

Die Rolle der Aktin-Regulation durch die Proteine Cofilin 1 und Profilin 1 für die Entwicklung von T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
“Doctor rerum naturalium”

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrée Patrick Salz

aus Siegburg

Bonn, im Dezember 2015

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Bradke

Tag der Promotion: 08.06.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ebenfalls erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, den 10. Dezember 2015

(Andrée Salz)

Zusammenfassung

Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von Zellen. Trotz intensiver Forschung an den Regulationsmechanismen, die den Auf- und Abbau von Aktinfilamenten regulieren, stammten zu Beginn dieser Arbeit die meisten dieser Erkenntnisse in Bezug auf die Entwicklung von T-Zellen aus Studien zu Signalwegen, welche nicht einzig und alleine Aktinfilament-Remodellierung zum Ziel haben. Daher wurden in dieser Arbeit die Funktion zweier direkt an Aktin bindenden Proteine beeinflusst, um die Regulation des Aktin-Zytoskeletts im Rahmen der T-Zell Entwicklung direkt zu adressieren. Während Cofilin 1 die Depolymerisierung von Aktin-Filamenten beschleunigen kann, begünstigt Profilin die Polymerisation von Aktinfilamenten. Da der "Knockout" von Cofilin 1 oder Profilin 1 in Mäusen jeweils zu einer frühen embryonalen Letalität führt, wurden in dieser Arbeit konditionale Knockout-Mausmodelle verwendet, in denen Cofilin 1 oder Profilin 1 in einem frühen Stadium der T-Zell Entwicklung im Thymus durch eine CD4-Cre-Rekombinase ausgeschaltet werden. Für Cofilin 1 konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Proteins zu signifikanten Veränderungen der Aktin-Polymerisationskinetik und zu einer starken Verschiebung des F-/G-Aktin Gleichgewichts zu Seiten von F-Aktin, in Thymozyten, führt. Anders als es für andere Zelltypen zuvor beschrieben wurde, konnten in mutanten Thymozyten keine Veränderungen im Zellzyklus, der Proliferation, der Apoptose, dem Rezeptor Cycling oder der Aktivierbarkeit der Zellen durch den Verlust von Cofilin 1 festgestellt werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben einen starken Block in der Entwicklung der mutanten Thymozyten, welche sich nicht über die positive Selektion hinaus in einzeln positive Thymozyten entwickeln können. Knochenmarktransplantations-Experimente konnten nachweisen, dass sich mutante Thymozyten auch in einem WT Thymus nicht entwickeln können, wodurch die Entwicklungsstörung auf ein zell-intrinsisches Problem zurückgeführt werden konnte. *In vitro* konnten mutante Thymozyten erfolgreich aktiviert und in CD4⁺ einzeln positive Zellen differenziert werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass das interne Differenzierungsprogramm dieser Zellen nicht direkt beeinflusst wurde. Letztendlich konnten als funktionale Ursachen des Entwicklungsdefizits sowohl Adhäsions- als auch Migrationsdefekte in mutanten Thymozyten identifiziert werden. Durch detaillierte Analysen des Migrationsverhaltens in dreidimensionaler Umgebung konnte gezeigt werden, dass es in mutanten Thymozyten dabei zu vermehrten Ruhephasen während der Migration kommt. Der Verlust von Profilin-1 bedingte eine verminderte Polymerisationskinetik in Thymozyten unter SDF-1 Stimulationsbedingungen und eine signifikant geringere Menge an

polymerisierten Aktin in diesen Zellen. Profilin-1 mutante Thymozyten wiesen einen verminderten Anteil des T-Zell Aktivierungsmarkes CD69 auf, zeigten jedoch keine Veränderungen in ihrer Aktivierbarkeit durch Antikörper. In durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte eine verminderte Anzahl des späten einzeln positiven Entwicklungsstadiums CD4SP im Thymus sowie die Abwesenheit von CD4- und CD8-T-Zellen in den peripheren lymphatischen Geweben nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden eine verminderte Adhäsionsfähigkeit sowie eine verminderte Migration der Zellen beobachtet. Die Deletion der Profilin-1 Allele zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt durch die distalLCK-Cre-Rekombinase führte zu einer starken Reduktion an peripheren zytotoxischen T-Zellen. Ergänzende Untersuchungen mit Reportermäusen konnten in diesem Zusammenhang geringe Anteile an potenziell Profilin-1 defizitären T-Zellen in Lymphozyten nachweisen.

Davon unabhängig konnte das Vorkommen zweier bisher nicht zuzuordnenden T-Zell Populationen in Pfn1^{GFPaktin} Reportermäusen bestätigt und gezeigt werden, dass es sich hierbei um diskrete Populationen handelt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass sowohl Cofilin-1 als auch Profilin-1 bereits in einer sehr frühen Phase der Chemokin-stimulierten Aktin-Regulation in Thymozyten von Bedeutung sind. In Summe konnte gezeigt werden, dass eine Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch die Proteine Cofilin 1 und Profilin 1 essentiell für die Entwicklung und die Funktion von T-Zellen ist.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Kurze Einführung in das Zytoskelett der Zelle	1
1.2 Aktin und Aktinfilamente.....	1
1.2.2 Aktin-Monomer-bindende Proteine	4
1.2.3 Aktin-Nukleation.....	5
1.2.4 Aktin-quervernetzende und -bündelnde Proteine.....	5
1.2.5 Aktin-verbindende Proteine zu anderen Zellstrukturen	6
1.2.6 Aktin-Kappen-bildende Proteine.....	6
1.2.7 Aktin-destabilisierende und -zerschneidende Proteine	6
1.3 ADF/Cofilin	7
1.3.2 Eigenschaften von ADF/Cofilin.....	8
1.3.3 Regulation von ADF/Cofilin.....	9
1.3.4 Cofilin-1	10
1.4 Profilin.....	12
1.4.2 Die Profilin-Proteinfamilie.....	13
1.5 T-Zell Entwicklung	15
1.6 Die Maus als Modellorganismus.....	18
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Material	20
2.1 Lösungen, Puffer und Medien	20
2.1.1 Allgemeine Lösungen	20
2.1.2 Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	21
2.1.3 Lösungen für die Proteinanalytik	22
2.1.4 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur	24
2.1.5 Medien und Lösungen für die Kultur und Analyse von primären Thymozyten	25
2.2 Kommerzielle Lösungen	26
2.2.1 Kommerzielle Lösungen für Nukleinsäure Analyse	26
2.2.2 Kommerzielle Lösungen für die Proteinanalytik	27
2.2.3 Kommerzielle Lösungen für die Gewebekultur	27
2.3 Chemikalien (flüssig)	27
2.4 Chemikalien (fest)	28
2.5 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits).....	28
2.6 Allgemeine Labormaterialien.....	29

2.6.1 Plastikware	29
2.6.2 Glasware.....	29
2.6.3 Weitere Labormaterialien.....	29
2.7 Geräte	30
2.7.2 Durchflusszytometer Klassifikation und Zubehör	31
2.8 Analyse Software	31
2.9 Verwendete Antikörper	32
2.9.1 Primärantikörper Western Blot	32
2.9.2 Sekundärantikörper Western Blot	33
2.9.3 Antikörper für FACS-Analyse	33
2.9.4 Antikörper für Thymozyten Stimulation.....	34
2.9.5 Antikörper für Adhäsions-Versuche	34
2.9.6 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz	34
2.9.6 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz.....	35
2.10 Färbe Reagenzien	35
2.11 Nukleinsäuren.....	36
2.11.1 Oligonukleotide für PCR.....	36
2.11.2 TaqMan® Proben für qPCR.....	36
2.11.3 Rekombinante Plasmide	37
2.11.4 Hybridisierungssonden für Southern Blot.....	37
2.12 Bakterienstämme	37
2.13 Mauslinien	38
2.14 Größenstandards.....	39
3 Methoden.....	40
3.1 Molekularbiologie	40
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
3.1.2 Genotypisierungs-PCRs zur Charakterisierung transgener Mäuse	40
3.1.3 Isolierung genomischer DNS aus Schwanzbiopsien von Mäusen für die Southern Blot-Analyse.....	44
3.1.4 Isolierung genomischer DNS aus Zellsuspensionen von Mäusen für die Southern Blot-Analyse.....	45
3.1.5 Agarosegelelektrophorese	45
3.1.6 Southern Blot-Analyse der verschiedenen Mauslinien.	46
3.1.7 Herstellung der DNS-Sonde für einen Cofilin1 Southern Blot.....	46
3.1.8 Herstellung der DNS-Sonde für einen Profilin1 Southern Blot.....	47
3.1.9 Herstellung radioaktiver Sonden	48
3.1.10 Hybridisierung und Nachweis der radioaktiven DNS-Sonde	48
3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	49

3.1.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	49
3.1.13	Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen	50
3.1.14	Elution von DNS aus Agarosegelen.....	50
3.1.15	RNS Isolation	50
3.1.15.1	Isolation von RNS aus murinen Zellen für qPCR	50
3.1.15.2	cDNS Synthese.....	52
3.1.15.3	qPCR/RT-PCR	52
3.1.15.4	Analyse von qPCR/RT-PCR Daten.....	55
3.2	Proteinanalytik	56
3.2.1	Proteinextraktion aus Geweben.....	56
3.2.2	Proteinextraktion aus primär Zellen	56
3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	56
3.2.4	Protein Konzentrationsbestimmung bei Gewebe-Lysaten	57
3.2.5	Konzentrationsbestimmung bei Zell-Lysaten	57
3.2.6	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
3.2.7	Coomassie Färbung von Protein-Gelen.....	58
3.2.8	Western Blot.....	59
3.2.9	Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL).....	60
3.2.10	Biochemische F-/G-Aktin Separation nach McRobbie.....	61
3.3	Zell Biologie.....	62
3.3.1	Gewebekultur	62
3.3.2	Isolation von primären Thymozyten aus dem Thymus	62
3.3.3	Isolation von primären Lymphozyten aus Lymphknoten	63
3.3.4	Isolation von Immunzellen aus dem Blut.....	63
3.3.5	Isolation von Knochenmark	64
3.3.6	Durchflusszytometrie	64
3.3.7	Durchflusszytometrische Zell-Sortierung	65
3.3.8	Färbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff.....	65
3.3.9	Fixierung von Zellen	66
3.3.10	Intrazelluläre Färbung von Thymozyten	66
3.3.11	Getrennte Kultur von Thymozyten nach Sortierung	66
3.3.12	Knochenmark-Transplantation.....	67
3.3.13	Apoptose-Analyse mit Annexin V	69
3.3.14	Apoptose-Analyse mit Caspase3.....	69
3.3.15	Zell Zyklus-Analyse	70
3.3.16	Proliferations-Analyse.....	70
3.3.17	Rezeptor Re-Expressions-Analyse	71
3.3.18	<i>In vitro</i> Differenzierung von Thymozyten	71

3.3.19	Aktivierung von Thymozyten	72
3.3.20	SDF-1 α induzierte Aktin-Polymerisation in Thymozyten	72
3.3.21	Adhäsion von Thymozyten auf ICAM-1	72
3.3.22	Adhäsion von Thymozyten auf Laminin.....	73
3.3.23	Transwell Migrations-Analyse	74
3.3.24	Kollagen Migrations-Analyse	75
3.4	Histologie	75
3.4.1	Einbetten und Anfertigen von Kryo-Dünnschnitten	75
3.4.2	Fixierung von Kryoschnitten für HuE Färbung	76
3.4.3	HuE Färbung von Dünnschnitten.....	76
3.4.3	Fixierung von Kryoschnitten für die Immunfluoreszenz	76
3.4.3	Immunfluoreszenz von Kryoschnitten	77
3.5	Kontrollen.....	77
4	Ergebnisse	78
4.1	Die Expression von Cofilin 1 und Profilin 1 wird im Zuge der T-Zell Entwicklung im Thymus gesteigert	78
4.2	Untersuchungen zur Rolle von Cofilin 1 in der T-Zell Entwicklung.....	80
4.2.1	Cofilin 1 ist als einziges Mitglied der ADF/Cofilin Familie in Thymozyten, Lymphozyten und Jurkat T-Zellen exprimiert	80
4.2.2	Cofilin 1 wird in Thymozyten effizient durch die CD4cre Rekombinase deletiert	81
4.2.3	Der Verlust von Cofilin 1 bedingt eine starke Erhöhung des F-Aktin Gehalts in Thymozyten.....	84
4.2.4	Der Verlust von Cofilin 1 führt zu einem Entwicklungs-Block heranreifender T-Zellen mit verminderter positiver Selektion wobei die Gesamtzellzahl der Thymozyten unverändert bleibt.....	85
4.2.5	Der Entwicklungs-Block von Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten führt zu einer drastischen Reduktion peripherer T-Zellen.....	87
4.2.6	Vermehrte Anzahl an $\gamma\delta$ -T-Zellen als indirekter Effekt der Cofilin 1 Deletion in TCR β T-Zellen.....	89
4.2.7	Deletion von Cofilin 1 führt zu einer Degeneration der Medulla im Thymus.....	91
4.2.8	Der Entwicklungs-Stopp in Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten ist auf einen Zell-intrinsischen Effekt zurückzuführen.....	92
4.2.9	Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigen keine veränderte Apoptose	94
4.2.10	Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigen keine Veränderungen in Zellzyklus oder Proliferation.....	95
4.2.11	Der Transport von Transmembran-Rezeptoren an die Zelloberfläche ist in Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten nicht beeinträchtigt.....	96
4.2.12	Cofilin 1 ist nicht essentiell für die frühe Aktivierung von Thymozyten <i>in vitro</i>	98
4.2.13	Verminderte Adhäsion von Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten an ICAM-1.....	99
4.2.14	Cofl ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigen eine verminderte Migration in “Transwell“-Versuchen.....	101

4.2.15 Verringerte dreidimensionale Migration von Cof1 ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in Kollagen-Gel	103
4.2.16 Cofilin 1 mutante Thymozyten zeigen nach SDF-1 α Stimulation eine veränderte F-Aktin-Kinetik	107
4.2.17 Cof1 ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten können in vitro zu CD4-SP Zellen differenzieren.....	108
4.3 Untersuchungen zu Profilin 1 in der T-Zell Entwicklung.....	110
4.3.1 Effiziente Deletion von Profilin1 durch die CD4cre- Rekombinase.....	111
4.3.2 Ein “Knockout“ von Profilin 1 in Thymozyten führt zu verringerten Mengen von F-Aktin.....	112
4.3.3 Der Verlust von Profilin 1 hemmt die Aktin Polymerisation nach SDF-1 α Stimulation	113
4.3.4 Profilin 1-Defizienz führt zu einer verminderten positiven und negativen Selektion von Thymozyten.....	115
4.3.5 Die Deletion von Profilin 1 in Thymozyten führt zu einer stark verminderten Anzahl an peripheren T-Zellen.....	116
4.3.6 Trotz verringerter CD69 Expression an ihrer Oberfläche lassen sich Pfn1 ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten aktivieren.....	117
4.3.7 Verminderte Adhäsion von Pfn1 ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten an Laminin-beschichtete Oberflächen	118
4.3.8 Dreidimensionale Migration ist in Pfn1 ^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten vermindert	119
4.4.1 Deletion von Profilin 1 im Thymus durch die distalLCK-Cre-Rekombinase führt zum Verlust von CD8 ⁺ T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben.	121
4.4.2 Ein geringer Anteil an Profilin 1 defizienten T-Zellen ist in sekundären lymphatischen Organen nachweisbar	123
4.5 Analyse des Pfn1 ^{GFPaktin} Reporter-Mausmodells.....	125
4.5.1 Detektion möglicher Pfn1 ^{GFPaktin} T-Zell Subpopulationen.....	125
4.5.2 Die GFP ⁺ und GFP ^{hoch} T-Zell Populationen sind diskrete Zell Populationen, welche in vitro nicht ineinander übergehen.....	126
4.5.3 Die GFP-Aktin Expression korreliert in Pfn1 ^{GFPAktin/wt} T-Zellen nicht mit der Expression von Profilin 1	128
5 Diskussion	130
5.1 Expression Aktin-bindender Proteine in der T-Zell Entwicklung.....	130
5.2 Deletion von Cofilin 1 in der T-Zell Entwicklung.....	132
5.3 Deletion von Profilin 1 in der frühen T-Zell Entwicklung.....	147
5.4 Analyse des Pfn1 ^{GFPaktin} Reporter Mausmodells	155
6. Literaturverzeichnis.....	158
7. Danksagung.....	177

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
A	Ampere
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AbP	Aktin bindende Proteine
ADF	actin depolymerizing protein
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosine triphosphate
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
ca.	circa
CD	engl. Cluster of differentiation
Cof1	Cofilin 1
Cof2	Cofilin 2
Cre	Cre-Rekombinase
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DN	doppelt negativ
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DP	doppelt positiv
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemi Luminescence
ED	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessig-säure
engl.	Englisch
et al.	und andere
Flp	Flip-Rekombinase
frt	<i>flip recombination target</i>
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HR	Homologieregion
KI	Knock-in
KO	Knock-out
Kond. Mut.	Konditionale Mutante
Kontr.	Kontrolle
konz.	konzentriert
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
loxP oder fl oder flox	<i>locus of x-cross of P1</i>
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	Molar

MCS	Merfachklonierungsstelle
MilliQ	Hochgradig gereinigtes und voll entsalztes Wasser
min oder Min.	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n-cofilin	Non muscle cofilin (cofilin 1)
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pfn1	Profilin 1
Pfn2	Profilin 2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidium iodide
poly(A)	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	einzel positiv (engl. Single positive)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TC	Gewebekultur (engl. Tissue culture)
TCR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris-EDTA
U	Unit
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VE	voll entsalzt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
mAk	Monoklonaler Antikörper
KM	Knochen Mark

1 Einleitung

1.1 Kurze Einführung in das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoskelett einer eukaryotischen Zelle besteht aus einem komplexen Netzwerk unterschiedlichster Protein-Komplexe, welche grob in drei Klassen unterteilt werden können: Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktinfilamente. Diese drei Klassen der sogenannten Zytoskelettfilamente besitzen jeweils einen für sie typischen Aufbau und nehmen in der Zelle verschiedene Aufgaben wahr. Mikrotubuli sind Hohlzylinder mit einem Durchmesser von circa 25 nm, die sich aus den Proteinen α - und β -Tubulin zusammensetzen und in der Zelle z.B. für den intrazellulären Transport oder die Ausbildung der mitotischen Spindel bedeutend sind (Akhmanova and Steinmetz, 2015). Intermediärfilament ist ein Oberbegriff, unter dem eine ganze Reihe von Proteinfilamenten, wie z.B. Lamine oder Desmine, zusammengefasst sind, von denen sich die meisten durch eine hohe mechanische Zugfestigkeit auszeichnen. Ihr Durchmesser beträgt etwa 10 nm und liegt damit zwischen dem der Mikrotubuli und der Aktinfilamente, was namensgebend für diese Gruppe von Proteinen war (Steinert and Roop, 1988). Die dritte und für das Verständnis dieser Arbeit wichtigste Klasse der Zytoskelettfilamente, sind die Aktinfilamente. Aktinfilamente, welche auch als Mikrofilamente bezeichnet werden, bilden mit einem Durchmesser von 7-8 nm die dünnsten Zytoskelettfilamente aus. Dabei bilden diese Filamente Polymere aus einzelnen, 42kDa großen Aktin-Monomeren, welche in der Zelle einer dynamischen Regulation unterliegen und in Prozesse wie beispielsweise Migration, Adhäsion, Zellteilung, intrazellulärer Vesikeltransport oder Endo- und Exocytose beteiligt sind (dos Remedios et al., 2003), (Winder and Ayscough, 2005).

1.2 Aktin und Aktinfilamente

Aktin stellt eine in allen eukaryotischen Zellen in großer Menge vorkommende Proteinfamilie dar, welche durch eine Genfamilie kodiert wird (im Menschen sechs paraloge Varianten), die sich nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden und zum Teil in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Funktionell werden die Aktin-Isoformen α -, β - und γ -Aktin voneinander unterschieden, wobei α -Aktin hauptsächlich in Skelettmuskelzellen, β - und γ -Aktin hauptsächlich in Nicht-Muskelzellen exprimiert werden (Garrels and Gibson, 1976), (Khaitlina, 2001). Einzelne Aktin Monomere können sich zu

Filamenten zusammenlagern, wobei jedes Aktin-Monomer eine intrinsische ATPase-Aktivität besitzt (Belmont et al., 1999). Für die Bildung eines neuen Aktin-Filaments ist dabei die Ausbildung eines trimeren Keimkomplexes aus ATP-beladenen G-Aktin-Molekülen von entscheidender Bedeutung. Denn erst durch die Aneinanderlagerung von drei Aktin-Molekülen entsteht *in vitro* ein thermodynamisch ausreichend stabiler Komplex um ein Aktin-Filament auszubilden (Pollard and Cooper, 2009). Nach der Ausbildung eines solchen Keimkomplexes können sich weitere ATP-Aktin-Monomere effizienter anlagern, wodurch ein doppelsträngiges, rechtsdrehend helicales F-Aktin-Filament mit circa 8 nm Durchmesser gebildet wird, welches unterschiedliche Wachstums-Charakteristika an seinen beiden Enden aufweist. Während bei hoher Konzentration von ATP-G-Aktin am sogenannten Plus-Ende (engl. *barbed end*) mehr ATP-Aktin Monomere an das Filament angelagert werden, kommt es am sogenannten Minus-Ende (engl. *pointed end*) unter Gleichgewichtsbedingungen vermehrt zu einer Dissoziation von ADP-Aktin aus dem Filament. Dieser Vorgang ist die Folge der Nukleotidhydrolyse von ATP zu ADP, welche sich kurz nach dem Einbau der Aktin-Monomere im Filament ereignet. Durch die Hydrolyse des gebundenen ATPs vermindert sich die Affinität einer Aktin-Untereinheit für seine benachbarten Aktin-Monomere, sodass sich diese vom Filament leichter ablösen kann (Belmont et al., 1999). Da die Konzentration an ADP-Aktin-Monomeren im älteren Teil des Filaments statistisch größer ist, kommt es zu einem Fließgleichgewicht, bei dem sich am Plus-Ende mehr ATP-Aktin-Monomere anlagern und am Minus-Ende mehr ADP-Aktin-Monomere vom Filament dissoziieren. Zusätzlich werden bei mittleren Konzentrationen an freien Aktin-Untereinheiten am Plus-Ende des Filaments Untereinheiten angelagert während gleichzeitig am Minus-Ende Untereinheiten dissoziieren, wodurch ein Tretmühlenmechanismus entsteht, der *in vitro* ständig Energie verbraucht, um eine gegebene Länge eines Aktin Filaments aufrecht zu erhalten (Pollard and Mooseker, 1981), (Wegner, 1982), (Pollard, 1983). Dieser Tretmühlenmechanismus ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

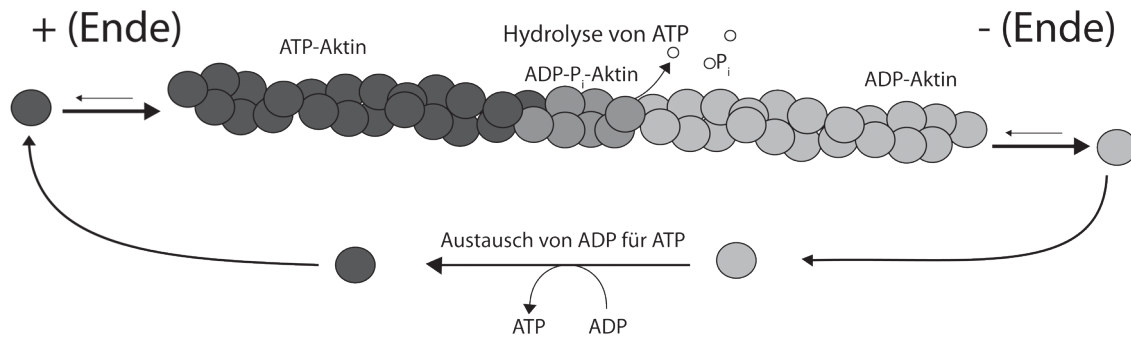


Abb.1.1 Tretmühlenmechanismus von Aktinfilamenten im Gleichgewichtszustand. In einem geschlossenen System bildet sich nach der Ausbildung eines stabilen Keimkomplexes ein Gleichgewichtszustand zwischen Anlagerung neuer ATP-Aktin Untereinheiten (dunkel) und Dissoziation von ADP-Aktin Untereinheiten (hell) aus, welcher zur Aufrechterhaltung der Filamentlänge konstant Energie verbraucht. Da die Affinität der Aktin Monomere zueinander in ATP gebundenem Zustand höher ist als im ADP gebundenen Zustand kommt es zur Ausbildung eines schnell wachsenden + Endes mit vornehmlich ATP-Aktin sowie einem dissoziierenden –Ende mit einer höheren Konzentration von ADP-Aktin. Diese Struktur bildet sich aus, da es nach der Bindung von ATP-Aktin an das Filament zu einer Hydrolyse es gebundenen ATP in ADP- P_i durch die intrinsische ATPase Aktivität von Aktin und einer damit einhergehenden Konformationsänderung der Monomere kommt. Der dargestellte Austausch von ADP mit ATP in Aktin Monomeren wird dabei *in vivo* durch Proteine wie Profilin katalysiert.

Das Aktin-Zytoskelett ist aufgrund dieses Aufbaus eine hoch dynamische Struktur, deren Regulation für viele Prozesse wie Zellbewegung (Stossel, 1993), Endozytose (Yarar, 2004), Zellteilung (Gerisch and Weber, 2000), Sekretion (Trifaró et al., 2002), (Trifaró et al., 2008), Chromatin-Remodellierung und Transkription (Bettinger et al., 2004), relevant ist (Gurniak and Witke, 2007). Neben der erläuterten Eigendynamik der Aktinfilamente werden all diese verschiedenen Prozesse in einer Zelle durch eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen (*AbP*) reguliert und nehmen Einfluss auf die Länge und Ausrichtung einzelner Aktinfilamente. Man unterscheidet zwischen Monomer bindenden- und Filament bindenden-Proteinen und klassifiziert diese gemäß ihrer Funktion. In Abbildung 1.2 wird die Regulation des Aktinzytoskeletts durch die unterschiedlichen Aktin-bindenden Proteine schematisch dargestellt.

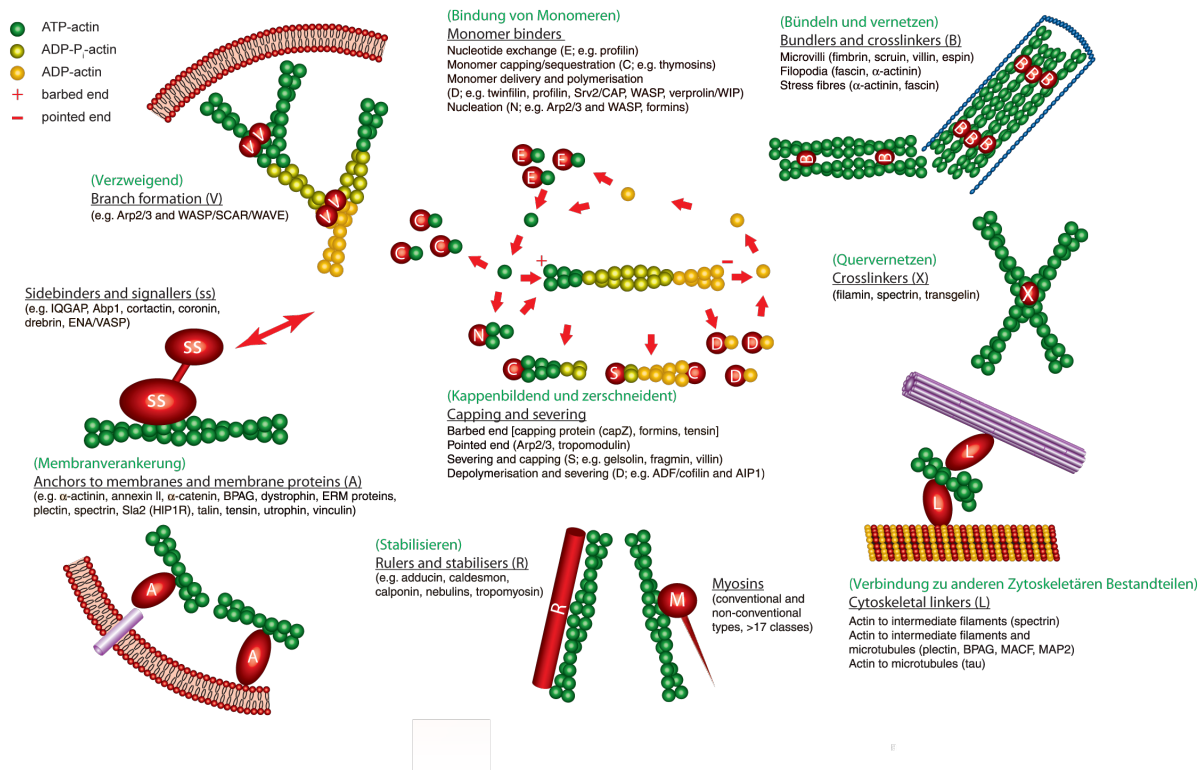


Abb.1.2 Schematische Übersicht über die verschiedenen Klassen von Aktin Bindeproteinen. Darstellung unterschiedlicher Klassen von Aktin Bindeproteinen, sortiert nach ihren funktionellen Eigenschaften die Regulation von Aktin betreffend. Beschriftung grün zeigt die deutsche Übersetzung des in schwarz beschrifteten englischen Originals. Abbildung modifiziert nach (Winder and Ayscough, 2005)

1.2.2 Aktin-Monomer-bindende Proteine

Um ein möglichst rasches Wachstums eines Aktin-Filaments gewährleisten zu können liegt in den meisten Nicht-Muskelzellen von Vertebraten ein großer Pool an Aktin-Monomeren vor. Diese würden ungesteuert polymerisieren, wenn sie nicht reguliert würden. Die Regulation dieser Aktin Monomere findet dabei vor allem durch Aktin-Monomer-bindende Proteine statt, von denen in Säugetieren bisher über zwanzig beschrieben wurden (Winder and Ayscough, 2005). In den meisten eukaryotischen Zellen sind die beiden am besten beschriebenen Aktin-Monomer-bindenden Proteine, Profilin und Thymosin β_4 . An Thymosin β_4 gebundene Aktin-Monomere befinden sich in einem geschlossenen Zustand, in dem sie nicht an andere Aktin-Moleküle binden können und auch ihr gebundenes Nukleotid weder hydrolysiert noch ausgetauscht werden kann. Profilin hingegen bindet an die der ATP-bindenden Domäne gegenüberliegende Seite eines Aktin-Monomers und blockiert so die Domäne mit der sich das Monomer an das Minus-Ende eines Aktinfilaments anlagern könnte (Pring et al., 1992), (Pantaloni and Carlier, 1993a). Dem Profilin/Aktin Komplex ist es jedoch möglich an das Plus-Ende eines Aktinfilaments zu binden. Bei der Bindung wird eine Konformationsänderung induziert, welche die Affinität von Aktin zu Profilin reduziert, sodass Profilin aus dem Komplex dissoziieren kann (Gutsche-Perelroizen et al., 1999). Da Profilin

und Thymosin β_4 um die Bindung an einzelne Aktin-Monomere konkurrieren, führt eine örtliche Aktivierung von Profilin zu einer Verlagerung der Aktin-Monomere zu den Plus-Enden der Aktinfilamente. Darüber hinaus ist die Ausbildung von Profilin/Aktin Komplexen begünstigt, da die Affinität von Aktin zu Profilin höher ist als zu Thymosin β_4 (Pollard and Borisy, 2003). Da Profilin-1 eines der beiden in dieser Arbeit untersuchten Proteine darstellt, wird auf seine Eigenschaften in Abschnitt 1.4 noch näher eingegangen.

1.2.3 Aktin-Nukleation

Für die Bildung eines neuen Aktinfilaments ist die Ausbildung eines Keimkomplexes aus ATP-beladenen G-Aktin-Molekülen von grundlegender Bedeutung. Die Ausbildung und Stabilität dieses Keimkomplexes wird dabei *in vivo* von Proteinen katalysiert und reguliert. Die beiden bekanntesten Regulatoren der Aktin-Keimbildung sind der Arp2/3 Komplex und Proteine aus der Familie der Formine. Der Arp2/3 Komplex ist in der Lage an G-Aktin zu binden und einen stabilen Nukleationskern für die Aktinpolymerisation auszubilden. Die Polymerisation des Aktinfilaments findet am Plus-Ende des Aktinfilamentes statt, während der Arp2/3 Komplex das Minus-Ende begrenzt und somit den Verlust von Aktin-Monomeren am Minus-Ende verhindert (Mullins et al., 1998a). Eine weitere Eigenschaft des Arp2/3 Komplexes ist, dass er sich an die Seite eines bestehenden Aktinfilaments anlagern kann und somit zur Ausbildung verästelter Aktinfilament-Netzwerke beiträgt.

Formine hingegen sind mit dem Plus-Ende von Aktinfilamenten verbunden und verstärken die Polymerisation an diesem, indem sie mit hoher Affinität an G-Aktin binden und dieses an das wachsende Plus-Ende liefern. Somit katalysieren Formine die Ausbildung unverzweigter linearer Aktinfilamente, wohingegen der Arp2/3 Komplex eher die Ausbildung verzweigter Aktin-Strukturen katalysiert (Lewin and Lynne, 2007).

1.2.4 Aktin-quervernetzende und -bündelnde Proteine

In der eukaryotischen Zelle sind Aktinfilamente oft zu Gefügen höherer Ordnung zusammengefasst, wobei Proteine wie α -Actinin oder Fimbrin Aktinfilamente zu Bündeln zusammenfassen und Proteine wie Filamin eine Quervernetzung einzelner Aktinfilamente bewirken (Winder and Ayscough, 2005).

1.2.5 Aktin-verbindende Proteine zu anderen Zellstrukturen

Damit eine Zelle Strukturen wie Mikrovilli oder Filopodien ausbilden kann, ist eine Assoziation des Aktin-Zytoskeletts mit der Plasmamembran essentiell. Membran-gebundene Proteine wie Dystrophin und Vinculin verknüpfen das Aktin-Zytoskelett beispielsweise an Adhäsionsrezeptoren wie Dystroglycan und Integrine, wohingegen Proteine wie Plektrin Aktinfilamente mit anderen Bestandteilen des Zytoskeletts, wie Intermediärfilamenten, verbinden (Winder and Ayscough, 2005).

1.2.6 Aktin-Kappen-bildende Proteine

Sogenannte Kappen-bildende Proteine bestimmen das Längenwachstum der F-Aktin-Filamente indem sie an die Enden der Aktinfilamente binden und dort den Austausch von Aktin-Monomeren unterbinden. Während Kappen-bildende Proteine wie CapZ, Gelsolin und Tensin an das Plus-Ende von Aktinfilamenten binden und dort die Addition neuer Aktin-Monomere unterbinden (Caldwell et al., 1989), (Sun et al., 1999), reduzieren Kappen-bildende Proteine wie Arp2/3 und Tropomodulin die Dissoziation von Aktin Monomeren am Minus-Ende der Filamente (Weber, 1994).

1.2.7 Aktin-destabilisierende und -zerschneidende Proteine

Um einen dynamischen Aktin-Umbau aufrechtzuerhalten, muss neben dem Aktin-Aufbau auch die Dissoziation einzelner Aktin-Monomere von den Filament-Enden reguliert werden. Das Zerschneiden von Aktinfilamenten durch Proteine wie Gelsolin (Sun et al., 1999) führt zu einer erhöhten Anzahl an Enden und kann damit sowohl zu einer verstärkten Dissoziation als auch zu einer verstärkten Assoziation von Aktin-Monomere führen. Aktin-depolymerisierende Proteine hingegen katalysieren die schnelle Dissoziation von Aktin-Monomeren an den Enden der Aktinfilamente. Die Proteine der ADF/Cofilin Familie stellen hierbei die am besten untersuchte Klasse von Aktin-depolymerisierenden und schneidenden Proteinen dar und sind ein Hauptgegenstand dieser Arbeit.

1.3 ADF/Cofilin

Die Proteine der ADF/Cofilin Familie sind F-Aktin-depolymerisierende Faktoren, welche in allen eukaryotischen Zellen inklusive Pflanzen vorkommen. Während in der Hefe (Moon et al., 1993), dem Nematoden *C.elegans* (Ono et al., 1999) und *D.melanogaster* (Blair et al., 2006) jeweils nur ein ADF/Cofilin Gen nachgewiesen werden konnte, wurden in Säugetieren drei in der Evolution hoch konservierte Gene dieser Proteinfamilie nachgewiesen. Diese Gene kodieren für die Proteine ADF (**A**ctin **d**epolymerising **f**actor), Cofilin-1 (**n**on-muscle-Cofilin; Synonym: N-Cofilin) sowie Cofilin-2 (**m**uscle-Cofilin; Synonym: M-Cofilin) (Nishida et al., 1984), (Abe et al., 1989), (Moriyama et al., 1990). DNS-Analysen zeigen eine konservierte Intron Exon Struktur aller ADF/Cofiline sowie eine Sequenzübereinstimmung zwischen Cofilin-1 und -2 von etwa 80% und eine Sequenzübereinstimmung beider Cofiline zu ADF von ca. 70% (Abb. 1.3). Die DNS-Sequenz von humanem und murinem Cofilin-1 ist zu 92,9% miteinander übereinstimmend, und weist eine Homologie von 98,8% der entsprechenden Aminosäuresequenz auf Proteinebene auf (Zhu et al., 2007).

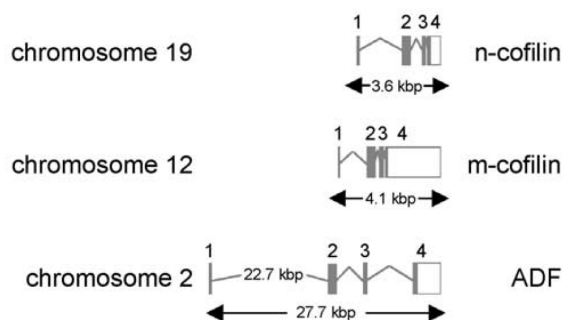


Abb. 1.3: Struktur der ADF/Cofilin Gene in der Maus. Alle drei ADF/Cofilin Gene sind aus vier kodierenden Exon-Sequenzen aufgebaut. Die Positionen der Introns, jedoch nicht deren Länge, sind konserviert. Die Gensequenz von Cofilin 1 (n-cofilin) auf Chromosom 19 und Cofilin 2 (m-cofilin) auf Chromosom 12 umfasst in etwa 4 kbp, wohingegen die auf dem Chromosom 2 liegende Gensequenz von ADF ein ungewöhnlich langes Intron von fast 23 kbp aufweist. Die kodierenden Regionen der drei ADF/Cofilin Gene weisen eine Übereinstimmung von 74% auf (Gurniak et al. 2005).

Während Cofilin 1 in allen Geweben der Maus außer im Herz und Muskel und ADF in Geweben epithelialen und endothelialen Ursprungs, sowie im Gehirn (Bellenchi et al., 2007) exprimiert werden, beschränkt sich die Expression von Cofilin 2 weitgehend auf Muskelzellen (Vartiainen et al., 2002a), konnte jedoch ebenfalls im Gehirn und in der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Gurniak et al., 2014). In Geweben in denen eine Koexpression der ADF/Cofilin Proteine stattfindet, können die Proteine mitunter unterschiedliche Aufgaben einnehmen, da sie sich in ihren biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Vartiainen et al., 2002b).

1.3.2 Eigenschaften von ADF/Cofilin

Die am besten beschriebene Funktion von ADF/Cofilinen liegt in ihrer Eigenschaft Aktinfilamente zu destabilisieren und so den Abbau der Filamente am Minus-Ende zu katalysieren. Darüber hinaus können sie Aktin Filamente zerschneiden und besitzen die Eigenschaft neben F-Aktin auch an G-Aktin zu binden, wodurch sie ebenfalls in der Regulation des G-Aktin Pools von Bedeutung sein können. Durch die Bindung von ADF/Cofilin an F-Aktin kommt es zu einer Konformationsänderung der Aktin Untereinheiten, wodurch das Filament in eine engere Windung gedrängt wird (McGough and Chiu, 1999). Hierdurch wird mechanischer Stress auf das Filament ausgeübt, wodurch es zu einer Lockerung der Bindungen zwischen den einzelnen Aktin-Untereinheiten des Filaments und einer damit einhergehenden Fragmentierung kommt. Die engere Windung des Filaments erleichtert darüber hinaus die Dissoziation von ADP-Aktin-Untereinheiten vom Minus-Ende des Filaments. Da der Tretmühlenmechanismus, dem ein Aktinfilament unterliegt, von der langsameren Dissoziationsgeschwindigkeit der Aktin-Untereinheiten am Minus-Ende des Aktinfilaments bestimmt wird, erhöht die Bindung von ADF/Cofilin die Geschwindigkeit des Aktinfilament-Umbaus somit enorm. Die Affinität von ADF/Cofilin für ADP-Aktin liegt etwa zweimal höher als die Affinität zu ATP-Aktin. Daher katalysiert Cofilin besonders effizient die Depolymerisation von älteren Aktinfilamenten, die mehr ADP-Aktin enthalten (Carlier, 1997). *In vitro* haben Cofiline die Eigenschaft auch an ADP-Aktin-Monomere zu binden, wodurch sie das "Recycling" von monomerem ADP-Aktin zu ATP-Aktin und die Anlagerung des gebundenen Aktin-Monomers an ein Filament inhibieren können (Nishida et al., 1984), (Nishida, 1985). *In Vivo* konkurrieren jedoch ADF/Cofiline mit Proteinen wie Thymosin und Profilin um die Bindung zu Aktin-Monomeren, wodurch ein Gleichgewicht entsteht, welches die Verfügbarkeit an Aktin-Untereinheiten für den Aufbau von Aktinfilamenten reguliert. Es ist bisher wenig untersucht, welchen Stellenwert die Bindung von ADF/Cofilin an G-Aktin in diesem Zusammenhang *in vivo* besitzt. Welche Auswirkungen ADF/Cofiline auf das Aktinzytoskelett haben können ist zudem stark abhängig von der Konzentration an F-, und G-Aktin sowie von der Konzentration von ADF/Cofilin selbst. So zeigten beispielsweise neuere *in vitro* Versuche, dass es nur bei niedrigen Konzentrationen von ADF/Cofilin zu Aktin überhaupt zu einem zerschneiden von Aktinfilamenten kommt (Andrianantoandro and Pollard, 2006), während hohe Konzentrationen von ADF/Cofilin einen gegenteiligen Effekt auf das Filament ausüben und es durch sehr starke Verdrehung eher stabilisieren als destabilisieren (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Da die Konzentration von ADF/Cofilin in den meisten Zellen zudem über dieser stabilisierenden mikromolaren Grenze liegt, wird

daher mittlerweile angenommen, dass *in vivo* weitere Aktin-Bindeproteine wie Aip1, Coronin oder Srv2/CAP, im Zusammenspiel mit ADF/Cofilin den Abbau von Aktinfilamenten vorantreiben (Lai et al., 2008), (Kueh et al., 2008), (Normoyle and Briher, 2012), (Winterhoff and Faix, 2015). So zeigen auch neuste Arbeiten, dass beispielsweise Aip-1 nicht, wie anfänglich angenommen, ein *barbed-end capping* Protein ist, sondern ein ADF/Cofilin-abhängiger Kofaktor, welcher den Cofilin bedingten Abbau von Aktin-Filamenten, trotz hoher Konzentrationen an Cofilin, um ein vielfaches beschleunigen kann (Nadkarni and Briher, 2014), (Chen et al., 2015) (Winterhoff and Faix, 2015). Diese Beispiele zeigen eindrucksvoll, dass trotz der über 30-jährigen Erforschung von ADF/Cofilinen, seit ihrer Entdeckung (Bamburg et al., 1980), (Nishida et al., 1984), noch immer grundsätzliche Fragen ihre Funktion betreffend offen sind. So ist insbesondere die Analyse der ADF/Cofilin Funktion im Zusammenhang mit neu entdeckten Bindungspartnern Gegenstand aktueller Forschungen.

1.3.3 Regulation von ADF/Cofilin

Die Bindung von ADF/Cofilin an Aktin kann auf verschiedene Weise reguliert werden. Zum einen können ADF/Cofiline über ihre Aktin-Bindedomäne an die Phospholipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) und Phosphatidylinositol-4-phosphate, binden, was ihre Aktin Bindungseigenschaften blockiert (Yonezawa et al., 1990), (Kusano et al., 1999). Ebenso übt der pH-Wert einen regulatorischen Effekt auf ADF/Cofilin aus. Während bei pH-Werten um 6,8 Aktinfilamente tendenziell stabilisiert werden, ist bei pH-Werten von 7,3 und höher ein Anstieg der Depolymerisation von F-Aktin durch ADF/Cofilin zu beobachten (Yonezawa et al., 1985), (dos Remedios et al., 2003). Dabei ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob diese Veränderung des pH-Wertes zu einer generellen Strukturveränderung von Aktin und/oder ADF/Cofilin führt. Ebenso wurde eine redoxabhängige Regulation von Cofilin beschrieben, bei der Cofilin in einem reduzierenden Milieu in seiner aktiven Form und unter oxidativen Bedingungen in einer inaktiven Form vorliegt (Samstag et al., 2013). Einer der wichtigsten und bisher am besten untersuchten Regulationsmöglichkeiten von ADF/Cofilin ist die in Abbildung 1.4 dargestellte Regulation über den Phosphorylierungszustand der Aminosäure Serin an der dritten Position in ADF/Cofilinen (Moriyama et al., 1996). Während die Phosphorylierung von Serin 3 durch verschiedene Kinasen wie LIM-1, LIM-2 oder TES-1, TES-2 zu einer Inaktivierung des Proteins führt, aktivieren die Phosphatasen Slingshot (SSH) und Chronophin Cofilin, indem sie den Phosphatrest am Serin 3 abspalten (Arber et al., 1998), (Yang et al., 1998), (Sumi et

al., 1999), (Toshima et al., 2001a), (Toshima et al., 2001b), (Niwa et al., 2002), (Gohla et al., 2005), (Huang et al., 2006). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung/Dephosphorylierung an Serin 3 dabei nicht zu einer Konformationsänderung im Protein führt, sondern die Affinität zu Aktin durch eine veränderte Ladungsdichte an der Aktin-Bindedomäne beeinflusst wird (Blanchoin et al., 2000). In Abbildung 1.4 ist die Funktionsweise von Cofilin sowie dessen Regulation durch Kinasen/Phosphatasen schematisch abgebildet.

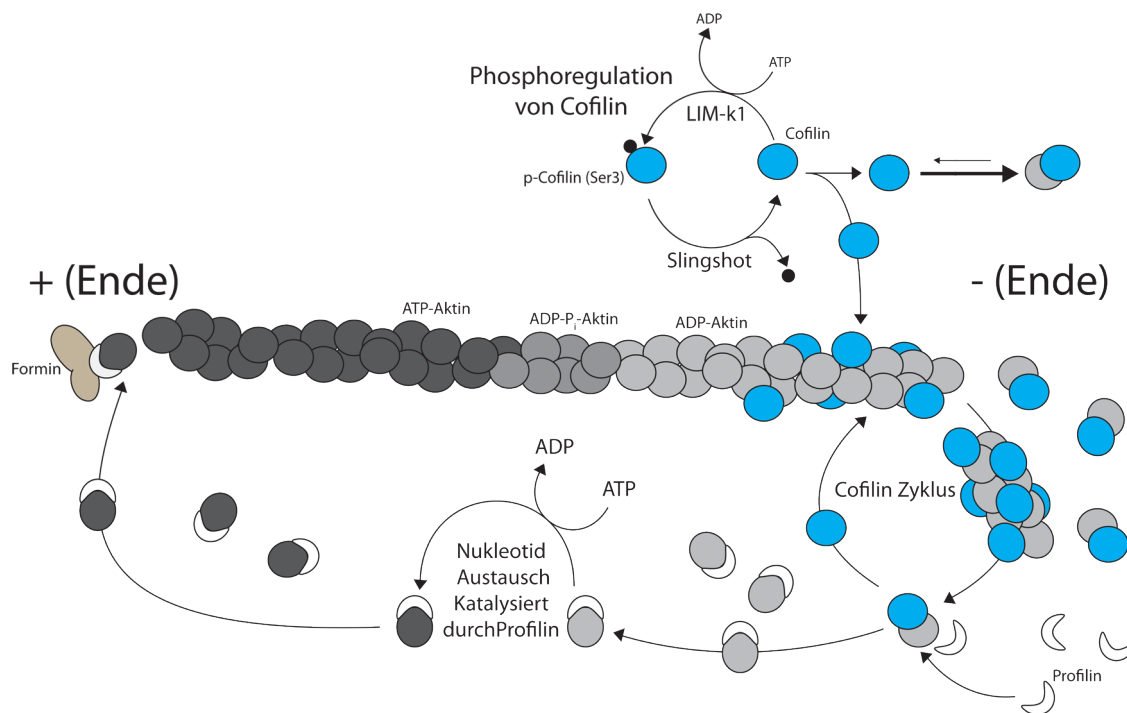


Abb. 1.4: Auswirkungen von ADF/Cofilin auf das Aktinzytoskelett sowie dessen Phosphoregulation am Serin 3. ADF/Cofilin (blau) bindet mit hoher Affinität an ADP-Aktin-Untereinheiten (hell grau) von F-Aktin und erhöht somit die Dissoziationsrate von Aktin-Monomeren am Minus-Ende der Filamente. Darüber hinaus kann ADF/Cofilin Aktin Filamente brechen, was neue Filament-Enden generiert, welche je nach den herrschenden Bedingungen weiter verkürzt oder wieder verlängert werden können. Die Aktivität von Cofilin wird durch Phosphorylierung des Serin 3 gesteuert, wobei die Kinasen LIM und TES, Serin 3 phosphorylieren, wodurch die Bindung zu Aktin inhibiert wird. Bei Dephosphorylierung des Serin 3 durch die Phosphatasen Slingshot oder Chronophin wird die Bindungsfähigkeit zu Aktin wieder hergestellt und folglich ADF/Cofilin aktiviert. Der Nucleotidaustausch der Aktin Monomere von ADP zu ATP wird durch das Protein Profilin (weiß) katalysiert, welches ADP-Aktin mit hoher Affinität bindet. Der Profilin-Aktin Komplex kann an weitere Proteine wie Formine (braun) binden, wodurch die Polymersiation von Aktin Filamenten differenzieller gesteuert werden kann.

1.3.4 Cofilin-1

Cofilin-1 wird im Gegensatz als ADF und Cofilin-2, außer in Muskeln, in allen Geweben und Zellen eines eukaryotischen Organismus exprimiert, wobei ADF und Cofilin-1 ähnliche Eigenschaften aufweisen, welche sich vornehmlich quantitativ unterscheiden. Während ADF

effizienter an Aktin-Monomere bindet, kann Cofilin-1 effizienter Aktinfilamente zerschneiden (Chen et al., 2004). Cofilin 2 hingegen hat schwächere F-Aktin Depolymerisierungseigenschaften als ADF und Cofilin 1 und begünstigt in Experimenten im Gleichgewichtszustand eher den Filamentaufbau als den Abbau (Nakashima et al., 2005), (Vartiainen et al., 2002b). Das ADF und Cofilin-1 überlappende Rollen in Zellen einnehmen können, wurde bereits eindrucksvoll anhand von siRNA Knockdown und “rescue“-Experimenten an NIH 3T3, B16F1 sowie an neuronalen 2A Zellen gezeigt. Hier konnte die Überexpression Cofilin-1 die Akkumulation von F-Aktin eines ADF-“Knockdowns“ retten und umgekehrt (Hotulainen et al., 2005). Demgegenüber konnte durch “Knockout“-Experimente “*in vivo*“ nachgewiesen werden, dass ADF und Cofilin-1 auch unterschiedliche Rollen im Organismus einnehmen. Während der “Knockout“ von Cofilin-1 in Mäusen zu einem embryonal letalen (E10) Phänotyp, aufgrund eines fehlerhaften Verschlusses des Neuralrohrs, führt (Gurniak et al., 2005), sind ADF “Knockout“-Mäuse lebensfähig und zeigen lediglich eine Hyperplasie der Cornea (Bellenchi et al., 2007).

Neben einer Vielzahl an Studien, welche die Rolle von Cofilin-1 in der Entwicklung bestimmter Organe wie Beispielweise dem Gehirn (Bellenchi et al., 2007) untersuchen, weisen erste “*in vitro*“-Untersuchungen auf eine essentielle Rolle von Cofilin in reifen T-Zellen hin. Untersuchungen von (Lee et al., 2000) konnten zeigen, dass die für die T-Zell Aktivierung notwendige Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts mit einer Dephosphorylierung von Cofilin-1 einhergeht und dass bei einer gestörten Regulation von Cofilin-1 keine Aktivierung von T-Zellen und somit auch keine T-Zell-abhängige Immunantwort stattfinden kann. Untersuchungen von (Samstag et al., 1994), (Samstag et al., 1996) haben gezeigt, dass in der Tumor T-Zelllinie Jurkat nach der Stimulation T-Zell-spezifischer Korezeptoren wie CD2, CD4 oder CD8 eine Aktivierung und infolgedessen eine Translokation von Cofilin-1 in den Zellkern stattfindet, deren Funktion bislang noch nicht aufgeklärt ist. Ebenfalls wurde in dieser Tumor Zelllinie eine spontane stimulations-unabhängige Aktivierung von Cofilin beschrieben (Samstag et al., 1994), welche darauf hindeutete, dass Cofilin in bestimmten Tumorzellen missreguliert wird. Demgegenüber liegt in ruhenden primären T-Zellen Cofilin-1 in seiner phosphorylierten Form inaktiv im Zytoplasma vor (Samstag et al., 1994). Daneben wurde Cofilin-1 auch im Rahmen der HIV-Infektion von T-Zellen als Zielprotein des Virus beschrieben. Der Studie zur Folge führt die Bindung des HI-Virus an den Chemokinrezeptor CXCR4 zu einer lokalen Aktivierung von Cofilin, wodurch das umliegende kortikale Aktinzytoskelett geschwächt wird und somit letztendlich der Eintritt des Virus in die Zelle erleichtert wird (Yoder et al., 2008). Ebenso

wurde eine erhöhte Expression von Cofilin-1 in HIV-infizierten humanen CD4 T-Zellen festgestellt (Wu et al., 2008). Erste Arbeiten von C.Gurniak und F.Jönsson deuteten im Vorfeld bereits auf eine Rolle von Cofilin-1 in der Entwicklung von T-Zellen hin und gaben den Anstoß, die Bedeutung von Cofilin-1 für die Entwicklung von T-Zellen eingehender zu untersuchen.

1.4 Profilin

Profilin wurde erstmalig 1977 als 15kDa großes Protein beschrieben, welches in einem 1:1 Komplex mit G-Aktin aus Kälber-Milz und -Thymus isoliert wurde (Carlsson et al., 1977). Es gehört somit zu einem der ersten überhaupt beschriebenen Aktin-bindenden Proteine. Der Umstand, dass Profilin *in vitro* die Polymerisation von Aktin verhindern konnte und es so in seinem pro-filamentösen Status hielt, war namensgebend für diese Proteinfamilie. Erst Jahre später wurde entdeckt, dass Profilin den Austausch von ADP zu ATP in monomeren Aktin Molekülen um das bis zu 1000-fache erhöhen kann, wodurch der zur Polymerisation verfügbare Pool an Aktin Monomeren signifikant vergrößert wird (Goldschmidt-Clermont et al., 1991a). Da ebenso gezeigt werden konnte, dass ATP-Aktin schneller und bei einer niedrigeren kritischen Konzentration polymerisiert als ADP-Aktin (Pollard, 1986), (Pollard and Cooper, 1986), führt der durch Profilin katalysierte Austausch von ADP in ATP zu einer starken Beschleunigung der Aktin Polymerisation. Darüber hinaus besitzt Profilin die Eigenschaft ATP-geladenes-Aktin an das Plus-Ende der Aktin-Filamente binden zu können (Pring et al., 1992), wo es nach Bindung an das Aktin Filament schnell dissoziiert, da seine Affinität zu F-Aktin im Vergleich zu G-Aktin um ein vielfaches geringer ausfällt (Gutsche-Perelroizen et al., 1999). *In vivo* nehmen Profiline daher wahrscheinlich eine doppelte Funktion ein. Zum einen können sie zusammen mit Proteinen wie Thymosin den zur Polymerisation zur Verfügung stehenden Pool an G-Aktin Molekülen regulieren. Insbesondere wenn die zur Polymerisation geeigneten Plus-Enden der Aktinfilamente durch Proteine wie CapZ blockiert sind wodurch ein Einbau von Aktin-Monomeren am Plus Ende verhindert wird (Pantaloni and Carlier, 1993a). Zum anderen können sie bei freien Plus-Enden ATP-Aktin Monomere direkt an die Plus-Enden der Aktinfilamente liefern und so den Aufbau von Filamenten stark beschleunigen (Kang et al., 1999). Neben ihrer Bindung an Aktin können Profiline mit einer Vielzahl anderer Proteine wechselwirken. Neben ihrer Interaktion mit Forminen, welche den gerichteten linearen Aufbau von Aktinfilamenten regulieren (Watanabe, 1997), (Kovar et al., 2006), interagieren Profiline auch mit Aktin Nukleatoren wie Mena/VASP (Reinhard et al., 1995), (Gertler et al., 1996), ARP2/3 (Mullins

et al., 1998a) oder den WAVE/WASP Proteinen (Miki et al., 1998), sowie mit einer Vielzahl weiterer Proteine (Witke, 2004). Dabei findet die Interaktionen mit Nicht-Aktin Proteinen in der Regel über ihre Poly-L-Prolin Bindedomäne statt, welche zunächst erst gar nicht mit der Bindung an andere Proteine assoziiert wurde (Lindberg et al., 1988). Mit VASP wurde erst einige Jahre später der erste Profilin-Bindungspartner beschrieben, welcher über diese Domäne an Profilin bindet (Reinhard et al., 1995). Über die Jahre ist die Anzahl an identifizierten Profilin-Bindungspartnern stark gewachsen und umfasst mittlerweile über 50 verschiedene Proteine zum Teil unterschiedlichster Natur (Witke, 2004). Neben den oben genannten Proteinen zählen beispielsweise auch Regulatoren der Endozytose wie Clathrin (Witke et al., 1998) oder nukleare Export-Rezeptoren wie Exportin (Stüven et al., 2003) zu den Bindungspartnern von Profilin. Da die Poly-L-Prolin Bindedomäne nicht mit der Aktin-Bindedomäne überlappt (Schutt et al., 1993), können Profiline gleichzeitig an Proteine wie Formine und an G-Aktin binden, wodurch Proteinkomplexe mit neuer Funktionalität entstehen können. Neben der Bindung an Poly-L-Prolin und Aktin können Profiline auch an die beiden Phospholipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) binden (Lassing and Lindberg, 1985), (Fedorov et al., 1994), (Chaudhary et al., 1998). Sowohl die Aktin- als auch die Poly-L-Prolin-Bindedomäne scheinen dabei mit der Bindedomäne für PIP_2 zu überlappen, so dass Aktin von Profilin nach Bindung an PIP_2 oder PIP_3 dissoziiert (Lassing and Lindberg, 1985), (Lu et al., 1996). Daneben konnte gezeigt werden, dass die Bindung zu PIP_2 auch die Bindung zu Poly-L-Prolin Liganden reguliert (Lambrechts et al., 1997). Jedoch scheint es auch Ausnahmen dieser Regel zu geben. So bleiben Mena und VASP beispielsweise an Profilin-2 auch nach Bindung an PIP_2 gebunden (Gareus et al., 2006). Interessanterweise reguliert PIP_2 nicht nur die Funktion von Profilin, sondern die Bindung von Profilin an PIP_2 schützt PIP_2 im Gegenzug auch vor der Hydrolyse durch Phospholipase-C- γ 1, wenn diese nicht phosphoryliert vorliegt (Goldschmidt-Clermont et al., 1990), (Machesky et al., 1990). Die Phosphorylierung der Phospholipase-C- γ 1 durch die epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptor Tyrosin Kinase jedoch überwindet diesen inhibitorischen Effekt, den Profilin auf PIP_2 ausübt (Goldschmidt-Clermont et al., 1991b). Diese Befunde sprechen für eine weitere Rolle von Profilin in der Signalweiterleitung von Rezeptor Thyrosin Kinasen.

1.4.2 Die Profilin-Proteinfamilie

Profiline sind evolutionär hoch konservierte Proteine und konnten bisher in allen eukaryotischen Organismen, wie Einzellern (Reichstein and Korn, 1979), Invertebraten

(Cooley et al., 1992), Vertebraten (Tanaka and Shibata, 1985) und Pflanzen (Valenta et al., 1993) nachgewiesen werden. In Säugetieren konnten bisher vier verschiedene Profiline identifiziert werden (Kwiatkowski and Bruns, 1988), (Honoré et al., 1993), (Hu et al., 2001), (Obermann et al., 2005). Während von Profilin-1, -3 und -4 jeweils nur eine Isoform in Säugetieren bekannt ist, wurden für Profilin-2, zwei verschiedene "Splice"-Formen (Profilin-2a und Profilin-2b) gefunden, von denen Profilin-2a die dominante Isoform darstellt (Di Nardo et al., 2000). Obwohl sich die vier Profiline in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, gibt es dennoch Unterschiede. So sind beispielsweise die Bindungseigenschaften von humanem Profilin-1 und -2 zu Poly-L-Prolin oder PIP₂ nahezu identisch, jedoch weist Profilin-1 eine bis zu 5-fach größere Affinität zu Aktin auf als Profilin-2 (Gieselmann et al., 1995). Neben unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften, variiert auch die Expression der Profiline in den unterschiedlichen Geweben voneinander. Während Profilin-1 in allen Geweben außer in Skelettmuskelzellen exprimiert wird (Witke et al., 1998), beschränkt sich die Expression von Profilin-3 und -4 auf die Hoden (Braun et al., 2002), (Obermann et al., 2005). Profilin-2 hingegen wird vermehrt im zentralen Nervensystem exprimiert, wurde aber ebenfalls im Thymus, Uterus, Darm, Milz und Niere nachgewiesen (Witke et al., 1998), (Witke et al., 2001). Die Tatsache, dass Profilin-1 und Profilin-2 besonders im zentralen Nervensystem ko-exprimiert werden, wirft die Frage auf, ob sie in den entsprechenden Zellen unterschiedliche Funktionen ausfüllen. In der Tat konnte bereits nachgewiesen werden, dass Profilin-1 und -2 mit einem unterschiedlichen Repertoire an Proteinen interagieren (Witke et al., 1998). Darüber hinaus führt der Verlust von Profilin-1 oder Profilin-2 zu unterschiedlichen Phänotypen. Während der Verlust von Profilin-1 zu einem frühen Defekt in der Embryonalentwicklung, und somit zur Letalität von Mäusen führt (Witke et al., 2001), sind Profilin-2 Knockout Mäuse lebensfähig, zeigen jedoch einen neuronalen Phänotyp, mit erhöhter Vesikel Exozytose in glutamatergen Neuronen (Pilo Boyle et al., 2007). Es ist daher anzunehmen, dass die unterschiedliche Profiline verschiedene Funktionen in Zellen einnehmen können.

Über die Funktion von Profilin in T-Zellen oder deren Entwicklung ist bisher nur sehr wenig bekannt. Profilin wurde in diesem Zusammenhang als Effektor-Protein im Rahmen des T-Zell Rezeptor Signalweges beschrieben (Billadeau and Burkhardt, 2006), (Billadeau et al., 2007) und ihm eine mögliche Rolle in der Formation der immunologischen Synapse zugeordnet (Dustin and Cooper, 2000). Diese Erkenntnisse basierten jedoch auf indirekten Schlussfolgerungen, welche auf der Lokalisation sowie Bindung von Profilin an andere Proteine beruhen. Untersuchungen, welche die Funktion von Profilin in T-Zellen direkt

adressieren, fehlten bisher. Um direkte Erkenntnisse über die Funktion von Profilin in T-Zellen und deren Entwicklung zu erhalten, wird im Rahmen dieser Arbeit Profilin-1 erstmalig über einen konditionalen “Knockout“ in der T-Zell-Entwicklung ausgeschaltet und die Auswirkungen in einem gewebespezifischen Kontext analysiert.

1.5 T-Zell Entwicklung

T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Da der Thymus der Ort der T-Zell Entwicklung ist, werden die sich entwickelnden T-Zellen im Thymus auch als Thymozyten bezeichnet. Im Allgemeinen dient der Thymus der Selektion von Thymozyten, wobei solche Thymozyten aussortiert werden, welche über keinen funktionellen T-Zell Rezeptor verfügen oder körpereigene Peptide erkennen und somit zu einer Autoimmunreaktion führen würden. Während ihrer Reifung durchlaufen die Thymozyten eine definierte Anzahl an gut dokumentierten Differenzierungsschritten, welche durch die Nachweisbarkeit bestimmter Oberflächenmoleküle auf den Thymozyten definiert werden. Dabei wird der Entwicklungsstand grob über die Expression der Oberflächenrezeptoren CD4 und CD8, welche MHC-spezifische Ko-Rezeptoren des T-Zell Rezeptors sind, definiert. Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark aus und gelangen über die Blutbahn in den Thymus, wo sie zunächst in die kortikalen Bereiche einwandern. Im Kortex exprimieren die Vorläuferzellen zunächst weder CD4 noch CD8, weshalb sie als doppelt negative (DN) Thymozyten bezeichnet werden. Im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung fangen die Thymozyten an sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren, weshalb sie in diesem Stadium auch als doppelt positive Thymozyten (DP) bezeichnet werden. Nachdem die doppelt positiven Thymozyten die Selektion für einen funktionstüchtigen T-Zell Rezeptor überstanden haben, reifen sie zu einzeln positiven Thymozyten heran, die entweder CD4- oder CD8-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und als Helfer-T-Zellen (CD4) oder zytotoxische T-Zellen (CD8) bezeichnet werden. Einzeln positive Thymozyten (SP) wandern für einen weiteren Selektionsschritt in die Medulla des Thymus ein (Anderson and Jenkinson, 2001) und von da in periphere Organe und die Blutbahn. Neben der Einteilung der Entwicklungsstadien über CD4 und CD8 wird das doppelt negative Stadium der T-Zell Entwicklung in 4 weitere Stadien unterteilt, welche durch die Expression der Oberflächenproteine CD25 und CD44 definiert werden (Godfrey et al., 1993), (Ceredig and Rolink, 2002). In Arbeiten von (Lind et al., 2001), (Porritt et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass sich die Thymozyten in bestimmten Entwicklungsstadien durch definierte Regionen des Thymus bewegen. Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern dabei an

der Grenze zwischen Kortex und Medulla in den Thymus ein. Im Anschluss migrieren die DN Thymozyten in die kortikalen Regionen des Thymus um nach einer ganzen Reihe von Entwicklungsschritten als einzeln positive Zellen in die Medulla des Thymus einzuwandern (Abb.1.5).

