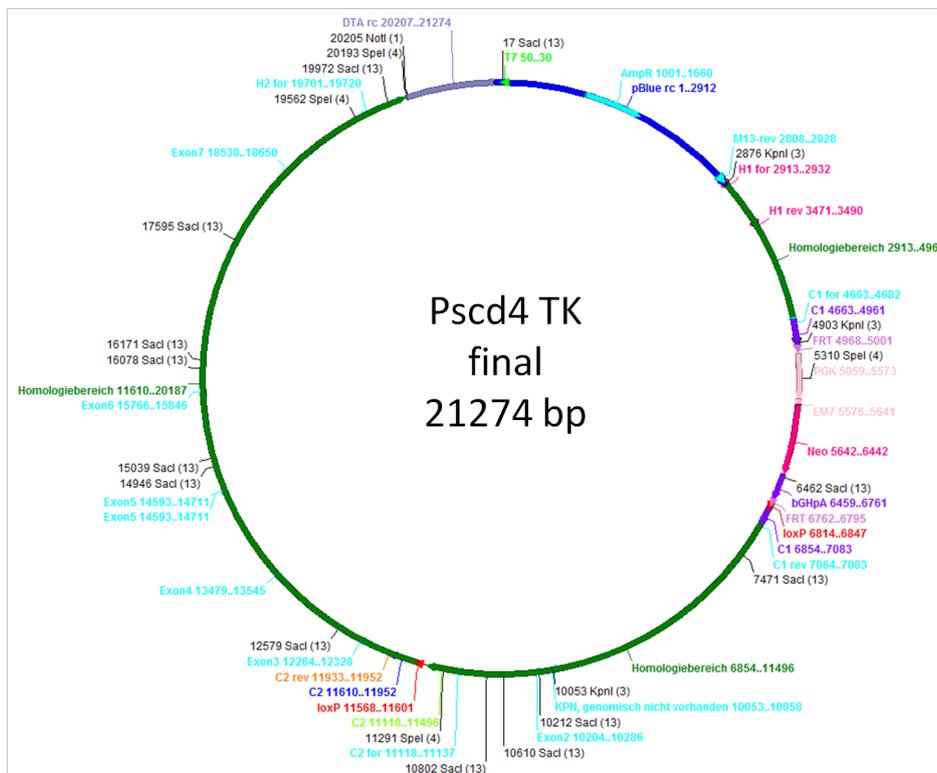


Abbildung 7.4: Targeting-Konstrukt für Cytohesin-4 konditional.

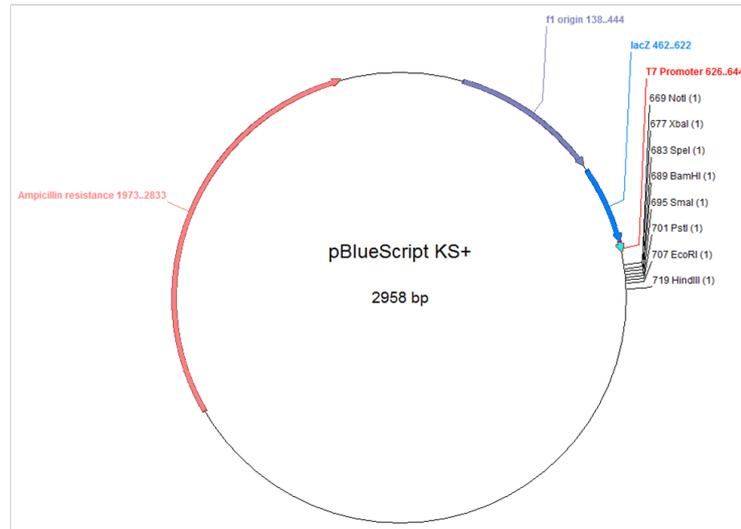


Abbildung 7.5: Vektorkarte von pBluescript KS+ (Stratagene). Der pBluescript KS+ bildet die Basis der Targeting-Konstrukte und trägt ein Ampizillin-Resistenzgen.

