

**Cytohesin-3 und sein Interaktionspartner Arl4d  
regulieren die T-Zellvermittelte Immunität  
gegen virale Infektionen durch Beeinflussung  
der IL-2 Produktion**

**-Dissertation-**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

**Felix Tolksdorf**

aus Bonn

Bonn, 11.09.2018

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

1. Gutachter Prof. Dr. Waldemar Kolanus
2. Gutachter Prof. Dr. Joachim Schultze

Tag der Promotion: 05.12.2018

Erscheinungsjahr: 2018

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Weiterhin erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner weiteren Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben. Einige Experimente wurden in Kooperation mit anderen Personen durchgeführt, was an den entsprechenden Stellen vermerkt ist.

Bonn, den

Felix Tolksdorf

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem der Wirbeltiere . . . . .	1
1.1.1	T-Zellvermittelte Immunantwort . . . . .	2
1.1.2	Die T-Zellaktivierung . . . . .	4
1.1.2.1	Der T-Zell-Rezeptor-Komplex . . . . .	5
1.1.2.2	Signalkaskade der T-Zellaktivierung (Signal 1) . . . . .	8
1.1.2.3	CD28-vermittelte Co-Stimulation (Signal 2) . . . . .	10
1.1.3	Inflammatorische Cytokine bilden das Signal 3 der T-Zellaktivierung	11
1.1.4	T-Zellenergie, -erschöpfung ( <i>exhausted T cells</i> ) und -seneszenz . . . .	11
1.1.4.1	Lebersinusoide Endothelzellen sind spezialisierte APCs, die T-Zelltoleranz auslösen . . . . .	13
1.1.5	Interleukin-2 (IL-2) . . . . .	13
1.2	Funktion und Regulation von GTPasen und ihren GEFs . . . . .	15
1.2.1	Arf GTPasen . . . . .	15
1.2.1.1	Arl4d . . . . .	18
1.2.2	Cytohesine . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material . . . . .	21
2.1.1	Geräte . . . . .	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien . . . . .	23
2.1.4	Kommerzielle Reaktionssysteme . . . . .	25
2.1.5	Plasmide . . . . .	26
2.1.6	Primäre Antikörper . . . . .	29
2.1.7	Sekundäre Antikörper . . . . .	29
2.1.8	Enzyme . . . . .	30
2.1.9	Zellkulturmedien, -seren, -zusätze und Puffer . . . . .	30
2.1.10	Komplexe Zellkulturmedien . . . . .	31
2.1.11	Organismen . . . . .	31
2.1.12	Längenstandards . . . . .	32
2.1.13	Programme . . . . .	32
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	33
2.2.1	Bakterienkultur . . . . .	33

2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien . . . . .	33
2.2.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien . . . . .	33
2.2.3.1	Mini-Präparation . . . . .	34
2.2.3.2	Maxi-Präparation . . . . .	35
2.2.4	Restriktionsverdau von DNA . . . . .	36
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	37
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	38
2.2.7	DNA-Sequenzierung . . . . .	38
2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	39
2.2.9	5'-Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA . . . . .	39
2.2.10	5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden . . . . .	40
2.2.11	Ligation . . . . .	40
2.2.12	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden . . . . .	42
2.2.13	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	42
2.2.14	Fällung von PCR-Produkten . . . . .	45
2.2.15	RNA-Isolierung . . . . .	45
2.2.15.1	DNA-Verdau . . . . .	46
2.2.16	cDNA-Synthese . . . . .	46
2.2.17	Quantitative Real-Time PCR (qPCR) . . . . .	46
2.3	Zellbiologische Methoden . . . . .	48
2.3.1	Lymphozyten-Isolation aus der Maus . . . . .	48
2.3.2	Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBM- Cs) aus Leukozytenpräparat . . . . .	49
2.3.3	Magnetic-activated cell sorting (MACS) . . . . .	50
2.3.4	Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs)	53
2.3.4.1	Unreife dendritische Zellen . . . . .	53
2.3.4.2	Reife dendritische Zellen . . . . .	53
2.3.5	Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen mit Calciumphosphat	53
2.3.6	Transfektion von Jurkat T-Zellen mit Plasmid-DNA . . . . .	54
2.3.7	<i>In vitro</i> Stimulation/Aktivierung muriner und humaner T-Zellen . .	55
2.3.8	Stimulation von OT-I <sup>+</sup> T-Zellen durch OVA-beladene BMDCs . . .	55
2.3.9	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	56
2.3.10	Cytometric Bead Array (CBA) . . . . .	58
2.3.11	Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	59
2.3.11.1	Färbung intrazellulärer Proteine . . . . .	60
2.3.12	Zellzahlbestimmung einer FACS-Probe . . . . .	61
2.3.13	Bestimmung der Überlebensfähigkeit von T-Zellen . . . . .	61
2.3.14	Proliferationsuntersuchung bei T-Zellen mittels CFSE-Färbung . . .	62
2.3.14.1	Plattenbeschichtung mit Antikörpern . . . . .	62
2.3.14.2	Proliferationsexperiment . . . . .	62

2.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	63
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten . . . . .	63
2.4.2	BCA (Bicinchoninsäure)-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	64
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	65
2.4.4	Proteintransfer (Western Blot) . . . . .	66
2.4.5	Immundetektion einzelner Proteine auf Nitrozellulose-Membranen . . . . .	67
2.4.6	Blot-Regeneration . . . . .	68
2.4.7	Co-Immunpräzipitation . . . . .	69
2.5	Tierexperimentelle Methoden . . . . .	70
2.5.1	Genotypisierung von OT-I Mäusen . . . . .	70
2.5.2	Genotypisierung von $Cyth3^{-/-}$ Mäusen . . . . .	71
2.5.3	<i>In vivo</i> Infektionsexperiment . . . . .	72
2.5.3.1	Isolierung naiver $CD8^+$ T-Zellen . . . . .	73
2.5.3.2	Adoptiver Zelltransfer . . . . .	73
2.5.3.3	Mausinfektion mit rekombinanten Adenoviren . . . . .	74
2.5.3.4	Analyse der zellulären Immunantwort im Blut . . . . .	74
2.5.3.5	Analyse der zellulären Immunantwort in der Milz und in der Leber . . . . .	74
2.5.3.6	Restimulation der Milz sowie Leber-assoziiierter T-Zellen . . . . .	75
2.5.3.7	Intrazelluläre Färbung von Cytokinen . . . . .	75
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>76</b>
3.1	Expression von Cytohesin-3 in murinen und humanen T-Zellen . . . . .	76
3.1.1	Die Proteinexpression von Cytohesin-3 ist in murinen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert . . . . .	77
3.1.2	Die mRNA-Expression von Cytohesin-3 ist in murinen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert . . . . .	78
3.1.3	Die Proteinexpression von Cytohesin-3 ist in humanen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert . . . . .	79
3.1.4	Die mRNA-Expression von Cytohesin-3 ist in humanen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert . . . . .	80
3.2	Expression von <i>Arl4d</i> in murinen und humanen T-Zellen . . . . .	81
3.2.1	Die mRNA-Expression von <i>Arl4d</i> ist in aktivierten murinen T-Zellen herunterreguliert, während sie in anergen murinen T-Zellen PD-1-abhängig hochreguliert ist . . . . .	82
3.2.2	Die mRNA-Expression von <i>ARL4D</i> ist in humanen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert . . . . .	83
3.3	<i>Arl4d</i> interagiert mit Cytohesin-2, -3 und -4, jedoch nicht mit Cytohesin-1 . . . . .	84
3.4	Charakterisierung der Cytohesin-3 Knockout-Maus . . . . .	85
3.4.1	Nachweis der Cytohesin-3 Defizienz auf DNA-Ebene . . . . .	86
3.4.2	Nachweis der Cytohesin-3 Defizienz auf Proteinebene . . . . .	87

3.4.3	Junge (6-8 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede im Gewicht ihrer Organe und Gewebestrukturen auf . . . . .	88
3.4.4	$Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf . . . . .	89
3.4.5	$Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der absoluten Zellzahl immunologisch relevanter Organe auf . . . . .	90
3.4.6	$Cyth3^{-/-}$ Mäuse haben eine reduzierte Lebenserwartung . . . . .	91
3.4.7	Seneszente (50-100 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse zeigen einen Fellphänotyp . . . . .	92
3.4.8	Seneszente (20-100 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen im Vergleich zu wt Mäusen eine Gewichtsreduktion auf . . . . .	93
3.4.9	Seneszente (70-100 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse enthalten weniger epididymales Fett als wt Mäuse . . . . .	94
3.5	6-8 Wochen alte $Arl4d^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Auffälligkeiten in Gewicht und der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf . . . . .	95
3.6	$Cyth3^{-/-}$ und $Arl4d^{-/-}$ T-Zellen produzieren mehr IL-2 als wt T-Zellen . . . . .	97
3.7	$Cyth3^{-/-}$ und $Arl4d^{-/-}$ T-Zellen produzieren mehr proinflammatorische Cytokine als wt T-Zellen . . . . .	98
3.8	Analyse der Funktion von Cytohesin-3 und $Arl4d$ in T-Zellen im Rahmen einer Adenovirus-Infektion (AdGOL) <i>in vivo</i> . . . . .	100
3.8.1	Die AdGOL Infektion löst eine starke zelluläre Immunantwort der transferierten OT-I <sup>+</sup> T-Zellen aus . . . . .	101
3.8.2	Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort gegen AdGOL im Blut <i>in vivo</i> . . . . .	102
3.8.3	Die Cytohesin-3 Defizienz hat keinen Einfluss auf die Differenzierung zu Effektor und Gedächtnis T-Zellen während der AdGOL Infektion <i>in vivo</i> . . . . .	104
3.8.4	Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort gegen AdGOL in der Milz und Leber <i>in vivo</i> . . . . .	106
3.8.5	Die $Cyth3^{-/-}$ OT-I <sup>+</sup> T-Zellen des <i>in vivo</i> Infektionsexperimentes haben eine gesteigerte IL-2 und IFN $\gamma$ Produktion im Vergleich zu wt OT-I <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	108
3.8.6	$Cyth3^{-/-}$ OT-I <sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich verstärkt in <i>short-lived effector cells</i> (SLECs) . . . . .	109
3.8.7	Auch $Arl4d^{-/-}$ T-Zellen dominieren die zelluläre Immunantwort gegen eine AdGOL Infektion und weisen eine gesteigerte IL-2 Produktion auf, die zur verstärkten Differenzierung zu SLECs führt . . . . .	110
3.9	Stimulation durch LSECs und DCs führt zur divergenten Phosphorylierung von Akt und Erk in T-Zellen, die abhängig vom PD-1-Signalweg ist . . . . .	114

3.10	Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Aktivität der Signalproteine Akt und Erk in T-Zellen negativ . . . . .	116
3.10.1	Überexpression von Cytohesin-3 und Arl4d reduziert die AKT Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen . . . . .	117
3.10.2	Arl4d-Defizienz führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt in T-Zellen . . . . .	119
3.11	Zwei Hypothesen zur Klärung der gesteigerten zellulären Immunantwort der Cyth3 <sup>-/-</sup> und Arl4d <sup>-/-</sup> -T-Zellen während des <i>in vivo</i> Infektionsexperimentes	121
3.11.1	Cytohesin-3 und Arl4d haben keinen Einfluss auf das Überleben von T-Zellen . . . . .	123
3.11.2	Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in T-Zellen . . . . .	125
3.11.3	Arl4d-Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in T-Zellen .	128
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>130</b>
4.1	Cytohesin-3 und sein Interaktionspartner Arl4d sind Markerproteine für anergische T-Zellen . . . . .	130
4.2	Trotz hoher Sequenzhomologie weisen die Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie funktionelle Unterschiede auf . . . . .	132
4.3	Cytohesin-3 und Arl4d sind negative Signalfaktoren der T-Zellaktivierung, deren Expression über CD28 und PD-1 kontrolliert wird . . . . .	134
4.4	Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Produktion proinflammatorischer Cytokine und beeinflussen so die zelluläre Immunantwort gegen Infektionen . .	136
4.5	Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Akt und Erk Aktivität und beeinflussen so die Proliferation und IL-2 Produktion von T-Zellen . . . . .	138
4.6	Cytohesin-3 wird benötigt für die vollständige Insulinrezeptor-Aktivierung und Veränderungen des metabolischen Phänotyps von Mäusen während des Alterns . . . . .	140
4.7	Zusammenfassung . . . . .	141
4.8	Grafisches Modell zur Beschreibung der Funktion von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen . . . . .	143
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>144</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>148</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem der Wirbeltiere

Unser Immunsystem hat die Aufgabe, die täglichen Gefahren abzuwehren, denen unser Körper durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren oder andere Parasiten ausgesetzt ist. Es ist in der Lage, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden und so gezielt Pathogene oder durch Pathogene infizierte Zellen zu eliminieren. Hierbei unterscheidet man zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers dar. Es besteht größtenteils aus Makrophagen, Killerzellen und Granulozyten wie z.B. Neutrophilen sowie dem Komplementsystem. Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene über evolutionär konservierte Strukturen. Hierzu zählen beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), welche Bestandteile der Hülle gramnegativer Bakterien sind. Genauso wird doppelsträngige RNA erkannt, welche natürlicherweise im Mensch oder der Maus nicht vorkommt, sondern eher typisch für bestimmte Viren ist. All diese fremden Strukturmerkmale werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet und von vielen verschiedenen Rezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs), auf bzw. in Immunzellen detektiert. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind in der Lage, die erkannten Pathogene zu phagozytieren und unschädlich zu machen. Weiterhin setzen sie Botenstoffe wie Chemokine und Cytokine frei, die andere Zellen auf die eindringenden Pathogene aufmerksam machen oder weitere Immunzellen anlocken. Eine weitere essentielle Funktion von insbesondere dendritischen Zellen ist, Proteinstrukturen des verdauten Pathogens auf der Oberfläche von Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren. Dies ist ein wichtiger Schritt für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems, welches gezielt nur auf den eingedrungenen Erreger reagiert. Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems wird benötigt, da viele Erreger allein durch das angeborene Immunsystem nicht beseitigt werden können. Außerdem bildet das adaptive Immunsystem Gedächtniszellen aus, welche zu einer effizienteren Bekämpfung des Erregers bei einer Reinfektion führen. Zu dem adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Zellen, welche zur Gruppe der Lymphozyten gehören. Beide Zelltypen werden aus denselben hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. B-Zellen spielen hauptsächlich eine Rolle in der humoralen Immunantwort. Das heißt, B-Zellen sind in der Lage, nach ihrer Aktivierung zu proliferieren und sich in Antikörper-produzierende Plasmazellen zu differenzieren. Die Antikörper werden von den B-Zellen sezerniert und binden an Toxine oder Oberflächenstrukturen extrazellulärer Pathogene. Die Bindung der Antikörper an diese Strukturen (Opsonierung) kann zum

einen deren Wechselwirkung mit Körperzellen behindern (Neutralisierung) und zum anderen die Pathogene mit einem "Friss mich"-Signal auszeichnen. Dies hat zur Folge, dass sie von anderen Immunzellen wie z.B. Makrophagen phagozytiert werden und so unschädlich gemacht werden können. Auf die zweite besondere Gruppe von Zellen, die T-Zellen, die Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind, wird in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen. [1, 2]

### 1.1.1 T-Zellvermittelte Immunantwort

T-Zellen sind, wie die in Abschnitt 1.1 beschriebenen B-Zellen, Teil des adaptiven Immunsystems. Während B-Zellen durch ihre produzierten Antikörper hauptsächlich für das Eliminieren extrazellulärer Pathogene verantwortlich sind, ist die Hauptaufgabe der T-Zellen, beim Abtöten von intrazellulären Pathogenen beizutragen [3, 4]. T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor* (TCR)) Antigene von Pathogenen, welche ihnen von APCs (*antigen presenting cells*), gebunden an die Haupthistokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex* (MHC))-Proteine, präsentiert werden. MHC-Moleküle sind Zelloberflächenproteine, welche intrazellulär mit körpereigenen und körperfremden Peptiden beladen und an die Oberfläche der APCs transportiert werden [5].

Man unterscheidet zwischen zwei Klassen von MHC-Proteinen, die jeweils von zwei unterschiedlichen Gruppen von T-Zellen erkannt werden. MHC-Klasse I-Proteine werden bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Erythrozyten) von allen Zellen des Körpers exprimiert. Sie werden mit Peptiden aus dem Cytoplasma der entsprechenden Zellen beladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen gescannt werden können. MHC-Klasse II-Proteine werden hingegen nur von professionellen APCs wie dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert. All diese Zellen sind in der Lage, Pathogene oder andere Bestandteile aus ihrer Umgebung durch Endozytose aufzunehmen und zu lysieren. Anschließend werden die Peptide bzw. Antigene der Pathogene auf MHC-Klasse II-Proteine beladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von  $CD4^+$  T-Helferzellen erkannt werden.  $CD4$  und  $CD8$  sind Co-Rezeptoren des TCR, die dabei helfen, das MHC-Protein der APCs zu binden und das Signal des TCR intrazellulär zu amplifizieren (siehe 1.1.2). Gleichzeitig sind sie bedeutende Marker für die Unterscheidung von T-Zellpopulationen [6].

Die Vorläufer der T-Zellen stammen aus dem Knochenmark, wo sie aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Als unreife T-Zellen wandern sie aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie ihre Reifungsprozesse durchlaufen. Zu ihnen gehört die somatische Rekombination und Hypermutation der T-Zell-Rezeptor-Gene. Diese Prozesse sorgen für die zufällige Rekombination von Genbereichen, welche für die variablen Teile des T-Zell-Rezeptors kodieren. Diese Regionen sind für die Bindung der Antigen-MHC-Komplexe durch den TCR zuständig. Durch die Rekombination entsteht in jedem Vorläufer der T-Zellen ein TCR, der ein unterschiedliches Antigen erkennt. Da die Rekombination rein zufällig ist, können auch TCRs entstehen, die körpereigene Antigene erkennen. T-Zellen,

welche körpereigene Antigene erkennen, müssen über mehrere Selektionsprozesse aussortiert werden. Dies ist essentiell, da die Erkennung von körpereigenen Antigenen durch TCRs Autoimmunreaktionen auslösen würde. Die Selektionsprozesse des Thymus sorgen dafür, dass nur T-Zellen entstehen, welche tolerant gegen körpereigene Strukturen sind (Selbsttoleranz). Die sogenannte positive Selektion dient dazu, Zellen abzutöten, die einen TCR exprimieren, der keine Antigen-MHC-Komplexe binden kann (MHC-Restriktion). In der negativen Selektion werden potentiell autoreaktive T-Zellen aussortiert. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Vorläufer-T-Zellen sowohl CD4- als auch CD8-Marker, d.h. sie sind doppelt positiv. Abschließend differenzieren sich T-Zellen, welche eine hohe Affinität zu MHC-Klasse I-Proteinen aufweisen, zu zytotoxischen T-Zellen, welche nur positiv für CD8 sind. T-Zellen, die hingegen eine hohe Affinität zu MHC-Klasse II-Proteinen haben, entwickeln sich nur zu CD4-positiven T-Helferzellen [7, 8].

Die fertig differenzierten T-Zellen, welche nur Antigene von Pathogenen erkennen, verlassen den Thymus und wandern in lymphatische Organe wie die Milz oder die Lymphknoten [9]. Dort scannen sie die Oberflächen von APCs nach ihrem passenden Antigen-MHC-Komplex. Sobald eine T-Zelle den passenden Komplex gebunden hat und weitere Stimuli (wie in Abschnitt 1.1.2 detailliert beschrieben) erhält, wird sie aktiviert (Priming). Dies löst die klonale Expansion der Zelle aus. Sie beginnt zu proliferieren, was zur Folge hat, dass eine große Menge an T-Zellen gebildet wird, die spezifisch auf das eingedrungene Pathogen reagieren. Es folgt die Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen [10].

CD8-positive T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen. Ihre Aufgabe ist es, Körperzellen abzutöten, welche von intrazellulären Pathogenen infiziert wurden. Sobald eine infizierte Zelle das pathogene Antigen über ihre MHC-Klasse I-Proteine präsentiert, löst dies zwei Mechanismen in der zytotoxischen T-Zelle aus, die beide Apoptose in der Zielzelle induzieren. Zum einen exprimieren sie das Oberflächenprotein Fas-Ligand, was von dem Todesrezeptor Fas auf der Körperzelle gebunden wird. Dies löst einen intrazellulären Signalweg aus, der zur Aktivierung der Caspasen führt, die wiederum Apoptose in der Körperzelle induziert. Beim zweiten Mechanismus setzt die zytotoxische T-Zelle Granula frei, welche Perforin, Granzyme und Granulysin enthalten. Diese Proteine sind in der Lage, in die Zielzelle einzudringen und dort auch über die Aktivierung von Caspasen Apoptose auszulösen. Durch das Abtöten der infizierten Zielzelle wird verhindert, dass sich das intrazelluläre Pathogen weiter im Körper ausbreiten kann [11].

CD4-positive T-Zellen können sich in unterschiedliche Effektorzellen differenzieren, je nachdem, welche Signale durch die sezernierten Cytokine der APCs und der umgebenen Zellen auf sie einwirken. Werden die CD4-positiven T-Zellen IL-12 und IFN- $\gamma$  ausgesetzt, differenzieren sie sich zu  $T_H1$ -Zellen. Ihre Aufgabe liegt darin, Makrophagen zu aktivieren, damit diese effektiver phagozytierte Pathogene zersetzen können. Außerdem induzieren sie durch das Aussenden von co-stimulierenden Signalen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern, die gegen extrazelluläre Pathogene gerichtet sind. Zusätzlich können  $T_H1$ -Zellen auch den Klassenwechsel bei aktivierten B-Zellen auslösen. Dies führt zu einem Wechsel des produzierten Antikörper-Isotyps. Werden die CD4-positiven T-Zellen durch IL-4 stimu-

liert, differenzieren sie sich zu  $T_{H2}$ -Zellen, deren Aufgabe ist, die humorale Immunantwort zu induzieren.  $T_{H2}$ -Zellen produzieren Cytokine, die die B-Zelldifferenzierung und deren Antikörperproduktion anregen. Sind die CD4-positiven T-Zellen TGF- $\beta$  ausgesetzt, entwickeln sie sich zu regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Sie unterdrücken bzw. regulieren die Funktion von Effektor-T-Zellen herunter, um das Überreagieren einer adaptiven Immunantwort und Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Für die Differenzierung zu  $T_{H17}$ -Zellen müssen CD4-positiv T-Zellen neben TGF- $\beta$  auch durch IL-6 stimuliert werden. Charakteristisch für sie ist die Sekretion von IL-17 und anderen Cytokinen, die auf Epithel- und Stromazellen einwirken, so dass diese Chemokine produzieren, die Neutrophile dazu anregen, ins Gewebe einzuwandern, um die Infektion zu bekämpfen [12, 13].

### 1.1.2 Die T-Zellaktivierung

Für die erfolgreiche Aktivierung einer T-Zelle muss die Zelle drei aktivierende Signale erhalten (siehe Abbildung 1.1). Signal 1 ist die Erkennung des passenden Antigen-MHC-Komplexes auf einer APC. Dies alleine führt allerdings noch nicht zu einer erfolgreichen Aktivierung. Als weiterer intrinsischer Sicherungsprozess, der verhindern soll, dass T-Zellen autoreaktiv gegen körpereigene Antigene reagieren, benötigen T-Zellen zur Aktivierung das zweite co-stimulatorische Signal durch CD80/86 (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Unter Signal 3 versteht man die von der APC oder den umgebenen Zellen ausgeschütteten Cytokine, die die Differenzierung der T-Zellen in ihre Subgruppen, wie in 1.1.2 beschrieben, induziert [2, 14, 15].