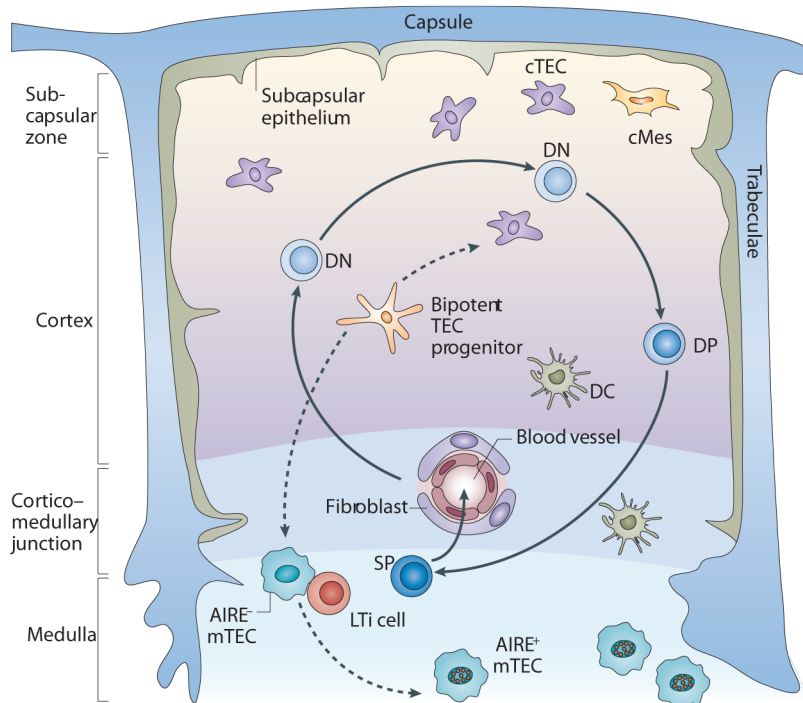


Abb. 1.5: Entwicklung der T-Zellen im Thymus. Die Architektur des Thymus besteht aus voneinander abgegrenzten kortikalen (Cortex) und medullären (Medulla) Bereichen, wobei jeder dieser Bereiche durch das Vorkommen epithelialer Bindegewebszellen sowie Thymozyten bestimmter Entwicklungsstadien, gekennzeichnet ist. Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern aus der Blutbahn an der Schnittstelle zwischen Cortex und Medulla ("cortico-medullary junction") in den Thymus ein. Im Anschluss migrieren diese zunächst doppelt negativen (DN) Thymozyten durch die kortikalen Areale hin zur Subcapsulären Zone des Thymus (subcapsular zone). Nach der Selektion des prä-T-Zell Rezeptors entwickeln sich

die Thymozyten weiter zu $CD4^+CD8^+$ doppelt positiven (DP) Zellen, welche sich im Cortex ansammeln. Nach erfolgreicher positiver Selektion entwickeln sich die DP thymozyten weiter zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ einzeln positiven (SP) Zellen, welche zielgerichtet in die medullären Bereiche des Thymus einwandern und nach erfolgter negativer Selektion den Thymus über die Blutbahn wieder verlassen. Neben T-Zellen entwickeln sich auch die kortikalen und medullären Epithelzellen (cTEC, mTEC) aus Epithelzellvorläufern um Thymus. Die Entwicklung der mTEC Zellen hängt dabei von *lymphoid tissue inducer* (LTi) Zellen ab, welche für die Differenzierung der für die Autoimmun-Regulation wichtigen AIRE⁺mTEC-Zellen mitverantwortlich sind. DC: Dendritische Zellen, cMes: cortical mesenchymale Zellen. Aus (Anderson et al., 2007).

Die drei wichtigsten Selektionsvorgänge, welche im Thymus erfolgen, sind die β -Selektion, die positive Selektion und die negative Selektion. Die β -Selektion findet zwischen dem DN3 und DN4 Entwicklungsstadium der Thymozyten statt, wobei doppelt negative Thymozyten, welche keine funktionstüchtige β -Kette des T-Zell Rezeptors auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch programmierten Zelltod aussortiert und an ihrer weiteren Entwicklung gehindert werden (von Boehmer et al., 1999). Die positive Selektion der Thymozyten findet nach der β -Selektion im doppelt positiven Entwicklungsstadium an den kortikalen Epithelzellen des Thymus statt, welche neben MHC-I Molekülen auch MHC-II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Bei der positiven Selektion bekommen diejenigen Thymozyten ein Signal zum Überleben, die mit ihrem T-Zell Rezeptor-Komplex MHC-I oder MHC-II Moleküle binden können, während Thymozyten, die nicht fähig sind eine Bindung einzugehen, durch Apoptose absterben (Jameson and Bevan, 1998), (Sebzda et al., 1999).

Thymozyten, die bei diesem Vorgang positiv für MHC-I selektioniert worden sind, stellen die Expression des Ko-Rezeptors CD4 ein und entwickeln sich zu CD8 einzeln positiven Thymozyten, wohingegen Thymozyten, die positiv für MHC-II selektioniert worden sind, die Expression von CD8 einstellen und zu CD4 einzeln positiven Thymozyten heranreifen. Im Anschluss an eine erfolgreiche positive Selektion wandern die Thymozyten zielgerichtet (Witt et al., 2005a), (Le Borgne et al., 2009) in die Medulla des Thymus ein, wo sie den letzten Selektionsschritt durchlaufen. Die negative Selektion der einzeln positiven Thymozyten findet an dendritischen Zellen in der Medulla des Thymus statt, die zum einen als ausdifferenzierte Zellen nach der Geburt in den Thymus einwandern und zum anderen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen direkt im Thymus gebildet werden (Le Borgne et al., 2009). Dendritische Zellen präsentieren „Selbst“ (körpereigene) Antigene über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, wobei diejenigen Thymozyten, welche mit zu hoher Affinität an diese MHC-Moleküle binden, eliminiert werden. Sinn der negativen Selektion ist es, Thymozyten, die potentiell autoreaktiv sein könnten auszuschalten (Anderson and Jenkinson, 2001). Thymozyten, die sowohl die positive als auch die negative Selektion durchlaufen haben, verlassen den Thymus als naive T-Zellen und beginnen ihre Wanderung zwischen Blut- und Lymphbahnen (Butcher and Picker, 1996). In Abbildung 1.6 ist die Expression bestimmter entwicklungspezifischer Marker für die T-Zell Entwicklung schematisch zusammengefasst.

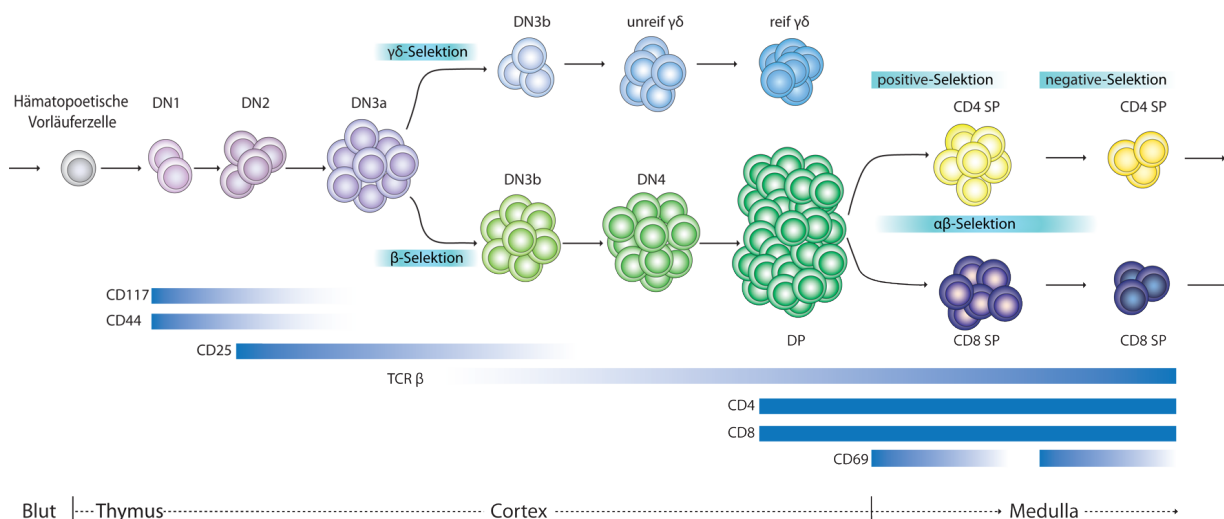


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der T-Zell Entwicklung im Thymus. Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark über das Blut in den Thymus ein und entwickeln sich zu doppelt negativen ($CD4^-CD8^-$) Thymozyten (DN), deren vier Stadien DN1-DN4 durch die unterschiedliche Expression von CD44, CD25 und CD117 definiert sind. Die weiteren Entwicklungsstadien sind durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD4, CD8 definiert. DP: doppelt positiv $CD4^+CD8^+$; DN: doppelt negativ $CD4^-CD8^-$. $CD8SP$: $CD4^-CD8^+$. $CD4SP$: $CD4^+CD8^-$. Darüber hinaus ist in das Schema der Expressionsbeginn von CD69 und der T-Zell Rezeptor β -Kette, sowie die Zeitpunkte der wichtigsten Selektionsschritte eingezeichnet. Im doppelt negativen Stadium der Entwicklung zweigt ein geringer Prozentsatz der Thymozyten vom „normalen“ Entwicklungsweg ab und entwickelt sich zu $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche einen anderen T-Zell-Rezeptor exprimieren und nicht durch die β -, positive- oder negative Selektion gehen. Verändert nach (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2010).

Innerhalb der ersten drei Wochen nach Verlassen des Thymus durchlaufen die T-Zellen, welche in diesem Stadium als “*recent thymic emigrants*“ bezeichnet werden, weitere Differenzierungsschritte, welche bisher jedoch noch wenig verstanden sind (Fink and Hendricks, 2011), (Fink, 2013). *Recent thymic emigrants* sind dabei durch eine hohe Expression von CD24 sowie niedrige Expression von Qa2 gekennzeichnet, während naive T-Zellen später CD24^{niedrig} und Qa2^{hoch} sind. Während die Rolle und Funktion von reifen T-Zellen für das Immunsystem gut charakterisiert ist, steht die Entwicklung der T-Zellen im Thymus steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

1.6 Die Maus als Modellorganismus

Da über 90 % der Gene des Menschen ähnliche Strukturen in der Maus besitzen und vergleichbare Funktionen ausüben, eignet sich die Maus als Modellorganismus zur Funktionsanalyse von Genen und zur Erforschung genetisch bedingter Krankheiten im gewebespezifischen Kontext. Vorteile der Maus gegenüber andern Säugetieren liegen in ihrer vergleichsweise einfachen Haltung, der kurzen Generationsdauer und der verhältnismäßig großen Anzahl an Nachkommen für ein Säugetier (Bradley et al., 1998).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Einige Untersuchungen zu Proteinen, welche indirekt die Regulation von Aktin beeinflussen zeigten eine essentielle Funktion dieser Proteine für die Entwicklung von T-Zellen. Beispielsweise führte der Verlust des Arp2/3 Regulators WASP zur begrenzten Entwicklung von T-Zellen (Zhang et al., 2002) und RAC-1 *Signaling* konnte als essentiell für positive und negative Selektion von Thymozyten identifiziert werden (Gomez et al., 2001). Da diese Proteine die Regulation des Aktin-Zytoskeletts indirekt steuern, sollten in dieser Arbeit mit Cofilin 1 und Profilin 1 zwei direkt an Aktin bindende Proteine in ihrer Funktion für die T-Zell Entwicklung untersucht werden. Während in diesem Zusammenhang die Funktion von Cofilin 1 im Rahmen der T-Zell Aktivierung bereits beschrieben werden konnte (Stradal et al., 2006), (Burkhardt et al., 2008), war über die Funktionen von Cofilin 1 und Profilin 1 während der Entwicklung dieser Zellen noch sehr wenig bekannt, was wohl auch in der embryonalen Letalität begründet lag welche sowohl der “Knockout“ von Cofilin-1 als auch der von Profilin-1 zeigen. Da die Entwicklung von T-Zellen in einem Gewebespezifischen Kontext betrachtet werden sollte wurden daher im Rahmen dieser Arbeit konditionale

“Knockout“ Mauslinien von Cofilin 1 und Profilin 1 verwendet, in denen die jeweilige Sequenz in einer frühen Phase der T-Zell Entwicklung im Thymus ausgeschaltet wird. Erste Erkenntnisse über die Auswirkungen der Deletion von Cofilin-1 durch die CD4cre Rekombinase wurden dabei bereits in im Rahmen der Diplomarbeit (Salz, 2011) gewonnen, und zeigten einen Entwicklungsblock in Thymozyten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Bestehenden Daten zum Entwicklungsdefizit in Cofilin 1 mutanten Thymozyten daher weiter vertieft und insbesondere in Bezug auf eine mögliche Ursache des Entwicklungsdefizits, durch funktionale Analysen erweitert werden. Darüber hinaus sollte erstmalig Profilin 1 über konditionalen “Knockout“ zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten im Thymus ausgeschaltet, und die Auswirkungen seiner Deletion detailliert analysiert werden.

2 Material

2.1 Lösungen, Puffer und Medien

Die unten aufgeführten Lösungen, Puffer und Medien werden, sofern nicht anders angegeben, mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser angesetzt und bei RT gelagert.

2.1.1 Allgemeine Lösungen

PBS ⁻ (pH 7,4) (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) (1x)	9,6 g Dulbecco's PBS Tabletten 133 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ <ul style="list-style-type: none"> • Mit einem Liter H₂O auffüllen, autoklavieren
PBS ⁻ (pH 7,4) (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei) (10x)	96 g Dulbecco's PBS <ul style="list-style-type: none"> • Mit einem Liter H₂O auffüllen, autoklavieren
4% Paraformaldehyd (PFA) (pH 7.2)	8g PFA In 180 ml MilliQ rühren <ul style="list-style-type: none"> • Der Lösung wird tropfenweise 1 M NaOH zugeführt bis sich diese klar verfärbt • Durchmischen bei 60°C • Nach Abkühlen der Lösung 20 ml 10xPBS zugeben • steril filtrieren • Aliquots bei -20°C lagern

2.1.2 Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

20x SSC (pH 7.0)	3 M NaCl 0.3 M Na ₃ Citrat
Denaturierungs-Puffer (Southern Blot)	0.5 M NaOH 0.7 M NaCl
DNS-Größenstandards	100 µl Größenstandard 100 µl Fermentas DNS-Lade-Puffer (1:6) 400 µl H ₂ O Lagerung bei 4°C
DNS-Ladepuffer (6x)	TE-Puffer 40% (w/v) Saccharose 0.5% (w/v) SDS 0.25% (w/v) Bromphenol blue
Hybridisierungs Puffer (Southern Blot)	1 % BSA 1 mM EDTA 0,5 M N ₂ HPO ₄ , pH7.2 7 % SDS
Laird-DNS Extraktions Puffer (pH 8)	100 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2 % (w/v) SDS vor Gebrauch Zugabe von 3 µl Proteinase-K-Lösung pro 400 µl
Neutralisierungs-Puffer (Southern Blot)	0,5 M Tris-HCl pH 7,0
Proteinase K (Stammlösung)	10 µg/µl Proteinase K in H ₂ O Lagerung bei -20°C
TAE (50x)	242 g Tris-Base 57.1 ml Essigsäure 100 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 Mit H ₂ O auf 1L auffüllen
TENT Puffer	20 mM Tris, pH 8.3 0.1 mM EDTA 1 % Tween® 20 0.2 % Triton®X-100

TENT-DNS Extraktions Puffer	10 ml TENT buffer 160 µl Proteinase K (Stammlösung) Lagerung bei -20°C
TE-Puffer (pH 8,0)	100 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA Autoklavieren
Wasch-Puffer (Southern Blot)	1 mM EDTA 40 mM N ₂ HPO ₄ , pH7.2 1 % SDS
Spermidin	0,01 M Spermidin in H ₂ O
DEPC H ₂ O	100 ml MilliQ H ₂ O 0,1 ml DEPC üN lösen Autoklavieren
Zytoplasmatischer-RNS-Extraktions Puffer	100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 5 mM EDTA 50 mM Tris/HCL (pH 7.4) 1% Triton X-100 40 u/ml RNaseOut (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
Tris/HCL pH7.4 (RNS)	Angesetzt mit DEPC H ₂ O
Phenol pH7,4	Angesetzt mit Tris/HCL pH7.4 (RNS)

2.1.3 Lösungen für die Proteinanalytik

F-/G-Aktin Separations Puffer	1% (v/v) Triton®X-100 in 1x PHEM
Antikörperlösung für den primären AB (Western Blot)	1:x Antikörper in WB-Blockierungslösung
Antikörperlösung für den sekundären AB (Western Blot)	1:x Antikörper 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x NCP- azid

Coomassie Brilliant Blue Färbelösungen	0.1% Coomassie Brilliant Blue 50% Methanol 10% Essigsäure in H ₂ O nach guter Durchmischung wird die Lösung gefiltert.
ECL	<u>Lösung A:</u> 200 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 4 ml Luminol Stammlösung 0.1 ml p-hydroxy-Coumarin Stammlösung Lagerung bei 4°C unter Lichtabschluss <u>Lösung B:</u> 200 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 0.2 ml H ₂ O ₂ (30-35% Stammlösung) Lagerung bei 4°C unter Lichtabschluss
Luminol (Stammlösung)	0.44 g Luminol in 10 ml DMSO Lagerung bei -20°C
NCP – azid , pH 8.0 (10x)	100 mM Tris/HCl 1.5 M NaCl 0.5% (v/v) Tween® 20
NCP + azid, pH 8.0 (10x)	100 mM Tris/HCl 1.5 M NaCl 0.5% (v/v) Tween® 20 2 g Natrium-azid (auf 1L)
PHEM (10x, pH 7.0)	600 mM PIPES 200 mM HEPES 100 mM EGTA 20 mM MgCl ₂
p-hydroxy-Coumarin (Stammlösung)	150 mg in 1 ml DMSO Lagerung bei -20°C
Schnell-Entfärber für Comassie	30% Isopropanol 6% Essigsäure in H ₂ O

SDS Proben-Puffer (5x)	110 mM Tris, pH6.8 20% (v/v) Glycerol 3.8% (w/v) SDS 8% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,01 % (v/v) Bromphenolblau in H ₂ O
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glyzin 1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Sammelgel (4 %) (für 7 Gele)	4.8 ml 30% Acrylamid 0.3 ml 10% SDS 17.4 ml H ₂ O 7.5 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 150 μ l 10% APS 30 μ l TEMED
SDS-PAGE Trenngel (15 %) (für 7 Gele)	25 ml 30 % Acrylamid 9.4 ml 2 M Tris-HCl, pH 8.8 0.5 ml 10% SDS 15 ml H ₂ O 240 μ l 10% APS 45 μ l TEMED
Towbin Transferpuffer (1x)	25 mM Tris/HCl, pH8.5 190 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol
WB-Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in NCP + azid (1x)

2.1.4 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

Ampizillin-Stammlösung (pH 7,4)	50 mg/ml Ampizillin Lagerung bei -20°C
LB ₀ -Agar (pH 7,4)	1,5 % (w/v) Agar in LB ₀ -Medium Autoklavieren

LB ₀ -Medium (pH 7,4)	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt Autoklavieren
LB _{AMP} -Agar (pH 7,4)	1,5 % (w/v) Agar in LB ₀ -Medium Autoklavieren auf 55°C abkühlen Zugabe von Ampizillin zu 50 µg/ml final
LB _{AMP} -Medium (pH 7,4)	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt Autoklavieren auf 55°C abkühlen Zugabe von Ampizillin zu 50 µg/ml final

2.1.5 Medien und Lösungen für die Kultur und Analyse von primären Thymozyten

MACS-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % (v/v) FCS in PBS Steril filtrieren
MACS-Puffer (FCS frei)	2 mM EDTA 1 % (w/v) BSA in PBS Steril filtrieren
RPMI-Mangel-Medium	RPMI-1640 ohne Phenolrot 10 mM HEPES (pH 7,2) 100 u/ml Penicillin/Streptomycin 0,5 % (v/v) BSA Steril filtrieren

RPMI-Voll-Medium	425 ml RPMI-1640 ohne Phenolrot 50 ml fetales Kälber Serum (FCS) 5 ml L-Glutamin (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100x) 5 ml Natrium Pyruvat (100x) 5 ml HEPES pH 7.2 (100x) Steril filtrieren
Permeabilisierung-Puffer	% (v/v) Triton®X-100 in PBS
Blockierungs-Puffer	0,1 % Fisch Gelatine in PBS
Wasch-Puffer	0,5 % (v/v) Tween® 20 in PBS
PMA	-
Ionomycin	-
Interleukin-7	Peprotech
SDF-1 α	Peprotech
CCL25	Peprotech
Laminin	Zellüberstand von A12 Zellen (Witke)

2.2 Kommerzielle Lösungen

2.2.1 Kommerzielle Lösungen für Nukleinsäure Analyse

'Random-hexamer'-Primer	Invitrogen
³² P dGTP	Perkin Elmer
AflII	NEB
dNTPs	Promega
EcoRI	NEB
Go-Taq-Polymerase	Promega
Klenow	NEB
MgCl ₂	Promega
Nco I	NEB
PCR-flexi-Puffer (5x)	Promega
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®	Quanta

qScript™ cDNA SuperMix Kit	Quanta
TaqMan Master Mix	Applied Biosystems™

2.2.2 Kommerzielle Lösungen für die Proteinanalytik

Bradford-Reagenz (5x)	BIO-RAD
Broad Range marker	BIO-RAD
SeeBlue Plus2 Prestained marker	Invitrogen

2.2.3 Kommerzielle Lösungen für die Gewebekultur

10X MEM Medium	Gibco
Collagen I, (aus Ratten Schwänzen)	Gibco
2-Mercaptoethanol	Sigma
DMEM Medium	Gibco
FCS (fetales Kälber Serum)	PAA
Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Biosciences
HEPES pH 7.2 (100x)	Gibco
L-Glutamin (100x)	Gibco
Natrium-pyruvat (100x)	Gibco
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Gibco
PBS ⁻ (Qualität: Gewebe Kultur)	Gibco
Penicillin/Streptomycin Antibiotika (100x)	Gibco
RPMI 1640 Medium	Gibco

2.3 Chemikalien (flüssig)

Acrylamid-Stammlösung (30%)	BIO-RAD
Bovine serum albumin (BSA), (10mg/ml)	New England Biolabs
Chloroform	Merck
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (Analyse)	Merck
Ethanol (technisch)	Merck
Ethidiumbromid (1% Lösung)	BIO-RAD
Film Entwicklerlösung G153	AGFA
Film Fixierlösung G354	AGFA
Fisch Gelatine	Sigma
Glycerol	Sigma
Histofix® (4% PFA)	Roth
Isopropanol	Merck
Methanol	VWR
NP-40	Sigma

Salzsäure (HCl) (37 %)	Merck
Stickstoff (flüssig)	German-Cryo
TEMED	Sigma
Triton-X-100	Roche
Tween-20	Sigma
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.4 Chemikalien (fest)

Agarose	AppliChem
APS	Fischer Scientific
Bovine serum albumin (BSA)	Merck
Bromphenolblau	BIO-RAD
Complete mini	Roche
Coomassie Brilliant Blue	BIO-RAD
EDTA	Sigma
Glucose	Merck
Glyzin	Grüssing
HEPES	Sigma
Luminol	Sigma
Magermilchpulver (fettfrei)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma
Moviol	Roth
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma
PBS ⁻	Sigma
PBS Tabletten	Sigma
p-hydroxy-Coumarin	Sigma
Proteinase-K	Sigma
SDS	Merck
Tris Base Ultra Quality	Roth
Ultrapure Agarose	Invitrogen

2.5 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)

Annexin V-FITC apoptosis detection Kit I	BD Pharmingen™
CyQuant™ Proliferations Kit	Thermo Fischer Scientific
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas
MACS T-cells isolation Kit (Pan-T)	Miltenyi
PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Invitrogen
Zell-Zyklus Analyse Kit	Accuri (jetzt BD)

2.6 Allgemeine Labormaterialien

2.6.1 Plastikware

Filter (Für Sterilisation von Medium; 0,2 μm \varnothing)	Millipore
Mikroreaktionsgefäße (0,25 ml)	Bioplastics
Mikroreaktionsgefäße (1.5 ml/ 2ml)	Eppendorf
Multiwell Platten (12 und 24 well)	Corning
Petrischalen (3cm, 10cm \varnothing)	Corning
Pipettierspitzen (mit Filter) (20 μl , 200 μl , 1000 μl)	ART
Pipettierspitzen (ohne Filter) (20 μl , 200 μl , 1000 μl)	Sarstedt
Plastikpipetten, steril(5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	BD Falcon
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Transwell [®] Permeable Supports (5 μm pore size \varnothing)	Corning
Zellkultur Flaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Corning
Petrischalen (3cm \varnothing Polystyrol) für Antikörper Bindung,	Greiner

2.6.2 Glasware

Deckgläser (\varnothing 18mm)	VWR
Erlenmeyerkolben	VWR
Glas Flaschen (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Brandt
Glaswolle	Roth
Objektträger geschliffen	VWR
Pasteurpipetten	VWR

2.6.3 Weitere Labormaterialien

Southern Blot Membran (Gene screen plus)	GE Healthcare
Bio Max XAR Film	Kodak
Immobilon-P transfer membrane PVDF	Millipore
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Whatman 3mm-Papier GB 002	VWR

2.7 Geräte

BZ-900 Biorevo Mikroskop	Keyence
CFX384 Touch™ Real-Time PCR Maschine	BIO-RAD
Cryostat	Laica
Durchflusszytometer Accuri C6	Accuri
Durchflusszytometer FACS-Aria	BD
ECL-Imager LAS Mini	GE Healthcare
Elektrophoresekammer (Nukleinsäuren)	European Molecular Biology Laboratory
Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260	Hoefer
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA
Feinwaage	Kern
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific
Heizblock	Grant/QBT
Hybridisierungsofen	-
Inkubatoren (Bakterienkultur, Gewebekultur)	Heraeus
Kolbenhubpipetten	Gilson
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikrowelle	-
NanoVue Spektralphotometer	GE Healthcare
Netzteil (für Elektrophoresekammer)	Pharmacia
Netzteil Power PAC 200	BioRad
Netzteil Power PAC300	BIO-RAD
Ofen	Heraeus
PCR-Maschine PTC-200	MJ Research
pH Messgerät, ph Level 2	InoLab
Pipettierhilfe Accu-jet®	Brandt
Schüttelvorrichtung (Bakterien Kultur)	New Brunswick Scientific
SDS-Gel Apparatur SE250	Pharmacia Biotech
Semi-dry Blotkammer	BIO-RAD
Sonnenrad	Stuart
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Szintillationszähler	Beckman
Ultraschallbad T 460	Transsonic
UV-Transilluminator	Herolab
UV-Transilluminator	Bachofer
UV-Transilluminator für Gel Dokumentation	Herolab
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	

Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Wasserbäder	GFL
Wippe Duomax 1030	Heidolph
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge J2-HS	Beckman
Zentrifuge J2-MC	Beckman

2.7.2 Durchflusszytometer Klassifikation und Zubehör

Durchflusszytometer Accuri C6		Accuri
Lasers	Detektor: Filter	
488nm	FL1: 533/30 nm	
640 nm	FL2: 585/40 nm	
	FL3: >670 nm	
	FL4: 675/25 nm	
Bacteriostatic Concentrate Solution (KR-220)		Accuri
Cleaning Concentrate Solution (KR-210)		Accuri
Decontamination Concentrate Solution (KR-205)		Accuri
Durchflusszytometer FACS-Aria		BD
Lasers	Filter	
375 nm	450/50 nm	
405 nm	510/50 nm	
488 nm	530/30 nm	
561 nm	610/20 nm	
633 nm	660/20 nm	
	670/30 nm	
	695/40 nm	
	710/50 nm	
	730/45 nm	
	780/60 nm	

2.8 Analyse Software

Software Name	Hersteller
CFlow Software	Accuri
CFX Manager™ Software	BIO-RAD
FlowJo®	Treestar
GraphPad Prism®	GraphPad Software
Illustrator Cs4	Adobe

Microsoft Excel	Microsoft
Multi Gauge	Fujifilm
Photoshop Cs5	Adobe
SigmaPlot®	Systat Software, Inc.

2.9 Verwendete Antikörper

2.9.1 Primärantikörper Western Blot

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Verdünnung	Quelle
7D10	ADF	monoklonal	Maus	WB: 1:5	AG Witke
Aktin C4	α -, β -, γ Aktin	polyklonal	Maus	WB: 1:1000	AG Witke
CapG	CapG	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000	AG Witke
FHU1	Cofilin 2	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:500	AG Witke
GAPDH	GAPDH	monoklonal	Maus	WB: 1:10.000	Calbiochem
Gelsolin	Gelsolin	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:5000	AG Witke
GFP	GFP	Monoklonal	Maus	WB: 1:2000	Clontech
KG40	Cofilin 1 Cofilin 2	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:500	AG Witke
KG60	Cofilin 1	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:500	AG Witke
P1T	Profilin 1	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000	AG Witke
P2(3003)	Profilin 2	polyklonal	Kaninchen	WB: 1:1000	AG Witke
p-Cof1	phospho-Cofilin (Ser3)	monoklonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling
Rat 4	Cofilin 1	polyklonal	Ratte	WB: 1:1000	AG Witke

2.9.2 Sekundärantikörper Western Blot

Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Markierung	Verdünnung	Quelle
Maus IgG	polyklonal	Ziege	Peroxidase	WB: 1:1000	Pierce
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Peroxidase	WB: 1:1000	Pierce
Ratte IgG	polyklonal	Ziege	Peroxidase	WB: 1:1000	Pierce

2.9.3 Antikörper für FACS-Analyse

Name	Antigen	Markierung	Verdünnung	Quelle
CD184-APC	CXCR4	APC	1:100	eBioscience
CD199-APC	CCR9	APC	1:100	eBioscience
CD19-APC	CD19	APC	1:100	BD Pharmingen™
CD19-PE	CD19	PE	1:100	BD Pharmingen™
CD19-PerCP	CD19	PerCP	1:100	Pharmingen™
CD25-PE	CD25	PE	1:100	Pharmingen™
CD2-FITC	CD2	FITC	1:100	BD
CD3-APC	CD3	APC	1:100	BD
CD44-APC	CD44	APC	1:100	BD Pharmingen™
CD4-FITC	CD4	FITC	1:100	eBioscience
CD4-PerCP	CD4	PerCP _e fluor710	1:200	eBioscience
CD69-PE	CD69	PE	1:100	Pharmingen™
CD8a-FITC	CD8a	FITC	1:100	Pharmingen™
CD8a-PE	CD8a	PE	1:100	eBioscience
CD8a-PerCP	CD8a	PerCP	1:100	BD
gamma/delta($\gamma\delta$)-PE	TCR $\gamma\delta$	PE	1:100	BD
TCR-APC	TCR β	APC	1:100	eBioscience
TCR-FITC	TCR β	FITC	1:100	eBioscience
TCR-PE	TCR β	PE	1:100	BD

2.9.4 Antikörper für Thymozyten Stimulation

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Konzentration	Quelle
Purified CD2	CD2 (Maus)	IgG2b _λ	Ratte	2μg/ml	eBioscience
Purified CD3 _e	CD3 _e (Maus)	IgG1 _κ	Hamster	2μg/ml	BD Pharmingen™
Purified CD28	CD28 (Maus)	IgG	syrischer Hamster	10μg/ml	eBioscience
Purified TCR _β	TCR _β (Maus)	IgG	armenischer Hamster	5μg/ml	eBioscience

2.9.5 Antikörper für Adhäsions-Versuche

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Konzentration	Quelle
Purified CD3 _e	CD3 _α	IgG1 _κ	Hamster	10μg/ml	BD Pharmingen™
Anti Human IgG	Fc _γ -IgG (Human)	IgG	Ziege	13μg/ml	dianova

2.9.6 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Verdünnung	Quelle
Purified anti mouse thymic medullary epithelium	Murine mTEC Zellen	IgM _κ	Ratte	1:100	BD Pharmingen™
Anti GFP	GFP	IgG	Huhn	1:200	Abcam

2.9.6 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Verdünnung	Quelle
Anti RatIgM DyLight594	Ratten IgM	IgG	Ziege	1:400	Abcam
Anti Chicken Alexa 488	Huhn IgG	IgG	Huhn	1:400	Abcam

2.10 Färbe Reagenzien

Name	Ziel	Markierung	Verdünnung	Quelle
7-Aminoactino- mycin D (7AAD)	DNA	/	1:100	BD Pharmingen™
Annexin V	Phosphatidyl- serin	FITC	1:20	BD Pharmingen™
DAPI	DNA	/	1:10.000	BD Pharmingen™
DNase I	G-Aktin	Alexa-594	1:444	Merck
DNase I	G-Aktin	Alexa-488	1:555	Merck
Eosin	Eosinophile Strukturen	/	0,05% in Et- OH	Sigma
Hämatoxilin	Basophile Strukturen	/	25% in H ₂ O	Merck
Hoechst 33342	DNA	/	1:10.000	BD Pharmingen™
Phalloidin	F-Aktin	TRITC	1:5000	Merck
Phalloidin	F-Aktin	Alexa-488	1:200	Merck
Phalloidin	F-Aktin	Alexa-680	1:200	Merck
Phalloidin	F-Aktin	Alexa-594	1:200	Merck
Propidiumiodid	DNA	/	1:100	BD Pharmingen™

2.11 Nukleinsäuren

2.11.1 Oligonukleotide für PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	PCR
Coinsma 3'	CGC TGG ACC AGA GCA CGC GGC ATC	
Coin1-5'a	CTG GAA GGG TTG TTA CAA CCC TGG	Cof1
cofNTS-3'a	CAT GAA GGT TCG CAA GTC CTC AAC	
546 Pfn1-flox1 for	TGG AGC GGA TCC AGC GAA GG	
547 Pfn1-flox1 rev	GTC CCC AGC AGT CGG GAC G	Pfn1
547 Pfn1-floxed rev	GGA CAC CAA CCT CAG CTG GC	
GFP-A	GGG AAT ACA GCC CGG GGA GC	GFP-act-Pfn1
GFP-B	CAT CGA GCT GAA GGG CAT CGA C	
Cre1	GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA	
Cre2	GTG GCA GAT GGC GCG GCA ACA CCA TT	CD4Cre
Gel+1	GTG GTG GAG CAC CCC GAA TT	
Gel+267	CTC AGT TCA GGT ATA TCC ATA CAG TT	
Lck-cre FWD	ATG GTG CCC AAG AAG AAG AG	dLCKCre
Lck-cre REV	CAG GTG CTG TTG GAT GGT CT	
Primer 686	TTT TGG AGG CAG GAA GCA CTT	
Primer 687	GAA GGA GCG GGA GAA ATG GAT A	RosX-WtXba-R26R
Primer 688	GAC ATC ATC AAG GAA ACC CTG GAC T	
Pfn1-HindIII-3'UTR-3'	CTC GAA GCT TGT CCC CAT CCT C	Pfn1 Sonde
Pfn1-NcoI-3'UTR-5'	GGT TTT GGC CAT GGG AAC AG	

2.11.2 TaqMan® Proben für qPCR

Name	Sequenz (5' → 3')	Markierung	Quelle
Pfn1	Sequenz wurde nicht zur Verfügung gestellt	FAM	Life Technologies
GAPDH	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG	VIC	Life Technologies

2.11.3 Rekombinante Plasmide

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Referenz
p1.0N ₆	pUC19 SmaI	1.0kbp NcoI genomisches Fragment von WT Cofilin-1, Ampizillin-Resistenzgen, MCS,	Christine Gurniak
λ phage ¹⁷⁻³⁻²	λ phage	Genomische DNA Sequenz von WT Profilin-1	Walter Witke

2.11.4 Hybridisierungssonden für Southern Blot

Zielregion	Beschreibung	Größe
Bereich der Cof-1 5' UTR Region	HindIII-BamHI-Fragment aus dem Vektor pUC19 SmaI_p1.0N ₆	500bp
Bereich der Pfn-1 Region 3' hinter dem Poly-A Signal	HindIII-NcoI-Fragment aus der Pfn1 Sonde PCR(Siehe 3.1.2.7)	785bp

2.12 Bakterienstämme

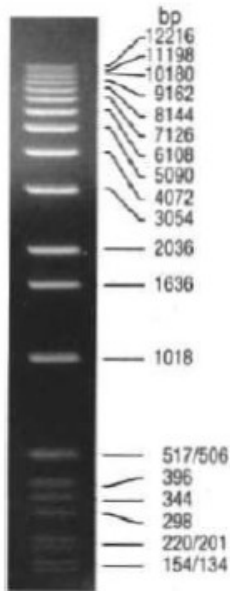
Bakterienstamm	Referenz
JM105	(de Taxis du Poët et al., 1987)

2.13 Mauslinien

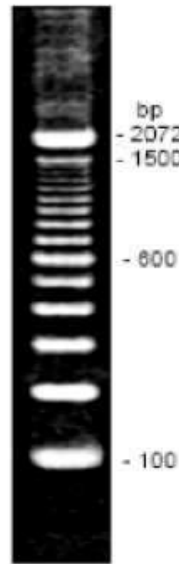
Stamm	Beschreibung	Referenz
C57BL/6	Inzuchtmausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen.	Charles River, eigene Zucht
Cof1 ^{flox/flox}	Transgene Mauslinie, in der die kodierende Region des zweiten Exons von Cofilin 1 von loxP-Stellen flankiert wird	(Gurniak et al., 2005)
CD4-Cre	Transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promotors exprimiert	(Wolfer et al., 2001)
Pfn1 ^{flox/flox}	Transgene Mauslinie, in der die kodierende Region des erste Exons von Profilin 1 von loxP-Stellen flankiert wird	(Böttcher et al., 2009)
huGE	Transgene Mauslinie, welche einen Knock-In Gen für ein GFP-Aktin Fusionsprotein im Profilin 1 Locus trägt. Im Manuskript als Pfn1 ^{GFP-Aktin/wt} bezeichnet.	(Gurniak and Witke, 2007)
distalLCK-Cre	Transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des distalen LCK Promotors exprimiert	(Zhang et al., 2005)
Rosa26 stop-YFP	Transgene Mauslinie, welche unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierenden Rosa26 Promotors für eine flox-stop-flox-eYFP Kasette kodiert, und somit der Überprüfung der Deletions-Effizienz der Cre-Rekombinase dienen kann.	(Srinivas et al., 2001)

2.14 Größenstandards

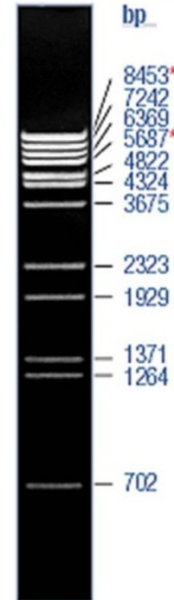
1 kbp DNS-Größenstandard
(Invitrogen)



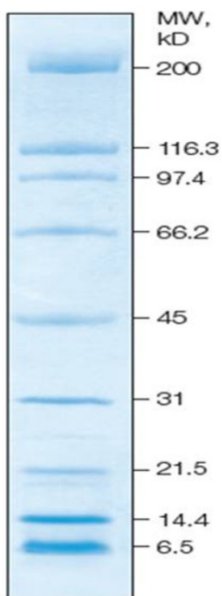
100 bp DNS-Größenstandard
(Invitrogen)



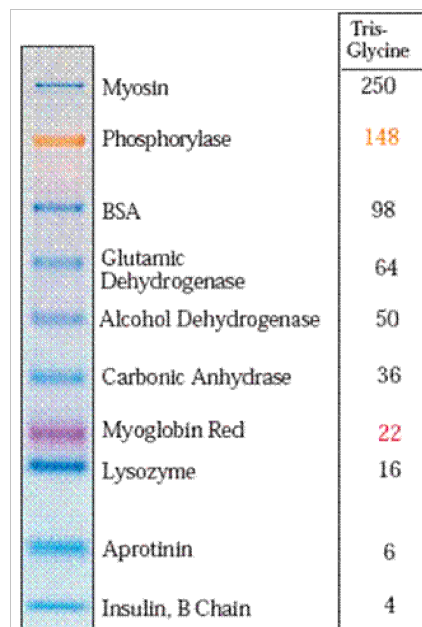
Lambda-BstEII
(Fermentas)



Proteinmarker
Broad Range Standard
(BIO-RAD, MW in kDa)



SeeBlue Plus2
Prestained Standard
(Invitrogen, MW in kDa)



3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction) ist eine weit etablierte Methode (Mullis and Faloona, 1987) zur gezielten, exponentiellen Vervielfältigung eines DNS-Abschnittes *in vitro*. Ermöglicht wird diese Methode durch eine hitzestabile DNS-Polymerase, die *Taq*-Polymerase, welche ursprünglich aus *thermus aquaticus*, einem thermophilen Arche-Bakterium, stammt. Bei hohen Temperaturen von 94-98°C wird DNS denaturiert, woraufhin zwei künstlich synthetisierte Oligonukleotid-Startermoleküle bei einer darauf folgenden Temperatur von 50-65°C gegenläufig an die komplementären DNS-Stränge binden können. Die Oligonukleotide bestehen meist aus 18-30 Basen und enthalten eine zu den Enden des zu amplifizierenden DNS-Fragmentes komplementäre Sequenz. Dabei leitet sich ein Startermolekül vom Sinnstrang (5'-3' upstream primer) und eins vom Gegensinnstrang (downstream primer) ab. Ausgehend von den 3'-OH-Enden dieser beiden Startermoleküle synthetisiert die *Taq*-Polymerase bei einem Temperaturoptimum von etwa 72°C nach Vorgabe der DNS-Matrizen neue komplementäre DNS-Stränge, die nach erneuter Denaturierung selbst als Matrize fungieren können. Dieser PCR-Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Synthese wird 35-40 fach wiederholt und führt zu einer exponentiellen Amplifikation der durch die Startermoleküle flankierten Sequenz.

3.1.2 Genotypisierungs-PCRs zur Charakterisierung transgener Mäuse

Um den Genotyp unterschiedlicher transgener Mäuse zu bestimmen, wurden 3-4 Wochen alten Tieren Schwanzbiopsien von etwa 2 mm Länge entnommen. Die Schwanzbiopsien wurden in 200µl TENT-Puffer bei 55°C verdaut. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben auf einem Vortex durchgemischt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht, um die im TENT-Puffer enthaltene Proteinase K zu inaktivieren. Im Anschluss wurden die Proben bei 13.200 upm für 10 min zentrifugiert und 1µl des Überstandes als DNS-Matrize in die jeweilige PCR Reaktion eingesetzt. Die verbleibende DNS wurde für die weitere Verwendung bei 4°C gelagert. Abschließend wurden die jeweiligen PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

3.1.2.1 Cof1-PCR

PCR zum Nachweis des geflochtenen Cof1-Allels (420 bp), des deletierten Cof1-Allels (170 bp) und des Cof1-WT-Allels (380 bp).

Reaktionsansatz für eine Probe (20ul)

4 µl	5x-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	Primer Coin1-5'a (5 pmol/µl)
0,5 µl	Primer Coinsma 3' (5 pmol/µl)
0,5 µl	Primer cofNTS-3'a (5 pmol/µl)
0,13 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
9,37 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS

PCR-Programm

[1]	94°C	2 min
	94°C	30 sec
[35]	58°C	30 sec
	68°C	40 sec
[1]	68°C	5 min
[1]	8 °C	∞

3.1.2.2 Pfn1-PCR

PCR zum Nachweis des geflochtenen Pfn1-Allels (340 bp), des deletierten Pfn1-Allels (700 bp) und des Pfn1-WT-Allels (242 bp).

Reaktionsansatz für eine Probe (20ul)

4 µl	5x-Puffer
1,3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
2,0 µl	Primer 546 (5 pmol/µl)
1,0 µl	Primer 547 (5 pmol/µl)
1,5 µl	Primer 548 (5 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
7,5 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS

PCR-Programm

[1]	98°C	2 min
	96°C	30 sec
[35]	58°C	60 sec
	72°C	30 sec
[1]	72°C	5 min
[1]	8 °C	∞

3.1.2.3 GFP-act-Pfn1-PCR

PCR zum Nachweis des Knock-Ins der GFP-Aktin Sequenz im Profilin-1 Lokus. (450bp)

Reaktionsansatz für eine Probe

4 µl	5x-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	Primer GFP-A (5 pmol/µl)
1,5 µl	Primer GFP-B (5 pmol/µl)
0,13 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
8,87 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS

PCR-Programm

[1]	94°C	2 min
	94°C	30 sec
[35]	55°C	40 sec
	72°C	40 sec
[1]	72°C	5 min
[1]	8 °C	∞

3.1.2.4 CD4Cre-PCR

PCR zum Nachweis des CD4-Cre-Rekombinase-Allels (600bp). Der Nachweis des Gelsolin Allels (264bp) dient der positiv Kontrolle der PCR, da bei CD4-Cre negativen Proben sonst nicht nachvollzogen werden könnte, ob die Reaktion erfolgreich stattgefunden hat.

Reaktionsansatz für eine Probe

4 µl	5x-Puffer
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	Primer Cre 1 (5 pmol/µl)
1,5 µl	Primer Cre 2 (5 pmol/µl)
1,5 µl	Primer Gel+1 (5 pmol/µl)
1,5 µl	Primer Gel+264 (5 pmol/µl)
0,13 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
6,1 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS

PCR-Programm

[1]	98°C	2 min
	98°C	30 sec
[35]	58°C	30 sec
	72°C	40 sec
[1]	72°C	5 min
[1]	15 °C	∞

3.1.2.5 dLCKCre –PCR

PCR zum Nachweis des dLCK-Cre-Rekombinase-Allels (300bp).

Reaktionsansatz für eine Probe

4 µl	5x-Puffer
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	Lck-cre FWD (5 pmol/µl)
1,5 µl	Lck-cre REV (5 pmol/µl)
0,13 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
9,17 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS

PCR-Programm

[1]	94°C	2 min
	94°C	30 sec
[35]	62°C	40 sec
	72°C	40 sec
[1]	72°C	5 min
[1]	8 °C	∞

3.1.2.6 RosX-WtXba-R26R–PCR

PCR zum Nachweis des Knock-Ins der flox-stop-flox-YFP-Sequenz (290bp) im Rosa26 Locus. Rosa26-WT-Allel (650bp). Diese PCR wird mit genomischer DNA durchgeführt, welche analog zum im Southern Blot beschriebenen Protokoll, aus Schwanzbiopsien, gewonnen wird.

Reaktionsansatz für eine Probe

5 µl	5x-Puffer
1,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,0 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,0 µl	Pmimer 686 (25 pmol/µl)
1,0 µl	Primer 687 (25 pmol/µl)
1,0 µl	Primer 688 (25pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
13,5 µl	ddH ₂ O
1 µl	DNS (einer 1/30 Verdünnung)

PCR-Programm

[1]	94°C	2 min
	94°C	30 sec
[35]	62°C	40 sec
	72°C	40 sec
[1]	72°C	5 min
[1]	8 °C	∞

3.1.2.7 Pfn1 Sonde-PCR

PCR zur Erstellung einer Southern Blot Sonde 3' des Poly-A des Profilin-1 Lokus. Als Template diente der λ Phage_{e17-3-2}, welcher die genomische Sequenz des WT Profilin-1 Lokus trägt. Das Amplikon beträgt 800bp und kann über HindIII und NcoI in den Vektor pAlterEx2#26 kloniert werden oder nach einem HindIII und NcoI Verdau mit anschließender Aufreinigung direkt als Southern Sonde verwendet werden.

Reaktionsansatz für eine Probe

4 μ l	5x-Puffer
1,5 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
1,5 μ l	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 μ l	Pfn1-HindIII-3'UTR-3' (5 pmol/ μ l)
1,5 μ l	Pfn1-NcoI-3'UTR-5' (5 pmol/ μ l)
0,13 μ l	Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
8,87 μ l	ddH ₂ O
1 μ l	DNS

PCR-Programm

[1]	94°C	2 min
	94°C	30 sec
[35]	55°C	40 sec
	72°C	45 sec
[1]	72°C	5 min

3.1.3 Isolierung genomischer DNS aus Schwanzbiopsien von Mäusen für die Southern Blot-Analyse

Zur Isolierung genomischer DNS aus Schwanzbiopsien von Mäusen wurden den ca. 5mm langen Schwanzbiopsien je 500 μ l Laird-Lysis-Puffer hinzugefügt und diese bei 55°C üN lysiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 10 min bei 13000 upm zentrifugiert, um unverdaute Geweberückstände sowie Haare und Knochen zu entfernen. Der Überstand wurde in einem frischen Reaktionsgefäß mit gleichem Volumen (500 μ l) Isopropanol überschichtet und die DNS durch mehrmaliges Invertieren auf einem Sonnenrad für 30 min präzipitiert. Die präzipitierte DNS wurde mit einer sauberen Pipettierspitze gefischt und durch mehrmaliges Eintauchen zunächst in 70% Ethanol, dann in 100% Ethanol, gewaschen und dann in einem frischen Reaktionsgefäß bei RT getrocknet. Die getrocknete DNA wurde je nach Größe des Pellets in 30-150 μ l TE-Puffer bei 37°C gelöst und für den Southern Blot weiter bearbeitet oder bei 4°C gelagert.

3.1.4 Isolierung genomischer DNS aus Zellsuspensionen von Mäusen für die Southern Blot-Analyse

Die Gewinnung genomischer DNS aus Zellsuspensionen erfolgte analog zu der Gewinnung genomischer DNS aus Schwanzbiopsien (Abs. 3.1.3). Nachdem die entsprechenden Zellen (Thymozyten oder Lymphozyten), wie in Abs. 3.3.2-3 beschrieben, aus der Maus isoliert und in RPMI-Voll-Medium auf Eis resuspendiert worden sind, wurden ca. 3×10^6 Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 upm pelletiert. Nach Entfernung überschüssiger Mediumreste wurden die Zellen in 50µl PBS resuspendiert und in 500µl Laird-Lysis-Puffer gegeben. Die weitere Behandlung erfolgte analog zu denen der Schwanzbiopsien.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der negativen Gesamtladung der DNS, welche auf die zwischen den Zuckerresten des Nukleinsäurerückrats liegenden Phosphatgruppen zurückzuführen ist, ist es möglich DNS Fragmente in einer Agarosematrix unter einem elektrischen Spannungsfeld in Abhängigkeit ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wurde je nach erwarteter Fragmentgröße der aufzutrennenden DNS eine Agarosekonzentration von 0,8-2% (w/v) gewählt. Die entsprechende Agarosemenge wurde durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und mit dem DNA Farbstoffe Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelträger gegossen, wobei ein spezieller Kamm für die Ausbildung von Taschen sorgt, in welche später die DNS eingebracht werden kann. Nach Erkalten des Gels wurden die Kämmen entfernt und das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet, woraufhin die mit Ladepuffer versehenen DNS-Proben in die Taschen pipettiert und bei einer Spannung von 30-90 V aufgetrennt werden konnten. Um die Größe der zu untersuchenden DNS Fragmente bestimmen zu können, wurde ein entsprechender Größenstandard mit aufgetragen, welcher DNS-Abschnitte definierter Größen enthält. Dadurch, dass der im Gel enthaltene Farbstoff Ethidiumbromid in doppelsträngiger Nukelinsäure interkaliert, konnte die DNS unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und somit ihre Größe dokumentiert werden.

3.1.6 Southern Blot-Analyse der verschiedenen Mauslinien.

Die Southern Blot-Analyse ermöglicht den Nachweis einer bestimmten Gensequenz in einem komplexen Gemisch aus DNS (Southern, 1975). Im Zusammenhang dieser Arbeit konnte der Southern Blot sowohl dazu benutzt werden den Genotyp der Versuchstiere in Bezug auf Cofilin 1 oder Profilin 1 zu untersuchen, als auch Aussagen über die Effizienz des konditionalen Knockouts durch die jeweiligen CRE-Rekombinasen treffen zu können. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNS der Versuchstiere isoliert (Abs. 3.1.3 und 3.1.4) und für Cofilin 1 enzymatisch mit EcoRI behandelt. Analog wurde ein enzymatischer Einzelverdau mit dem Enzym NcoI für die Analyse des Profilin 1 Gens durchgeführt. Die so entstandenen Fragmente bestimmter Größen wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese bei 20V üN in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem daneben liegenden Lineal auf einem UV-Transiluminator fotografiert. Dies hilft später bei der Abschätzung der Bandengrößen auf dem Film. Bevor die DNS auf eine Nylon-Membran übertragen wird, wurde die DNS durch einstündige Inkubation des Agarosegels in alkalischer Denaturierungslösung in Einzelstränge gespalten. Dies ist notwendig, damit später die radioaktive DNS-Sonde an die komplementären DNS-Sequenzen in der genomischen DNS binden kann. Im Anschluss erfolgte der Transfer der DNS auf eine ‚Gene screen plus‘-Membran üN. Am nächsten Tag erfolgte eine 10 minütige Inkubation in Neutralisierungspuffer und eine anschließende Trocknung der Membran für 30 min bei 80°C im Ofen. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde vorbereitet (Abs. 3.1.9) oder bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

3.1.7 Herstellung der DNS-Sonde für einen Cofilin1 Southern Blot

Für die Herstellung der DNS-Sonde wurden bereits zuvor mit dem Vektor pUC19 transformierte Bakterien des Stammes JM105 verwendet und, wie in Abschnitt 3.1.11 beschrieben, vervielfältigt. Diese Bakterien tragen das eingebrachte p1.0N₆ Plasmid (Christine Gurniak), in welchem ein 1,0 kbp großes NcoI Fragment aus dem 5'UTR Bereich des Maus Cofilin 1 Gens liegt.

Nach der Vermehrung der Bakterien wurde das Plasmid aus den Bakterien isoliert (Abs. 3.1.11) und in TE-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Menge sowie Reinheit des isolierten Plasmids wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung (Abs. 3.1.12) mittels eines UV-Photometers durchgeführt. Um die DNS-Sonde aus dem Plasmid zu extrahieren wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII sowie BamHI durchgeführt (Abs. 3.1.13). Die daraus resultierenden Fragmente sind durch

Agarosegel-Elektrophorese in einem 1% Agarosegel voneinander getrennt worden und das 500 bp große HindIII/BamHI-DNS Fragment wurde aus dem Gel eluiert (Abs. 3.1.14). Um die Konzentration der DNS nach der Elution zu erhöhen, wurde eine Natrium-Acetat Fällung der DNS durchgeführt. Dabei werden der in H₂O gelösten DNS 1/10 vol. 3M Na-Acetat und 2.5 Volumen absoluter Ethanol hinzugefügt. Im Anschluss wurde die DNS bei 20 minütiger

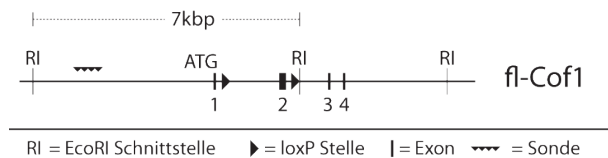


Abb. 3.1 Genomsiche Struktur des Cofilin 1 Gens mit loxP Stellen (*Cof1^{fl/fl}*), sowie der EcoRI Schnittstellen und der Position der Sonde.

Zentrifugation (13200 upm) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Ethanols wurde die DNS in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und ein 1µl Aliquot zur Überprüfung der Konzentration sowie Reinheit der DNS auf eine 1,5%

Agarosegel aufgetragen. Die weitere Behandlung der DNS wird im folgenden Abschnitt 3.1.9 beschrieben. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 3.1 die Position der Sonde sowie die Erkennungssequenzen der EcoRI Restriktionsendonuklease auf der genomischen DNS schematisch dargestellt.

3.1.8 Herstellung der DNS-Sonde für einen Profilin 1 Southern Blot

Um die DNS-Sonde für den Profilin 1 Southern Blot herzustellen, wurde DNS des λ Phagen17-3-2 verwendet, welche für ein Fragment des murinen WT Pofilin 1 Lokus trägt. Diese wurde als Template in die in (Abs. 3.1.2.7) beschriebene PCR Reaktion eingesetzt, um ein 800bp großes Amplikon zu amplifizieren, welches 3' des Poly A Signals des Profilin 1 Lokus liegt. Dieses wurde nach Abschluss der PCR einem Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII unterzogen (Abs. 3.1.13) und die Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese in einem 1% Agarosegel voneinander getrennt. Im Anschluss wurde das 785 bp große Fragment aus dem Gel eluiert (Abs. 3.1.14) und durch eine Natrium-Acetat Fällung (Abs. 3.1.7) dessen Konzentration erhöht. Zur Überprüfung der

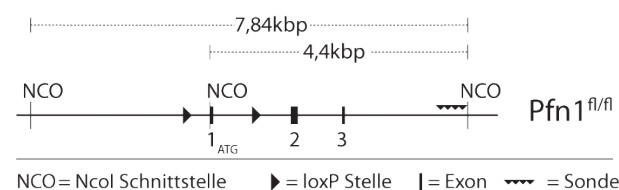


Abb. 3.2 Genomsiche Struktur des Profilin 1 Gens mit loxP Stellen (*Pfn1^{fl/fl}*), sowie der NcoI Schnittstellen und der Position der Sonde.

Konzentration sowie Reinheit der DNS wurde diese im Anschluss photometrisch untersucht und ein Teil auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Die weitere Behandlung der DNA wird im folgenden Abschnitt 3.1.9 beschrieben. Zum besseren Verständnis

sind in Abbildung 3.2 die Position der Sonde sowie die Erkennungssequenzen der NcoI Restriktionsendonuklease auf der genomischen DNS schematisch dargestellt.

3.1.9 Herstellung radioaktiver Sonden

Die Herstellung radioaktiver Sonden zur Detektion genomischer DNS wurde mit einer speziellen DNS Replikationsmethode durchgeführt. Dabei wurden etwa 50 ng des jeweiligen aufgereinigten DNS-Fragmentes in H₂O auf 10µl verdünnt und die DNS bei 95°C für 10 min denaturiert. Nach sofortiger Abkühlung auf Eis wurden dem Ansatz 10µl OLBs (Oligos ohne Guanin, random hexamer primer), 2µl BSA sowie 24µl H₂O hinzugefügt. Im Isotopenlabor wurden weiterhin 4µl radioaktives ³²PdGTP und 1µl Klenow-Enzym (Klenow and Henningsen 1970) hinzu geführt. Nach sicherem Verschluss des Reaktionsgefäßes wird die Reaktion gemischt und danach kurz abzentrifugiert. Die DNS-Synthese durch das Klenow-Enzym erfolgte bei RT über Nacht. Die Aufreinigung der radioaktiven Sonde erfolgte über eine Säule mit dem Kunstharz „Bio-GelP6 DG“ in TE-Puffer. Zur Herstellung der Säule wurde eine 1 ml Plastikspritze zugeschweißt und mit einer Kanüle (27G) ein kleines Loch gestochen. Dann füllt man die so präparierte Spritze mit etwas silikonisierter Glaswolle und dem Kunstharz. Die Spritze wird 2 min bei 1000 upm in einem 15 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert, so dass eine Säule mit dem Endvolumen von ca. 1000 µl entsteht. Im Isotopenlabor werden der Sonde 150µl Stopp-Puffer hinzugefügt und das Gemisch auf die Säule aufgetragen. Bei anschließender Zentrifugation (2 min, 1000 upm) wird die Sonde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen während die nicht verwendeten Nukleotide im Säulenmaterial verbleiben. In der folgenden Szintillationsmessung wird die Radioaktivität der Sonde überprüft. Die so gewonnene radioaktive Sonde wurde im Anschluss direkt in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt (Abs. 3.1.10)

3.1.10 Hybridisierung und Nachweis der radioaktiven DNS-Sonde

Um unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran zu vermeiden, wurde die Membran mit 65°C warmen Hybridisierungs-Puffer für ein paar Stunden im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Kurz vor Zugabe der radioaktiven Sonde wurde der Hybridisierungs-Puffer ausgetauscht und die Sonde für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Im Anschluss wurde die Sonde kurz zentrifugiert um das Kondenswasser aus dem Deckel zu sammeln und zu dem Hybridisierungs-Puffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen bei 65°C. Um nicht gebundene Sonden von der Membran zu entfernen wurde am Tag darauf der Hybridisierungspuffer abgegossen und die Membran 1x kurz mit

Wasch-Puffer und folgend 3-4 mal für je 25 min mit SB-Wasch-Puffer bei 65°C gewaschen. Die Anzahl der nötigen Waschküchläge richtet sich dabei nach der verbleibenden Rest-Radioaktivität auf der Membran. Der Nachweis der Sonde erfolgt durch die Ionisierung eines aufgelegten Röntgenfilms, welcher bei -80°C für mehrere Tage der Strahlung ausgesetzt wurde. Die niedrige Temperatur von -80°C erhöht dabei die Ionisierung des Röntgenfilms, da die Elektronen des radioaktiven ^{32}P dGTP bei dieser Temperatur länger brauchen, um in ihre Orbitale zurückzufallen.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Für die verschiedensten Fragestellungen ist eine Vervielfältigung manipulierter DNS notwendig. Diese Vervielfachung wird durch Transformation, d.h. Einführung von Fremd-DNS in Bakterien und späteres Wachstum der Bakterien erreicht.

Zu diesem Zweck wurden von einer Glycerolkultur mit dem Vektor p1.0N₆ transformierter Bakterien (Transformation: Christine Gurniak) des Stammes JM105 einige Bakterien auf LB_{AMP}-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C vermehrt. Zur weiteren Vervielfältigung wurden 50 ml LB_{AMP}-Medium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und üN in einem Schüttelinkubator bei 250 upm und 37°C inkubiert. Zur Isolation der rekombinanten DNS aus den Bakterien wurde das PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kit der Firma Invitrogen verwendet. Das Verfahren basiert auf Ionenaustausch-Chromatographie, wobei die negativen Phosphatgruppen der DNS mit positiv geladenen Gruppen des Säulenmaterials interagieren. Mit einem Puffer bestimmter Salzkonzentrationen kann die DNS schließlich über Konkurrenz wieder vom Säulenmaterial gelöst werden. Gegenüber anderen Verfahren, wie der alkalischen Mini-Präparation, eignet sich dieses Verfahren zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNS (100-200 µg) mit höherem Reinheitsgrad.

3.1.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren kann mit Hilfe von UV-Licht anhand ihrer Absorption bestimmt werden. Nukleinsäuren zeichnen sich durch eine maximale Absorption bei 260 nm aus, während Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Die Messung erfolgt mittels eines Photometers in Quarzküvetten oder am NanoVue Plus, wobei TE-Puffer oder H₂O (RNS) als Leerwert gegengemessen wird. Dabei entspricht eine Absorptionseinheit bei einem Strahlengang von 1 cm einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNS. Die Reinheit der Nukleinsäuren wird aus dem Quotienten der

Absorption von 260 nm /280 nm abgeleitet und sollte bei 1,8 - 2,0 liegen. Werte unter 1,8 weisen auf Verunreinigungen, z.B. durch Proteine, hin.

3.1.13 Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Diese erkennen spezifische, palindromische Nukleotidsequenzen zwischen 4-8 bp Länge innerhalb derer sie schneiden. Die Restriktionsendonukleasen werden nach den Herstellerangaben verwendet. Bei einer gleichzeitigen Verwendung von mehreren Enzymen muss darauf geachtet werden, dass die Pufferbedingungen der jeweiligen Enzyme miteinander kompatibel sind.

3.1.14 Elution von DNS aus Agarosegelen

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung der DNS Fragmente wurde die gewünschte Bande (500 bp für Cof1 Sonde und 785bp für die Pfn1 Sonde) unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die eigentliche Elution der DNS aus dem Agarosegel erfolgte durch ein Gelelutionskit der Firma Fermentas nach Herstellerangaben.

3.1.15 RNS Isolation

Um die mRNA Expressionslevel von Profilin 1 sowie von GFP-Aktin in GFP⁺ und GFP^{hohen} Thymozyten und T-Zell Populationen bestimmen zu können, wurde die zytoplasmatische RNS der Zellen isoliert und anschließend eine cDNS Synthesedurchgeführt. Der Gehalt an entsprechender mRNA wurde im Anschluss mittels quantitativer 'real time' PCR bestimmt.