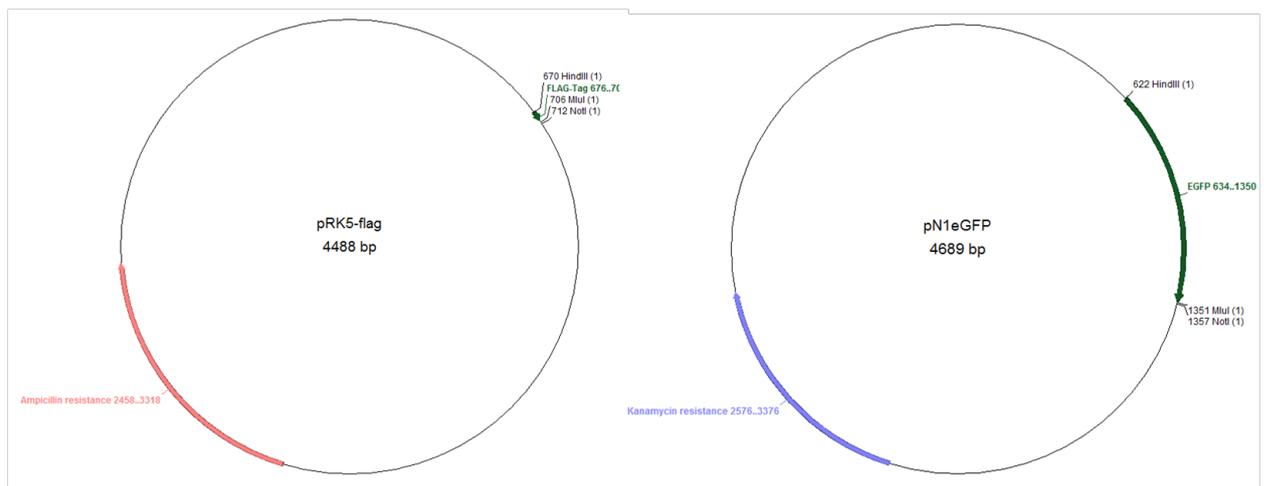


Abbildung 7.6: Vektorkarten der Plasmide pRK5-flag und pN1eGFP. Über die Schnittstellen *MluI* und *NotI* können cDNA-Sequenzen inkloniert werden, sodass nach Überexpression das entsprechende Protein N-terminal mit einem Flag-Tag (pRK5-flag) oder einem GFP-Tag (pN1eGFP) versehen ist. pRK5-flag trägt ein Ampizillin-Resistenz-Gen, pN1eGFP ein Kanamycin-Resistenz-Gen.

Danke...

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, die auf unterschiedlichste Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Kolanus für die Betreuung dieser Arbeit, die stete Motivation und Diskussionsbereitschaft, die uneingeschränkte Unterstützung sowie die zahlreichen Ideen, die diese Arbeit entscheidend vorangebracht haben. Außerdem möchte ich ihm für die Vermittlung internationaler Kooperationen danken, sowie die Möglichkeit an zahlreichen Kongressen teilzunehmen.

Bei Herrn Professor Knolle möchte ich mich an dieser Stelle für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei allen im Labor möchte ich mich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre bedanken, die vielen guten und fundierten Ratschläge und die Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, die gute Organisation und den netten Zusammenhalt. Ich habe mich in dieser Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt und unglaublich viel gelernt.

Ganz herzlicher Dank gilt Dr. Thomas Quast für die guten wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen, seine stete Unterstützung, sein zuverlässiges Korrekturlesen und die schönen Mittagspausen.

Ganz herzlich möchte ich Dr. Bettina Jux danken, die mit einer gelungenen Mischung aus Expertise und Fröhlichkeit meine Arbeit bereichert hat und mir bei jedem einzelnen Klon als "Pick-Schwester" Beistand geleistet hat. Neben all ihren guten Ideen und Ratschlägen möchte ich ihr auch für die konstruktive Korrektur dieser Arbeit danken.

Für die ausgezeichnete technische Assistenz im Isotopenlabor danke ich an dieser Stelle Barbara Reichwein, die immer und zu jeder Zeit an meiner Seite für "schöne Banden" gekämpft hat und mich mit ihrer Energie angesteckt hat, immer weiterzumachen.

Christa Mandel danke ich für die sehr gute Unterstützung beim Bau der Targeting-Konstrukte und ihre Expertise in allen molekularbiologischen Angelegenheiten. Ich danke Helga Ueing bei der tatkräftigen Unterstützung in Sachen Buffys und Proteingelen, und Susi Weese, Elke Thome, Esther Gast, Gertrud Mierzwa und Margret Schöler dafür, dass alles in diesem Labor so gut organisiert war und "lief".

Besonderer Dank gilt Dr. Jessica Grell, Nina Novak, Felix Tolksdorf, Jacqueline Ratter, Dr. Diana Hippe, Marie Dhaen und Sibylle Molt für die tolle Arbeitsatmosphäre in "unserem" Labor, insbesondere in der Zeit des Zusammenschreibens, und die vielen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen. Felix möchte ich zudem für die Hilfe mit Lyx und Prism danken und natürlich für die DJ-Aktivität in den späten Abendstunden, und Jacqueline für Ideen und Korrekturen jeglichen Schreibkrams.

Ganz herzlicher Dank gilt den lieben Unterstützern von der „Büroseite“, Katrin Hesse, Dr. Dieter Sedlmeier und Marie Hendrikx, die mir bei der Bewältigung bürokratischer Hürden stets zur Seite standen und jederzeit aufmunternde Worte für mich hatten.

Für anregende wissenschaftliche Diskussionen, vielfältige Unterstützung in zahlreichen „Labor-Dingen“ und ein tolles Arbeitsklima danke ich Dr. Johanna Kolanus, Dr. Tobias Goller, Karin Schneider, Sibylle Mitschka, Michael Rieck und Felix Eppler.

Ich danke Prof. Leitges und Philipp Sell vom Biotech Centrum Oslo für die Kooperation in Sachen Targeting-Konstrukte und die freundliche Aufnahme in ihrem Labor während meines Oslo-Aufenthaltes. Dr. Joachim Degen danke ich ebenfalls für seine wertvollen Ratschläge in Bezug auf Targeting-Vektoren. Auch der AG Schultze möchte ich für die vielfältige Unterstützung danken, insbesondere Dr. Marc Beyer und Maren Mai für die Hilfe beim Zell-Sortieren. Für die zuverlässige Hilfe bei diversen Computerangelegenheiten möchte ich mich ganz herzlich bei Tom Wegner bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit danken, insbesondere meinen Eltern. Für ihr Verständnis für meinen Freizeitmangel danke ich meiner besten Freundin Steffi.

Mein ganz besonderer Dank gilt Ali Alia. Du hast mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit stets weiter motiviert, unterstützt und immer an mich geglaubt. Du hast mir jederzeit geholfen und mir stets den Rücken freigehalten, sodass ich mich voll um meine Arbeit kümmern konnte. Dafür möchte ich dir diese Arbeit widmen.