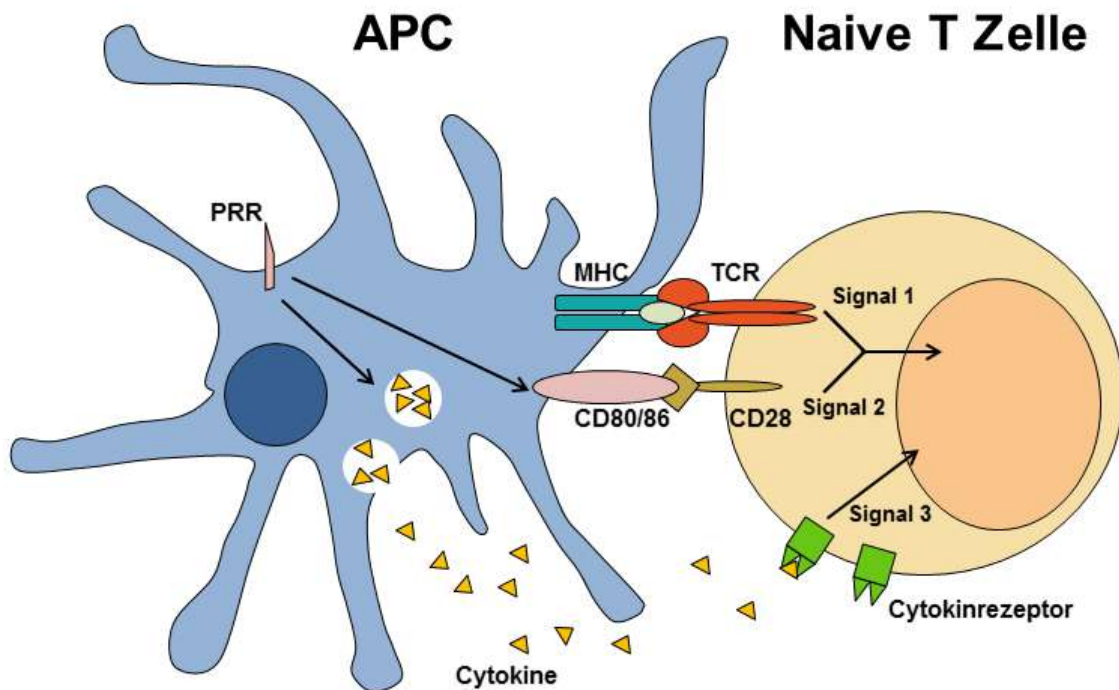


Abbildung 1.1: **Signal 1, 2 und 3 der T-Zellaktivierung.** Für die erfolgreiche Aktivierung einer naiven T-Zelle werden drei Signale benötigt. Signal 1 ist die Erkennung des passenden Antigen-MHC-Komplexes auf einer APC. Signal 2 ist die Co-Stimulation durch CD80/86, was durch den CD28-Rezeptor auf der T-Zellseite erkannt wird. CD80/86 wird spezifisch auf APCs hochreguliert, wenn sie mit Pathogenen in Kontakt kommen bzw. ihre Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* (PRRs)) Strukturen aus Pathogenen erkennen. So wird verhindert, dass naive T-Zellen aktiviert werden, wenn keine Pathogene vorhanden sind. Die von der APC und der Umgebung freigesetzten Cytokine können von verschiedenen Cytokinrezeptoren auf der Oberfläche der T-Zelle gebunden werden, was eine Signalweiterleitung (Signal 3) und die Differenzierung der T-Zelle in einen Subtypen nach sich zieht.

### 1.1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Der T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex ist essentiell für die Generierung des Signals 1, damit naive T-Zellen aktiviert werden können. Er besteht aus mehreren Transmembranproteinen, die alle unterschiedliche Aufgaben erfüllen. So sind die variablen Transmembranproteine an der Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes beteiligt, während die invarianten Transmembranproteine für die Signalweiterleitung verantwortlich sind. Nur ein vollständig assemblierter TCR-Komplex ist funktionsfähig. Daher werden nur vollständige und korrekt gefaltete TCR-Komplexe durch Vesikel an die Zelloberfläche transportiert [16]. Unvollständige oder falsch gefaltete TCR-Komplexe werden im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten bzw. in Lysosomen abgebaut [17, 18].

Der Aufbau des TCR-Komplexes ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Er besteht aus dem eigentlichen TCR, dem CD3-Komplex und zwei  $\zeta$ -Ketten [19, 20]. Der TCR ist ein Heterodimer, der aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$ -Transmembranglykoproteinkette besteht, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der extrazelluläre Teil einer Untereinheit besteht aus zwei Immunglobulindomänen, die jeweils eine konstante und eine variable Region enthalten. Die variable Region ist aufgrund der somatischen Rekombination und Hypermu-

tation (V(D)J-Rekombination) der Genregionen in jeder T-Zelle unterschiedlich [21]. Da sie für die Antigenpezifität des TCR verantwortlich ist, erkennt jede T-Zelle ein unterschiedliches Antigen. Die konstante Region des TCR unterscheidet sich von T-Zelle zu T-Zelle kaum. Beide Untereinheiten des TCR haben innerhalb ihrer hydrophoben Transmembranbereiche positiv geladene basische Aminosäuren, welche für die Bindung bzw. ionische Wechselwirkung mit dem CD4-Komplex und den  $\zeta$ -Ketten wichtig sind. Die Bindung an die anderen Mitglieder ist essentiell, da der TCR-Heterodimer keinen intrazellulären Bereich enthält, der Sequenzmotive aufweist, die für die Signaltransduktion ins Zellinnere sorgen könnten. Sowohl CD3 als auch die  $\zeta$ -Ketten übernehmen die Funktion der Signalweiterleitung [22, 23]. CD3 besteht aus vier Transmembranproteinen (zwei  $\epsilon$ -Ketten, einer  $\delta$ -Kette und einer  $\gamma$ -Kette). Auch die CD3-Ketten weisen eine extrazelluläre Immunglobulin-domäne und geladene Aminosäuren in ihrem Transmembranbereich auf. Sie sind allerdings negativ geladen, damit sie mit den positiv geladenen Regionen des TCR-Heterodimers interagieren können. Sowohl die CD3- als auch die  $\zeta$ -Ketten zeichnen allerdings ihr intrazelluläres Bereich aus, welcher *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Sequenzmotive enthält. Ein ITAM besteht aus zwei YXXL/I-Motiven, die durch sechs bis neun Aminosäuren voneinander getrennt sind [24]. ITAMs sind verantwortlich für die Signalweiterleitung ins Zellinnere, wenn der TCR einen passenden Antigen-MHC-Komplex auf einer APC erkennt. Sie enthalten Tyrosinreste, die im Laufe der T-Zell-Aktivierung durch Kinasen phosphoryliert werden und dazu dienen, Signalproteine an den TCR-Komplex zu rekrutieren [23].

Für die Antigen-MHC-Erkennung ist der TCR-Komplex nicht alleine verantwortlich. Er wird durch die sogenannten Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 unterstützt [25]. CD4 wird von T-Helferzellen exprimiert und besitzt eine Spezifität für MHC-Klasse II-Proteine. CD8 wird hingegen von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und erkennt MHC-Klasse I-Proteine. Beide Co-Rezeptoren steigern die Affinität des TCR-Komplexes zu MHC-Proteinen und verlängern so die Zell-Zell-Interaktion zwischen APCs und T-Zellen. Zusätzlich unterstützen sie auch die Signaltransduktion, indem sie Signalproteine wie z.B. LCK (siehe Abbildung 1.3) an den TCR-Komplex rekrutieren [26].

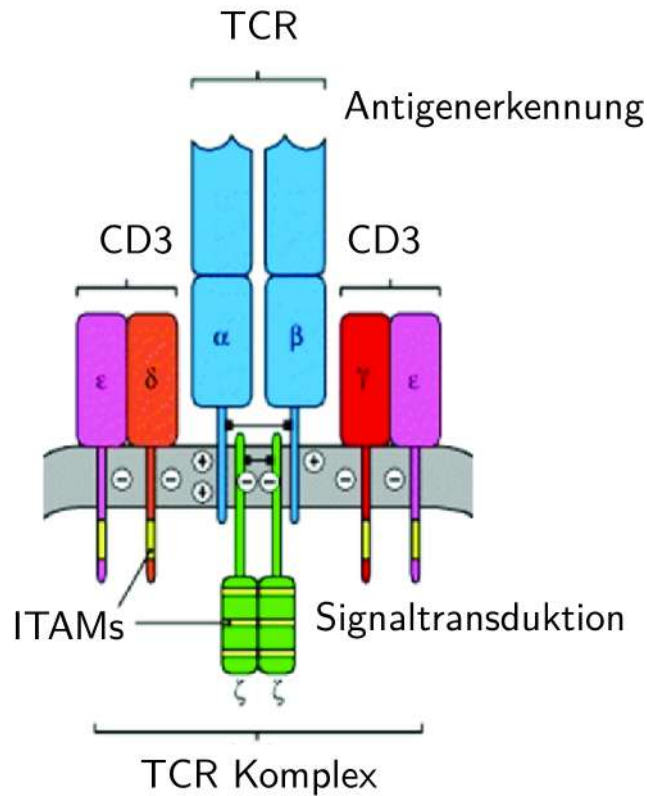


Abbildung 1.2: **Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes.** Der TCR-Komplex besteht aus den TCR-Heterodimeren, welche für die Antigen-MHC-Erkennung zuständig sind, sowie dem CD3-Komplex und zwei ζ-Ketten, welche für die Signaltransduktion in das Zellinnere zuständig sind. Sowohl CD3- als auch die ζ-Ketten weisen konservierte ITAM-Sequenzmotive auf, die bei der T-Zellaktivierung durch Kinasen phosphoryliert werden und die Rekrutierung von Signalproteinen an den TCR-Komplex auslösen, was zur Weiterleitung des Signals in die Zelle führt.

Die Abbildung wurde modifiziert aus: Charles Janeway. Immunobiology: *The immune system health & disease*. Garland, New York, 5th edition, 2001.[27]

1.1.2.2 Signalkaskade der T-Zellaktivierung (Signal 1)

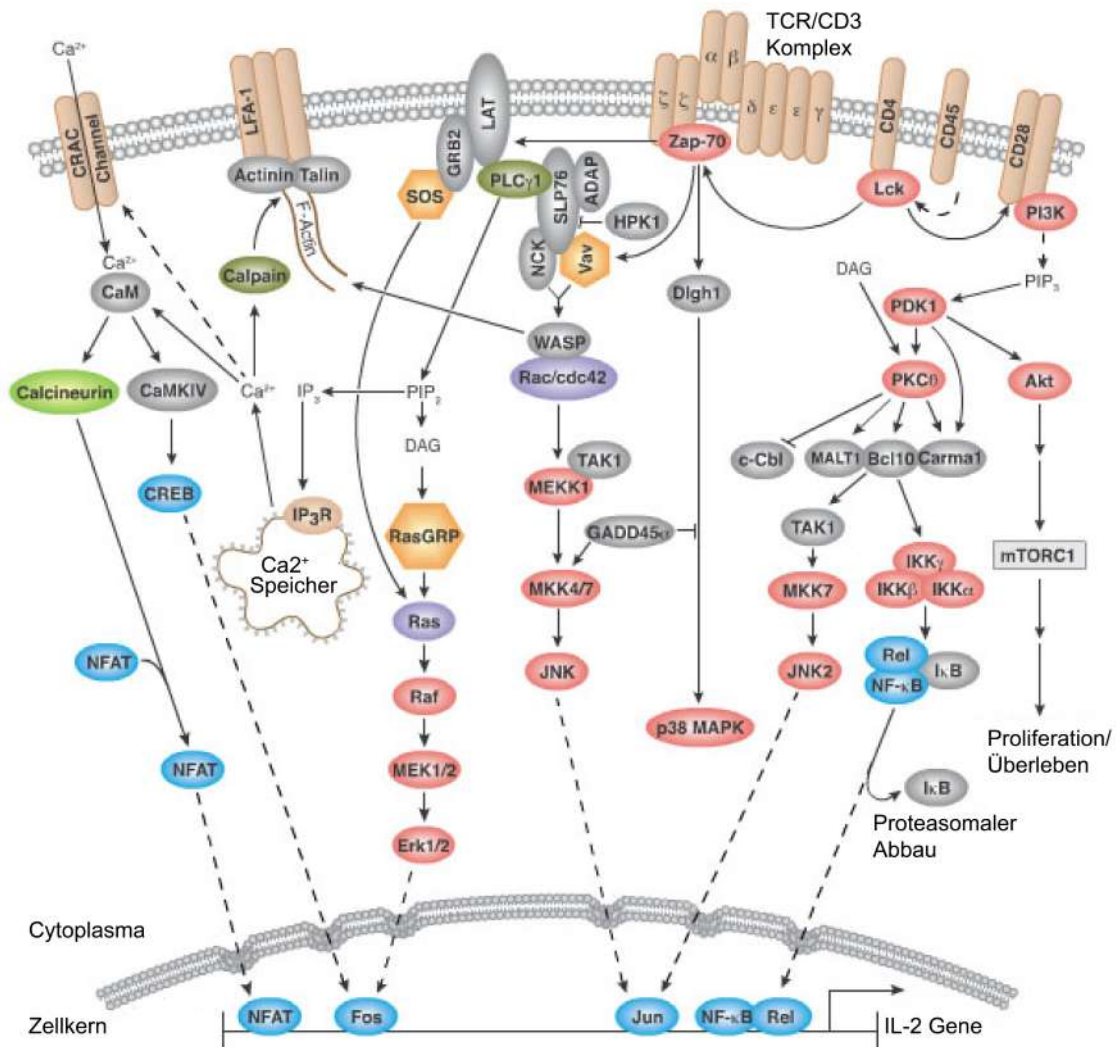


Abbildung 1.3: **Signalwege der T-Zellaktivierung.** Die Stimulation des TCR-Komplexes durch das Erkennen des passenden Peptid-MHC-Komplexes löst eine Signalkaskade aus, die zusammen mit der Co-Stimulation von CD28 zur Transkription des IL-2 Gens führt. Zu den Signalwegen gehört die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (bestehend aus Fos und Jun) durch den MAP-Kinase-Signalweg, die Aktivierung von NFAT über den Calcium-abhängigen Signalweg, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Wirkung der Proteinkinase C sowie der co-stimulatorische Signalweg durch CD28. Neben der Induktion der IL-2 Produktion werden auch viele weitere zelluläre Prozesse durch die Signalwege beeinflusst. So reguliert die CD28-abhängige Aktivierung von Akt die Proliferation und das Überleben der T-Zellen. Die Abbildung wurde modifiziert von: <http://www.homepages.ucl.ac.uk/~zcbtgn1/introduction.html>

Das Signal 1 der T-Zellaktivierung wird ausgelöst durch den TCR-Komplex, der durch das Erkennen des passenden Antigen-MHC-Komplexes auf einer APC aktiviert wird. Der aktivierte TCR löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (*activator protein 1*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) sowie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells*) führt [28, 29, 30].



Diese sind wiederum dafür verantwortlich, die IL-2 Produktion auf transkriptioneller Ebene anzuregen. IL-2 ist ein essentielles Cytokin für die adaptive Immunantwort, da es die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen über autokrine Signalübertragung induziert (siehe Abschnitt 1.1.5) [31]. Der erste Schritt der Signalkaskade ist die Phosphorylierung der ITAMs des CD3-Komplexes sowie der  $\zeta$ -Ketten durch Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) und Fyn, die zu den Src Kinasen zählen [23]. Sie werden über die Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 an den TCR-Komplex rekrutiert. Sind die ITAMs erfolgreich phosphoryliert, werden sie zu Bindestellen für SH2 (*Src Homology 2*)-Domänen. So bindet die Tyrosinkinase ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) mit ihren Tandem-SH2-Domänen die doppelt phosphorylierten ITAMs von CD3-zeta. Nach der Rekrutierung an den TCR wird ZAP70 seinerseits durch die Co-Rezeptor-assoziierte Kinase Lck phosphoryliert und aktiviert. Aktiviertes ZAP-70 hat die Aufgabe, die beiden Gerüstproteine LAT (*linker of activated T cells*) und SLP-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa*) zu phosphorylieren [32]. Beide funktionieren zusammen und werden über das Adapterprotein GADS (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*) miteinander verbunden [33]. Eines der Schlüsselsignalproteine, das durch die Gerüstproteine rekrutiert wird, ist die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), welche die Umsetzung des Membranlipids PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in den sekundären Botenstoff IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und das Membranlipid DAG (Diacylglycerin) katalysiert [34]. Für die Induzierung der katalytischen Aktivität ist die Rekrutierung an die Gerüstproteine alleine nicht ausreichend. Für die Aktivierung benötigt PLC- $\gamma$  eine Phosphorylierung durch die Tec Kinase Ltk (*leukocyte receptor tyrosine kinase*) [35]. Ltk wird an die Plasmamembran rekrutiert und durch Lck sowie die PI3-Kinase aktiviert. Für die Aktivierung der PI3-Kinase ist die Aktivierung des Co-Rezeptors CD28 entscheidend (siehe Signal 2 1.1.2.3) [36]. Nach der oben beschriebenen Aktivierung der PLC- $\gamma$  und der durch ihr ausgelösten Bildung von DAG und IP<sub>3</sub> spaltet sich der Signalweg zur T-Zellaktivierung folgendermaßen auf:

**Aktivierung von NFAT durch einen Calcium-abhängigen Signalweg** NFAT wird indirekt über einen Calcium-abhängigen Signalweg aktiviert. Das von der PLC- $\gamma$  gebildete IP<sub>3</sub> wird von IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) erkannt, was die Freisetzung von im ER gespeicherten Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) in das Cytoplasma auslöst [37]. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Calcium-abhängigen Kanäle CRACs (*calcium release-activated calcium channel*) der Plasmamembran aktiviert werden, die den Einstrom von extrazellulären Calcium-Ionen in die T-Zelle ermöglichen [38]. Die einströmenden Calcium-Ionen können von dem Calcium-sensitiven Protein Calmodulin gebunden werden, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt und die Interaktion mit einer Reihe von Proteinen ermöglicht. Zu den möglichen Interaktionspartnern vom aktivierten Calmodulin gehört die Phosphatase Calcineurin. Sie ist in der Lage, inhibierende Phosphorylierungen des Transkriptionsfaktors NFAT zu entfernen [39]. NFAT wird ubiquitär exprimiert. In naiven T-Zellen liegt es allerdings in einer inaktiven Form im Cytoplasma

vor. NFAT kann in seiner inaktiven Form nicht in den Nukleus eindringen, um seine Funktion als Transkriptionsfaktor auszuführen, da sein Kernlokalisierungssignal (NLS) durch inhibierende Phosphorylierungen maskiert ist [28]. Werden durch die Phosphatase Calcineurin die inhibierenden Phosphorylierungen von NFAT entfernt, wird das NLS erkannt und NFAT wird in den Zellkern transportiert, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausführen kann und unter anderem an die Promotorregion des IL-2 Gens bindet und seine Transkription induziert.

**Aktivierung von AP-1 durch die MAP-Kinase-Kaskade** Das von der PLC- $\gamma$  gebildete DAG diffundiert in der Plasmamembran, wo es von einer Reihe von Proteinen gebunden wird und zu deren Aktivierung führt. Zu ihnen zählt sowohl die Proteinkinase C als auch das Protein RasGRP [40, 41]. Bei RasGRP handelt es sich um einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) (siehe Abbildung 1.4) für die Ras GTPase. Neben RasGRP zählt auch SOS zu den Ras-aktivierenden GEFs. Die Aktivierung von Ras löst die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Kaskade aus. Hierbei bindet und aktiviert Ras die erste Kinase der Kaskade Raf. Raf wird auch als MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase) bezeichnet. Raf führt die Kaskade fort, indem es die MAPKK MEK aktiviert. MEK aktiviert im nächsten Schritt die MAP-Kinase Erk-1/Erk-2 (*extracellular signal-regulated protein kinase*)[42]. Erks stimulieren durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 die Fos-Transkription [43]. Fos bildet zusammen mit Jun die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1. Während die Transkription von Fos spezifisch induziert wird, liegt Jun konstitutiv im Cytoplasma vor und muss über die Proteinkinase JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) phosphoryliert werden, damit sie in den Nukleus transportiert wird. Nach Bildung des Heterodimers aus Fos und Jun bindet AP-1 an die Promotorregion des IL-2 Gens und löst dessen Transkription aus [30].

**Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Proteinkinase C** NF- $\kappa$ B gehört genau wie AP-1 und NFAT zu den IL-2 induzierenden Transkriptionsfaktoren [29]. Er liegt in einer inaktiven Form im Cytoplasma vor. Dadurch, dass er an I $\kappa$ B (Inhibitor von  $\kappa$ B) gebunden ist, wird NF- $\kappa$ B im Cytoplasma zurückgehalten und kann so seine Rolle als Transkriptionsfaktor im Nukleus nicht ausüben [44, 45]. Damit NF- $\kappa$ B in seiner aktiven Form in den Kern wandern kann, muss I $\kappa$ B durch IKK (I $\kappa$ B Kinase) phosphoryliert und ubiquitiniert werden [46]. Dies hat zur Folge, dass I $\kappa$ B abgebaut und NF- $\kappa$ B frei wird. Die Signalkaskade, die zur Aktivierung von IKK führt, läuft über Proteinkinase C (PKC- $\theta$ ). Sie wird auch durch das von der PLC- $\gamma$  produzierten DAG aktiviert. PKC- $\theta$  phosphoryliert das Gerüstprotein CARMA 1, welches Bcl10 und Malt1 rekrutiert [47, 48]. Gemeinsam bilden sie einen Komplex, der I $\kappa$ B-Kinasen rekrutiert und aktiviert.

### 1.1.2.3 CD28-vermittelte Co-Stimulation (Signal 2)

Neben dem TCR-vermittelten Signal 1 benötigen naive T-Zellen die durch CD28 vermittelte Co-Stimulation. CD28 ist ein Co-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, der die

Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) bindet (siehe Abbildung 1.1 [49]). B7.1 und B7.2 werden hauptsächlich von professionellen APCs wie dendritischen Zellen als Reaktion auf eindringende Pathogene exprimiert. Signal 2 wird für eine erfolgreiche Stimulation von naiven T-Zellen benötigt. Dies verhindert zum einen, dass T-Zellen ohne vorliegende Infektion aktiviert werden und zum anderen, dass sie von unbeteiligten Nachbarzellen aktiviert werden, die das Antigen präsentieren. CD28 ist ein Homodimer, dessen extrazelluläre Bereiche die Liganden auf der Oberfläche von APCs binden und dessen intrazelluläre Bereiche für die Signalweiterleitung zuständig sind. Nach der Bindung der Liganden wird das intrazelluläre YXXM-Motiv von CD28 phosphoryliert, was die Rekrutierung und Aktivierung der PI3-Kinase auslöst [50]. Diese wiederum katalysiert die Phosphorylierung des Membranlipids PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>. PIP<sub>3</sub> dient der Rekrutierung von spezifischen Proteinen an die Plasmamembran [51]. Sie binden über eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne an das Membranlipid. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Serin/Threonin-Kinase Akt, deren Aktivierung das Überleben der Zelle durch Inhibierung von Zelltod-Signalwegen fördert. Zusätzlich wird der Metabolismus der Zelle durch eine erhöhte Glukose-Verwendung stimuliert [52].

Eine weitere Funktion der CD28-Stimulation liegt in der Unterstützung des TCR-Signals (siehe Abschnitt 1.1.2.2). Dazu wird das intrazelluläre YXN-Motiv phosphoryliert, um das Adapterprotein Grb2 zu rekrutieren [53]. Grb2 aktiviert zusammen mit SOS und Vav das Signalprotein Ras [54]. Diese wiederum löst, wie in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben, über den MAP-Kinase-Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 aus, was auch zur Induzierung der IL-2 Produktion führt.

### 1.1.3 Inflammatorische Cytokine bilden das Signal 3 der T-Zellaktivierung

Zusätzlich zu dem Antigen/TCR-vermittelten Signal 1 und der durch CD28 ausgelösten Co-Stimulation benötigen T-Zellen ein drittes Signal, um eine vollständige T-Zellaktivierung sicherzustellen. Zu diesem Signal gehören inflammatorische Cytokine wie IL-1, IL-2, IL-12 und IFN $\alpha/\beta$ , die nicht unbedingt von APCs oder T-Zellen stammen, sondern auch von den umliegenden Zellen, die das Mikromilieu für die T-Zellaktivierung bilden (siehe Abbildung 1.1)[55]. Auch wenn Signal 1 und Signal 2 essentiell für die Induktion der Proliferation und Aktivierung der T-Zellen sind, so spielt auch Signal 3 eine wichtige Rolle, um das Überleben der Zellen sicherzustellen und die Formation einer Gedächtnis-T-Zellpopulation zu induzieren [56]. Weiterhin stellt Signal 3 sicher, dass die T-Zellen keine Toleranz und Anergie (siehe Abschnitt 1.1.4) ausbilden [57]. Die Cytokine von Signal 3 haben auch langfristige Auswirkungen auf die T-Zellen. So sorgen sie für den Chromatinumbau, um die Transkription von vielen Genen sicherzustellen, die für die T-Zell-Effektorfunktionen und -Differenzierung nötig sind [58].