3.1.15.1 Isolation von RNS aus murinen Zellen für qPCR

Um möglichst saubere mRNA, mit möglichst geringer Kontamination von genomischer DNS für quantitative real time PCR zu erhalten, wurde eine zytoplasmatische RNS Extraktionsmethode angewandt, in der vor der Gewinnung der RNS eine Separation der Zellkerne vom Zytoplasma erfolgte. Da es sich bei RNS um sehr sensible Moleküle handelt, die schnell durch ubiquitär vorkommende RNAsen abgebaut werden, wurden alle Schritte bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Zudem wurde immer mit gestopften Spitzen pipettiert und der Arbeitsplatz sowie die Arbeitsgeräte vorher mit DEPC H₂O gereinigt. Für die RNS Isolation wurden die entsprechenden T-Zellen zunächst entsprechend ihrem GFP Signal

durchflusszytometrisch in 4°C PBS (5% FCS) sortiert (3.3.8) und im Anschluss zweimal mit 4°C PBS gewaschen. Darauf folgend wurden je $1-1,5 \cdot 10^6$ T-Zellen bei 1000 upm zentrifugiert und mit 200µl zytoplasmatischem-RNS-Extraktions Puffer vermischt, woraufhin eine Inkubation von 10 min bei 4°C folgte, in der die Zellen, ohne Lyse des Zellkerns, lysiert wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 3200 upm in einer 'swingout' Zentrifuge, bei der das Zytoplasma von den noch intakten Zellkernen separiert wurde. Der Überstand wurde überführt und mit je 10µl Proteinase-K (finale Konzentration 0.5mg/ml) und 10µl 20% SDS (finale Konzentration 1%) versetzt und für drei Stunden oder üN bei 37°C verdaut, um alle im Zytoplasma enthaltenen RNAsen und andere Proteine zu inaktivieren. Am nächsten Tag erfolgte eine zweimalige Phenol/Chloroform Extraktion der RNS wobei dem Überstand je 150µl Phenol/Chloroform (1v/1v; pH des Phenols mit 100mM TrisHCl: pH 7,4) hinzugegeben und durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes alles gut miteinander vermischt wurde. Die Phenol/Chloroform Extraktion separiert Proteine (wie z.B. die hinzugegebene Proteinase-K) von Nukleinsäuren aufgrund von Phasentrennung. Proteine werden hierbei nach der Phasentrennung in der organischen Phenol/Chloroform Phase (untere Phase) angereichert und zudem durch Phenol denaturiert, wohingegen sich Nukleinsäuren wie DNS oder RNS in der wässrigen oberen Phase lösen. In der hier beschriebenen Methode wurde eine Phenol/Chloroform (1/1) Mischung verwendet, da das Chloroform mit seiner höheren Dichte von 1,47 eine klarere Trennung der wässrigen und organischen Phase bewirkt und somit einer Inversion beider Phasen entgegenwirkt. Nach der Mischung des Überstandes mit Phenol/Chloroform wurde diese für 10 Minuten bei 4000 upm mit einem 'swingout' Rotor zentrifugiert und die wässrige Phase (oben) zur erneuten Phenol/Chloroform Extraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden zwei Extraktionen nur mit Chloroform, analog zur Phenol/Chloroform Extraktion, durchgeführt, um Phenol Reste zu eliminieren. Folgend wurde die wässrige Phase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 10 µg Glycogen, 15 µl NaOAC (3M pH 5,4) und 2,5 Volumen EtOH gemischt und bei -80°C über Nacht die RNS ausgefällt. Am nächsten Tag wurde die RNS bei 16000 upm für 30 min pelletiert und in 40 µl H₂O gelöst. Um sicher zu gehen, dass trotz zytoplasmatischer Extraktion keine DNS mit auf gereinigt wird, wurde folgend ein DNS Verdau mit DNase durchgeführt. Hierfür wurde 5µl Puffer sowie 5µl RNase freie DNase hinzugegeben und für 45 min bei 37°C verdaut. Darauf folgend wurden der RNS 15µl NaOAC und 135µl H₂O hinzugegeben, diese zwei Mal über Phenol/Chloroform und zwei Chloroform Extraktion aufgereinigt und abschließend wieder bei -80°C mit 2,5 Volumen EtOH gefällt. Am nächsten

Tag wurde das RNS Pellet nach Zentrifugation in 11,5µl H₂O (Milli Q) aufgenommen und am Nano-View photometrisch auf Gehalt und Reinheit (260/280nm) hin vermessen.

3.1.15.2 cDNS Synthese

Da eine quantitative realtime PCR auf der Amplifikation von DNS basiert, muss im Vorfeld die RNS in cDNS (copy DNS) umgeschrieben werden, wofür das qScript™ cDNA SuperMix Kit verwendet wurde. Um in der qPCR eine Kontamination von DNS ausschließen zu können, wurde jede cDNS Synthese in Duplikaten mit (+RT) und ohne (-RT) reverse Transcripase durchgeführt (-RT wurde ohne Mix mit 10mM Tris/HCl pH8 durchgeführt). In die Reaktion wurden je 0,5µg RNS eingesetzt. Das Syntheseprogramm wurde in einer PCR Maschine mit folgenden Parametern durchgeführt: Annealing (engl.) 7 Min. 25°C, Synthese für 45 Min. 42°C und Denaturierung für 5 Min. bei 85°C. Folgend wurden von 5µl der cDNS, Verdünnungsreihen für die qPCR angefertigt und diese in selbige eingesetzt.

3.1.15.3 qPCR/RT-PCR

Die quantitative real time PCR basiert auf dem Prinzip der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Standard PCR, wobei nach jedem Amplifikationszyklus die Menge an DNS in der Reaktion über Fluoreszenz gemessen wird. Die eigentliche Bestimmung der Ausgangs-Menge an cDNS erfolgte relativ zur Menge an cDNS einer Kontrollgruppe und wurde erst nach Abschluss aller PCR Zyklen mathematisch bestimmt, indem die exponentielle Phase der jeweiligen PCR Reaktion bestimmt wurde, in der theoretisch kein Mangel an irgendeiner Komponente herrscht, die DNS pro Zyklus verdoppelt wird und die Fluoreszenz klar über der des Hintergrundes liegt. In dieser Arbeit wurden zur Ermittlung der Amplifikation zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Ermittlung der GFP-Aktin RNS bzw. cDNS wurde die SyberGreen Methode gewählt, da keine kommerziellen TaqMan Sonden für GFP zu diesem Zeitpunkt vorhanden waren. Syber Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der an die kleine Furche der DNS bindet und in gebundenem Zustand bei 495nm Anregung, Licht bei 520nm emittiert. Durch diese Methode wird jede doppelsträngige DNS markiert, weshalb diese Methode besonders anfällig für Verunreinigungen von genomischer DNS ist, welche über die Reaktionen ohne RT (-RT) ausgeschlossen werden müssen. Die zweite verwendete Methode benutzt die bereits erwähnten TaqMan Sonden, welche spezifisch für das jeweilige Amplikon sind und für Pfn1 und GAPDH verwendet wurden. Die verwendeten TaqMan Sonden sind sequenz-spezifisch und besitzen am jeweiligen 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende einen entsprechenden Quencher. Solange sich Farbstoff

und Quencher in unmittelbarer Nähe befinden, überträgt der Farbstoff bei Anregung seine Energie an den Quencher. Nach Bindung der TaqMan Sonde an die DNS wird diese bei der Strangsynthese durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase verdaut, wodurch der Quencher vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt wird und die entsprechende Fluoreszenz detektiert werden kann. Somit liefert die Detektion über TaqMan Sonden einen sequenz-spezifischen Fluoreszenz-Anstieg, welcher proportional zur amplifizierten DNS Menge ist. Darüber hinaus wurden die TaqMan Sonden GAPDH und Pfn1 in einem Multiplex Verfahren gleichzeitig in einer Reaktion verwendet, wobei beide Sonden Fluorochrome tragen, welche bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Somit war es möglich die Normalisierung auf das Referenz-Gen (GAPDH) in der jeweils gleichen Reaktionskammer durchzuführen, was aufgrund von möglichen Pipettierunterschieden zu einer höheren Messgenauigkeit beiträgt.

3.1.15.3.1 Pfn1 qPCR

qPCR zur Ermittlung der Effizienz der Pfn1 qPCR Reaktion durchgeführt mit Verdünnungsreihen der cDNS

Reaktionsansatz für eine Probe

5 µl	TaqMan Master Mix
0,5 µl	Sonde Pfn1-FAM
0,5 µl	H ₂ O
4 µl	cDNS (1:4)

PCR-Programm

[1]	96°C	10 min
	96°C	15 sec
	60°C	15 sec
[39]	72°C	15 sec
	Messung	

3.1.15.3.2 GAPDH qPCR

qPCR zur Ermittlung der Effizienz der GAPDH qPCR Reaktion durchgeführt mit Verdünnungsreihen der cDNS

Reaktionsansatz für eine Probe

5 µl	TaqMan Master Mix
0,5 µl	Sonde GAPDH-VIC
0,5 µl	H ₂ O
4 µl	cDNS (1:4)

PCR-Programm

[1]	96°C	10 min
	96°C	15 sec
	60°C	15 sec
[39]	72°C	15 sec
	Messung	

3.1.15.3.3 Pfn1+GAPDH qPCR

qPCR zur Ermittlung der Profilin 1 Expression in verschiedenen Pfn1^{GFPaktin/wt} Thymozyten und T-Zell Populationen. GAPDH fungiert hierbei als interne Lademengen-Kontrolle, auf die alle Proben später normalisiert wurden.

Reaktionsansatz für eine Probe

5 µl	TaqMan Master Mix
0,5 µl	Sonde Pnfl-FAM
0,5 µl	Sonde GAPDH-VIC
4 µl	cDNS (1:4)

PCR-Programm

[1]	96°C	10 min
	96°C	15 sec
	60°C	15 sec
[39]	72°C	15 sec
	Messung	

3.1.15.3.3 GFP qPCR

qPCR RT-PCR zur Ermittlung der GFP Expression in verschiedenen Pfn1^{GFPaktin/wt} Thymozyten und T-Zell Populationen. Die erwartete Amplikon Größe liegt bei 450 bp. Die Lademengen wurden durch eine unabhängige GAPDH qPCR RT-PCR validiert.

Reaktionsansatz für eine Probe

5 µl	SYBR Green Master Mix
0,5 µl	Primer GFP-A (5 pmol/µl)
0,5 µl	Primer GFP-B (5 pmol/µl)
4 µl	cDNS (1:4)

PCR-Programm

[1]	96°C	10 min
	96°C	15 sec
	60°C	15 sec
[39]	72°C	15 sec
	Messung	

3.1.15.4 Analyse von qPCR/RT-PCR Daten

Für die Analyse von qPCR/RT-PCR Daten steht eine Reihe von mathematischen Methoden zur Verfügung. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden mit der Pfaffl-Methode, einer modifizierten Form der $\Delta\Delta CT$ -Methode, quantifiziert. Bei der $\Delta\Delta CT$ -Methode handelt es sich um eine relative Quantifizierungs-Methode, welche die Menge des zu quantifizierenden Zielgens (C_T -Zielgen) in Relation zur Menge eines Referenzgens (C_T -Referenzgen) in jeder Probe einzeln bestimmt, um im Anschluss relative Expressionslevel unterschiedlicher Proben miteinander zu vergleichen.

$$1) \text{ Relative Expression} = 2^{(C_T\text{-Referenzgen} - C_T\text{-Zielgen})}$$

Dieser Schritt ist notwendig, da aufgrund der hohen Sensitivität der Methode bereits kleinste Lademengen-Unterschiede der cDNS in der PCR zu großen Abweichungen im Ergebnis führen können. Voraussetzungen hierfür sind zum einen, dass das verwendete Referenzgen (hier GAPDH) vom Genotyp unbeeinflusst sein muss. Zum anderen muss die Effizienz der PCR für das Referenz- und für das Zielgen ermittelt werden. Diese wurde durch Erstellung einer Standardkurve über eine Verdünnungsreihe [1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125] in Triplikaten ermittelt und lag für Pfn1 bei $E=0,886$ und GAPDH bei $E=0,889$. Bei der PCR mit GAPDH und Pfn1 in einer Reaktion betrug die Effizienz Pfn1: $E=0,9$ und GAPDH: $E=0,88$. Diese realen Effizienz-Werte liegen nahe an der optimalen Effizienz von $E=1,0$, bei der von einer Verdopplung der DNS nach jedem PCR Zyklus ausgegangen wird und erfüllen somit

die Analyse Voraussetzung, würden jedoch die Ergebnisse verfälschen, wenn Sie nicht mit einbezogen würden. Darum wurde nach Pfaffl-, die real bestimmte Effizienz mit einbezogen:

$$2) \text{ Relative Expression (Pfaffl)} = E_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{CT}(\text{Zielgen})} / E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta\text{CT}(\text{referenzgen})}$$

$$3) \text{ Relative Expression (Pfaffl)}^{\text{Probe1}} / \text{Relative Expression (Pfaffl)}^{\text{Probe2}}$$

3.2 Proteinanalytik

3.2.1 Proteinextraktion aus Geweben

Für die Extraktion von Proteinen aus Geweben wurden die betreffenden Organe direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. In Abhängigkeit von der Größe des Gewebes wurde diesem eine entsprechende Menge PEB-Puffer hinzugefügt und auf Eis mit einem Glas-Teflon Douncer homogenisiert. Im Anschluss wurde das Homogenisat in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 10000 upm und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration über einen Bradford-Assay bestimmt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Für Western Blot-Analysen wurde das Lysat mit 5x SDS-Proben-Puffer verdünnt (Endkonzentration 1x SDS) und einmalig für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die so behandelten Proteine wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert, vor Verwendung durchmischt und bei 4°C für 10 min bei 10000 upm zentrifugiert. Um ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Proben zu vermeiden, wurden die sich in SDS-Probenpuffer befindlichen Protein-Lysate aliquotiert.

3.2.2 Proteinextraktion aus primär Zellen

Um nach der FACS Analyse die Konzentration von Cofilin 1 in den untersuchten Zellen zu determinieren, wurde nach der Einzelzellsuspension der Zellen in RPMI-Voll-Medium ein Anteil in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 upm zentrifugiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in 20-80 μl PBS resuspendiert, 1/4Vol. 5x SDS hinzugefügt und für 10 min unter mehrmaligem Vortexen bei 95°C aufgeköcht. Die weitere Behandlung der Proben ist identisch mit der Behandlung der Gewebeproben nach SDS Zugabe (Abs. 3.2.1).

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen wurde die photometrische Methode nach Bradford angewendet. Die Methode basiert auf der Veränderung des Absorptionsspektrums,

des Triphenylmethan Farbstoffes Coomassie-Brillant-BlauG-250 von 465 nm zu 595 nm, wenn er in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe ausbildet (Bradford 1976). Eine Zunahme der Absorption bei 595 nm steht dabei in linearem Zusammenhang zur Proteinkonzentration in der Lösung. Um aus der gemessenen Absorption der Proben die Proteinkonzentration zu ermitteln, wurde im Vorfeld der Messung eine Eichreihe mit BSA-Proteinproben bekannter Konzentration aufgenommen.

3.2.4 Protein Konzentrationsbestimmung bei Gewebe-Lysaten

Nach dem Auftauen der Proteinlysate auf Eis wurden diese zunächst kurz gemischt und für 10 min bei 10000 upm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurden je 3µl des Lysates mit 97µl reinem H₂O gemischt. Unmittelbar vor der Messung wurden 900 µl Bradford Lösung (1/5 verdünnt) dazu gegeben und durch kurzes Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und bei 595 nm im Photometer gemessen. Um das Gerät auf einen Null-Wert zu eichen, wird im Vorfeld jeder Messreihe das Gerät mit einer Lösung bestehend aus 100 µl H₂O und 900 µl Bradford-Lösung geeicht. Die Proteinkonzentration der gemessenen Probe errechnet sich aus der gemessenen Absorption/Steigung der Eichgerade = µg/µl. Da 3 µl Lysat eingesetzt wurden, musste das Ergebnis noch durch 3 geteilt werden.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung bei Zell-Lysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten von Primär-Zellen erfolgte analog zur Methodik in Abschnitt 3.2.4. mit dem Unterschied, dass das Gerät im Vorfeld anders auf null geeicht worden ist. Da die Zell-Lysate bereits 1x SDS Probenpuffer enthielten, wurde das Gerät mit einer Lösung aus 3 µl 1x SDS, 97 µl H₂O und 900 µl Bradford-Reagenz auf einen Null-Wert geeicht. Die Proteinkonzentration wurde analog zu Abschnitt 3.2.4 basierend mit einer BSA-Eichreihe kalkuliert.

3.2.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und beruht auf der Wanderung von geladenen Proteinen im elektrischen Feld. Da Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzungen eine unterschiedliche Eigenladung aufweisen, werden sie mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. In diesem Puffer ist das Detergenz Natriumdodecylsulfat

(engl. Sodium Dodecyl Sulfate) enthalten. Dieses anionische Detergenz denaturiert einerseits die Proteine und bindet an die hydrophoben Gruppen der Proteine, so dass die Eigenladung der Proteine von der des Natriumdodecylsulfat maskiert wird. Da auch die Konformation der Proteine die Wanderung im Gel beeinflusst, ist im Puffer β -Mercaptoethanol enthalten, welches intramolekulare Disulfidbrücken reduziert und somit aufbricht. Zusammen mit dem 10 minütigen Aufkochen werden die Proteine somit denaturiert, linearisiert und ihre Ladung vom Natriumdodecylsulfat maskiert, so dass sie unabhängig von ihrer Eigenladung und Konformation ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können.

Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel besteht aus 2 Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung, welche sich in Porengröße und pH Wert unterscheiden. Im verwendeten Lauf-Puffer befinden sich Chlorid-Ionen und Glyzin, welche bei unterschiedlichen pH Werten unterschiedliche Laufeigenschaften aufweisen. Im Sammelgel mit einem pH Wert von 6,8 wandern die Chlorid-Ionen schneller als die SDS-Proteinkomplexe, die Glyzin Zwitter-Ionen langsamer. Durch diesen Sachverhalt entstehen ein erhöhter Spannungsgradient und eine Fokussierung der Proteine zwischen den zwei Ionen an der Grenze zum Trenngel. Im Trenngel mit einem pH Wert von 8,8 ist das Glyzin negativ geladen und überholt die Proteine, welche nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Diese Methode verbessert die Auflösung der Auftrennung erheblich (Laemli, 1970). Der Prozentsatz an Polyacrylamid im Trenngel richtet sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Für Cofilin 1 (20 kDa) und Profilin 1 mit einem Molekulargewicht von 15kDa wurden 15% Acrylamid-Gele verwendet. Die Gele wurden in einer selbstgebauten Gießvorrichtung, in der 7 Gele auf einmal hergestellt werden können, gegossen und nach Polymerisation in eine mit SDS-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Für Coomassie Gele wurden 5 μ g Protein pro Probe und 5 μ l 'Broad Range'-Marker als Größenstandard eingesetzt. Für weiterführende Western Blot-Analysen 10 μ g Protein pro Probe, sowie 5 μ l Sea Blue Plus 2 'Prestained'-Marker als Größenstandard verwendet. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 60 V verwendet, solange die Proteine im Sammelgel waren. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Volt-Zahl auf bis zu 100 V erhöht.

3.2.7 Coomassie Färbung von Protein-Gelen

Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau hat die Eigenschaft sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anzulagern und somit Proteine unspezifisch anzufärben. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die Coomassie Färbung von Protein-Gelen eine weit verbreitete Methode um

Proteinkonzentrationen im Gel abzuschätzen oder die Transfereffizienz nach einem Western Blot zu beurteilen. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 50 ng Protein pro Bande. In unserem Fall wurden die Protein-Gele entweder direkt im Anschluss an die SDS-PAGE oder nach dem Western Blot-Transfer für 30 Minuten in einer Coomassie Brilliant Blau Färbelösung bei RT gefärbt und danach für 90-120 min mit einer Schnell-Entfärbelösung bei RT auf einer Wippe inkubiert und so ungebundenes Coomassie wieder entfernt. Die Gele sind in H₂O gelagert und zur Dokumentation gescannt worden.

3.2.8 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrozellulose-Membran zu übertragen. Der Transfer der Proteine auf eine Membran erlaubt die spätere Detektion bestimmter Proteine durch spezifische Antikörper (Towbin et al., 1979). Hier wurde die Methode des elektrischen Transfers angewendet, bei welcher die Proteine aufgrund ihrer negativen Maskierung durch das SDS im elektrischen Feld zur Anode wandern und dabei auf eine Membran übertragen werden.

3.2.8.2 'Semi-dry' Blot

Für kleine Proteine wie Cofilin1 (20 kDa) oder Profilin1 (15kDa) wurde für den Western Blot die semi-dry Methode verwendet, welche für Proteine bis etwa 90 kDa angewendet werden kann. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 5 min in Towbin Transfer-Puffer inkubiert, während die verwendete PVDF Membran erst in Methanol aktiviert und dann ebenfalls für 5 min in Towbin Transfer-Puffer inkubiert wurde. Schließlich wurde der

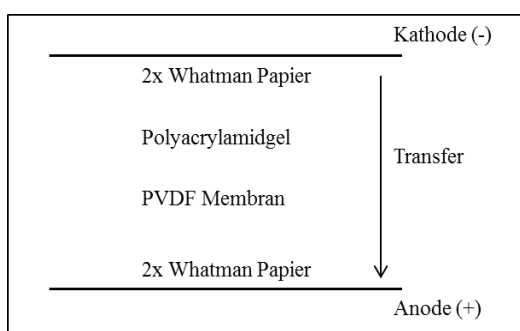


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Aufbaues eines semi-dry Western Blotes.

Transfer entsprechend der Abbildung 3.3 in der Blotkammer aufgebaut, wobei die Whatman Papiere vorher mit Towbin Transfer-Puffer angefeuchtet wurden. Der Proteintransfer erfolgte bei 20 V für 70 min bei RT. Nachfolgend wurde die Membran für 1-2 Stunden bei RT mit WB-Blockierungslösung behandelt und das Polyacrylamid-Gel einer Coomassie Färbung unterzogen.

3.2.8.3 'wet' Blot

Für Proteine mit einem Molekulargewicht von über 50 kDa wie das GFP-Aktin-Fusionsprotein (68,9kDa) wurde die 'wet' Blot Methode angewendet, da diese für größere Proteine einen gleichmäßigeren Transfer ermöglichen kann. Die Methode wird analog zur in 3.2.8.2 beschriebenen 'semi-dry' Methode durchgeführt, mit dem Unterschied, dass der Transfer in einer vollständig mit Towbin Transfer-Puffer gefüllten Kammer bei 100V für 1h und bei 4°C stattfinden.

3.2.9 Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL)

Für den Nachweis bestimmter Proteine auf der Membran wurden als erstes unspezifische Antikörperbindungsstellen mit WB-Blockierungslösung abgesättigt, um unerwünschte unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren (1-2 Std. RT oder üN bei 4°C). Daraufhin erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers in entsprechender Verdünnung (in 1x NCP/5% (w/v) Milchpulver), welcher gegen ein Epitop des zu untersuchenden Zielproteins gerichtet ist. Nach zweistündiger Inkubation des ersten Antikörpers wurde die Membran 3-5x für 10 min mit NCP-Puffer ohne Azid auf einer Wippe gewaschen, um nicht gebundenen Erst-Antikörper zu entfernen. Darauf folgte die Inkubation mit einem zweiten Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse Radish Peroxidase, HRP)-gekoppelten Antikörper für 1 Std. bei RT auf der Wippe. Dieser zweite Antikörper erkennt die Fc-Region des Erstantikörpers und bindet an diese. Nach 1 Std. Inkubationszeit wird der Blot wieder 5x 10 min mit NCP-Puffer ohne Azid auf einer Wippe gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der eigentliche Nachweis der gebundenen Antikörper und somit auch des Proteins erfolgt durch die Umsetzung des im ECL-Reagenz enthaltenen Wasserstoffperoxids durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, wobei Sauerstoff freigesetzt wird.

Der Sauerstoff führt zur Anregung des ebenfalls im ECL-Reagenz enthaltenen Luminols, welches in seinem angeregten Zustand eine Chemilumineszenz aussendet, die Mithilfe eines sehr sensitiven Photomultipliers (ECL-Imager LAS Mini) detektiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Membran im Anschluss vorsichtig mit H₂O abgespült und für 1 min mit einer frisch angesetzten ECL-Mixtur (1:1 aus ECL-Stocklösung A und B) inkubiert. Überschüssiges ECL wurde durch Abtropfen von der Membran entfernt und diese in eine lichtdurchlässige Klarsichtfolie eingeschlagen bevor sie in das Gerät inseriert wurde. Die durchschnittliche Belichtungszeit im Gerät betrug zwischen 5-60 Sekunden und richtete sich nach der Stärke des Signals. Die Blockierung der Membran bei Verwendung des gegen das

am Serin 3 phosphorylierte Cofilin gerichteten p-Cofil Antikörpers erfolgte nicht in 1x NCP/5% (w/v) Milchpulver, sondern in NCP mit 5% BSA. Ebenfalls wurde dieser Antikörper in NCP mit 5% BSA verdünnt, um unspezifische Signale durch das Milchpulver zu vermeiden.

3.2.10 Biochemische F-/G-Aktin Separation nach McRobbie

Um Aussagen über das genaue Verhältnis von F- zu G-Aktin in Zellen oder Geweben treffen zu können, wurde die auf Löslichkeit und Zentrifugation basierende Methode von (McRobbie and Newell, 1983) und (Pilo Boyle et al., 2007) in leicht abgewandelter Form verwendet. Die Methode basiert auf der Separation von Triton-X100-unlöslichem F-Aktin von löslichem G-Aktin, welches nach Ultra-Zentrifugation im Überstand zurück bleibt. In Kurzform: $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden nach ihrer Präparation auf Eis in 4°C PBS gewaschen, aufgenommen und mit 1 Vol. 2X PHEM Puffer mit 2% Triton-X100 versetzt und bei 4°C für 15 min inkubiert. Darauf folgte die Separation von F- und G-Aktin durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 70.000 upm. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5X SDS Probenpuffer versetzt. Das korrespondierende Pellet wurde durch vorsichtiges Pipettieren sowie mit Kapillaren von möglichen Überstandsresten gereinigt und in das gleiche Endvolumen SDS Probenpuffer aufgenommen wie der korrespondierende Überstand. Folgend wurden beide Fraktionen für 10 Minuten bei 95°C gekocht und im Anschluss mit Ultraschall behandelt, um sicher zu gehen, dass das zuvor unlösliche F-Aktin Pellet in Lösung geht und genomische DNS gesichert wird. Die Analyse der F- zu G-Aktin Relation erfolgte schließlich über SDS-PAGE indem jeweils gleiches Volumen von Pellet und Überstand aufgetragen wurden. Hierfür wurde der Proteingehalt der Pellet-Fraktionen über eine Bradford-Reaktion bestimmt und je 1µg Pellet-Fraktion mit entsprechend gleichem Volumen des korrespondierenden Überstandes aufgetragen.

3.3 Zell Biologie

3.3.1 Gewebekultur

Im Allgemeinen bietet die Gewebekultur die Möglichkeit der Kultivierung und Analyse von eukaryotischen Zellen unter definierten Bedingungen *in vitro*. Zu diesem Zweck wurden für einige Experimente dieser Arbeit primäre Thymozyten aus den Thymi von bis zu 3 Monate alten Mäusen isoliert und unter definierten, sterilen Bedingungen kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen in Gewebekultur wurden unter sterilen Bedingungen mit Gebrauch von steriler Plastik- und Glas-Ware unter einer Sterilbank durchgeführt. Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

3.3.2 Isolation von primären Thymozyten aus dem Thymus

Der Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von Cofilin 1 oder Profilin 1 in primären Thymozyten. Zu diesem Zweck wurde bei 1-3 Monate alten Mäusen eine Thymus-Dissektion vorgenommen. Um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden wurden alle dabei verwendeten Instrumente zuvor mit 70% Ethanol sterilisiert. Zur Vermeidung eines vorzeitigen Zelltodes durch Unterversorgung des Gewebes wurde der Thymus unmittelbar nach der Entfernung in 5 ml eisgekühltes RPMI-Medium gegeben. Für Experimente in der Gewebekultur erfolgten alle weiteren Schritte unter der Sterilbank, analog zu den Gewebekultur-unabhängigen Experimenten. Im Anschluss an die Dissektion wurde eine Einzelzell-Suspension der Thymozyten hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das Organ mit leichtem Druck zwischen den angeätzten Bereichen zweier steriler Objektträger in RPMI-Medium zerrieben, die Zellen durch anschließendes Auf- und Ab-Pipettieren vereinzelt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß übertragen. Um die Zell-Ausbeute zu erhöhen, wurde die Petrischale, in der das Organ aufgeschlossen wurde, mit 5 ml RPMI-Medium gespült und diese 5 ml der Suspension hinzu geführt. Die weitere Aufarbeitung der Zellen richtete sich nach der Art des jeweiligen Experiments.

Für anschließende Experimente in der Gewebekultur wurden die Zellen dann durch einen Filkon-Filter mit einem Porendurchmesser von 30µm filtriert um verbleibende Gewebestandteile abzuschneiden. Abschließend wurden das Filtrat für 10 min bei 4°C und maximal 1000 upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml frischem RPMI-Medium resuspendiert.

Bei direkter durchflusszytometrischer Analyse der Zellen wurden diese nach Erstellen der Einzelzell-Suspension in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 1000 Upm für 7 min bei 4°C pelletiert, das Medium entfernt und in 12 ml MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension über einen Filkon-Filter (30 µm) filtriert, um Gewebereste abzuscheiden. Folgend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und am Ende in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen.

3.3.3 Isolation von primären Lymphozyten aus Lymphknoten

Für die Untersuchung reifer T-Zellen wurden 1-3 Monate alten Mäusen die Lymphknoten aus der Achselregion (*Nodi lymphatici axillares*), der Leistengegend (*Lymphonodi inguinales*) und im Bereich des Halses (*Lymphonodi cervicales*) entnommen. Die darauf folgende Behandlung der Organe entsprach der beim Thymus angewandten Methodik.

3.3.4 Isolation von Immunzellen aus dem Blut

Für die Isolation von Leukozyten wurde 1-3 Monate alten Mäusen Blut aus der Vena cava entnommen und in 1 ml MACS-Puffer aufgefangen. Das im MACS-Puffer enthaltene EDTA verhindert dabei eine Gerinnung des Blutes, indem es die dafür nötigen Ca^{2+} Ionen komplexiert. Da der in den Erythrozyten enthaltene Blutfarbstoff Hämoglobin die weiterführende Analyse der Leukozyten beeinträchtigen würde, ist das Blut einer Blut-Zelllyse unterzogen worden. Dazu wurden den Zellen 500 µl RBC ('red blood cell')-Lyse-Puffer hinzugegeben und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Der RBC-Lyse-Puffer ist eine hypotonische Lösung mit bestimmter Konzentration an Osmolyten, so dass besonders die Erythrozyten durch Osmose zum Platzen gebracht werden. Da das Verfahren jedoch auch die Leukozyten in Mitleidenschaft zieht, sollte die Inkubationszeit im Lysepuffer nicht über 3-5 min betragen. Zum Abstoppen des Prozesses wurde 1 Volumen MACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen bei 1000 upm und 4°C zentrifugiert. Nach 5 min sollte sich ein weißes Zellpellet abgesetzt haben und der Puffer kristallrot sein. Wenn das Zellpellet zu diesem Zeitpunkt noch eine rote Färbung aufwies, wurde der Lyse-Prozess noch ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss wurde der rote Pufferüberstand entfernt und die Leukozyten in MACS-Puffer aufgenommen. (Puffermenge variierte in Abhängig der Pelletgröße)

3.3.5 Isolation von Knochenmark

Hämatopoetische Stammzellen wurden aus dem Knochenmark beider Ober- und Unterschenkelknochen (*Os femoris*, *Os tibialis*) von 1-3 Monate alten Mäusen gewonnen. Dazu wurden nach der Präparation die Knochenköpfe entfernt und das Knochenmark unter Verwendung einer Kanüle mit MACS-Puffer aus dem Hohlknochen herausgespült. Darauffolgend wurden die Zellen durch Auf- und Ab-Pipettieren in 10ml MACS-Puffer vereinzelt und durch einem 30 µm Filkon-Filter filtriert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei 1000 upm, 4°C pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert.

3.3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen und Partikeln in großem Maßstab ermöglicht.

Technisch werden dabei Zellen in einem Flüssigkeitsstrom in hohem Tempo an einem Laser vorbeigeschossen. Durch die nachgeschalteten Detektoren können so Informationen über Größe, Form/Struktur sowie Färbung der Zellen abgeleitet werden. Durch vorangegangene Färbungen der Zellen mit Fluorochromen (beispielsweise über Antikörper-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe) können Informationen über unterschiedliche Eigenschaften von Einzelzellen sowie über die Zusammensetzung von Zellpopulationen getroffen werden. Durch Verwendung mehrerer Laser sowie Detektoren mit entsprechenden Filtern ist somit eine Vielzahl von Parametern gleichzeitig zu erfassen. Die erhobenen Daten werden, anders als bei der Fluoreszenzmikroskopie, nicht in Form eines „Bildes“ sondern in Form eines Achsendiagramms durch einen mathematischen Algorithmus erhoben, wodurch sich das Verfahren besonders zur Analyse großer Zellzahlen eignet, jedoch eine geringes Auflösungsvermögen für strukturelle Analysen besitzt.

In dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, ein Durchflusszytometer mit 2 Lasern (488 nm/640 nm) und 4 Fluoreszenz-Detektoren (Filter: FL1 533/30 nm, FL2 585/40 nm, FL3 > 670 nm, FL4 675/25 nm) sowie einem FSC und einem SSC Detektor der Firma ACCURI verwendet. Um Messfehler durch Schwankungen in der Geräteperformance zu vermeiden, wurde das Gerät regelmäßig einem 'Performance Check' mit geeichten Mess-'Beads' unterzogen.

Durch den technischen Aufbau eines Durchflusszytometers kann es bei einer Mehrfachfärbung von Zellen zu falsch positiven Signalen kommen, wenn ein Fluorochrom

einen Emissionsbereich hat, der durch mehrere Detektoren gleichzeitig detektiert werden kann. Ist der Anteil an falsch positiven Signalen nicht zu groß, kann er mathematisch durch das Gerät kompensiert werden. Zu diesem Zweck wurden bei Mehrfachfärbungen immer Einzelfärbungen aller Antikörper sowie ungefärbte Zellen mitgemessen, anhand derer im Anschluss eine optimale Kompensation erstellt werden konnte.

3.3.7 Durchflusszytometrische Zell-Sortierung

Durch die durchflusszytometrische Zell-Sortierung können Zellen und andere Partikel aufgrund ihrer optischen Eigenschaften effizient voneinander getrennt und in einzelne Gruppen sortiert werden, um sie im Anschluss getrennt voneinander auf verschiedene Merkmale hin untersuchen zu können. Technisch findet, wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben, eine durchflusszytometrische Analyse statt, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der Messung durch ein starkes Magnetfeld aus dem Probenstrom gemäß der vorgegebenen Parameter, wie Größe, Granularität und Färbung, abgelenkt und somit in unterschiedliche Gefäße sortiert werden. Diese Methode hat den Vorteil eines sehr hohen Reinheitsgrades der entsprechenden Populationen, ist im Vergleich zu anderen Methoden wie MACS jedoch relativ Zeit- und Kosten-intensiv. Darüber hinaus muss darauf hingewiesen werden, dass eine anschließende Kultivierung der Zellen nicht immer möglich ist, da empfindliche Zelltypen wie Neuronen die Prozedur nicht ohne weiteres unbeschadet überstehen. Im Zuge dieser Arbeit wurde die durchflusszytometrische Zellsortierung verwendet, um sowohl aus unterschiedlich starken GFP-Aktin exprimierenden Thymozyten- und T-Zell-Populationen Protein und RNA gewinnen zu können, als auch um diese Populationen getrennt voneinander weiter zu kultivieren. Ebenfalls wurde die Methode verwendet, um die unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Thymozyten gemäß ihrer Expression von CD4 und CD8 zu sortieren und den Expressions-Level unterschiedlicher Proteine während der T-Zell Entwicklung über Western Blot nachverfolgen zu können.

3.3.8 Färbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff

Durch die Färbung von Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern können Proteine, wie beispielsweise Oberflächenrezeptoren einer Zelle, sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden die so gefärbten Zellen im Anschluss mit einem Durchflusszytometer analysiert.

Für die Färbung wurden je 100 μl (falls nicht anders angegeben) Zellsuspension (in gleicher Zellkonzentration, maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen) in MACS-Puffer mit einer entsprechenden Menge

Antikörper (Abs. 2.9.3) für 30 min auf Eis, im Dunkeln, inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von ca. 500 µl MACS-Puffer (4°C) abgestoppt und die Zellen bei 1000 upm, 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 300 µl MACS-Puffer gewaschen. Darauffolgend wurden die Zellen in 200-400 µl MACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.9 Fixierung von Zellen

Die Fixierung von Zellen erfolge durch 4% PFA. Hierzu wurden 300µl 4% PFA zu 100 µl Zellsuspension (in MACS-Puffer) gegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Zum Waschen wurde der Reaktion 700 µl PBS mit 0,5% Tween hinzugefügt, gemischt und für 10 min bei 1000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut mit 300 µl MACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 µl MACS-Puffer aufgenommen und entweder weiterbehandelt oder durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.10 Intrazelluläre Färbung von Thymozyten

Damit intrazelluläre Strukturen wie das Aktin-Zytoskelett mit nicht Membran gängigen Substanzen oder Antikörpern angefärbt werden können, muss die Plasmamembran der Zellen permeabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden eine jeweils gleiche Anzahl von Zellen im Vorfeld für 10 min mit 4% PFA fixiert, damit durch die folgende Permeabilisierung keine intrazellulären Bestandteile der Zelle ausgeschwemmt werden. Zur Permeabilisierung wurden die fixierten Zellen für 10 min mit 200 µl 0,1% Triton®X-100 in PBS behandelt. Dem folgend wurden die Zellen zweimal mit PBS mit 0,5% Tween gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 45-minütige Inkubation mit 1% Fisch-Gelatine abgesättigt. Daraufhin wurden die Zellen noch einmal mit MACS-Puffer gewaschen und in 100 µl MACS-Puffer mit Fluorochrom-gekoppelter DNaseI (G-Aktin) und Phalloidin (F-Aktin) 30 min auf Eis unter Lichtabschluss gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit 300 µl MACS-Puffer gewaschen und dann in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen, um im Durchflusszytometer analysiert zu werden.

3.3.11 Getrennte Kultur von Thymozyten nach Sortierung

Bei der getrennten Kultur von Thymozyten wurden Pfn1^{GFP-Aktin/wt} Thymozyten zuvor in die Populationen GFP⁺ und GFP^{hoch} durchflusszytometrisch sortiert und im Anschluss getrennt voneinander für 120 Stunden kultiviert. Hierfür wurden T-Zellen aus der Milz zunächst über

Ficoll-Gradient von Thrombozyten und toten Zellen getrennt und im Anschluss durch MACS (engl. Magnetic Activated Cell Sorting)(Pan-T; nach Herstellerangaben) aufgereinigt. Die Pan-T Aufreinigung erlaubt eine Aufreinigung von T-Zellen durch die Magnetische Markierung und Aussortierung anderer Nicht T-Zellen aus Lymphatischen Geweben, basierend auf einem Cocktail nicht T-Zell spezifischer Antikörper. Im Anschluss wurde ein kleiner Teil dieser Zellen mit Antikörpern gegen CD19 sowie CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Reinheit der T-Zellen untersucht. Der erreichte Reinheitsgrad lag bei >92%. Die restlichen T-Zellen wurden ungefärbt durchflusszytometrisch in die beiden GFP Populationen GFP⁺ und GFP^{hoch} sortiert und in Kultur genommen. Die relativ schonenden Voraufreinigungsschritte vor der Sortierung wurden unternommen, damit die Zielzellen (T-Zellen) nicht durch Antikörper (wie CD3 oder ähnliche) stimuliert werden und sich die Sortierungszeit am Gerät verkürzt, da das durchflusszytometrische Sortieren Stress auf lebende Zellen ausübt und die Dauer möglichst minimal gehalten werden sollte. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Voll-Medium dem 1ng/ml Interleukin-7 hinzugefügt wurde, bei 37°C und 5% CO₂. Interleukin-7 wird als Wachstumsfaktor für die Kultivierung von T-Zellen eingesetzt und ermöglicht eine längere in Kulturnahme der Primärzellen, welche ansonsten nach einigen Tagen in Kultur absterben. Für die Kultivierung wurden ~10⁶ Zellen der jeweiligen Population in 3ml Medium aufgenommen und in einer 6 Well-Kulturplatte kultiviert. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden je 150 µl Zellsuspension entnommen und durchflusszytometrisch auf ihre GFP Expression hin untersucht. Zeitpunkte: 0 Std., 20 Std., 44 Std., 67 Std., 96 Std., 120 Std. nach in Kulturnahme. Die Zeitpunkte wurden dabei absichtlich nicht in gleichen Zeitabständen gewählt, um einer möglichen Periodizität (einer oszillierenden Expression) entgegenzuwirken.

3.3.12 Knochenmark-Transplantation

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Knochenmarktransplantationsexperiment in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Linda Diehl durchgeführt, um die Populationsfähigkeit von Cofilin 1 konditionalen Knockout-Thymozyten in einem Wild Typ-Thymus zu untersuchen (Phee et al., 2010a). Zu diesem Zweck wurden aus Mäusen des Genotyps Cofilin1^{flox/flox} CD4-CRE^{wt/CRE} Profilin-GFP-Aktin^{wt/GFP} Knochenmarkzellen präpariert und über eine Schwanzvenen-Injektion in einen Tag zuvor bestrahlte (9 Gray) WT-C57/BL6 Tiere transplantiert. Spender- und Empfänger-Tiere waren gleich alt sowie vom gleichem Geschlecht(♀) und Maus-Stamm (C57/BL6). Um die Gefahr einer Transplantat-Wirt-Reaktion (engl. Graft-versus-Host-Reaktion) zu minimieren, wurden aus den

Knochenmarkzellen vor der Transplantation CD90 positive Zellen entfernt. Die Aussortierung erfolgte über MACS wobei 4×10^7 Zellen für 15 min mit 40 μ l CD90 'MicroBeads' im Kühlschrank bei 4°C inkubiert und im Anschluss über eine MACS-Säule aufgereinigt wurden. CD90 'MicroBeads' sind mit Magnetpartikeln gekoppelte Antikörper gegen den Cluster of Differentiation 90. Nach Bindung der Antikörper können die Zellen durch einen starken Magneten aussortiert werden, wobei CD90 negative Zellen von der Säule nicht gebunden werden können. Das CD90 oder Thy-1 Protein, ist ein auf T-Zellen und bestimmten Stammzellen vorkommendes Oberflächenprotein. Da reife T-Zellen aus dem Spender jedoch die Zellen des Rezipienten als fremd erkennen und angreifen würden, müssen diese vor der Transplantation entfernt werden, um eine Endzündungsreaktion im Empfänger zu minimieren.

Bei der Transplantation wurden die Zellen eines Spendertieres zu gleichen Teilen in 4 Empfängertiere transplantiert. Das Injektionsvolumen betrug dabei 200 μ l.

(Um einen Vergleich zur Re-Populationsfähigkeit in Abhängigkeit von Cofilin 1 zu haben, wurden neben der Transplantation von Zellen des Genotyps $Pfn1^{GFP-Aktin}Cof1^{fl/fl,CD4cre}$, mit der gleichen Methode Knochenmarkzellen des Genotyps $Pfn1^{GFP-Aktin}Cof1^{wt/wt}$ in WT-C57bl6 Mäuse transplantiert. Sollte der Phänotyp des Cofilin 1 Knockouts alleine von der Thymusarchitektur abhängen, würde man erwarten, dass sich Cofilin 1 Knockout Thymozyten im WT-Thymus zu CD4 und CD8 einzelpositiven Zellen entwickeln können. Sollten sich im Vergleich die transplantierten Kontrollzellen im Thymus zu einzelpositiven Thymozyten entwickeln können, die Cofilin 1 Knockout Thymozyten jedoch nicht, so wäre dies ein starker Hinweis auf einen Zell-internen Defekt der Knockout-Thymozyten.) Als Bestrahlungskontrolle wurde ein weiteres C57/BL6 WT Tier der gleichen Bestrahlung ausgesetzt, wie die Knochenmarks-Rezipienten, es erhielt jedoch keine Knochenmarktransplantation. Bei ausreichender Bestrahlung sollte das Tier nach wenigen Tagen an den Folgen der Bestrahlung sterben. Drei Wochen nach der Transplantation wurde allen Rezipienten Blut abgenommen und im Durchflusszytometer auf das Vorkommen von GFP-positiven Zellen hin untersucht.

Durch die Verwendung des GFP-Aktin Knockins (Gurniak and Witke, 2007) können die aus dem Donor stammenden Zellen leicht mit dem Durchflusszytometer von den Zellen des Rezipienten unterschieden werden. Bei erfolgreicher Rekonstitution des Knochenmarks durch die Spenderzellen sollte ein Großteil der neu gebildeten Zellen der hämatopoetischen Linie von den Spender-Stammzellen abstammen. (Durch vorangegangene Analysen wurde

sichergestellt, dass der Knockin des GFP-Aktin Gens keinen Einfluss auf die Thymozyten-Entwicklung hat.)

6 Wochen nach der Transplantation wurden aus je 2 der 4 Rezipienten jeweils Thymus, Lymphknoten, Knochenmark und Blut präpariert und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die Zellen zusätzlich zu ihrem GFP-Gehalt auf verschiedene Oberflächenmoleküle hin gefärbt, um mehr Informationen über verschiedene Zell-Populationen im Zusammenhang mit der Transplantation zu erhalten.

3.3.13 Apoptose-Analyse mit Annexin V

Um die Apoptose in verschiedenen Subpopulationen primärer Thymozyten zu untersuchen, wurde ein Annexin V-FITC 'apoptosis detection' Kit I der Firma BD Pharmingen™ nach Herstellerangaben verwendet. Die zugrunde liegende Methode basiert auf der Bindung des Annexin-V Proteins an Phosphatidylserin. Das Phospholipid Phosphatidylserin befindet sich in lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran, wird jedoch bei Einleitung der Apoptose auf die Außenseite der Membran transloziert. Durch Kopplung des Annexin-V an einen Fluoreszenzfarbstoff wie FITC kann somit, auf relativ einfache Weise, Apoptose durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Um die Auflösung des Experiments zu erhöhen, wurden die Zellen darüber hinaus mit weiteren Antikörpern (CD4, CD8) gefärbt, so dass der Apoptose-Status in den verschiedenen Thymozyten-Subpopulationen untersucht werden konnte.

3.3.14 Apoptose-Analyse mit Caspase3

Um die Ergebnisse, die über Annexin-V Färbung ermittelt worden sind, zu bestätigen, wurde eine zweite Methode der Apoptose-Messung durchgeführt, welche auf dem intrazellulären Nachweis aktiver Caspase-3 beruht. Aktive Caspase 3 ist Teil der Apoptose induzierenden Caspasen-Kaskade und spaltet unter anderem PARP (Poly-(ADP-ribose)Polymerase-1 und Protein Kinase C (Slee et al., 1999), (Woo et al., 1998). Zu diesem Zweck wurde eine intrazelluläre Färbung von mit PFA fixierten Thymozyten mit primären monoklonalen Antikörpern gegen aktive Caspase 3 durchgeführt, welche in einem zweiten Schritt von Alexa-488 gebundenen sekundären Antikörpern detektiert wurden. Die Messung erfolgte analog zu 3.3.13 durchflusszytometrisch. Die Färbung der CD4 und CD8 Ko-Rezeptoren erfolgte vor der Fixierung der Zellen durch PFA, da diese Antikörper fixierte Epitope nicht mehr effizient erkennen. Um eine unspezifische Bindung der Sekundäantikörper

auszuschließen, wurden Sekundärantikörper-Kontrollen durchgeführt, in denen kein primärer Antikörper gegen aktive Caspase 3 hinzugegeben wurde.

3.3.15 Zell Zyklus-Analyse

Um den Zellzyklus von Thymozyten zu analysieren wurde das Zell-Zyklus Kit der Firma Accuri (jetzt BD) unter Verwendung der Herstellerangaben verwendet. Das Kit basiert auf der Messung des DNS Gehaltes der Zellen mit dem Farbstoff PI, welcher unspezifisch an Nukleinsäuren bindet und nach Anregung bei 488nm bei einer Wellenlänge von 562-588nm detektiert werden kann. Da PI unspezifisch an Nukleinsäuren bindet, beinhaltet das Protokoll einen RNS Verdau mit RNase A, um falsche Signale durch RNS auszuschließen. Nach der Durchführung wurde der DNS Gehalt jeder einzelnen Zelle durchflusszytometrisch gemessen und ihre Zellzyklus-Phase bestimmt.

3.3.16 Proliferations-Analyse

Um die Proliferation von Thymozyten in Kultur zu untersuchen, wurde das CyQuant™ Kit der Firma Thermo Fischer Scientific benutzt, welches ebenfalls auf der Messung des DNS-Gehalts basiert. Hierzu wurden je $5 \cdot 10^4$ Zellen, in 96 Well-Kulturschalen, für 0, 24, 48 und 72 Stunden mit und ohne 10 ng/ml PMA und 400 nM Ionomycin in RPMI-Voll-Medium bei 37°C und 5%CO₂, in je vierfacher Ausführung, kultiviert. PMA ist ein DAG Analogon und aktiviert die Proteinkinase C, wohingegen Ionomycin den Einstrom des ‘second messengers’ Ca²⁺ ins Zytoplasma ermöglicht. Zusammengenommen führt dies zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen, indem ein erhöhter Ca²⁺ Spiegel unter anderem über Calcineurin zu einer Aktivierung von NFAT führt, was wiederum die Produktion von IL-2 führt und somit Proliferation bewirkt. Nach Kultivierung der Zellen wurden diese in der Kulturplatte zentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen bei -80°C schockgefroren, um den Zugang des Farbstoffes CyQuant™ zur DNS zu ermöglichen. Folgend wurden die DNS der Zellen mit CyQuant™ angefärbt und die Zellzahl in einem Plattenlesegerät über die Fluoreszenz-Stärke ermittelt. Dabei ist die gemessene Fluoreszenz-Stärke direkt proportional zur Anzahl der sich im Kompartiment befindlichen Zellen. Dies wurde durch eine Kalibrierungsreihe bestätigt, in der jeweils definierte Zellzahlen in einer 96 Well-Kulturplatte ohne Kultivierung quantifiziert wurden. Da die Ausgangsmenge an Zellen in jedem Well die gleiche war, wurden die Fluoreszenz-Werte auf den nicht stimulierten Ausgangswert (=100%) normalisiert.

3.3.17 Rezeptor Re-Expressions-Analyse

Um den Rezeptor ‘turnover’ von Proteinen an Zelloberflächen zu analysieren, gibt es verschiedene Methoden, die angewandt werden können. Hier wurde die Methode der Rezeptor Re-Expressions-Analyse verwendet, welche von (Ohoka et al., 1996; Punt, 1996; Suzuki et al., 1995) beschrieben wurde. Diese beruht auf der Pronase vermittelten nicht spezifischen Abspaltung von Proteinen auf der Zelloberfläche und deren erneuten Transportes an die Zelloberfläche im Zuge des physiologischen Rezeptor ‘turnovers’. Je $2 \cdot 10^6$ frisch isolierte Thymozyten wurden nach der Isolation drei Mal mit PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen, welches die Effizienz der Pronase-Behandlung erheblich reduzieren würde. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal mit 0,02% Pronase (Calbiochem) und 100 $\mu\text{g/ml}$ DNaseI (Promega) in PBS für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend an die zweite Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10% FCS abgestoppt. Die Zellen wurden daraufhin drei Mal mit RPMI-Voll-Medium gewaschen und für 1 Std., 6 Std., und 14 Std. bei 37°C , 5% CO_2 oder bei 4°C kultiviert. Zuletzt wurden die kultivierten Zellen aus der Kultur entnommen und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD4 und CD8 untersucht.

3.3.18 *In vitro* Differenzierung von Thymozyten

Thymozyten können *in vitro* durch Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen TCR_β und CD2, in CD4 einzel positive Thymozyten differenziert werden (Cibotti et al., 1997). Hierzu wurden 3 cm Polystyrol Petrischalen (Greiner Bio-One; keine Zellkulturschalen verwenden) für 3 Std. mit monoklonalen Antikörpern gegen TCR_β und CD2 (je 5 $\mu\text{g/ml}$; gelöst in Tris/HCl pH 9.5) beschichtet. Im Anschluss wurden die beschichteten Schalen mit PBS gewaschen. Folgend wurden $1 \cdot 10^7$ frisch isolierte Thymozyten (pro Schale) in RPMI-Differenzierungs-Medium für 18 Stunden auf den Schalen kultiviert. Nach den 18 Stunden sogenannter Signal-Kultur, wurden die Thymozyten mit Medium gewaschen und für weitere 16 Stunden in RPMI-Differenzierungs-Medium auf einer unbeschichteten Schale weiter bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach dieser Erholungs-Kultur wurden die Thymozyten mit den Antikörpern CD4-PerCP_{effluor710}®, CD8 α -APC, CD69-PE und TCR_β -FITC gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Darüber hinaus wurde ein Teil der Thymozyten einer intrazellulären Färbung von G- und F-Aktin (siehe 3.3.10) unterzogen. Bei dem verwendeten RPMI-Differenzierungs-Medium handelt es sich um RPMI-Voll-Medium, welchem 50 μM 2-Mercaptoethanol zugesetzt wurden; dem zugesetzten FCS (10%) wurden durch eine

Aktivkohle/Dextran- sowie Hitze-Behandlung endogene Steroid-Hormone entzogen, welche die Differenzierung hätten beeinflussen können.

3.3.19 Aktivierung von Thymozyten

Um Thymozyten zu aktivieren, wurde das von (Klemke et al., 2008) beschriebene Protokoll zur Aktivierung von T-Zellen in abgewandelter Form verwendet. Im Grundsatz ähnelt es dem in Abschnitt 3.3.18 beschriebenen Protokoll der Differenzierung. 3 cm Polystyrol Petrischalen (Greiner Bio-One) wurden für 3 Stunden mit (2 µg/ml) CD3 und (10 µg/ml) CD28 monoklonalen (gelöst in Tris/HCl pH 9.5) beschichtet. Im Anschluss wurden die Platten mit PBS gewaschen und $1 \cdot 10^7$ frisch isolierte Thymozyten in RPMI-Differenzierungs-Medium auf ihnen für 20 Std. bzw. 44 Stunden kultiviert. Nach Kultivierung erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des frühen T-Zell Aktivierungsmarkers CD69 nach 3.3.8.

3.3.20 SDF-1 α induzierte Aktin-Polymerisation in Thymozyten

In primären T-Zellen konnte unter Stimulation mit SDF-1 α ein kurzzeitiger Anstieg an filamentösem Aktin gemessen werden (Wabnitz et al., 2010, 2015),(Vicente-Manzanares et al., 2004),(Kim et al., 2009). Ausgehend von diesem Befund wurden in dieser Arbeit Analysen zur SDF-1 α vermittelten Aktin-Polymerisation in Thymozyten durchgeführt. 10^6 Thymozyten wurden direkt nach der Isolation in 100 µl RPMI-Voll-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in einer 96 Well Kulturschale für eine Stunde inkubiert, um sich vom Stress der Präparation erholen zu können. Im Anschluss wurden die Thymozyten für je 0, 5, 10, 30, 60, 300 und 900 Sekunden mit 100 ng/ml SDF-1 α bei 37°C stimuliert, wobei die Reaktion durch Zugabe von 1,5 Vol. 4% PFA (37°C) nach entsprechender Inkubationszeit abgestoppt wurde. Nach der Fixierung erfolgte eine intrazelluläre Färbung von F-Aktin über Alexa-680 gekoppeltes Phalloidin sowie eine durchflusszytometrische Analyse. Bei der Auswertung wurden die Fluoreszenz-Werte auf den Ausgangswert des jeweiligen Genotyps normalisiert (0 Sek.=100%). Die Versuche wurden in Duplikaten je Tier angefertigt.

3.3.21 Adhäsion von Thymozyten auf ICAM-1

Um die Adhäsion von Cofl^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Strategie mit Bindung an ICAM-1 beschichtetem Untergrund gewählt, wie sie zuvor bereits von Quast et al., 2009 und Boehm et al., 2003 für Jurkat Zellen beschrieben wurde (Quast et al., 2009), (Boehm et al., 2003). Hierzu wurden die Thymozyten nach der Isolation

durchflusszytometrisch gezählt, in HBSS (37°C) gewaschen und für 15 min bei ebenfalls 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert, bevor sie auf mit ICAM-1 beschichtete Polystyrol Kulturschalen (Greiner Bio-One, 3 cm) transferiert wurden. Um das Integrin ICAM-1 an die Plastikoberfläche zu binden, wurde ein Fusionsprotein von ICAM-1 mit einem Fc-Fragment eines humanen IgG Antikörpers verwendet. Das Fc-Fragment des ICAM-1-Fc (R&D Systems) bindet an einen zuvor an die Plastikoberfläche gebundenen monoklonalen gegen humanes IgG Fc γ gerichteten Antikörper, was die richtige Orientierung von ICAM-1 sicherstellt, welche für eine effiziente Interaktion mit dem LFA-1 Rezeptor von Thymozyten nötig ist. Die Bindung des verwendeten gegen humanes IgG Fc γ gerichteten Antikörpers (13 μ g/ml) wurde wie in Abschnitt 3.3.18 beschrieben in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) durchgeführt, wobei nur ein innerer Teil der Oberfläche überzogen wurde (200 μ l Antikörperlösung in der Mitte einer Schale). Im Anschluss an die Antikörperbindung wurden die Schalen zweimal mit Tris/HCl gewaschen und mit je 1ml PBS mit 1%BSA bei 4°C üN blockiert. Am nächsten Tag wurden die Platten für 90 min bei RT mit 500 μ l (5 μ g/ml) ICAM-1-Fc in PBS inkubiert, wodurch ICAM-1-Fc an den zuvor mit anti IgG Fc γ Antikörper beschichteten Teil der Plastikoberfläche bindet. Transferiert wurden je 2*10⁶ Zellen in 1 ml HBSS pro Kulturschale. Um die Adhäsion der Thymozyten zu erhöhen, wurden diese teils mit 10 ng/ml PMA (Sigma) oder 400 ng/ml SDF-1 α (PeproTech) stimuliert. Nach 60 min bei 37°C und 5% CO₂ auf den Kulturschalen wurden nicht adhärenente Thymozyten durch vorsichtiges Waschen mit HBSS (37°C) entfernt, wobei die äußere nicht ICAM-1 gebundene Fläche als Kontrolle diente. Beim Waschen wurde darauf geachtet, jede Kulturschale möglichst gleich und schonend zu behandeln. Nachdem auf der ICAM-1 ungebundenen Fläche keine Thymozyten vorhanden waren, wurden die adhärenenten Zellen durch 4% PFA (37°C) für 10 min fixiert und über ein Inverses Phasenkontrast Mikroskop ausgezählt. Zur Quantifizierung wurden je Kulturschale, sieben zufällige Bildausschnitte innerhalb der ICAM-1 gebundenen Oberfläche bei einer Vergrößerung von 10x ausgezählt. Für die Analyse wurde die Adhäsion auf die Anzahl der adhärenenten Zellen an der unbehandelten Kontroll-Fläche (=100%) normiert.

3.3.22 Adhäsion von Thymozyten auf Laminin

Um die Adhäsion von Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zu untersuchen wurde eine *in vitro* Strategie mit Bindung an Laminin beschichtetem Untergrund gewählt, da dieses in allen Arealen des Thymus exprimiert wird. Das verwendete Verfahren ist identisch zu dem in Abschnitt 3.3.21 beschriebenen, mit dem Unterschied, dass Laminin direkt an die Oberfläche von Glas-Deckgläsern gebunden wurde und die Thymozyten in RPMI-Medium anstatt HBSS

aufgenommen wurden. Die Bindung von Laminin an die Glasoberfläche erfolgte bei 4°C üN in einer feuchten Kammer. Analog zu 3.3.21 wurde nur eine definierte Fläche des Deckglases mit Laminin beschichtet, so dass die unbeschichtete Fläche beim Waschen als Negativkontrolle für die Adhäsion fungieren konnte. Die Adhäsion der Thymozyten erfolgte für 120 min bei 37°C 5%CO₂ in einer 12 Well-Kulturschale, unstimuliert in RPMI-Medium oder analog stimuliert mit 10 ng/ml PMA (Sigma) oder 400 ng/ml SDF-1α (PeproTech). Nach der Adhäsion wurden die Deckgläser sehr vorsichtig durch eintauchen in 37°C PBS gewaschen. Folgend wurden die adhärenen Zellen auf den Deckgläsern durch eintauchen in 4% PFA (37°C) fixiert und die Deckgläser in Moviol eingedeckelt. Nach Aushärtung des Eindeck-Mediums wurde die Anzahl der adhärenen Zellen mikroskopisch ausgewertet. Hierzu wurden je Deckglas 5*4 (10x) Einzelaufnahmen im Laminin gebundenen Bereich angefertigt, welche vor der Quantifizierung durch ein Computerprogramm zu einem großen Bild zusammengesetzt wurden. Für die Analyse wurde die Adhäsion auf die Anzahl der adhärenen Zellen in der unbehandelten Kontrolle =100% normiert.

3.3.23 Transwell Migrations-Analyse

Die Migrationsfähigkeit primärer Thymozyten in zweidimensionaler Umgebung wurde, wie bei Phee et al., 2010 beschrieben, mittels Transwell-Kammern mit einem Porendurchmessers von 5 µm gemessen (Phee et al., 2010a). Dazu wurden Thymozyten in RPMI-Mangel-Medium isoliert und je 3x10⁵ Zellen pro 24 Well-Transwell eingesetzt (Zellzahl bestimmt über eine Neubauerzählkammer). Vor Gebrauch wurden die Transwell-Filter 1x mit PBS gewaschen, auf Dichtheit überprüft und für 1 Std. bei 37°C und 5%CO₂ mit RPMI-Mangel-Medium vorinkubiert, was laut Herstellerangaben die Eigenschaften des Plastiks verbessern soll. Die Transwell-Analysen wurden in Duplikaten für jedes der Chemokine SDF-1α (400 ng/ml) und CCL25 (2.5 µg/ml), im unteren Kompartiment befindlich, durchgeführt und nach 5 stündiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) die Zellen im unteren Kompartiment mit dem Durchflusszytometer gezählt. Um gleiche Bedingungen garantieren zu können, wurde jedes Experiment mit Zellen aus einem Kontroll- und einem Knockout-Tier simultan durchgeführt. Des Weiteren sind von den Thymozyten beider Tiere, welche nicht im Transwell eingesetzt wurden, weitere Antikörper Färbungen verschiedener Oberflächenmolekülen durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert worden, um die Ausgangsmengen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu ermitteln.

3.3.24 Kollagen Migrations-Analyse

Die Migrationseigenschaften von Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung wurde, wie in (Quast et al., 2009) und (Friedl et al., 1998) beschrieben, durch live Zell Videoanalyse in ‘rat tail’ Kollagen-I (Gibco® INVITROGEN)-Gel untersucht. Hierzu wurde das Kollagen auf Eis zunächst mit 0,1 N NaOH titriert und dann mit 10X MEM gemischt. Für die stimulierten Bedingungen wurden ebenfalls SDF-1 α (400 ng/ml) oder CCL25 (2.5 μ g/ml) mit eingemischt. Im Anschluss wurden je $3 \cdot 10^5$ Thymozyten in je 100 μ l des noch nicht polymerisierten Kollagen-Gels mit eingemischt, was einer finalen Konzentration von 3 mg/ml Kollagen entspricht. Für die Herstellung des Kollagen-Gels musste dessen pH Wert austitriert werden, daher wurde für Kontrollen und Mutanten immer das gleiche Kollagen-Gel verwendet. Hierzu wurde zunächst das Grundgel hergestellt, dann geteilt und entsprechende Chemokine eingemischt. Im Anschluss wurden diese Mischungen wieder geteilt und Kontroll- und Mutanten-Zellen eingemischt. Der pH Wert des Gels wurde dabei stets mit pH Streifen überprüft. Diese Vorgehensweise war nötig, um in allen Bedingungen sowohl die gleiche Kollagen-Konzentration als auch den gleichen pH Wert gewährleisten zu können. Nach Mischung wurden die jeweiligen Gel/Zell-Gemische in selbstgebaute Chemotaxis-Kammern überführt und in eine an ein Mikroskop angeschlossene Klimakammer bei 37°C und 5%CO₂ gegeben. Nach 60 minütiger Polymerisation des Gels wurden automatisierte ‘time-laps’ Video-Aufnahmen an bis zu 20 Positionen mit einem voll automatischen inversen Phasenkontrast-Mikroskop (Keyence) bei 37°C und 5%CO₂ durchgeführt. Hierbei wurden Kontroll- sowie Mutante-Thymozyten (stimuliert und unstimuliert) gleichzeitig über einen Zeitraum von acht Stunden gefilmt wobei alle 90 Sekunden ein Bild an bis zu 20 Positionen aufgenommen wurde. Zur Analyse wurde die Migration der Zellen mit dem ‘Manual Tracking Plug-in’ der ImageJ 1.47q Software (NIH) per Hand nachvollzogen. Das von Ibidi entwickelte ‘Chemotaxis and Migration Tool’ Version 1.01 (ImageJ Plug-in) wurde verwendet, um die Geschwindigkeiten sowie die zurückgelegten Distanzen einzelner Zellen zu bestimmen. Die statistische Analyse erfolgte über SigmaPlot® 12 sowie Excel.

3.4 Histologie

3.4.1 Einbetten und Anfertigen von Kryo-Dünnschnitten

Zur Analyse der Gewebestruktur wurden Mäusen ihr linker sowie rechter Thymuslappen entnommen und in PBS von Blut- und Geweberesten gereinigt. Im Anschluss wurden die Thymi in Tissue-Tec eingebettet und auf Trockeneis bei -80°C eingefroren. Von den

eingefrorenen Thymi wurden bei -20°C $12\mu\text{m}$ dicke Dünnschnitte an einem Kryostaten angefertigt, wobei die Thymi in transversaler Richtung geschnitten wurden. Nach dem Schnitt wurden die Thymi auf Objektträgern übertragen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Fixierung von Kryoschnitten für HuE Färbung

Für die HuE (Hämatoxylin und Eosin) Färbung wurden die Objektträger, der am Kryostaten geschnittenen $12\mu\text{m}$ Thymus Dünnschnitte, zunächst bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss für 5 min in einem Bad mit 4% PFA (Histo-Fix) fixiert.

3.4.3 HuE Färbung von Dünnschnitten

Die Hämatoxylin und Eosin Färbung ist eine der Standardfärbungen der Histologie und ermöglicht eine gute morphologische Untersuchung des angefärbten Gewebes. Zu diesem Zweck wird das Gewebe erst mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin angefärbt, welcher alle sauren und basophilen Strukturen dunkelblau anfärbt. Dies betrifft insbesondere die Zellkerne aufgrund ihrer hohen Konzentration an DNS sowie das raue endoplasmatische Retikulum. Darauf erfolgt eine Gegenfärbung mit Eosin, welches alle basischen Strukturen rot färbt, wovon vor allem Zellplasma-Proteine, Mitochondrien sowie Kollagen und Keratin betroffen sind (Fischer et al., 2008). Die HuE Färbung wurde immer direkt im Anschluss an die PFA Fixierung durchgeführt, wobei die Schnitte nach der PFA Fixierung für 10 Minuten in PBS gewaschen wurden. Darauf folgend wurden die Schnitte für 30-45 Sekunden in einer 25%igen Hämatoxylin (verdünnt mit H_2O) Lösung angefärbt und für 4 min mit H_2O gebläut. Hierfür wurde aufgrund seines höheren pH Wertes Leitungswasser und nicht VE-Wasser verwendet. Dann wurden die Schnitte für 2,5 min mit 0,05% Eosin (gelöst in Et-OH) gefärbt und im Anschluss für 30 Sekunden in 96% Et-OH dehydriert. Für eine vollständige Dehydrierung wurden die Schnitte zuletzt für 2 Minuten in absoluten Et-OH und darauf folgend für 5 Minuten in Xylen gegeben, bevor sie in Entellan eingedeckelt wurden. Nach der Aushärtung des Entellans wurden die Dünnschnitte bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mit einem inversen Mikroskop (Keyence) bei 10x mikroskopiert wurden.

3.4.3 Fixierung von Kryoschnitten für die Immunfluoreszenz

Der in der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper erlaubte keine PFA Fixierung der am Kryostaten hergestellten Thymus Dünnschnitte. Stattdessen wurden die Schnitte für die

Immunfluoreszenz für 5 min mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Analog zur Fixierung mit PFA wurden auch hier die Schnitte zunächst bei RT getrocknet, um ein Ablösen vom Objektträger durch Kondensationsflüssigkeit zu vermindern.

3.4.3 Immunfluoreszenz von Kryoschnitten

Nach der Fixierung mit Methanol wurden die Thymusschnitte für 10 Minuten in PBS rehydriert und im Anschluss für 30 min mit 50 mM Ammoniumchlorid überschichtet, was die Autofluoreszenz des Gewebes leicht reduziert. Folgend wurden die Schnitte für fünf Minuten mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit 5% NGS in PBS blockiert. Unter Lichtabschluss wurden die Schnitte in PBS mit 0,2% Triton 2x für 5 Minuten permeabilisiert und üN bei 4°C mit entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Darauf folgend wurden die Schnitte 3x für 5 Minuten mit PBS (0,2% Triton) gewaschen und für eine Stunde mit Fluoreszenz-gebundenen sekundären Antikörpern gefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte drei weitere Male gewaschen, wobei im vorletzten Waschschritt noch eine Zellkernfärbung mit dem Farbstoff DAPI erfolgte. Zuletzt wurden die Schnitte in Moviol eingedeckelt und bis zu ihrer mikroskopischen Analyse bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert.

3.5 Kontrollen

Im Allgemeinen wurden die meisten Experimente dieser Arbeit in Bezug auf entsprechende Kontrollgruppen durchgeführt. Für $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ wurden wenn nicht anders angegeben $\text{Cofl}^{\text{fl/fl}}$ Tiere als Kontrollgruppe verwendet. Ebenfalls wurde überprüft, dass $\text{Cofl}^{\text{wt/wt,CD4cre}}$ Tiere ohne Befund sind. Für $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ und $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,dLCKcre}}$ Tiere dienten $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl}}$ Tiere als Kontrollgruppe. $\text{Pfn1}^{\text{wt/wt,dLCKcre}}$ Mäusen zeigten in Voruntersuchungen keine Beeinträchtigungen der T-Zell Entwicklung. Die Untersuchung aller Kontrollgruppen im Vergleich mit reinen Wild Typ Tieren zeigte keinerlei Auffälligkeiten.

4 Ergebnisse

In der Vergangenheit und besonders in den letzten Jahren wurde durch eine Vielzahl von Publikationen der Verdacht erhärtet, dass dynamische Veränderungen am Aktin-Zytoskelett für die Funktion von T-Zellen von entscheidender Bedeutung sind (Billadeau et al., 2007). So konnte z.B. gezeigt werden, dass der T-Zell Rezeptorkomplex durch ein Gerüst von Aktin-Filamenten stabilisiert wird (Monks et al., 1998) (Samstag, 2003) (Bunnell et al., 2001) und dass der Guanin Austausch Faktor VAV1 in diesem Zusammenhang für die Akkumulation von F-Aktin in dieser sogenannten Immunologischen Synapse von entscheidender Bedeutung ist (Tybulewicz, 2005). Die meisten dieser Arbeiten beschäftigten sich mit der Funktion entsprechender Proteine in humanen T- oder Jurkat T-Zellen, weswegen bisher vergleichsweise wenig über die Funktionen Aktin-modulierender Proteine für die Entwicklung der T-Zellen im Thymus bekannt ist. Einige Gruppen konnten in diesem Zusammenhang bereits zeigen, dass der Knockout von Proteinen “*downstream*“ des T-Zell-Rezeptor Signalweges oft zu Veränderungen in der Thymozyten-Entwicklung führt (Mombaerts et al., 1992)(Negishi et al., 1995)(Swan et al., 1995)(Dower et al., 2000a), wobei einige dieser Arbeiten auch Veränderungen am Aktin Zytoskelett beobachten konnten (Phee et al., 2010b). Obwohl der Regulation von Aktin für die Aktivierung von T-Zellen große Bedeutung zugesprochen wird (Dustin and Cooper, 2000), waren auf der Ebene direkter Aktin Interaktion eher wenige Proteine beschrieben. Darum war es Ziel dieser Arbeit die Rolle zweier grundlegender Aktin modulierender Proteine durch deren Deletion während der T-Zell Entwicklung zu untersuchen. Auf der einen Seite wurde mit der ADF/Cofilin Familie und Cofilin 1 einer der essentiellsten F-Aktin depolymerisierenden und spaltenden Proteinfamilien als Ziel ausgewählt (Bamburg et al., 1999), auf der anderen Seite wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mit dem Protein Profilin 1 einer der bekanntesten Aktin Polymerisationsfaktoren (Witke, 2004) als Ziel gewählt, so dass beide Seiten der Aktin Regulation (Polymerisation und Depolymerisation) in dieser Arbeit exemplarisch betrachtet werden konnten.

4.1 Die Expression von Cofilin 1 und Profilin 1 wird im Zuge der T-Zell Entwicklung im Thymus gesteigert

Da zum Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über die Rolle von Cofilin 1 und Profilin 1 für die Entwicklung von T-Zellen bekannt war, wurde zunächst deren Expressionsmuster in den verschiedenen Entwicklungsstadien der T-Zell Reifung im Thymus eingehender untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Thymozyten aus WT Mäusen isoliert, gegen die T-Zell Co-Rezeptoren CD4 und CD8 gefärbt, und durchflusszytometrisch in die vier Hauptentwicklungsstadien DN, DP, CD4-SP und CD8-SP sortiert, um Zell-Lysate für die SDS-PAGE herzustellen. Tote Zellen wurden hierbei durch eine Hoechst Färbung vorher aussortiert. Die durchgeführten Western Blot Analysen konnten dabei zum einen zeigen, dass sowohl Cofilin 1 als auch Profilin 1 in Thymozyten exprimiert sind (Abb. 4.1, A) als auch, dass beide während der Entwicklung von DN über DP nach CD4-SP oder CD8-SP in ihrer Expression stark gesteigert werden (Abb. 4.1, A+B). Interessanterweise zeigten die Analysen für Aktin ein anderes Expressionsmuster als für Cofilin 1 und Profilin 1, bei dem DP Thymozyten im Vergleich zu den anderen Entwicklungsstadien die deutlich geringste Konzentration an Aktin aufwiesen. Die Befunde konnten durch eine Quantifizierung mehrerer Western Blots bestätigt werden (Abb. 4.1, B), wobei anzumerken ist, dass eine Expression von Cofilin 1 in DN Thymozyten, anders als in (Abb. 4.1, A) dargestellt, bei längeren Expositionszeiten in DN Thymozyten nachgewiesen wurde.

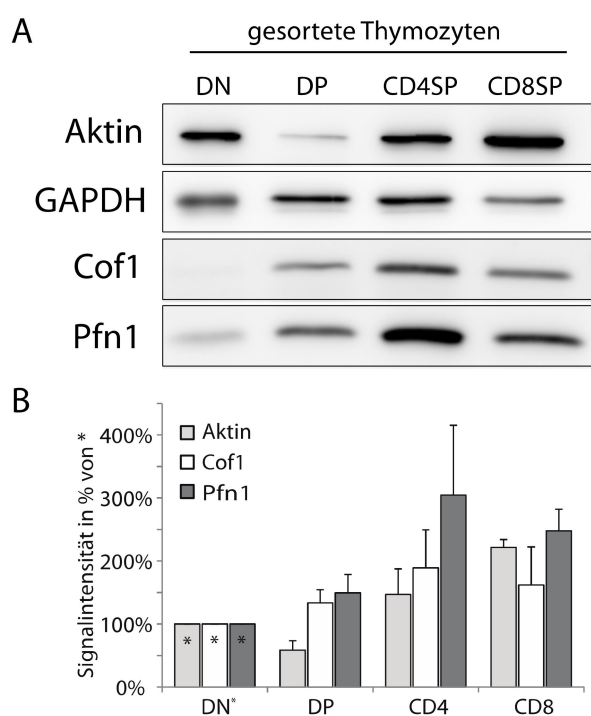


Abb.4.1 Western Blot Analyse zur Expression von Cofilin 1, Profilin 1 sowie Aktin in der T-Zell Entwicklung. Western Blot Analyse von gesorteten Thymozyten zeigt eine Steigerung der Expression von Cofilin 1 und Profilin 1 Protein im Zuge der T-Zell Entwicklung an. (A) Western Blot geprobt gegen die Proteine Aktin (Ak.: AktinC4), (Cof1) Cofilin 1 (Ak.: KG60) und (Pfn1) Profilin 1 (Ak.: P1T) in CD4, CD8 doppelt negativen (DN), doppelt positiven (DP) und einzel positiven (SP) Thymozyten von C57bl6 WT Mäusen. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet. Daten sind repräsentativ für n=3 Tiere. (B) Quantifizierung der Expression von Aktin, Cofilin 1 und Profilin 1 jeweils relativ zu ihrer Expression in DN Thymozyten, durch densitometrische Vermessung mit Multi Gauge. Zu diesem Zweck wurden die Daten zunächst auf GAPDH normalisiert, um die leicht unterschiedlichen Lademengen auszugleichen und im Anschluss auf die Signalintensität der DN Fraktion relativiert. Daten wurden aus unabhängigen Western Blots von n=2 Tieren erhoben.

Die Daten von WT Mäusen lassen auf diskrete physiologische Ereignisse schließen, die während der Reifung der T-Zellen im Thymus in Bezug auf die Regulation von Aktin ablaufen, und sind grundlegend für die Interpretation der Ergebnisse zum Knockout von Cofilin 1, sowie des später in dieser Arbeit diskutierten Profilin 1 Knockouts, in Thymozyten.

4.2 Untersuchungen zur Rolle von Cofilin 1 in der T-Zell

Entwicklung

Die Proteine der ADF/Cofilin Familie gehören zu den am besten untersuchten Aktin Depolymerisationsfaktoren in Vertebraten und kontrollieren unter anderem die Poly- und Depolymerisationsrate am (-) Ende der Aktin Filamente (Carlier, 1997). Darüber hinaus können sie, insbesondere alte, Aktin Filamente zerschneiden und dadurch sowohl Aktin Filamente abbauen, als auch neue Nukleations-Enden für Aktin Polymerisation schaffen (Maciver, 1991) (McGough, 1997). In der Maus und im Menschen sind drei Gene dieser Proteinfamilie kodiert (Cofilin 1, Cofilin 2 sowie ADF), deren Aktivität, Expression und biologische Funktion sich voneinander unterscheiden können (Vartiainen et al., 2002b), (Nakashima et al., 2005). Frühere Experimente in T-Zellen deuteten darauf hin, dass Cofilin von Bedeutung für die Aktivierung der T-Zellen ist (Lee et al., 2000) und dass dieses unter Co-Stimulation des T-Zell-Rezeptors an Serin 3 dephosphoryliert und somit aktiviert wird (Samstag et al., 1991). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Cofilin regulierende Kinase LIMK-1 in humanen T-Zellen Teil dieses T-Zell-Rezeptor abhängigen Signalweges ist (Klemke et al., 2010). Über die Rolle von Cofilin in der Entwicklung von T-Zellen war jedoch zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenig bekannt und darüber hinaus wurde in der Literatur zumeist nicht zwischen Cofilin 1, 2 und ADF differenziert, weshalb zu Beginn Thymozyten auf die Expression der ADF/Cofilin Familien-Mitglieder hin untersucht wurden.

4.2.1 Cofilin 1 ist als einziges Mitglied der ADF/Cofilin Familie in Thymozyten, Lymphozyten und Jurkat T-Zellen exprimiert

Um zu untersuchen, welche Proteine der ADF/Cofilin Familie in Thymozyten, Lymphozyten und Jurkat Zellen exprimiert werden, wurden Totallysate von Einzelzell-Suspensionen der entsprechenden Zellen angefertigt und über SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot wurde im Anschluss mit spezifischen Antikörpern gegen Cofilin 1 (Cof1), Cofilin 2 (Cof2) sowie ADF geprobt, wobei als Lademengenkontrolle GAPDH sowie eine Comassie-Färbung fungierten. Die Untersuchung zeigte, dass sowohl in Thymozyten als auch in Lymphozyten und Jurkat Zellen Cofilin 1 als einziges Familienmitglied in nachweisbarer Menge exprimiert wird (Abb. 4.2). Die als positive Kontrollen mit aufgetragenen totalen Lysate von Gehirn und Uterus bestätigen hierbei die Funktion der verwendeten Antikörper. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Salz, 2011) dokumentiert werden, wobei die Möglichkeit besteht, dass die Expressionsmengen von ADF und Cofilin 2

in Thymozyten, Lymphozyten und Jurkat Zellen unterhalb der Detektionsgrenze unseres experimentellen Aufbaues mit 10µg Gesamt-Protein lagen und dass minimale Mengen dieser Proteine in den Zellen exprimiert sind. Hierfür konnten allerdings auch bei längeren Belichtungszeiten keine Hinweise gefunden werden.

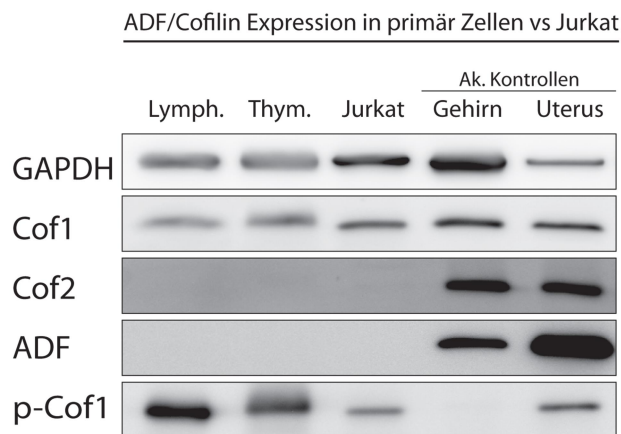


Abb.4.2 Expression der ADF/Cofilin Familie in Primär- und Jurkat Zellen (Western Blot). In Totallysaten von C57BL/6 WT Lymphozyten (Lymph.), Thymozyten (Thym.) und Jurkat Zellen konnte, Cofilin 1 als einziges Mitglied der ADF/Cofilin Familie mit Antikörpern gegen Cofilin1 (Cof1, Ak.: KG60), Cofilin 2 (Cof2, Ak.: FHU1) und ADF, Ak.: 7D10) nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten Jurkat Zellen eine verminderte Phosphorylierung von Cofilin 1 (p-Cof1) im Vergleich zu primären Lymphozyten oder Thymozyten (Ak.: p-Cof1 Cell Signaling). WT Lysate von Gehirn und Uterus wurden als Antikörperkontrolle aufgetragen. Geladen wurden 10µg Protein pro Probe nach Bradford, zusätzlich wurde gegen GAPDH als Lademengenabgleich geprobt. Daten sind repräsentativ aus über 5 unabhängigen Experimenten.

Neben der Expressionsanalyse der ADF/Cofiline in den entsprechenden Zellen wurde auch die Phosphorylierung von Cofilin 1 an Serin 3 über einen phospho-spezifischen Antikörper (p-Cof1) untersucht. Interessanterweise wiesen hierbei Jurkat T-Zellen trotz leicht erhöhter Lademenge (GAPDH) die mit Abstand schwächste Bande für p-Cof1 auf, was auf einen erhöhten Anteil an aktivem Cofilin, im Vergleich zu primären Thymozyten, hinweist. Bei dem Vergleich des p-Cof1 Signals von Lymphozyten sollte allerdings beachtet werden, dass es sich dabei um eine Mischkultur an Zellen (vorwiegend B- und T-Zellen) aus Lymphknoten handelt und daher nicht für einen Vergleich von T-Zellen mit Jurkat Zellen verwendet werden sollte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Cofilin 1 das einzige in Thymozyten nachweisbare Mitglied der ADF/Cofilin Familie ist, weshalb im Folgenden seine Funktion in der T-Zell Entwicklung näher untersucht wurde.

4.2.2 Cofilin 1 wird in Thymozyten effizient durch die CD4cre Rekombinase deletiert

Da so komplexe Prozesse wie die T-Zell Entwicklung vor einem gewebespezifischen Hintergrund betrachtet werden sollten, musste zur Analyse des Cofilin 1 Knockouts, eine

konditionale Knockout Strategie verfolgt werden, da der totale Knockout von Cofilin 1 embryonal lethal (E10) (Gurniak et al., 2005) und somit nicht lebensfähig ist. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit geflochten Cofilin 1 Allelen ($Cofl^{fl/fl}$) (Gurniak et al., 2005) mit der CD4cre Mauslinie gekreuzt, wodurch Cofilin 1 in einem frühen doppelt negativen (DN3) Stadium der T-Zell Entwicklung deletiert werden sollte (Wolfer et al., 2001). Die CD4cre Linie trägt ein Minigen welches für eine Cre Rekombinase kodiert welche unter der Kontrolle des CD4 Promotors in der T-Zell Entwicklung exprimiert wird.

Unter der Verwendung eines stop-YFP-R26^{CD4cre} Reporter Maus Modells (Srinivas et al., 2001), welches die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe ermöglicht, konnte die Expression der Cre-Rekombinase ab dem DN Stadium der T-Zell Entwicklung über die YFP Expression des Reporter-Gens nachgewiesen werden (Abb. 4.3.1). Das stop-flox-YFP-R26 Mausmodell trägt eine geflochte Stop Kasette vor dem kodierenden Bereich eines YFP-Gens unter der Kontrolle des Rosa26 Promotors und ermöglicht somit die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte im CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven (DP) Entwicklungsstadium dabei über 83% positive Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren.

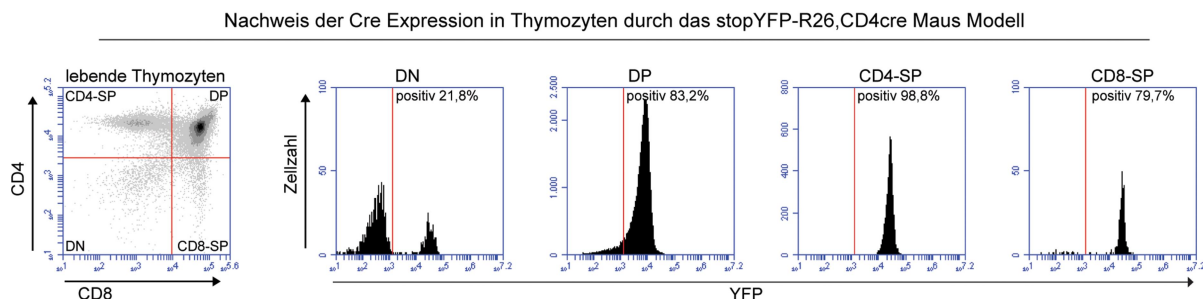


Abb.4.3.1 Analyse der CD4-Cre Expression in der T-Zell Entwicklung durch das stop-flox-YFP-R26^{CD4cre} Reporter Maus Modell. Durchflusszytometrische Untersuchung von stop-flox-YFP-R26^{CD4cre} Thymozyten, welche für CD4 und CD8 gefärbt wurden, zeigt eine starke Cre-Aktivität in DP Thymozyten. Das stop-flox-YFP-R26 Mausmodell trägt eine geflochte Stop Kasette vor dem kodierenden Bereich eines YFP-Gens unter der Kontrolle des Rosa26 Promotors und ermöglicht somit die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe. Im Dotplot (links) ist das 'Gating' für die einzelnen Entwicklungsstadien der Thymozyten nach CD4 und CD8 abgebildet. Die Histogramme zeigen den Anteil der YFP-positiven Zellen in den jeweiligen Populationen (**DN**) CD4⁻CD8⁻, (**DP**) CD4⁺CD8⁺, (**CD4-SP**) CD4⁺CD8⁻, (**CD8-SP**) CD4⁻CD8⁺. Daten sind repräsentativ für >3 Tiere pro Genotyp.

Korrespondierend konnte in $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten eine effiziente Deletion der geflochten Cofl Allele mit einer Deletion-Rate von über 93% im Southern Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.3.2, A). Ebenfalls konnte durch eine Western Blot Analyse eine starke Reduktion des Cofilin 1 Proteins in mutanten Thymozyten nachgewiesen werden (Abb. 4.3.2, B), wobei

beachtet werden muss, dass in die Analyse totale Thymozyten eingegangen sind, welche auch die Stadien DN1 und DN2 enthalten, die keine Cre- Rekombinase exprimieren.

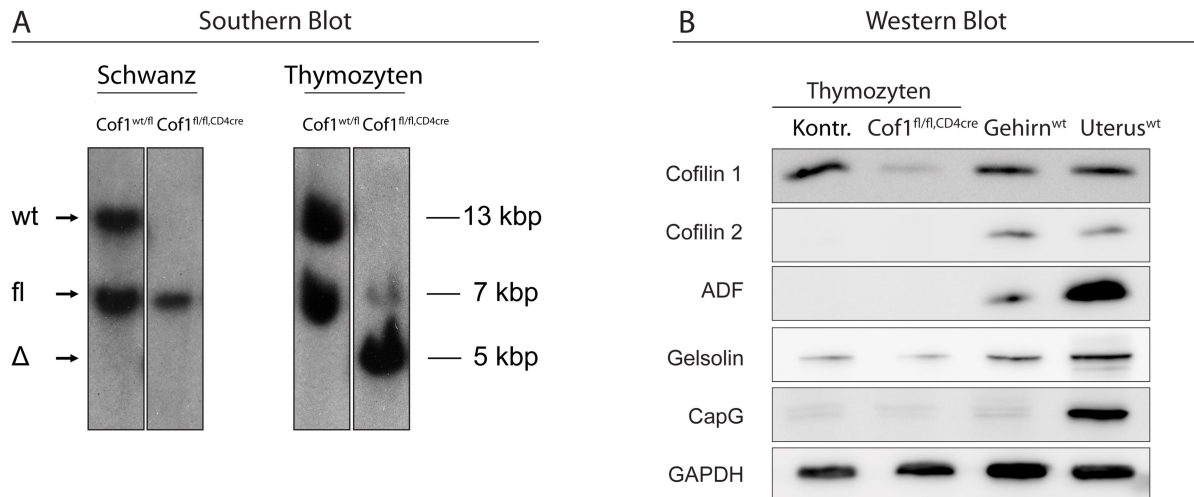


Abb.4.3.2 Deletion von Cofilin 1 durch die CD4cre-Rekombinase in adulten Mäusen. Die in (A) dargestellte Southern Blot Analyse zeigt eine effiziente Deletion der geflochten Cofilin 1 DNS-Sequenz in totalen Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten mit circa 93% (densitometrische Vermessung mit Multi Gauge) an. Im Gegensatz zu Thymozyten konnte in Schwanz DNS keine Deletionsbande in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen detektiert werden. Die durch die Sonde detektierbaren Fragmentgrößen ergeben sich aus dem Genetargeting, das bei der Erstellung der Mauslinien verwendet wurde und einem EcoRI Verdau der DNS. Für das Wildtyp-Allel (wt) von Cofilin 1 entsteht so ein Fragment, welches nach Auftrennung bei etwa 13 kbp durch die radioaktive Sonde detektiert wird. Entsprechend ergibt sich für das geflochte Allel (fl) eine Fragment Größe von 7kbp und für ein durch die Cre-Rekombinase ausgeschnittenes Allel (Δ) eine Bande bei 5 kbp. Korrespondierend zeigt die in (B) dargestellte Western Blot Analyse von Cof1^{fl/fl,CD4cre} und Kontroll- (Kontr.) Thymozyten (Genotyp Cof1^{fl/fl}), eine starke Reduktion Cofilin 1 Proteins in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten (Ak.: KG60). Darüber hinaus wurde der Blot mit Antikörpern gegen Cofilin 2 (Ak.: FHU1), ADF (Ak.: 7D10), Gelsolin (Ak.:3825) und CapG (Ak.:) geprobt um zu ermitteln, ob der Verlust von Cofilin 1 zu einer veränderten Expression dieser Proteine in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten führt. Die Gehirn^{WT} und Uterus Lysate^{WT} wurden als positive Antikörperkontrolle aufgetragen. Geladen wurden 10µg Protein pro Probe nach Bradford. Zusätzlich wurde gegen GAPDH als Lademengenabgleich geprobt. (A) Daten sind repräsentativ für >3 Tiere pro Genotyp. (B) Daten sind repräsentativ für >5 Tiere pro Genotyp.

Zusätzlich konnte die Western Blot Analyse (Abb. 4.3.2, B) keine kompensatorische Expressionserhöhung von Aktin bindenden Proteinen mit ähnlicher Funktion, wie Gelsolin oder CapG, durch die Deletion von Cofilin 1 beobachten und darüber hinaus zeigen, dass diese eher schwach in Thymozyten exprimiert werden. Zusammenfassend konnte eine effiziente Deletion von Cofilin 1 in Thymozyten sowohl auf DNS- als auch auf Proteinebene durch die CD4cre-Rekombinase nachgewiesen werden.

4.2.3 Der Verlust von Cofilin 1 bedingt eine starke Erhöhung des F-Aktin Gehalts in Thymozyten

Da die Expressionsanalysen zeigen konnten, dass Cofilin 1 wahrscheinlich der vorwiegende F-Aktin Depolymerisationsfaktor in Thymozyten ist (Abb. 4.3.2, B) und dieser effizient durch die CD4^{cre}-Rekombinase in Thymozyten deletiert wird (Abb. 4.3.2, A+B), war davon auszugehen, dass der Verlust von Cofilin 1 Auswirkungen auf den stationären Zustand des F- zu G-Aktin Equilibriums in Thymozyten haben könnte. Um dies experimentell zu überprüfen, wurde der Anteil an filamentösem (F-) und globulärem (G-) Aktin in Cofl^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zum einen durch Färbung mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin und DNaseI durchflusszytometrisch in Relation zur Kontrolle bestimmt (Abb 4.4, A+Aⁱⁱ). Dabei konnte die Färbung mit Phalloidin, welches spezifisch und irreversibel an F-Aktin bindet, eine um das bis zu 2,5 fache erhöhte Menge an filamentösem Aktin in Relation zu Kontrollzellen nachweisen (Abb 4.4, Aⁱⁱ). Darüber hinaus zeigte die Messung des G-Aktin Gehaltes durch DNaseI, welche mit hoher Affinität an G-Aktin bindet, eine Reduktion des verfügbaren G-Aktin Pools (Abb 4.4, Aⁱⁱ). Zusätzlich zu den relativen durchflusszytometrischen Messungen wurde durch biochemische Sedimentations-Analysen das genaue Verhältnis von F- zu G-Aktin in Mutanten- und Kontroll-Thymozyten bestimmt (Abb 4.4, B+Bⁱⁱ). Diese absoluten Analysen konnten zum einen die Verlagerung des F-/G-Aktin Equilibriums hin zu filamentösem Aktin in mutanten Thymozyten bestätigen. Zum anderen zeigten die Analysen, dass in WT Thymozyten, im Vergleich zu anderen Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten (nicht gezeigt), ein sehr großer Pool an globulärem Aktin von ca. 80% in Relation zu einem geringen Anteil an F-Aktin mit ca. 20% vorliegt (Abb 4.4, Bⁱⁱ). Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass in Cofl^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten eine gestörte Aktin-Regulation mit einem stark erhöhten Anteil an filamentösem Aktin vorliegt.

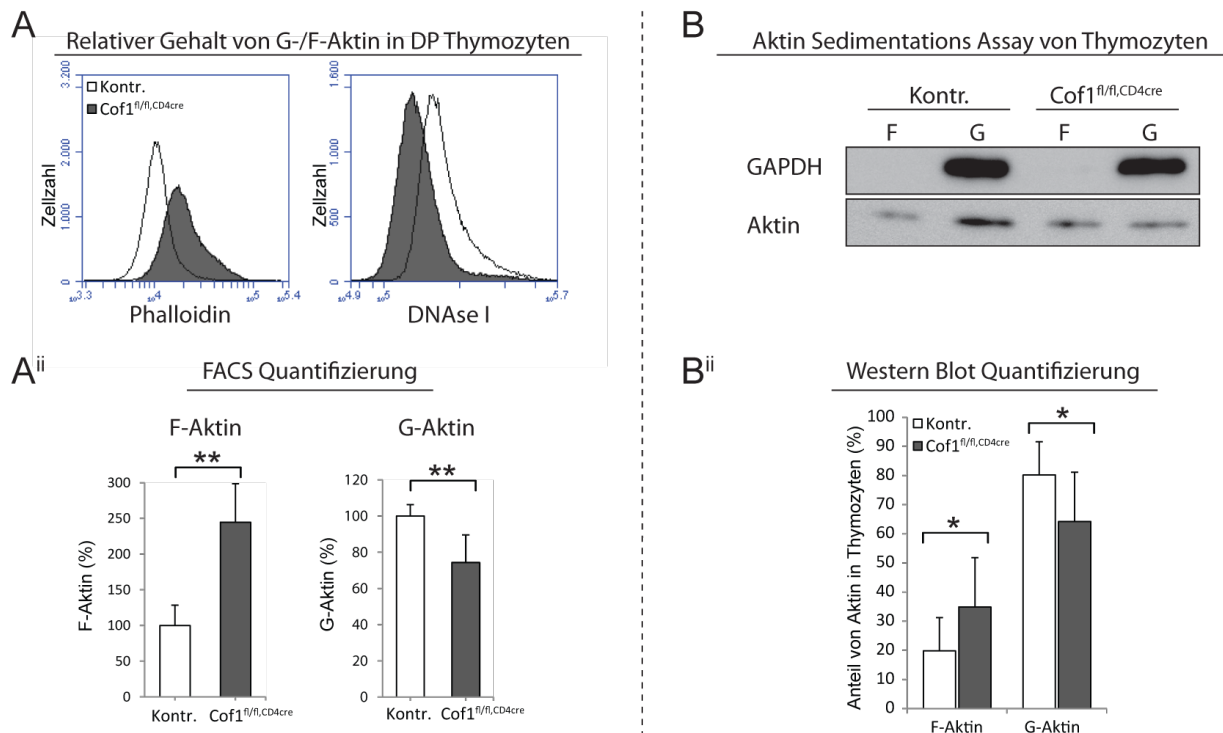


Abb.4.4 Analyse des G-/F-Aktin Gehaltes in Cof1^{fl/fl,CD4cre}- und Kontroll-Thymozyten. Durchflusszytometrische und biochemische Analysen zeigten einen starken Anstieg von F-Aktin in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. (A) Durchflusszytometrische Messung von F- und G-Aktin in Cof1^{fl/fl} und Kontroll DP Thymozyten (Cof1^{fl/fl}) über Färbung mit Alexa680 gekoppeltem Phalloidin (F-Aktin) und Alexa-488 gekoppelter DNase I (G-Aktin). Die Histogramme zeigten einen Anstieg von F-Aktin bei gleichzeitiger Verringerung von G-Aktin in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten (grau) an. (Aⁱⁱ) Quantifizierung der medianen Fluoreszenzwerte (von (A)). Die Werte für F- und G-Aktin wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf die Kontrolle (=100%) normalisiert. (B) Biochemische Separation von F- und G-Aktin zeigte ebenfalls eine Erhöhung des F-Aktin Gehaltes in totalen Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. Nach der Separation, durch Zentrifugation wurden Pellet (F) und Überstand (G) im gleichen Volumen SDS aufgenommen und im gleichen Volumen auf die SDS Page geladen. Geladen wurden 1µg Gesamt-Protein bezogen auf die Pellet-Fraktion. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen die Proteine Aktin (Ak.: AktinC4) und GAPDH (Ak.: GAPDH) geprobt, wobei GAPDH nicht dem Lademengenabgleich sondern dem Reinheitsnachweis der Pellet Fraktion dient, in der kein GAPDH Signal detektiert werden darf. Daten sind repräsentativ für 3 Tiere pro Genotyp (Bⁱⁱ) Quantifizierung von (B) über densitometrische Vermessung mit Multi Gauge, mit n=4 Kontroll- und n=3 cof1^{fl/fl,CD4cre} Tieren in 6 unabhängigen Western Blots. (A+Aⁱⁱ) n=7 Tiere pro Genotyp (Aⁱⁱ+Bⁱⁱ) Fehlerbalken zeigen Standard-Abweichung. Signifikanz wurde über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *0.01<P<0.05;**0.001<P<0.01;***P<0.001

4.2.4 Der Verlust von Cofilin 1 führt zu einem Entwicklungs-Block heranreifender T-Zellen mit verminderter positiver Selektion wobei die Gesamtzellzahl der Thymozyten unverändert bleibt.

Da die vorangegangenen Analysen gezeigt haben, dass Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten eine gestörte Aktin Homöostase mit stark erhöhten Anteilen von F-Aktin aufwiesen (Abb. 4.4), war die zentrale Frage, ob sich diese Störung negativ auf die Entwicklung der Thymozyten auswirkt. Um diese Frage zu beantworten, muss zuerst verstanden werden, wie sich

Thymozyten im Thymus zu T-Zellen entwickeln. Während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen die Thymozyten, nachdem sie als hematopoetische Vorläuferzellen in den Thymus eingewandert sind, verschiedene Entwicklungsstufen, welche in drei bedeutende Entwicklungsabschnitte unterteilt werden können. Diese Entwicklungsabschnitte lassen sich grob durch die Expression der CD4 und CD8 T-Zell Coreceptor Ketten definieren. Thymozyten entwickeln sich aus den doppelt negativen $CD4^-CD8^-$ Vorläuferstadien zunächst zu doppelt positiven $CD4^+CD8^+$ Zellen, welche ca. 85% der Zellen im Thymus ausmachen. Im Anschluss entwickeln sich diese DP Zellen zu einzel-positiven $CD4^+CD8^-$ oder $CD8^+CD4^-$ Zellen, welche nach erfolgreicher Selektion den Thymus verlassen. Im Rahmen dieser Arbeit sind die Termini doppelt negativ (DN), doppelt positiv (DP) und einzel-positiv (SP) sofern nicht anders angegeben, somit auf die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 bezogen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von mutanten $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Mäusen ergab dabei keine Veränderung in der Gesamtzahl von Thymozyten (Abb. 4.5, A) und zeigte eine erfolgreiche Entwicklung von DN zu DP Thymozyten (Abb. 4.5, B). Jedoch ergaben die Analysen eine dramatische Veränderung in den dem DP Stadium folgenden einzel-positiven Entwicklungsstadien (Abb. 4.5, B+C), welche in der statistischen Auswertung eine 5-10 fache Reduktion in der Anzahl an $CD4^+$ oder $CD8^+$ SP Zellen im Thymus ergab (Abb. 4.5, C). Da die Entwicklung von DP Thymozyten zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ SP Zellen durch den Prozess der positiven Selektion gesteuert wird (Yamashita et al., 1993), (Swat et al., 1993), bei dem auf den Zellen nach ihrer erfolgreichen Selektion eine Erhöhung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie der β -Kette des T Zellrezeptors (TCR_β) auf der Zelloberfläche gemessen werden kann, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den genauen Zeitpunkt des Entwicklungsstopps besser eingrenzen zu können. Die Analysen ergaben eine drastische Reduktion der $CD69^+TCR_\beta^{hoch}$ Population in DP $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten (Abb. 4.5, D), was den Zeitpunkt des Entwicklungsdefizits auf die positive Selektion in DP Thymozyten eingrenzt.

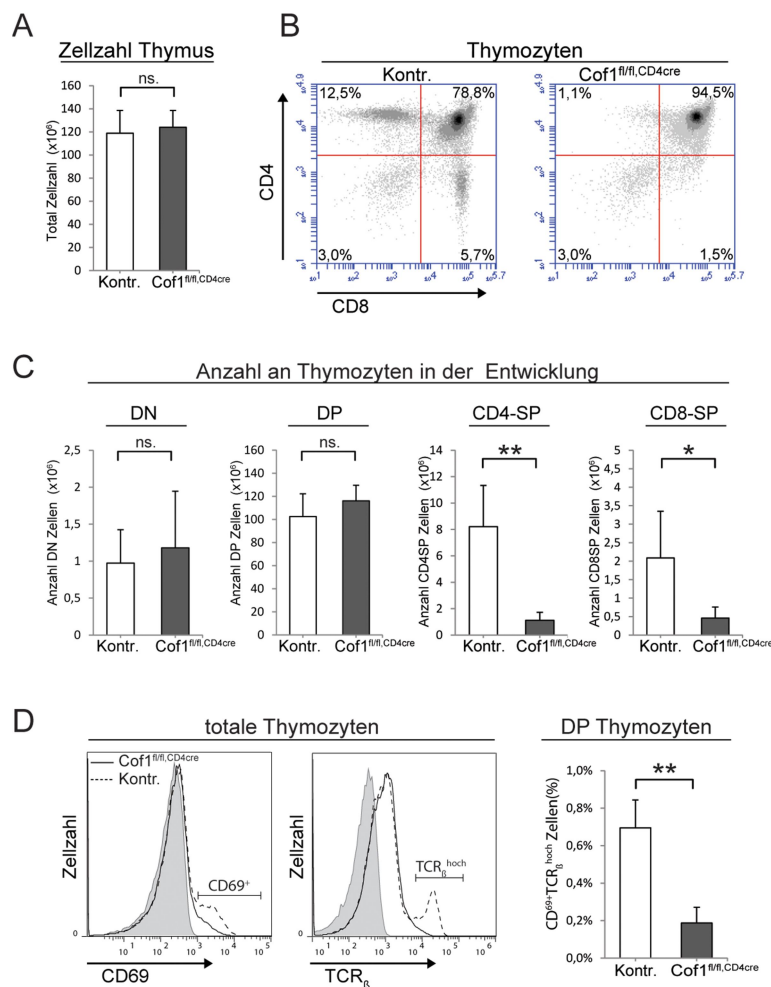


Abb.4.5 Verminderte Entwicklung von einzel-positiven Thymozyten in Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Mäusen, bei gleichbleibender Gesamt-Zellzahl.

Durchflusszytometrische Analysen zur (A) Anzahl der gesamten Zellen im Thymus von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} und Kontrollmäusen (Cof1^{wt/wt},CD4^{cre}) zeigt keine Veränderungen durch die Deletion von Cofilin 1. (B) Expression der T-Zell

Corezeptoren CD4 und CD8 auf Thymozyten von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} und Kontrollmäusen (Kontr.) zeigen eine deutliche Verminderung der CD4-SP und CD8-SP Populationen. Die Zahlen geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. (C) Anzahl an Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien im Thymus von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} und Kontrollmäusen bestätigen einen stark verminderte Entwicklung von DP zu SP Zellen. (D) Expression von CD69 sowie der T-Zell Rezeptor β -Kette in totalen Thymozyten (D, links). Gefüllte Flächen im Histogramm stellen negative Färbekontrollen dar, Klammern zeigen die TCR_β hohen sowie die CD69⁺ positiven Thymozyten an. (D, rechts) Die statistische Analyse von DP Thymozyten zeigt einen stark verminderten Anteil an DP

Thymozyten, welche positiv selektioniert wurden (CD4⁺CD8⁺TCR_β^{hoch}CD69⁺). Alle Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns 0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001 (A+C) n=5 Mäuse pro Genotyp. (B) repräsentativ für n>10 Mäuse pro Genotyp (D) n=7 Mäuse pro Genotyp.

Zusammenfassend ergaben die Entwicklungsanalysen, dass Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Thymozyten bei der positiven Selektion ein starkes Entwicklungsdefizit aufweisen, ohne dass dabei die Gesamtzahl an Zellen im Thymus beeinträchtigt ist.

4.2.5 Der Entwicklungs-Block von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Thymozyten führt zu einer drastischen Reduktion peripherer T-Zellen

Da die durchflusszytometrische Analyse in Thymozyten eine drastische Reduktion an CD4⁺ und CD8⁺ SP Thymozyten gezeigt hat (Abb. 4.5, C), wurden im Anschluss die peripheren Immunorgane Lymphknoten, Milz und Blut auf ihren Gehalt an T-Zellen hin untersucht. Wie in Abbildung 4.6 A zu erkennen, lieferte die Analyse von Lymphknoten eine drastische Reduktion des CD4 T-Zell Anteils von 31% in Kontrollen auf 6,5% in Mutanten und eine

ebenso drastische Reduktion an CD8 T-Zellen von ca. 30% in Kontrollen auf 8,2% in der konditionalen Mutante.

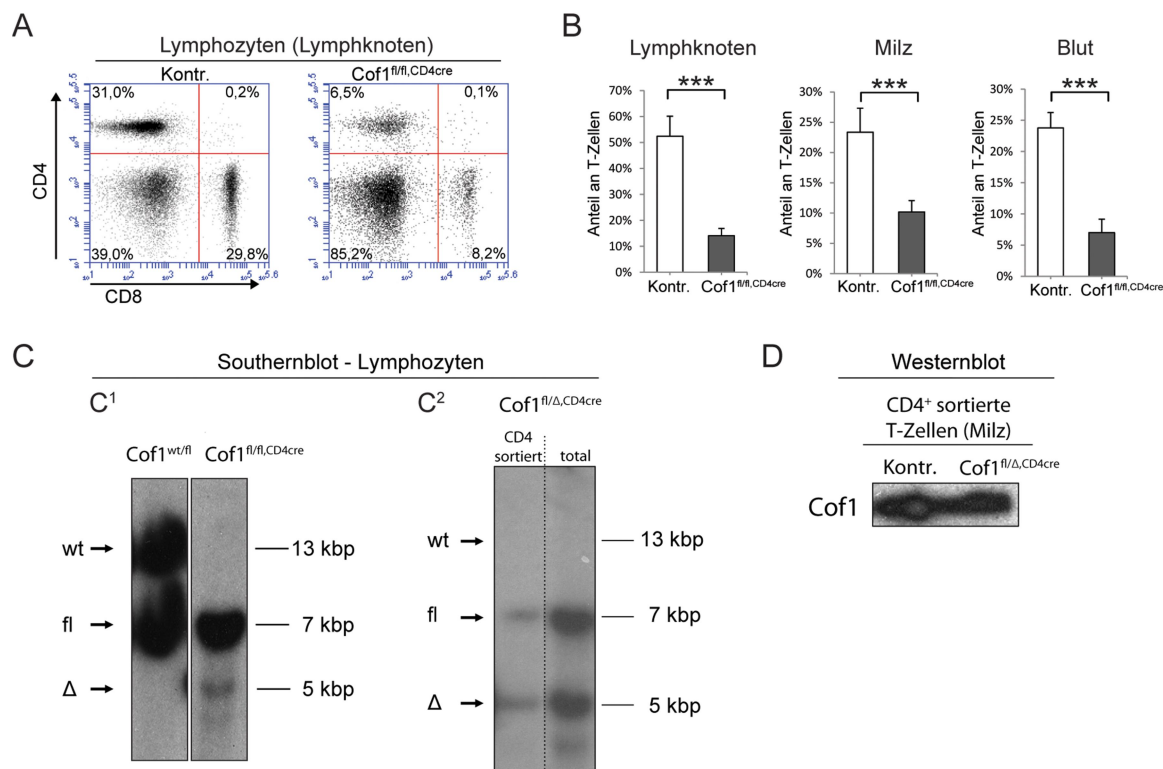


Abb.4.6 Analyse von peripheren T-Zellen in konditionalen Cofilin1/CD4Cre Mäusen. Die Untersuchung von T-Zellen aus sekundär lymphatischen Geweben von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Mäusen zeigte eine extreme Verminderung der T-Zell-Population an, welche darüber hinaus nicht durch die CD4cre-Rekombinase deletiert wurde. (A) Durchflusszytometrische Analysen zur Expression der T-Zell Corezeptoren CD4 und CD8 auf Lymphozyten aus Lymphknoten von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} und Kontrollmäusen (Cof1^{wt/wt},CD4^{cre}) (Kontr.) zeigte eine starke Verminderung von cytotoxischen T-Zellen (CD8) und T-Helfer-Zellen (CD4). Zahlen geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. (B) Statistische Analyse zum Anteil an T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben Lymphknoten, Milz und Blut von Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} und Kontrollmäusen, bestätigte eine starke Verminderung der T-Zell Population in Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Mäusen. Daten wurden durchflusszytometrisch über eine vierfach Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8, TCR_β und CD19 erhoben. (C) Southern Blot Analyse von totalen (C¹) und CD4 gesorteten (C²) Lymphozyten zeigte nur eine schwache Deletionsbande (bei 5kbp) in totalen Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Lymphozyten. Um zu verifizieren, ob die in den sekundär lymphatischen Geweben vorkommenden Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} T-Zellen erfolgreich von der CD4cre Rekombinase deletiert worden sind, wurden für (C²) Cof1^{fl/Δ},CD4^{cre} Lymphozyten durchflusszytometrisch CD4⁺ aufgereinigt und vergleichend zu Cof1^{fl/Δ} totalen Lymphozyten aufgetragen. Dabei konnte in den CD4⁺ peripheren Cof1^{fl/Δ},CD4^{cre} T-Zellen keine Verstärkung der Deletionsbande festgestellt werden. (D) Western Blot Analyse von CD4⁺ sortierten Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) von Cof1^{fl/Δ},CD4^{cre} und Kontrollmäusen bestätigt, durch vergleichbare Bandenintensität, dass keine oder nur wenig Deletion in den Cof1^{fl/Δ},CD4^{cre} CD4⁺ T-Zellen stattgefunden hat. Kontroll- und Cof1^{fl/fl},CD4^{cre} Zellen wurden im gleichen Volumen aufgetragen und zuvor in je gleicher Zellzahl in gleichem Volumen lysiert. Western Blot wurde mit Antikörper gegen Cofilin 1 (Ak.:KG60) geprobt. (A+B) n=5 Mäuse pro Genotyp. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns 0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. (C¹) repräsentativ für n>3 Mäuse pro Genotyp (C²+D) Daten zur Verfügung gestellt von C. Gruniak, Daten gepooled von n=3 Cof1^{fl/Δ},CD4^{cre} Tieren.

Die Reduktion an T-Zellen war dabei von einem Anstieg anderer Zell-Populationen in Lymphknoten begleitet (Daten nicht gezeigt). Ergänzende Messungen mit CD3_a und TCR_β als T-Zell-Marker in Milz und Blut zeigten ebenfalls eine starke Reduktion der T-Zell-Populationen an (Abb.4.6 B). Da eine korrespondierende Southern Blot Analyse nur eine sehr

schwache Deletionsbande in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Lymphozyten nachweisen konnte (Abb.4.6, C), wurden periphere CD4 positive T-Zellen aus der Milz von $Cof1^{fl/\Delta,CD4cre}$ Tieren isoliert und zusammen mit totalen Lymphozyten über Southern Blot (Abb.4.6, C) auf Deletion des geflochtenen Cofilin 1 Lokus hin untersucht. Da die Bandenstärke für das geflochte Allel nahezu mit der des deletierten Allels in T-Zellen übereinstimmt, ist davon auszugehen, dass in einem Großteil der in der Peripherie vorkommenden T-Zellen das Cofilin 1 Allel nicht durch die Cre-Rekombinase deletiert wurde. Um dies auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurde eine Western Blot Analyse mit aus der Milz aufgereinigten T-Zellen von Kontroll- und $Cof1^{fl/\Delta,CD4cre}$ Tieren durchgeführt, bei der je gleich viele Zellen pro Spur geladen wurden (Abb.4.6, C). Die Analyse zeigte dabei vergleichbare Mengen an Cofilin 1 in $Cof1^{fl/\Delta,CD4cre}$ und Kontroll T-Zellen. Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäuse einen stark verminderten Anteil an peripheren T-Zellen aufweisen, welche wahrscheinlich nicht durch die Cre-Rekombinase deletiert wurden und daher als “escaper“ Zellen klassifiziert wurden.

4.2.6 Vermehrte Anzahl an $\gamma\delta$ -T-Zellen als indirekter Effekt der Cofilin 1 Deletion in TCR_{β} T-Zellen

Da in den vorangegangenen Analysen ein Entwicklungsdefizit von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten aufgezeigt werden konnte, welcher zu einem Verlust von peripheren CD4 und CD8 T Zellen führt, stellte sich die Frage, ob auch eine andere, seltenere T-Zell Population durch den Verlust von Cofilin 1 während ihrer Entwicklung im Thymus beeinflusst wird. Gemeint sind die sogenannten $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche durch eine andere T-Zell Rezeptor Zusammensetzung charakterisiert werden als die bekannteren $\alpha\beta$ T-Zellen. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind intra-epitheliale Lymphozyten, welche in Darm, Haut und Lunge vorkommen. Sie stellen unter den T-Zellen eine eher kleine und bislang wenig erforschte Subpopulation dar, welche in der Thymozytenentwicklung vom DN2 Stadium abzweigen und weder durch die β -Selektion noch durch die positive oder negative Selektion gehen (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2010). Um $\gamma\delta$ -T-Zellen im Thymus zu untersuchen, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Untersuchung der vier doppelt negativen Stadien mit den dazugehörigen Markern CD4, CD8, CD44 und CD25 durchgeführt (Abb. 4.7, A). Interessanterweise zeigte die Analyse eine Akkumulation an Zellen im DN2 Stadium, welches als $CD4^{-}CD8^{-}CD44^{+}CD25^{+}$ definiert ist. Da in diesem Entwicklungsstadium $\gamma\delta$ -T-Zellen von der alpha/beta T-Zell Entwicklung abzweigen, war dies ein Indiz dafür $\gamma\delta$ - Zellen näher zu untersuchen. Folgende

Untersuchungen stellten einen stark erhöhten Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen, sowohl im Thymus (Abb. 4.7, B) als auch in den Lymphknoten (Abb. 4.7, C), fest.

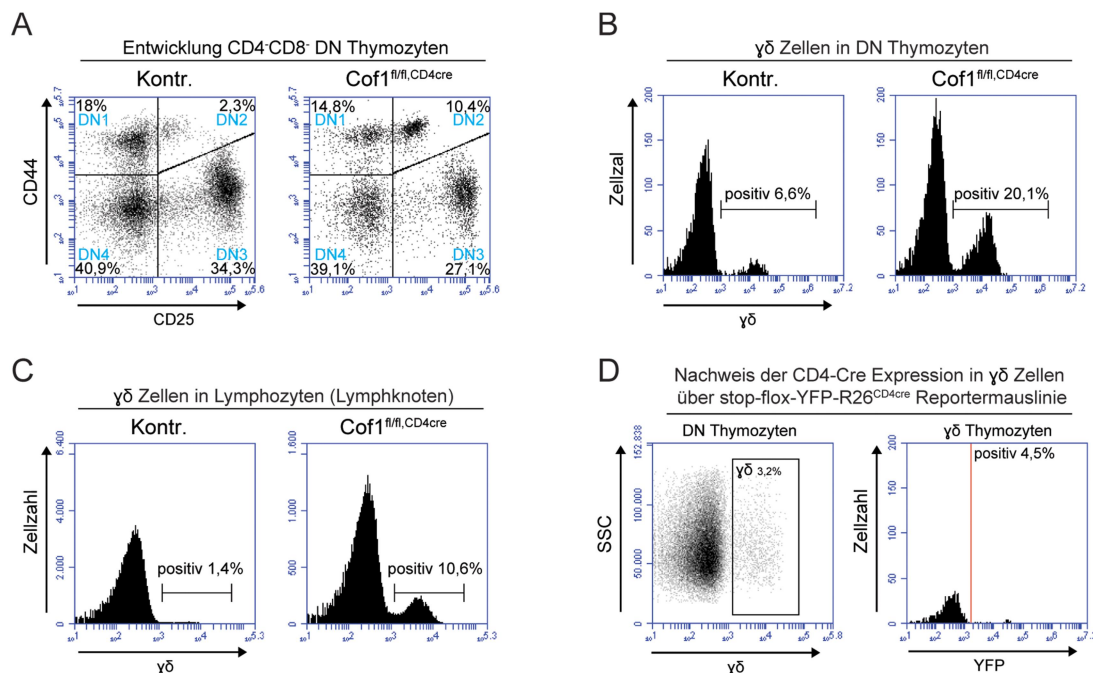


Abb.4.7 Entwicklungsanalyse der frühen DN Entwicklungsstadien in Cof1^{fl/fl,CD4cre} und Kontr. Thymozyten. Eine Analyse der frühen Entwicklungsstadien von Thymozyten zeigte einen Anstieg an $\gamma\delta$ T-Zellen in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen als sekundären Effekt der Cofilin 1 Deletion in $\alpha\beta$ Thymozyten. Durchflusszytometrische Analysen zum (A) Anteil der einzelnen DN Entwicklungsstadien von Cof1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten (Cof1^{fl/fl}), anhand einer vierfach Färbung gegen CD4,CD8,CD44 und CD25 zeigen eine Akkumulation im DN2 Stadium in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen an. (B+C) Anteil an $\gamma\delta$ in (B) DN Thymozyten und (C) Lymphozyten zeigen eine stark erhöhte Zellzahl von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Thymus und Lymphknoten von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Tieren. (D) Analyse von stop-flox-YFP-R26^{CD4cre} Thymozyten, welche für CD4,CD8 und $\gamma\delta$ gefärbt wurden. Im Dotplot (links) ist das Gating für die $\gamma\delta$ positiven Zellen in CD4⁺CD8⁻ DN Thymozyten abgebildet. Das Histogramm (rechts) zeigt einen geringen Anteil an YFPpositiven Zellen in $\gamma\delta$ Thymozyten, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die CD4Cre-Rekombinase nur in sehr geringem Anteil von $\gamma\delta$ Zellen exprimiert wird. (A-D) Gemessen wurden je $5 \cdot 10^5$ lebende Thymozyten. Die Nummern in Ecken und über den Klammern geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. Daten sind repräsentativ für (A) $n > 10$ Mäuse pro Genotyp (B+C) $n = 5$ Mäuse pro Genotyp (D) $n = 2$ Mäuse.

Da die CD4cre-Rekombinase jedoch erst ab dem DN3 Stadium exprimiert werden sollte, bestand die Frage, ob der erhöhte Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen auf die Deletion von Cofilin 1 oder auf einen sekundären Effekt zurückzuführen war. Um diese Frage zu beantworten wurde das bereits zuvor eingeführte stop-YFP-R26^{CD4cre} Reporter Maus Modell (Srinivas et al., 2001), welches die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe ermöglicht, verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass 95,5% der $\gamma\delta$ -Zellen im Thymus, keine CD4Cre-Rekombinase exprimieren und daher nicht für Cofilin 1 defizitär sind (Abb. 4.7, D). Zusammenfassend konnte in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Tieren ein erhöhter Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden, in welchen jedoch keine CD4Cre-Rekombinase exprimiert wird, weshalb ihre erhöhte Anzahl wahrscheinlich auf einen sekundären Effekt

zurückzuführen war, weswegen ihnen im weiteren Verlauf der Analysen keine Aufmerksamkeit mehr zu Teil wurde.

4.2.7 Deletion von Cofilin 1 führt zu einer Degeneration der Medulla im Thymus

Während ihrer Entwicklung durchwandern die Thymozyten verschiedene Kompartimente des Thymus. So durchwandern noch nicht positiv selektierte Thymozyten die cortikulären Areale des Thymus auf der Suche nach Antigenen, welche ihnen von verschiedenen Zelltypen über den MHC präsentiert werden (Marrack et al., 1988). Nach erfolgreicher positiver Selektion wandern die Thymozyten gerichtet von den cortikulären in die medullären Bereiche des Thymus, wo sie negativ selektiert werden, bevor sie den Thymus schließlich als T-Zelle verlassen. In histologischen Dünnschnitten von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymi wurden starke strukturelle Veränderungen (Abb. 7.8, A) gefunden. Während die allgemeine Größe der Thymi sich nicht von Kontrollmäusen unterschied (nicht gezeigt), konnte in dem Mutanten eine starke Reduktion des Anteils an medullären Bereichen beobachtet werden, wobei nur kleine vereinzelte medulläre Inseln detektiert werden konnten (Abb. 7.8, A+B).

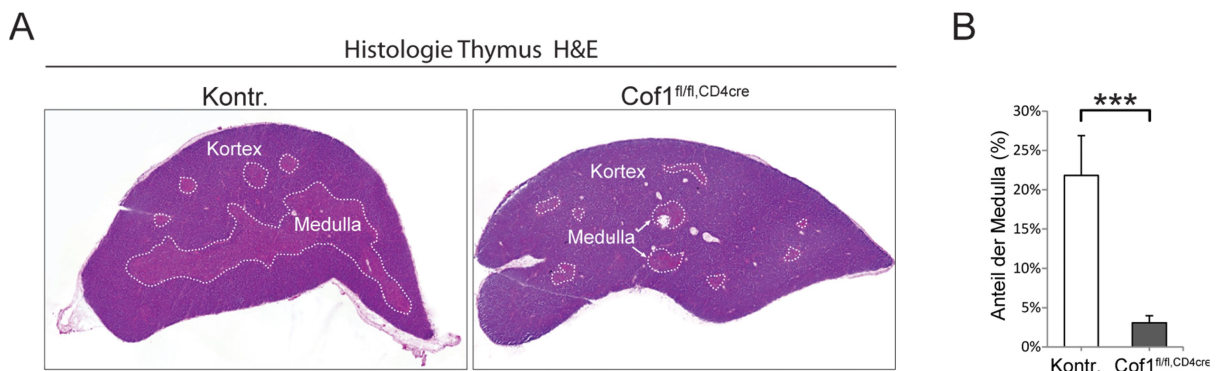


Abb.4.8 Histologische Untersuchung des Thymus von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäusen.

In (A) dargestellt sind Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbungen von 10 μ m Cryo Schnitten sechs Wochen alter $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontroll-Thymi ($Cof1^{fl/fl}$). Im $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymus ist im Vergleich zur Kontrolle nur ein rudimentärer medullärer Anteil nachzuweisen. Die medullären Bereiche erscheinen aufgrund ihrer geringeren Zelldichte hell rosa wohingegen die cortikulären Bereiche des Thymus dunkel violett gefärbt sind. Zur besseren Visualisierung wurden die medullären Bereiche mit einer weiß gepunkteten Linie umgeben. (B) Quantifizierung des Anteils der medullären Bereiche im Thymus von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäusen, ermittelt durch Vermessung des Flächeninhaltes der medullären Bereiche von (A) H&E Schnitten, bestätigt eine drastische Verminderung an medullären Anteilen in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymi. Die Gesamtgröße der Thymi unterscheidet sich hierbei allerdings nicht (nicht dargestellt). Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurde über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *** $P < 0.0001$ (A) repräsentativ für $n > 5$ Thymi pro Genotyp (B) $n = 8$ Schnitte von $n = 2$ Mäusen pro Genotyp wurden zur Quantifizierung verwendet.

Ähnliche Veränderungen in der Thymusarchitektur konnten bereits zuvor von einigen Gruppen (Philpott et al., 1992a) (Negishi et al., 1995) beobachtet werden, bei denen durch den Verlust eines Proteins ebenfalls die Entwicklung der Thymozyten zu SP Zellen stark

beeinträchtigt war. Ein Block in der positiven Selektion der Thymozyten würde dazu führen, dass so gut wie keine Thymozyten in die Medulla einwandern könnten, was wiederum zu einer Reduktion des Gewebes führen könnte. Andererseits könnte auch die Reduktion der Medulla die Entwicklung der Thymozyten beeinflussen.

4.2.8 Der Entwicklungs-Stopp in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten ist auf einen Zell-intrinsischen Effekt zurückzuführen

Um zu überprüfen, ob der Entwicklungsdefekt der mutanten Thymozyten auf eine veränderte Thymusarchitektur zurückzuführen ist, wurde eine Knochenmarktransplantation von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Zellen in einen WT Empfänger durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden in den Empfängertieren die sich schnell teilenden Stammzellen des Knochenmarks durch eine intensive Bestrahlung abgetötet. Im Anschluss erfolgt die Transplantation des Spenderknochenmarks durch eine Schwanzveneninjektion. Die Spenderzellen haben die Fähigkeit aus der Blutbahn in das Knochenmark einzuwandern und dieses neu zu besiedeln. Ist die Knochenmarktransplantation erfolgreich, so erhält man chimäre Mäuse, deren neu gebildete hämatopoetische Zell-Linien den Genotyp des Spendertieres aufweisen. Um die Gefahr einer Transplantat-Wirt-Reaktion (engl. Graft-versus-host-Reaktion) zu minimieren, wurden aus den Knochenmarkzellen vor der Transplantation CD90-positive Zellen über eine MACS Säule aussortiert. Das CD90 oder Thy-1 Protein ist ein auf T-Zellen und bestimmten Stammzellen vorkommendes Oberflächenprotein (Kisselbach et al., 2009). Da reife T-Zellen aus dem Spender jedoch die Zellen des Rezipienten als fremd erkennen und angreifen würden, müssen diese vor der Transplantation entfernt werden, um eine Endzündungsreaktion im Empfänger zu minimieren. Bei der Transplantation wurde das Knochenmark eines Spendertieres jeweils in vier Empfängertiere transplantiert. Als Bestrahlungskontrolle wurde ein Wildtyp Tier verwendet, welches nach der Bestrahlung keine Knochenmarktransplantation erhalten hat und im Laufe der darauf folgenden Woche an den Folgen der Bestrahlung verstarb. Um die Spenderzellen von denen des Empfängers unterscheiden zu können wurden $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäuse ($Cof1^{wt/wt,CD4cre}$) mit der in (Gurniak and Witke, 2007) beschriebenen GFP-Aktin Reporter Maus Linie gekreuzt, in der in allen hämatopoetischen Zellen das Fusionsprotein GFP-Aktin exprimiert wird. GFP-Aktin Mäuse wurden heterozygot gehalten und zeigten in Voruntersuchungen keinen Befund in Bezug auf die Entwicklung von T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Nachdem GFP-Aktin exprimierende Knochenmarks-Zellen von Kontroll-Tieren (GFP^+ Kontr.) in bestrahlte WT

Mäuse transplantiert wurden, konnte sechs Wochen nach der Transplantation eine normale Differenzierung der GFP⁺ Kontroll-Zellen in den chimären Tieren nachgewiesen werden (Abb. 4.9, A (links)). Die GFP⁺ Kontrollzellen differenzierten im Thymus in CD4 und CD8 SP Thymozyten und wanderten in die peripheren Immunorgane ein, wo sie als CD4 und CD8 T-Zellen in Lymphknoten (Abb. 4.9, A (links)), Milz und Blut (nicht dargestellt) nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten sich GFP⁺Cof1^{fl/fl,CD4cre} Zellen nicht im WT Thymus des Empfängertieres zu CD4 oder CD8 SP Zellen entwickeln (Abb. 4.9, A (rechts)) und zeigten im Thymus und den peripheren Immunorganen Lymphknoten, Milz und Blut den gleichen Phänotyp wie Cof1^{fl/fl,CD4cre} Tiere.