### 1.1.4 T-Zellanergie, -erschöpfung (*exhausted T cells*) und -seneszenz

Die Begriffe der T-Zellanergie, -erschöpfung und -seneszenz beschreiben alle Zustände von T-Zellen, die sich durch eine Unterempfindlichkeit (*hyporesponsiveness*) gegenüber stimu-

lierenden Reizen auszeichnen. Sie entstehen durch Mechanismen, die der peripheren Toleranz zugeordnet werden [59]. Man unterscheidet zwischen der zentralen und der peripheren Toleranz. Die zentrale Toleranz wird auch negative Selektion genannt und beschreibt die Vorgänge während der Entwicklung von T-Zellen im Thymus, die zur Eliminierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen führt [60]. Der Mechanismus beruht darauf, dass die Thymus-Epithelzellen (mTECs (*medullary thymic epithelial cells*)) in der Lage sind, sehr viele körpereigene Antigene ektopisch zu präsentieren. Entscheidend hierfür ist der Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) [61]. Er induziert die Genexpression einiger gewebespezifischer Autoantigene [62]. Nach Abbau im Proteasom und dem Transport ins ER werden die Antigene auf MHC-Proteine geladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie den T-Zellen präsentiert werden. Bindet eine T-Zelle während ihrer Entwicklung im Thymus an die präsentierten Antigene, so induziert dies die negative Selektion, d.h. die Zelle stirbt durch klonale Deletion ab oder differenziert zu einer regulatorischen T-Zelle [63]. Die zentrale Toleranz ist elementar wichtig, da sie sicherstellt, dass die gebildeten T-Zellen nicht auf körpereigene Peptide reagieren. Entsteht ein Toleranzverlust, so können Autoimmunerkrankungen wie Typ-1-Diabetes, rheumatoide Arthritis oder multiple Sklerose entstehen [64].

Da die zentrale Toleranz nicht immer zu 100 % funktioniert, gelangen immer wieder autoreaktive T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie. Hier greifen verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz, die sicherstellen, dass die autoreaktiven T-Zellen keine Autoimmunreaktion auslösen [59].

Einer der wichtigsten Prozesse hierbei ist die Anergisierung von T-Zellen, welche dafür sorgt, dass T-Zellen in einen inerten Zustand übergehen, in dem sie weder proliferieren noch ihre Effektor-Funktion ausführen können [65]. Anerge T-Zellen entstehen durch eine unvollständige Aktivierung der T-Zellen mit einer geringen Co-Stimulation, vermittelt durch CD28 oder durch eine hohe Co-Inhibition durch Aktivierung des inhibitorischen Rezeptors PD-1 [66, 67]. Eines der Kennzeichen dieser Zellen ist ihr Unvermögen, IL-2 zu produzieren, was essentiell für die Proliferation der T-Zellen ist (siehe Abschnitt 1.1.5) [68]. Man geht davon aus, dass die Funktion der T-Zellanergie ist, eine Toleranz der T-Zellen gegen ungefährliche Antigene auszulösen, so dass keine Autoimmunerkrankungen entstehen [69].

Erschöpfte T-Zellen (*exhausted T cells*) werden beschrieben als T-Effektorzellen mit stark reduzierter Cytokin-Produktion und Effektor-Funktion. Gleichzeitig sind sie auch resistent gegen eine Restimulation bzw. Reaktivierung [70]. Wie auch bei der Bildung der anergen T-Zellen spielt bei der Bildung der erschöpften T-Zellen die Aktivierung des inhibitorischen Signalweges durch PD-L1/PD-1 eine entscheidende Rolle [71].

Auch wenn die Eigenschaften anerer T-Zellen sich denen erschöpfter T-Zellen stark ähneln, gibt es Indizien, die dafür sprechen, dass sie sich unterscheiden. Im Gegensatz zur T-Zellanergie, die während des ersten Antigen-Kontaktes der T-Zellen sehr schnell ausgebildet wird, entstehen erschöpfte T-Zellen in einem langsameren Prozess, bei dem sie chronisch aktiviert werden, z.B. in Infektionsherden von chronischen Entzündungen wie

bei Krebs, Autoimmunerkrankungen oder chronischen Infektionen [72, 73].

Zur dritten Population gehören die seneszenten T-Zellen (*T cell senescence*). Sie sind terminal differenzierte T-Zellen, die durch gekürzte Telomere, phänotypische Veränderungen wie dem Verlust der CD28-Expression, Zellzyklusarrest und geringere Effektor-Funktionen charakterisiert sind [74, 75, 76, 77]. Die verkürzten Telomere sind ein Nebenprodukt der häufigen Zellteilung, welche zur Seneszenz führt. Normalerweise ist so ein Prozess mit dem natürlichen Altern des Körpers assoziiert, jedoch werden sehr viele seneszente T-Zellen in jungen Patienten mit Autoimmunerkrankungen und chronischen viralen Infektionen gefunden [78]. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Patienten die chronische Aktivierung und Proliferation der T-Zellen die Seneszenz auslöst.

### 1.1.4.1 Lebersinusoidale Endothelzellen sind spezialisierte APCs, die T-Zelltoleranz auslösen

Eine besondere Rolle bei der Induzierung von T-Zellanergie spielen die Lebersinusoid-Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells* LSECs) [79]. Hierbei handelt es sich um spezielle APCs der Leber, die Toleranz in T-Zellen gegenüber ungefährlichen Antigenen auslösen, die wir aus der Nahrung aufnehmen [80, 81, 82]. Mit der Nahrung nimmt der Körper eine Vielzahl an körperfremden Antigenen auf. Die allermeisten dieser Antigene sind jedoch ungefährlich, so dass der Körper eine Immunreaktion gegen sie unterdrücken muss [83]. LSECs sind spezialisierte Endothelzellen. Sie bilden die Schnittstelle zwischen Blutzellen auf der einen und Hepatozyten auf der anderen Seite. Sie sind die am meisten permeable Endothelzellen im menschlichen Körper und weisen gleichzeitig auch die höchste Endozytosekapazität auf [84]. Über den Prozess Kreuzpräsentation sind LSECs in der Lage, T-Zellen exogene Antigene auf MHC I-Molekülen zu präsentieren. Dies führt zur Induktion einer systemischen antigenspezifischen Immuntoleranz in den T-Zellen [82]. In physiologischen Konditionen regulieren LSECs den Gefäßtonus, den Transport von Stoffwechselprodukten und spielen eine Rolle bei der Angiogenese [85].

### 1.1.5 Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 gehört zu den Cytokinen, bei denen es sich um Signalmoleküle des Immunsystems handelt. Sie sind meist sehr kleine Proteine mit einer Größe von 5-20 kDa. Sie werden von spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen erkannt und gebunden, was eine Signalkaskade im Inneren der Zelle auslöst. Je nach Cytokin hat dies unterschiedliche Auswirkungen. So können Cytokine die Migration, Differenzierung, Aktivierung, Homeostase, Proliferation und Reprogrammierung der genetischen Signatur in Immunzellen auslösen [86].

Weiterhin unterscheidet man zwischen autokrin, parakrin und endokrin wirkenden Cytokinen. Autokrin wirkende Cytokine sind Proteine, die von Zellen sekretiert werden und gleichzeitig aber auch wieder von produzierenden Zellen aufgenommen werden. Parakrin wirkende Cytokine sind Proteine, die von Zellen an die Umgebung abgegeben und auf di-

rekt benachbarte Zellen wirken, während endokrin wirkende Cytokine in den Blutkreislauf abgegeben werden und so auf weit entfernte Zellen wirken können [87].

IL-2 ist ein 15 kDa 4- $\alpha$ -Helix Cytokin. Es wird vom IL-2 Rezeptor auf T-Zellen gebunden. Hierbei handelt es sich um ein heterotrimeres Transmembranprotein. Der vollständige Rezeptor besteht aus drei Ketten und hat die höchste Affinität für IL-2. Er besteht aus der  $\alpha$ -Kette (CD25), der  $\beta$ -Kette (CD122) und der  $\gamma$ -Kette (CD132) [88]. Auf naiven T-Zellen lässt sich allerdings nur ein IL-2 Rezeptordimer, bestehend aus  $\beta$ - und  $\gamma$ - Ketten finden. Im Vergleich zum Trimer hat der Dimerrezeptor eine 10-100 geringere Affinität für IL-2 [89]. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ - Ketten werden konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert, während die Expression der  $\alpha$ -Ketten spezifisch angeregt wird [90]. Dies geschieht während der Aktivierung von T-Zellen bzw. nach Stimulation des TCR, wie in 1.1.2.2 beschrieben.

IL-2 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und zu einem geringeren Anteil von DCs produziert [91, 92]. Es wirkt autokrin sowie parakrin auf die aktivierten T-Zellen, was zur Proliferation und Differenzierung der Zellen führt. Intrazellulär werden insbesondere der Januskinasen (JAK)-STAT (*signal transducers and activators of transcription*)- Signalweg sowie der PI3-Kinase-AKT-Signalweg und der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert [91, 89, 93]. Während einer Immunantwort werden gerade in sekundären lymphatischen Organen wie dem Lymphknoten große Mengen IL-2 produziert und direkt von aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufgenommen. Dies führt durch die positive Rückkopplung der IL-2 Signalkaskade zu einer schnellen Vervielfältigung der aktivierten T-Zellen im Lymphknoten, die spezifisch für die Abwehr des eingedrungenen Pathogens sind [94, 95, 96].

Im Gegensatz zur homeostatischen Proliferation von T-Zellen ist die IL-2-abhängige Proliferation während einer Immunantwort sehr schnell und führt vermehrt zur Bildung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Effektorzellen [97]. Die Stärke und die Dauer, mit denen das IL-2 Signal während der primären Immunantwort auf T-Zellen einwirkt, haben Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen zu SLECs (*short lived effector T cells*) [96, 98]. SLECs sind terminal differenzierte T-Effektor-Zellen, die durch Apoptose nach der Klärung der Infektion absterben [99]. In CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst das IL-2 Signal auch die Differenzierung der T-Effektorzellen zu T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub> Zellen. Hierbei spielt die Kombination des IL-2 Signals mit weiteren Signalen wie z.B. der Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren wie T-bet und GATA3 eine entscheidende Rolle, ob T<sub>H1</sub> oder T<sub>H2</sub> Zellen gebildet werden [13].

Ein wichtiger negativer Regulator des IL-2 Gens ist der Transkriptionsfaktor BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*). Seine Bindung an das IL-2 Gen führt zum transkriptionellen Gen-Silencing. Die Expression von BLIMP1 wird in T-Zellen durch den IL-2 Signalweg hochreguliert, so dass eine negative Rückkopplung für das IL-2 Signal entsteht. Dies führt dazu, dass die aktivierten T-Zellen mit der Zeit zu terminal differenzierten oder erschöpften T-Zellen werden (siehe Abschnitt 1.1.4) [100, 101, 102].

## 1.2 Funktion und Regulation von GTPasen und ihren GEFs

### 1.2.1 Arf GTPasen

Arfs sind kleine monomere GTPasen (Guanosintriphosphatasen). In Zellen erfüllen sie häufig die Aufgabe eines “molekularen Schalters” (siehe Abbildung 1.4). Haben die Arfs GDP (Guanosindiphosphat) gebunden, liegen sie in ihrer inaktiven Form vor. Sogenannte GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) katalysieren den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren die Arfs dadurch. Die Bindung von GTP löst eine Konformationsänderung in Arfs aus, wodurch sie nun in der Lage sind, mit ihren Ziel-Proteinen zu interagieren. Da Arfs nur eine geringe intrinsische GTPase-Aktivität haben, verweilen sie in ihrer aktiven GTP-gebunden Form so lange, bis ihre Hydrolyseaktivität durch ein entsprechendes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) gesteigert wird. Nach Abspaltung eines Phosphatrestes von GTP ist nur noch GDP an das nun wieder inaktive Arf gebunden, womit sich der Aktivitätszyklus schließt. [103]

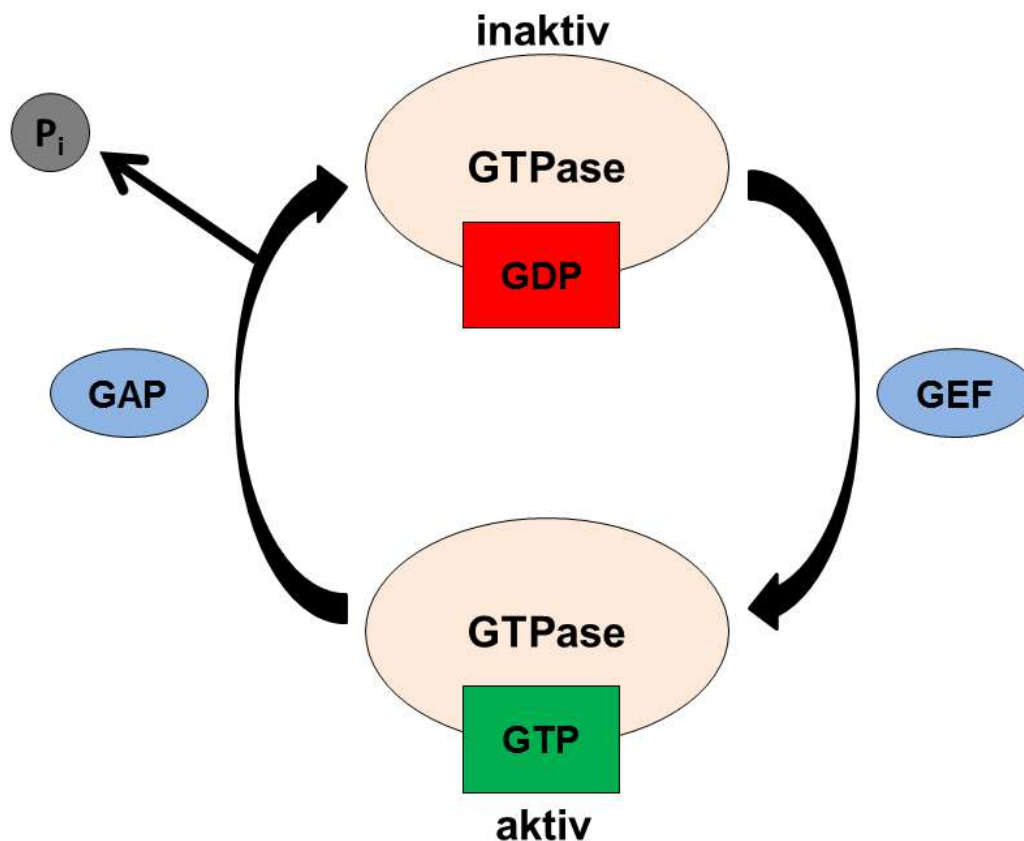


Abbildung 1.4: **Aktivitätszyklus von Arfs.** Im inaktiven Zustand liegen die kleinen monomeren Arf-GTPasen in GDP-gebundener Form vor. Der durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysierte Austausch von GDP durch GTP löst eine Konformationsänderung in der GTPase aus. In der GTP-gebundenen Form sind Arfs aktiv und können mit ihren Zielproteinen interagieren und ihre zellulären Funktionen ausführen. Um wieder in den inaktiven Zustand überzugehen, interagieren GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) mit der GTP-gebundenen Form und katalysieren die Hydrolyse des Nukleotids, wodurch ein Phosphatrest abgespalten wird und das Arf wieder GDP gebunden hat.

Arfs sind die Namensgeber einer großen Proteinfamilie, welche neben Arfs selbst Arls (*ARF-like proteins*), Arps (*ARF-related proteins*) und SAR (*secretion-associated and Ras-related*)-Proteine beinhaltet. Im Allgemeinen liegt ihre Funktion in der Kontrolle verschiedener Membranprozesse und der Regulation von Organellstrukturen [104, 105]. Arf-Proteine werden in drei Klassen eingeteilt. Klasse I besteht aus Arf1, Arf2 und Arf3. Klasse II besteht aus Arf4 und Arf5. Arf6 gehört zur Klasse III der Arfs. Klasse II-Arfs sind spät in der tierischen Zellevolution entstanden, während Klasse I-Arfs hoch konserviert und in allen Eukaryoten vorhanden sind. So finden sich z.B. Klasse I-Arfs in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und auch in Pflanzen [106]. Arfs sind in der gesamten Zelle, inklusive der Plasmamembran und den Membranen des sekretorischen, endosomalen und lysosomalen Signalweges, lokalisiert [107].

Die Klasse I-Arfs regulieren den Aufbau mehrerer Vesikel-Hüll-Komplexe, zu denen die COPI-Hülle am Golgi-Apparat (Arf 1), die Clathrin-AP1-Hülle am trans-Golgi-Netzwerk



(TGN) sowie die Clathrin-AP3-Hülle an Endosomen gehören [108, 109]. Klasse II-Arfs sind mit dem trans-Golgi-Netzwerk assoziiert und regulieren dort die Sekretion von Proteinen und spezielle Transportprozesse. So reguliert z.B. Arf4 den Transport des Sehpigments Rhodopsin [110]. Arf6 ist das einzige Klasse III-Arf und ist an Endosomen und der Plasmamembran lokalisiert, wo es Vesikeltransportprozesse wie Endozytose oder Recyclingprozesse reguliert [111]. Neben dem Vesikeltransport ist Arf6 auch an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und beeinflusst so die Zellmigration [112, 113, 114]. Außerdem kann es lipidmodifizierende Enzyme wie die Phospholipase D und Phosphatidylinositol-(4)-Phosphat 5-Kinase (PIP-5kin) aktivieren [115, 116].

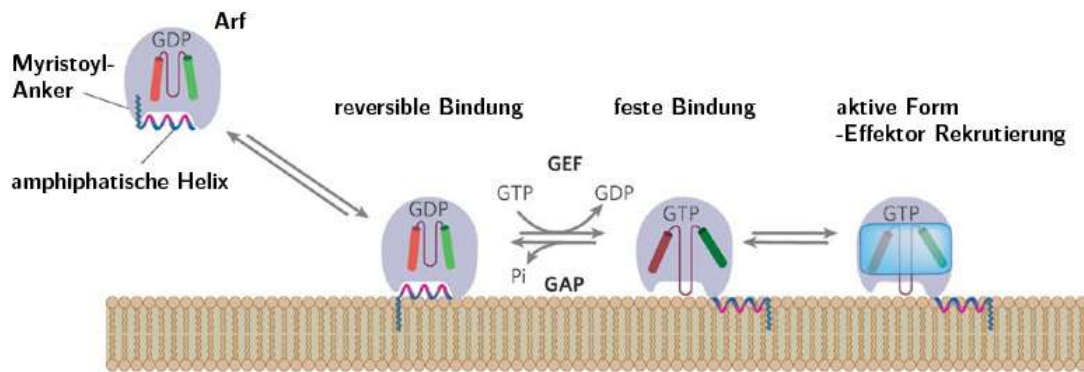


Abbildung 1.5: **Ablauf der Membranintegration eines Arf.** Das inaktive GDP-gebundene Arf ist im Cytoplasma lokalisiert. Der hydrophobe Myristoyl-Anker des Arf kann reversibel in die Membran integriert werden und so das Arf an sie binden. Dort kann der Austausch von GDP zu GTP durch GEFs katalysiert werden. Dies induziert eine Konformationsveränderung in den Arfs, bei der die amphipathische Helix aus ihrer hydrophoben Tasche herausklappt und in die Membran integriert. In diesem Zustand ist das Arf fest an die Membran gebunden, was die Rekrutierung von Effektorproteinen ermöglicht. Arfs können auch wieder von der Membran gelöst werden, wenn ein GAP die Hydrolyse des gebundenen GTP katalysiert. Hierdurch klappt die amphipathische Helix wieder zurück in die hydrophobe Tasche, was die Bindung der Arfs an die Membran aufhebt. Die Abbildung wurde modifiziert aus: Rudy Behnia and Sean Munro. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438(7068):597604, 2005. [117]

Damit Arfs zur Bildung von Vesikelhüllen beitragen können, müssen sie in einem ersten Schritt an die Membran rekrutiert werden. Sie benutzen dazu ihre N-terminale amphipathische Helix. An sie ist ein Myristoyl-Anker gekoppelt. Der hydrophobe Anker kann sich in Lipidmembranen integrieren und so eine Assoziation des Arf mit der Membran ermöglichen [118]. In diesem Zustand können die GEFs des Arf den Austausch von GDP durch GTP initiieren. Dies löst wiederum eine Konformationsänderung im Arf aus, bei der die amphipathische Helix aus einer hydrophoben Tasche im Arf herausklappt und sich auch in die Membran integriert. In diesem Zustand sind die Arfs fest an die Membran gebunden und können im nächsten Schritt Effektorproteine rekrutieren [119]. Um das Arf wieder von der Membran zu lösen, wird durch ein GAP die Hydrolyse des GTP katalysiert. Dies sorgt gleichzeitig dafür, dass die amphipathische Helix wieder aus der Membran zurück in ihre hydrophobe Tasche klappt, was wiederum das Ablösen des Arf von der Membran ermöglicht [120].

### 1.2.1.1 Arl4d

Arl4d gehört zur Familie der *Arf-like* Proteine. *Arf-like* Proteine teilen allerdings nur 40-60 % Sequenzübereinstimmung mit regulären Arfs. Die Domänenstruktur von Arl4d ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Sie besteht aus einem N-terminalen Myristoyl-Anker, der dem Protein die Integration in Membranen ermöglicht (siehe 1.5). Hieran schließen sich drei konservierte Domänen, die für die Bindung von GTP und GDP verantwortlich sind. Am C-terminalen Ende befindet sich ein Kernlokalisierungssignal, was es dem Protein ermöglicht, in den Nukleus transportiert zu werden. Über die Funktionen von Arl4d ist bisher sehr wenig bekannt. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass Arl4d bei der Regulation von Membran-assoziierten Transportprozessen, der Aktin-Umstrukturierung und der Regulation der Morphologie von Mitochondrien involviert ist [121, 122, 123]. Interessanterweise scheint Arl4d mit Cytohesin-2 zu interagieren und es an die Plasmamembran zu rekrutieren [121].

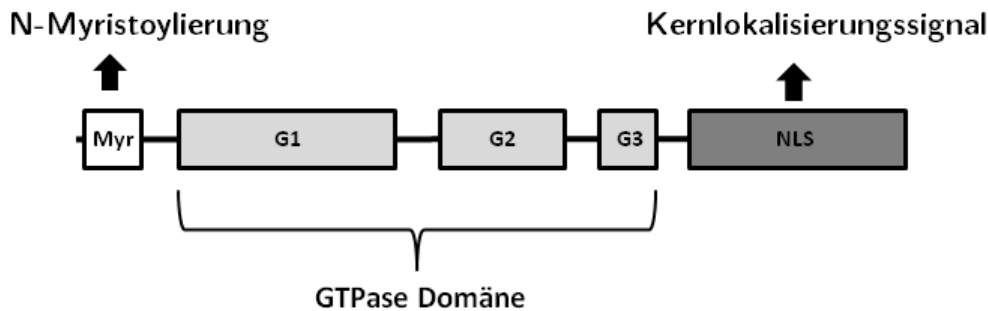


Abbildung 1.6: **Arl4d-Domänenstruktur.** Am N-terminalen Ende befindet sich der Myristoyl-Anker, welcher Arl4d erlaubt, sich in Membranen zu integrieren. Darauf folgen die drei GDP-GTP-Bindedomänen mit GTPase-Aktivität. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Kernlokalisierungssequenz, die Arl4d ermöglicht, in den Zellkern transportiert zu werden.

### 1.2.2 Cytohesine

Cytohesine sind GEFs für Arf-GTPasen (Siehe 1.2.1). In Säugetieren wurden bisher vier Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie identifiziert. Hierzu zählen Cytohesin-1, Cytohesin-2 (auch ARNO (*ARF nucleotide binding site opener*) genannt), Cytohesin-3 (Grp-1 oder auch Steppke in *Drosophila melanogaster* genannt) und Cytohesin-4. Cytohesine sind hoch konservierte Proteine, was erklärt, dass man auch jeweils einen Vertreter der Cytohesine bei Invertebraten wie Fliegen oder Nematoden findet [124].

Cytohesine sind ca. 47 kDa groß, bestehen aus ca. 400 Aminosäuren und weisen dieselbe Domänenstruktur auf, welche in Abbildung 1.7 dargestellt ist. Am N-terminalen Ende befindet sich die *Coiled-coil*-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen zuständig ist. Daran schließt sich die Sec7-Domäne an, die für die GEF-Aktivität (siehe Abbildung 1.4) der Cytohesine verantwortlich ist. Als nächstes folgt die PH-Domäne, mit der die Cytohesine an Membranen rekrutiert werden können. Die Membranrekrutierung erfolgt durch die Bindung der Phospholipide PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> [125]. Entscheidend für die Affinität der

Cytohesine zu den Phospholipiden ist das Di- bzw. Triglycin-Motiv in der PH-Domäne der Cytohesine. Die Cytohesine können in zwei Spleißvarianten exprimiert werden. Die Diglycin-Isoform besitzt zwei Glycine in der Phospholipidbinderegion der PH-Domäne und führt zu einer starken Affinität zu PIP<sub>3</sub>. Exprimiert das Cytohesin die Triglycin-Isoform, so führt dies zu einer gesteigerten Affinität zu PIP<sub>2</sub> [126].