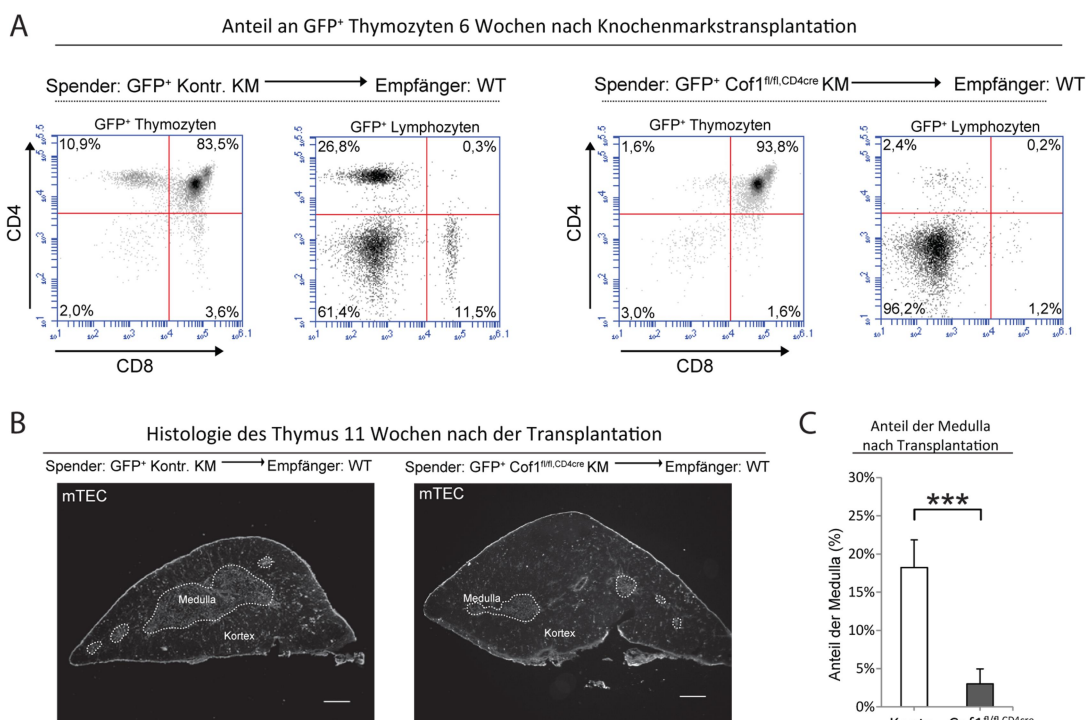


Abb.4.9 Knochenmark-Transplantation von GFP⁺ Kontroll- und GFP⁺Cof1^{fl/fl,CD4cre} Knochenmark in WT Mäuse. Um zu überprüfen, ob sich Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in einem WT Thymus entwickeln können, wurden Knochenmarkstransplantationen von Pfn1^{GFPAktin,CD4cre} (Kontr.) und Pfn1^{GFPAktin}Cof1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen, in γ -bestrahlte (9 Gray) WT Mäuse, durchgeführt und sechs Wochen nach der Transplantation auf das Vorkommen von GFP positiven Zellen im Thymus und den Lymphknoten hin untersucht. Der verwendete Reporter Pfn1^{GFPAktin} hat dabei selber keine negativen Auswirkungen auf die T-Zell Entwicklung (Daten nicht gezeigt) und wurde genutzt um die Spenderzellen von den Empfängerzellen über die Expression eines GFP-Aktin Fusionsproteins unterscheiden zu können. (A) Die durchflusszytometrische Analyse sechs Wochen nach der Transplantation konnte nur einen geringen Anteil an GFP positiven CD4⁺- oder CD8⁺ einzel-positiven Zellen im Thymus oder in den Lymphknoten in Cof1^{fl/fl,CD4cre} chimären Tieren (rechts) im Vergleich zu Kontroll-chimären Tieren (links) nachweisen, was darauf hindeutet, dass sich Cof1^{fl/fl,CD4cre} Zellen auch in einem WT Thymus nicht entwickeln können. (B) Die histologische Analyse der chimären Thymi 11 Wochen nach der Knochenmark-Transplantation durch eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf medulläre Thymus Epithelzellen (mTEC), zeigt einen deutlichen Rückgang der medullären Bereiche des ursprünglichen WT Thymus in Pfn1^{GFPAktin}Cof1^{fl/fl,CD4cre} Knochenmarkschimären, welches durch eine (C) Quantifizierung des Anteils der Medulla am Gesamtflächeninhalt des Thymus bestätigen konnte. Zur besseren Visualisierung wurden die medullären Bereiche mit einer weiß gepunkteten Linie umgeben. Größenstandard entspricht 300 μ m. (B+C) Daten repräsentativ für n=4 Schnitte pro Genotyp. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurde über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ***P<0.0001 (A) Daten sind repräsentativ für n=4 Chimären pro Genotyp.

Genau wie in $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Tieren wurden auch in den $GFP^+Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ chimären Tieren ein Arrest im DP Stadium der Thymozyten-Entwicklung im Thymus, mit nur vereinzelt detektierbaren GFP^+ T-Zellen in Lymphknoten beobachtet. Um der Frage nachzugehen, ob das Fehlen von SP Zellen im Thymus zu einer Verkleinerung der medullären Anteile führt, wurden 11 Wochen nach der Transplantation Dünnschnitte der Thymi angefertigt und über eine Immunodetektion mit mTEC spezifischen Antikörpern auf ihren Anteil an medullärem Gewebe hin untersucht (Abb. 4.9, B). Dabei wurde eine Reduktion der Medulla in $GFP^+Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ chimären Thymi beobachtet (Abb. 4.9, C). Die Analyse der medullären Thymus Epithelzellen (mTEC) unterstützt dabei die Befunde von (White et al., 2010), welche zeigen, dass einzel-positive Thymozyten für die langfristige Erhaltung und Differenzierung der mTEC Zellen essentiell zu sein scheinen. Diese bereits zum Teil in ähnlicher Form in der Diplomarbeit (Salz, 2011) gezeigten Befunde, zeigen eindrucksvoll, dass sich $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten auch in einem WT Thymus nicht zu SP T-Zellen entwickeln können und dass der Entwicklungsdefekt Zell-autonom und auf die Veränderungen Zell-intrinsischer Parameter zurückzuführen ist.

4.2.9 $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten zeigen keine veränderte Apoptose

Da die bisherigen Befunde zeigten, dass sich $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nicht über das DP Stadium hinaus entwickeln und dieser Entwicklungsdefekt Zell-intrinsische Ursachen zu haben scheint, wurde die Apoptose in Thymozyten gemessen, um zu verifizieren, ob $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten eine erhöhte Apoptoserate besitzen, welche das Fehlen von SP Zellen erklären könnte. Hierzu wurden totale und DP Thymozyten zunächst durchflusszytometrisch mit dem Apoptosemarker aktive Caspase 3 direkt nach ihrer Isolation untersucht (Abb. 4.10, A). Diese Messungen konnten keine signifikanten Veränderungen im Apoptosestatus von $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten ermitteln. Da apoptotische Zellen im Thymus jedoch sehr schnell durch Markophagen entfernt werden, ist die detektierbare Anzahl an apoptotischen Thymozyten im Thymus im stationären Zustand sehr gering (Abb. 4.10, A) und kleinere Unterschiede wären wahrscheinlich mit dieser Messmethode schwer detektierbar. Um mögliche Apoptose-Einflüsse/Veränderungen in $Cofl^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten besser sichtbar zu machen, wurden Thymozyten isoliert und vier Stunden lang unter "suboptimalen" Kulturbedingungen gehalten (37°C, 5%CO₂ RPMI ohne IL-7), um künstlich die Apoptose zu

erhöhen und den Abtransport apoptotischer Zellen zu verhindern. Die so behandelten Thymozyten wurden im Anschluss mit FITC gekoppelten Annexin-V und Propidium Iodide markiert, sowie gegen CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches sich in lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet und bei Einleitung der Apoptose auf die Außenseite der Membran transloziert wird. Jedoch konnte auch unter diesen Stressbedingungen keine signifikante Veränderung im Apoptoseverhalten von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten festgestellt werden (Abb.4.10, B).

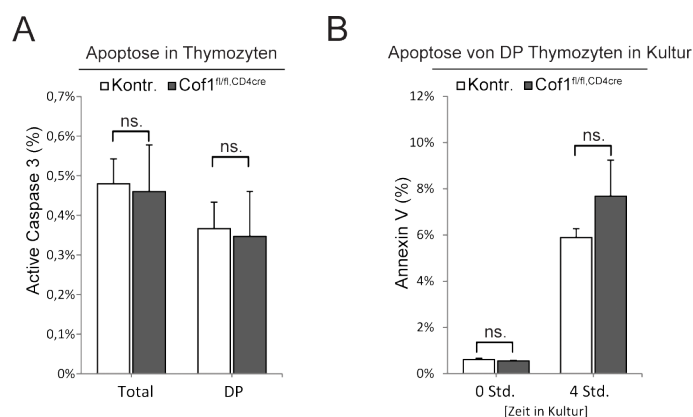


Abb.4.10 Messung der Apoptose in Thymozyten

Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose in (A) totalen und $CD4^+CD8^+$ DP Thymozyten, von Kontroll- ($Cof1^{fl/fl}$) und $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen, durch eine intrazelluläre Färbung von aktiver Caspase3, konnte keine Unterschiede zwischen den Genotypen ermitteln. (B) Analyse der Apoptose in DP Thymozyten nach 0 und 4 Stunden Inkubation in RPMI minimal Medium, über eine Annexin V Färbung, konnte nach 4 Stunden Inkubation ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen

$Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollthymozyten ermitteln. (A+B) Gemessen wurden lebende Thymozyten, deren Membranintegrität über eine 7AAD oder PI Färbung verifiziert worden ist. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt mit $ns=P>0,05$. (A) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. (B) Fehlerbalken zeigen Standard Fehler. Daten stammen von (A) $n=3$ (B) $n=5$ Mäuse pro Genotyp.

Die so erhobenen Daten deuteten nicht auf einen direkten Zusammenhang zwischen Cofilin 1 und Apoptose hin wodurch die Abwesenheit von SP Thymozyten in den Mutanten nicht mit einem direkt damit verbunden Zelltod erklärt werden kann.

4.2.10 $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten zeigen keine Veränderungen in Zellzyklus oder Proliferation.

Da, nach Abb.4.10, die Apoptose als Ursache für den Entwicklungs-Stopp unwahrscheinlich erschien, wurde untersucht, ob der Zellzyklus oder die Proliferation von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten negativ beeinflusst wurde. Messungen des Zellzyklus über den DNS Gehalt zeigten keine Abweichungen in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten (Abb.4.11, A). Ebenfalls konnten keine signifikanten Veränderungen im Proliferationsverhalten kultivierter Thymozyten festgestellt werden (Abb.4.11, B). Da Thymozyten ohne Stimulation nicht stark proliferieren

wurden die Thymozyten in Kultur künstlich mit PMA und Ionomycin zur Proliferation stimuliert. Jedoch ergaben die Messungen auch unter stimulierten Bedingungen (Abb.4.11, B (schwarze Linien)) keine signifikanten Veränderungen im Proliferationsverhalten von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten. Zusammengefasst mit dem Befund, dass eine gleiche Anzahl an Gesamt-Thymozyten gemessen wurde (Abb.4.5, A), deuteten die Daten nicht auf eine Veränderung des Proliferationsverhaltens oder des Zellzyklus in $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten hin.

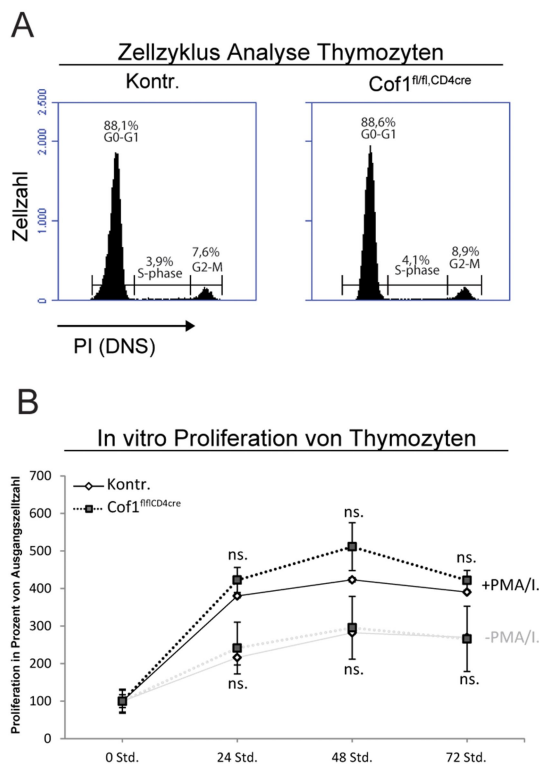


Abb.4.11 Analyse des Zellzyklus sowie der Proliferation von totalen Thymozyten.

Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus (A) von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ und Kontroll-Thymozyten ($Cof1^{fl/fl}$) (Kontr.) über die Bestimmung ihres DNS-Gehaltes mittels intrazellulärer PI Färbung konnte keine Veränderung im Zellzyklus durch den Verlust von $Cof1$ feststellen. (B) *in vitro* Proliferation von Thymozyten unter Kulturbedingungen. $5 \cdot 10^4$ $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ und Kontrollzellen wurden für 0, 24, 48 und 72 Stunden mit (schwarze Linien) und ohne (graue Linien), 10ng/ml PMA und 400nM Ionomycin in RPMI -Medium bei 37°C 5%CO₂ behandelt, daraufhin zentrifugiert und bei -80°C schockgefroren. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde die DNS der Zellen mit CyQuant™ angefärbt und die relative Zellzahl in einem Plattenlesegerät über die Fluoreszenzstärke ermittelt. Die Messungen konnten dabei keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten unter Stimulationsbedingungen oder ohne Stimulation ermitteln. (A) Daten repräsentativ für n=3 Tiere pro Genotyp. (B) Daten von n=8 unabhängigen Messungen (pro Kondition) von n=2 Tieren pro Genotyp. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt mit ns=P>0,05.

4.2.11 Der Transport von Transmembran-Rezeptoren an die Zelloberfläche ist in $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten nicht beeinträchtigt

Ein Kennzeichen der T-Zell Entwicklung ist die sequenzielle Expression unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren wie CD4 und CD8 sowie die Expression eines funktionsfähigen T-Zell Rezeptors. Allgemein wird der Transport von Rezeptoren an die Zelloberfläche durch das Zytoskelett mit gesteuert. So konnte beispielsweise in Neuronen gezeigt werden, dass Cofilin 1 und das Aktin Zytoskelett eine entscheidende Rolle bei der Diffusion des AMPA Rezeptors haben (Rust et al., 2010). Darüber hinaus zeigten neuste Veröffentlichung eine

Verbindung von Cofilin 1 zu dem trans Golgi Netzwerk (von Blume et al., 2009)(Salvarezza et al., 2009)(Rosso et al., 2004). Es wäre daher denkbar, dass der Verlust von Cofilin 1 in Thymozyten zu Veränderungen im Recycling von Oberflächenproteinen führen könnte, welches wiederum die Entwicklung der Thymozyten negativ beeinflussen könnte. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurde die von (Ohoka et al., 1996; Punt, 1996; Suzuki et al., 1995) beschriebene Methode der Rezeptor Re-Expressionsanalyse angewendet, welche auf der Abspaltung von Zelloberflächen-Proteinen durch Pronase und ihres erneuten Transportes an die Zelloberfläche basiert. Da die Corezeptoren CD4 und CD8 transmembran in ausreichender Menge in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ DP Thymozyten an der Zelloberfläche exprimiert werden, wurde ihre Reexpression nach Abspaltung durch Pronase, durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei konnte eine vollständige Wiederherstellung der CD4 und CD8 Rezeptor Expression an der Zelloberfläche von Kontroll- und $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nach 14 Stunden bei 37°C, nachgewiesen werden (Abb.4.12, A). Respektive wurde die Rezeptor Reexpression bei 4°C unterbunden, was die Abhängigkeit eines aktiven Transportes der Rezeptoren an die Zelloberfläche illustriert. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kinetik der Reexpression zwischen $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontroll-Thymozyten beobachtet werden (Abb.4.12, B), weshalb Veränderungen im Transport von Rezeptoren an die Zelloberfläche in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten als Ursache der Entwicklungsstörung eher unwahrscheinlich erschienen.

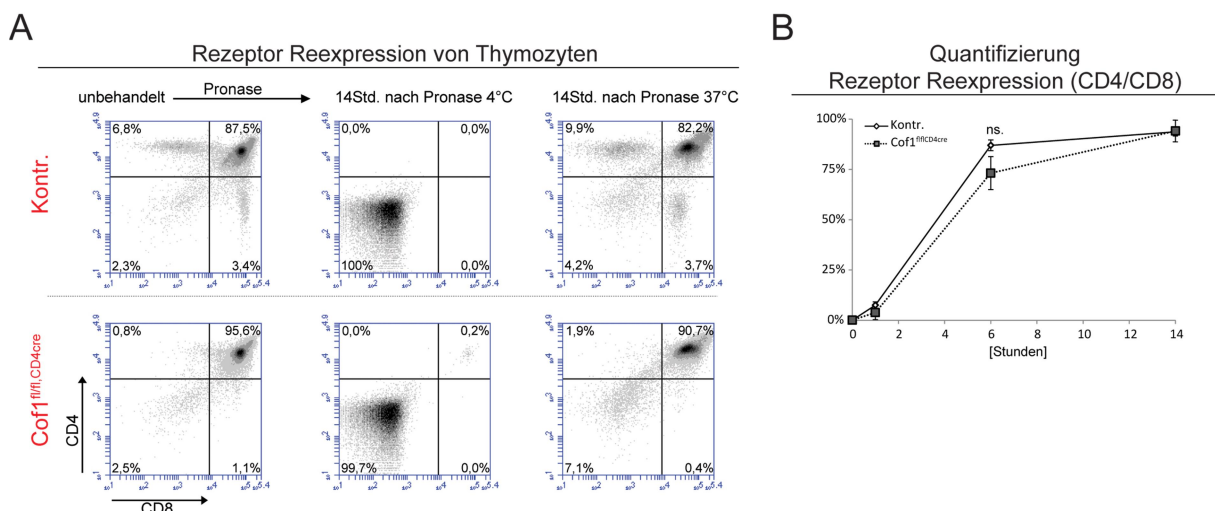


Abb.4.12 Analyse zur Rezeptor Reexpression auf der Zelloberfläche von Thymozyten. Untersuchungen zur Reexpression von CD4 und CD8 Corezeptoren an die Zelloberfläche von $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Kontrollthymozyten ($Cof1^{fl/fl}$) dokumentieren. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD4 und CD8 Expression von Pronase behandelten $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollthymozyten, welche für 14 Stunden bei 37°C oder 4°C kultiviert wurden. Die Nummern in Ecken geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. (B) Quantifizierung der CD4 und CD8 Corezeptor Reexpression, 0, 1, 6 und 14 Stunden nach der Behandlung mit 0,02% Pronase in Relation zum Anteil an $CD4^+CD8^+$ DP Zellen vor der Behandlung, deutete nicht auf eine signifikante Veränderung, des Transports der Transmembranrezeptoren an die Zelloberfläche nach dem Verlust von Cofilin 1 hin. (A+B) Daten von n=5 Mäusen pro Genotyp; (B) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt mit ns:p=0,08.

4.2.12 Cofilin 1 ist nicht essentiell für die frühe Aktivierung von Thymozyten *in vitro*

Im Zuge der positiven Selektion der Thymozyten im Thymus werden diese auf die Funktion ihres sich entwickelnden T-Zell Rezeptors getestet (Sebzda et al., 1999), (Starr et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei der positiven Selektion der CD4⁺CD8⁺ DP Thymozyten T-Zell Rezeptor assoziierte Signale mit der Expression von CD69 gekoppelt sind (Swat et al., 1993), (Yamashita et al., 1993). Da durch vorherige Experimente gezeigt wurde, dass die CD69 Expression in DP Thymozyten von Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Mäusen vermindert ist (Abb.4.5, D), lag die Frage nahe, ob die mutanten Thymozyten prinzipiell in der Lage sind, positive Signale über ihren sich entwickelnden T-Zell Rezeptor zu empfangen. Um diese Frage zu adressieren, wurde ein für T-Zellen beschriebenes Aktivierungsprotokoll (Klemke et al., 2008) in leicht abgewandelter Form angewendet, um die Expression von CD69 als Aktivierungsmarker *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurden frisch isolierte totale Thymozyten für 20 bzw. 44 Stunden mit Antikörpern gegen CD3 sowie CD28 behandelt und so über ihren sich entwickelnden T-Zell Rezeptor stimuliert (Klemke et al., 2008). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten bei frisch isolierten unbehandelten Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten erneut signifikant verminderte Anteile an CD69-positiven Zellen (Abb.4.13), jedoch interessanterweise keine Veränderungen in deren Aktivierbarkeit. Die Behandlung der Thymozyten führte sowohl bei Kontroll- als auch bei mutanten Zellen zu einer sprunghaften Erhöhung des Anteils an CD69 positiven Zellen.

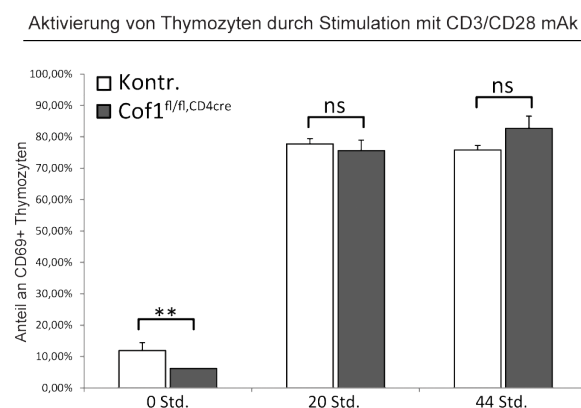


Abb.4.13 Aktivierung von Thymozyten über CD3 und CD28. Durchflusszytometrische Analyse des frühen T-Zell Aktivierungsmarkers CD69, vor und 20 bzw. 44 Stunden (Std.) nach Stimulation mit CD3 (2µg/ml) und CD28 (10µg/ml) an Platte gebundenen Antikörpern, von Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} und Kontrollthymozyten (Cof1^{fl/fl}). Die Messungen ergaben einen signifikant geringeren Anteil an CD69 positiven Zellen im unstimulierten Zustand direkt nach der Isolation aus dem Thymus. Durch die *in vitro* Stimulation konnte jedoch kein Unterschied über CD69 in der Stimulierbarkeit von Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten nachgewiesen werden. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden über einen

ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns 0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; n=4 Mäuse pro Genotyp.

Darüber hinaus konnte nach der Behandlung kein signifikanter Unterschied in der CD69 Expression zwischen Kontrolle und Mutante mehr beobachtet werden. Alles in allem konnten

diese Experimente zeigen, dass $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten unter Kulturbedingungen stimuliert werden können, weshalb davon auszugehen war, dass der Verlust von Cofilin 1 keine messbaren Auswirkungen auf diese T-Zell Rezeptor abhängige Signalkaskade innerhalb der Zelle hat, wobei Veränderungen anderer T-Zell Rezeptor abhängiger Signalwege nicht formal durch diese Befunde auszuschließen sind.

4.2.13 Verminderte Adhäsion von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten an ICAM-1

Die Thymozyten durchwandern während ihrer Entwicklung den Thymus und sind, um sich erfolgreich differenzieren zu können, auf einen Signalaustausch über direkten Zell-Zell Kontakt mit andern Zellen, wie beispielsweise medullären Thymus Epithelzellen, angewiesen (Bouso et al., 2002). Wie die *in vitro* Stimulations-Experimente bereits zeigten, konnten $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten prinzipiell zur Expression von CD69 stimuliert werden, wiesen jedoch im nicht stimulierten Zustand einen wesentlich geringeren Anteil an CD69^+ positiven Zellen auf (Abb.4.13). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einem verminderten Zell-Zell Kontakt von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten begründet sein, der dazu führen würde, dass weniger oder gar keine stimulierenden Signale über den sich entwickelnden T-Zell Rezeptor empfangen werden könnten. Ein wichtiges Zielprotein in diesem Zusammenhang stellt das β_2, α_L -Integrin LFA-1 dar, von dem angenommen wird, dass es für die Interaktion von Thymozyten mit Epithelzellen im Thymus wichtig ist und folglich eine gewichtige Rolle für die Differenzierung der Thymozyten spielt (Fine and Kruisbeek, 1991), (Singer et al., 1990). Um diese Hypothese zu testen wurden im Folgenden Untersuchungen zur Bindung von Thymozyten an ICAM-1 beschichtete Oberflächen durchgeführt. Da von naiven T-Zellen bekannt ist, dass die Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 unter nicht-stimulierten Bedingungen sehr gering ist (Lub et al., 1997), wurden die Thymozyten mit SDF-1 α stimuliert, um deren Adhäsion zu erhöhen. Von SDF-1 ist darüber hinaus bekannt, dass es von Stroma-Zellen im Thymus produziert wird und eine Rolle bei der Aktivierung von β_2 -Integrinen (Lub et al., 1997), (Peled et al., 2000) und in der Entwicklung der Thymozyten (Takahama, 2006), (Norment and Bevan, 2000), (Uehara et al., 2002) spielt. Zu Beginn der Analysen musste sichergestellt werden, dass sich $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten in ihrer Expression an Rezeptormolekülen für ICAM-1 und SDF-1 an der Zelloberfläche nicht von Kontrollthymozyten unterscheiden. Zu Diesem Zweck wurden die Thymozyten mit Antikörpern gegen CD11a und CD18 sowie gegen CD184 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Voruntersuchungen zeigten dabei weder Abweichungen in den beiden Ketten

CD11a und CD18 des ICAM-1 Rezeptors (Abb.4.14.1, A), noch Abweichungen des SDF-1 Chemokin-Rezeptors CD184 (Abb.4.14.1, B).

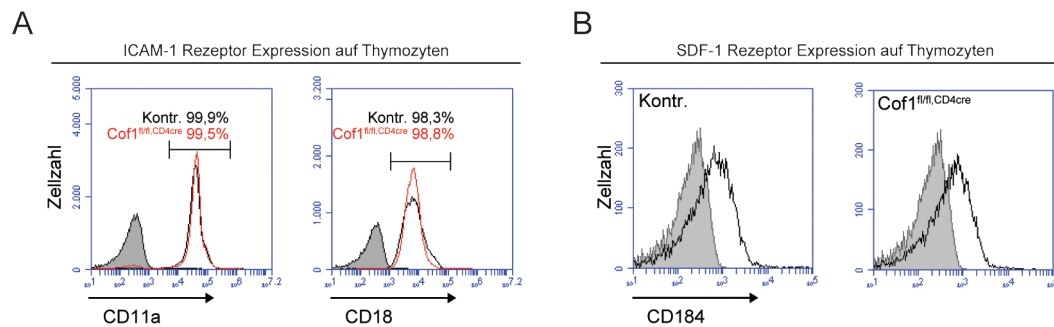


Abb.4.14.1 Nachweis des ICAM-1 und SDF-1 Chemokin Rezeptors. Durchflusszytometrische Analysen zur Expression des ICAM-1 Rezeptors LFA1 sowie des SDF-1 Chemokin Rezeptors CXCR4, ergaben keine Veränderungen in Menge dieser Rezeptoren an der Oberfläche von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. **(A)** Expression der beiden LFA-1 (ICAM-1 Rezeptor) Ketten CD11a und CD18 auf Cof1^{fl/fl} (Rot) und Kontroll- (schwarz) Thymozyten (Cof1^{fl/fl}). **(B)** Expression des SDF-1 Chemokin Rezeptors CD184 gleich auf Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten der Expression auf Kontrollthymozyten. **(A+B)** Gefüllte **graue** Fläche im Histogramm repräsentiert eine negative Färbekontrolle. Daten repräsentativ für n=3 Mäuse pro Genotyp.

Im Folgenden wurde die Adhäsion von Cof1^{fl/fl,CD4cre}- und Kontrollthymozyten auf mit ICAM-1 beschichteten Kulturschalen untersucht (Abb.4.15.2, A). Die Analysen zeigten dabei eine signifikant schlechtere Bindung von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten an die mit ICAM-1 beschichteten Plastikoberfläche (Abb.4.15.2, A+B). Darüber hinaus konnte keine erhöhte Adhäsion der Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten durch SDF-1 α Stimulation beobachtet werden, wohingegen SDF-1 α die Adhäsion von Kontrollthymozyten signifikant erhöht hat (Abb.4.14.2, B). Neben der Adhäsion wurde im gleichen Versuchsaufbau auch das Ausbreitungsverhalten (Spreading) der Thymozyten untersucht (Abb.4.14.2, C). Dabei zeigte sich, dass der Anteil der ausgebreiteten Thymozyten auf ICAM-1 beschichtetem Untergrund in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten ebenfalls signifikant geringer war. Ähnliche Ergebnisse konnten unter PMA Stimulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt); Kontrollthymozyten zeigten auch unter PMA Stimulation eine verstärkte Adhäsion sowie Ausbreitung, wohingegen die Adhäsion und Ausbreitung von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten unbeeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt).

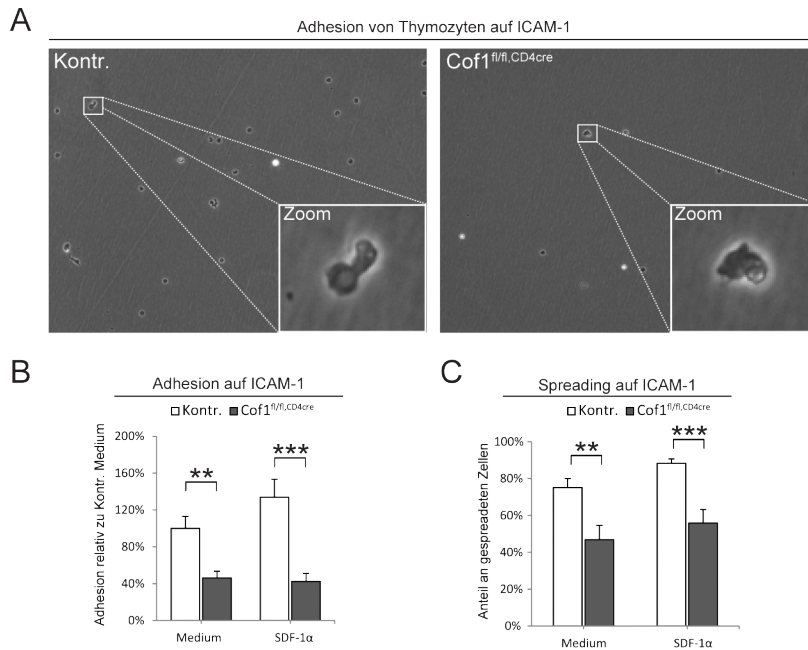


Abb.4.14.2 Analyse zur Adhäsion und Ausbreitung von Thymozyten auf ICAM-1 beschichtetem Untergrund. Versuche zur Adhäsionsfähigkeit von Thymozyten ergaben, dass Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten signifikant schlechter auf ICAM-1 überzogenem Untergrund adhären als Kontrollthymozyten (Cof1^{fl/fl}), und sich dabei weniger ausbreiten (Spreading). (A) Mikroskopische 10x Phasenkontrast Aufnahmen von an ICAM-1 gebundenen Cof1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten auf Kulturschalen. In den unteren rechten Ecken ist je eine digitale Vergrößerung (Zoom) eines ausgebreiteten Thymozyten exemplarisch abgebildet. (B) Statistische Analyse der Adhäsionsfähigkeit von Cof1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten auf ICAM-1 überzogenen Kulturschalen im nicht stimulierten (Medium) oder SDF-1α (400ng/ml) stimulierten Zustand. Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die nicht stimulierte Kontrolle (=100%) normalisiert. Adhäsion erfolgte über 60 Minuten bei 37°C 5% CO₂. (C) Analyse zum Anteil an ausgebreiteten (engl. spreading) Zellen der an ICAM-1 adhären Zellen aus (B) zeigte eine signifikante Verminderung im Ausbreitungsverhalten von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. (B+C) Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten wurden auf Normalverteilung über einen Shapiro-Wilk Test getestet. Daten aus n=21 gezählten Platten (pro Kondition) von n=3 Mäusen pro Genotyp

Zusammengenommen deuteten die Analysen auf eine wichtige Rolle von Cofilin 1 in der ICAM-1/LFA-1-vermittelten Adhäsion von Thymozyten und damit verbundenen Veränderungen der Zellgestalt (“Spreading“) hin. Darüber hinaus wurde eine mögliche Verbindung zwischen Cofilin 1 und der Aktivierung von β2-Integrinen, wie z.B. LFA-1, beobachtet.

4.2.14 Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigen eine verminderte

Migration in “Transwell“-Versuchen

Abgesehen von direkter Zell-Zell Interaktion sind Integrin-abhängige Zell-Substrat Bindungen ein essentieller Bestandteil von Zellbewegung auf zweidimensionalen Untergründen (Vicente-Manzanares et al., 2009) und könnten daher ebenfalls die Migration von Thymozyten beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist für reife T-Zellen auf zweidimensionalem Untergrund ein Integrin-abhängiger amöboider Bewegungsvorgang

beschrieben (Friedl et al., 2001), (Friedl and Weigelin, 2008). Da die vorangegangenen Analysen sowohl eine starke Veränderung der Aktin Homöostase als auch eine verringerte Integrin-vermittelte Adhäsion von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten beobachten konnten, war anzunehmen, dass das Migrationsverhalten von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten ebenfalls beeinträchtigt sein könnte, welches wiederum einen Einfluss auf die Entwicklung der Thymozyten haben könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen wurden Thymozyten im “Transwell“ auf ihre gerichtete Migration zu den Chemokinen SDF-1 α und CCL25 hin untersucht, wobei Thymozyten durch eine Membran mit 5 μ m Porendurchmesser von einer oberen Kammer in eine untere mit Chemokin angereicherte Kammer migrieren mussten. Die verwendeten Chemokine SDF-1 α und CCL25 sind im gesamten Thymus anzutreffen (Zaitseva et al., 1998), (Wurbel et al., 2000) und konnten in vergleichbaren Experimenten erfolgreich Thymozyten aller Entwicklungsstufen zur gerichteter Migration stimulieren (Phee et al., 2010b). Zur Bestimmung der ungerichteten Migration wurden Zellen ohne Chemokin-Stimulation nach fünfständiger Inkubation aus dem unteren Kompartement isoliert und mit einem Durchflusszytometer gezählt. Im Vorfeld der Migrationsanalysen konnten, wie bereits für den SDF-1 Rezeptor CD184 (Abb.4.14.1, B) gezeigt, auch für den CCL25 Rezeptors CD199 (Abb.4.15.1) durchflusszytometrisch keine Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten festgestellt werden.

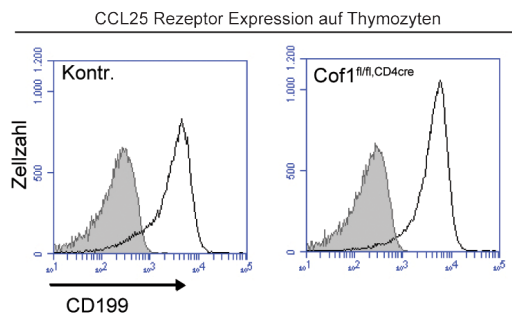


Abb.4.15.1 Nachweis des CCL25 Chemokin-Rezeptors auf Thymozyten. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD199 (CCR9) auf der Zelloberfläche von Kontroll- und $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten. Gefüllte graue Fläche in Histogrammen repräsentiert eine negative Färbekontrolle. Daten repräsentativ für n=3 Mäuse pro Genotyp.

Aufgrund der Messergebnisse war davon auszugehen, dass ein eventuell verändertes Migrationsverhalten nicht auf unterschiedlich hohe Rezeptorlevel zurückzuführen ist. Die Transwell-Analysen von totalen Thymozyten zeigten hierbei, im Gegensatz zu den Adhäsionsversuchen (Abb.4.14.2), dass sowohl $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ – als auch Kontrollthymozyten durch die Chemokine zu einer verstärkten Migration angeregt werden konnten (Abb.4.15.2, A), wobei die Migration zu SDF-1 α stärker ausgeprägt war als zu CCL25. Darüber hinaus war die Migration von totalen $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten ins untere Kompartement unter allen Bedingungen signifikant geringer als die von Kontrollzellen (Abb.4.15.2, A). Um die

Auflösung des Experiments zu erhöhen, wurden die Zellen nach Migration zusätzlich mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt, um den Anteil an DP Zellen bestimmen zu können, der ins untere Kompartiment migriert ist (Abb.4.15.2, B). Die Ergebnisse des Migrationsverhaltens von DP Thymozyten gleichen denen von totalen Thymozyten, mit dem Unterschied, dass für SDF-1 α -stimulierte Bewegung kein signifikanter Unterschied gemessen werden konnte, wobei dennoch eine starke Tendenz zu beobachten war ($p=0,06$).

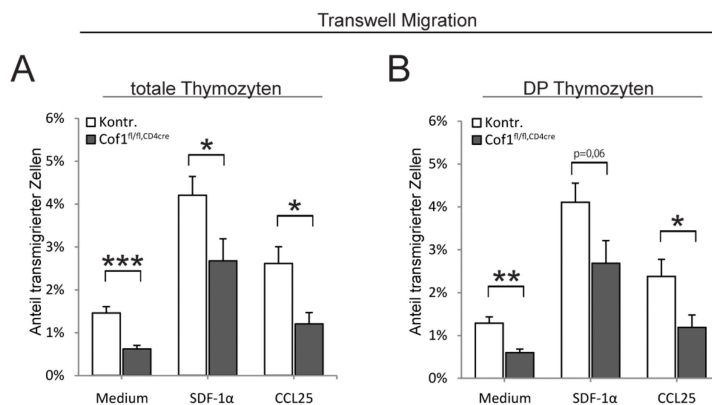


Abb.4.15.2 Transwell Migration von totalen oder CD4⁺CD8⁺ DP Thymozyten in Abhängigkeit der Chemokine SDF-1 α oder CCL25. Transwell Migrationsversuche ergaben eine signifikant verringerte Migration von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in das untere Transwell Kompartiment, sowohl unter ungerichteten (Medium) als auch in durch die Chemokine SDF-1 α oder CCL25, gerichteten Bedingungen. (Für die Analyse wurden je $3 \cdot 10^5$ Thymozyten in das obere Kompartiment eines Transwell Einsatzes ($5 \mu\text{m}$)

gegeben. Nach fünfstündiger Migration wurden alle Thymozyten aus dem unteren Kompartiment isoliert, mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCR β gefärbt und ihre Zellzahl mit einem Durchflusszytometer bestimmt. (A) Statistische Analyse des Anteils an ins untere Kompartiment migrierten totalen Thymozyten in Relation zu den im oberen Kompartiment eingesetzten $3 \cdot 10^5$ Thymozyten (100%). (B) Wie (A) mit dem Anteil an CD4⁺CD8⁺ DP Thymozyten im unteren Kompartiment im Verhältnis zur Ausgangsmenge von DP-Thymozyten, die ins obere Kompartiment eingesetzt wurden. (A+B) Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Daten wurden auf Normalverteilung über einen Shapiro-Wilk Test getestet. Daten von Medium $n=10$, SDF1 und CCL25 $n=6$ unabhängigen Experimenten von $n=3$ Mäusen pro Genotyp.

Zusammengenommen konnte durch Transwell Analysen ein stark beeinträchtigt Migrationsverhalten von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten gezeigt werden, wobei sie in ihrer Migration jedoch noch durch Chemokine stimuliert werden konnten.

4.2.15 Verringerte dreidimensionale Migration von Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in Kollagen-Gel

Untersuchungen an reifen T-Zellen haben gezeigt, dass sich diese in dreidimensionalen Umgebungen über einen Integrin-unabhängigen Bewegungsvorgang fortbewegen können, bei welchem die Bewegung hauptsächlich durch einen konstanten Aktin-Fluss generiert wird (Wolf et al., 2003), (Woolf et al., 2007). Da die *in vivo* Migration der Thymozyten durch den Thymus eher in einem dreidimensionalen Kontext betrachtet werden sollte, wurden zusätzlich

zu den Transwell-Analysen, welche eher zweidimensionale Migration adressieren, ausführliche Migrations-Analysen in Kollagen-Gel durchgeführt. Ähnlich wie bei den Transwell-Versuchen wurden hierbei die Chemokine SDF-1 α oder CCL25 eingesetzt, um die Migration der Thymozyten zu stimulieren, mit dem Unterschied, dass beide Chemokine nicht in einem gerichteten Gradienten verabreicht wurden, sondern gleichverteilt in der Gel-Matrix vorlagen, um die ungerichtete Migration zu stimulieren. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, da zwei Photon Mikroskopie Experimente von (Witt et al., 2005b) zeigen konnten, dass sich Thymozyten vor der positiven Selektion in einem zufälligen Migrationsmuster bewegen und erst nach positiver Selektion gerichtet in die medullären Bereiche des Thymus wandern. Bei der Analyse der Migrationsvideos fiel zunächst auf, dass sich signifikant weniger Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten im Kollagen Gel bewegen als Thymozyten von Kontrollmäusen (Abb.4.16.1, A). Darüber hinaus konnte ähnlich wie beim Transwell-Experiment eine signifikant erhöhtes Migrationsverhalten in mutanten und Kontrollthymozyten sowohl unter SDF-1 α - als auch unter CCL25-Stimulation beobachtet werden (Abb.4.16.1, A). Bei der folgenden Analyse der Migrationsgeschwindigkeit der sich bewegenden Thymozyten beider Genotypen wurde festgestellt, dass sich Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zudem im Mittel (bzw. Median) weniger schnell im Kollagen-Gel fortbewegen (Abb.4.16.1, C), was in einem graphischen Migrations-Blot unter SDF-1 α -Stimulationsbedingungen (Abb.4.16.1, B) exemplarisch dargestellt wurde. Der Blot in Abbildung 4.16.1, B illustriert dabei die ungerichtete Migration der Zellen, welche häufigen Richtungswechseln unterworfen sein kann. Da Richtungswechsel eine dynamische Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts voraussetzen, wurde der Direktionalitätsindex für die migrierenden Zellen im Kollagen Gel bestimmt, welcher auch bei ungerichteter Migration ein Maß für die Persistenz der Bewegung darstellt. Die Analyse ergab jedoch keine Veränderungen, in der Direktionalität von Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten (Abb.4.16.1, D), was auf einen ähnlich häufigen Richtungswechsel im Vergleich zu Kontroll-Thymozyten hinwies.

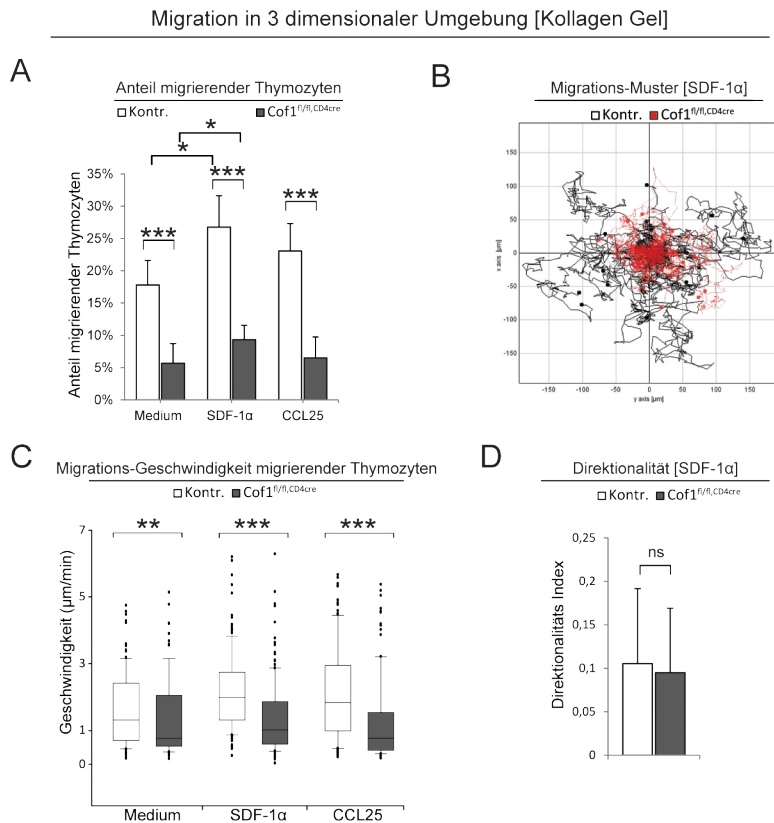


Abb.4.16.1 Migration von Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung (Kollagen Gel). Migrationsanalysen, während sechsständiger Migration, in dreidimensionaler Umgebung haben gezeigt, dass $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ im Vergleich zu Kontrollthymozyten ($\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$) einen wesentlich geringeren Anteil an migrierenden Zellen aufweisen und das deren Migrationsgeschwindigkeit darüber hinaus signifikant verringert ist. (A) Graph zeigt den Anteil an migrierenden Thymozyten in Kollagen Gel (3mg/ml) unter der Präsenz oder Absenz der Chemokine SDF-1 α (400ng/ml) oder CCL25 (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), während sechs stündiger Migration, aufgenommen durch Timelapse Phasenkontrast Mikroskopie. (Als migrierend wurden Zellen definiert, die während der 6 Stunden mehr als 1 μm Strecke zurückgelegt haben. Analysiert wurden alle im jeweiligen Bildausschnitt sichtbaren Zellen). Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt $***P < 0.001$. Daten von $n=4$ Mäusen pro Genotyp. (B) Schematische Darstellung der Migrationswege von migrierenden $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ (Rot) und Kontrollthymozyten (Schwarz) (stimuliert mit SDF-1 α) während der Migrationsphase im Kollagen Gel. (C) Statistische Auswertung der Migrationsgeschwindigkeiten von $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ und Kontrollthymozyten während Migration im Kollagen Gel, in der Präsenz oder Absenz (Medium) der Chemokine SDF-1 α oder CCL25. Die Daten sind mittels eines "box and whisker"- Plots präsentiert, in welchem die Boxen die Zone repräsentieren in der 50% der Messdaten liegen. Die Balken (whiskers) zeigen die Zone an, in der sich 95% der Messdaten befinden, wohingegen die Quer-Balken in den Boxen den Median der Migrationsgeschwindigkeit angeben. Punkte über den Balken zeigen Zellen deren Migrationsgeschwindigkeit sich nicht innerhalb des 95% Intervalls befindet. (Für die Analyse wurden nur migrierende Thymozyten betrachtet und deren Migration durch manuelles Zell-"tracking" analysiert.) (D) Analyse der Direktionalität der Zell Migration von SDF-1 α stimulierten Kontroll- und $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten während sechsständiger Migration im Kollagen Gel. Berechnet wurde der sogenannte Direktionalitäts-Index über den Quotienten aus der Euklidischen Migrationsdistanz geteilt durch die Akkumulierte Distanz, wobei ein Wert von 1 einer geraden Migrationslinie entspricht. (Das Chemokin lag gleichverteilt im Gel vor und diente der allgemeinen Stimulation der Migration, ohne einen gerichteten Gradienten vorzugeben.) (C+D) Daten von: Medium: Kontr. $n=119$, $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ $n=85$; SDF-1: Kontr. $n=144$, $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ $n=182$; CCL25: Kontr. $n=120$, $\text{Cof1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ $n=111$ getrackten Zellen, aus 4 unabhängigen Experimenten von $n=4$ Mäusen pro Genotyp. Signifikanz wurde über einen nicht parametrischen Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet.

Um ein detaillierteres Bild der Migration von Thymozyten zu erhalten, wurden im Folgenden das Migrationsverhalten einzelner Zellen über einen Zeitraum von 6 Stunden unter SDF-1 α Stimulation im Detail untersucht. Für die Analyse wurde, über den gesamten Zeitraum, die Geschwindigkeiten einzelner Zellen in 90 Sekunden Intervallen gemessen und in einer

“Binning“-Analyse der prozentuale Anteil, den die Zellen in einer gegebenen Geschwindigkeit gelaufen sind, aufgetragen (Abb.4.16.2, A+A^{II}).

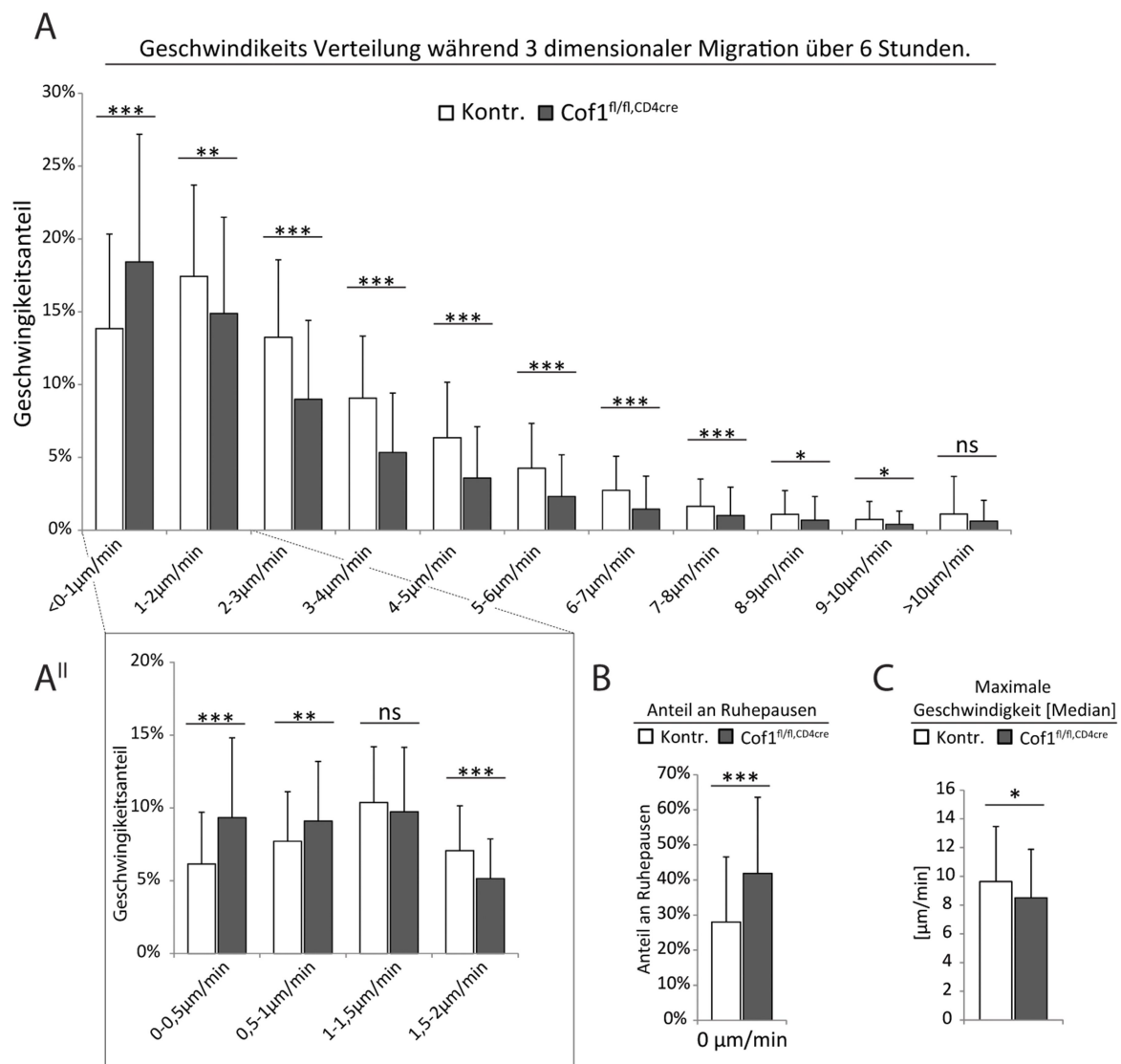


Abb.4.16.2 Detailanalysen zur Migration von SDF-1 α stimulierten Thymozyten in Kollagen Gel. Detailanalyse des Migrationsverhaltens zeigte einen erhöhten Anteil an Ruhepausen der Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten innerhalb ihrer sechsständigen Migration in Kollagen Gel, ohne dass ihre Maximalgeschwindigkeit drastisch beeinflusst wurde. (A-C) Um eine höhere Auflösung ihres Migrationsverhaltens zu erreichen, wurden für die Analysen die Geschwindigkeiten einzelner Zellen in 90 Sekunden Intervallen über sechs Stunden lang gemessen. (Daten von SDF-1 α stimulierten Zellen) (A) Binning Analyse der Anteile der einzelnen Migrationsgeschwindigkeiten an der gesamten Migration in Geschwindigkeits-Unterteilungen/Stufen von 1 μ m/min, zeigte einen höheren Anteil der Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten im unteren Geschwindigkeitsbereich von <0-1 μ m/min, innerhalb ihrer sechsständigen Migration. (A^{II}) Wie (A) mit einer feineren Geschwindigkeitsauflösung in 0,5 μ m/min Schritten im unteren Geschwindigkeitsbereich von <0-2 μ m/min. (B) Anteil an Ruhepausen, während sechsständiger Migration, in denen die Thymozyten keine Strecke zurücklegen, zeigte einen signifikant erhöhten Anteil der Ruhepausen in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. (C) Analyse der maximalen Geschwindigkeit, welche die Thymozyten innerhalb eines 90 Sekunden Intervalls, während sechsständiger Migration im Kollagen Gel, erreichen, zeigt eine signifikante jedoch keine drastische Verminderung der maximalen Geschwindigkeit in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten. (A-C) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns 0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten von n=144 Kontr., n=182 Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten von 4 unabhängigen Experimenten mit n=4 Tieren pro Genotyp.

Diese komplexe Analyse zeigte, dass $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten einen erhöhten Anteil an sehr langsamen Migrationsphasen im Bereich von 0-1 $\mu\text{m}/\text{min}$ aufwiesen. Darüber hinaus wurde in $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten ein signifikant erhöhter Anteil an Ruhepausen nachgewiesen (Abb.4.16.2, B), in denen sich die Zellen gar nicht fortbewegt haben. Interessanterweise konnte bei dieser Analyse auch beobachtet werden, dass $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten einen ähnlich großen Anteil an Migrationsphasen mit sehr schnellen Bewegungen $>10\mu\text{m}/\text{min}$ aufweisen wie Kontrollthymozyten (Abb.4.16.2, A) und dass die maximale Geschwindigkeit, welche innerhalb der sechsständigen Migration gemessen werden konnte, sich nur in geringem Maße (wenn auch signifikant) von Kontrollthymozyten unterschied (Abb.4.16.2, C). Zusammenfassend konnte ein Migrationsdefizit von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten auch in dreidimensionalem Kontext bestätigt und genauer charakterisiert werden. Die Analysen zeigten, dass auch mutante Thymozyten durch Chemokine in ihrer Migration stimuliert werden konnten, sich jedoch im Mittel signifikant langsamer bewegten. Detail-Analysen zum Migrationsverhalten einzelner Zellen konnten darüber hinaus zeigen, dass Cofilin 1-defiziente Thymozyten trotz einer leicht verminderten maximalen Migrationsgeschwindigkeit noch zu schnellen Migrationsvorgängen in der Lage sind, welche jedoch weniger häufig auftreten als in Kontrollthymozyten. Darüber hinaus pausieren mutante Thymozyten wesentlich häufiger in ihrer Migration als Kontrollthymozyten.

4.2.16 Cofilin 1 mutante Thymozyten zeigen nach SDF-1 α Stimulation eine veränderte F-Aktin-Kinetik

Vorangegangene Analysen konnten signifikante Beeinträchtigungen in Migration und Integrin-abhängiger Adhäsion von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten beobachten. Da diese hoch dynamischen Prozesse von einer schnellen Regulation des Aktin-Zytoskeletts gekennzeichnet sind (Mitra et al., 2005), (Friedl et al., 2001), wurde im folgenden Experiment der SDF-1 α -stimulierte Aktin-Umbau in $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ - und Kontrollthymozyten in einer hohen zeitlichen Auflösung analysiert, um genauere Rückschlüsse treffen zu können, ob das Fehlen von Cofilin 1 mechanistische Auswirkungen für die Zellen *in vivo* hat. Hierzu wurden Thymozyten für die angegebenen Zeitpunkte mit SDF-1 α in Kultur stimuliert und nach sofortiger Fixierung ihr F-Aktin-Gehalt durchflusszytometrisch mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin bestimmt. Für die Analyse wurden die entsprechenden Genotypen auf ihren jeweiligen Ausgangswert normalisiert, um die unterschiedlich hohen basalen Mengen an F-Aktin zu kompensieren. Die Kompensation ist notwendig da mutante Thymozyten, wie in Abbildung 4.4 gezeigt bereits

im Ruhezustand erhöhte Mengen an F-Aktin aufweisen. Es konnte, wie in der Literatur (Wabnitz et al., 2015) beschrieben, in Kontroll-Zellen ein kurzzeitiger Anstieg von F-Aktin in den ersten 30 Sekunden gemessen werden, welchem sich eine schnelle Depolymerisations-Phase anschloss, in der bereits 1 Minute nach Stimulationsbeginn der Gehalt an F-Aktin auf annähernd basale Ausgangswerte zurückging (Abb. 4.17). In $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten wurde hingegen ein signifikant höherer Anstieg an filamentösem Aktin gemessen, welcher von einer extrem verlängerten Depolymerisations-Phase begleitet wurde, in welcher der basale Ausgangswert auch 15 Minuten (nicht mehr dargestellt) nach Stimulationsbeginn nicht wieder erreicht wurde (Abb. 4.17).

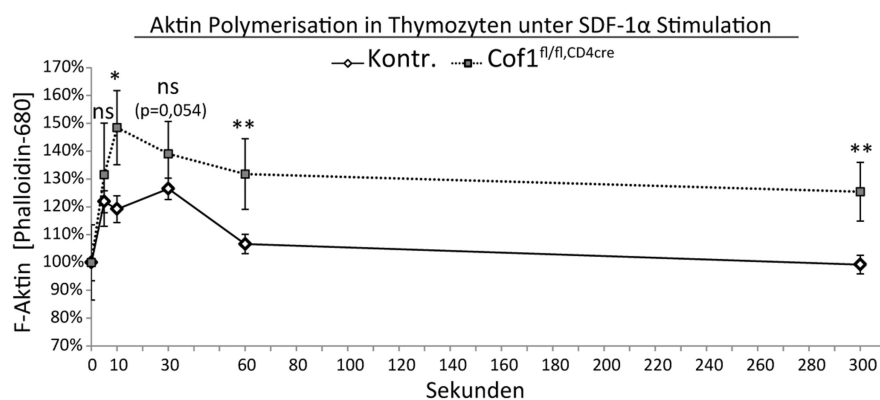


Abb.4.17 Aktin-Polymerisation in Thymozyten nach Stimulation durch SDF-1 α . In $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten konnte eine stärkere Aktin-Polymerisation nach SDF-1 α Stimulation beobachtet werden, welche von einer signifikant längeren Depolymerisationsphase begleitet wurde. Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse der Polymerisation von F-Aktin in $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ und Kontrollthymozyten nach Stimulation mit SDF-1 α (100 ng/ml), durch Färbung mit Alexa-680 gekoppeltem Phalloidin. Gemessen wurden 0, 5, 10, 30, 60, 300 und 900 (nicht dargestellt) Sekunden nach SDF-1 α Zugabe und PFA-Fixierung. Zum besseren Vergleich wurden die Fluoreszenzwerte des jeweiligen Genotyps auf den nicht stimulierten Ausgangswert (=100%) normalisiert. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns:0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten aus Duplikaten von je n=3 $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ - und n=4 Kontrolltieren pro Genotyp.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben dem basal erhöhten Anteil an F-Aktin in $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten, diese unter Stimulationsbedingungen überraschenderweise eine erhöhte Polymerisation von Aktin aufwiesen, welche von einer extrem verlängerten Depolymerisations-Phase begleitet wurde.

4.2.17 $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten können in vitro zu CD4-SP Zellen differenzieren

Zusammengenommen deuteten die vorangegangenen Analysen von $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten darauf hin, dass diese eine extrem gestörte Aktin-Dynamik aufweisen. In

Kausalzusammenhang damit wurden eine verminderte Integrin-vermittelte Adhäsion sowie verschlechterte Migrationseigenschaften als wahrscheinliche Ursachen für das Entwicklungsdefizit der Cofilin1 mutanten Thymozyten herausgestellt. Um herauszufinden ob sich $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten unter Adhäsions und Migrations unabhängigen, künstlichen Bedingungen über das DP Stadium hinaus entwickeln könnten, wurden $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ und Kontrollthymozyten einem Differenzierungsprotokoll unterzogen, welches die Differenzierung von DP Thymozyten zu CD4-SP Thymozyten *in vitro*, über die Stimulation mit Antikörpern gegen TCR_{β} und CD2, erlaubt (Cibotti et al., 1997). Das Experiment zeigte eindrucksvoll, dass sich über 50% der $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten unter den Kulturbedingungen nach 32 Stunden in CD4-SP Zellen entwickeln konnten (Abb 4.18). Unter Einbezug der unterschiedlichen Ausgangsanteile an CD4-SP Zellen zwischen Kontrolle und Mutante konnten keine signifikanten Unterschiede im Differenzierungsvermögen von DP zu CD4-SP Thymozyten beobachtet werden. In den *in vitro* differenzierten Thymozyten konnte dabei sowohl in der Kontrolle auch als in der Mutante ein Anstieg in der CD69 Expression sowie ein Anstieg an filamentösem Aktin gemessen werden, was charakteristisch für einzel-positive Thymozyten ist (Daten nicht dargestellt).

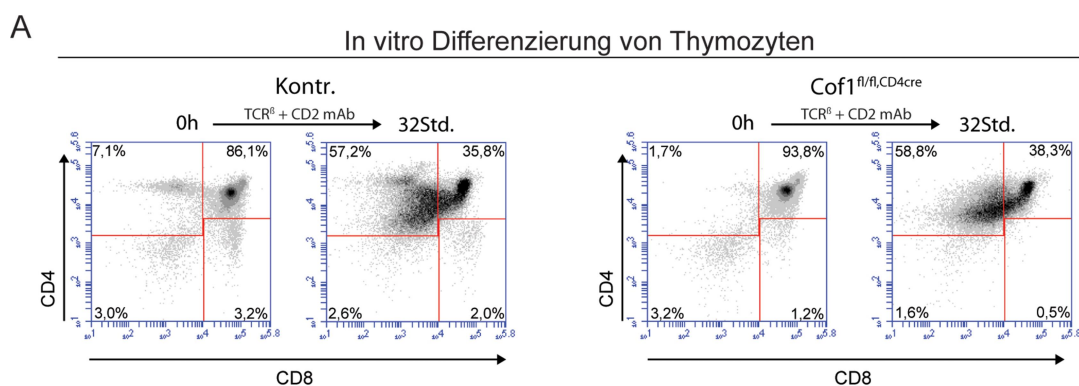


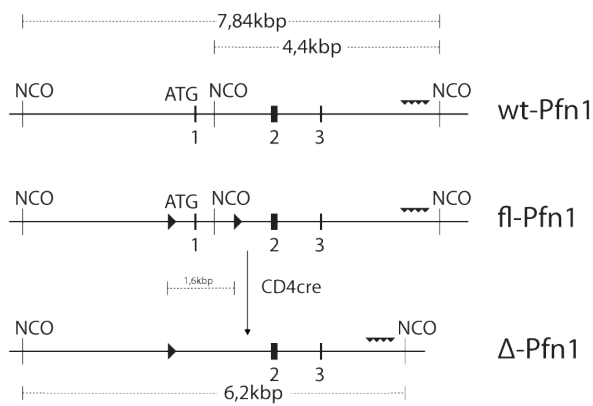
Abb.4.18 In vitro Differenzierung von Thymozyten zu CD4-SP Zellen. In vitro Differenzierung von Thymozyten durch Behandlung mit TCR_{β} und CD2 Antikörpern hat ergeben, dass $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten das Potential haben sich in $CD4^{+}$ einzel-positive Zellen zu entwickeln. Die Diagramme zeigen die durchflusszytometrische Analyse der CD4 und CD8 Expression von unbehandelten und von 32 Stunden mit, an Platte gebundenen, TCR_{β} ($5\mu\text{g/ml}$) und CD2 ($5\mu\text{g/ml}$) monoklonalen Antikörpern, behandelten Kontroll- (links) und $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten (rechts). Die Nummern in Ecken geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. Daten sind repräsentativ für $n=6$ unabhängige Experimente pro Genotyp.

Gleiche Ergebnisse konnten darüber hinaus mit einem anderen Differenzierungsprotokoll (Ohoka et al., 1996), (Zhang et al., 2002) unter Stimulation mit PMA und Ionomycin erzielt werden (Daten nicht gezeigt). In Summe konnte gezeigt werden, dass $Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten die Fähigkeit besitzen, sich zu einzel-positiven Thymozyten zu entwickeln, sie dieses Potential im Thymus jedoch nicht ausschöpfen können.

4.3 Untersuchungen zu Profilin 1 in der T-Zell Entwicklung

Nachdem mit Cofilin 1 die Bedeutung eines essentiellen Aktin-Depolymerisation-Faktors in der T-Zell Entwicklung untersucht wurde, war es von großem Interesse die Funktion der Aktin-Dynamik in reifenden T-Zellen auch von der Seite der Aktin-Polymerisation einhergehender zu betrachten. Schlüsselproteine, welche eine schnelle Polymerisation von Aktin ermöglichen, stellen Proteine der Profilin Familie dar, welche unter anderem den Austausch von ADP zu ATP in ADP-Aktin Monomeren katalysieren (Mockrin and Korn, 1980), (Goldschmidt-Clermont et al., 1992), (Pollard et al., 2003); sie kompetieren mit Thymosin β 4 um die Bindung an G-Aktin (Pantaloni and Carlier, 1993b), womit sie den zur Polymerisation befähigten Pool an G-Aktin Molekülen regulieren, der in der Zelle zur Verfügung steht. In vivo haben Profiline wahrscheinlich eine Katalysatorfunktion für Aktin Polymerisation, indem sie auch über ihre poly-L-Prolin Bindedomäne (Metzler et al., 1994), (Mahoney et al., 1999) mit einer Vielzahl von Aktin assoziierten Proteinen wie VASP (Reinhard et al., 1995), WAVE (Miki et al., 1998), WASP (Suetsugu et al., 1998) interagieren und so den Einbau von ATP-Aktin am Plus-Ende des Filaments verstärkt katalysieren können.

In diesem Zusammenhang wurden Profiline bereits als mögliche “downstream targets“ des T-Zell-Rezeptor-Signalweges postuliert (Billadeau and Burkhardt, 2006), (Billadeau et al., 2007) und ihnen eine mögliche Rolle in der Formation der immunologischen Synapse zugeordnet (Dustin and Cooper, 2000). Anders als im Falle von Cofilin 1, basierten die Erkenntnisse über Profilin fast ausschließlich auf Experimenten in anderen Zellsystemen sowie von *in vitro* Untersuchungen. Studien, welche die Funktion von Profilin in T-Zellen oder deren Entwicklung direkt adressieren, waren zu Beginn dieser Arbeit rar. Ein Hindernis die Funktion von Profilin 1 in T-Zellen direkt zu adressieren lag wohl auch in der Tatsache begründet, dass der homozygote Knockout von Profilin 1 bereits zwischen dem Zwei- und Acht-Zellstadium der Embryonalentwicklung in Mäusen zum Tod führt (Witke et al., 2001). Daher mussten, wie bereits im Falle von



NCO = NCO Schnittstelle; ▶ = loxP Stelle [fl]; | = Exon; ~~~ = Sonde

Abb.4.19 Schematischer Aufbau des Profilin 1 Lokus. Dargestellt ist der Aufbau der verschiedenen Profilin 1 Allele, wt, Kond. (fl-Pfn1) und nach CD4cre vermittelter Deletion (Δ -Pfn1) des mit loxP Stellen flankierten ersten Exons mit entsprechenden Fragmentgrößen. Die Angegebenen Fragmentgrößen, für den Southern Blot, ergeben sich aus einem NcoI Verdau, sowie Position der verwendeten DNS Sonde.