Alle Cytohesine weisen eine hohe Sequenzhomologie auf [127, 124]. So stimmen die Aminosäuresequenzen von Cytohesin-1, -2 und -3 zu ca. 80 % überein. Cytohesin-4 ist ein wenig anders aufgebaut und weist daher eine Sequenzhomologie von nur 70 % auf. Jedes Mitglied der Cytohesin-Proteinfamilie ist ein GEF für spezifische Arfs. Cytohesin-1 katalysiert den GDP/GTP-Austausch bei Arf1, Arf3 und Arf6. Cytohesin-2 und -3 sind hingegen die GEFs für Arf1 und Arf6 [128, 129, 130, 131].

Auch wenn sich die Cytohesine in vielen Eigenschaften ähneln, so unterscheiden sie sich darin, was ihre Expression in Zelltypen angeht. Cytohesin-1 wird von den meisten Körperzellen exprimiert, jedoch ist die Expression in hämatopoetischen Zellen am stärksten. Auch Cytohesin-4 wird hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert. Es wird fast ausschließlich in peripheren Leukozyten sowie in der Milz und dem Thymus exprimiert [127]. Cytohesin-2 wird in nahezu allen Körperzellen exprimiert [124]. Auch Cytohesin-3 wird in den meisten Körperzellen mit Ausnahme von Leber- und Thymuszellen exprimiert [130].

Cytohesine regulieren viele wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellmigration und -Adhäsion, T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion und den Insulin-Signalweg [132, 133, 134, 135]. Cytohesin-1 wurde als Interaktionspartner des Adhäsionsproteins LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) identifiziert [136]. Die Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18, der Untereinheit von LFA-1, reguliert die Affinität von LFA-1 zu seinem Liganden ICAM-1 (*inside-out signaling*) und beeinflusst so die Zellmigration [132].

Es ist bekannt, dass Cytohesin-1 durch die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges die T-Zellaktivierung unterstützt [135]. Passend dazu ist die Beobachtung, dass Cytohesin-1 ein positiver Regulator der IL-2 Produktion ist, die wie in 1.1.2 und 1.1.5 beschrieben ein essentieller Teil der T-Zellaktivierung ist [137, 138, 135]. Die Daten von Kliche et al. deuten darauf hin, dass Cytohesine auf den MAP-Kinase-Signalweg über Erk1/Erk2 einwirken, welcher wiederum essentiell für die Induktion der IL-2 Produktion ist [137].

Genau wie für Cytohesin-1 konnte auch für Cytohesin-2 gezeigt werden, dass es in den MAP-Kinase-Signalweg über die Regulation der Phosphorylierung von Erk eingreifen kann [139]. Zusätzlich spielt Cytohesin-2 eine Rolle im Akt-Signalweg, da Cytohesin-2 mit dem Gerüstprotein CNK1 (*connector enhancer of KSR 1*) interagiert und für die Rekrutierung zur Plasmamembran sorgt, was wiederum wichtig für die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges ist [140].

Auch das Cytohesin-3 Homolog Steppke in *Drosophila melanogaster* beeinflusst den PI3-Kinase/Akt-abhängigen Insulin-Signalweg [134]. Zusätzlich ist Cytohesin-3 auch im T-Zellaktivierungs-Signalweg, in dem die PI3-Kinase und Akt involviert sind, enthalten. Im Gegensatz zu Cytohesin-1 konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cytohesin-

3 den IL-2 Promotor inhibitiert [135]. Dies deutet darauf hin, dass Cytohesin-1 und -3 in der T-Zellaktivierung eine antagonistische Rolle spielen.

Über die Funktion von Cytohesin-4 ist bisher wenig bekannt, da es das am wenigsten untersuchte Mitglied der Cytohesin-Proteinfamilie ist. Laut Ogasawara et al. wird es spezifisch in immunologisch relevanten Organen wie der Milz und dem Thymus sowie Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert [127]. Die genaue Funktion, die Cytohesin-4 in Immunzellen hat, ist allerdings unbekannt.

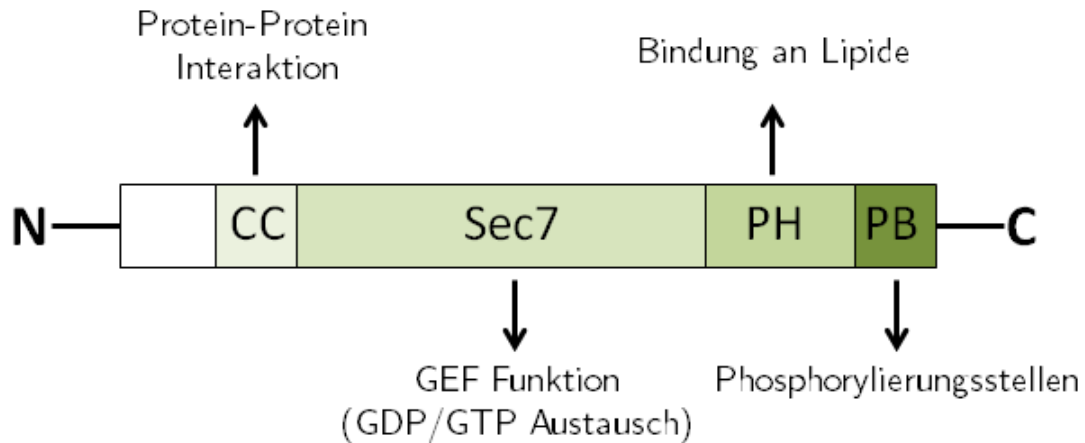


Abbildung 1.7: **Cytohesin-Domänenstruktur.** Am N-terminalen Ende ist die *Coiled-coil* (CC)-Domäne lokalisiert, welche für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Auf sie folgt die Sec7-Domäne, welche den GDP zu GTP-Austausch an Zielproteinen wie Arfs katalysiert. Die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne bindet die Phospholipide PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub>, was den Cytohesinen erlaubt, an Membranen rekrutiert zu werden. Am C-terminalen Ende befindet sich die polybasische Region, welche in Cytohesin-1 und -2 Phosphorylierungsstellen aufweist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Absaugpumpe	AC, HLC BioTech (Bovenden)
Agarosegeldokumentation	Gel Max, INTAS (Göttingen)
Autoklav	Model 135T, H+P (Oberschleißheim)
Automacs pro Separator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Blotapparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Bakterien-Schüttler	VKS-75 control, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Durchflusszytometer (FACS)	BD CantoII, BD Biosciences (Heidelberg)
Drehrad	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Polymehr (Paderborn)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektrophorese-Netzteil	EV-243, Consort (Turnhout, Belgien)
Elektroporator	GenePulser Xcell + CE-Modul, Biorad (München) Nucleofector I Elektroporator, Amaxa Biosystems (Basel)
Elektrowaage	JB2002-G, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Entwicklermaschine	SRX-101A, Konica Minolta (Langenhagen)
Feinwaage	AG285, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Heiz- und Magnetrührer	Combimac RCT, IKA (Staufen)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Heizplatte	ARE, VELP scientifica (Milan, Italy)
Magnetständer	DynaMag™-2 Magnet, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss (Jena) Eclipse TS100, Nikon (Tokio, Japan)
Mikrotiter-Plattenreader	Infinite M200, Tecan (Maennedorf, Schweiz)
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy HT Multimode-Reader, BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Netzgeräte für Elektrophorese	Elite300Plus, Schütt Labortechnik (Göttingen)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)

Photometer	Biophotometer, Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA) Eppendorf (Hamburg) ErgoLine, StarLab (Ahrensburg)
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro, Brand (Wertheim)
Präparierbesteck	FST (Heidelberg)
Protein-Minigel-Apparaturen	BioRad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München)
Scanner, Aufsicht- und Durchlicht-	Scan Maker 8700, Mikrotek (Hsinchu, Taiwan) Canon 900F mark II (Tokio, Japan)
Schüttler	VKS-75 control, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Spektrophotometer	Nanodrop200, Thermo Scientific (Braunschweig)
Sterilbank	Euroflow, Thermolife (Woerden, Niederlande) BDK (Sonnenbühl-Genzingen)
Thermocycler	iCycler iQ5, Biorad (München) Mycycler, Biorad (München)
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus, Bandelin Electronic (Berlin)
Vakuumpumpe	AC, HLC BioTech (Bovenden)
Vortexer	Zx3, VELP scientifica (Mailand, Italien)
Waage	JB2002-G/FACT, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Wasserbad	WNE, Memmert (Schwabach)
Wippe	WS-10, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Zellkulturinkubator	Binder (Great River, USA) Model 381, ThermoForma (Karlsruhe)
Zentrifugen	Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München) Centrifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg) Centrifuge 5810R, Eppendorf (Hamburg) Multifuge 4KR, Heraeus instrument GmbH (München) Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter (München)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	4 mm, Biozym (Wien, Österreich) 2 mm, Amaxa biosystems (Köln)
FACS-Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

Filterspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kapillarspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Küvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnetic Beads	Dynal Biotech (Carlsbad, USA)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nylon-Mikrofilter (40 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
PCR-Reaktionsgefäße	200 µl Thin Wall Tubes, Biorad (München)
Pasteurpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikpipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl Carl Roth (Karlsruhe)
Polypropylen-Reaktionsgefäße	0,5/1,5/2,0 ml, Starlab (Ahrensburg)
Q-PCR-Folie	Peqlab (Erlangen)
Q-PCR-Platten	Peqlab (Erlangen)
Röntgenfilm	GE-Healthcare (Freiburg) Hyperfilm <sup>TM</sup> MP, Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Spritzen	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter	0,2 µm/0,45 µm Schleicher & Schuell (Dassel)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
UV-Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Verbandmull	Hartmann (Heidenheim)
Vakuum-Filtrationssystem	Millipore (Schwalbach)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen	175/75/25cm <sup>2</sup> , Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten	6-/12-/48-/96-Loch), Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellophanfolie	BioRad (München)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

### 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar	BD (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ammoniumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Antipain	Sigma-Aldrich (Steinbach)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinbach)
Beads	Invitrogen (Carlsbad)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Steinbach)
1-Butanol	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Brefeldin A	eBiosciences (San Diego, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinbach)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Diacetate Succinimydyl Ester (CFSE)	eBiosciences (San Diego, USA)
$\lambda$ -DNA/EcoRI + HindIII Marker Nr.3	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTP-Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Dynasore	Sigma Aldrich (Steinbach)
Dynabeads Protein G	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Elektrochemilumineszenz (ECL)-Kit	Thermo Scientific (USA)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	VWR (Frankreich)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ficoll human (Pancol)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Gentamycin	Gibco (Eggenstein)
Glukose	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Roche (Mannheim)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Igepal CA-630	Sigma Aldrich (Steinbach)
Ionomycin	Sigma Aldrich (Steinbach)
Leupeptin	Sigma Aldrich (Steinbach)
Lithiumchlorid	Sigma Aldrich (Steinbach)
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
AutoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnesiumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)



Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Monensin	eBiosciences (San Diego, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin	GIBCO (Eggenstein)
Phenol	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (Steinbach)
Precision Plus Protein All Blue Standard	BioRad (München)
Propidiumiodid (PI)	Fluka (Sigma)(Steinheim)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
RibonukleaseA (RNase A)	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
Trizol	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Trypsin, 2,5 %	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

#### 2.1.4 Kommerzielle Reaktionssysteme

Annexin PI Färbung	Biologend (San Diego)
BCA Protein Assay Reagenz	Thermo Scientific (Braunschweig)
CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit	BD (Heidelberg)
CountBright Absolute Counting Beads	Thermo Scientific (Braunschweig)
ECL Plus Western-Blotting Substrat	Thermo Scientific (Braunschweig)
Human T-cell Nucleofector Kit	Amaxa Biosystems (Köln)
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Kapa Sybr Fast qPCR Mastermix for Bio-Rad iCycler	Peqlab (Erlangen)
Mouse IL-2 Ready-SET-Go!	eBiosciences (San Diego)
peqGold hot Start Mix Real-Time	Peqlab (Erlangen)
Phusion <sup>TM</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

### **2.1.5 Plasmide**

Als Ausgangsvektor wurde pEGFP-N1 von Clontech (siehe Abbildung 2.1) sowie der pRK5 Vektor von Addgene verwendet. Sie wurden durch W. Kolanus entsprechend modifiziert, so dass eine Klonierung über die Restriktionsschnittstellen MluI und NotI möglich war. Die Fusionsproteine mit den eGFP, Flag oder Ig Markierungen stehen unter der Kontrolle des CMV-Promotors des Zytomegalievirus.

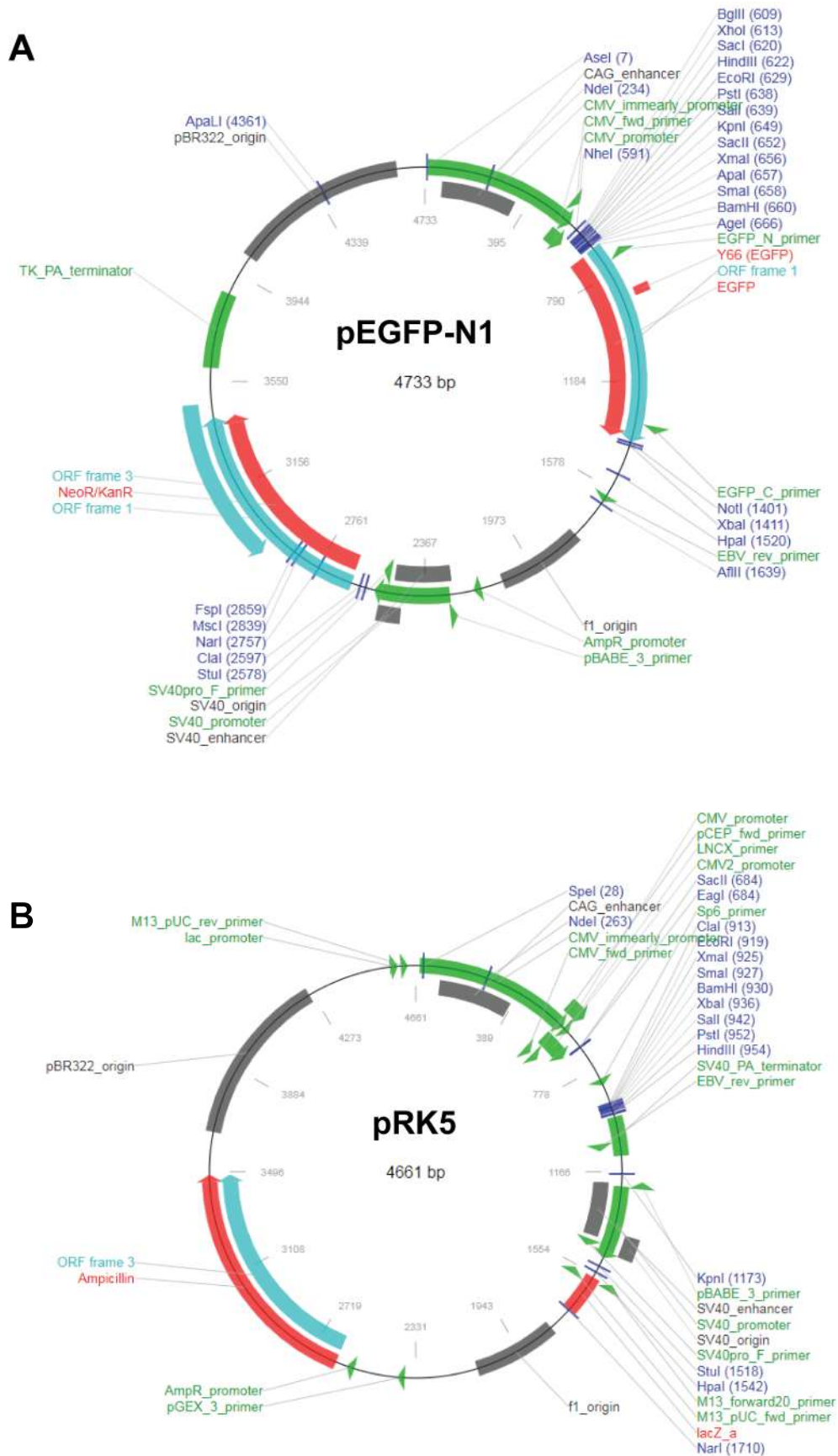


Abbildung 2.1: Vektorkarten des pEGFP-N1 von Clontech sowie des pRK5 von Addgene. Abgebildet ist die zirkuläre Anordnung spezifischer DNA-Sequenzen auf dem pEGFP-N1 (A) und pRK5 Vektor (B). Abbildungen sind modifiziert von Addgene.com

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Markierung</b>
pN1 eGFP	Kanamycin	eGFP
pN1 eGFP Cytohesin 1	Kanamycin	eGFP
pN1 eGFP Cytohesin 3	Kanamycin	eGFP
pN1 eGFP Cytohesin 3 E161K	Kanamycin	eGFP
pN1 eGFP Arl4d Q80L	Kanamycin	eGFP
pN1 eGFP Arl4d G2A	Kanamycin	eGFP
pRK5 Ig Kontrolle	Ampicillin	Ig
pRK5 Ig Arl4d G2A	Ampicillin	Ig
pRK5 Flag Cytohesin-1	Ampicillin	Flag
pRK5 Flag Cytohesin-2	Ampicillin	Flag
pRK5 Flag Cytohesin-3	Ampicillin	Flag
pRK5 Flag Cytohesin-4	Ampicillin	Flag

## 2.1.6 Primäre Antikörper

Antikörper	Anwendung	Hersteller
$\alpha$ -Aktin	WB	Sigma-Aldrich (St. Louis)
$\alpha$ -Akt	WB	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -pAkt Theronin	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -pAkt Serin	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -pAkt	WB	Cellsignaling (Danvers)
$\alpha$ -CD4	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD8 $\alpha$	FACS	Biolegend (San Diego)
$\alpha$ -CD8	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD25	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD44	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD45.1	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD45.2	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD62L	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -CD127	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -Cyth1	WB	Bereitgestellt durch Dr. Elisabeth Kremmer
$\alpha$ -Cyth2	WB	Sigmaaldrich (St. Louis)
$\alpha$ -Cyth3	WB	Bereitgestellt durch Dr. Elisabeth Kremmer
$\alpha$ -Cyth4	WB	Bereitgestellt durch Dr. Elisabeth Kremmer
$\alpha$ -Erk	WB	Cellsignaling (Danvers)
$\alpha$ -pErk	WB	Cellsignaling (Danvers)
$\alpha$ -IFN $\gamma$	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -IL-2	FACS	eBiosciences (San Diego)
$\alpha$ -KLRG1	FACS	Biolegend (San Diego)
$\alpha$ -TCR V $\beta$ 5.1	FACS	Biolegend (San Diego)
$\alpha$ -Tubulin	WB	Cellsignaling (Danvers)
$\alpha$ -V $\alpha$ 2 TCR	FACS	Biolegend (San Diego)

## 2.1.7 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Markierung	Spezies	Anwendung	Hersteller
$\alpha$ -Kaninchen	HRP	Ziege	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -Maus	HRP	Ziege	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -Ratte	HRP	Ziege	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -Schaaf	HRP	Esel	WB	Santa Cruz
$\alpha$ -Ziege	HRP	Esel	WB	Santa Cruz

## 2.1.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I	Roche (Basel, Schweiz)
Restriktionsenzyme:	
AgeI	Fermentas (St. Leon-Rot)
EcoRI	Fermentas (St. Leon-Rot)
MluI	Fermentas (St. Leon-Rot)
NotI	Fermentas (St. Leon-Rot)
XbaI	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Polynukleotid-Kinase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
Phusion <sup>TM</sup> High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)

## 2.1.9 Zellkulturmedien, -seren, -zusätze und Puffer

Name	Hersteller
DMEM Low Glucose	Sigma Aldrich (Steinbach)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich (Steinbach)
Fixation Buffer	Biologend (San Diego, USA)
Gentamicin 50 mg/ml	Sigma Aldrich (Steinbach)
GBSS	Sigma Aldrich (Steinbach)
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma Aldrich (Steinbach)
OptiMem, phenolfrei	Gibco (Eggenstein)
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich (Steinbach)
Permeabilization Wash Buffer (10x)	Biologend (San Diego, USA)
PERM Buffer	eBiosciences (San Diego, USA)
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinbach)
L-Glutamin	Sigma Aldrich (Steinbach)
RPMI 1640	Sigma Aldrich (Steinbach)
mit L-Glutamin	
VLE-RPMI 1640	Biochrom (Berlin)
mit L-Glutamin	
2 g/l NaHCO <sub>3</sub>	

### 2.1.10 Komplexe Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
RPMI 1640 +/+	RPMI 1640 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 10 µg/ml Gentamycin
VLE-RPMI 1640 +/+	VLE-RPMI 1640 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Jurkat Elektroporationsmedium	RPMI 1640 50 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
Jurkat Hungermedium	RPMI 1640 0,5 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS

### 2.1.11 Organismen

#### Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	endA1,hsdR17( $r_{\kappa}^{-}m_{\kappa}^{+}$ ),supE44,thi1,recA1,gyrA, (Nal <sup>y</sup> ),relA1	[141]
MC1061	araD139,Δ(ara-leu)7696,galE15,galK16,Δ(lac) <sub>X74</sub> , rpsL(Str <sup>y</sup> )hsdRR2( $m_{\kappa}^{-}m_{\kappa}^{-}$ ),mcrA,mcrB	[142]

#### Säugetier-Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Jurkat E6.1	Aus einem Patienten mit akuter Leukämie isolierte humane T-Zelllinie	[143]
HEK 293T	Es handelt sich um menschliche embryonale Nierenzellen	[144]

#### Primäre Zellen

Bezeichnung	Ursprung
Murine CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	Isoliert aus der Milz und Lymphknoten von wt, Cyth3 <sup>-/-</sup> und Arl4d <sup>-/-</sup> -Mäusen
Humane CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	Isoliert aus Lymphozytenkonzentraten ( <i>Buffy coats</i> ), welche von dem Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn zur Verfügung gestellt wurden

### 2.1.12 Längenstandards

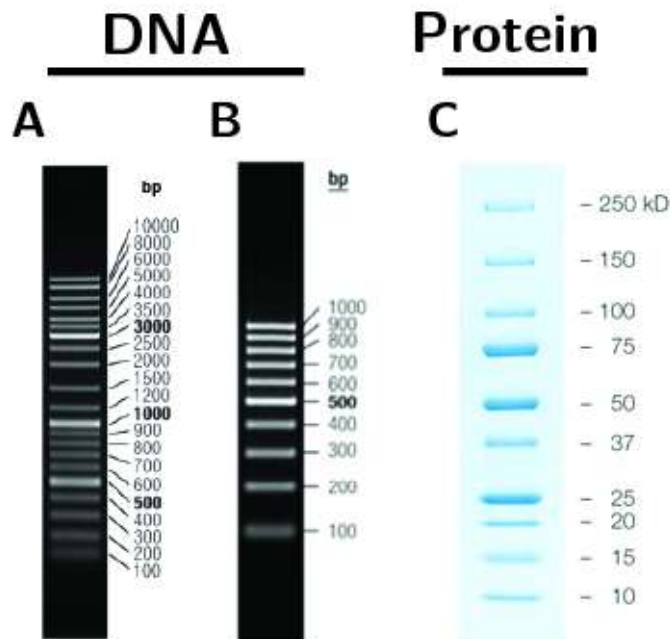


Abbildung 2.2: **Verwendete DNA- und Proteinlängenstandards.** Neben den einzelnen Proben wurden auf Agarosegele und SDS-PAGES Längenstandards aufgetragen, um die Proben mit Fragmenten bekannter Größe zu vergleichen. (A) DNA-Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* von Fermentas (St. Leon-Rot). (B) DNA-Längenstandard *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* von Fermentas (St. Leon-Rot). (C) Proteinstandard *Precision Plus All Blue* von BioRad (München).

### 2.1.13 Programme

Name	Verwendungszweck	Hersteller
ApE	DNA Sequenz Analyse	M. Wayne Davis
Citavi	Literaturverwaltung	Swiss Academic Software (Zürich, Schweiz)
FlowJo	FACS Daten-Auswertung	FlowJo, LLC (Ashland, USA)
FACSDiva	FACS Daten-Auswertung	BD (Franklin Lakes, USA)
Lyx	Textverarbeitung	<i>Open Source</i>
Illustrator	Arrangieren von Graphen	Adobe Systems (San José, USA)
iQ5 2.0 Standard Edition	qPCR Analyse	Biorad (Hercules, USA)
Photoshop	Grafikbearbeitung	Adobe Systems (San José, USA)
PowerPoint	Grafikgestaltung	Microsoft (Albuquerque, USA)
Prism	Erstellung von Graphen	GraphPad (La Jolla, USA)



## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Bakterienkultur

In der Bakterienkultur wurden die Stämme DH5 $\alpha$  sowie MC1061 nach Miller in LB-Medium gehalten [145]. Plattenkulturen wurden auf Agarplatten (10 g Agar/1 l LB-Medium) bei 37 °C für 16 h kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C mit 150 rpm für 16 h geschüttelt. Zur Isolation von transformierten Bakterien wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ g/ml Kanamycin oder 100  $\mu$ g/ml Ampicillin auf die Bakterien ein Selektionsdruck ausgeübt. Nur Bakterien, welche ein Plasmid mit der genetischen Information für eine Kanamycin- oder Ampicillinresistenz aufgenommen haben, können in diesem Medium wachsen.

### 2.2.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Unter der Transformation versteht man eine Technik, mit der man DNA-Plasmide in kompetente Bakterien einführt. Diese sind wiederum in der Lage, die Plasmide zu vervielfältigen. Dieses Verfahren wurde benutzt, um große Mengen eines Plasmides herzustellen. Pro Transfektion wurden 80  $\mu$ l der *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  oder MC1061 langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,25  $\mu$ g Plasmid-DNA. Die darauffolgende 10-minütige Inkubation auf Eis diente dazu, das Binden der Plasmid-DNA an die Bakterien zu ermöglichen. Zur Induzierung eines Hitzeschocks, der zur Aufnahme der Plasmide durch die Bakterien führt, wurde die Bakteriensuspension in einen Heizblock mit 37 °C überführt und für 5 min inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt. Das anschließende Schütteln der Bakterien in 1 ml LB Medium (ohne Antibiotika) für 30 min bei 37 °C erlaubt es den Bakterien, noch ohne Selektionsdruck zu wachsen. Des Weiteren wird die Zeit von den erfolgreich transformierten Bakterien genutzt, um das Resistenzgen auf den Plasmiden abzulesen. Dies ermöglicht den transformierten Bakterien, für den kommenden Selektionsdruck vorbereitet zu sein. Nun konnten die Bakterien pelletiert und in 100  $\mu$ l LB Medium resuspendiert werden. Diese Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, welche 30  $\mu$ g/ml Kanamycin oder 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen. Nach einer 16-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden Kolonien gepickt, welche anschließend für das Animpfen von Flüssigkulturen genutzt oder bei 4 °C gelagert wurden.

### 2.2.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Nach der erfolgreichen Transformation von Bakterien müssen die Plasmide vieler Klone verifiziert werden. Hierzu wurde eine geringe Menge an Plasmid-DNA isoliert (Mini-Präparation: siehe Abschnitt 2.2.3.1), welche zur Bestätigung einer erfolgreichen DNA-Insertion in einen Vektor für einen Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.4) verwendet wurde. Nach der Identifizierung von Klonen, die das gewünschte Plasmid exprimieren, wurde mit diesen eine Maxipräparation (siehe Abschnitt 2.2.3.2) durchgeführt. Sie ermöglicht die Aufreinigung großer DNA-Mengen mit einer höheren Reinheit, da sie eine bessere Ab-

trennung der DNA von der RNA durch die zusätzliche Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation erreicht [146]. Sowohl die Mini- als auch die Maxi-Präparation beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [147] und benötigen folgende Puffer:

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

### 2.2.3.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation dient einer schnellen Analyse der Plasmid-DNA mehrerer Klone. Dies ermöglicht, dass nur Klone, welche das gewünschte Plasmid exprimieren, für die anschließende Maxi-Präparation verwendet werden. Hierzu wurden anfangs ein bzw. mehrere Klone einer LB-Agarplatte gepickt, um mit ihnen jeweils 4 ml LB-Medium anzupflanzen. Um den Selektionsdruck auf die Bakterien aufrecht zu erhalten, wurde dem LB-Medium des auf dem Plasmid enthaltenen Resistenzgens entsprechend ein Antibiotikum hinzugefügt (siehe Abschnitt 2.2.1). Anschließend wurde die Flüssigkultur (Übernachtkultur) bei 180 rpm und 37 °C für 16 h geschüttelt. Nachfolgend wurden 2 ml der Bakterienkultur bei 11.400 x g pelletiert und in 200 µl Lösung I resuspendiert. Zur Induzierung der alkalischen Lyse wurden 400 µl Lösung II hinzugegeben. In diesem Prozess wird durch den hohen pH-Wert der Lösung II und durch das Detergens SDS die Membran der Bakterien zerstört, wodurch sowohl Proteine als auch die DNA denaturieren. Durch Zugabe von 300 µl Lösung III und durch mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde die Suspension neutralisiert. Die Neutralisierung sorgt dafür, dass die chromosomale DNA sowie die denaturierten Proteine als Komplex mit SDS ausfallen. Die Plasmid-DNA hingegen fällt nicht aus, da sie aufgrund ihrer geringen Größe und kovalenten Verknüpfungen in der Lage ist, schneller zu renaturieren als die genomische DNA. Die darauffolgende Zentrifugation mit 11.400 x g bei 4 °C für 10 min diente dem Abtrennen der ausgefallenen Bestandteile, welche sich im Pellet ansammelten. Im Überstand befanden sich nun hauptsächlich die Plasmid-DNA sowie die bakterielle RNA. Zur Entfernung der restlichen Proteine wurden 900 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl Phenol-Chloroform versetzt und gevortext. Nun wurde die Lösung für 5 min bei 11.400 x g zentrifugiert, um eine schnellere Phasentrennung zu erreichen. Die Plasmid-DNA enthaltende obere wässrige Phase wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 800 µl Isopropanol gefällt. Zur Pelletierung der Plasmid-DNA wurden die Proben für 15 min mit 11.400 x g bei 4 °C abzentrifugiert. In den letzten Schritten wurde das Pellet noch zweimal mit jeweils 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, sowie für 15 min bei 37 °C in einem Heizblock getrocknet. Letzte kleine Verunreinigungen durch RNA wurden durch Lösen des Pellets in 50 µl sterilem A. bidest, welchem 0,5 µl RNase A zugesetzt wurde, entfernt. Die nun fertig aufgereinigte Plasmid-DNA konnte bei -20 °C gelagert oder für

analytische Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.4) verwendet werden.

### 2.2.3.2 Maxi-Präparation

Zur Isolierung großer Mengen sehr reiner DNA wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. Diese entspricht einer im Maßstab vergrößerten Mini-Präparation (siehe Abschnitt 2.2.3.1), an die jedoch eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation angeschlossen ist. Dies ermöglicht, Plasmid-DNA mit einem höheren Reinheitsgrad zu gewinnen. Für die Maxi-Präparation wurden die restlichen 2 der 4 ml der Übernachtskultur (siehe Abschnitt 2.2.3.1) verwendet, um 1 l LB-Medium anzupflanzen. Auch diesem Medium wurden 30 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, um wachsenden Bakterien einem Selektionsdruck auszusetzen. Die Bakteriensuspension wurde für 16 h mit 150 rpm bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Pelletierung erfolgte durch eine Zentrifugation mit 4.000 x g für 20 min. Nachdem der Überstand abgossen worden war, konnte das Pellet in 40 ml Lösung I resuspendiert werden. Daraufhin folgte die Zugabe von 80 ml Lösung II, was die alkalische Lyse, wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, auslöste. Nach 5 min wurde durch das Hinzufügen von 80 ml Lösung III die Reaktion durch Neutralisierung der Suspension abgestoppt. Zur Pelletierung der ausgefallenen Zelltrümmer, wie z.B. Proteine und die chromosomale DNA, wurde die Suspension mit 4.000 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Es folgte die Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit gleichzeitiger Filtrierung durch Verbandsmull, was verhinderte, dass verbleibende Zelltrümmer die Lösung verunreinigen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 100 ml 2-Propanol gefällt. Daraufhin wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 4.000 x g für 10 min bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde nach dem Abgießen des Überstandes das Plasmid-DNA-haltige Pellet für mindestens 15 min an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nun in 4 ml Lösung I resuspendiert werden. Für die Vorbereitung der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation wurden in der Suspension 5,5 g Cäsiumchlorid bei 37 °C gelöst. Nach dem vollständigen Lösen des Cäsiumchlorids wurden 100 µl Igepal (10 % (v/v)) sowie 500 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation mit 4.000 x g wurde der Überstand in *Quickseal*-Ultrazentrifugationsgefäße (Beckman) überführt. Diese wurden anschließend luftblasenfrei verschlossen, und bei 50.900 x g für 3,5 h ultrazentrifugiert. Durch die Ultrazentrifugation bildete sich ein Cäsiumchloridgradient aus. In diesem Gradienten wurden Proteine, DNA, *supercoiled* DNA und RNA entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Proteine setzen sich im oberen Teil des Ultrazentrifugationsgefäßes ab, während die dichtere RNA sich am Boden ansammelt. Normale und *supercoiled* Plasmid-DNA bilden zwei Banden in der Mitte des Gefäßes. Diese werden durch Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, rot angefärbt. Beide DNA-Banden wurden mit Hilfe einer Spritze entnommen. Es folgten drei Waschschriffe mit 10 ml salzgesättigtem 1-Butanol, um das Ethidiumbromid aus der DNA zu entfernen. Nach erfolgreichem Waschen wurde die nun wieder farblose Suspension mit einem Volumenanteil Ammoniumacetat (1 M) und drei Volumenanteilen 96 % (v/v) Ethanol versetzt, um die DNA zu

fällen. Pelletiert wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 x g. Als letzter Schritt wurde die Plasmid-DNA mit 70 % (v/v) Ethanol ein weiteres Mal gewaschen, bevor das Pellet für 16 h an der Luft trocknen konnte. Abschließend wurde das Pellet in 0,5 ml A. bidest gelöst. Nach einer Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 2.2.6) konnte die Plasmid-DNA für Transformationen, Transfektionen etc. verwendet oder bei 4 °C gelagert werden.

### 2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Bei einem Restriktionsverdau von DNA erkennen Restriktionsendonukleasen spezifische DNA-Sequenzen an einem DNA-Doppelstrang. Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, spalten sie den DNA-Doppelstrang an einer für sie spezifischen Sequenz, so dass überhängende Einzelstränge (*sticky ends*) entstehen. Neben den *sticky ends* bildenden Restriktionsenzyme gibt es auch einige, die in der Lage sind, eine glatte Spaltung des DNA-Doppelstranges durchzuführen (*blunt ends*). Für diese Doktorarbeit wurden lediglich Restriktionsenzyme verwendet, welche überhängende Einzelstränge herstellen, da diese Klonierungsarbeiten, wie das Einfügen von Insertionen in der richtigen Orientierung in ein Plasmid, stark vereinfachen.

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen können spezifische Fragmente eines Plasmids entfernt werden. Des Weiteren können an die entstandenen Enden durch eine Insertion auch weitere DNA-Sequenzen oder *Tags* (Proteinmarkierungen wie z.B. GFP) über eine Ligation (siehe 2.2.11) in das Plasmid eingefügt werden. Auch für die Analyse eines Plasmids wurden Restriktionsverdaus durchgeführt. Um die korrekte Insertion einer Sequenz in ein Plasmid nachzuweisen, wurde dieses einem Restriktionsverdau unterzogen und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5). So kann bestimmt werden, ob das Insert eines Plasmids die korrekte Größe aufweist. Für eine spezifischere Analyse des Inserts wurden jedoch zusätzlich noch Sequenzierungen, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, durchgeführt.

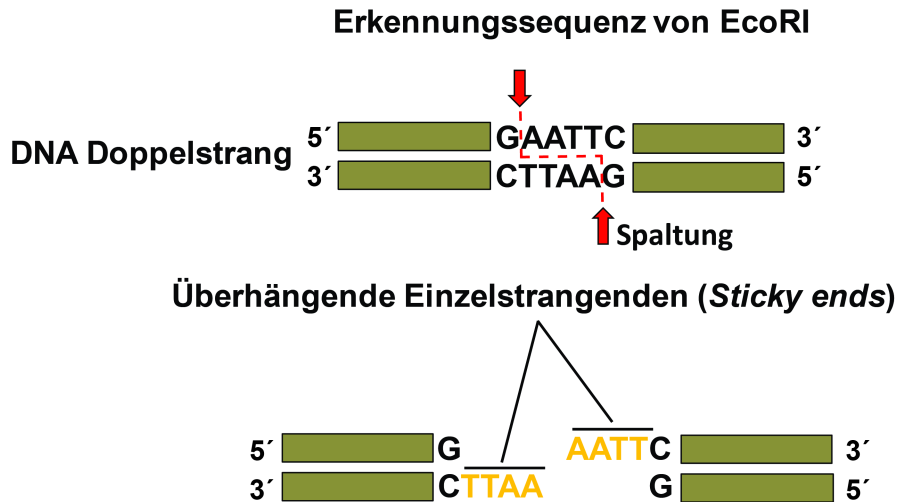


Abbildung 2.3: **Restriktionsverdau.** Es ist die schematische Spaltung eines DNA-Doppelstranges durch das Restriktionsenzym EcoRI dargestellt. EcoRI erkennt die Spaltungsequenz G<sup>^</sup>AATTC im DNA-Doppelstrang. Bei der Spaltung werden überhängende Einzelstränge gebildet, welche für Plasmid-Klonierungsstrategien genutzt werden können.

Für den Restriktionsverdau wurden entweder 3 µg Plasmid-DNA oder 40 µl eines PCR-Ansatzes verwendet. Zu der DNA wurden dann jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme sowie 5 µl des Reaktionspuffers gegeben. Der Reaktionspuffer wurde entsprechend der Kombination der Restriktionsenzyme nach den Herstellerangaben (Fermentas) ausgewählt. Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit A. bidest auf 50 µl aufgefüllt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen des Restriktionsverdaus erfolgte durch eine 20-minütige Inkubation der Proben bei 80 °C, was zur Inaktivierung der Enzyme führt.

Restriktionsenzym	Sequenz der Schnittstelle
AgeI	5'..A <sup>^</sup> C C G G T..3' 3'..T G G C C <sup>^</sup> A..5'
EcoRI	5'..G <sup>^</sup> A A T T C..3' 3'..C T T A A <sup>^</sup> G..5'
HindIII	5'..A <sup>^</sup> A G C T T..3' 3'..T T C G A <sup>^</sup> A..5'
MluI	5'..A <sup>^</sup> C G C G T..3' 3'..T G C G C <sup>^</sup> A..5'
NotI	5'..G C <sup>^</sup> G G C C G C..3' 3'..C G C C G G <sup>^</sup> C G..5'

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, verdaute Plasmide, Klonierungsinserionen usw.) nach ihrer Größe bzw. Anzahl an Basenpaaren. Um die zu analysierende DNA auf Agarosegele aufzutragen, musste sie mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt werden. Der Glycerolanteil des Puffers ermöglicht das

Absinken der DNA in die Geltaschen und verhindert so das Vermischen unterschiedlicher Proben. Neben den Proben wurde ein DNA-Standard aufgetragen, welcher einen Größenvergleich der DNA-Fragmente erlaubt (siehe Abschnitt 2.1.12). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen der DNA wandern die Proben im elektrischen Feld zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit durch das engmaschige Gel ist allerdings abhängig von ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Abhängig von der Größe der nachzuweisenden DNA wurden Agarosegele mit unterschiedlichem Anteil an Agarose hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Zusätzlich wurde noch 1:50.000 Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid ist in der Lage, in den Doppelstrang der DNA zu interkalieren und nach Anregung durch UV-Strahlung die DNA sichtbar zu machen [148]. Die Lösung wurde nun in eine Gelgießapparatur gegossen und mit einem Kamm versehen, der Taschen zum Auftragen der Proben erzeugte. Als Laufpuffer wurde der TAE-Puffer verwendet, welchem auch Ethidiumbromid hinzugefügt wurde. Die Gele liefen mit 4 V/cm für ca. 30-45 min.

### **TAE-Puffer**

---

50 mM EDTA

1 M Essigsäure

2 M Tris

Ethidiumbromid 1:50.000

### **2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Plasmide, PCR-Produkte, RNA usw.) wurde an einem Nanodrop-Spektral-Photometer (Thermo) durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm von 1 µl der DNA- bzw RNA-haltigen Lösung gemessen. Hierbei entspricht eine optische Dichte von 1 ( $OD_{260} = 1$ ) einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml oder einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zusätzlich wurde die Absorption der Proben bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Probe. Liegt der Quotient bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0, handelt es sich um eine reine Probe. Weist der Quotient einer Probe einen Wert unter 1,8 auf, liegt höchstwahrscheinlich eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Phenol vor, so dass diese nicht weiter verwendet wurde.

### **2.2.7 DNA-Sequenzierung**

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

### 2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei verschiedensten Klonierungsvorgängen müssen sowohl Vektor-Rückgrate, PCR-Produkte oder andere Inserts über Agarosegele isoliert werden. Dies ist vonnöten, um die gewünschten Zielfragmente von kleinen DNA-Fragmenten zu trennen, die beim Restriktionsverdau von Plasmiden oder PCR-Produkten entstehen. Die ungewünschten Fragmente weisen nach dem Restriktionsverdau komplementäre überhängende Einzelstrangenden zu dem Vektor-Rückgrat oder dem einzufügenden Insert auf und inhibieren daher die gewünschte Ligation (siehe Abschnitt 2.2.11).

Für die Isolation von spezifischen DNA-Fragmenten wurde ein *Low-Melting-Agarosegel* aus 1,2 % (m/v) *Low-Melting-Agarose* in TAE-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.5) im Kühlraum gegossen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C war das Gel ausgehärtet und konnte mit Proben beladen werden. 15 µl der DNA-haltigen Lösung mussten dazu mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt werden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Agarosegelen, die in Abschnitt 2.2.5 beschrieben wurden, schmelzen *Low-Melting-Agarosegele* schon bei einer Temperatur von 65 °C. Daher musste auch die Elektrophorese dieser Gele mit einer wesentlich geringeren Spannung (65 V für 20 bis 45 min, je nach DNA-Fragmentgröße) durchgeführt werden. Anschließend wurden die Zielfragmente mit einem Skalpell unter langwelligem 366 nm UV-Licht ausgeschnitten. Die so erhaltenen DNA-haltigen Agaroseblöcke konnten bei -20 °C gelagert werden. Für die Weiterverwendung der DNA musste diese aus den Agaroseblöcken durch Erhitzen auf 65 °C im Heizblock und durch Vortexen freigesetzt werden. Aufgrund der geringen Schmelztemperatur der Agarose denaturiert die DNA nicht beim Erhitzen und kann ungeschädigt für Klonierungsvorgänge eingesetzt werden.

### 2.2.9 5'-Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Nachdem ein Vektor durch einen Restriktionsverdau (siehe 2.2.4) linearisiert wurde, muss verhindert werden, dass die beiden freien komplementären überhängenden Einzelstrangenden mit sich selber religieren. Dies wird durch eine Inkubation des linearisierten Vektors mit der *Shrimp-Alkaline-Phosphatase* (SAP) erreicht. SAP ist ein Enzym, welches die 5'-Phosphatgruppe der freien Einzelstrangenden des Vektors entfernt [149]. Denn ohne die 5'-Phosphatgruppe der Einzelstrangenden ist es der DNA-Ligase nicht möglich, die freien Enden des Vektors miteinander zu ligieren.

Für die 5'-Dephosphorylierung eines Vektors wurden zu den 50 µl eines hitzeinaktivierten Restriktionsansatzes (siehe Abschnitt 2.2.4) 5,7 µl 10x SAP Reaktionspuffer sowie 2 µl SAP hinzugefügt. Der enzymatische Abbau der 5'-Phosphatgruppen erfolgte bei einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C. Um SAP abschließend zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz weitere 15 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert.

### 2.2.10 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Um die Ligation (siehe Abschnitt 2.2.11) von synthetisierten und hybridisierten Oligonukleotiden in einen linearisierten Vektor zu ermöglichen, müssen die 5'-Enden des Inserts phosphoryliert werden. Dies ist essentiell, damit es der T4-DNA-Ligase ermöglicht wird, kovalente Bindungen zwischen Vektor-Rückgrat und -Insert herzustellen (siehe Abbildung 2.4). Die enzymatisch katalysierte Reaktion der Addition der 5'-Phosphorylierung wird durch die T4 Polynukleotid-Kinase (PNK) durchgeführt. PNK überträgt das  $\gamma$ -Phosphat des ATP auf ein 5'-Hydroxylende des Inserts [150]. Durchgeführt wurde die Reaktion in ATP-haltigem Kinasepuffer für 30 min bei 37 °C. Um das Enzym zu inaktivieren und damit die Reaktion abzustoppen, wurde das Reaktionsgemisch für 15 min auf 75 °C im Heizblock erhitzt.

#### Phosphorylierungsansatz

<b>ATP</b>	20 pmol
<b>Oligonukleotid</b>	20 pmol
<b>10x PNK Reaktionspuffer A</b>	2 $\mu$ l
<b>T4 Polynukleotid-Kinase</b>	1 $\mu$ l
<b>A. bidest</b>	ad 20 $\mu$ l

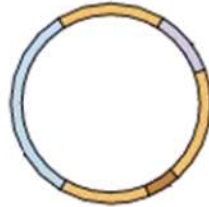
### 2.2.11 Ligation

Eine Ligation ist die enzymatische Verknüpfung zweier DNA-Fragmente. Hierbei katalysiert das Enzym T4-DNA-Ligase die Verknüpfung eines 5'-Phosphat-Endes der DNA mit einem freien 3'-Hydroxylende [151]. In dieser Doktorarbeit wurden hauptsächlich linearisierte dephosphorylierte Plasmid-Rückgrate mit PCR-Produkten oder subklonierten Inserts ligiert, wie es in Abbildung 2.4 dargestellt ist. Wichtig ist, dass der Vektor wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben 5'-dephosphoryliert wurde und die Insertionen, wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben, 5'-phosphoryliert wurden. Dies ist essentiell, damit die DNA-Ligase nur Plasmide mit Inserts verbindet und keine Insert-Insert- oder Plasmid-Plasmid-Ligationen auftreten. Die Ligation wurde entweder für 3 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 16 °C mit ATP-haltigem Ligasepuffer durchgeführt. Neben dem eigentlichen Ligationsansatz, der sowohl den dephosphorylierten Vektor als auch das zu ligierende phosphorylierte Fragment enthält, wurde zusätzlich eine Kontrolle angesetzt. Dieser Ansatz enthält nur den Vektor ohne Insert. Da die dephosphorylierten Enden des Vektors sich eigentlich nicht miteinander ligieren lassen sollten, dient dieser Ansatz als Negativkontrolle. Bei der an die Ligation angeschlossenen Transformation (siehe Abschnitt 2.2.2) sollten sich wenige Kolonien bilden, da hier nur die linearisierte DNA von den Bakterien aufgenommen werden konnte. Linearisierte DNA wird nur schlecht an Tochterzellen weitergegeben und ohne das Antibiotikaresistenzgen, welches sich auf dem Vektor befindet, sind die Bakterien auf den speziellen Antibiotika-enthaltenden Agarplatten nicht überlebensfähig. Der Transformationsansatz mit dem vollständigen Ligationsansatz sollte im Gegensatz zur Negativkontrolle



eine große Anzahl an Kolonien aufweisen, da die Bakterien bei der Transformation zirkuläre DNA aufgenommen haben, welche gut an Tochterzellen weitergegeben werden kann.