Cofilin 1, konditionale Knockout Mäuse unter Verwendung des Cre-lox-P Systems verwendet werden (Böttcher et al., 2009) um Profilin 1 in einem frühen Stadium der T-Zell Entwicklung im Thymus zu deletieren. Hierzu ist in Abbildung 4.19 der Aufbau des wt Profilin 1 Lokus sowie im konditionalen Allel die Position der lox-P Stellen, welche das erste Exon von Profilin 1 flankieren, schematisch dargestellt. Die Deletion des ersten Exons durch die Cre Rekombinase führt zu einem totalen Expressionsverlust des Profilin 1 Proteins.

4.3.1 Effiziente Deletion von Profilin1 durch die CD4cre-Rekombinase

Um die Rolle von Profilin 1 in der T-Zell Entwicklung zu untersuchen, wurden Mäuse mit geflochtenen Pfn1 Allelen ($Pfn1^{fl/fl}$) mit der bereits beschriebenen CD4cre Mauslinie gekreuzt, wodurch auch Profilin 1 in einem frühen Stadium der T-Zell Entwicklung (DN3) deletiert werden sollte (Wolfer et al., 2001). Hierbei konnte eine Southern Blot-Analyse eine effektive Deletion des ersten Exons von Profilin 1 mit einer Effizienz von über 95% in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nachweisen (Abb. 4.20, A), wohingegen keine Deletion im Schwanz oder in Lymphozyten (Lymphknoten) festgestellt wurde, was die Spezifität der Cre Rekombinase unterstreicht. Korrespondierend konnte die effiziente Deletion des Proteins in Thymozyten durch Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 4.20, B), wobei zusätzlich beachtet werden sollte, dass in die Untersuchung totale Thymozyten eingegangen sind, welche auch die Stadien DN1 und DN2 enthalten, die noch keine Cre-Rekombinase exprimieren. Zusätzlich wurden die Thymozyten auf ihren Gehalt an α -Tubulin untersucht, da in Studien an Blutplättchen ein Anstieg von α -Tubulin nach Deletion von Profilin beobachtet werden konnte (Bender et al., 2014). Die Analysen konnten jedoch in Thymozyten keine Veränderung in der Expression von α -Tubulin durch den Verlust von Profilin 1 aufzeigen (Abb. 4.20, B).

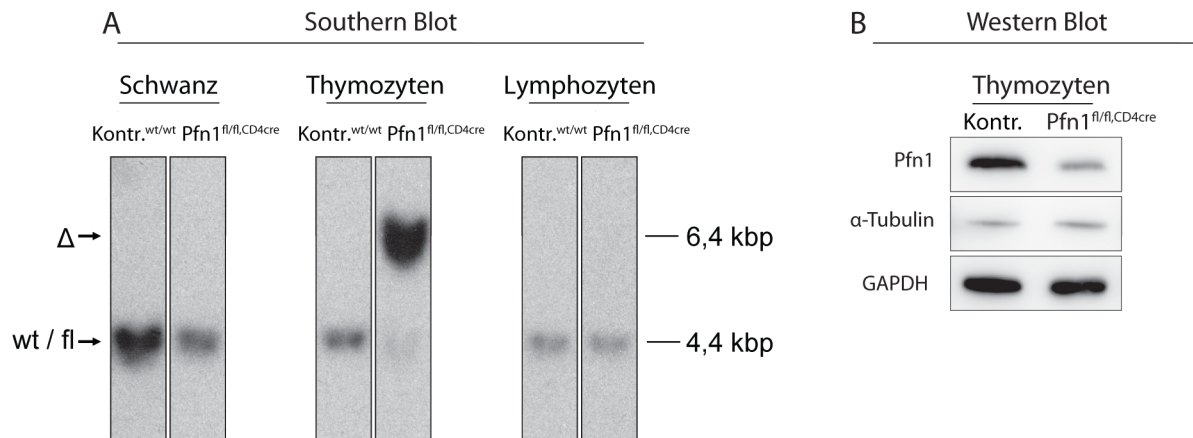


Abb.4.20 Deletionseffizienz von Profilin 1 durch die CD4cre-Rekombinase in adulten Mäusen. Die in (A) dargestellte Southern Blot Analyse zeigt eine effiziente Deletion der geflochtenen Profilin 1 DNS-Sequenz in totalen Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} Thymozyten mit ~98% (densitometrische Vermessung mit Multi Gauge) an. Im Gegensatz zu Thymozyten konnte in Schwanz und Lymphozyten DNS keine Deletionsbande in Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} Mäusen detektiert werden. Die durch die Sonde detektierbaren Fragmentgrößen ergeben sich aus dem Genetargeting, das bei der Erstellung der Maus Linien verwendet wurde und einem NCO Verdau der DNS. Für das (wt) wildtyp sowie das (fl) geflochte Allel von Profilin 1 entsteht so ein Fragment, welches nach Auftrennung bei etwa 4,4 kbp durch die radioaktive Sonde detektiert wird. Entsprechend ergibt sich für das durch die Cre-Rekombinase deletierte Allel (Δ) eine Bande bei 6,4 kbp. Korrespondierend zeigt die in (B) dargestellte Western Blot Analyse von Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} und Kontroll- (Kontr.) Thymozyten (Genotyp Pfn1^{fl/fl}), eine starke Reduktion des Profilin 1 (Pfn1) Proteins in Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} Thymozyten (Ak.: P1T). Darüber hinaus wurde der Blot gegen α-Tubulin (Ak.: α-Tubulin) geprobt um zu ermitteln, ob der Verlust von Profilin 1 zu einer veränderten Expression an α-Tubulin führt, wie es zuvor für andere Zelltypen beschrieben wurde. 10µg Protein pro Probe nach Bradford zusätzlich wurde gegen GAPDH als Lademengenabgleich geprobt. (A) Daten sind repräsentativ für >3 Tiere pro Genotyp. (B) Daten sind repräsentativ für >5 Tiere pro Genotyp.

In Summe konnte eine effiziente Deletion von Profilin 1 sowohl auf DNS als auch auf Protein Ebene in totalen Thymozyten durch die CD4cre-Rekombinase nachgewiesen werden.

4.3.2 Ein “Knockout“ von Profilin 1 in Thymozyten führt zu verringerten Mengen von F-Aktin

Nach dem Nachweis einer effizienten Deletion des Profilin 1 Proteins in Thymozyten (Abb. 4.20, B) durch die CD4cre-Rekombinase wurde untersucht, ob der Verlust des Proteins Auswirkungen auf den stationären Zustand des Aktin Zytoskelets hat. Hierzu wurden, analog zu den Messungen der Cof1^{fl/fl}, CD4^{cre} Thymozyten, durchflusszytometrische Analysen zu F- und G-Aktin durch Färbung mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin und DNaseI an Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} und Kontrollthymozyten durchgeführt. Die Analysen zeigten dabei eine signifikante Reduktion von über 25% an filamentösem Aktin in Pfn1^{fl/fl}, CD4^{cre} im Vergleich zu Kontrollthymozyten (Abb.4.21, A), bei gleichzeitigem Anstieg des globulären Aktin Gehalts (nicht dargestellt). Die Reduktion von F-Aktin konnte darüber hinaus auch durch biochemische Sedimentationsanalysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Da von

vorrangegangenen Analysen bekannt war, dass Profilin 1 zudem während der Entwicklung der Thymozyten in seiner Expression gesteigert wird (Abb.4.1, A+B), wurde zusätzlich der Gehalt von F-Aktin in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien DN, DP, CD4-SP, CD8-SP der T-Zell Entwicklung untersucht. Die Analysen der durchflusszytometrischen Vierfach-Färbung zeigten, wie bereits an totalen Thymozyten zuvor, eine signifikante Reduktion des F-Aktin Gehaltes in allen vier Entwicklungsstadien. Darüber hinaus konnte besonders in den CD4 und CD8 einzel-positiven Entwicklungsstadien ein massiver Rückgang von weit über 50% an F-Aktin beobachtet werden (Abb.4.21, B), womit die Stärke der F-Aktin Reduktion mit der Expression des Profilin1 Proteins korreliert (Abb.4.1).

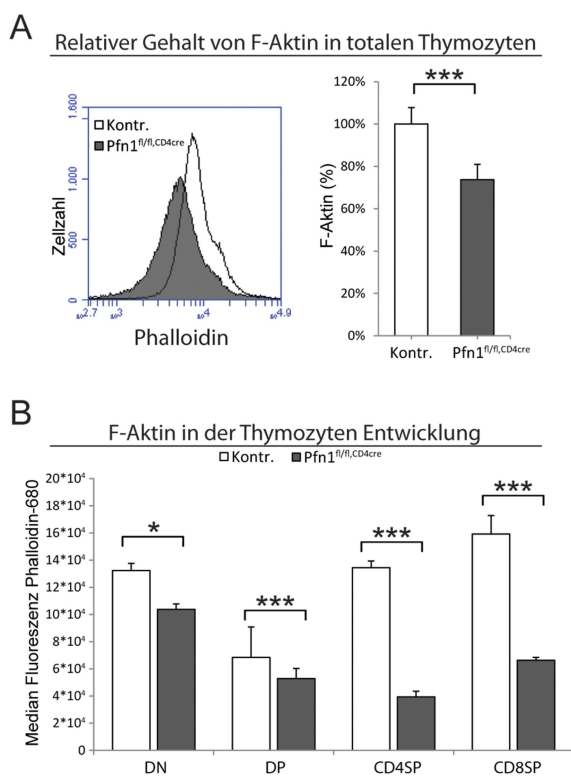


Abb.4.21 Analyse des F-Aktin Gehaltes in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten. Durchflusszytometrische Analyse des filamentösen Aktins durch intrazelluläre Färbung mit Alexa-680-gekoppeltem Phalloidin. In (A) ist der Anteil des F-Aktins in totalen Thymozyten von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen relativ zu Kontrollthymozyten (Pfn1^{fl/fl}) im Histogramm (links) und dessen Quantifizierung (rechts) dargestellt. (B) Mengen an F-Aktin in den jeweiligen Entwicklungsstadien der T-Zell Entwicklung im Thymus von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten, ermittelt über die Median Fluoreszenz für Phalloidin Alexa-680 der entsprechenden Population. Die durchflusszytometrischen Messungen zeigen deutlich, dass Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten weniger Aktin in filamentöser Form aufweisen als entsprechende Kontrollthymozyten. (A+B) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurde über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten von n=5 Tieren pro Genotyp.

Allgemein zeigten die Analysen einen signifikanten Rückgang an filamentösem Aktin in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten im Vergleich zu Kontrollthymozyten.

4.3.3 Der Verlust von Profilin 1 hemmt die Aktin Polymerisation nach SDF-1 α Stimulation

Da es sich bei den vorangegangenen Analysen (Abb.4.21, A+B) um Messungen in einer stationären Phase handelt, wurde folgend der SDF-1 α stimulierte Aktin Umbau in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollthymozyten (Pfn1^{fl/fl}) analysiert, um genauere Rückschlüsse auf die

mechanistischen Auswirkungen des Profilin 1 Verlustes, für die Zellen *in vivo* treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden Thymozyten für die angegebenen Zeitpunkte mit SDF-1 α in Kultur stimuliert und nach sofortiger Fixierung ihr F-Aktin Gehalt durchflusszytometrisch mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin bestimmt. Um die unterschiedlich hohen Ausgangswerte an F-Aktin zu kompensieren wurden die Genotypen für die Analyse auf ihren jeweiligen Ausgangswert normalisiert. Die in Abb.4.22 dargestellten Daten zeigten eine deutliche Reduktion an SDF-1 α stimulierter Aktin Polymerisation in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten, mit einer der Kontrolle vergleichbaren Depolymerisationsphase. Um sicherzustellen, dass die verminderte Polymerisation nicht auf eine verminderte Expression des SDF-1 α Rezeptors CD184 zurückzuführen ist, wurde dessen Expression auf Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten durchflusszytometrisch untersucht, wobei keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

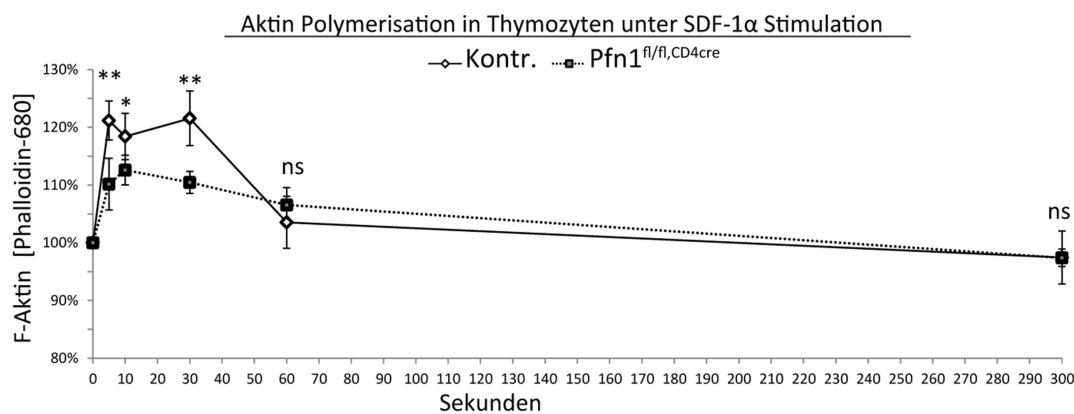


Abb.4.22 Aktin Polymerisation in Thymozyten nach Stimulation durch SDF-1 α . Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigen eine signifikant schwächere Aktin Polymerisation nach SDF-1 α Stimulation im Vergleich zu Kontroll Thymozyten (Pfn1^{fl/fl}). Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse der Aktin Polymerisation in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontroll- Thymozyten nach Stimulation mit SDF-1 α (100 ng/ml), durch Färbung mit Alexa-680 gekoppeltem Phalloidin. Gemessen wurden 0, 5, 10, 30, 60, 300 und 900 (nicht dargestellt) Sekunden nach SDF-1 α Zugabe und PFA-Fixierung. Zum besseren Vergleich wurden die Fluoreszenzwerte des jeweiligen Genotyps auf den nicht stimulierten Ausgangswert (=100%) normalisiert. Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns:0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten aus Duplikaten von n=3 Tieren pro Genotyp.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten neben einem geringeren basalen Gehalt an F-Aktin, eine signifikant verminderte Polymerisation von Aktin unmittelbar nach Stimulation mit dem Chemokin SDF-1 α aufwiesen.

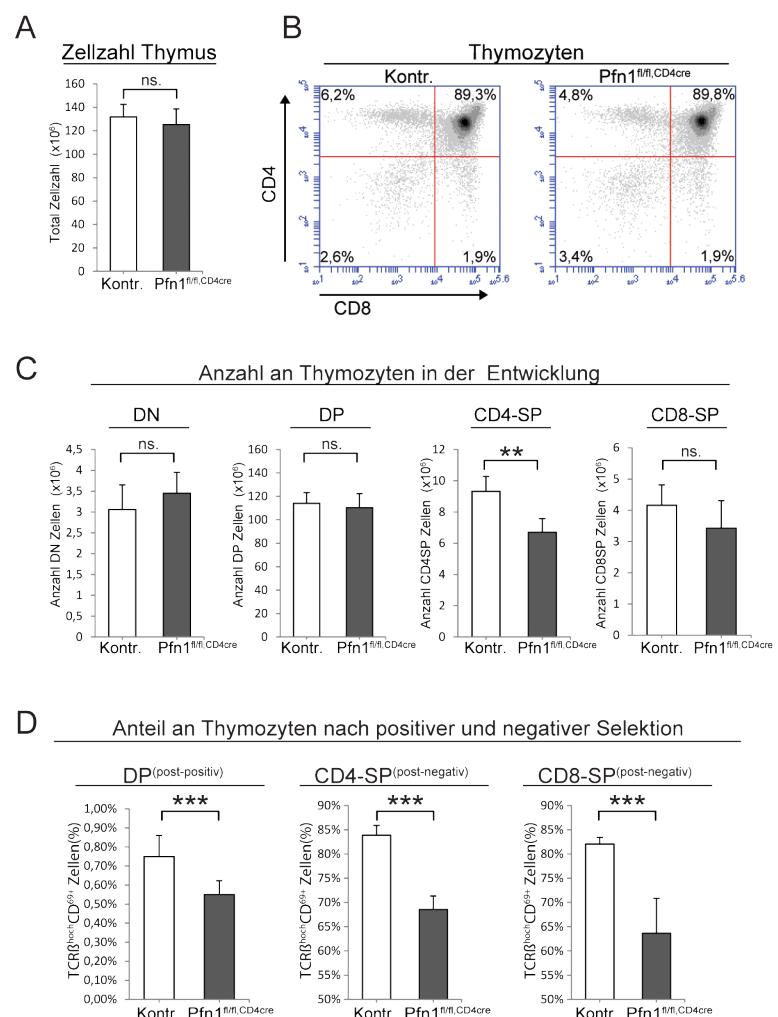
4.3.4 Profilin 1-Defizienz führt zu einer verminderten positiven und negativen Selektion von Thymozyten

Nachdem die vorangegangenen Analysen eine gestörte Aktin Polymerisation in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten zeigen konnten, bestand die zentrale Frage darin, ob sich diese Störung negativ auf die Entwicklung der Thymozyten auswirkt. Hierbei zeigten durchflusszytometrische Quantifizierungen der Gesamt-Zahl an Thymozyten zunächst keine Veränderungen in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen (Abb.4.23, A). Eine folgende durchflusszytometrische Analyse anhand der Entwicklungsmarker CD4 und CD8 konnte in diesem Zusammenhang $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten in allen 4 Entwicklungsstadien (DN, DP, CD4-SP, CD8-SP) im Thymus nachweisen (Abb.4.23, B). Eine genaue Quantifizierung der Anzahl an Zellen in den entsprechenden Entwicklungsstadien offenbarte hierbei jedoch eine signifikante Reduktion an CD4-SP Thymozyten um ca. 20% (Abb.4.23, C).

Abb.4.23 Eingeschränkte Entwicklung von einzel-positiven Thymozyten in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen bei gleichbleibender Gesamt-Zell-Zahl.

Durchflusszytometrische Analysen zur (A) Anzahl der gesamten Zellen im Thymus von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäusen zeigt keine Veränderungen durch die Deletion von Profilin 1. (B) Expression der T-Zell Corezeptoren CD4 und CD8 auf Thymozyten von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäusen ($Pfn1^{fl/fl}$) (Kontr.) zeigen eine leichte Verminderung der CD4-SP Population, bei unveränderter CD8-SP Präsenz. Die Nummern in Ecken geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. (C) Anzahl an Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien im Thymus von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollmäusen bestätigen eine Verminderung an CD4-SP Zellen. (D) Analyse der Expression von CD69 sowie der T-Zell Rezeptor β -Kette in DP, CD4-SP und CD8-SP Thymozyten zeigt einen leicht verminderten Anteil an DP Thymozyten, welche positiv selektioniert wurden ($CD4^+CD8^+TCR\beta^{hoch}CD69^+$), sowie deutlich verminderte Anteile für negativ selektionierte Thymozyten in den einzel-positiven Entwicklungsstadien CD4-SP und

CD8SP Zellen. Alle Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns $0,05 < P < 0,1$; $*0,01 < P < 0,05$; $**0,001 < P < 0,01$; $***P < 0,001$ (A+C+D) $n=5$ Mäuse pro Genotyp. (B) repräsentativ für $n > 10$ Mäuse pro Genotyp



Die Analyse deutete darüber hinaus ebenfalls auf eine schwache Reduktion an CD8-SP Thymozyten in Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Mäusen hin (Berechnung in absoluten Zellzahlen allerdings nicht signifikant mit $p=0,2$). Da die Entwicklung von DP Thymozyten zu CD4⁺ oder CD8⁺ SP Zellen durch den Prozess der positiven Selektion gesteuert wird (Yamashita et al., 1993), (Swat et al., 1993), bei dem auf den Zellen nach ihrer erfolgreichen Selektion eine Erhöhung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie der β -Kette des T-Zell Rezeptors (TCR $_{\beta}$) auf der Zelloberfläche gemessen werden kann, wurde eine durchflusszytometrische Analyse dieser durchgeführt, um zu überprüfen, ob DP Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten erfolgreich selektioniert werden konnten. Die Analysen zeigten eine signifikante Reduktion der CD69⁺TCR $_{\beta}$ ^{hoch} Population in DP Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten (Abb. 4.23, D links) und weisen somit auf eine verminderte positive Selektion in Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten hin. Darüber hinaus zeigten die Messungen von CD69 und TCR $_{\beta}$ der vorhandenen CD4- und CD8-SP Thymozyten eine starke Reduktion an CD69⁺TCR $_{\beta}$ ^{hoch} CD4-SP und CD8-SP Thymozyten, was auf eine starke Verminderung der negativen Selektion dieser Zellen hinwies (Abb. 4.23, D rechts). CD69 und TCR $_{\beta}$ sind dabei Marker sowohl für positive als auch für negative Selektion. Zusammenfassend zeigten die Entwicklungsanalysen eine beeinträchtigte Entwicklung von Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten hin zu CD4-SP Thymozyten, mit einem verminderten Anteil an post-positiv selektionierten DP Thymozyten. Darüber hinaus zeigten die Analysen stark verminderte Anteile an post-negativ selektionierten CD4- und CD8 einzel-positiven Thymozyten.

4.3.5 Die Deletion von Profilin 1 in Thymozyten führt zu einer stark verminderten Anzahl an peripheren T-Zellen

Da die vorangegangenen Entwicklungsanalysen von Thymozyten einen verminderten Anteil an erfolgreich negativ selektionierten CD4- und CD8 einzel-positiven Thymozyten aufzeigten (Abb. 4.23, D), bestand die Frage, ob dieser Umstand Auswirkungen auf die Anzahl an T-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben hat. Um diese Fragestellung zu adressieren wurden Zellen aus Lymphknoten, Blut und Milz isoliert und durchflusszytometrisch über eine Färbung gegen CD4, CD8 sowie TCR $_{\beta}$ auf ihren Anteil an T-Zellen hin untersucht. Die Analysen ergaben dabei eine extreme Reduktion an peripheren T-Zellen in Lymphknoten (Abb.4.24, A+B), wobei sowohl die CD4 als auch die CD8 T-Zell Populationen betroffen waren. Blut und Milz zeigten hierbei den gleichen Befund wie Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten die Ergebnisse durch die Messung der T-Zell Marker CD3 $_{e}$

und TCR β bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob die in Lymphknoten von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen vorkommenden T-Zellen durch die CD4cre-Rekombinase deletiert worden sind, wurden Southern Blot Analysen von Lymphozyten durchgeführt, in welchen keine Deletionsbande bei 6,4kbp nachgewiesen werden konnte (Abb.4.24 C). Diese Ergebnisse wurden durch eine PCR an Lymphozyten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

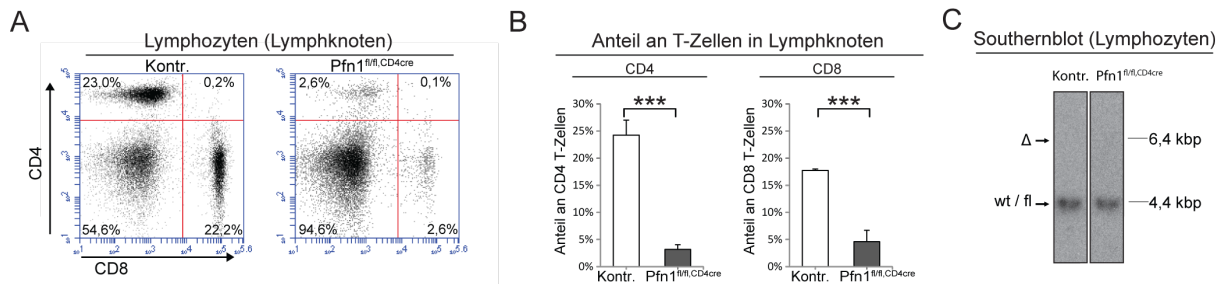


Abb.4.24 Der Anteil an peripheren T-Zellen (Lymphknoten) ist in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen drastisch vermindert. Durchflusszytometrische Analysen zum (A) Anteil an CD4-SP und CD8-SP T-Zellen in Lymphknoten von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontrollmäusen, zeigt eine drastische Reduktion an T-Zellen. (B) Quantifizierung des Anteils an zytotoxischen (CD8) und T-Helfer- (CD4) T-Zellen in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontroll-Lymphknoten (Pfn1^{fl/fl}) bestätigt die drastische Reduktion an T-Zellen. (C) Southern Blot Analyse von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} und Kontroll-Lymphozyten (Pfn1^{fl/fl}) zeigt keine Deletion des Profilin 1 Lokus (Exon 1) auf DNS Ebene in Lymphozyten an. Die verbliebenen peripheren T-Zellen von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Mäusen aus (A) und (B) sind demnach nicht durch die CD4cre-Rekombinase deletiert. (B) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichungen. Signifikanz wurde über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns 0,05<P; *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten von n=5 Mäusen pro Genotyp.

Zusammenfassend zeigten Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Mäuse eine extreme Reduktion an peripheren CD4 und CD8 T-Zellen, wobei die vorhandenen Zellen nicht durch die CD4cre-Rekombinase deletiert wurden.

4.3.6 Trotz verringerter CD69 Expression an ihrer Oberfläche lassen sich Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten aktivieren.

Da im Rahmen der Entwicklungsanalyse eine verminderter Anteil an CD69⁺ DP und SP Thymozyten gemessen worden ist (Abb.4.23, D), wurde getestet, ob Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten prinzipiell in der Lage sind positive Signale über ihren sich entwickelnden T-Zell Rezeptor zu empfangen. Um diese Frage zu adressieren, wurde das bereits für Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten beschriebene Aktivierungsprotokoll (Klemke et al., 2008) verwendet, indem Thymozyten mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 behandelt werden, und die Expression von CD69 als Aktivierungsmarker *in vitro* vor und nach Stimulation gemessen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten bei frisch isolierten unbehandelten Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten erneut signifikant verminderte Anteile an CD69 positiven Zellen (Abb.4.25). Darüber hinaus zeigten die Analysen, dass sich Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in

ähnlicher Weise wie Kontrollthymozyten aktivieren lassen, da sich der Anteil an CD69 positiven Zellen nach 20 bzw 44 Stündiger Stimulation stark erhöhte. Anders als $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten (Abb.4.13) behielten $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten jedoch einen signifikant geringeren Anteil an CD69-positiven Zellen unter Stimulationsbedingungen, im Vergleich zur Kontrolle, bei.

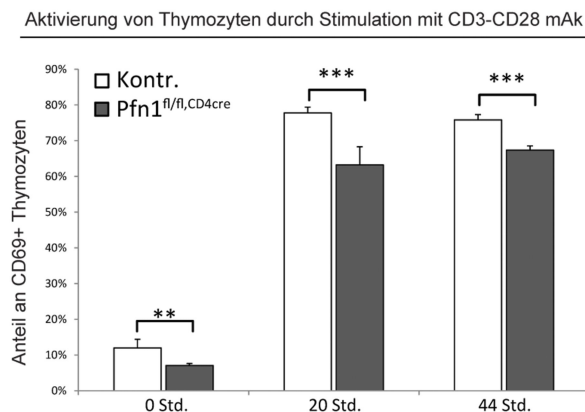


Abb.4.25 Aktivierung von Thymozyten über CD3 und CD28. Durchflusszytometrische Analyse des frühen T-Zell Aktivierungsmarkers CD69 vor und 20 bzw. 44 Stunden nach Stimulation mit CD3 (2µg/ml) und CD28 (10µg/ml) an Platte gebundenen Antikörpern, von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ und Kontrollthymozyten ($Pfn1^{fl/fl}$). Die Messungen zeigten einen signifikant geringeren Anteil an CD69 positiven Zellen im unstimulierten Zustand direkt nach der Isolation aus dem Thymus (0 Std.), der auch nach der Stimulation bestehen blieb. Da der beobachtete Anstieg der CD69 Expression, unter Stimulation, in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten jedoch vergleichbar mit dem in Kontrollthymozyten war, konnte kein

Unterschied in der *in vitro* Stimulierbarkeit dieser nachgewiesen werden. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. Signifikanz wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt $**0.001 < P < 0.01$; $***P < 0.001$; n=4 Mäuse pro Genotyp

4.3.7 Verminderte Adhäsion von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten an Laminin-beschichtete Oberflächen

Die Thymozyten durchwandern während ihrer Entwicklung den Thymus und sind, um sich erfolgreich differenzieren zu können, auf einen Signalaustausch über direkten Zell-Zell Kontakt mit andern Zellen angewiesen (Bouso et al., 2002). Wie die *in vitro* Stimulationsexperimente bereits zeigten, konnte ein Großteil der $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten stimuliert werden, wies jedoch bereits im nicht stimulierten Zustand einen geringeren Anteil an $CD69^+$ positiven Zellen auf (Abb.4.25). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einem verminderten Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakt von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten begründet liegen, der dazu führen würde, dass sie weniger stimulierende Signale von anderen Zellen über den sich entwickelnden T-Zell Rezeptor empfangen können. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von Thymozyten an eine mit Laminin beschichtete Oberfläche untersucht. Hierbei wurde das Glykoprotein Laminin als Substrat gewählt weil vorherige Untersuchungen von (Berrih et al., 1985), (Lannes-Vieira et al., 1991) und (Savino et al., 1993) zeigen konnten, dass Laminin sowohl im Cortex, als auch in der Medulla des Thymus ähnlich stark exprimiert wird und somit sowohl DP als auch SP Thymozyten im Gewebe mit ihm gleichermaßen wechselwirken können. Da bereits von naiven T-Zellen bekannt war

(Abb.4.14.2), dass ihre Bindungsfähigkeit unter nicht stimulierten Bedingungen eher gering ist, wurden die $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten teils mit SDF-1 α stimuliert, um deren Adhäsion zu erhöhen.

Die Analysen offenbarten dabei eine signifikant schlechtere Bindung sowohl von unstimulierten als auch von SDF-1 α -stimulierten $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten an die mit Laminin beschichteten Glasoberflächen (Abb.4.26, A+B) im Vergleich zu Kontrollthymozyten ($\text{Pfn1}^{\text{fl/fl}}$). Darüber hinaus ergaben die Analysen eine erhöhte Adhäsionskapazität von $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten nach SDF-1 α Stimulation, im Vergleich zum nicht stimulierten Zustand (Abb.4.26, B).

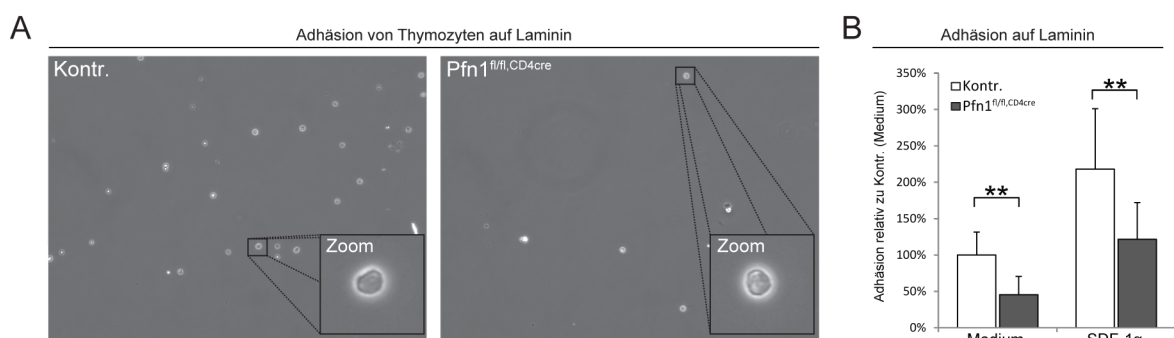


Abb.4.26 Adhäsion von Kontroll- und $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten auf mit Laminin gecoateten Untergrund. (A) Mikroskopische 10x Phasenkontrastaufnahmen von adhärenen $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ und Kontrollthymozyten ($\text{Pfn1}^{\text{fl/fl}}$) auf Laminin (Laminin gebunden an Glas), nachdem nicht adhärenente Zellen mit warmen PBS gewegewaschen wurden. In den unteren rechten Ecken ist je eine digitale Vergrößerung (Zoom) eines adhärenen Thymozyten exemplarisch dargestellt. (B) Quantifizierung der Adhärenz von totalen $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ und Kontrollthymozyten auf Laminin, relativ zu Kontrolle Medium=100%, zeigte ein deutlich verringertes Adhäsionspotential von $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten auf Laminin. Fehlerbalken zeigen Standard Fehler. Signifikanzen wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt $**0.001 < P < 0.01$. Daten aus $n=12$ zusammengesetzten Aufnahmen (a 5×4 (10x) Einzel Aufnahmen), pro Kondition von $n=4$ Mäusen pro Genotyp

Identische Ergebnisse konnten unter PMA-Stimulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da die Thymozyten auf Laminin kaum zur Ausbreitung (spreading) neigten (Abb.4.26, A close up), wurde diese in $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten nicht näher analysiert. Alles in allem zeigten die Analysen, dass $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten signifikant schlechter an Laminin adhären, jedoch in ihrer Adhäsion durch SDF-1 α oder PMA stimuliert werden konnten.

4.3.8 Dreidimensionale Migration ist in $\text{Pfn1}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten vermindert

Da nach gängiger Lehrmeinung das Aktin-Zytoskelett maßgeblich an der Migration von Zellen beteiligt ist (Wolf et al., 2003), (Woolf et al., 2007), (Gardel et al., 2010) und in

$Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten sowohl starke Veränderungen im F-Aktin Gleichgewicht (Abb.4.21) als auch kinetische Veränderungen in der Aktin Polymerisation (Abb.4.22) beobachtet wurden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich der Verlust von Profilin 1 auch auf das Migrationsverhalten der Zellen auswirkt. Eine Verbindung von Profilin 1 und Zellmigration wurde in diesem Zusammenhang bereits zuvor in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen (Kullmann et al., 2012), Endothelzellen (Ding et al., 2006) oder Krebszellen (Mouneimne et al., 2012a) beschrieben. Wie in vorangegangenen Kapiteln bereits erwähnt wurde, sollte die Migration von Thymozyten in einem drei-dimensionalen Kontext betrachtet werden, weshalb der ebenfalls bereits beschriebene Kollagen-Gel Versuchsaufbau gewählt wurde, um die Migration der $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten im un- und SDF-1 α -stimulierten Zustand zu analysieren. Auch in diesem Versuchsaufbau wurde SDF-1 α gleichverteilt in das Gel eingebracht, um eine ungerichtete Migration der Zellen zu fördern. Die Analyse der vierstündigen Migrationsvideos zeigte einen stark signifikant verminderten Anteil an migrierenden Zellen in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten, sowohl ohne Stimulation als auch unter SDF-1 α Behandlung (Abb.4.27). Dabei bestätigte die statistische Analyse eine Reduktion des migrierenden Zellanteils von ~50% (Abb.4.27). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten durch SDF-1 α in ihrer Migration stimulieren ließen, da ihr Anteil an migrierenden Zellen im Vergleich zum nicht stimulierten Zustand im gleichen Maße wie bei Kontrollthymozyten zunahm (Abb.4.27).

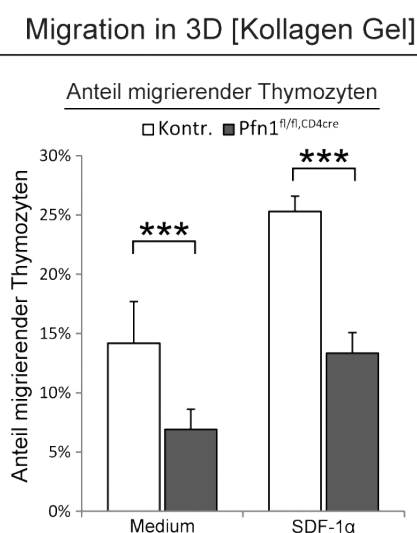


Abb.4.27 Migration von Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung (Kollagen-Gel). Migrationsanalysen in dreidimensionaler Umgebung haben gezeigt, dass $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ im Vergleich zu Kontrollthymozyten ($Pfn1^{fl/fl}$) einen wesentlich geringeren Anteil an migrierenden Zellen aufweisen. Graph zeigt den Anteil an migrierenden Thymozyten in Kollagen Gel (3mg/ml) unter der Präsenz oder Absenz (Medium) des Chemokines SDF-1 α (400ng/ml), die mittels vier stündiger Timelapse Phasenkontrast Mikroskopie analysiert wurden. (Als migrierend wurden Zellen definiert, die während der vier Stunden mehr als 1 μ m Strecke zurückgelegt hatten. Analysiert wurden alle im jeweiligen Bildausschnitt sichtbaren Zellen). Fehlerbalken zeigen Standard Fehler. Signifikanz wurden über einen ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *** $P < 0.001$. Daten aus $n=12$ Filmen (a 4 Stunden, mit 90 Sek. Pro Frame), pro Kondition von $n=3$ Mäusen pro Genotyp.

Detaillierte Analysen des Migrationsverhaltens einzelner Zellen waren zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen, wiesen jedoch auf eine langsamere Migration der migrierenden $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten hin (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend

konnte das Experiment zeigen, dass deutlich weniger Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten im Kollagen-Gel migrieren, sich ihr Anteil jedoch durch SDF-1 α Stimulation hat erhöhen lassen.

4.4.1 Deletion von Profilin 1 im Thymus durch die distalLCK-Cre-Rekombinase führt zum Verlust von CD8⁺ T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben.

Die frühe Deletion (in DN3) von Profilin 1 in der T-Zell Entwicklung durch die CD4cre-Rekombinase führte zu einem Verlust an T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (Abb.4.24). Unter Verwendung einer anderen Cre-Rekombinase (distalLCK-Cre), welche erst im einzel-positiven Entwicklungsstadium nach der positiven Selektion der Zellen exprimiert wird (Zhang et al., 2005), sollte folgend untersucht werden, ob sich die Thymozyten bei dieser späteren Deletion von Profilin 1 im Thymus soweit entwickeln können, dass sie in die sekundären lymphatischen Gewebe auswandern können. Um die Deletions-Effizienz der distalLCK-Cre- Rekombinase im Vorfeld zu überprüfen, wurde das stop-YFP-R26^{distalLCK-Cre} Reporter Maus Modell (Srinivas et al., 2001) verwendet, welches die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe ermöglicht. Die durchflusszytometrische Analyse der stop-YFP-R26^{distalLCK-Cre} Mäuse zeigte dabei eine geringe Expression der distalLCK-Cre-Rekombinase von nur 11,2% in CD4-SP und 38,9% in CD8-SP Thymozyten (Abb.4.28, A links). In peripheren T-Zellen aus Lymphknoten wurden in CD4 T-Zellen eine distalLCK-Cre Expression in etwa der Hälfte der Zellen (55,5%) gemessen, wohingegen die Deletionseffizienz in CD8 T-Zellen 97,7% betrug (Abb.4.28, A rechts). Diese Werte entsprachen den Messungen, die bereits von (Hecker, 2015) in einem anderen Zusammenhang durchgeführt wurden und spiegeln das stärker CD8 fokussierte Expressionsverhalten der distalLCK-Cre-Rekombinase wieder (Srinivas et al., 2001).

Im Folgenden wurden Pfn1^{fl/fl} Mäuse mit distalLCK-Cre Mäusen gekreuzt um Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Mäuse zu generieren, in welchen die Profilin 1 Allele nach der positiven Selektion im Thymus deletiert werden sollten. Eine durchflusszytometrische Analyse der Entwicklungsmarker CD4 und CD8 zeigte hierbei keine Veränderungen in der Entwicklung der Thymozyten (Abb.4.28, B links), jedoch eine starke Reduktion von CD8 T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben (Abb.4.28, B rechts). Die statistische Analyse konnte eine drastische Reduktion an CD8 T-Zellen in Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Lymphozyten bestätigen, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an CD4 Lymphozyten (Abb.4.28, D).

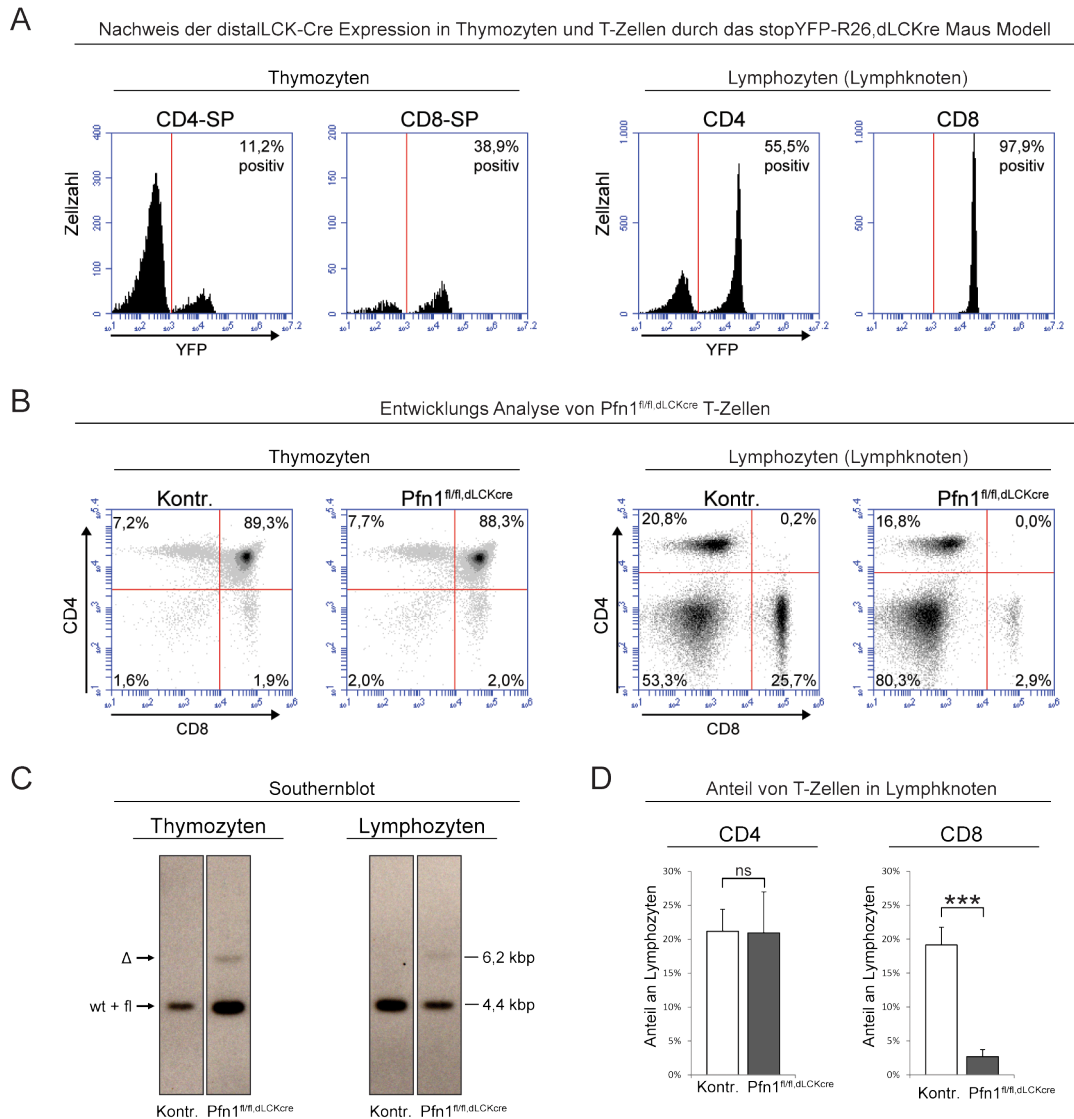


Abb.4.28 Deletion von Profilin 1 durch die distal-LCKcre-Rekombinase. Durchflusszytometrische Untersuchung (A) von stop-flox-YFP-R26^{dLCKcre} Thymozyten und Lymphozyten, welche für CD4 und CD8 gefärbt wurden. Das stop-flox-YFP-R26 Mausmodell trägt eine gefloخته Stop Kasette vor dem kodierenden Bereich eines YFP-Moleküls unter der Kontrolle des Rosa26 Promotors und ermöglicht somit die Visualisierung einer Cre-Rekombinase Aktivität in entsprechenden Zellen oder im Gewebe. Die Histogramme zeigen den Anteil der YFP-positiven Zellen in den jeweiligen Populationen, in welchen demnach die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Die Analyse zeigt eine mäßige Deletionseffizienz in CD4 T-Zellen (~55%), sowie niedrige Deletionsraten in CD4 und CD8 Einzelpositiven (SP) Thymozyten. (B) Expression der T-Zell Corezeptoren CD4 und CD8 auf Thymozyten und Lymphozyten von Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} und Kontrollmäusen (Pfn1^{fl/fl}) (Kontr.) zeigen keine Veränderungen in der T-Zell Entwicklung im Thymus, jedoch eine starke Verminderung der CD8 T-Zell Population in Lymphknoten, bei unverändertem Anteil an CD4 T-Zellen. (C) Die Southern Blot-Analyse bestätigt eine schwache Deletion der gefloخته Profilin 1 DNS-Sequenz in totalen Pfn1^{fl/fl,dLCK4cre} Thymozyten. Darüber hinaus konnte auch in Lymphozyten nur eine sehr schwache Deletion der gefloخته Profilin 1 DNS-Sequenz detektiert werden. Die durch die Sonde detektierbaren Fragmentgrößen ergeben sich aus dem Gentergating, das bei der Erstellung der Mauslinien verwendet wurde und einem NCO Verdau der DNS. Für das (wt) wildtyp- sowie das (fl) gefloخته- Allel von Profilin 1 entsteht so ein Fragment, welches nach Auftrennung bei etwa 4,4 kbp durch die radioaktive Sonde detektiert wird. Entsprechend ergibt sich für das durch die Cre-Rekombinase ausgeschnittene Allel (Δ) eine Bande bei 6,4 kbp. (D) Statistische Analyse des Anteils an T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen repräsentiert durch Lymphknoten bestätigte den stark verminderten Anteil an zytotoxischen T-Zellen (CD8) in sekundären lymphatischen Organen, bei gleichbleibender Präsenz von T-Helferzellen (CD4). (A+B) Die Nummern in Ecken geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. Daten sind repräsentativ für (A) n>3 (B) n=4 (C) n=2 Tiere pro Genotyp. (D) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt ns:0,05<P; ***P<0.001. Daten von n=4 Tieren pro Genotyp.

Darüber hinaus konnte der verminderte Anteil an CD8 T-Zellen ebenfalls in Blut und Milz Biopsien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführte Southern Blot Analyse der DNS konnte sowohl in Thymozyten als auch in Lymphozyten (aus Lymphknoten) eine schwache Deletionsbande detektieren (Abb.4.28, C), welches auf einen geringen Anteil an deletierten T-Zellen in Lymphknoten hinwies. Zusammenfassend zeigten die $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Mäuse eine normale Anzahl an Zellen in den entsprechenden Entwicklungsstadien im Thymus, wiesen jedoch eine starke Reduktion an CD8 T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben auf, in welchen die $dLCKcre$ -Rekombinase vermehrt exprimiert wird.

4.4.2 Ein geringer Anteil an Profilin 1 defizienten T-Zellen ist in sekundären lymphatischen Organen nachweisbar

Da die Southern Blot Analyse der $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Lymphozyten eine schwache Deletionsbande für Profilin 1 detektieren konnte, bestand die Frage, ob ein geringer Teil der in den Lymphknoten vorkommenden T-Zellen durch die Cre-Rekombinase deletiert wurde. Um diese Frage adressieren zu können, wurden unter der Annahme, dass beide Loci gleich effizient rekombiniert werden, die bereits mehrfach verwendeten stop-YFP-R26 Cre Reporter Mäuse in den $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Hintergrund gekreuzt, um potentiell deletierte Zellen über ihr YFP Signal isoliert betrachten zu können. Analysen des stop-YFP-R26- $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Maus Modells zeigten den gleichen Phänotyp wie $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Mäuse in Bezug auf die Entwicklung der Thymozyten und die stark reduzierte Anzahl an CD8 T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben (Abb.4.29, A). Die durchflusszytometrische Analyse des YFP-Signals in stop-YFP-R26- $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Lymphozyten ergab einen YFP-positiven Anteil von 34% in CD4 und 62,7% in CD8 T-Zellen aus Lymphknoten (Abb.4.29, A). Da in YFP-positiven Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, sollte in diesen auch Profilin 1 deletiert worden sein, welches potentiell zu einer Reduktion an F-Aktin sowie CD69 führen könnte, wie es auch in der $CD4cre$ -vermittelten Profilin 1 Deletion in Thymozyten bereits beobachtet wurde. Hierzu wurden Lymphozyten aus stop-YFP-R26- $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Lymphknoten isoliert und durchflusszytometrisch über Vierfachfärbungen auf ihren Gehalt an F-Aktin und ihre Expression an CD69 in den entsprechenden CD4 und CD8 T-Zell Populationen untersucht, wobei die Signale von YFP-negativen T-Zellen (CD4, CD8) mit denen von YFP positiven T-Zellen (CD4, CD8) verglichen wurden. Die Analysen ergaben signifikant geringere Mengen von F-Aktin in YFP-positiven CD4 und CD8 T-Zellen

(Abb.4.29, B) und ebenfalls signifikant geringere Anteile an CD69-positiven Zellen in YFP positiven CD4 und CD8 T-Zellen im Vergleich zu entsprechenden YFP negativen Zellen (Abb.4.29, B).

A stop-flox-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Mausmodell zur Analyse möglicher Profilin1 defizitärer T-Zellen

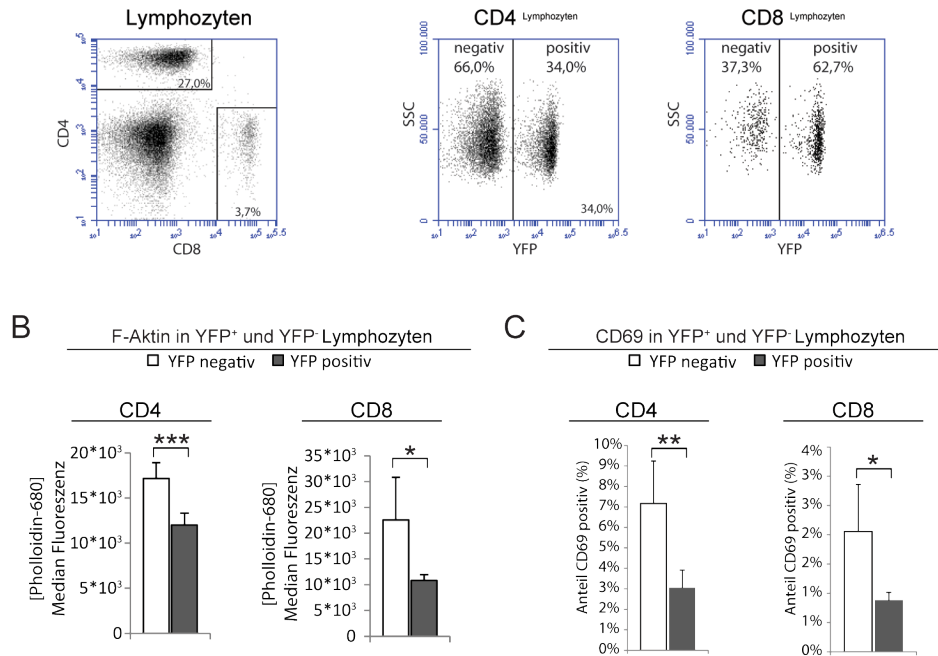


Abb.4.29 Analyse von stop-flox-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Lymphozyten zum Nachweis von Profilin 1 defizienten T-Zellen in der Peripherie. Aufgrund der schlechten Deletionseffizienz der distalLCKcre-Rekombinase im Thymus und in T-Helferzellen (CD4) wurden die Cre Reporter Mauslinie mit der Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} gekreuzt um unter Pfn1 Knockout Bedingungen die Expression der Cre-Rekombinase visualisieren zu können. Im stop-flox-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Modell sollten im Idealfall die meisten YFP positiven Zellen gleichzeitig defizitär für Profilin-1 sein, da die Cre-Rekombinase den geflochten DNS Bereich von Profilin 1 ebenfalls herausgeschnitten haben sollte. (A) Zeigt die durchflusszytometrische Untersuchung von stop-flox-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Lymphozyten (Lymphknoten) in Bezug auf ihre CD4, CD8 und YFP Expression. Ausgehend von den einzelnen YFP negativen oder positiven T-Zell Populationen (CD4 oder CD8) wurde die (B) Menge an F-Aktin und der (C) Anteil an CD69 positiven Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Messungen haben ergeben, dass YFP positive T-Zellen weniger F-Aktin aufweisen und darüber hinaus einen geringeren Anteil an CD69 positiven Zellen besitzen, was darauf hindeuten könnte, dass es Profilin-1 defizitäre T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen geben könnte. (A) Daten repräsentativ für n>5 Tiere. (B+C) Fehlerbalken zeigen Standard Abweichung. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. Daten von n=5 Tiere.

Zusammenfassend konnten im stop-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Maus Modell CD4 und CD8 T-Zellen in Lymphknoten detektiert werden, welche sowohl YFP exprimierten als auch verringerte Mengen an F-Aktin sowie einen geringerer Anteil an CD69 positiven Zellen aufwiesen.

4.5 Analyse des Pfn1^{GFPAktin} Reporter-Mausmodells

In dem von (Gurniak and Witke, 2007) erstellten Mausmodell, welches bereits im Zuge der Knochenmarktransplantation in dieser Arbeit Verwendung fand, wird ein GFP-Aktin Fusionsprotein unter der Kontrolle des Profilin 1-Promotors exprimiert, womit sich diese Maus-Linie ebenfalls als Reporter-Modell für die Profilin 1-Expression eignet. Da es sich hierbei um einen Knock-in handelt und homozygote Pfn1^{-/-} Tiere nicht lebensfähig sind, musste das GFP-Aktin Allel stets in heterozygotität gehalten werden, weshalb diese Tiere im Folgenden als Pfn1^{GFPAktin/wt} Tiere bezeichnet werden.

4.5.1 Detektion möglicher Pfn1^{GFPAktin} T-Zell Subpopulationen

Bereits bei den durchflusszytometrischen Voruntersuchungen im Rahmen der Knochenmarktransplantation von GFP⁺Cof1fl^{/fl,CD4cre} Tieren konnte eine unterschiedlich starke Verteilung des GFP Signals in Pfn1^{GFPAktin/wt} Thymozyten festgestellt werden (Abb.4.30, A (totale Thymozyten)). Um die Expression von Profilin 1 während der Thymozyten-Entwicklung eingehender zu untersuchen, wurden neben der biochemischen Analyse von gesorteten Wildtyp Thymozyten (Abb.4.30, B), durchflusszytometrische Untersuchungen an den Pfn1^{GFPAktin/wt} Reporter Mäusen durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Experimente zeigten dabei zum einen eine Verstärkung der mittleren GFP Signalstärke in der Entwicklung (nicht direkt dargestellt). Zum anderen offenbarten die Analysen ein Vorkommen verschiedener GFP-Aktin Subpopulationen in den einzelnen T-Zell-Entwicklungsstadien im Thymus (Abb.4.30, A), wobei grob drei unterschiedliche Expressionsgrade von GFP unterschieden werden konnten. Während in DN Thymozyten sowohl GFP negative Zellen (GFP⁻), als auch Zellen mit mittlerer GFP (GFP⁺) und hoher GFP (GFP^{hoch}) Expression beobachtet wurden, konnten in DP Thymozyten fast ausschließlich Thymozyten mit einer mittleren GFP Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden im Falle von CD4 und CD8 einzel-positiven Thymozyten je zwei GFP Subpopulationen beobachtet (GFP⁺ und GFP^{hoch}), wobei sich das Verhältnis zwischen der GFP⁺ und GFP^{hoch} Populationen stets in einem 50/50 bis 40/60 Bereich bewegte (Abb.4.30, A). Darauf folgende Analysen der peripheren T-Zellen (aus Lymphknoten) der Pfn1^{GFPAktin/wt} Mäuse zeigten ebenfalls die beiden GFP Populationen GFP⁺ und GFP^{hoch}, welche ebenfalls in einem 50/50 bis 40/60 Verhältnis sowohl in CD4- als auch in CD8 T-Zellen vorkamen (Abb.4.30, C). Messungen an T-Zellen aus Blut und Milz zeigten hierbei den gleichen Befund wie zuvor T-Zellen aus Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Summa summarum konnte eine gesteigerte GFP-Aktin Expression in SP im Vergleich zu DP

Thymozyten, neben den biochemischen Analysen im Wildtyp auch durch den GFP-Aktin Reporter abgebildet werden, wobei sowohl die einzel-positiven Thymozyten als auch die korrespondierenden peripheren T-Zellen in zwei unterschiedlich stark GFP-exprimierenden Unterpopulationen in einem 50/50 - 40/60 Verhältnis vorkamen.

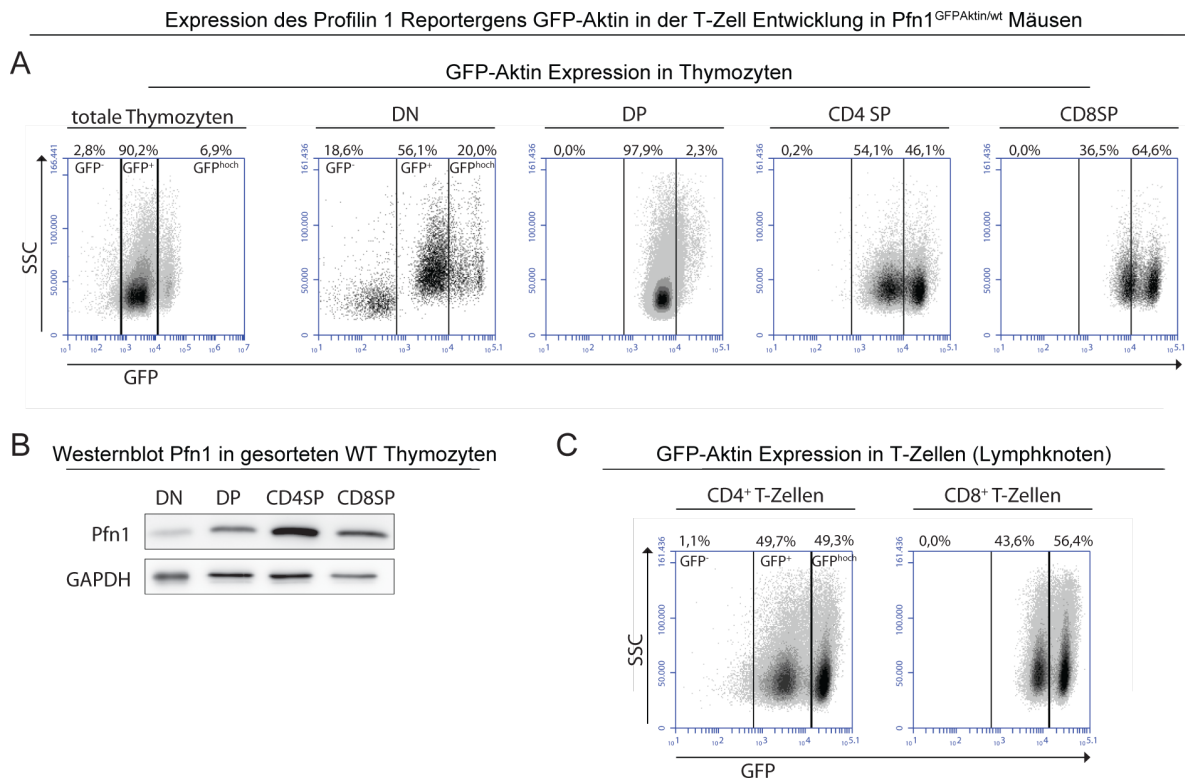


Abb.4.30 Expressions-Analyse des Profilin 1 Reportergens GFP-Aktin in der T-Zell Entwicklung sowie in T-Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchungen des Profilin 1 Reporters GFP-Aktin bestätigen eine verstärkte Expression von Profilin 1 im Zuge der T-Zell Entwicklung und zeigten darüber hinaus mögliche Pfn1 Subpopulationen in einzel-positiven Thymozyten und T-Zellen. **(A)** Durchflusszytometrische Untersuchung der GFP-Aktin Expression in der T-Zell Entwicklung im Thymus, GFP Fluoreszenz und Färbung mit fluoreszenzgekoppelten CD4 und CD8 mAk. **(B)** Western Blot Analyse von gesorteten Wildtyp Thymozyten zeigt eine Steigerung der Expression von Profilin 1 Protein im Zuge der T-Zell Entwicklung an. Western Blot geprobt gegen die Proteine (Pfn1) Profilin 1 (Ak.: PIT) in CD4,CD8 doppelt negativen (DN), doppelt positiven (DP) und einzel-positiven (SP) Thymozyten. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet. **(C)** Durchflusszytometrische Untersuchung der GFP-Aktin Expression in CD4 oder CD8 T-Zellen aus Lymphknoten zeigte eine Aufteilung der einzelnen T-Zell Populationen in GFP-Aktin niedriger (GFP⁺) und GFP-Aktin hoch (GFP^{hoch}) exprimierende Zell-Populationen an. Die Verteilung der Populationen befand sich dabei zumeist in einem 1/1 Verhältnis. Daten sind repräsentativ für **(A)** n>3 **(B)** n=2 **(C)** n=3 Tiere.

4.5.2 Die GFP⁺ und GFP^{hoch} T-Zell Populationen sind diskrete Zell Populationen, welche in vitro nicht ineinander übergehen.

Aufgrund des Auftretens der beiden GFP⁺ und GFP^{hoch} Subpopulationen in SP Thymozyten und T-Zellen, welche in Pfn1^{GFPAktin/wt} Mäusen entdeckt wurden, bestand ein möglicher Erklärungsansatz in einer oszillierenden Promotoraktivität des Profilin 1 Promotors. Im Vorfeld durchgeführte Versuche, die beiden GFP-T-Zell-Populationen über Marker-Proteine zu charakterisieren waren erfolglos, da das GFP-Signal weder mit Aktivierungsmarkern wie

CD69, noch mit der Größe oder dem Zellzyklus der T-Zellen korrelierte (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls war keine Veränderung des Verhältnisses beider Populationen nach Stimulation mit Antikörpern gegen CD3/CD28 oder TCR β /CD2, zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnten GFP⁺ und GFP^{hoch} Populationen in einem ähnlichen Verhältnis auch in anderen hämatopoetischen Zellen, wie B-Zellen, beobachtet werden (Gurniak and Witke, 2007). Um zu untersuchen, ob es sich bei den beiden GFP-Populationen um oszillierende Aktivitäts-Zustände des Profilin-1-Promotors oder um diskrete T-Zell Populationen handelt, wurden hämatopoetische Zellen aus der Milz von Pfn1^{GFPAktin/wt} Mäusen isoliert, T-Zellen über MACS (magnetic activated cell sorting) aufgereinigt, im Anschluss durchflusszytometrisch in die GFP⁺ und GFP^{hoch} Population anhand ihres GFP-Signales sortiert und getrennt für bis zu 120 Stunden mit Interleukin-7 in Kultur genommen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.31 dargestellt und zeigen zum einen die erfolgreiche Trennung der beiden Populationen direkt nach der Sortierung als auch den GFP-Status der entsprechenden Populationen nach 120 Stunden. Die Messungen nach 20, 44, 67, 69 und 120 Stunden nach Inkulturnahme der Zellen zeigten zu keiner Zeit eine Veränderungen der GFP Signalstärke in den entsprechenden Populationen (Abb.4.31).

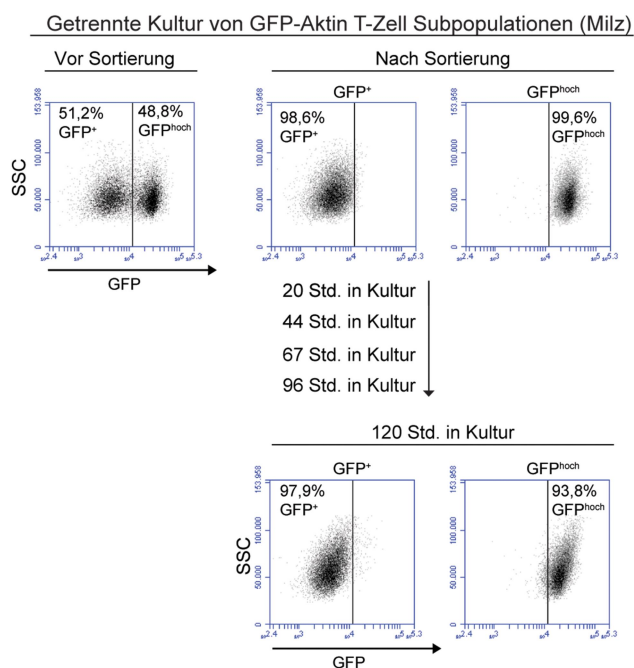


Abb.4.31 Analyse möglicher Oszillationszustände des Pfn1 Promotors durch getrennte Kultivierung der zwei GFP-Aktin T-Zell Populationen. Um zu untersuchen, ob es sich bei den beiden GFP-Aktin Populationen um eine oszillierende Promotoraktivität des Pfn1 Promotors handelt, wurden die GFP⁺ und die GFP^{hoch} Population durchflusszytometrisch voneinander getrennt und separat über 120 Stunden in vitro kultiviert. Bei den abgebildeten T-Zellen handelt es sich um gemischte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz, da aufgrund der limitierenden Anzahl an Zellen, keine Unterscheidung in CD4 und CD8 T-Zellen einzeln durchgeführt wurde. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei den GFP⁺ und GFP^{hoch} T-Zellen um stabile Populationen handelt, welche unter Kulturbedingungen nicht ineinander übergehen. Gemessen wurde 20, 44, 67, 96 sowie 120 Stunden nach der getrennten Inkulturnahme. Zur besseren Übersicht wurde nur der 120 Stunden Messwert aufgeführt von dem sich die vorherigen Messwerte nicht maßgeblich unterschieden. Daten sind repräsentativ für ein Tier.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei den GFP⁺ und GFP^{hoch} T-Zell-Populationen um diskrete Populationen handelt, bei welchen unter den gegebenen Kulturbedingungen die Stärke des GFP-Signals nicht variierte und daher nicht davon

ausgegangen wird, dass sich die Profilin 1 Expression in einzelnen T-Zellen verändert bzw. oszilliert.