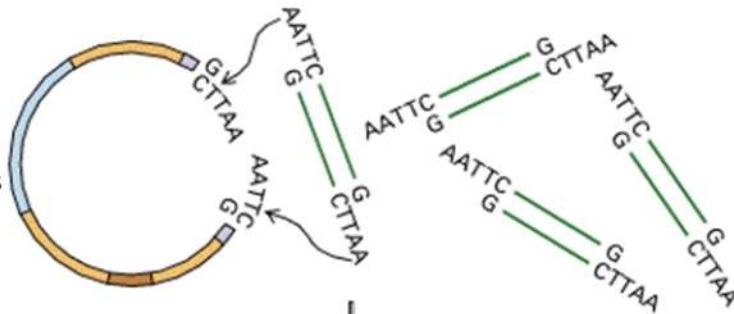
Ausgangs-Plasmid:



Restriktionsverdau  
+ 5'-Dephosphorylierung  
der freien Einzelstrangenden



Zugabe des vorverdauten  
und phosphorylierten Inserts



Ligation:  
Das enzymatische Verknüpfen zweier DNA-Fragmente



Rekombinant erstellter Vektor  
bestehend aus Ausgangs-Plasmid und Insert

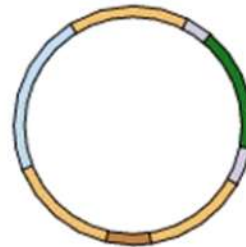


Abbildung 2.4: **Ligation.** Für die Klonierung eines neuen Vektors wird ein Ausgangsvektor einem Restriktionsverdau mit anschließender Dephosphorylierung seiner 5'- Enden unterzogen. Zu ihm werden vorverdaut 5'-phosphorylierte Inserts gegeben. Nun kann das Enzym T4-DNA-Ligase die Verknüpfung eines 5'-Phosphat-Endes der DNA mit einem freien 3'-Hydroxylende katalysieren, was zur Verbindung des linearisierten Ausgangsplasmids mit dem Insert führt.

Die Abbildung wurde modifiziert aus: Harvey F. Lodish. *Molecular cell biology*. W.H. Freeman, New York, 4 edition, 2000. [152]

### Ligationsansatz

<b>10x Ligasepuffer</b>	5 $\mu$ l
<b>Insert</b>	10-20x molare Menge des Vektors
<b>T4-DNA-Ligase</b>	1 $\mu$ l
<b>Vektor</b>	75 ng
<b>A. bidest</b>	ad 20 $\mu$ l

### Negativ-Kontrollansatz

<b>10x Ligasepuffer</b>	5 $\mu$ l
<b>T4-DNA-Ligase</b>	1 $\mu$ l
<b>Vektor</b>	75 ng
<b>A. bidest</b>	ad 20 $\mu$ l

## 2.2.12 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Einzelstrang-Oligonukleotide sind in der Lage zu hybridisieren, wenn sie komplementäre Sequenzen aufweisen. Bei der Hybridisierung bilden die Basen Adenin und Thymin des komplementären Stranges Wasserstoffbrückenbindungen aus. Genauso bilden sich auch Verbindungen zwischen den Basen Guanin und Cytosin beider Stränge aus.

Eine Inkubation bei 75 °C für 15 min trennt teilweise hybridisierte Oligonukleotide voneinander, was dazu führte, dass nur noch Einzelstrang-Sequenzen im Reaktionsgefäß vorlagen. Daraufhin wurde die Temperatur langsam von 75 °C über einen Zeitraum von 30 min reduziert. Dies sorgte dafür, dass sich bei den höheren Temperaturen nur komplementäre Sequenzen aneinanderlagern und Doppelstränge ausbilden konnten. Nur bei komplementären Sequenzen können sich so viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Einzelsträngen ausbilden, da sie auch bei höheren Temperaturen in der Lage sind, einen Doppelstrang zu bilden.

### Hybridisierungsansatz

<b>Oligonukleotid A</b>	5 $\mu$ l des entsprechenden Phosphorylierungsansatzes (siehe 2.2.10)
<b>Oligonukleotid B</b>	5 $\mu$ l des entsprechenden Phosphorylierungsansatzes (siehe 2.2.10)
<b>10x NEB Puffer 2</b>	4 $\mu$ l
<b>A. bidest</b>	ad 40 $\mu$ l

## 2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur Vervielfältigung einer spezifischen Ziel-DNA-Sequenz. Der schematische Ablauf der PCR ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Im ersten Schritt wird die gesamte DNA der Probe bei 95 °C denaturiert. Dies hat zur

Folge, dass die DNA nur noch in Einzelsträngen vorliegt. Die freien Einzelstränge der Ziel-DNA sind so zugänglich für die spezifischen Primerpaare. Dabei handelt es sich um zwei DNA-Oligonukleotidsequenzen, welche komplementär zu einer Sequenz auf jeweils einem Strang an den entgegengesetzten Enden der anzureichernden Ziel-DNA-Sequenz sind. Folglich flankieren die Primerpaare die Ziel-DNA-Sequenz. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur reduziert, damit den Primern ermöglicht wird, an die Flanken der Ziel-DNA-Sequenz zu hybridisieren (*Annealing*). Die Primer hybridisieren für 30 sec bei 50-68 °C an die komplementären Einzelstränge. Die optimale Hybridisierungstemperatur hängt von der Sequenzlänge der Primer sowie ihrem GC-Gehalt ab. Je höher der GC-Anteil, desto mehr Basenbindungen mit drei Wasserstoffbrückenbindungen können gebildet werden und desto höher ist die Hybridisierungstemperatur. Sobald die Primer erfolgreich an die DNA-Einzelstränge gebunden haben, bilden sie den doppelsträngigen Startpunkt für die Phusion-DNA-Polymerase. Bei der DNA-Polymerase handelt es sich um ein Enzym, welches in der Lage ist, den DNA-Einzelstrang, an dem die Primer hybridisiert sind, als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges zu nutzen. Dieser Prozess wird Elongation genannt und wird bei 72 °C für 60-120 sec durchgeführt. Die Dauer der Elongation hängt von der Sequenzlänge ab. Je länger das zu synthetisierende PCR-Produkt ist, desto mehr Zeit benötigt die DNA-Polymerase, um das Produkt zu synthetisieren. Nach Abschluss der Elongation liegen wieder vervielfältigte doppelsträngige DNA-Sequenzen vor, die mit der Ziel-DNA-Sequenz übereinstimmen. Nun kann ein weiterer Zyklus der PCR mit dem Denaturierungsprozess beginnen. Durch jeden Zyklus, bestehend aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation wird die Ziel-DNA jeweils exponentiell vervielfältigt.

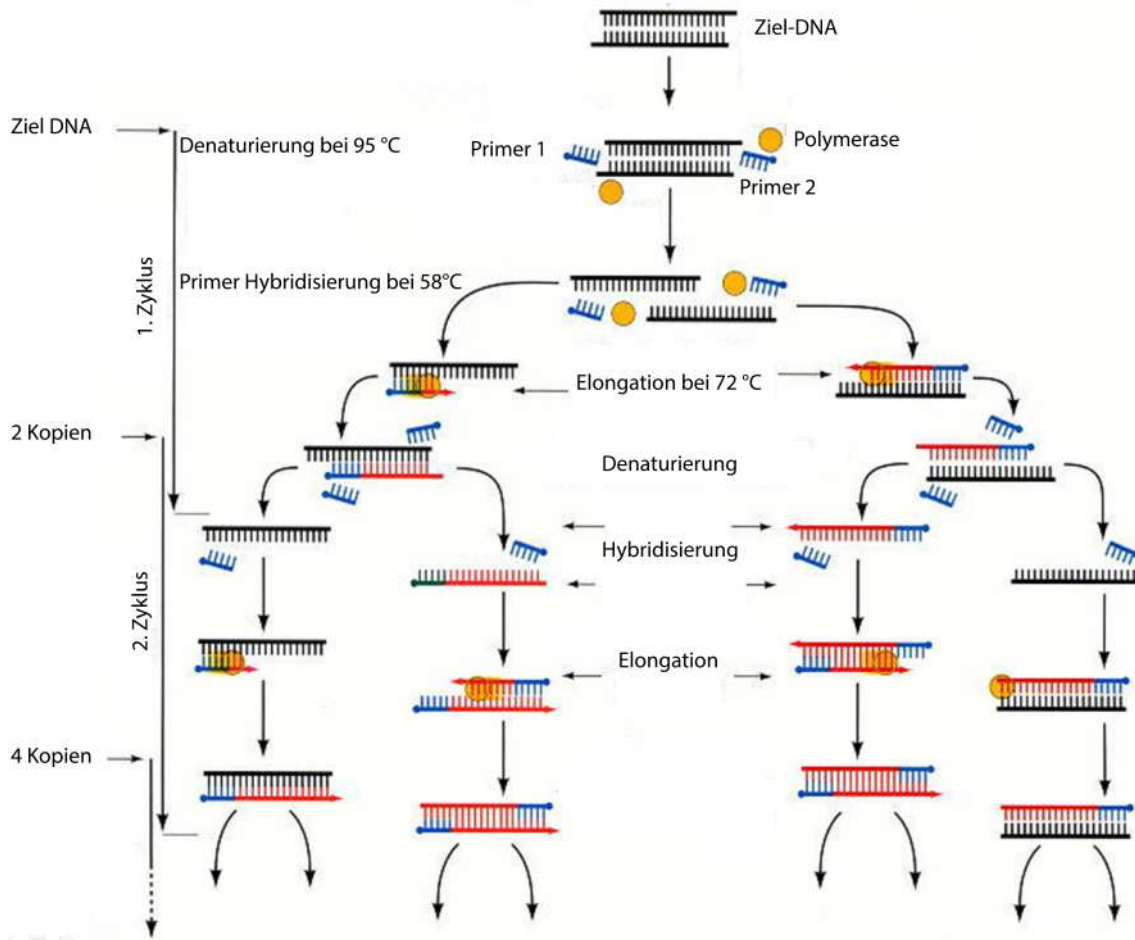


Abbildung 2.5: **Polymerasekettenreaktion (PCR)**. Dargestellt sind die ersten Schritte der Polymerasekettenreaktion, welche zur Vervielfältigung von DNA genutzt wird. Jeder Zyklus der PCR besteht aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Die Denaturierung doppelsträngiger DNA führt zur Bildung einzelsträngiger DNA, an die sich Primer der komplementären Sequenzen anlagern können (*Annealing*). Die Primer bilden mit dem Einzelstrang der Ziel-DNA den doppelsträngigen Startpunkt für die Elongation, bei der die DNA-Polymerase den Einzelstrang anhand der Matrize auffüllt. Nach jedem abgeschlossenen Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Ziel-DNA-Kopien, welche wiederum als Matrize für den nächsten Zyklus genutzt werden können. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl an PCR-Produkten exponentiell ansteigt.

Die Abbildung wurde modifiziert aus: Scott F. Gilbert. *Developmental biology*. Sinauer Associates and NCBI, Sunderland, Mass, Bethesda, MD, 6 edition, 2000 [153]

### PCR-Ansatz

<b>Matrizen-DNA</b>	100 ng
<b>Primer 1 [10 pmol/µl]</b>	1 µl
<b>Primer 2 [10 pmol/µl]</b>	1 µl
<b>HF Puffer</b>	10 µl
<b>dNTP-Mix [10 mM]</b>	2 µl
<b>Phusion Polymerase</b>	0,5 µl
<b>A. bidest</b>	ad 50 µl

**PCR-Programm für Reaktionen mit der Phusion Polymerase**

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
<b>Vordenaturierung</b>	98 °C	2 min	1
<b>Denaturierung</b>	95 °C	30 sec	
<b>Annealing</b>	50-68 °C	45 sec	30-35
<b>Elongation</b>	72 °C	0.5-2 min	
<b>Endsynthese</b>	72 °C	10 min	1
<b>Lagerung</b>	4 °C	∞	

**2.2.14 Fällung von PCR-Produkten**

Bevor ein PCR-Produkt für die weiteren Klonierungsschritte verwendet werden kann, muss es von der DNA-Polymerase, den Primern und übrigen Nukleotiden aus dem PCR-Reaktionsgemisch abgetrennt werden. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit A. bidest auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und anschließend mit 300 µl Phenol-Chloroform (1:1) versetzt, um Proteine abzutrennen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation konnte die obere DNA-haltige Phase abgenommen und durch Zugabe von 40 µl Lithiumchlorid, 1 µl Glykogen und 1 ml Ethanol (96 % v/v) gefällt werden. Es folgten zwei Waschschrte mit 1 ml Ethanol (70 % v/v), bei der die DNA jeweils für 12 min mit 11.400 x g bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Um das DNA-Pellet zu trocknen, wurde es bei 37 °C für 10-30 min inkubiert. Abschließend wurde es in 40 µl A. bidest aufgenommen und für weitere Klonierungsschritte verwendet oder bei -20 °C gelagert.

**2.2.15 RNA-Isolierung**

Um die Expression von Genen auf der mRNA-Ebene zu analysieren, muss die RNA aus den Zellen isoliert und von DNA sowie Proteinen abgetrennt werden. Im ersten Schritt wurden daher  $1-5 \cdot 10^6$  Zellen in 500 µl Trizol aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Nachdem die Proben aufgetaut waren, konnte 100 µl Chloroform zugefügt werden, um die Proteine der Proben abzutrennen. Die Proben mussten 15 sec gevortext und anschließend für 3 min bei RT inkubiert werden. Nachdem sie mit 18.407 x g für 15 min bei RT abzentrifugiert wurden, konnte die obere RNA- und DNA-haltige Phase abgenommen werden. Anschließend wurden zu den Proben weitere 0,25 ml Isopropanol hinzugefügt. Bevor sie für 10 min bei RT inkubierten, wurden die Proben zum Vermengen der Substanzen noch geschüttelt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 18.407 x g für 10 min bei RT, um die Nukleinsäuren zu pelletieren. Für die nächsten zwei Waschschrte wurde zu den Proben jeweils 1 ml Ethanol (70 % v/v) gegeben und anschließend mit 18.407 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet konnte nun für 10-20 min an der Luft getrocknet und daraufhin in 20 µl reinem Wasser (Sigma) aufgenommen werden. Um die Nukleinsäuren zu lösen, wurden die Proben bei 55 °C im

Heizblock für 30 min inkubiert. Bevor die Proben für eine cDNA-Synthese (siehe Abschnitt 2.2.16) weiterverwendet werden konnten, musste die restliche DNA in den Proben wie in Abschnitt 2.2.15.1 beschrieben verdaut werden.

### 2.2.15.1 DNA-Verdau

Bei der Isolierung von RNA reinigt man neben der gewünschten RNA auch noch genomische DNA auf, welche durch das Enzym DNaseI spezifisch abgebaut werden kann. Dazu wurden zu den 20 µl 2,2 µl DNase-Puffer gegeben sowie 0,5 µl des Enzyms. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 37 °C inkubiert, was dem Temperaturoptimum der DNase entspricht. Um den Verdau zu beenden, wurde die DNase durch 10-minütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert.

### 2.2.16 cDNA-Synthese

Um isolierte RNA für qPCR-Analysen verwenden zu können, muss sie erst in DNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Umgeschrieben wurden 750 ng RNA, welche in 7,5 µl RNase freiem Wasser gelöst wurden. Hierzu wurden 0,8 µl dNTP-Mix, 2 µl Puffer, 2 µl *random Primers*, 7,5 µl RNase freies Wasser und 1 µl der reversen Transkriptase gegeben. Die cDNA-Synthese wurde anschließend nach dem unten abgebildeten Programm durchgeführt.

	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
<b>Schritt 1</b>	10 min	25 °C
<b>Schritt 2</b>	120 min	37 °C
<b>Schritt 3</b>	5 min	85 °C
<b>Schritt 4</b>	∞	4 °C

### 2.2.17 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die *quantitative Real-Time PCR* (qPCR) wird zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene verwendet. Für diese Doktorarbeit wurde die *SYBR Green*- und die *TaqMan-Sonden*-Variante der qPCR verwendet. Das Funktionsprinzip beider Methoden ist in Abbildung 2.6 abgebildet. Die Zusammensetzung der PCR-Mastermixe und die Programme für die qPCR ist in den nachfolgenden Tabellen abgebildet. Für die Auswertung beider Methoden wurde das Programm iQ5 2.0 Standard Edition von Biorad verwendet.

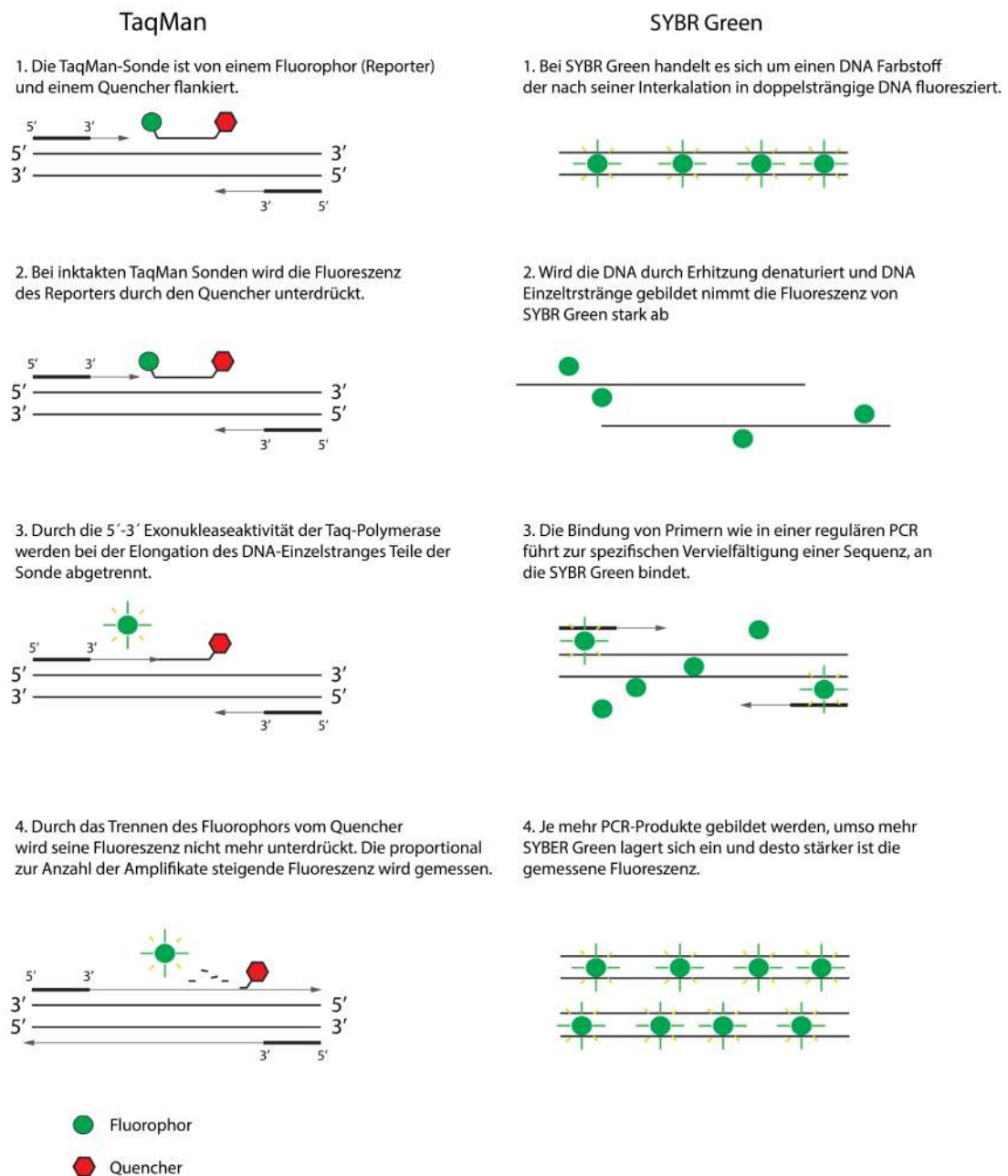


Abbildung 2.6: **qPCR Methoden (TaqMan und SYBR Green)**. Dargestellt ist das Funktionsprinzip der Quantifizierung von Genexpressionen anhand der TaqMan bzw. SYBR Green qPCR Methoden. Die Abbildung wurde übernommen aus: Karin Schneider, *Untersuchungen der molekularen Funktion des Stammzellfaktors Trim71 in der Karzinogese*, 2014 Bonn [154].

### TaqMan qPCR Mastermix

iTaq universal probes supermix (2x)	10 µl
TaqMan Sonde	1 µl
DNA Vorlage	1 µl
A. bidest	8 µl

### TaqMan qPCR Programm

Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
2 min	50 °C	1
10 min	95 °C	1
15 s	95 °C	40
1 min	60 °C	Real-Time

### SYBR Green qPCR Mastermix

iTaq universal SYBR Green supermix (2x)	10 µl
Primer [10 pmol/µl]	0,6 µl pro primer
DNA Vorlage	1 µl
A. bidest	7,8 µl

### SYBR Green qPCR Programm

Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
3 min	95 °C	1
15 s	95 °C	40
30 s	55 °C	
30 s	72 °C	
30 s	55-95 °C	Schmelzkurve

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Lymphozyten-Isolation aus der Maus

Durch zerebrale Dislokation wurde die Maus getötet. Zur Isolation von Maussplenozyten wurden die Milz sowie die inguinalen, axillären und zervikalen Lymphknoten der Maus herauspräpariert und in PBS auf Eis gelagert. Damit die Sterilität der Lymphozyten garantiert werden kann, wurden die folgenden Schritte des Protokolls unter der Sterilbank durchgeführt. Um eine Einzelzellsuspension der Milz sowie der Lymphknoten zu erhalten, wurden sie durch ein Nylonsieb mit 40 µm<sup>2</sup> Porengröße mit dem Stempel einer Spritze gedrückt. Das Sieb sowie der Stempel wurden danach gründlich mit 50 ml PBS abgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 300 x g bei 4 °C für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde das Pellet in 1 ml RBC Lysepuffer je Milz aufgenommen und 1 min bei RT unter kontinuierlichem Invertieren inkubiert. Der Puffer induziert einen starken osmotischen Druck, dem hauptsächlich Erythrozyten nicht standhalten können. Das eindringende Wasser bringt die Erythrozyten zum Platzen, während die restlichen Lymphozyten dem Druck standhalten können. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Falcon auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 300 x g bei 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml PBS aufgenommen und erneut durch ein Nylonsieb mit 40 µm<sup>2</sup>Porengröße filtriert. Dies sorgt



dafür, dass der Erythrozyten-Zelldebris abgetrennt werden kann.

### **RBC Lysepuffer**

---

155 mM Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  
10 mM Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )  
0,1 mM EDTA  
A. bidest

### **2.3.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Leukozytenpräparat**

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Bestandteilen des Leukozytenpräparats (*Buffy coat*) abgetrennt. Zur Trennung wurde Pancol, ein hydrophiles Polymer der Sucrose (400.000 Da) verwendet. Während der Dichtegradientenzentrifugation sedimentieren die Bestandteile des Blutes entsprechend ihrer Dichte durch das Pancol (siehe Abbildung 2.7). Je höher die Dichte der entsprechenden Zellpopulation ist, desto schneller sedimentieren sie. D.h. nach einer erfolgreichen Dichtegradientenzentrifugation befanden sich Erythrozyten sowie Granulozyten, welche die größte Dichte aller Zellarten im Leukozytenpräparat aufweisen, am Boden des Falcons. Darüber befand sich eine Schicht aus Pancol. An diese schloss sich eine Schicht aus Lymphozyten und Monozyten an (PBMCs). Oberhalb der PBMC-haltigen Interphase befand sich eine Phase, welche die flüssigen Bestandteile des Blutes (Plasma) und die Thrombozyten enthielt, da diese die geringste Dichte im Lymphozytenkonzentrat aufwiesen.

Zu Beginn wird das Leukozytenpräparat 1:1 mit PBS/2 mM EDTA versetzt. Der im Puffer enthaltene Chelatbildner EDTA dient der Komplexbildung von Calciumionen, was die Gerinnung des Blutes unterbindet. Im nächsten Schritt wurden jeweils 34 ml des Gemisches zur Überschichtung von 16 ml Pancol in einem 50 ml Reaktionsgefäß verwendet. Die folgende Dichtegradientenzentrifugation wurde für 30 min bei 800 g durchgeführt. Hierbei war zu beachten, dass die Zentrifugation ohne abschließenden Bremsvorgang durchgeführt wurde, da dieser den gebildeten Gradienten wieder zerstören würde. Anschließend wurde die PBMC-haltige Interphase entnommen und mehrfach mit 50 ml PBS/2 mM EDTA gewaschen. Bei diesen Waschvorgängen wurde die Kraft, mit der die Proben zentrifugiert wurden, bei jedem Schritt von 640 x g auf 500 x g zu 400 x g und abschließend 300 x g reduziert. Jeder einzelne Zentrifugationsschritt wurde für 7 min bei RT durchgeführt. Nach erfolgreichem Waschen konnten die Zellen mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml in VLE RPMI +/- aufgenommen und kultiviert werden. Alternativ wurde mit den Zellen ein MACS-Prozess (siehe Abschnitt 2.3.3) durchgeführt, um  $\text{CD8}^+$  oder  $\text{CD4}^+$  T-Zellen zu isolieren.

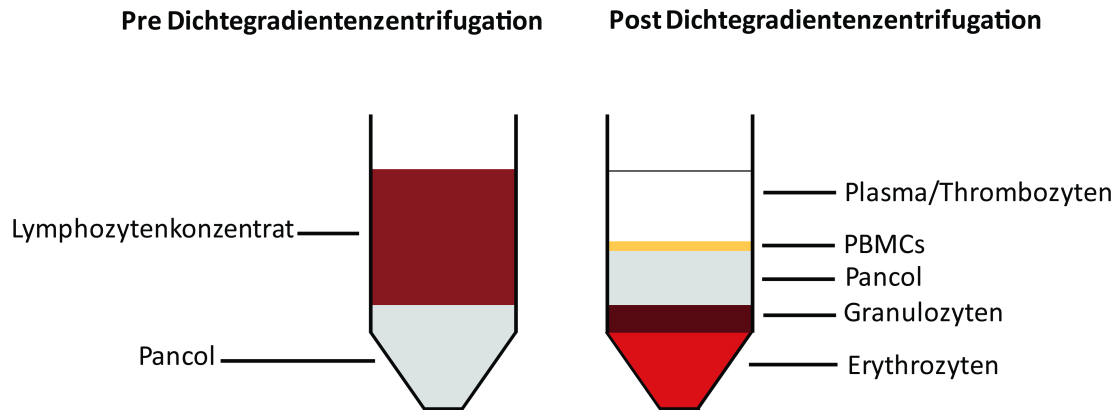


Abbildung 2.7: **Dichtegradientenzentrifugation des Leukozytenpräparat.** Dargestellt ist die Auftrennung der Bestandteile eines Lymphozytenkonzentrats nach einer Dichtegradientenzentrifugation. Zelltypen mit einer hohen Dichte wie Erythrozyten und Granulozyten befinden sich am Boden des Reaktionsgefäßes. PBMC-enhaltene Zellpopulationen mittlerer Dichte befinden sich in der Interphase. Die oberste Phase enthält das Plasma und Thrombozyten.

### 2.3.3 Magnetic-activated cell sorting (MACS)

Das MACSen ist eine effiziente Methode, um aus einer großen Zellpopulation eine spezifische Subpopulation zu isolieren. Das Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, dass Zellen von einer Population abgetrennt werden, weil sie von magnetischen *Beads* gebunden werden, die in einem Magnetfeld zurückgehalten werden. Man unterscheidet zwei Varianten des MACSens, die positive MACS-Selektion, wie sie in Abbildung 2.8 A-C dargestellt ist, und die negative MACS-Selektion, welche in Abbildung 2.8 D-F abgebildet ist. Bei der positiven Selektion werden die zu isolierenden Zielzellen über die *Beads* und Antikörper gebunden und in der Säule zurückgehalten. Alle anderen Zellen sind in der Lage, durch die Säule zu fließen. Die negative Selektion funktioniert genau umgekehrt. Das heißt, es werden alle Zellen bis auf die Zielzellen über *Beads* gebunden und retraktiert. So können die Zielzellen als einzige Population durch die Säule fließen. Im Allgemeinen ist die negative Selektion der schonendere Prozess für die Zielzellen, weil sie bei dieser Methode nicht mit den *Beads* interagieren müssen. Für die vorliegende Arbeit wurde das MACSen hauptsächlich verwendet, um  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zu isolieren. Als Ausgangsmaterial wurden hierbei entweder Splenozyten der Maus (siehe Abschnitt 2.3.1) oder humane PBMCs verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2). Für das MACSen der T-Zellen wurden folgende Kits der Firma Miltenyi verwendet: *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (mouse + human)* und *CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (mouse + human)*. Im Folgenden ist beispielhaft das Protokoll für die negative Selektion von murinen  $CD4^+$  T-Zellen dargestellt. Variationen des Protokolls für die Isolation eines anderen Zelltyps sind der Anleitung des entsprechenden Kits zu entnehmen.

Im ersten Schritt wurden die Zellen in 40  $\mu\text{l}$  pro  $10^7$  Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und 10  $\mu\text{l}$  des Biotin-Antibody Cocktails hinzugegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C inkubiert, damit die Antikörper ihre spezifischen Zellen binden konnten. Anschließend wurden weitere 30  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben. Nun

wurden 20  $\mu$ l anti-Biotin *Microbeads* hinzugegeben und die Zellen für 10 min bei 4 °C inkubiert, damit auch die *Beads* an die Biotin-gekoppelten Antikörper binden konnten. Zum Abschluss des Markierungsprozesses wurden die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert und in 200  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Die Zielzellen wurden von den durch *Beads* gebundenen Zellen durch magnetische Separation im autoMACS Separator unter Verwendung des “*Depletes*” Protokolls abgetrennt. Nach erfolgreicher Isolation wurden die T-Zellen einmal in 10 ml PBS gewaschen und bei 300 x g für 10 min abzentrifugiert. Abschließend wurden die T-Zellen in 1 ml VLE RPMI+/+ pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen aufgenommen und bei 37 °C im Brutschrank für 1 h inkubiert, bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden.

### **MACS-Puffer**

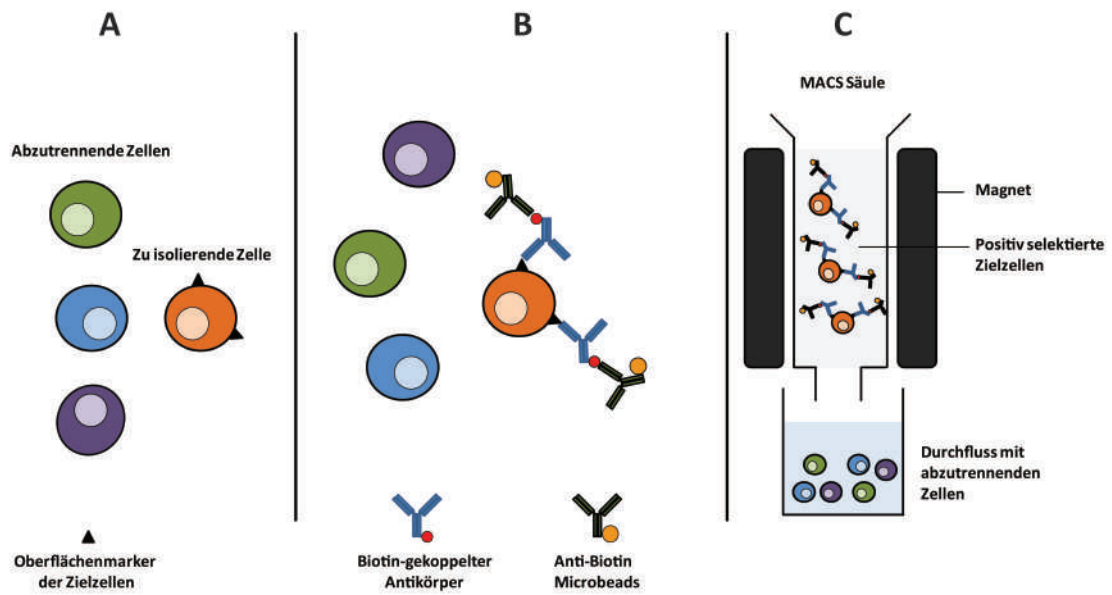
---

BSA 0,5 %

EDTA 2 mM

in PBS

**Positive MACS Selektion:**



**Negative MACS Selektion:**

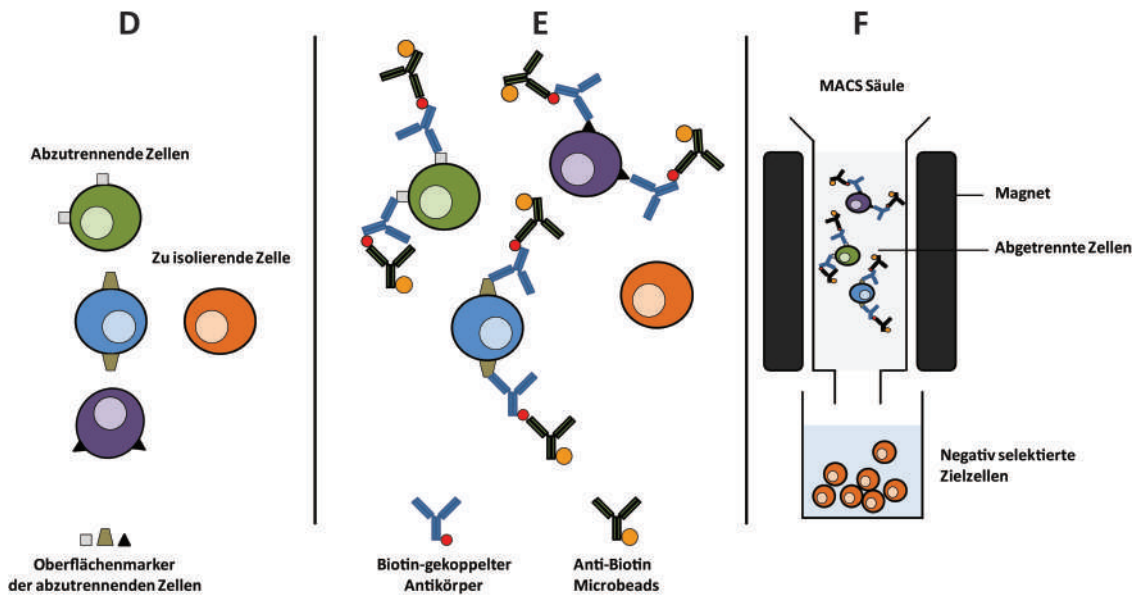


Abbildung 2.8: **Magnetic-activated cell sorting (MACS)**. Dargestellt ist das Funktionsprinzip der positiven (**A-C**) und negativen (**D-F**) MACS-Selektion. Bei der positiven MACS-Selektion wird aus einer großen heterogenen Zellpopulation (**A**) die aufzureinigende Zielzellpopulation durch Biotin-gekoppelte Antikörper gebunden (**B**). An diese binden wiederum magnetische *Microbeads*, welche mit Antibiotin-Antikörpern beschichtet sind (**B**). (**C**) Die so markierten Zielzellen können anschließend in einer magnetischen Säule zurückgehalten werden, um sie so von den restlichen Zellen der Ausgangspopulation abzutrennen. Bei der negativen MACS-Selektion werden aus der heterogenen Zellpopulation (**D**) alle Zellen bis auf die Zielzellen spezifisch durch Biotin-gekoppelte Antikörper und Antibiotin-Antikörper beschichtete *Microbeads* markiert (**E**). (**F**) Dies erlaubt, dass nur die Zielzellen ungehindert durch die magnetische Säule wandern können und so von dem Rest der Ausgangspopulation abgetrennt werden können.

### 2.3.4 Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs)

Durch zerebrale Dislokation wurde die Maus getötet. Es wurden die Hinterbeine der Maus herauspräpariert. Dazu wurde das Fell mit 70 % Ethanol desinfiziert und vorsichtig zusammen mit der Haut und den Muskeln entfernt. Die freien Ober- und Unterschenkelknochen wurden daraufhin in PBS auf Eis gelagert. Damit die Sterilität der Zellen garantiert werden kann, wurden die folgenden Schritte des Protokolls unter der Sterilbank durchgeführt. Bevor die Knochen weiterverarbeitet werden konnten, wurden sie in 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Knochenenden mit einer Knochenschere aufgeschnitten, so dass der Knochen mit PBS durchgespült werden konnte. Hierzu wurde eine Spritze mit einer 27G-Kanüle verwendet. Die herausgespülten Zellen wurden resuspendiert, durch ein Nylonsieb mit 40  $\mu\text{m}^2$  Porengröße filtriert und anschließend mit 280 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Es folgte das Ausplattieren von  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml VLE-RPMI +/+, welchem 10 ng/ml rGM-CSF zugesetzt wurde, in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm Agarplatten für Bakterien). Um die Zellen zu versorgen, wurde an Tag 2 oder 3 der Kultivierung 5 ml frisches Medium hinzugegeben. An Tag 5 oder 6 wurde ein Halbmediumwechsel durchgeführt. Hierbei wird die Hälfte des Mediums abgenommen, mit 280 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und wieder zurück auf die Platte gegeben.

#### 2.3.4.1 Unreife dendritische Zellen

An Tag 6-10 konnten die unreifen dendritischen Zellen, welche am Plattenboden adherieren, geerntet werden. Hierzu mussten zuerst vorgereifte dendritische Zellen, die sich im Überstand befanden, entfernt werden. Um die adherenten unreifen dendritischen Zellen vom Plattenboden abzulösen, wurden sie für 10 min bei 37 °C mit 2 mM EDTA/PBS inkubiert. Der Chelatbildner EDTA komplexiert hierbei zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , welche essentiell für die Integrin-vermittelte Adhesion der Zellen sind [155].

#### 2.3.4.2 Reife dendritische Zellen

An Tag 6-8 wurde ein weiterer Halbmediumswechsel durchgeführt, bei dem alle Zellen aus dem Überstand entfernt wurden. Zusätzlich wurden 200 ng/ml LPS zugesetzt, was den Reifungsprozess in dendritischen Zellen auslöste. LPS ist ein Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien und wird von den dendritischen Zellen aufgenommen, was zu deren Aktivierung führt [156]. 24 h nach der Stimulation mit LPS konnten reife dendritische Zellen aus dem Überstand geerntet werden.

### 2.3.5 Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen mit Calciumphosphat

Um HEK 293T-Zellen zu transfizieren, wurde die DNA (Plasmide) in einer Calciumchloridhaltigen Lösung gelöst und tröpfchenweise zu einer phosphathaltigen Pufferlösung gegeben.

Dies löste die Bildung eines DNA-Calciumphosphat-Niederschlags aus, welcher an die Oberfläche der HEK 293T-Zellen band und über Endozytose aufgenommen wurde [157].

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50 % hatten. Für die Transfektion einer Ø 10 cm Schale wurden 10 µl ( $c=1$  µg/ml) DNA in 30 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  und 260 µl A. bidest gelöst. Anschließend wurde die Lösung gevortext und langsam tröpfchenweise zu 300 µl 2x HBS gegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurde das Gemisch für 30 min bei RT inkubiert, damit sich der DNA-Niederschlag ausbilden konnte. Um die Zellen für die Transfektion vorzubereiten, wurde bei ihnen das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Nun konnte die DNA-Calciumphosphat-Suspension tröpfchenweise zu den Zellen gegeben werden. Es folgte eine Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C im Inkubator, bei der die Zellen die DNA endozytieren. Abschließend wurden die Zellen 2 x mit 10 ml PBS gewaschen, bevor frisches Medium hinzugegeben und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank gehalten wurden.

### **2 x HBS (pH 7,05 mit 0,5 M NaOH einstellen)**

1,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
10 mM Glukose  
50 mM HEPES  
10 mM Kaliumchlorid (KCl)  
274 mM Natriumchlorid (NaCl)

### **2.3.6 Transfektion von Jurkat T-Zellen mit Plasmid-DNA**

Um Proteine in Jurkat T-Zellen überzuexprimieren, wurden sie mit Plasmiden transfiziert, welche die genetischen Informationen für die Expression der entsprechenden Proteine tragen. Transfiziert wurde mittels Elektroporation. Hierbei handelt es sich um eine physikalische Methode, welche mit Hilfe von elektrischen Impulsen die Durchlässigkeit von Membranen für Moleküle wie DNA-Plasmide oder auch siRNA reversibel erhöht [158].

Jurkat T-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf einen Zelltitel von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml gesplittet, um zu garantieren, dass sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion im exponentiellen Wachstum befinden. Pro Transfektion wurden  $1 \cdot 10^7$  Zellen verwendet. Diese wurden mit 50 ml 37 °C warmem PBS gewaschen. Der Zentrifugationsschritt für den Waschprozess wurde bei 300 x g für 7 min bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl Elektroporationsmedium aufgenommen (siehe 2.1.10) und in einer 4 mm Küvette mit 20 µg Plasmid-DNA im *Gene Pulser X Cell* Elektroporator (Biorad) elektroporiert. Die verwendeten Einstellungen des Elektroporators sind der unten abgebildeten Tabelle zu entnehmen. Abschließend wurden die Zellen in 10 ml RMPI +/+ (siehe 2.1.10) aufgenommen und in einer 10 cm Schale bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % relativer Luftfeuchte im Inkubator kultiviert. 24-48h nach der Transfektion wurden die Zellen für Experimente verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die Expression des Zielproteins am höchsten ist.

### Elektroporationseinstellungen

Küvette	Programm	Spannung	Feldstärke	Widerstand
4 mm	Exponentiell	240 V	1500 $\mu\text{F}$	$\infty$

#### 2.3.7 *In vitro* Stimulation/Aktivierung muriner und humaner T-Zellen

Sowohl murine als auch humane T-Zellen können *in vitro* durch anti-CD3/CD28 Antikörper stimuliert werden. Die Bindung der Antikörper an die T-Zellen sorgt für eine Quervernetzung und die Aktivierung der entsprechenden Zielrezeptoren, welche daraufhin eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zur Aktivierung der T-Zellen führt (siehe 1.1.2). Die Interaktion der Antikörper mit T-Zellen ist der *in vitro* Versuch, die Aktivierung der T-Zellen durch APCs zu simulieren. Die Aktivierung von CD3 als Teil des TCR liefert das erforderliche Signal 1, während die Aktivierung des Co-Stimulators CD28 das Signal 2 für eine vollständige T-Zellaktivierung liefert.

Für die Aktivierung muriner T-Zellen wurden anti-CD3/CD28 Antikörper im Verhältnis von 1:10 auf den Boden von Zellkulturplatten immobilisiert oder direkt ins Medium der Zellen gegeben. Für die Immobilisierung der Antikörper wurden 1  $\mu\text{g}$  anti-CD3 Antikörper und 10  $\mu\text{g}$  anti-CD28 Antikörper in 1 ml PBS gelöst. Anschließend wurde der Boden der verwendeten Zellkulturplatte mit der Antikörperlösung beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Löcher der Platte jeweils zweimal mit PBS gewaschen, bevor die murinen T-Zellen in VLE-RPMI+/+ in die Löcher gegeben wurden. Abschließend wurden die T-Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte im Inkubator für bis zu 72 h inkubiert.

Für die Aktivierung humaner T-Zellen wurden magnetische *Beads* verwendet, welche mit anti-CD3 (OKT3, Ortho Biotech), anti-CD28 (bereitgestellt von Dr. C. June und J. Riley) und anti-MHC Klasse I (bereitgestellt durch B. Carreno, Wyeth Research, Cambridge, MA) Antikörpern beschichtet waren. Für die Stimulation wurden die humanen T-Zellen in VLE-RMPI+/+ aufgenommen und *Beads* im Verhältnis von 1:1 bis zu 1:5 hinzugegeben. Ähnlich wie bei den murinen Zellen wurden die humanen T-Zellen mit den *Beads* bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte im Inkubator für bis zu 72 h inkubiert.

#### 2.3.8 Stimulation von OT-I<sup>+</sup> T-Zellen durch OVA-beladene BMDCs

In vielen *in vitro* Experimenten wurden T-Zellen durch  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Antikörper stimuliert, da diese die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen simulieren [159]. Physiologischer ist allerdings die Stimulation von T-Zellen mit echten APCs wie dendritischen Zellen. Da alle T-Zellen mit ihrem TCR unterschiedliche Antigene erkennen, kann man nicht eine komplette Population von wt T-Zellen mit DCs stimulieren, welche nur mit einem Antigen beladen sind. Damit dies möglich wird, wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I positiven Mäusen verwendet. Sie exprimieren zusätzlich zu ihrem endogenen TCR ein Transgen, welches für einen TCR kodiert, der das Hühnerprotein Ovalbumin (OVA) als spezifisches Antigen erkennt [160]. Das heißt, man kann OT-I positive T-Zellen stimulieren,

wenn man sie mit DCs kokultiviert, welche mit OVA beladen wurden. *In vitro* kultivierte dendritische Zellen sind in der Lage, Ovalbumin aus dem Medium über Endozytose aufzunehmen. Intrazellulär wird Ovalbumin prozessiert, bis es schließlich auf der Zelloberfläche auf MHC-Molekülen den OT-I positiven T-Zellen präsentiert wird. Diese sind nun in der Lage, mit ihrem transgenen TCR die OVA/MHC-Komplexe auf der DC-Oberfläche zu erkennen, was eine intrazelluläre Signalkaskade, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, auslöst, die zur Aktivierung der T-Zellen führt.

Für die T-Zell-DC-Kokultur wurden unreife BMDCs, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, generiert. Um die unreifen DCs in 24 Loch-Platten auszusäen, mussten diese erstmal vom Boden ihrer Kulturplatten wie in Abschnitt 2.3.4.1 abgelöst werden, da unreife DCs starke Adhensionen mit dem Plattenboden ausbilden. Anschließend wurden sie 10 min bei 300 x g abzentrifugiert und einmal in PBS gewaschen, bevor sie in VLE-RPMI+/+ mit  $0,65 \cdot 10^6$  Zellen/ml aufgenommen wurden. Daraufhin wurden 300  $\mu$ l der Zellsuspension in jedes Loch der 24 Loch-Platte pipettiert. Damit die DCs auf dem Boden der 24 Loch-Platte adherieren konnten, wurden sie für mindestens 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Beladung der DCs wurden zu jedem Loch 300  $\mu$ l VLE-RPMI+/+ mit 200  $\mu$ g/ml OVA geben. Damit die DCs in Lage waren, das OVA zu endozytieren und intrazellulär weiter zu verarbeiten, so dass sie in der Lage waren, es auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, wurden sie für eine weitere Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Um die OT-I positiven Zellen aus der Maus zu gewinnen, wurden zuerst ihre Lymphozyten, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, isoliert und aus ihnen die CD8<sup>+</sup>T-Zellen über das MACS-Verfahren (siehe Abschnitt 2.3.3) aufgereinigt. Nach dem erfolgreichen MACS wurden die Zellen für 10 min bei 300 x g abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in VLE-RPMI+/+ mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und für 1 h bei 37 °C ruhen gelassen.

Nun konnte der Überstand der DCs abgenommen und 500  $\mu$ l der T-Zellsuspension in jedes Loch gegeben werden. Dies sorgt dafür, dass eine Kokultur mit einem T-Zellen zu DC-Verhältnis von 5:1 erstellt wurde ( $1 \cdot 10^6$  T-Zellen:  $0,2 \cdot 10^6$  DCs). Sollte die Kokultur über mehrere Tage verlaufen, wurde zusätzlich noch 1 ml VLE-RPMI+/+ zu jedem Loch gegeben, um eine ausreichende Nährstoffversorgung für die Zellen zu gewährleisten.

### 2.3.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein Verfahren, welches zur Konzentrationsbestimmung von Cytokinen, wie z.B. IL-2, genutzt wurde, die von Lymphozyten an ihr Medium abgegeben wurden. Er ist ein Antikörper-basierendes Nachweisverfahren, das sich die spezifische Bindung von Antikörpern an Epitope des Cytokins zunutze macht [161].