4.5.3 Die GFP-Aktin Expression korreliert in Pfn1^{GFPAktin/wt} T-Zellen nicht mit der Expression von Profilin 1

Angesichts der Tatsache, dass vorherige Untersuchungen das Vorkommen der beiden GFP Populationen in T-Zellen von Pfn1^{GFPAktin/wt} Tieren nicht erklären konnten, wurden Thymozyten und T-Zellen durchflusszytometrisch anhand ihres GFP Signals sortiert und biochemisch auf ihren Gehalt an Profilin 1 und GFP-Aktin Protein in den entsprechenden Populationen über Western Blot untersucht um zu überprüfen ob die beiden Allele jeweils ähnlich Exprimiert werden (Abb.4.32, A). Die Analysen bestätigten dabei eine stark erhöhte Konzentration von GFP-Aktin Protein in GFP^{hoch} Zellen im Vergleich zum Gehalt in der korrespondierenden GFP⁺ Population, sowohl in Thymozyten als auch in T-Zellen (aus Milz). Bei der Betrachtung der Profilin 1 Proteinmenge hingegen konnte überraschenderweise eine Korrelation zum entsprechenden GFP-Aktin Signal nur in Thymozyten beobachtet werden, wohingegen sich GFP⁺ und GFP^{hoch} T-Zellen nicht maßgeblich in ihrem Gehalt von Profilin 1 unterschieden (Abb.4.32, A). Da auf Proteinebene der Gehalt von Profilin 1 in T-Zellen somit nicht mit dem von GFP-Aktin korrelierte, sollte im Folgenden überprüft werden, ob ein Expressionsunterschied auf RNS Ebene nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde die RNS aus GFP⁺ und GFP^{hoch} gesorteten T-Zellen über zytoplasmatische RNS Extraktion isoliert, in cDNS umgeschrieben und über eine quantitative "realtime" PCR auf ihren relativen Gehalt an Profilin 1 und GFP-Aktin RNS hin untersucht (Abb.4.32, B). Für die Analyse wurden die erhaltenen Daten zunächst auf GAPDH als "Housekeeper-Gen geeicht und im Anschluss auf den Gehalt von GFP bzw. Profilin 1 in GFP⁺ T-Zellen (=100%) normalisiert. Die quantitative realtime PCR konnte hierbei einen erhöhten Gehalt an GFP-Aktin RNS in GFP^{hoch} T-Zellen nachweisen, welcher mit ~270% (2,7 fach erhöht im Vergleich zu GFP⁺) mit den gemessenen Protein Verhältnissen (Abb.4.32, A) beider Populationen korrelierte. Die gemessenen RNS Level für Profilin 1 in GFP^{hoch} T-Zellen entsprachen jedoch mit ~40% im Vergleich zur GFP⁺ Population weder dem Verhältnis von GFP-Aktin RNS noch den Verhältnissen des Profilin 1 Proteins (Abb.4.32, B). In diesem Zusammenhang soll jedoch ausdrücklich bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Messungen der RNS Expression aus technischen Gründen von nur einem Tier stammten.

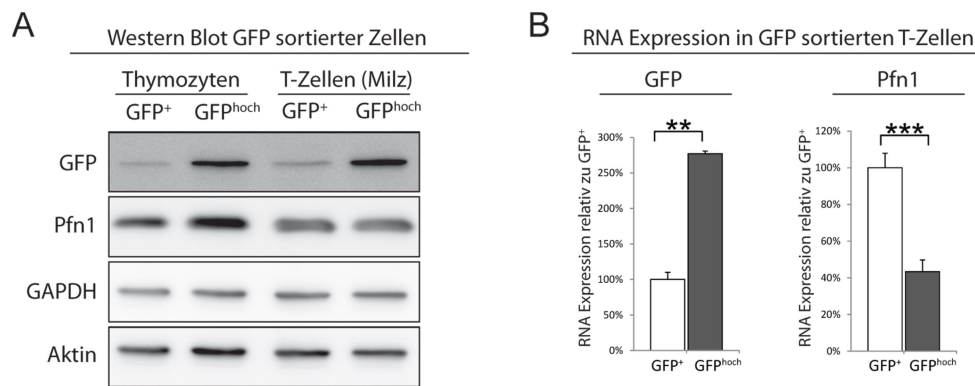


Abb.4.32 Vergleich der Protein- und mRNA Expression von GFP-Aktin und Profilin 1 in den GFP⁺ und GFP^{hoch} Subpopulationen. Western Blot Analysen haben gezeigt, dass die Expression des zu untersuchenden Zielproteins, Profilin 1, in T-Zellen nicht mit der des GFP-Aktin Reporters übereinstimmt und auf mRNA Ebene (qPCR) invertiert zu sein scheint, was auf eine veränderte Regulation der beiden Allele schließen lässt. **(A)** Western Blot von durchflusszytometrisch sortierten GFP⁺ und GFP^{hoch} Thymozyten und T-Zellen (aus Milz) geprobt mit Antikörpern gegen die Proteine GFP (Ak.: GFP), Profilin 1 (Pfn1) (Ak.: P1T), Aktin (Ak.: Aktin C4) sowie GAPDH (Ak.: GAPDH) welcher als Lademengenkontrolle dient. Das GFP Signal, welches auf Höhe des GFP-Aktin Fusionsproteins detektiert wurde (~68 kDa), konnte die Expressionsunterschiede des GFP-Aktin Fusionsproteins in GFP⁺ und GFP^{hoch} Thymozyten und T-Zellen bestätigen. Demgegenüber korrespondiert die Pfn1 Expression nur in Thymozyten mit der des GFP-Aktin Fusionsproteins, nicht jedoch in peripheren T-Zellen aus der Milz. **(B)** Eine Analyse der Expression der GFP-Aktin und Profilin 1 mRNA in GFP⁺ und GFP^{hoch} sortierten T-Zellen aus der Milz über qualitative realtime PCR zeigte eine invertierte Expression der Pfn1 mRNA im Vergleich zu der von GFP-Aktin. Für die Analyse wurden die jeweiligen mRNA Werte zunächst auf GAPDH normalisiert und im Anschluss relativ zur Expression in der jeweiligen GFP⁺ Population (=100%) dargestellt. **(A+B)** Daten von n=3 Experimenten von **(A)** n=3 **(B)** n=1 Tieren **(B)** Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt **0.001<P<0.01; ***P<0.001.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Expression des zu untersuchenden Zielproteins, Profilin 1, in T-Zellen nicht mit der des GFP-Aktin Reporters übereinstimmt und auf mRNA Ebene (qPCR) invertiert zu sein scheint, was auf eine veränderte Regulation der beiden Allele schließen lässt.

5 Diskussion

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Aktin-Regulation, war zum Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über die physiologischen Vorgänge Aktin bindender Proteine in der Entwicklung von T-Zellen bekannt. Die gegebenen Informationen stammten zumeist von Studien, die sich mit Proteinen befassten welche nicht direkt an Aktin binden. Dabei setzt die Differenzierung von Thymozyten in reifen T-Zellen eine außerordentlich komplexe Sequenz von Ereignissen voraus, welche sicherstellen, dass nur funktionale T-Zellen den Thymus verlassen. In diesem Zusammenhang war bereits bekannt, dass der Knockout von Proteinen “*downstream*“ des T-Zell-Rezeptor Signalweges oft zu Veränderungen in der Thymozytenentwicklung führt (Mombaerts et al., 1992), (Negishi et al., 1995), (Swan et al., 1995), (Dower et al., 2000a), wobei einige dieser Arbeiten auch Veränderungen am Aktin Zytoskelett beobachten konnten (Phee et al., 2010b). Obwohl der Regulation von Aktin für die Aktivierung von T-Zellen bereits große Bedeutung zugesprochen wurde (Dustin and Cooper, 2000), gab es nur sehr wenige Studien, welche sich direkt mit der Regulation von Aktin in der Entwicklung von T-Zellen befassten. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle zweier grundlegender Aktin-modulierender Proteine in Bezug auf die T-Zell Entwicklung nach deren Deletion zu untersuchen, wobei auf der einen Seite mit der ADF/Cofilin Familie eine der essentiellsten F-Aktin depolymerisierenden und spaltenden Proteinfamilien als Ziel ausgewählt wurde (Bamburg et al., 1999). Auf der anderen Seite wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mit Profilin 1 einer der bekanntesten Aktin Polymerisationsfaktoren (Witke, 2004) ausgewählt, so dass beide Seiten der Aktin Regulation (Polymerisation und Depolymerisation) in direktem Bezug auf die Entwicklung von T-Zellen betrachtet werden konnten.

5.1 Expression Aktin-bindender Proteine in der T-Zell Entwicklung

Auch zu den Proteinen Cofilin 1 und Profilin 1 in der Entwicklung von T-Zellen war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig bekannt. Bisherige Studien zu Cofilin 1 zeigten das Cofilin in Jurkat- (Nishita et al., 2002) und humanen T-Zellen (Lee et al., 2000) exprimiert wurde, jedoch unterschieden diese Studien weder zwischen den drei ADF/Cofilin Proteinen, noch zeigten sie, ob Cofilin 1 und Profilin 1 während ihrer Entwicklung in Thymozyten exprimiert werden. Die Funktion und Expression von Profilin 1 in T-Zellen oder Thymozyten war darüber hinaus noch nicht adressiert worden. Die zu diesem Zweck durchgeführten Western Blot Analysen konnten zum einen zeigen, dass in murinen Thymozyten,

Lymphozyten und humanen Jurkat T-Zellen nur Cofilin 1 als einziges Mitglied der ADF/Cofilin Familie in nachweisbarer Menge exprimiert wurde (Abb.4.2). Der Befund deckte sich hierbei mit Beobachtungen von F. Jönsson, C.Gurniak und (Hecker, 2015) die ebenfalls Cofilin 1 als einziges Mitglied der ADF/Cofilin Familie in murinen Thymozyten und Lymphozyten identifizieren konnten. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich eine Vielzahl der an T-Zellen durchgeführten Publikationen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Cofilin 1 bezogen, wodurch diese Forschungsergebnisse neu eingeordnet werden können. Western Blot Analysen zu Profilin 1 bestätigten dessen Expression in Thymozyten (Abb.4.20) und konnten darüber hinaus kein weiteres Mitglied der Profilin Familie nachweisen (Daten nicht gezeigt). Der erbrachte Nachweis von Profilin 2 in Thymus total Lysaten (Witke et al., 2001), ist demzufolge wahrscheinlich auf andere Zelltypen zurückzuführen, welche durch die hier verwendete Zell-Extraktions-Methode nicht mit aufgereinigt wurden. Aufgrund der Befunde war davon auszugehen, dass in murinen Thymozyten jeweils nur Cofilin 1 und Profilin 1 als Vertreter ihrer Familien vorkamen, wodurch ihre Funktion nach ihrer Deletion nicht durch ein anderes Familienmitglied übernommen werden sollte. In der Tat zeigten Western Blot Analysen keine Expression von Cofilin 2 oder ADF nach Deletion von Cofilin 1 (Abb.4.2) in Thymozyten. Ebenfalls konnte keine Expression von Profilin 2 nach Deletion von Profilin 1 in Thymozyten über Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Folgend wurde die Expression beider Proteine in der Entwicklung der Thymozyten näher untersucht. Die biochemische Analyse des Proteingehaltes von durchflusszytometrisch sortierten Thymozyten zeigte dabei eine Erhöhung der Expression von Cofilin 1 und Profilin 1 mit voranschreitender Entwicklung im Thymus (Abb.4.1). Dabei waren in CD4 einzel-positiven Thymozyten die größten Mengen an Cofilin 1 und Profilin 1 nachzuweisen, wohingegen DN Thymozyten die geringsten Mengen beider Proteine auswiesen. Interessanterweise zeigten DP Thymozyten, trotz mittlerer Expression von Cofilin 1 und Profilin 1, den mit Abstand geringsten Gehalt an gesamt Aktin auf (Abb.4.1), womit DP Thymozyten ein grundlegend anderes Verhältnis von Aktin zu Cofilin 1 und Profilin 1 aufweisen als SP Thymozyten. Der direkte durchflusszytometrische Nachweis der beiden Proteine, Cofilin 1 und Profilin 1, in Thymozyten scheiterte, da unterschiedliche Antikörper in diesem Versuchsaufbau wahrscheinlich nicht genügend Spezifität für die Analysemethode aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte der Verlauf der Profilin 1 Expression in der Entwicklung indirekt über die Verwendung der Pfn1^{GFPAktin/wt} Reportermause abgebildet und die Ergebnisse der Western Blot Analyse bestätigt werden (Abb.4.30). Le Borgne konnte zeigen, dass die Migration von DP Thymozyten im Thymus sehr viel langsamer ist, als die

von einzel-positiven Thymozyten (Le Borgne et al., 2009). Dies steht in Einklang mit dem hier präsentierten erhöhten Level an Aktin, Cofilin 1 und Profilin 1 in SP Thymozyten, welche einen erhöhten Aktin-Turnover und somit eine schnelle Migrationsgeschwindigkeit ermöglichen könnten.

5.2 Deletion von Cofilin 1 in der T-Zell Entwicklung

Ein Aspekt warum es in der Vergangenheit schwierig war, die Funktion von Cofilin 1 *in vivo* näher zu untersuchen, bestand in der Tatsache, dass der homozygote Verlust von Cofilin 1 zu einer frühen embryonalen Letalität (E10) führt (Gurniak et al., 2005). Damit die Funktion von Cofilin 1 in der T-Zell Entwicklung über einen Knockout untersucht werden konnte, wurden konditionale Mäuse mit dem Cre-loxP System verwendet (Gurniak et al., 2005), welche mit der CD4cre Mauslinie (Wolfer et al., 2001) gekreuzt wurden, wodurch Cofilin 1 ab dem DN3 Stadium in Thymozyten deletiert werden sollte. Die Expression der CD4cre-Rekombinase konnte dabei unter Verwendung des stop-YFP-R26^{CD4cre} Reporter Maus Modells (Srinivas et al., 2001) in DN Thymozyten nachgewiesen werden (Abb.4.3.1), was die von (Wolfer et al., 2001) gemachten Angaben bestätigte. Ein genauer Nachweis der YFP Expression im DN3 Stadium der Thymozyten-Entwicklung wurde aufgrund des großen technischen Aufwandes nicht durchgeführt.

Cofl^{fl/fl,CD4cre} Tiere waren lebensfähig und zeigten keine erhöhten Mortalitätsraten (Daten nicht gezeigt). Eine Southern Blot Analyse dieser Tiere zeigte mit über 93% eine hohe Deletionseffizienz der geflochten Cofilin 1 Allele in Thymozyten (Abb.4.3.2, A). Korrespondierend konnte über eine Western Blot Analyse ebenfalls eine starke Reduktion des Cofilin 1 Proteins in Thymozyten nachgewiesen werden (Abb.4.3.2, B). Der Nachweis geringer Mengen an Cofilin 1 in Cofl^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten lässt sich hierbei zum einen durch den Expressionszeitpunkt der CD4cre-Rekombinase erklären, wodurch die DN1 und DN2 Stadien der Thymozyten noch nicht von der Deletion betroffen sind. Des Weiteren handelte es sich bei den verwendeten Lysaten um Proben von totalen Thymozyten, die ebenfalls geringe Mengen an anderen Zelltypen wie DC, cTEC, mTEC und Makrophagen enthielten, welche keine CD4cre-Rekombinase exprimieren sollten. Ebenfalls zeigten die Experimente der stop-YFP-R26^{CD4cre} Linie, dass nicht in allen DP und SP Thymozyten CD4cre-Rekombinase exprimiert wird, weshalb ein geringer Anteil an sogenannten “*escaper*“ Zellen beobachtet wurde.

5.2.1 Auswirkung der Cofilin 1 Deletion auf das Aktin-Zytoskelett

Nach derzeitigem Stand der Forschung besteht eine der Hauptcharakteristika von Cofilin 1 in der Depolymerisation sowie der Destabilisierung von F-Aktin. Die Kinetik dieses Prozesses ist jedoch hoch komplex, so dass beispielsweise die durch Cofilin erhöhte Freisetzung von G-Aktin am Minus-Ende der Filamente den "Pool" an G-Aktin Monomeren erhöht, welcher zum erneuten Einbau am Plus-Ende verwendet werden könnte. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass diese Eigenschaft den Turnover der Aktinfilamente signifikant erhöht (Carlier, 1997). Darüber hinaus können durch das Cofilin-bedingte Zerschneiden von Aktinfilamenten neue Enden für die Aktin Polymerisation geschaffen werden, womit theoretisch netto Aktin Polymerisation und nicht Depolymerisation gefördert werden könnte (Moriyama and Yahara, 1999), (Ghosh et al., 2004), (DesMarais, 2005), (Oser and Condeelis, 2009). Ebenso konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Cofilin in hohen Konzentrationen sogar einen Nukleationseffekt auf Aktin ausüben kann (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Neben der Konzentration sowie Regulation von Cofilin und anderen Aktin bindenden Proteinen ist die Konzentration sowie Verfügbarkeit von G-Aktin ein entscheidender Faktor, welcher das Gleichgewicht zwischen netto Poly- oder Depolymerisation beeinflusst (Pollard, 1983). In Experimenten, in denen die Expression von Cofilin durch siRNA in humanen T-Zellen stark vermindert wurde, wurde eine 1,3-fache Erhöhung des Gehaltes an F-Aktin gemessen (Klemke et al., 2010). Die hier durchgeführten durchflusszytometrischen Experimente zeigten ebenfalls einen Anstieg an F-Aktin, um das 2,5-fache in Cofl^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten im Vergleich zu Kontrollthymozyten (Abb.4.4, A+Aⁱⁱ). Der höhere Anstieg im Vergleich zum siRNA Knockdown könnte dabei auf den stärkeren Verlust des Proteins gegenüber einem geringeren Verlust im Knockdown zurückzuführen sein (Knockdown verminderte Proteinlevel um 75%, nach WB). Darüber hinaus wurde neben der Erhöhung von F-Aktin eine signifikante Reduktion von G-Aktin gemessen. Neben der durchflusszytometrischen Messung, welche lediglich den relativen Vergleich des F- und G-Aktin Gehaltes zweier Zellpopulationen miteinander vergleichen kann, konnten die Ergebnisse durch eine biochemische Separationsmethode bestätigt werden, in der die genauen Verhältnisse von F- zu G-Aktin analysiert wurden. Diese Analyse lieferte neben einer signifikanten Erhöhung des F-Aktin Anteiles in Cofl^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten erstmalig Daten zum F- zu G-Aktin Equilibriums in Thymozyten allgemein (Abb.4.4, B+Bⁱⁱ). Unstimuliert wiesen Thymozyten mit ~20% F-Aktin und ~80% G-Aktin ein im Vergleich zu anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten (ca. 40-50% F-Aktin), ein sehr ungewöhnliches Verhältnis auf. Dieser immense Ungleichgewicht auf Seiten von G-Aktin erklärt, warum in den durchflusszytometrischen Messungen die Reduktion von G-Aktin prozentual kleiner

ausfiel, als der korrespondierende Anstieg von F-Aktin, da diese Messungen die Menge an gesamt Aktin nicht berücksichtigen. Darüber hinaus lieferte das große Reservoir an G-Aktin eine mögliche Erklärung, warum in $\text{Cofil}^{\text{fl/fl,CD4}^{\text{cre}}}$ Thymozyten, trotz extrem erhöhter Ausgangswerte von F-Aktin im Ruhezustand, nach Stimulation mit SDF-1 α noch Polymerisation gemessen werden konnte (Abb.4.17).

Die Messungen der Aktin-Polymerisation Sekunden nach Stimulation in Thymozyten zeigten erstmalig, dass der Verlust von Cofilin 1 neben einer signifikant verlängerten Depolymerisationsphase eine starke Erhöhung der Polymerisation in den ersten Sekunden nach Stimulationsbeginn bewirkte. Und dies, obwohl $\text{Cofil}^{\text{fl/fl,CD4}^{\text{cre}}}$ Thymozyten den biochemischen Analysen zufolge einen geringeren Pool an Aktin Monomeren aufwiesen als Kontrollthymozyten (Abb.4.17). Die Ergebnisse deuteten somit darauf hin, dass die Aktivität von Cofilin 1 bereits unmittelbar nach der Stimulation von Bedeutung sein könnte um der, z.B. durch Profilin 1 vermittelten (Abb.4.22) Polymerisation, direkt entgegenzusteuern. Bisherige Studien, welche sich mit der Aktivierung von Cofilin in Jurkat oder T-Zellen befassten, konnten hierzu die zeitlich begrenzte Deaktivierung von Cofilin durch Aktivierung der LIM-K, nach SDF-1 α Stimulation beobachten (Nishita et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch SDF-1 α induzierte Aktivierung von LIM-K, Rac abhängig ist (Nishita et al., 2002), (Nishita et al., 2005). Interessanterweise wurde in diesen Studien die Aktivierung von LIM-K erst eine bis fünf Minuten nach Beginn der Stimulation beschrieben, wobei Daten in den ersten Sekunden nicht erhoben wurden. Bei Betrachtung der hier präsentierten Daten fällt auf, dass der Gehalt an F-Aktin nach 60 Sekunden in Kontrollthymozyten bereits fast auf basale Anfangswerte abgefallen war, was zusammen mit der erhöhten Polymerisationsrate in $\text{Cofil}^{\text{fl/fl,CD4}^{\text{cre}}}$ Thymozyten eine frühe Aktivierung von Cofilin 1 impliziert. Der in Jurkat T-Zellen beschriebene zeitliche Rahmen der LIM-K Aktivierung steht dabei nicht im Widerspruch zu den von uns beobachteten Messungen und sollte durch Western Blot Analysen auch für Thymozyten untersucht werden. Eine Hypothese, wie Cofilin 1 bereits, auf anderem Wege, in der frühen Phase aktiviert werden könnte, ist die SDF-1 α induzierte Spaltung von PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) und die damit verbundene Freisetzung von aktivem Cofilin 1 nahe der Plasmamembran. PIP₂ ist ein Phospholipid, dessen Bindung an ADF/Cofilin in zahlreichen Publikationen nachgewiesen werden konnte (Van Troys et al., 2000), (van Rheenen et al., 2007), (Meier, 2014). Die Bindung von Cofilin an PIP₂ erfolgt dabei über seine Aktin Bindedomäne. Damit verliert dephosphoryliertes (aktives) Cofilin, nach Bindung an PIP₂ seine Fähigkeit an Aktin zu binden (Van Troys et al., 2000). Die durch Phospholipase-C (PLC) induzierte Spaltung

von PIP₂ in IP₃ und DAG setzt dephosphoryliertes Cofilin lokal an der Membran frei, wodurch es an die dort lokalisierten Aktinfilamente binden kann (Van Troys et al., 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von SDF-1 α an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR4 zur direkten Aktivierung der Phospholipase-C führt (Teicher and Fricker, 2010), welche PIP₂ spaltet und so Cofilin freisetzen könnte. Andererseits könnte Cofilin auch nach Stimulation gezielt durch Phosphatasen wie SSH-1 aktiviert werden. In der Tat konnte in Jurkat T-Zellen die Aktivierung von SSH nach SDF-1 α Stimulation nachgewiesen werden (Mizuno, 2013), wobei die dort aufgeführten Daten ebenfalls erst Minuten nach Stimulation erhoben wurden. Messungen der Phosphorylierungsgrade von Cofilin 1, LIM-K sowie von SSH in den ersten Sekunden der Stimulation könnten weiteren Aufschluss darüber geben, wie die frühe Aktivität von Cofilin 1 reguliert wird. Darüber hinaus könnten FRET Analysen an lebenden Thymozyten Aufschluss darüber geben, ob Cofilin 1 in Thymozyten an PIP₂ gebunden vorliegt und nach SDF-1 α Stimulation freigesetzt wird.

5.2.2 Auswirkung der Cofilin 1 Deletion auf die T-Zell Entwicklung

In der Vergangenheit beobachteten bereits eine ganze Reihe von Studien Entwicklungsstörungen von T-Zellen, wenn Proteine oder Signalwege gestört wurden, welche T-Zellen Aktivierung mit dem Aktin Zytoskelett verbinden. Beispielsweise wurde durch Expression einer mutierten Form von WASP (Zhang et al., 2002) oder einer katalytisch inaktiven Form der MAP-Kinase MEK-1 (Alberola-Ila et al., 1995), eine gestörte T-Zell Entwicklung beobachtet. Desweiteren führte die Deletion von ZAP70, RasGRP oder RhoH (Negishi et al., 1995) (Dower et al., 2000b)(Gu et al., 2006) ebenfalls zu einer gestörten Entwicklung der T-Zellen. In T-Zellen wird WASP zum T-Zellrezeptor rekrutiert, wo es mit ZAP70 ko-lokalisiert (Barda-Saad et al., 2005) und so die Ras-PI₃ Kaskade, den MAP/ERK Signalweg und kleine GTPasen (Bishop and Hall, 2000) mit der Aktivität von Cofilin 1 verbindet (Wabnitz et al., 2006). In vielen dieser beschriebenen Modelle wurde die letztendliche Aktivierung von Cofilin durch Dephosphorylierung des Serin 3 als mechanistische Erklärung benutzt, um die Verbindung zwischen T-Zell Aktivierung und der beobachteten Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu erklären. Obwohl dieses Modell in sich schlüssig war, lieferte es bisher keinen umfassenden Einblick in die komplexen Veränderungen im Aktinzytoskelett durch die oben genannten Moleküle, da Cofilin für keinen der beschriebenen Signalwege das einzige Ziel-Protein darstellt. Dass Cofilin für die Aktivierung von T-Zellen in der Tat eine entscheidende Funktion einnimmt, konnte jedoch bereits durch Experimente an Jurkat und humanen T-Zellen in vitro nachgewiesen werden

(Eibert et al., 2004), (Samstag et al., 2000), (Lee et al., 2000). Allerdings fehlten bisher Daten zur Funktion von Cofilin 1 in T-Zellen und Thymozyten im gewebespezifischen Kontext. Durch die Verwendung des $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Mausmodells konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Rolle von Cofilin 1 für die Entwicklung von T-Zellen direkt adressiert werden. Dabei wurde nach der effizienten Deletion durch die CD4cre-Rekombinase eine starke Entwicklungsstörung in Thymozyten auf Ebene der positiven Selektion (Abb.4.5, D) festgestellt, wobei die Anzahl an CD4-SP und CD8-SP Zellen im Thymus stark reduziert wurde (Abb.4.5, C). Korrespondierend konnte eine starke Reduktion von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben beobachtet werden (Abb.4.6, B). Darüber hinaus wiesen Southern- sowie Western Blot Analysen aufgereinigter T-Zellen darauf hin, dass es sich bei den wenigen in der Peripherie detektierten T-Zellen um Zellen handelt deren Cofilin 1 Allele nicht durch die CD4cre-Rekombinase deletiert wurden (Abb.4.6, C+D). Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen des $stop-YFP-R26^{CD4cre}$ Reporter Maus Modells, welches eine hohe, aber keine 100-prozentige, Deletionseffizienz der CD4cre-Rekombinase abbilden konnte (Abb.4.3.1). Ferner durfte bei den durchgeführten Analysen die Halbwertszeit des Proteins selbst nicht vernachlässigt werden, welche bei Cofilin 1 in T-Zellen in Kultur mit etwa einem Tag (Hecker, 2015) als relativ hoch anzunehmen ist. Die Entwicklung von DN3 zu SP im Thymus dauert in etwa 2-3 Tage (Klein, 2009). Es ist anzunehmen, dass in den wenigen detektierten SP Thymozyten eine gewisse Menge an noch nicht abgebautem Cofilin 1 vorhanden war, welche ausreichte um ihre Entwicklung zu SP Thymozyten zu gewährleisten. Hierzu passend wurde in $Cof1^{fl/del,CD4cre}$ Mäusen ein noch geringerer Anteil an einzel-positiven Thymozyten im Vergleich zu $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das $Cof1^{fl/del,CD4cre}$ Modell jedoch nicht weiter verwendet, da mögliche Einflüsse des heterozygoten Genotyps vermieden werden sollten. Interessanterweise zeigten $Cof1^{fl/\Delta}$ Mäuse keinen äußerlichen Phänotyp und wiesen auch keine erhöhten Mortalitätsraten auf. Ebenfalls zeigten $Cof1^{fl/del}$ Tiere eine normale T-Zell Entwicklung (Abb.5.1, A) mit normalen Anteilen an T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben (Abb.5.1, C), wobei die Expression von Cofilin 1 im Vergleich zu Kontrollthymozyten ($Cof1^{fl/fl}$) nur ~ 50% betrug (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise wurde in $Cof1^{fl/\Delta}$ Thymozyten und Lymphozyten ein signifikanter Anstieg an F-Aktin beobachtet (Abb.5.1, B+D), welcher sich jedoch nicht negativ auf die Entwicklung auswirkte. Der Anstieg an F-Aktin um ~30% lag dabei weit unter dem festgestellten Anstieg in $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten, welche das bis zu 2,5-fache an F-Aktin unter Verwendung der gleichen Analyseverfahren aufwiesen.

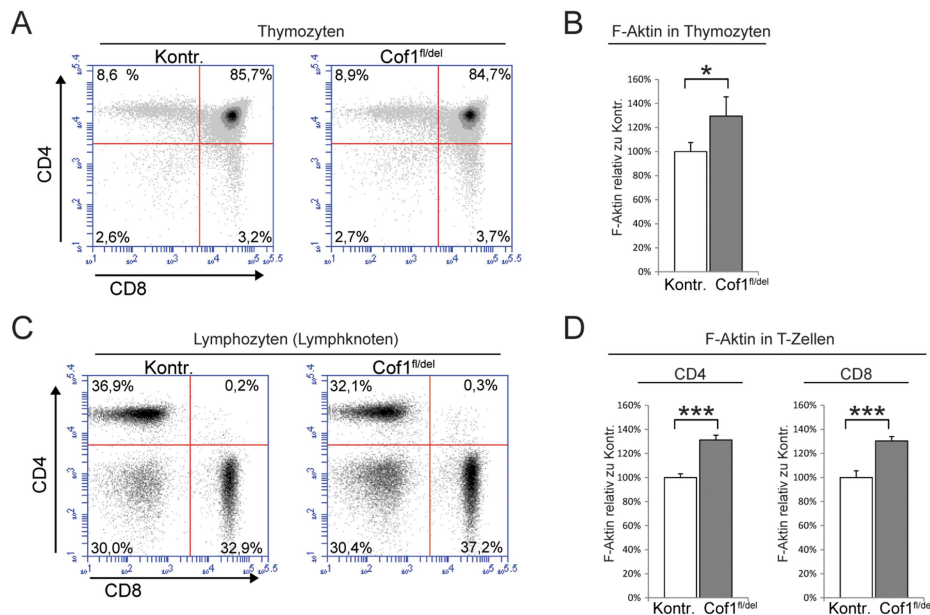


Abb.5.1 Heterozygote Deletion von Cofilin 1 in Thymozyten und T-Zellen. Die Analyse der heterozygoten Deletion von Cofilin 1 über das Cof1^{fl/del} Mausmodell zeigte keine Veränderungen in der T-Zell Entwicklung bei jedoch gleichzeitig signifikantem Anstieg an filamentösem Aktin. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse zur Expression der T-Zell Co-Rezeptoren CD4 und CD8 auf Thymozyten von Cof1^{fl/del} und Kontrollmäusen (Cof1^{fl/fl}) (Kontr.) **(B)** Auswertung der durchflusszytometrischen Messung der medianen Fluoreszenzwerte von Alexa680 gekoppeltem Phalloidin in Cof1^{fl/del} und Kontrollthymozyten zeigten einen signifikanten Anstieg an F-Aktin in Cof1^{fl/del} Thymozyten. **(C)** Wie **(A)** mit Lymphozyten aus Lymphknoten. In Cof1^{fl/del} Mäusen konnte keine veränderte Anzahl an T-Zellen in den sekundär lymphatischen Geweben festgestellt werden. (Blut und Milz ebenfalls ohne Befund (nicht dargestellt)). **(D)** Wie **(B)** mit CD4 und CD8 T-Zellen, zeigte einen Anstieg an F-Aktin in CD4 und CD8 T-Zellen wie er auch in Thymozyten gemessen wurde. **(A+C)** Nummern in Ecken geben den Prozentsatz an Zellen im entsprechenden Quadranten an. **(B+D)** Fluoreszenz Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf die Kontrolle (=100%) normalisiert. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt *0.01<P<0.05; **0.001<P<0.01; ***P<0.001. **(A-D)** Daten von n=4 Tieren pro Genotyp.

Diese Befunde zeigten, dass bereits 50% der Proteinmenge von Cofilin 1 ausreichte, um eine erfolgreiche T-Zell Entwicklung zu gewährleisten, obwohl bereits signifikante Veränderungen im Aktin Zytoskelett beobachtet wurden. Es ist demnach möglich, dass in Cof1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten ein gewisser Schwellenwert der Aktin Missregulation überschritten wurde, welcher eine erfolgreiche Entwicklung nicht mehr möglich machte. Allerdings könnten diese Befunde auch ein Hinweis darauf sein, dass Cofilin 1 neben seiner Funktion als zytoplasmatischer Aktin Regulator andere physiologische Aufgaben besitzen könnte. Neueste Forschungen konnten Cofilin 1 in einem Komplex mit Aktin und phosphorylierter RNS Polymerase II in Zellkernen von HeLa- Karzinom-Zellen nachweisen (Obdlik and Percipalle). Darüber hinaus konnte über Chromatin IP von HeLa-Zellen keine Assoziation von Aktin mit der RNS Polymerase II nach Cofilin 1 Knockdown mehr beobachtet werden, wodurch Cofilin 1 eine mögliche Rolle in der Aktin regulierten Elongationsphase der Transkription zukommen könnte (Obdlik and Percipalle). Interessanterweise konnte bereits in der Vergangenheit eine Translokation von zytoplasmatischem Cofilin 1 in den Zellkern von

Jurkat und humanen T-Zellen nach Stimulation durch Antikörper (CD2) beobachtet werden (Samstag et al., 1994), (Nebl et al., 1996). Die Untersuchung dieser möglichen nukleären Funktion von Cofilin 1 war Gegenstand einer eigenständigen Forschungsarbeit, welche durch Mutation der nuklearen Zielsequenz von Cofilin 1 die möglichen Funktionen von Cofilin 1 im Zellkern näher untersucht hat (Roy, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine durch die Mutation ausgelöste Fehlregulation des Proteins beobachtet, welche zu einem Verlust des Cofilin 1 Proteins in der Embryonalentwicklung führte. Daneben wurde eine veränderte Aktivität des mutierten Proteins beobachtet. Auch in Thymozyten ($Cofilin^{KTRTK/WT,CD4cre}$) führte die Mutation der Zielsequenz (NTS) zu einem Verlust des Proteins und damit zum gleichen Phänotyp, wie in $Cofilin^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen (Salz, 2011). Darüber hinaus konnte die beobachtete Translokalisierung von Cofilin 1 (Samstag et al., 1994) in murinen Thymozyten und Jurkat Zellen nach Stimulation nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die experimentellen Bedingungen variiert haben und die verwendete Western Blot Methode nicht genügend Sensitivität für einen Nachweis besaß. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung kann demnach eine nukleäre Funktion von Cofilin 1 in Thymozyten weder ausgeschlossen noch bestätigt werden und bedarf somit weiterer Forschung.

Ausgehend von der Gesamtheit dieser Befunde war von einem vollständigen Block der T-Zell Entwicklung auf Ebene der positiven Selektion in DP Thymozyten nach vollständigem Verlust des Proteins auszugehen.

5.2.3 Sekundäre Auswirkungen der Cofilin 1 Deletion in Thymozyten

Einhergehend mit dem Verlust an T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben wurde eine Erhöhung der B-Zell Anteile beobachtet (Daten nicht gezeigt) - ein Phänomen, welches bereits zuvor nach dem Verlust von peripheren T-Zellen beobachtet werden konnte (Negishi et al., 1995), (Molina et al., 1992). Über die Regulation dieses kompensatorischen Effektes ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass der Verlust einer Zellpopulationen eine ökologische Nische frei werden lässt, welche von anderen Zellen so besetzt wird, dass die Zellzahl des Organs auf einem konstanten Level gehalten wird. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch eine erhöhte Anzahl an $\gamma\delta$ -T-Zellen in $Cofilin^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen beobachtet werden (Abb.4.7). Da in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen von der Deletion durch die CD4cre-Rekombinase nicht betroffen waren (Abb.4.7, D), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei ebenfalls um einen bisher noch unbekanntem kompensatorischen sekundären Effekt handelt. Ein weiterer sekundärer Effekt der Deletion von Cofilin 1 in Thymozyten zeigte sich in einer

starken Reduktion der medullären Anteile des Thymus von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Tieren (Abb.4.8). Untersuchungen von (Philpott et al., 1992b), (Surh et al., 1992), (White et al., 2010) zeigten bereits, dass einzel-positive Thymozyten für die Differenzierung von medullären Epithelzellen essentiell sind. Auch die starke Reduktion der Medulla wurde bereits zuvor in verschiedenen voneinander unabhängigen Mausmodellen beobachtet, in denen positiv selektionierte einzel-positive Thymozyten fehlten (Negishi et al., 1995), (Zhang et al., 2002). Um einen direkten Effekt des Cofilin 1-Verlustes auf die Architektur des Thymus auszuschließen, wurde Cofilin 1 durch die Verwendung einer K14cre Mauslinie in medullären Thymus Epithelzellen deletiert. Eine Analyse des Thymus von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,K14cre}}$ Tieren zeigte dabei keine Veränderungen in der Medulla oder T-Zell Entwicklung (unveröffentlichte Daten C.Gurniak). Zusätzlich wurde durch eine Knochenmarktransplantation (Abb.4.9) gezeigt, dass sich $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten auch in einem WT Thymus nicht entwickeln konnten, wobei es ebenfalls zu einer Reduktion der medullären Anteile in den $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Chimären im Vergleich zu chimären Kontrollmäusen kam. Die Degeneration der Thymus Medulla steht in Einklang mit den Befunden von White et al, welche zeigen, dass einzel-positive Thymozyten für die langfristige Erhaltung und Differenzierung der medullärer Epithelzellen von großer Bedeutung sind (White et al., 2010). Zusammengenommen sprechen die Daten dafür, dass ein Zell-autonomer Defekt den Block in der Entwicklung der $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten verursacht.

5.2.4 Mögliche Ursachen des Entwicklungsdefizits von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten

In Jurkat T-Zellen wurde Cofilin 1 als essentiell für die Proliferation und das Überleben dieser Zellen beschrieben (Samstag et al., 1996). In Thymozyten ist eine starke Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Einwanderung in den Thymus bekannt, bevor diese DP werden (Fehling and Boehmer, 1997). Da DP Thymozyten den mit Abstand größten Anteil an Zellen im Thymus stellen und in $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ in normaler Anzahl nachgewiesen werden konnten, war es unwahrscheinlich, dass ein Proliferationsdefekt als Ursache des Entwicklungsdefizits in Betracht kam. Eine genauere Analyse der *in vitro* Proliferationskapazität von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten (Abb.4.11, B) konnte ebenfalls keine Veränderungen im Vergleich zu Kontrollthymozyten feststellen, wodurch ein Proliferationsdefekt als Ursache der Entwicklungsstörung weiterhin als unwahrscheinlich anzusehen ist. Ebenso konnten durchflusszytometrische Untersuchungen keine Veränderungen im Zellzyklus von $\text{Cofl}^{\text{fl/fl,CD4cre}}$ Thymozyten feststellen (Abb.4.11, A), wie es

zuvor im zentralen Nervensystem (Bellenchi et al., 2007) für Neuronale Cofilin^{-/-} Vorläuferzellen, oder für Cofilin^{KTRTK/KTRTK} MEFs (Roy, 2015) beschrieben wurde, welche jeweils in der G2/M Phase des Zellzyklus akkumulierten.

Da die Deletion eines Proteins theoretisch zum direkten Tod einer Zelle führen könnte, wurden Analysen zur Apoptose von Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten durchgeführt. In der Vergangenheit konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Cofilin 1 und Apoptose in verschiedenen Zellen beobachtet werden. Dabei wurde die Rolle, die Cofilin 1 in der Apoptose spielen könnte, in der Literatur bereits kontrovers diskutiert, was vordergründig in den verschiedenen experimentellen und zellulären Systemen, welche verwendet wurden, begründet ist. Experimente wurden dabei sowohl an primären Zellen (Wabnitz et al., 2010), (Rehklau et al., 2012) als auch an Krebs Zelllinien (Samstag et al., 1996), (Chua et al., 2003), (Klamt et al., 2009) durchgeführt. Zusätzlich wurde Apoptose durch verschiedene Behandlungen herbeigeführt und unter Zuhilfenahme verschiedener Parameter gemessen, was einen adäquaten Vergleich der Systeme äußerst schwierig gestaltet. (Wabnitz et al., 2010) beschreibt beispielsweise eine Translokation von Cofilin unter oxidativem Stress zu den Mitochondrien und einen damit einhergehenden Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod in humanen T-Zellen. Andererseits wurde in embryonalen murinen Fibroblasten (MEF) ebenfalls eine Translokation von Cofilin 1 zu Mitochondrien, nach Staurosporin Behandlung, nachgewiesen welche jedoch hier keine Auswirkungen auf die Apoptose hatte (Rehklau et al., 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von Thymozyten konnten anders als in der Literatur für andere Zellen beschrieben, jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen der Deletion von Cofilin 1 und Apoptose in Thymozyten feststellen (Abb.4.10). Während der Selektionsvorgänge im Thymus werden ~95% der Thymozyten ausgesiebt, und begehen Apoptose. Trotz dieser enormen Anzahl an Zellen, die im Thymus unter dem Vorgang der Apoptose sterben, ist der detektierbare Anteil an apoptotischen Zellen im Thymus sehr gering. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass apoptotische Zellen im Thymus sehr effizient durch Makrophagen entfernt werden. Ein anderer Grund ist, dass die Messungen zum Anteil an apoptotischen Zellen nach der Isolation lediglich Momentaufnahmen darstellen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es sehr schwierig in Thymozyten Veränderungen im Apoptoseverhalten zu beobachten. Eine künstliche Erhöhung der Apoptoserate durch vierstündige Kultivierung der Thymozyten konnte dabei *ex vivo* die Apoptose von Thymozyten zwar erhöhen, förderte jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Apoptoseverhalten von Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zu Tage (Abb.4.10, B). Da weder direkt nach der Isolation, noch nach vier

stündiger Kultur signifikante Unterschiede in Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten die Apoptose betreffend festgestellt werden konnten, war ein Zusammenhang mit Apoptose als Ursache des Entwicklungsdefizits ebenfalls unwahrscheinlich.

In anderen Untersuchungen, welche hauptsächlich an Tumor-Zelllinien durchgeführt wurden, ist Cofilin als relevant für die Sortierung einiger Proteine im Golgi-Apparat, sowie deren Transport an die Zelloberfläche, beschrieben worden (Rosso et al., 2004), (Salvarezza et al., 2009), (von Blume et al., 2009), (von Blume et al., 2011). Eine Rezeptor Reexpressionsanalyse der CD4 und CD8 Rezeptoren zeigte keine signifikanten Veränderungen der Reexpressionskinetik in Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten (Abb.4.12), womit ein genereller Transportdefekt von Rezeptoren ausgeschlossen werden konnte. Ein Transportdefekt anderer Transmembranproteine konnte mit dem gegebenen Versuchsaufbau jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass auf Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten nach Stimulation mit Antikörpern (CD3, CD28) eine stark erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 gemessen werden konnte (Abb.4.13), macht es allerdings ebenfalls unwahrscheinlich, dass eine Fehlsortierung von Proteinen im Golgi-Apparat für den Entwicklungsdefekt in Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten verantwortlich ist.

Dass Thymozyten *in vitro* durch Antikörper (CD3, CD28), in ihrer Expression des Aktivierungsmarkers CD69, stimuliert werden konnten und dabei keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollzellen zeigten, steht in Widerspruch zu Studien, welche Cofilin als essentiellen Mediator für die Aktivierung von Jurkat und humanen T-Zellen beschrieben haben (Lee et al., 2000), (Eibert et al., 2004), (Samstag et al., 2013). In der Tat konnte in einigen Studien die phosphospezifische Regulation von Cofilin nach Ko-Stimulation nachgewiesen werden (Samstag et al., 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, dass in T-Zellen, die mutante Formen von Cofilin exprimieren (C39G sowie C80G), die ko-stimulierte Aktivierung dieser Zellen stark beeinträchtigt war (Klemke et al., 2008). Darüber hinaus konnte eine verminderte T-Zell Aktivierung nach siRNA Knockdown von Cofilin (Klemke et al., 2008) oder nach Behandlung von T-Zellen mit PI3-K Inhibitoren (Lee et al., 2000) beobachtet werden. Da Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten in den hier durchgeführten Versuchen nach Stimulation eine stark erhöhte CD69 Expression zeigten, könnten durchaus Unterschiede in der Aktivierbarkeit zwischen murinen Thymozyten und humanen T-Zellen sowie Jurkat T-Zellen bestehen. Bei den Experimenten mit siRNA oder Inhibitoren sollten allerdings auch off Target Effekte nicht komplett ausgeschlossen werden, welche zu einem Cofilin unabhängigen Einfluss auf das System geführt haben könnten. Des Weiteren wurden die Daten unter anderen experimentellen Bedingungen erhoben. Während bei (Klemke et al., 2008) die

Expression von CD69 bereits nach 6-stündiger Behandlung gemessen worden ist, fanden die hier präsentierten Messungen erst nach 20- bzw. 44-stündiger Behandlung statt. Neben CD69 sollten in der Zukunft weitere T-Zell Aktivierungs Marker wie IL-2 hinzugezogen werden um die Diskrepanzen zwischen den unterschiedlichen Systemen einhergehend zu untersuchen. Zusammenfassend konnte ein Einfluss der Cofilin 1 Deletion auf die Aktivierung der Thymozyten nicht bestätigt werden. Von einer intakten Signalweiterleitung ausgehend müssten sich Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten *in vitro* gemäß des Differenzierungsprotokolls von (Cibotti et al., 1997), in CD4-SP Thymozyten differenzieren lassen. In der Tat verhielten sich Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten unter diesen Bedingungen wie entsprechende Kontrollthymozyten (Cof1^{fl/fl}) und entwickelten sich erfolgreich zu CD4-SP Thymozyten (Abb.4.18). Dem folgend besitzen Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten noch die Fähigkeit sich über das DP Stadium hinaus zu entwickeln, können diese Kapazität jedoch *in vivo* nicht abrufen.

5.2.5 Auswirkungen der Deletion von Cofilin 1 auf Adhäsion und Migration

Im Gegensatz zu der künstlichen Differenzierung von Thymozyten *in vitro* müssen Thymozyten im Gewebe mit einer Vielzahl Antigen-präsentierender Zellen interagieren um positive Differenzierungssignale zu erhalten (Bouso et al., 2002). Studien haben gezeigt, dass Thymozyten *in vivo* dabei an ICAM-1 präsentierende Thymus-Epithelzellen binden (Singer et al., 1990) und dass die Bindung des Rezeptors LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 eine wichtige Rolle für die Differenzierung der Thymozyten spielt (Fine and Kruisbeek, 1991), (Singer et al., 1990). So resultierte die Blockierung der LFA-1 Funktion durch Antikörper (*in vitro* Kultur) in einer verminderten negativen Selektion von DP Thymozyten durch dendritische Zellen (Carlow et al., 1992). Diese Befunde passen zu der Hypothese, dass der beobachtete Adhäsionsdefekt von Cof1 mutanten Thymozyten auf ICAM-1, ihre Entwicklung negativ beeinflusst. Daneben wurde LFA-1 auch eine bedeutende Funktion für das Einwandern von T-Zellen in Lymphknoten zugesprochen (Berlin-Rufenach et al., 1999). LFA-1 ist darüber hinaus durch Proteine wie α -Actinin, Talin oder Vinculin direkt mit dem Aktin Zytoskelett verbunden (Brakebusch and Fässler, 2003). Dabei ist die Bindung von LFA1 an ICAM-1 im unstimulierten Zustand zunächst sehr gering (Lub et al., 1997). LFA-1 kann jedoch durch Chemokine wie SDF-1 α , welches auch im Thymus exprimiert wird, aktiviert und seine Bindung zu ICAM-1 so gesteigert werden (Lub et al., 1997), (Peled et al., 2000). Diese Regulation des Adhäsionspotentials von Integrinen, wird dabei in der Literatur als Integrin "inside out signaling" bezeichnet, und stellt einen Prozess dar, welcher durch intrazelluläre Signalwege streng kontrolliert wird (Hynes, 1992). Die Aktivierung von Integrinen kann über verschiedene Signalwege erfolgen. Beschrieben sind unter anderem G-

Proteine, Rezeptor Thyrosin Kinasen, Proteinkinase C, cAMP und der PI3-K Signalweg (Stewart et al., 1996), (Shimizu and Hont, 1996), (Bokoch, 1995), (Laudanna et al., 1996), (del Pozo et al., 1995). In diesem Zusammenhang wurde SDF-1 α bereits von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen als wichtiges Signalprotein in der Entwicklung von T-Zellen beschrieben (Takahama, 2006), (Norment and Bevan, 2000), (Uehara et al., 2002). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Expression des SDF-1 Rezeptors CXCR4 je nach Entwicklungsstadium der Thymozyten differenziell moduliert wird (Kitchen and Zack, 1997). Ein Block des SDF-1 Rezeptors mit Antikörpern führte im Rahmen von *in vitro* Kulturexperimenten mit humanen Thymozyten zu einer Störung ihrer Entwicklung (Hernandez-Lopez, 2002). Was Cofilin angeht konnte bereits in früheren Studien ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Cofilin und dem Ausbreitungsverhalten (Spreading) von T-Zellen auf Antigen-präsentierten Zellen beobachtet werden (Freeman et al., 2011). Sowohl eine geringere Adhäsion als auch ein geringeres Ausbreitungsverhalten (Abb.4.14.2) konnten im Rahmen dieser Arbeit auch in Cofilin 1 mutanten Thymozyten nachgewiesen werden, wodurch die Daten von (Freeman et al., 2011) bestätigt werden konnten, welche zeigen konnten dass die Aktivität von Cofilin für ein effizientes Ausbreitungsverhalten von B- und T-Zellen notwendig ist. Interessanterweise wurden Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten nicht signifikant in ihrer Adhäsion oder Ausbreitung durch SDF-1 α stimuliert. Demgegenüber konnte SDF-1 α Stimulation sowohl Aktin Polymerisation (Abb.4.17) als auch die Migration (Abb.4.15.2; Abb.4.16.2) von Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten erfolgreich anregen. Dies macht es zusammen mit einer unveränderten Expression des SDF-1 Rezeptors auf den mutanten Thymozyten (Abb.4.14.1, B) unwahrscheinlich, dass Cof1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten schlechter auf SDF-1 α reagierten. Hingegen besteht die Möglichkeit, dass Cofilin 1 in der SDF-1 α abhängigen Aktivierung von Integrinen wie LFA-1 eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Stimulation durch SDF-1 α zu einer Aktivierung (Clustering) des Integrins LFA-1, in Lymphozyten, führt (Lub et al., 1997). Ebenfalls ist bekannt, dass die Bindung von SDF-1 α an seinen Rezeptor CXCR4 zu direkten Aktivierung (über G-Proteine) der Phospholipase-C führt, welche PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet (Teicher and Fricker, 2010). Somit könnte zum einen durch Aktivierung der Phospholipase-C direkt an PIP₂ gebundenes aktives Cofilin freigesetzt werden, zum anderen würde durch das so freigesetzte DAG die Ras-PI3K Kaskade aktiviert, welche unter anderem die Dephosphorylierung von Cofilin reguliert (Dower et al., 2000b), (Wabnitz et al., 2006). Dass Phospholipase-C in diesem Zusammenhang für die Adhäsion von Fibroblasten Bedeutung ist, wurde bereits gezeigt

(Tvorogov, 2005). Die hier präsentierten Daten sind ein erster Hinweis darauf, dass Cofilin 1 in diesem Prozess involviert sein könnte, weshalb die Clusterung von LFA-1 auf Cofilin^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten näher untersucht werden sollte. Daneben sollte auch die Avidität und Affinität der LFA-1 Rezeptoren auf der Oberfläche der Cofilin^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten detailliert analysiert werden. Um die Funktion von Cofilin in diesem Prozess auch vor einem unveränderten Aktin-Hintergrund zu untersuchen, könnten spezifische Inhibitoren für Cofilin, wie beispielsweise Aptamere (Hecker, 2015), eingesetzt werden.

Abgesehen von direkter Zell-Zell Interaktion sind Integrin-abhängige Zell-Substrat Bindungen ein essentieller Bestandteil von Zell-Bewegungen auf zweidimensionalen Untergründen (Vicente-Manzanares et al., 2009) (Mitra et al., 2005). Neben der direkten Zell-Zell Interaktion setzt eine erfolgreiche Entwicklung von Thymozyten ihre Migration durch das Thymus Gewebe voraus (Savino et al., 1993). Neuste Untersuchungen über intravitale zwei Photonen Mikroskopie konnten zeigen, dass sich DP Thymozyten vor positiver Selektion in einem chaotisch zufälligen Migrationsmuster im Cortex fortbewegen und erst nach positiver Selektion gerichtet in die medullären Bereiche des Thymus einwandern (Witt et al., 2005a), (Le Borgne et al., 2009). Dabei wird ihre Wanderung durch den Thymus durch Migrationssignale, wie SDF-1 α und CCL25, reguliert (Ladi et al., 2006). Adhäsion und Migration sind dabei miteinander verflochtene Vorgänge, welche beide von einer strengen Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Cofilin abhängen. An Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Cofilin zu einer erhöhten Adhäsion und Migration der Zellen (Zhang et al., 2013) führte, wohingegen der “Knockdown“ von Cofilin die Zellbewegung signifikant reduzierte (Hotulainen et al., 2005). Auch bei Makrophagen führte der Verlust von Cofilin zu verminderten Adhäsions- und Migrationsraten (Jönsson et al., 2012). In diesem Zusammenhang wird Cofilin eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung und Ausdehnung lamellopodialer Protrusionen an der Vorderseite migrierender Zellen zugeschrieben (Svitkina, 1999), (Chan, 2000), (Bailly and Jones, 2003), (Dawe et al., 2003), (Jovceva et al., 2007). Auf zweidimensionalem Untergrund ist dabei für entwickelte T-Zellen ein Integrin-abhängiger amöboider Bewegungsvorgang beschrieben (Friedl et al., 2001), (Friedl and Weigel, 2008). Im dreidimensionalen Umgebung wie dem Thymus basiert der Fortbewegungsmechanismus jedoch wahrscheinlich eher auf einem konstanten Fluss von Aktin an der Zellfront (“leading edge“) (Friedl et al., 1998), (Wolf et al., 2003). Neben einer kontinuierlich gesteuerten Aktin-Polymerisation an der Vorderseite der Zellen durch Proteinkomplexe, wie WAVE und Arp2/3 (Machesky et al., 1999), hängt dieser Mechanismus auch von einem simultanen Abbau der

Aktinfilamente am hinteren Ende des Lamellipodiums ab, welcher durch Proteine wie Cofilin gesteuert wird. Anders als für Bewegung auf zweidimensionalem Untergrund kann die Bewegung in dreidimensionalem Kontext damit sowohl integrinabhängig als auch integrinunabhängig erfolgen (Friedl et al., 1998). Es wurde beschrieben, dass der Verlust von Cofilin die Migration von humanen T-Zellen in dreidimensionalen, jedoch nicht im zweidimensionalen Umgebungen, negativ beeinflusst (Klemke et al., 2010). Die hier aufgeführten Daten bestätigen eindeutig einen starken Migrationsdefekt von Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung (Abb.4.16.1/2), zeigen jedoch auch signifikant verminderte Migrationsraten im "Transwell", welcher eher die zweidimensionale Migration adressiert (Abb.4.15.2). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit den unterschiedlichen Transwell-Protokollen zusammen hängen, welche verwendet wurden. So wurde der Transwell hier nicht mit ICAM-1 beschichtet. Jedoch weist die beobachtete verminderte Adhäsion auf ICAM-1 beschichtetem Untergrund auf einen möglichen Migrationsdefekt auch in rein zweidimensionalen Umgebungen hin. Anders als (Klemke et al., 2010) konnte von (Nishita et al., 2005) nach Knockdown von Cofilin in Jurkat T-Zellen eine verminderte Migration und Chemotaxis (zu SDF-1) unter Verwendung von Dunn Chambers beobachtet werden. Da dieser Assay formal zweidimensionale Migration adressiert, könnten fundamentale Unterschiede zwischen den zellulären Systemen bestehen. Um diese Frage in der Zukunft detailliert beantworten zu können, sollten mikroskopische Analysen zum ungerichteten und gerichteten Migrationsverhalten von Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten auf zweidimensionalem Untergrund durchgeführt werden. Allerdings wird die verminderte Adhäsion von Cofilin^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten die Interpretation dieser Versuche extrem schwierig gestalten.

Neben seiner Funktion in Immunzellen wird die Rolle von Cofilin für die Migration von Tumorzellen in der Literatur ebenso kontrovers diskutiert. So führte der Knockdown von Cofilin in metastasierenden Krebszellen eines Mammakarzinoms zu einer verstärkten Adhäsion und Migration der Zellen unter EGF Stimulationsbedingungen (Tahtamouni et al., 2013). Zum einen könnte die EGF Stimulation in diesen Zellen andere Signalwege aktivieren als SDF-1 α dies tut. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass in bestimmten Krebsarten durch die angehäuften Mutationen die physiologische Funktion, welche für Cofilin 1 in nicht Krebszellen beschrieben wurde, überlagert wird. Diese Hypothese wird gestützt durch Befunde, die zeigen konnten, dass Cofilin und relevante regulatorische Proteine in Mammakarzinomzellen vollkommen anders exprimiert werden als in entsprechenden nicht entarteten Zellen (Sidani et al., 2007). So ist Cofilin in Adenokarzinomen essentiell für die EGF induzierte Migration (Zebda et al., 2000) und ebenso entscheidend für die Invasion von

Astrozytom-Zellen in nicht entartetes Gewebe (Nagai et al., 2011). Auch wurde Cofilin als essentiell für die gerichtete Migration von Melanom-Zellen beschrieben (Hotulainen et al., 2005). In allen aufgeführten Systemen, einschließlich der hier präsentierten Daten, spielte Cofilin 1 eine entscheidende Rolle für die Migration und Adhäsion von Zellen, wobei der Verlust von Cofilin stets zu einer Akkumulation von F-Aktin führte. Die hier präsentierten Daten konnten das Bild von Cofilin erweitern, indem gezeigt werden konnte, dass $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung trotz verminderter Migrationsgeschwindigkeiten noch zu schnellen Migrationsvorgängen $>8\mu\text{m}/\text{min}$ in der Lage waren. Darüber hinaus deutet das längere Pausieren der Thymozyten auf eine mögliche Funktion von Cofilin als Taktgeber für Migrationsvorgänge hin, welcher die Pausenzeiten zwischen einzelnen Migrationsschüben reguliert. Die hier erhobenen Daten mit 90 Sekunden Intervallen reichen jedoch nicht aus, um diese Theorie ausreichend belegen zu können, weshalb die Untersuchungen mit einer viel höheren zeitlichen Auflösung durchgeführt werden sollten. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zum gerichteten Migrationsverhalten in Bezug auf Cofilin durchgeführt werden. Das eher chaotisch und ungerichtete Migrationsverhalten von DP Thymozyten (Witt et al., 2005a), macht es allerdings schwierig gerichtete Migration in $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten überhaupt zu untersuchen. Die bereits in (Hecker, 2015) verwendete Rosa26-CreER^{T2} Mauslinie, welche für eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Rosa26 Promotors kodiert (Badea et al., 2003), könnte hierbei verwendet werden, um Cofilin 1 in T-Zellen *in vitro* zu deletieren und anschließend ihr Migrationsverhalten näher zu untersuchen.

Nach Betrachtung aller zur Verfügung stehenden Daten ist es anzunehmen, dass der Entwicklungsstopp der $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten auf ihre verminderte Adhäsion sowie Migration zurückzuführen sein könnte. $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten waren nicht in der Lage sich in einem WT Thymus zu SP Thymozyten zu entwickeln, konnten jedoch *in vitro* erfolgreich in CD4-SP Thymozyten umgewandelt werden. Es ist anzunehmen, dass auch *in vivo* $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nicht effizient durch den Thymus migrieren und daher nicht mit entsprechenden Antigen-präsentierenden Zellen Kontakt aufnehmen können, was zu dem observierten Block der positiven Selektion führen würde. In der Zukunft könnten intravitale Zwei-Photonen-Untersuchungen verwendet werden, um diese Hypothese auch *in vivo* direkt im Thymus bestätigen zu können. Darüber hinaus sollte die Ausbildung der Struktur der immunologischen Synapse zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und $Cofil1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten untersucht werden. Dies könnte weiteren Aufschluss darüber geben, ob Cofilin 1 für die Ausbildung der immunologischen Synapse in Thymozyten relevant ist, wie es bereits

zuvor für Jurkat T-Zellen und humane T-Zellen beschrieben wurde (Eibert et al., 2004), (Samstag et al., 2003).

5.3 Deletion von Profilin 1 in der frühen T-Zell Entwicklung

Anders als im Falle von Cofilin 1 stammten die bisherigen Erkenntnisse über Profiline zu einem großen Teil aus anderen zellulären Systemen und *in vitro* Studien. Studien, welche die Funktion von Profilin in T-Zellen oder deren Entwicklung direkt adressieren, fehlen. Erste Studien beschrieben Profilin jedoch bereits als Teil des T-Zell Rezeptor Signalweges (Billadeau and Burkhardt, 2006), (Billadeau et al., 2007) und ordneten ihm eine mögliche Rolle in der Formation der immunologischen Synapse zu (Dustin and Cooper, 2000). Diese Erkenntnisse beruhen jedoch auf indirekten Schlussfolgerungen, welche sich auf die Lokalisation von Profilin stützen, es jedoch nicht direkt adressieren. Da Profilin 1 über seine poly-L-Prolin Domäne mit einer ganzen Vielzahl anderer Proteine interagieren kann (Metzler et al., 1994), (Mahoney et al., 1999) wird angenommen, dass Profilin neben seiner Funktion als Aktin-Polymersiationsfaktor auch eine Funktion für die Ausbildung unterschiedlichster Proteinkomplexe besitzt (Witke, 2004), deren Funktionen man gerade erst beginnt zu verstehen. Dies macht es schwierig, über die bloße Anwesenheit von Profilin 1 in einem Komplex Aussagen über dessen mögliche Funktion zu treffen. Ein Hindernis, die Funktion von Profilin 1 in T-Zellen direkt zu adressieren, lag wohl auch in der Tatsache begründet, dass der homozygote Knockout von Profilin 1 bereits zwischen dem Zwei- bis Acht-Zellstadium der Embryonalentwicklung in Mäusen letal ist (Witke et al., 2001). Daher mussten konditionale Knockout Mäuse unter Verwendung des Cre-lox-P Systems verwendet werden, um Profilin 1 in einem frühen Stadium der T-Zell Entwicklung im Thymus zu deletieren. Die Deletion der Profilin 1 Allele unter Verwendung der CD4cre-Rekombinase (Wolfer et al., 2001) war in Thymozyten mit einer Deletionseffizienz von ~98% nach Southern Blot Analysen hoch effizient (Abb.4.20, A). Korrespondierend konnte eine starke Reduktion des Profilin 1 Proteins in Thymozyten über Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abb.4.20, B). Der Nachweis geringer Mengen des Profilin 1 Proteins ist, wie bei Cofilin 1 zuvor, wahrscheinlich auf den Deletionszeitpunkt der CD4cre-Rekombinase im DN3 Stadium der Thymozyten Entwicklung sowie dem Vorhandensein von "escaper" Zellen, zurückzuführen. Ein weiterer Faktor könnte eine hohe Halbwertszeit des Profilin 1 Proteins darstellen. Um diese Hypothese zu testen, könnte in der Zukunft das Tamoxifen induzierbare Rosa26-CreER^{T2} Mausmodell (Badea et al., 2003) verwendet werden und so die Halbwertszeit von Profilin 1 nach der Deletion des Gens bestimmt werden. Um dabei die Effizienz der

Tamoxifeninduktion zu bewerten, sollte zeitgleich das stop-YFP-R26 Reporter Maus Modell (Srinivas et al., 2001) eingekreuzt werden.

5.3.1 Auswirkung der Profilin 1 Deletion auf das Aktin Zytoskelett

Profilin gehört zu den ersten Proteinen, deren Bindung an Aktin beschrieben wurde (Carlsson et al., 1977), wobei anfängliche *in vitro* Studien zeigten, dass es die Polymerisierung von Aktin-Filamenten hemmt indem es an G-Aktin bindet und so den "Pool" an zur Polymerisation zur Verfügung stehenden Aktin-Monomeren vermindert (Carlsson et al., 1977). Erst spätere Analysen, die unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten, dass Profilin den Nukleotid-Austausch von ADP-Aktin zu ATP-Aktin in Aktin-Monomeren um das bis zu 1000-fache steigert, womit der Pool an Polymerisationsfähigem ATP-Aktin in der Zelle aufrechterhalten wird (Goldschmidt-Clermont et al., 1991a), (Goldschmidt-Clermont et al., 1992), (Perelroizen et al., 1995), (Selden et al., 1999). Weitere *in vitro* Studien zeigten, dass es nach Bindung des Profilin/Aktin-Komplexes an F-Aktin zu einer stark verminderten Affinität von Profilin zu Aktin kommt, wodurch Profilin von Aktin dissoziiert und so vermehrt ATP-Aktin an das wachsende Ende von Aktinfilamenten gebunden wird (Gutsche-Perelroizen et al., 1999). Anders als anfänglich angenommen, kann Profilin *in vivo* somit den Aufbau von Aktinfilamenten fördern. So führte beispielsweise die Überexpression von Profilin in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) zu einem erhöhten Gehalt an filamentösem Aktin sowie stabilisierten Aktin-Filamenten (Finkel et al., 1994). Darüber hinaus wurden in der Zwischenzeit eine Vielzahl von Aktin Nukleatoren wie Arp2/3 (McCollum et al., 1996), (Mullins et al., 1998b), WASP (Miki et al., 1998), Mena/VASP (Reinhard et al., 1995), (Gertler et al., 1996), mDia (Watanabe, 1997) und Formine (Kovar et al., 2006) entdeckt, welche mit Profilin interagieren. Es wird daher inzwischen angenommen, dass Profilin *in vivo* in Abhängigkeit seiner Bindungspartner den Aufbau von Aktin-Filamenten auf unterschiedliche Weise fördert (Rotty et al., 2015). Dazu passend führte der Verlust von Profilin-1 in $Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}}$ Thymozyten zu einem ~20% verminderten Gehalt an F-Aktin im Vergleich zu Kontrollthymozyten (Abb.4.21, A). Detailanalysen der einzelnen Entwicklungsstadien offenbarten dabei sogar eine Reduktion von F-Aktin in CD4-SP und CD8-SP Thymozyten von weit über 50% (Abb.4.21, B). Diese Beobachtungen stehen in Einklang zu den im Vergleich zu DP-Thymozyten erhöhten Expressionswerten von Profilin-1 in CD4- und CD8-SP Thymozyten (Abb.4.1), wodurch sich die Deletion in diesen stärker auszuwirken scheint. Zusammengefasst mit einem beobachteten Überschuss an G-Aktin in Thymozyten (Abb.4.4, B) führte der Verlust von Profilin-1 demnach zu einer dramatischen

Verschiebung des F-/G-Aktin Gleichgewichtes. Dies untermauert die in der Literatur beschriebene Rolle von Profilin-1 als Polymerisationsfaktor, welcher auch das Gleichgewicht von F-/G-Aktin *in vivo* reguliert. Andererseits ergaben diese Messungen wenig Aufschluss über die Funktion von Profilin-1 bei der Polymerisation von Aktin-Filamenten in Thymozyten. Bereits wenige Sekunden nach der Stimulation mit SDF-1 α ist in Thymozyten ein starker Anstieg an filamentösem Aktin zu verzeichnen, welcher bisher noch nicht direkt mit Profilin-1 assoziiert worden ist. Die Analyse der Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten zeigte erstmalig, dass Profilin-1 tatsächlich an der SDF-1 α bedingten Polymerisation von Aktin in Thymozyten beteiligt zu sein scheint (Abb.4.22). Dabei zeigten Pfn1^{fl/fl,CD4^{cre}} Thymozyten nach der Stimulation zwar einen geringeren Anstieg an F-Aktin als Kontrollthymozyten, jedoch führte der Verlust von Profilin-1 nicht zu einem vollständigen Polymerisations-Verlust, was darauf hindeutet, dass neben Profilin-1 noch andere, z.B. Ras-abhängige, Proteine an der Polymerisation in den ersten Sekunden beteiligt sein könnten. Es ist bekannt, dass die Bindung von SDF-1 α an seinen Rezeptor zu einer Aktivierung des Ras-vermittelten Signalweges führt (Arai et al., 2006), welcher die Aktivität vieler Aktin-bindenden Proteine reguliert. Bisher ist jedoch völlig unklar, ob oder auf welchem Wege die Aktivität von Profilin-1 in diesem Prozess reguliert wird. So könnte die Stimulation durch SDF-1 α zu einer Aktivierung von Profilin-1 durch De/Phosphorylierung führen. Obwohl Profilin als eines der ersten Aktin bindenden Proteine klassifiziert wurde, ist bis zum heutigen Tag nur sehr wenig über eine mögliche Regulation der Profilin-1 Aktivität bekannt. Experimente an Endothel-Zellen konnten in diesem Zusammenhang eine Phosphorylierung des T129 und eine damit einhergehende erhöhte Polymerisation von Aktin nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor VEGF-A nachweisen (Fan et al., 2012). Es wäre demnach interessant zu untersuchen, ob Profilin-1 auch nach der Stimulation durch SDF-1 α in Thymozyten phospho- oder dephosphoryliert wird. Durch zweidimensionale SDS-PAGE, gefolgt von hoch sensibler Massenspektroskopie, sollte es möglich sein auch geringe Mengen an phosphoryliertem Profilin-1 nachzuweisen und zu klassifizieren.

Andererseits ist es auch möglich, dass Profilin-1 nach Stimulation durch SDF-1 α nicht selber aktiviert wird, sondern dass es zu einer Aktivierung bestimmter Bindungspartner von Profilin-1 kommt, wie es beispielsweise bereits für WAVE beschrieben wurde (Haddad, 2001). Da Profilin-1 mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann (Witke, 2004), sollten über Co-Immun Präzipitation die Bindungspartner von Profilin-1 vor und nach Stimulation detailliert analysiert werden. Dabei sollten hochauflösende mikroskopische Analysen an lebenden Zellen das Bild komplementieren und untersuchen, ob es beispielsweise zu einer veränderten

Lokalisierung von Profilin in den ersten Sekunden nach der Stimulation kommt. Hierfür müssten Thymozyten zunächst mit einem Fusionsprotein wie GFP-Profilin 1 transfiziert oder ein Reportermausmodell erstellt werden. Ein weiterer zu untersuchender Aspekt wäre, in wie weit “uncapping“ und “severing“ von Aktin-Filamenten in diesem Prozess von Bedeutung ist. Gelsolin ein Protein, welches sowohl “uncapping“ als auch in “severing“ Prozessen von Aktin involviert ist (Stossel, 1993), wäre ein gutes Ziel solcher Studien, da bereits gezeigt werden konnte, dass es in Thymozyten exprimiert wird (Abb.4.3.2, B). Gelsolin assoziiert interessanterweise ebenso wie Profilin-1, Cofilin-1 und andere Schlüsselregulatoren des Aktin-Zytoskeletts mit dem Phospholipid PIP₂ (Toker, 1998a), (Toker, 1998b), (Czech, 2000). Die Bindung von SDF-1 α an seinen Rezeptor aktiviert dabei sowohl die Phospholipase-C als auch die PI3-Kinase (Mellado et al., 2001), (Teicher and Fricker, 2010). PIP₂ kann wiederum durch die PI3-K in PIP₃ phosphoryliert werden (Rameh and Cantley, 1999), (Czech, 2000). Während bei Bindung von Profilin an PIP₂ die Hydrolyse von PIP₂ durch die Phospholipase-C in DAG+IP₃ verhindert zu sein scheint (Goldschmidt-Clermont et al., 1990), ist bisher unklar, ob dies auch auf die Phosphorylierung von PIP₂ zutrifft und unter welchen Umständen Profilin von PIP₂ dissoziiert. Anfängliche *in vitro* Experimente zeigten, dass Aktin von Profilin nach Bindung von Profilin an PIP₂ oder PIP₃ dissoziiert (Lassing and Lindberg, 1985), (Lu et al., 1996), wobei jüngere Forschungen wiederum zeigen konnten, dass Profilin-1 über zwei verschiedene Bindedomänen für PIP₂ verfügt. Demzufolge kann die Bindung zu PIP₂ sowohl über die poly-L-Profilin als auch über die Aktin Bindedomäne von Profilin-1 erfolgen. Daher ist es möglich, dass Profilin-1 zeitgleich an Aktin und PIP₂ gebunden sein kann, je nachdem, mit welcher Domäne die Bindung an PIP₂ erfolgt (Skare and Karlsson, 2002). Aufgrund dieser Daten sollte eine mögliche Rolle von PIP₂/Profilin-1 bei der Stimulation der Thymozyten mit SDF-1 α nicht ausgeschlossen und ebenfalls näher untersucht werden. Neben FRET Analysen könnten hierbei elektronenmikroskopische Aufnahmen Aufschluss darüber geben, ob in Thymozyten Profilin-1 nahe an der Plasmamembran lokalisiert und in räumlicher Nähe von PIP₂ vorkommt. Eine der Herausforderungen der Zukunft wird darin bestehen zu ermitteln, welchen Anteil welcher Mechanismus an einem so vielschichtigen Prozess wie der Regulation des Aktin-Zytoskeletts einnimmt. Rein mathematische Modelle könnten in der Zukunft dabei helfen, komplexe Zusammenhänge dabei besser miteinander zu verknüpfen.

5.3.2 Konsequenzen der Profilin 1 Deletion auf die T-Zell-Entwicklung

Neben den beobachteten Veränderungen am Aktin-Zytoskelett von $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten führte die Deletion von Profilin-1 zu einer gestörten Entwicklung der Zellen. Während erste Analysen Zellen aller Entwicklungsstadien im Thymus nachweisen konnten (Abb.4.23, B), offenbarte die statistische Analyse eine signifikante Reduktion an CD4-SP und CD8-SP Thymozyten im Thymus (Abb.4.23, C). Detailanalysen zeigten dabei eine signifikante Verminderung an post-positiv und post-negativ selektionierten Zellen (Abb.4.23, D). Korrespondierend konnte eine starke Reduktion von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben beobachtet werden (Abb.4.24). Sowohl Southernblot als auch PCR Analysen konnten hierbei keine Deletion des Profilin 1 Allels in Lymphozyten detektieren, was einen Block auf Ebene der negativen Selektion im Thymus wahrscheinlich erscheinen lässt. Da es sich bei Lymphozyten um eine Mischpopulation unterschiedlichster Zellen handelt, sollte die durchgeführte Southernblot Analyse an sortierten T-Zellen wiederholt werden, um eine eindeutigere Aussage treffen zu können. Da jedoch die viel sensibleren PCR Analysen ebenfalls keine Deletion in Lymphozyten detektieren konnten, ist es unwahrscheinlich, dass eine Analyse sortierter T-Zellen hier zu anderen Ergebnissen kommen würde.

Untersuchungen der Thymus Architektur zeigten im Unterschied zu $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen keine auffällige Reduktion der Medulla (Daten nicht gezeigt), weshalb auf eine aufwändige Knochenmarktransplantation in WT Tiere bisher verzichtet wurde. Obwohl $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäuse eine leicht verminderte Anzahl an CD4-SP-Thymozyten aufweisen (Abb.4.23,C) scheint ihre Anzahl auszureichen um die Entwicklung der Medulla zu gewährleisten.

Da in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Mäusen keine Profilin 1 deletierten T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben nachgewiesen werden konnten, obwohl sich ihre Thymozyten bis zu den einzel-positiven Entwicklungsstadien entwickeln konnten, wurde Profilin-1 in einem zweiten Maus-Modell zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung deletiert. Unter Verwendung der distalLCK-Cre-Rekombinase, welche erst nach der positiven Selektion in Thymozyten exprimiert wird (Zhang et al., 2005), sollte untersucht werden, ob sich die Thymozyten bei dieser späteren Deletion im Thymus soweit entwickeln können, dass sie in die sekundären lymphatischen Gewebe auswandern können. $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Thymozyten zeigten erwartungsgemäß eine vollständige Entwicklung im Thymus (Abb.4.28, B) bis hin zu den einzel-positiven Entwicklungsstadien. Die Analyse des T-Zell-Anteils der sekundären lymphatischen Organe zeigte hingegen eine drastische Reduktion an CD8-T-Zellen in $Pfn1^{fl/fl,dLCKcre}$ Lymphozyten, wobei CD4-Lymphozyten wiederum unverändert in gleicher

Anzahl nachgewiesen werden konnten (Abb.4.28, D). Dabei konnte der Unterschied zwischen CD4- und CD8-Zellen direkt auf die differenzielle Deletionseffizienz der distalLCK-Cre-Rekombinase zurückgeführt werden, welche in CD8-Lymphozyten mit ~97% deutlich höhere Deletionsraten erzielte als in CD4-Lymphozyten mit lediglich ~55% (Abb.4.28, A). Die durch das Reporter-Mausmodell gemachten Beobachtungen stehen in Einklang mit den Analysen von (Zhang et al., 2005) und (Hecker, 2015), welche ähnliche differenzielle Deletionseffizienzen der distalLCK-Cre-Rekombinase beobachten konnten. Die sehr geringe Deletionsrate in CD4-SP und CD8-SP Thymozyten konnte durch eine sehr schwache Deletionsbande in der Southernblot-Analyse bestätigt werden (Abb.4.28, C). Interessanterweise konnte auch in Lymphozyten eine schwache Deletionsbande im Southernblot nachgewiesen werden. Die Analyse des stop-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Mausmodells ermöglichte es schließlich nachzuweisen, dass in den sekundären lymphatischen Organen sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen vorkommen, welche distalLCK-Cre-Rekombinase exprimieren (Abb.4.29,A). Die getrennte Analyse dieser Zellen zeigte darüber hinaus signifikant geringere Mengen des Aktivierungsmarkers CD69 sowie einen geringeren Gehalt an F-Aktin, wie er bereits zuvor in Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten beobachtet wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass ein gewisser Anteil an deletierten Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Thymozyten in die peripheren lymphatischen Gewebe aus dem Thymus auswandern konnte. CD69 ist ein Marker für die Aktivierung von T-Zellen weshalb die Ergebnisse ebenfalls andeuten, dass Profilin 1 eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen *in vivo* spielt. Da diese Schlussfolgerungen jedoch lediglich auf indirekte Beobachtungen zurückzuführen ist, sollten in der Zukunft Western- und Southernblot Analysen an durchflusszytometrisch sortierten YFP-positiven und YFP-negativen stop-YFP-R26-Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Lymphozyten, durchgeführt werden um das Vorkommen Profilin-1 defizitärer T-Zellen direkt nachzuweisen, welches aufgrund der sehr geringen Anzahl dieser Zellen jedoch ein großes Maß an Ressourcen voraussetzt. Ebenfalls wäre es vorteilhaft, Profilin-1 über Immunodetektion direkt durchflusszytometrisch in Thymozyten und T-Zellen nachweisen zu können. Bisherige Bemühungen in diese Richtung lieferten bisher jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Daneben macht es die unbefriedigende Deletionseffizienz der distalLCKcre im Thymus schwierig, wirkliche Aussagen über das mögliche Auswandern Profilin-1 defizitärer Thymozyten zu treffen, da unklar ist, ob die in der Peripherie nachgewiesenen YFP-positiven Zellen bereits im Thymus oder erst nach ihrer Auswanderung deletiert wurden. In diesem Zusammenhang sollten sowohl die Pfn1^{fl/fl,CD4cre} als auch die Pfn1^{fl/fl,dLCKcre} Mäuse auf ihren Gehalt an sogenannten

Recent Thymic Emigrants untersucht werden. Als Recent Thymic Emigrants werden dabei die T-Zellen bezeichnet, welche erst kürzlich den Thymus verlassen haben und durch die Expression der beiden Oberflächenproteine CD24 sowie Qa2 klassifiziert sind (Fink and Hendricks, 2011), (Fink, 2013). Diese Analyse könnte helfen zu verstehen, ob die Thymozyten nach der negativen Selektion aus dem Thymus auswandern können und was danach mit ihnen geschieht. Betrachtet man den Anteil an post-negativ selektionierten CD4-SP und CD8-SP Thymozyten in $Pfn1^{fl/fk,CD4cre}$ Mäusen, so ist dieser trotz einer signifikanten Reduktion immer noch sehr hoch. Vor diesem Hintergrund sollte, die Halbwertszeit des Proteins selber nicht außer Acht gelassen werden. Diese könnte in Thymozyten und T-Zellen unter der Verwendung einer Tomoxifen induzierbaren Cre-Rekombinase in Kultur untersucht werden, wie es bereits zuvor für Cofilin-1 beschrieben wurde (Hecker, 2015).

5.3.3 Funktionelle Analysen an $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten

Da $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nach der Isolation aus dem Thymus eine verminderte CD69 Expression an ihrer Zelloberfläche zeigten, wurde getestet, ob diese prinzipiell in der Lage sind positive Signale über ihren sich entwickelnden T-Zell Rezeptor zu empfangen. Aufgrund der Ergebnisse der Antikörper-Stimulation (Abb.4.25) ist jedoch davon auszugehen, dass Profilin-1 keine essentielle Rolle bei der Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor einnimmt, da ein Großteil der Zellen erfolgreich den Aktivierungsmarker CD69 nach 20- bzw. 40-stündiger Stimulation auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Tatsache, dass auch nach der Stimulation signifikant weniger CD69-positive Zellen gemessen wurden, könnte dabei auf den verringerten Ausgangswert zurückzuführen sein. Eine Funktion von Profilin-1 in der T-Zell Rezeptor Signalkette kann jedoch aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere da der Anteil an CD69-positiven $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Zellen auch nach der Stimulation stets geringer war. Darüber hinaus sollten neben CD69 weitere T-Zell Aktivierungsmarker wie IL-2 überprüft werden. Ebenfalls wäre es ratsam, die einzelnen Entwicklungsstadien der Thymozyten getrennt voneinander zu betrachten, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie unterschiedlich auf die Stimulation reagieren könnten.

Die Tatsache, dass $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten nach der Isolation eine verminderte Expression an CD69 aufweisen, könnte mit der beobachteten verminderten Adhäsionsfähigkeit zusammen hängen (Abb.4.26), da *in vivo* Thymozyten mit einer Vielzahl Antigen-präsentierender Zellen interagieren müssen, um positive Differenzierungssignale zu erhalten (Bouso et al., 2002). Laminin wurde als Substrat gewählt, weil es sowohl im Cortex als auch in der Medulla des Thymus relativ gleichmäßig exprimiert wird, und *in vivo* sowohl DP als

auch SP Thymozyten gleichermaßen mit ihm wechselwirken können (Berrih et al., 1985), (Lannes-Vieira et al., 1991), (Savino et al., 1993). Leider konnten mit diesem Versuchsaufbau keine Aussagen über das Ausbreitungsverhalten der Thymozyten getroffen werden, da die überwiegende Anzahl der Zellen eine rundliche, wenig ausgespreitete Morphologie aufwiesen (Abb.4.26). Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten zeigten eine verminderte Adhäsion ließen sich jedoch sowohl durch das Chemokin SDF-1 α als auch durch PMA (Daten nicht gezeigt) in ihrer Adhäsion stimulieren. Im Gegensatz dazu konnte bei Cofilin1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten unter den gleichen Stimulationsbedingungen keine vermehrte Adhäsion an ICAM-1 beobachtet werden. Um die Rolle von Profilin-1 und Cofilin-1 in der Adhäsion von Thymozyten jedoch direkt miteinander vergleichen zu können, wäre es notwendig die Bindung der Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten an ICAM-1 ebenfalls zu untersuchen, da nur exakt gleiche Bedingungen miteinander verglichen werden sollten. Eine Untersuchung der Adhäsion von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten an ICAM-1 wäre darüber hinaus ebenfalls sinnvoll, da für LFA-1 eine Funktion in der negativen Selektion beobachtet werden konnte (Carlow et al., 1992). Der Umstand, dass Thymozyten auf ICAM-1 ein Ausbreitungsverhalten zeigen, könnte auch dazu genutzt werden, die Komposition von fokalen Adhäsionen näher zu untersuchen. So ist aus anderen zellulären Systemen bereits bekannt, dass Profilin über VASP das Aktin-Zytoskelett mit fokalen Adhäsionen verknüpfen kann (Holt et al., 1998). Die Bindung an VASP erfolgt dabei über die Poly-L-Prolin Domäne (Reinhard et al., 1995), womit Profilin zeitgleich an VASP und Aktin gebunden sein kann.

Neben dem Adhäsionsdefekt konnte in dieser Arbeit auch eine verminderte Fähigkeit zur Migration von Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten in dreidimensionaler Umgebung beobachtet werden (Abb.4.27). Da die Migration von Zellen in dreidimensionaler Umgebung von einem konstanten Fluss von Aktin an der Zellfront (Friedl et al., 1998), (Wolf et al., 2003) sowie einer kontinuierlichen Aktin Polymerisation an der Vorderseite der Zellen durch Proteinkomplexe, wie WAVE und Arp2/3 (Machesky et al., 1999) abhängt, ist dieses Ergebnis durchaus zu der in der Literatur beschriebenen Funktion von Profilin-1 konform. Bereits in einer Vielzahl anderer zellulärer Systeme konnte Profilin-1 eine Schlüsselrolle in der Migration und Adhäsion von Zellen zugeschrieben werden (Ding et al., 2006), (Kullmann et al., 2012), (Mouneimne et al., 2012b). Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen einen stark reduzierten Anteil an migrierenden Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten, wobei die Zellen in ihrer Migration durch SDF-1 α angeregt werden konnten. Erste Detailanalysen deuten darauf hin, dass sich Pfn1^{fl/fl,CD4cre} Thymozyten auch langsamer fortbewegen als entsprechende Kontrollthymozyten (Daten nicht gezeigt). Diese aufwändigen Detailanalysen sollten daher,

in der Zukunft, auch für Profilin-1 durchgeführt werden. Da DP Thymozyten *in vivo* ein anderes Migrationsverhalten als SP Thymozyten zeigen (Witt et al., 2005a), (Le Borgne et al., 2009), sollten in Zukunft Methoden angewandt werden, die eine Unterscheidung der einzelnen Entwicklungsstadien während der Migration ermöglichen. Intravitale 2 Photonen Mikroskopie könnte dabei helfen die Migration der Thymozyten im gewebespezifischen Kontext zu betrachten und DP von SP Thymozyten voneinander zu unterscheiden. Darüber hinaus sollten für SP Thymozyten auch gerichtete Migrationsversuche durchgeführt werden, um eine mögliche Rolle von Profilin 1 in der Chemotaxis der Thymozyten zu untersuchen. Abschließend könnten "homing" Experimente klären, ob Profilin-1 defizitäre T-Zellen in der Lage sind, aus der Blutbahn in die Lymphknoten oder andere sekundäre lymphatische Organe einzuwandern. Hierzu könnte das Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase-System (Badea et al., 2003) genutzt werden um $Pfn1^{fl/fl,CreERT2}$ T-Zellen *ex vivo* zu deletieren, und markiert direkt in die Blutbahn von Mäusen zu injizieren. Nach einiger Zeit könnte der Anteil an erfolgreich eingewanderten T-Zellen in den entsprechenden Organen ermittelt werden. Zusammenfassend wurden in $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten sowohl Adhäsions- als auch Migrationsdefekte festgestellt; Beide könnten *in vivo* zu dem beobachteten Entwicklungsdefekt beitragen, und das Auswandern der Thymozyten aus dem Thymus inhibieren. Warum sich $Pfn1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten trotz ähnlicher Defizite (Adhäsion, Migration) etwas weiter entwickeln können als $Cof1^{fl/fl,CD4cre}$ Thymozyten, kann hingegen nur durch die beschriebenen weiterführenden Analysen beantwortet werden.

5.4 Analyse des $Pfn1^{GFPaktin}$ Reporter Mausmodells

Das $Pfn1^{GFPaktin}$ Mausmodell (Gurniak and Witke, 2007), welches ein GFP-Aktin Fusionsprotein unter der Kontrolle des Profilin-1 Promotors kodiert, konnte die erhöhte Expression von Profilin-1 in SP im Vergleich zu DP Thymozyten, welche für Profilin-1 bereits im Western Blot gezeigt werden konnte (Abb.4.1), bestätigen. Ebenfalls bestätigte das System das Vorkommen zweier verschieden stark GFP-Aktin exprimierender Subpopulationen in CD4 und CD8 Thymozyten und T-Zellen (Abb.4.30), welche bereits zuvor von (Gurniak and Witke, 2007) für T- und B-Zellen beschrieben worden waren. Da die Western Blot Analyse sortierter Zellen die erhöhte GFP-Aktin Proteinkonzentration in GFP^{hoch} Zellen bestätigen konnte (Abb.4.32,A), sind Messfehler wie Dubletten oder Proteinaggregation als Ursache der unterschiedlichen GFP Intensitäten auszuschließen. Auch konnte der unterschiedliche Gehalt an GFP-Aktin weder auf Aktivierung (CD69) noch auf den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus der Zellen zurückgeführt werden (Daten nicht

gezeigt). Da beide Populationen in ihrer Expression auch bei mehrtägiger getrennter Kultivierung keine Veränderungen offenbarten (Abb.4.31), ist anzunehmen, dass es sich um jeweils diskrete Populationen handelt. Da sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen in weitere Subpopulationen klassifiziert werden können, sollten demnach weitere detailliertere durchflusszytometrische Analysen erfolgen. Die an den beiden GFP Populationen durchgeführte Western Blot Analyse erschwert die Interpretation der Daten zusätzlich. Während in Thymozyten der Proteingehalt von Profilin-1 und GFP-Aktin miteinander korreliert, ist in T-Zellen diese Korrelation nicht mehr erkennbar (Abb.4.32, A). Während dieser Umstand noch auf unterschiedliche post-translationale Modifikationsmechanismen zurückgeführt werden könnte, ist es unklar, warum sich der RNS-Gehalt von Profilin-1 und GFP-Aktin in T-Zellen zueinander invers zu verhalten scheint (Abb.4.32, B). Es ist möglich, dass die Stabilität beider RNS Moleküle (Profilin 1, GFP-Aktin) sich stark voneinander unterscheidet. Zwar konnten die Ergebnisse der RNS-Analyse bisher nur von einem Tier erhoben werden, jedoch war bereits in zwei weiteren Versuchstieren eine ähnliche Tendenz zu verzeichnen. Eine Erklärung für die unterschiedliche Expression von Profilin-1 und GFP-Aktin könnte in der Rolle des 3' oder 5' untranslatierten Bereiches für die Translationseffizienz liegen. Eine sogenannte Allel-spezifische Translation konnte bereits für andere Proteine wie HLA nachgewiesen werden (René et al., 2015). Untersuchungen von (Crowley et al., 2015) zeigen in diesem Zusammenhang eindrucksvoll, dass ~80% aller murinen Gene cis regulatorische Variationen im nicht kodierenden Bereich der DNS aufweisen, welche zu einer differenziellen Genexpression führen könnten. Falls durch den Pfn1^{GFPaktin} Knock-in unwissentlich auch solche regulatorischen Regionen verändert wurden, könnte dies die Diskrepanz in T-Zellen erklären. Sollte dem so sein so würde dies auf ein ebensolches Event in der Entwicklung von DP zu SP Thymozyten hindeuten. Dieses Modell würde jedoch immer noch nicht erklären, warum es überhaupt zu einer Aufspaltung in die zwei Populationen kommt. Eine hypothetische Möglichkeit wäre eine stochastische Expressionserhöhung nur einer der beiden Allele. So wird im sogenannten Transposon Silencing Model (Branciamore et al., 2015) postuliert, dass ein cis lokalisiertes Transposon während eines bestimmten Entwicklungsstadiums die Möglichkeit hat in einen anderen Lokus zu springen, wodurch die Expression nur eines Allels beeinflusst würde. Da Pfn1^{GFPaktin/wt} Mäuse nicht homozygot gehalten werden können, könnten so zwei unterschiedliche Populationen erzeugt worden sein, welche im WT Tier eventuell in dieser Form nicht vorkommen. Die Anpassung des Proteingehaltes von Profilin-1 in T-Zellen könnte in einem solchen Modell durch post-translationale Modifikationsmechanismen oder eine erhöhte

Halbwertszeit des Proteins erklärt werden. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich hierbei um ein rein spekulatives Modell handelt. Letztendlich könnten aufwändige RNA Microarray Analysen der GFP Populationen dabei helfen, diese in das bestehende Bild der T-Zell Populationen einzuordnen.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, H., Ohshima, S., and Obinata, T. (1989). A cofilin-like protein is involved in the regulation of actin assembly in developing skeletal muscle. *J. Biochem.* *106*, 696–702.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Alberola-Illa, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G., and Perlmutter, R.M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* *373*, 620–623.
- Anderson, G., and Jenkinson, E.J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 31–40.
- Anderson, G., Lane, P.J.L., and Jenkinson, E.J. (2007). Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 954–963.
- Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Mol. Cell* *24*, 13–23.
- Arai, A., Aoki, M., Weihua, Y., Jin, A., and Miura, O. (2006). CrkL plays a role in SDF-1-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway through Ras and Rac to mediate chemotactic signaling in hematopoietic cells. *Cell. Signal.* *18*, 2162–2171.
- Arber, S., Barbayannis, F. a, Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. a, Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* *393*, 805–809.
- Badea, T.C., Wang, Y., and Nathans, J. (2003). A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *J. Neurosci.* *23*, 2314–2322.
- Bailly, M., and Jones, G.E. (2003). Polarised Migration: Cofilin Holds the Front. *Curr. Biol.* *13*, R128–R130.
- Bamburg, J.R., Harris, H.E., and Weeds, A.G. (1980). Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.* *121*, 178–182.
- Bamburg, J.R., McGough, A., and Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.* *9*, 364–370.
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat. Immunol.* *6*, 80–89.
- Bellenchi, G.C., Gurniak, C.B., Perlas, E., Middei, S., Ammassari-Teule, M., and Witke, W. (2007). N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* *21*, 2347–2357.
- Belmont, L.D., Orlova, A., Drubin, D.G., and Egelman, E.H. (1999). A change in actin conformation associated with filament instability after Pi release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 29–34.
- Bender, M., Stritt, S., Nurden, P., van Eeuwijk, J.M.M., Zieger, B., Kentouche, K., Schulze, H., Morbach, H., Stegner, D., Heinze, K.G., et al. (2014). Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott-Aldrich syndrome-like platelet defect. *Nat. Commun.* *5*, 4746.

- Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M.J., Hamann, A., and Hogg, N. (1999). Lymphocyte Migration in Lymphocyte Function-associated Antigen (LFA)-1-deficient Mice. *J. Exp. Med.* 189, 1467–1478.
- Berrih, S., Savino, W., and Cohen, S. (1985). Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 655–664.
- Bettinger, B.T., Gilbert, D.M., and Amberg, D.C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 410–415.
- Billadeau, D.D., and Burkhardt, J.K. (2006). Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* 7, 1451–1460.
- Billadeau, D.D., Nolz, J.C., and Gomez, T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 131–143.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241.
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K.C., Goldberg, M.L., and Laski, F.A. (2006). Twinstar, the *Drosophila* homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning. *Development* 133, 1789–1797.
- Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S., and Pollard, T.D. (2000). Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J. Mol. Biol.* 295, 203–211.
- von Blume, J., Duran, J.M., Forlanelli, E., Alleaume, A.-M., Egorov, M., Polishchuk, R., Molina, H., and Malhotra, V. (2009). Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 187, 1055–1069.
- von Blume, J., Alleaume, A.-M., Cantero-Recasens, G., Curwin, A., Carreras-Sureda, A., Zimmermann, T., van Galen, J., Wakana, Y., Valverde, M.A., and Malhotra, V. (2011). ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca²⁺ ATPase SPCA1. *Dev. Cell* 20, 652–662.
- Boehm, T., Hofer, S., Winklehner, P., Kellersch, B., Geiger, C., Trockenbacher, A., Neyer, S., Fiegl, H., Ebner, S., Ivarsson, L., et al. (2003). Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J.* 22, 1014–1024.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J., Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U., Buer, J., and Azogui, O. (1999). Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 135–142.
- Bokoch, G.M. (1995). Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86, 1649–1660.
- Le Borgne, M., Ladi, E., Dzhagalov, I., Herzmark, P., Liao, Y.F., Chakraborty, A.K., and Robey, E. a (2009). The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat. Immunol.* 10, 823–830.
- Böttcher, R.T., Wiesner, S., Braun, A., Wimmer, R., Berna, A., Elad, N., Medalia, O., Pfeifer, A., Aszódi, A., Costell, M., et al. (2009). Profilin 1 is required for abscission during late cytokinesis of chondrocytes. *EMBO J.* 28, 1157–1169.
- Bouso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., and Robey, E. (2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876–1880.

- Bradley, A., Zheng, B., and Liu, P. (1998). Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int. J. Dev. Biol.* *42*, 943–950.
- Brakebusch, C., and Fässler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* *22*, 2324–2333.
- Branciamore, S., S. Rodin, A., Gogoshin, G., and D. Riggs, A. (2015). Epigenetics and Evolution: Transposons and the Stochastic Epigenetic Modification Model. *AIMS Genet.* *2*, 148–162.
- Braun, A., Aszódi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fässler, R., and Brandau, O. (2002). Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene* *283*, 219–225.
- Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., and Samelson, L.E. (2001). Dynamic Actin Polymerization Drives T Cell Receptor–Induced Spreading. *Immunity* *14*, 315–329.
- Burkhardt, J.K., Carrizosa, E., and Shaffer, M.H. (2008). The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 233–259.
- Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60–66.
- Caldwell, J.E., Heiss, S.G., Mermall, V., and Cooper, J.A. (1989). Effects of CapZ, an actin-capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* *28*, 8506–8514.
- Carrier, M.-F. (1997). Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-based Motility. *J. Cell Biol.* *136*, 1307–1322.
- Carlow, D.A., van Oers, N.S., Teh, S.J., and Teh, H.S. (1992). Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J. Immunol.* *148*, 1595–1603.
- Carlsson, L., Nyström, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* *115*, 465–483.
- Ceredig, R., and Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 888–897.
- Chan, A.Y. (2000). Role of Cofilin in Epidermal Growth Factor-stimulated Actin Polymerization and Lamellipod Protrusion. *J. Cell Biol.* *148*, 531–542.
- Chaudhary, A., Chen, J., Gu, Q.M., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., and Prestwich, G.D. (1998). Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem. Biol.* *5*, 273–281.
- Chen, H., Bernstein, B.W., Sneider, J.M., Boyle, J.A., Minamide, L.S., and Bamburg, J.R. (2004). In vitro activity differences between proteins of the ADF/cofilin family define two distinct subgroups. *Biochemistry* *43*, 7127–7142.
- Chen, Q., Courtemanche, N., and Pollard, T.D. (2015). Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Biol. Chem.* *290*, 2289–2300.
- Chua, B.T., Volbracht, C., Tan, K.O., Li, R., Yu, V.C., and Li, P. (2003). Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat. Cell Biol.* *5*, 1083–1089.

- Cibotti, R., Punt, J.A., Dash, K.S., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1997). Surface Molecules That Drive T Cell Development In Vitro in the Absence of Thymic Epithelium and in the Absence of Lineage-Specific Signals. *Immunity* 6, 245–255.
- Ciofani, M., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2010). Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 657–663.
- Cooley, L., Verheyen, E., and Ayers, K. (1992). chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. *Cell* 69, 173–184.
- Crowley, J.J., Zhabotynsky, V., Sun, W., Huang, S., Pakatci, I.K., Kim, Y., Wang, J.R., Morgan, A.P., Calaway, J.D., Aylor, D.L., et al. (2015). Analyses of allele-specific gene expression in highly divergent mouse crosses identifies pervasive allelic imbalance. *Nat. Genet.* 47, 353–360.
- Czech, M.P. (2000). PIP2 and PIP3. *Cell* 100, 603–606.
- Dawe, H.R., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., and Cramer, L.P. (2003). ADF/Cofilin Controls Cell Polarity during Fibroblast Migration. *Curr. Biol.* 13, 252–257.
- DesMarais, V. (2005). Cofilin takes the lead. *J. Cell Sci.* 118, 19–26.
- Ding, Z., Lambrechts, A., Parepally, M., and Roy, P. (2006). Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 4127–4137.
- Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000a). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat. Immunol.* 1, 317–321.
- Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000b). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat. Immunol.* 1, 317–321.
- Dustin, M.L., and Cooper, J. a (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol.* 1, 23–29.
- Eibert, S.M., Lee, K.-H., Pipkorn, R., Sester, U., Wabnitz, G.H., Giese, T., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (2004). Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1957–1962.
- Fan, Y., Arif, A., Gong, Y., Jia, J., Eswarappa, S.M., Willard, B., Horowitz, A., Graham, L.M., Penn, M.S., and Fox, P.L. (2012). Stimulus-dependent phosphorylation of profilin-1 in angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 1046–1056.
- Fedorov, A.A., Magnus, K.A., Graupe, M.H., Lattman, E.E., Pollard, T.D., and Almo, S.C. (1994). X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8636–8640.
- Fehling, H.J., and Boehmer, H. von (1997). Early $\alpha\beta$ T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 263–275.
- Fine, J.S., and Kruisbeek, A.M. (1991). The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J. Immunol.* 147, 2852–2859.
- Fink, P.J. (2013). The biology of recent thymic emigrants. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 31–50.
- Fink, P.J., and Hendricks, D.W. (2011). Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 544–549.

- Finkel, T., Theriot, J.A., Dose, K.R., Tomaselli, G.F., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994). Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 1510–1514.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., and Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* *2008*, pdb.prot4986.
- Freeman, S.A., Lei, V., Dang-Lawson, M., Mizuno, K., Roskelley, C.D., and Gold, M.R. (2011). Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *J. Immunol.* *187*, 5887–5900.
- Friedl, P., and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat. Immunol.* *9*, 960–969.
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., and Zänker, K.S. (1998). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2331–2343.
- Friedl, P., Borgmann, S., and Brocker, E.-B. (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J. Leukoc. Biol.* *70*, 491–509.
- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 315–333.
- Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V., and Witke, W. (2006). Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J. Biol. Chem.* *281*, 2803–2811.
- Garrels, J.I., and Gibson, W. (1976). Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* *9*, 793–805.
- Gerisch, G., and Weber, I. (2000). Cytokinesis without myosin II. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 126–132.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* *87*, 227–239.
- Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* *304*, 743–746.
- Gieselmann, R., Kwiatkowski, D.J., Janmey, P.A., and Witke, W. (1995). Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Eur. J. Biochem.* *229*, 621–628.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* *150*, 4244–4252.
- Gohla, A., Birkenfeld, J., and Bokoch, G.M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* *7*, 21–29.

- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Baldassare, J.J., and Pollard, T.D. (1990). The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247, 1575–1578.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Doberstein, S.K., and Pollard, T.D. (1991a). Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J. Cell Biol.* 113, 1081–1089.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Kim, J.W., Machesky, L.M., Rhee, S.G., and Pollard, T.D. (1991b). Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231–1233.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T., and Pollard, T.D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 1015–1024.
- Gomez, M., Kioussis, D., and Cantrell, D.A. (2001). The GTPase Rac-1 Controls Cell Fate in the Thymus by Diverting Thymocytes from Positive to Negative Selection. *Immunity* 15, 703–713.
- Gu, Y., Chae, H.-D., Siefring, J.E., Jasti, A.C., Hildeman, D.A., and Williams, D.A. (2006). RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat. Immunol.* 7, 1182–1190.
- Gurniak, C.B., and Witke, W. (2007). HuGE, a novel GFP-actin-expressing mouse line for studying cytoskeletal dynamics. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 3–12.
- Gurniak, C.B., Perlas, E., and Witke, W. (2005). The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 278, 231–241.
- Gurniak, C.B., Chevessier, F., Jokwitz, M., Jönsson, F., Perlas, E., Richter, H., Matern, G., Boyd, P.P., Chaponnier, C., Fürst, D., et al. (2014). Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *Eur. J. Cell Biol.* 93, 252–266.
- Gutsche-Perelroizen, I., Lepault, J., Ott, A., and Carlier, M.F. (1999). Filament assembly from profilin-actin. *J. Biol. Chem.* 274, 6234–6243.
- Haddad, E. (2001). The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* 97, 33–38.
- Hecker, J.K. (2015). Die Bedeutung von Cofilin1 und Aktindynamik für die Funktion von T-Zellen. Dissertation Universität Bonn. Institut für Gneetik.
- Hernandez-Lopez, C. (2002). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 99, 546–554.
- Holt, M.R., Critchley, D.R., and Brindle, N.P. (1998). The focal adhesion phosphoprotein, VASP. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 307–311.
- Honoré, B., Madsen, P., Andersen, A.H., and Leffers, H. (1993). Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett.* 330, 151–155.
- Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P. (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 649–664.

- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., and Zhu, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp. Nephrol.* *9*, 265–274.
- Huang, T.Y., DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 26–31.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* *69*, 11–25.
- Jameson, S.C., and Bevan, M.J. (1998). T-cell selection. *Curr. Opin. Immunol.* *10*, 214–219.
- Jönsson, F., Gurniak, C.B., Fleischer, B., Kirfel, G., and Witke, W. (2012). Immunological responses and actin dynamics in macrophages are controlled by N-cofilin but are independent from ADF. *PLoS One* *7*, e36034.
- Jovceva, E., Larsen, M.R., Waterfield, M.D., Baum, B., and Timms, J.F. (2007). Dynamic cofilin phosphorylation in the control of lamellipodial actin homeostasis. *J. Cell Sci.* *120*, 1888–1897.
- Kang, F., Purich, D.L., and Southwick, F.S. (1999). Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration. *J. Biol. Chem.* *274*, 36963–36972.
- Khaitlina, S.Y. (2001). Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* *202*, 35–98.
- Kim, K., Wang, L., and Hwang, I. (2009). A novel flow cytometric high throughput assay for a systematic study on molecular mechanisms underlying T cell receptor-mediated integrin activation. *PLoS One* *4*, e6044.
- Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., and Boyd, A. (2009). CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* *59*, 31–44.
- Kitchen, S., and Zack, J. (1997). CXCR4 expression during lymphopoiesis: implications for human immunodeficiency virus type 1 infection of the thymus. *J. Virol.* *71*, 6928–6934.
- Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R.L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., Yu, L.-R., Veenstra, T.D., and Shacter, E. (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1241–1246.
- Klein, L. (2009). Dead man walking: how thymocytes scan the medulla. *Nat. Immunol.* *10*, 809–811.
- Klemke, M., Wabnitz, G.H., Funke, F., Funk, B., Kirchgessner, H., and Samstag, Y. (2008). Oxidation of Cofilin Mediates T Cell Hyporesponsiveness under Oxidative Stress Conditions. *Immunity* *29*, 404–413.
- Klemke, M., Kramer, E., Konstandin, M.H., Wabnitz, G.H., and Samstag, Y. (2010). An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments. *EMBO J.* *29*, 2915–2929.
- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* *124*, 423–435.
- Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J., and Briehner, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* *182*, 341–353.

- Kullmann, J.A., Neumeier, A., Gurniak, C.B., Friauf, E., Witke, W., and Rust, M.B. (2012). Profilin1 is required for glial cell adhesion and radial migration of cerebellar granule neurons. *EMBO Rep.* 13, 75–82.
- Kusano, K., Abe, H., and Obinata, T. (1999). Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin. *Mol. Cell. Biochem.* 190, 133–141.
- Kwiatkowski, D.J., and Bruns, G.A. (1988). Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *J. Biol. Chem.* 263, 5910–5915.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., and Robey, E.A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat. Immunol.* 7, 338–343.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27, 982–992.
- Lambrechts, A., Verschelde, J.L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1997). The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *EMBO J.* 16, 484–494.
- Lannes-Vieira, J., Dardenne, M., and Savino, W. (1991). Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 1539–1546.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314, 472–474.
- Laudanna, C., Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (1996). Role of Rho in Chemoattractant-Activated Leukocyte Adhesion Through Integrins. *Science* (80-.). 271, 981–983.
- Lee, K.H., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (2000). Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur. J. Immunol.* 30, 892–899.
- Lewin, B., and Lynne, C. (2007). *Cells*. Sudbury, Massachusetts, Jones Bartlett Publ.
- Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* 194, 127–134.
- Lindberg, U., Schutt, C.E., Hellsten, E., Tjäder, A.C., and Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 391–400.
- Lu, P.J., Shieh, W.R., Rhee, S.G., Yin, H.L., and Chen, C.S. (1996). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry* 35, 14027–14034.
- Lub, M., van Kooyk, Y., van Vliet, S.J., and Figdor, C.G. (1997). Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1. *Mol. Biol. Cell* 8, 341–351.
- Machesky, L.M., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Pollard, T.D. (1990). The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul.* 1, 937–950.

- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3739–3744.
- Maciver, S.K. (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* *115*, 1611–1620.
- Mahoney, N.M., Rozwarski, D.A., Fedorov, E., Fedorov, A.A., and Almo, S.C. (1999). Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 666–671.
- Marrack, P., Lo, D., Brinster, R., Palmiter, R., Burkly, L., Flavell, R.H., and Kappler, J. (1988). The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* *53*, 627–634.
- McCollum, D., Feoktistova, A., Morpew, M., Balasubramanian, M., and Gould, K.L. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J.* *15*, 6438–6446.
- McGough, A. (1997). Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function. *J. Cell Biol.* *138*, 771–781.
- McGough, A., and Chiu, W. (1999). ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *J. Mol. Biol.* *291*, 513–519.
- McRobbie, S.J., and Newell, P.C. (1983). Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *115*, 351–359.
- Meier, S. (2014). Interaction partners of the ADF / cofilin family. Bachelorarbeit Universität Bonn. Institut für Gneetik.
- Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Mañes, S., and Martínez-A, C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 397–421.
- Metzler, W.J., Bell, A.J., Ernst, E., Lavoie, T.B., and Mueller, L. (1994). Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J. Biol. Chem.* *269*, 4620–4625.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* *17*, 6932–6941.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 56–68.
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* *25*, 457–469.
- Mockrin, S.C., and Korn, E.D. (1980). *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* *19*, 5359–5362.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovski, D.P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., and Veillette, A. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* *357*, 161–164.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877.

- Monks, C.R., Freiberg, B. a, Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, a (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86.
- Moon, A.L., Janmey, P.A., Louie, K.A., and Drubin, D.G. (1993). Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 120, 421–435.
- Moriyama, K., and Yahara, I. (1999). Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J.* 18, 6752–6761.
- Moriyama, K., Nishida, E., Yonezawa, N., Sakai, H., Matsumoto, S., Iida, K., and Yahara, I. (1990). Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA. *J. Biol. Chem.* 265, 5768–5773.
- Moriyama, K., Iida, K., and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73–86.
- Mouneimne, G., Hansen, S.D., Selfors, L.M., Petrak, L., Hickey, M.M., Gallegos, L.L., Simpson, K.J., Lim, J., Gertler, F.B., Hartwig, J.H., et al. (2012a). Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion. *Cancer Cell* 22, 615–630.
- Mouneimne, G., Hansen, S.D., Selfors, L.M., Petrak, L., Hickey, M.M., Gallegos, L.L., Simpson, K.J., Lim, J., Gertler, F.B., Hartwig, J.H., et al. (2012b). Differential Remodeling of Actin Cytoskeleton Architecture by Profilin Isoforms Leads to Distinct Effects on Cell Migration and Invasion. *Cancer Cell* 22, 615–630.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998a). The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6181–6186.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998b). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6181–6186.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 335–350.
- Nadkarni, A. V, and Briehar, W.M. (2014). Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends. *Curr. Biol.* 24, 2749–2757.
- Nagai, S., Moreno, O., Smith, C.A., Ivanchuk, S., Romagnuolo, R., Golbourn, B., Weeks, A., Seol, H.J., and Rutka, J.T. (2011). Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion. *Genes Cancer* 2, 859–869.
- Nakashima, K., Sato, N., Nakagaki, T., Abe, H., Ono, S., and Obinata, T. (2005). Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies. *J. Biochem.* 138, 519–526.
- Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D., and Witke, W. (2000). Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J. Cell Sci.* 113 Pt 21, 3795–3803.
- Nebl, G., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (1996). Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J. Biol. Chem.* 271, 26276–26280.
- Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C., and Loh, D.Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435–438.

- Nishida, E. (1985). Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 24, 1160–1164.
- Nishida, E., Maekawa, S., and Sakai, H. (1984). Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* 23, 5307–5313.
- Nishita, M., Aizawa, H., and Mizuno, K. (2002). Stromal Cell-Derived Factor 1 α Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis. 22, 774–783.
- Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2005). Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J. Cell Biol.* 171, 349–359.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108, 233–246.
- Norment, A.M., and Bevan, M.J. (2000). Role of chemokines in thymocyte development. *Semin. Immunol.* 12, 445–455.
- Normoyle, K.P.M., and Briehner, W.M. (2012). Cyclase-associated protein (CAP) acts directly on F-actin to accelerate cofilin-mediated actin severing across the range of physiological pH. *J. Biol. Chem.* 287, 35722–35732.
- Obermann, H., Raabe, I., Balvers, M., Brunswig, B., Schulze, W., and Kirchhoff, C. (2005). Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 53–64.
- Obrdlik, A., and Percipalle, P. The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus* 2, 72–79.
- Ohoka, Y., Kuwata, T., Tozawa, Y., Zhao, Y., Mukai, M., Motegi, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Iwata, M. (1996). In vitro differentiation and commitment of CD4 + thymocytes to the CD4 + lineage without TCR engagement. *Int. Immunol.* 8, 297–306.
- Ono, S., Baillie, D.L., and Benian, G.M. (1999). UNC-60B, an ADF/cofilin family protein, is required for proper assembly of actin into myofibrils in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *J. Cell Biol.* 145, 491–502.
- Oser, M., and Condeelis, J. (2009). The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* 108, 1252–1262.
- Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1993a). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007–1014.
- Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1993b). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell* 75, 1007–1014.
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., et al. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289–3296.
- Perelroizen, I., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1995). Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J. Biol. Chem.* 270, 1501–1508.

- Phee, H., Dzhagalov, I., Mollenauer, M., Wang, Y., Irvine, D.J., Robey, E., and Weiss, A. (2010a). Regulation of thymocyte positive selection and motility by GIT2. *Nat. Immunol.* *11*, 503–511.
- Phee, H., Dzhagalov, I., Mollenauer, M., Wang, Y., Irvine, D.J., Robey, E., and Weiss, A. (2010b). Regulation of thymocyte positive selection and motility by GIT2. *Nat. Immunol.* *11*, 503–511.
- Philpott, K., Viney, J., Kay, G., Rastan, S., Gardiner, E., Chae, S., Hayday, A., and Owen, M. (1992a). Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* (80-.). *256*, 1448–1452.
- Philpott, K.L., Viney, J.L., Kay, G., Rastan, S., Gardiner, E.M., Chae, S., Hayday, a C., and Owen, M.J. (1992b). Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* *256*, 1448–1452.
- Pilo-Boyl, P., Di Nardo, A., Mulle, C., Sassoè-Pognetto, M., Panzanelli, P., Mele, A., Kneussel, M., Costantini, V., Perlas, E., Massimi, M., et al. (2007). Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *EMBO J.* *26*, 2991–3002.
- Pollard, T.D. (1983). Measurement of rate constants for actin filament elongation in solution. *Anal. Biochem.* *134*, 406–412.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *103*, 2747–2754.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453–465.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* *55*, 987–1035.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* *326*, 1208–1212.
- Pollard, T.D., and Mooseker, M.S. (1981). Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* *88*, 654–659.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2003). Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells.
- Porritt, H.E., Gordon, K., and Petrie, H.T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J. Exp. Med.* *198*, 957–962.
- del Pozo, M.A., Sánchez-Mateos, P., Nieto, M., and Sánchez-Madrid, F. (1995). Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* *131*, 495–508.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M.R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* *31*, 1827–1836.
- Punt, J.A. (1996). Lineage Commitment in the Thymus: Only the Most Differentiated (TCR β hi) Subset of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes Has Selectively Terminated CD4 or CD8 Synthesis. *J. Exp. Med.* *184*, 2091–2100.

- Quast, T., Tappertzhofen, B., Schild, C., Grell, J., Czeloth, N., Förster, R., Alon, R., Fraemohs, L., Dreck, K., Weber, C., et al. (2009). Cytohesin-1 controls the activation of RhoA and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells. *Blood* *113*, 5801–5810.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* *274*, 8347–8350.
- Rehklau, K., Gurniak, C.B., Conrad, M., Friauf, E., Ott, M., and Rust, M.B. (2012). ADF/cofilin proteins translocate to mitochondria during apoptosis but are not generally required for cell death signaling. *Cell Death Differ.* *19*, 958–967.
- Reichstein, E., and Korn, E.D. (1979). Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from *Acanthamoeba castellanii* that inhibits actin nucleation. *J. Biol. Chem.* *254*, 6174–6179.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1995). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* *14*, 1583–1589.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V, Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* *83*, 433–473.
- René, C., Lozano, C., Villalba, M., and Eliaou, J.-F. (2015). 5' and 3' untranslated regions contribute to the differential expression of specific HLA-A alleles. *Eur. J. Immunol.* n/a – n/a.
- van Rheenen, J., Song, X., van Roosmalen, W., Cammer, M., Chen, X., Desmarais, V., Yip, S.-C., Backer, J.M., Eddy, R.J., and Condeelis, J.S. (2007). EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J. Cell Biol.* *179*, 1247–1259.
- Rosso, S., Bollati, F., Bisbal, M., Peretti, D., Sumi, T., Nakamura, T., Quiroga, S., Ferreira, A., and Ca, A. (2004). LIMK1 Regulates Golgi Dynamics , Traffic of Golgi- derived Vesicles , and Process Extension in Primary Cultured Neurons □. *15*, 3433–3449.
- Rotty, J.D., Wu, C., Haynes, E.M., Suarez, C., Winkelman, J.D., Johnson, H.E., Haugh, J.M., Kovar, D.R., and Bear, J.E. (2015). Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways. *Dev. Cell* *32*, 54–67.
- Roy, N. (2015). Study on the role of nuclear Cofilin1. Dissertation. Universität Bonn.Institut für Genetik.
- Rust, M.B., Gurniak, C.B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Banchaabouchi, M. Al, Giustetto, M., Triller, A., et al. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* *29*, 1889–1902.
- Salvarezza, S.B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M.M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G., and Rodriguez-Boulan, E. (2009). LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* *20*, 438–451.
- Salz, A. (2011). Die Rolle von N-Cofilin in der T-Zell-Entwicklung. Diplomarbeit Universität Bonn. Institut für Genetik.
- Samstag, Y. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 30–48.

- Samstag, Y., Bader, a, and Meuer, S.C. (1991). A serine phosphatase is involved in CD2-mediated activation of human T lymphocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* *147*, 788–794.
- Samstag, Y., Eckerskorn, C., Wesselborg, S., Henning, S., Wallich, R., and Meuer, S.C. (1994). Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4494–4498.
- Samstag, Y., Dreizler, E.M., Ambach, A., Sczakiel, G., and Meuer, S.C. (1996). Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. *J. Immunol.* *156*, 4167–4173.
- Samstag, Y., Dreizler, E., Ambach, A., Sczakiel, G., and Meuer, S.C. (2000). Inhibition of Constitutive Serine Phosphatase Activity in T Lymphoma Cells.
- Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., and Wabnitz, G.H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration of the immunological synapse at the interface be-.
- Samstag, Y., John, I., and Wabnitz, G.H. (2013). Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol. Rev.* *256*, 30–47.
- Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D.A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E., and Villa-Verde, D.M.S. (1993). Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 951–961.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* *365*, 810–816.
- Sebzda, E., Mariathan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., and Ohashi, P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 829–874.
- Selden, L.A., Kinosian, H.J., Estes, J.E., and Gershman, L.C. (1999). Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* *38*, 2769–2778.
- Shimizu, Y., and Hont, S.W. (1996). Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol. Today* *17*, 565–573.
- Sidani, M., Wessels, D., Mouneimne, G., Ghosh, M., Goswami, S., Sarmiento, C., Wang, W., Kuhl, S., El-Sibai, M., Backer, J.M., et al. (2007). Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J. Cell Biol.* *179*, 777–791.
- Singer, K.H., Denning, S.M., Whichard, L.P., and Haynes, B.F. (1990). Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J. Immunol.* *144*, 2931–2939.
- Skare, P., and Karlsson, R. (2002). Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett.* *522*, 119–124.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* *6*, 1067–1074.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* *98*, 503–517.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.-S., William, C., Tanabe, Y., Jessell, T., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* *1*, 4.

- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K. a (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.
- Steinert, P.M., and Roop, D.R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 593–625.
- Stewart, M.P., Cabanas, C., and Hogg, N. (1996). T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J. Immunol.* 156, 1810–1817.
- Stossel, T. (1993). On the crawling of animal cells. *Science* (80-). 260, 1086–1094.
- Stradal, T.E.B., Pusch, R., and Kliche, S. (2006). Molecular regulation of cytoskeletal rearrangements during T cell signalling. *Results Probl. Cell Differ.* 43, 219–244.
- Stüven, T., Hartmann, E., and Görlich, D. (2003). Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* 22, 5928–5940.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* 17, 6516–6526.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., and Nakamura, T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147, 1519–1532.
- Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., and Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33179–33182.
- Surh, C.D., Ernst, B., and Sprent, J. (1992). Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *J. Exp. Med.* 176, 611–616.
- Suzuki, H., Punt, J.A., Granger, L.G., and Singer, A. (1995). Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: A new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* 2, 413–425.
- Svitkina, T.M. (1999). Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
- Swan, K.A., Alberola-Ila, J., Gross, J.A., Appleby, M.W., Forbush, K.A., Thomas, J.F., and Perlmutter, R.M. (1995). Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J.* 14, 276–285.
- Swat, W., Dessing, M., von Boehmer, H., and Kisielow, P. (1993). CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 23, 739–746.
- Tahtamouni, L.H., Shaw, A.E., Hasan, M.H., Yasin, S.R., and Bamburg, J.R. (2013). Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells. *BMC Cell Biol.* 14, 45.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 127–135.
- Tanaka, M., and Shibata, H. (1985). Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur. J. Biochem.* 151, 291–297.
- de Taxis du Poët, P., Arcand, Y., Bernier, R., Barbotin, J.N., and Thomas, D. (1987). Plasmid stability in immobilized and free recombinant *Escherichia coli* JM105(pKK223-200): importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1548–1555.

- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 2927–2931.
- Toker, A. (1998a). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 254–261.
- Toker, A. (1998b). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 254–261.
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2001a). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1131–1145.
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R., and Mizuno, K. (2001b). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 31449–31458.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 4350–4354.
- Trifaró, J.M., Lejen, T., Rosé, S.D., Pene, T.D., Barkar, N.D., and Seward, E.P. (2002). Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion. *Neurochem. Res.* *27*, 1371–1385.
- Trifaró, J.-M., Gasman, S., and Gutiérrez, L.M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol. (Oxf)*. *192*, 165–172.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Verschelde, J.L., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2000). The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant. *Biochemistry* *39*, 12181–12189.
- Tvorogov, D. (2005). Integrin-dependent PLC- ζ 1 phosphorylation mediates fibronectin-dependent adhesion. *J. Cell Sci.* *118*, 601–610.
- Tybulewicz, V.L.J. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 267–274.
- Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J.M., and Love, P.E. (2002). A Role for CCR9 in T Lymphocyte Development and Migration. *J. Immunol.* *168*, 2811–2819.
- Valenta, R., Ferreira, F., Grote, M., Swoboda, I., Vrtala, S., Duchêne, M., Deviller, P., Meagher, R.B., McKinney, E., and Heberle-Bors, E. (1993). Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *J. Biol. Chem.* *268*, 22777–22781.
- Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002a). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* *13*, 183–194.
- Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002b). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* *13*, 183–194.
- Vicente-Manzanares, M., Vitón, M., and Sánchez-Madrid, F. (2004). Measurement of the levels of polymerized actin (F-actin) in chemokine-stimulated lymphocytes and GFP-coupled cDNA transfected lymphoid cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* *239*, 53–68.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J. Cell Sci.* *122*, 199–206.

- Wabnitz, G.H., Nebl, G., Klemke, M., Schröder, A.J., and Samstag, Y. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase functions as a Ras effector in the signaling cascade that regulates dephosphorylation of the actin-remodeling protein cofilin after costimulation of untransformed human T lymphocytes. *J. Immunol.* *176*, 1668–1674.
- Wabnitz, G.H., Goursot, C., Jahraus, B., Kirchgessner, H., Hellwig, A., Klemke, M., Konstandin, M.H., and Samstag, Y. (2010). Mitochondrial translocation of oxidized cofilin induces caspase-independent necrotic-like programmed cell death of T cells. *Cell Death Dis.* *1*, e58.
- Wabnitz, G.H., Nessmann, A., Kirchgessner, H., and Samstag, Y. (2015). InFlow microscopy of human leukocytes: A tool for quantitative analysis of actin rearrangements in the immune synapse. *J. Immunol. Methods.*
- Watanabe, N. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* *16*, 3044–3056.
- Weber, A. (1994). Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *127*, 1627–1635.
- Wegner, A. (1982). Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. *J. Mol. Biol.* *161*, 607–615.
- White, A.J., Nakamura, K., Jenkinson, W.E., Saini, M., Sinclair, C., Seddon, B., Narendran, P., Pfeffer, K., Nitta, T., Takahama, Y., et al. (2010). Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. *J. Immunol.* *185*, 4769–4776.
- Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* *118*, 651–654.
- Winterhoff, M., and Faix, J. (2015). Actin-filament disassembly: it takes two to shrink them fast. *Curr. Biol.* *25*, R450–R452.
- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* *14*, 461–469.
- Witke, W., Podtelejnikov, A. V, Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C., and Mann, M. (1998). In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.* *17*, 967–976.
- Witke, W., Sutherland, J.D., Sharpe, A., Arai, M., and Kwiatkowski, D.J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3832–3836.
- Witt, C.M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A.K., and Robey, E. a (2005a). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol.* *3*, e160.
- Witt, C.M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A.K., and Robey, E.A. (2005b). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol.* *3*, e160.
- Wolf, K., Müller, R., Borgmann, S., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2003). Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* *102*, 3262–3269.
- Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Lee, P.P., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R., et al. (2001). Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat. Immunol.* *2*, 235–241.

- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., et al. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* *12*, 806–819.
- Woolf, E., Grigorova, I., Sagiv, A., Grabovsky, V., Feigelson, S.W., Shulman, Z., Hartmann, T., Sixt, M., Cyster, J.G., and Alon, R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat. Immunol.* *8*, 1076–1085.
- Wu, Y., Yoder, A., Yu, D., Wang, W., Liu, J., Barrett, T., Wheeler, D., and Schlauch, K. (2008). Cofilin activation in peripheral CD4 T cells of HIV-1 infected patients: a pilot study. *Retrovirology* *5*, 95.
- Wurbel, M.A., Philippe, J.M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M.G., Malissen, M., Jordan, B.R., et al. (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur. J. Immunol.* *30*, 262–271.
- Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., and Nakayama, T. (1993). CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int. Immunol.* *5*, 1139–1150.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* *393*, 809–812.
- Yarar, D. (2004). A Dynamic Actin Cytoskeleton Functions at Multiple Stages of Clathrin-mediated Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 964–975.
- Yoder, A., Yu, D., Dong, L., Iyer, S.R., Xu, X., Kelly, J., Liu, J., Wang, W., Vorster, P.J., Agulto, L., et al. (2008). HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* *134*, 782–792.
- Yonezawa, N., Nishida, E., and Sakai, H. (1985). pH control of actin polymerization by cofilin. *J. Biol. Chem.* *260*, 14410–14412.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I., and Sakai, H. (1990). Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* *265*, 8382–8386.
- Zaitseva, M.B., Lee, S., Rabin, R.L., Tiffany, H.L., Farber, J.M., Peden, K.W., Murphy, P.M., and Golding, H. (1998). CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J. Immunol.* *161*, 3103–3113.
- Zebda, N., Bernard, O., Bailly, M., Welti, S., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2000). Phosphorylation of Adf/Cofilin Abolishes Egf-Induced Actin Nucleation at the Leading Edge and Subsequent Lamellipod Extension. *J. Cell Biol.* *151*, 1119–1128.
- Zhang, D.J., Wang, Q., Wei, J., Baimukanova, G., Buchholz, F., Stewart, A.F., Mao, X., and Killeen, N. (2005). Selective Expression of the Cre Recombinase in Late-Stage Thymocytes Using the Distal Promoter of the Lck Gene. *J. Immunol.* *174*, 6725–6731.
- Zhang, H., Ghai, P., Wu, H., Wang, C., Field, J., and Zhou, G.-L. (2013). Mammalian adenyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulates cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *288*, 20966–20977.

Zhang, J., Shi, F., Badour, K., Deng, Y., McGavin, M.K.H., and Siminovitch, K.A. (2002). WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2240–2245.

Zhu, H., Enaw, J.O.E., Ma, C., Shaw, G.M., Lammer, E.J., and Finnell, R.H. (2007). Association between CFL1 gene polymorphisms and spina bifida risk in a California population. *BMC Med. Genet.* 8, 12.

7. Danksagung

Danke sagen möchte ich an dieser Stelle insbesondere ...

... bei meinem Dr. Vater Prof. Dr. Walter Witke, dessen Türe trotz der immensen Arbeit immer offen stand und mich stets mit vielen fachlichen Ratschlägen unterstützt hat. Insbesondere möchte ich Danke sagen für die große wissenschaftliche Freiheit die mir gewährt wurde, welche mir die Möglichkeit gegeben hat jeder erdenkliche Richtung nachzugehen. Selbstredend bedanke ich mich für die Überlassung dieses interessanten sowie glücklichen Forschungsthemas.

... bei meiner Betreuerin Dr. Christine Gurniak, die sich immer Zeit für meine Fragen und anregende Diskussionen nahm, und mit mir gemeinsam durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit gegangen ist.

... Herrn Prof. Dr. Frank Bradke für die sofortige Bereitschaft das Korreferat zu übernehmen.

... Prof. Dr. Jörg Höfeld und Prof. Dr. Matthias Hullin für die sofortige Bereitschaft als Prüfer in der Prüfungskommission zur Verfügung zu stehen.

... Gabriele Matern, für endlos viele Genotypisierungs PCR's sowie die Unterstützung im Isotopenlabor.

... natürlich allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik: W.Witke, C.Witke, P. Pilo, A.Husch, G. Matern, M. Jokwitz, G. Hertig, G.Dienst, J.Hecker, N.Roy, K.Bläsius, C.Limerdorf, S.Stöcker, S.Hauk, M.Reinke, I.Özer, M. Di Domenico, S.Klein, für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die vielen guten Ratschläge und nicht zuletzt für das angenehme Arbeitsklima. Ohne euch wäre die Laborzeit nicht mal halb so spaßig gewesen...

... meiner Familie, welche mich immer in allem unterstützt hat.

... Janine Salz. Dafür das sie immer für mich da ist und so viel Geduld mit mir hat.

Für meine Frau