Für die Detektierung von IL-2 im Überstand von stimulierten T-Zellen wurde das *Mouse IL-2 Ready-SET-Go!* Reaktionssystem von eBiosciences verwendet. Im ersten Schritt des ELISA mussten die Fänger-Antikörper an den Boden einer 96-Loch-Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden werden. Für die Beschichtung einer Mikrotiterplatte wurden 48  $\mu$ l



des Fänger-Antikörpers in 12 ml Beschichtungspuffer verdünnt und 100  $\mu$ l der Fänger-Antikörperlösung in jedes Loch pipettiert. Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt (siehe Abbildung 2.9 A). Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde jedes Loch mit 250  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen der Fänger-Antikörper durch Zugabe von 200  $\mu$ l des 1 x ELISPOT Verdünnungsmittels für 1 h bei RT durchgeführt. Es folgte ein Waschschriff mit 250  $\mu$ l Waschpuffer. Im nächsten Schritt konnten die 100  $\mu$ l der zu analysierenden Mediumüberstände auf die Platten pipettiert werden. Damit eine genaue Konzentrationsbestimmung erfolgen konnte, wurde zusätzlich eine IL-2 Standardreihe auf die Platte pipettiert. Als höchste Konzentration wurde 400 pg/ml IL-2 in 1 x ELISPOT Verdünnungsmittels gewählt, die jeweils schrittweise um die Hälfte mit 1 x ELISPOT Verdünnungsmittel verdünnt wurde. Der Fänger-Antikörper band nun spezifisch für 2 h bei RT an ein Epitop des IL-2, wie in Abbildung 2.9 B dargestellt. Es folgten 5 Waschschriffe mit 250  $\mu$ l Waschpuffer. Nun konnte der Biotin-gekoppelte Detektions-Antikörper zu den Proben gegeben werden. Er erkennt genau wie der Fänger-Antikörper ein Epitop des IL-2. Allerdings unterscheidet sich das erkannte Epitop des Detektions-Antikörpers von dem des Fänger-Antikörpers, da sich die Antikörper sonst bei der Bindung von IL-2 behindern würden (siehe Abbildung 2.9 C). Es wurden 48  $\mu$ l des Detektions-Antikörpers in 12 ml 1 x ELISPOT Verdünnungsmittel verdünnt, von dem jeweils 100  $\mu$ l in jedes Loch gegeben wurden. Durch fünf weitere Waschschriffe wurden wieder ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurde Enzym-gekoppeltes Avidin zu den Proben gegeben. Avidin ist ein Glykoprotein aus Vogeleiern, welches in der Lage ist, das Biotin des Detektions-Antikörpers zu binden [162]. Bei dem gekoppelten Enzym handelt es sich um Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* HRP), welche in der Lage ist, farbloses TMB Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt umzuwandeln (siehe Abbildung 2.9 D) [163]. 48  $\mu$ l Avidin - HRP wurden in 12 ml 1 x ELISPOT Verdünnungsmittel verdünnt, von denen in jedes Loch 100  $\mu$ l pipettiert wurden. Eine 30-minütige Inkubationszeit bei RT erlaubte es dem Avidin, an das Biotin des Detektions-Antikörpers zu binden. Um jegliches ungebundenes Avidin aus den Löchern zu entfernen, wurden sieben Waschschriffe durchgeführt und darauffolgend 100  $\mu$ l TMB Substrat zu den Proben gegeben. Je mehr IL-2 in der Probe war, desto mehr Detektions-Antikörper und Enzym-gekoppeltes Avidin konnten binden, desto mehr Substrat konnte durch die Enzyme umgesetzt werden und desto stärker war der Farbumschlag. Um die Proben auszuwerten, wurde die Absorption der Proben bei 450 nm Wellenlänge in einem Plattenleser eingemessen. Abschließend wurden die Werte von der Messung der Absorption bei 570 nm subtrahiert.

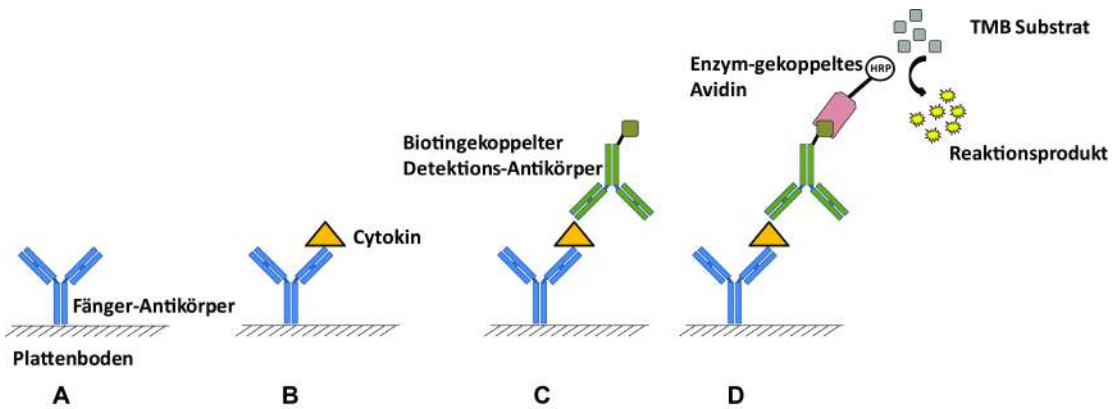


Abbildung 2.9: **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**. Dargestellt ist der schematische Ablauf eines ELISA. (A) Zu Beginn wird der Boden einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem Fänger-Antikörper beschichtet. (B) Die zu analysierenden Proben werden in die Löcher gegeben, was es dem Fänger-Antikörper erlaubt, spezifisch an ein Epitop seines Ziel-Cytokins zu binden. (C) Es folgt die Zugabe des Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörpers, welcher ebenfalls das Cytokin durch die Erkennung eines anderen Epitops bindet. (D) Zu den Proben wird nun Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltes Avidin gegeben, welches das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet. Die HRP ist anschließend in der Lage, das farblose TMB Substrat durch eine enzymatische Reaktion in ein farbiges Reaktionsprodukt umzusetzen.

### 2.3.10 Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA stellt eine elegante Methode dar, mit der es möglich ist, die Konzentration mehrerer Cytokine in einer Probe gleichzeitig zu messen. Der CBA macht sich zunutze, dass die Proben über das FACS eingemessen werden und nicht der Farbumschlag einer enzymatischen Reaktion wie beim ELISA (siehe Abschnitt 2.3.9) eine Rolle spielt. Hierzu wird eine Vielzahl an *Beads* verwendet, die sich in Größe sowie Fluoreszenz unterscheiden. Jede *Bead*-Familie ist mit einem spezifischen Fänger-Antikörper beschichtet, der ein spezifisches Cytokin erkennt (siehe Abbildung 2.10 A). Nachdem die *Beads* die Cytokine in den Proben gebunden haben, wurden PE-konjugierte Detektions-Antikörper hinzugefügt, welche ein Fluoreszenzsignal entsprechend der Menge an gebundenem Cytokin lieferten (Siehe Abbildung 2.10 B-D). Das Fluoreszenzsignal kann gleichzeitig für mehrere Cytokine bzw. *Bead*-Familien am FACS für eine Probe eingemessen werden. So können bei einer geringen Probenmenge wesentlich mehr Daten gesammelt werden im Vergleich zu einem ELISA, der aus derselben Probenmenge nur die Konzentration eines Cytokins bestimmen kann.

Für die Analyse der Cytokinkonzentration in Mediumüberständen von stimulierten T-Zellen wurde das *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit* verwendet. Es dient dazu, die Konzentrationen der T-Zellrelevanten Cytokine IL-2, -4, -6, -10, -17A sowie TNF $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zu bestimmen.

Zu Beginn mussten die zu analysierenden, bei -20 °C gelagerten Überstandsproben sowie die Standards, welche bei -80 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut werden. Die höchste Konzentration des Standards betrug 10.000 pg/ml, welcher 9 mal um die Hälfte mit Verdünnungspuffer verdünnt wurde, um eine Standardreihe zu erstellen. Eine weitere Probe der Standardreihe enthielt nur den Verdünnungspuffer, welcher als Nullwert fungierte. Im nächsten Schritt wurde der Mastermix der *Beads* erstellt. Pro Probe wurden 1,7  $\mu$ l der

einzelnen *Bead*-Suspensionen in den Mastermix gegeben. Anschließend wurden sowohl zu 10 µl der Überstandproben als auch zu 10 µl Standards 10 µl des *Bead*-Mastermixes sowie 10 µl des Detektionsreagenzes gegeben. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 300 x g abzentrifugiert und im Dunkeln für 3 h inkubiert. In dieser Zeit binden sowohl *Beads* als auch Detektions-Antikörper an die Cytokine, wie in Abbildung 2.10 C dargestellt. Es folgte ein Waschschritt mit 1 ml Waschpuffer. Die in 200 µl Waschpuffer resuspendierten Proben konnten anschließend am FACS eingemessen werden.

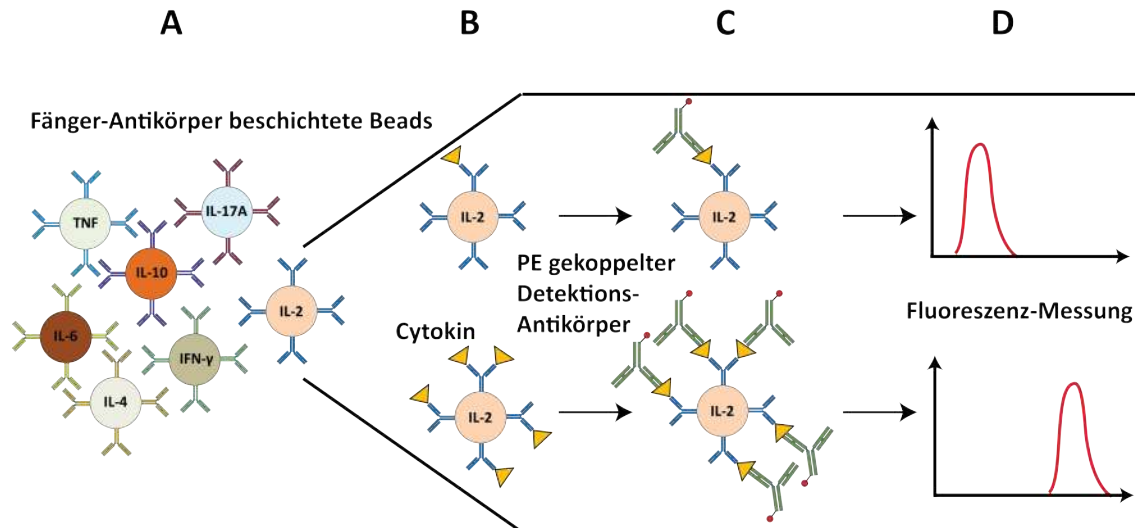


Abbildung 2.10: **Cytometric Bead Array (CBA)**. Dargestellt ist das Funktionsprinzip des CBA. (A) Für ihn werden verschiedene fluoreszierende *Beads* verwendet, welche mit spezifischen Fänger-Antikörpern beschichtet sind. (B) Nach Zugabe der Probe bindet jede *Bead*-Familie sein spezifisches Ziel-Cytokin. (C) Anschließend können PE-gekoppelte Detektions-Antikörper hinzugegeben werden, welche dafür sorgen, dass die *Beads* entsprechend der gebundenen Menge an Cytokin ein starkes oder schwaches PE-Fluoreszenzsignal in der abschließenden FACS-Messung abgeben. (D) Je höher die Konzentration des Ziel-Cytokins in der Probe, desto stärker ist das PE-Fluoreszenzsignal der entsprechenden *Beads*.

### 2.3.11 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) dient dazu, in kurzer Zeit eine große Menge an Zellen nach ihrer Größe, Granularität und Expression markierter Proteine zu analysieren. Um die Expression bestimmter Proteine auf der Oberfläche von einzelnen Zellen zu analysieren, wurden diese mit fluorophorgekoppelten Antikörpern markiert. Will man die Expression intrazellulärer Proteine analysieren, müssen die Zellen vor der Inkubation mit dem fluorophorgekoppelten Antikörper, wie in Abschnitt 2.3.11.1 beschrieben, permeabilisiert werden. Mittels FACS kann auch die Überexpression von Proteinen durch die Transfektion von Plasmiden (siehe 2.3.5 und 2.3.6) nachgewiesen werden, wenn an überexprimierte Proteine ein Fluorophor, wie z.B. eGFP, gekoppelt ist. Zur Analyse der Zellen werden diese durch das Durchflusszytometer eingesaugt und in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt. Die vereinzelt Zellen werden nachfolgend von Laserstrahlen angeregt. Diese werden wiederum durch die einzelnen Zellen abgelenkt, was von umliegenden Detektoren gemessen wird. Die individuelle Streuung des Lichts durch die

einzelnen Zellen gibt Aufschluss über deren Größe und Granularität. Sind die Zellen mit fluorophorgekoppelten Antikörpern markiert, können die Fluorophore mit Laserstrahlen bestimmter Wellenlänge angeregt werden, was zur Emittierung eines Fluoreszenzsignals führt. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge an gebundenem Antikörper, was wieder mit der Expression des markierten Proteins korreliert. Mit Hilfe des Durchflusszytometers ist es auch möglich, bestimmte Zellpopulationen zu sortieren. Hierzu werden die Zielzellen, nachdem sie den Detektor passiert haben, durch einen Vibrator geleitet, der den Flüssigkeitsstrom in kleine Tröpfchen umwandelt (hydrodynamische Fokussierung). Die Tröpfchengröße ist so gering, dass sich meist nur eine einzelne Zelle pro Tropfen befindet. Die Tropfen werden dann an der angeschlossenen Elektrode umgekehrt polarisiert. Dies erlaubt, dass die Tropfen mit den enthaltenen Zielzellen durch ein elektrisches Feld fallen und abgelenkt werden können. Auf diese Art werden die Zielzellen vom Rest abgetrennt. Auf diese Art kann eine Zellpopulation, die ein spezifisches Oberflächenprotein exprimiert, das mit Antikörpern markiert wurde, von Zellen abgetrennt werden, die dieses nicht exprimieren. Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden und ein fluorophorgekoppeltes Protein überexprimieren, von untransfizierten Zellen abzutrennen.

Für eine einfache Färbung der Oberflächenmoleküle einer Zelle wurden  $1 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen durch eine Zentrifugation mit  $300 \times g$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 7 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen, in welches die fluorophorgekoppelten Antikörper nach Herstellerangaben verdünnt wurden. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln für 20 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach der Färbung wurden die Zellen einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und wieder mit  $300 \times g$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 7 min abzentrifugiert. Je nach Zellzahl wurde das Pellet in 100-250  $\mu\text{l}$  kaltem PBS aufgenommen und resuspendiert. Das Einlesen der Proben erfolgte am BD FACS Canto II und die abschließende Analyse der Daten wurde mit den Programmen FACSDiva sowie FlowJo durchgeführt.

### 2.3.11.1 Färbung intrazellulärer Proteine

Mit einer herkömmlichen FACS-Färbung (siehe 2.3.11) ist es nur möglich, Oberflächenmoleküle anzufärben, da diese von außen für die markierenden Antikörper zugänglich sind. Für die Färbung intrazellulärer Proteine ist es nötig, die Zellmembran zu permeabilisieren, damit die Antikörper ins Cytoplasma der Zelle eindringen können.

Um spezifisch eine FACS-Färbung von intrazellulären Proteinen durchzuführen, wurden der Permeabilisierungs- und Fixierungspuffer von Biolegend verwendet. Es wurden  $1 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  der zu färbenden Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Es folgte ein Waschschriff durch die Zugabe von 1 ml kaltem PBS, mit anschließender Zentrifugation mit  $300 \times g$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 7 min. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  *Fixation Buffer* (Biolegend) aufgenommen und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert werden. Die Fixierung der Zellen wurde durch das im Puffer enthaltene Paraformaldehyd

bzw. Formaldehyd verursacht, das die Proteine untereinander quervernetzt. Nach der Fixierung wurden die Zellen wieder mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und bei 300 x g bei 4 °C für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet konnte nun in 50 µl permeabilisierende Färbelösung aufgenommen werden. Sie besteht aus 1x *Permeabilization Wash Buffer* (Biolegend), in dem die Antikörper gegen die Zielproteine 1:50-1:100 verdünnt wurden. Nach einer Inkubation für 20 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen, wie oben beschrieben, ein weiteres Mal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Es folgte der zweite Färbungsschritt mit dem fluorophorgekoppelten sekundären Antikörper, welcher gegen die Fc-Region der primären Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper wurde 1:50 bis 1:100 in 1x *Permeabilization Wash Buffer* (Biolegend) verdünnt und für 20 min mit den Zellen bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend folgte ein weiterer Waschschriff mit 1 ml PBS, bevor die Proben in 100 µl PBS aufgenommen und am BD FACS Canto II eingelesen wurden.

### 2.3.12 Zellzahlbestimmung einer FACS-Probe

Für die Bestimmung der Zellzahl einer FACS Probe wurden zu der Probe 5000 *Countbright absolute counting Beads* gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (Probe)} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Beadanzahl}} \times 5000$$

### 2.3.13 Bestimmung der Überlebensfähigkeit von T-Zellen

Um die Überlebensfähigkeit von T-Zellen zu testen, wurden sie aus der Milz und den Lymphknoten der Mäuse mittels MACS-Verfahren (siehe Abschnitt 2.3.3) isoliert. Anschließend wurden sie in VLE RPMI+/+ Medium für 72 h bei 37 °C kultiviert. Alle 24 h wurde das Verhältnis der lebenden Zellen zu toten Zellen mittels einer Propidiumiodid (PI) FACS-Färbung bestimmt. Bei PI handelt es sich um einen Nukleinsäureinterkalator, der durch perforierte Zellmembranen von toten Zellen dringen kann, jedoch nicht durch funktionsfähige Membranen lebender Zellen. In den toten Zellen interkaliert PI in die DNA und färbt die Zellen so an [164]. Für die PI-Färbung wurden die T-Zellen mit 300 x g bei 4 °C für 7 min pelletiert. Anschließend wurden bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen, dem 10 µl PI zugesetzt worden war. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C konnten die Zellen am FACS eingemessen werden.

Zusätzlich zu den unbehandelten T-Zellen wurden Ansätze verwendet, bei denen die T-Zellen mit den homeostatischen Cytokinen 10 ng/ml IL-7 und IL-15 oder einer Kombination von beiden stimuliert wurden. Es ist bekannt, dass sowohl IL-7 als auch IL-15 eine entscheidende Rolle für die Homeostase der T-Zellen spielen. Beide sind essentiell, um das Überleben der T-Zellen sowie ihre Proliferation zu fördern [165, 166, 167]. Die Stimulation der T-Zellen mit den homeostatischen Cytokinen sollte helfen, festzustellen, ob die Defizienz bestimmter Gene wie Cytohesin-3 oder Arl4d Einfluss auf die Signalwege haben, die das Überleben der T-Zellen sicherstellen.

### 2.3.14 Proliferationsuntersuchung bei T-Zellen mittels CFSE-Färbung

Ziel der Proliferationsuntersuchung mittels CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Färbung ist es, die Teilungsrate von Zellen zu bestimmen. CFSE ist eine unpolare Esterverbindung, die in der Lage ist, in Zellen zu diffundieren. Dort wird CFSE von unspezifischen Esterasen in ein polares Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften umgewandelt. Wenn sich nun eine mit CFSE beladene Zelle teilt, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt. Aufgrund der Verdünnung des Farbstoffes durch die Zellteilung nimmt die Intensität der Fluoreszenz der Tochterzellen im Vergleich zur Mutterzelle ab. Dies kann im FACS gemessen werden (siehe Abschnitt 2.3.11). Je geringer die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellen ist, desto häufiger haben sie sich geteilt [168].

#### 2.3.14.1 Plattenbeschichtung mit Antikörpern

Im Verlauf des Experimentes wurden T-Zellen stimuliert, was deren Proliferation auslöste. Für die Stimulation wurden anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper verwendet. Die Bindung der Antikörper simuliert eine Interaktion der T-Zelle mit einer passenden APC. Die Antikörper binden an die CD3 Proteine des TCR-Komplexes sowie den co-stimulierenden CD28 Rezeptor. Durch das Binden der Antikörper an ihre Zielrezeptoren werden diese quervernetzt, was die intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zur T-Zellaktivierung, wie in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben, führt [169]. Während anti-CD3 das Signal 1 der T-Zelle vermittelt, induziert anti-CD28 das Signal 2, was zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen führt. Für das Proliferationsexperiment wurde mit dem anti-CD3 Antikörper der Boden einer 96-Loch-Platte beschichtet, während der anti-CD28 Antikörper frei zu den Zellen gegeben wurde. Zur Immobilisierung des anti-CD3 Antikörpers wurde dieser mit einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS gelöst und jeweils 50 µl in jedes zu beschichtende Loch gegeben. In Löcher, welche nicht beschichtet wurden, wurde als Kontrolle nur 50 µl PBS gegeben. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.3.14.2 Proliferationsexperiment

Das Experiment wurde mit Splenozyten durchgeführt, die, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, aufgereinigt wurden. Das Splenozyten-enhaltende Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden weitere 10 ml PBS hinzugegeben, welche eine Konzentration von 2 µM CFSE enthielten. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde das CFSE mit den Splenozyten vermischt. Die Beladung der Zellen mit dem Farbstoff fand also bei einer Endkonzentration von 1 µM CFSE für 15 min bei 37 °C statt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 ml VLE RPMI +/+ hinzugegeben und die Zellen anschließend für 10 min bei 350 x g pelletiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 10 ml VLE RPMI +/+. Nun konnten die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in VLE RPMI+/+ aufgenommen werden.

Um die 96-Loch-Platte für die Zellen vorzubereiten, muss von dieser die Antikörperlösung abgesaugt werden, so dass 100 µl ( $1 \cdot 10^5$  Zellen) der Splenozytensuspension pro Loch aus-

plattiert werden können. Zur vollständigen Stimulation der T-Zellen wurden noch 3 µg/ml anti-CD28 hinzugeben. Anschließend wurden die Splenozyten für 4 Tage bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Im Abstand von jeweils 24 h wurde ein Teil der Proben am FACS eingemessen. Hierzu wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zum Waschen 2 ml PBS hinzugegeben. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen mit 300 x g bei 4 °C wurden sie in 50 µl PBS aufgenommen, dem 1:200 anti-CD4-PerCP/Cy5.5 oder 1:200 anti-CD8-PerCP/Cy5.5 hinzugegeben wurde, um die T-Zellsubpopulationen anzufärben. Das Färben der T-Zellen wurde für 20 min bei 4 °C durchgeführt. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 2 ml PBS, bevor die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und am FACS eingelesen wurden. Für die Auswertung der FACS-Daten wurde das Programm FlowJo verwendet. Mit Hilfe von FlowJo wurden die CFSE-Intensitätshistogramme erstellt und der *Division Index* der Zellen bestimmt.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden mindestens  $2 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Diese wurden vor der Lyse einmal mit kaltem PBS gewaschen und nach einer Zentrifugation für 5 min mit 4.000 x g bei 4 °C in 30 µl Igepal-Lysepuffer resuspendiert. Vor jeder Anwendung des Igepal-Lysepuffers wurden die Proteaseinhibitoren Antipain, Aprotinin, Benzamidin, Leupeptin und PMSF wie in der unten abgebildeten Tabelle frisch dem Puffer hinzugefügt. Nach der Aufnahme der Zellen im Puffer fand die eigentliche Lyse für 20 min auf Eis statt. Um die entstandenen unlöslichen Zelltrümmer abzutrennen, wurden die Proben für 15 min bei 11.400 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Während sich die Zelltrümmer im Pellet ansammelten, befanden sich die restlichen Proteine im Überstand, welcher in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert oder direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, verwendet wurde.

Falls die Zelllysate für die Analyse der Phosphorylierung von Signalproteinen wie z.B. Erk oder Akt verwendet wurden, wurde alternativ der Tritonlysepuffer verwendet. Ähnlich wie bei der Verwendung des Igepal-Lysepuffers mussten auch dem Tritonlysepuffer wie unten beschrieben die Proteaseinhibitoren frisch hinzugefügt werden. Es wurden auch mindestens  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 30 µl Tritonpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben allerdings in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nachdem sie für 20 min auf Eis langsam aufgetaut wurden, konnten auch hier die Zelltrümmer durch Abzentrifugieren bei 11.400 x g abgetrennt und der proteinhaltige Überstand für die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 2.4.2) verwendet werden.

<b>Igepal-Lysepuffer</b>	<b>Tritonlysepuffer</b>
10 mM Hepes (pH 7.5)	1 mM EDTA
10 mM KCl	1 mM EGTA
10 mM MgCl	10 mM
	Glycerolphosphat
150 mM NaCl	50 mM Natriumfluorid
1 % (v/v) Igepal	5 mM
	Natriumpyrophosphat
	1 mM Natriumvanadat
	0,27 M Sucrose
	10 mM Tris/HCl (pH 7.5)
	1 % (v/v) Triton X-100

<b>Proteaseinhibitor</b>	<b>Verdünnung</b>
Antipain (2 mg/ml)	1:1000
Aprotinin (20 mg/ml)	1:2000
Benzamidin (1 M)	1:1000
Leupeptin (20 mg/ml)	1:2000
PMSF	1:1000
(gesättigte Lösung in Isopropanol)	

#### 2.4.2 BCA (Bicinchoninsäure)-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA (Bicinchoninsäure)-Tests von Thermo Scientific durchgeführt. Der Test beruht auf der Biuretreaktion, bei der Aminosäurereste von Cystein, Tyrosin sowie Tryptohan  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren. Dieses kann wiederum von der im BCA-Reagenz enthaltenen Bicinchoninsäure gebunden werden, was zur Ausbildung eines violettfarbigen Komplexes führt [170]. Dieser hat ein Absorptionsmaximum von 562 nm. Um die genaue Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen, wird ihre Absorption mit einer Kalibrierungsstandardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentration (0-4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verglichen. Mittels linearer Regression der Extinktionswerte der Standardreihe konnte eine Eichgeradengleichung erstellt werden, die zur Proteinkonzentrationsberechnung der Probenlösungen verwendet wurde.

Um Pipettierfehler zu vermindern, wurden von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden jeweils 3  $\mu\text{l}$  der Standards sowie 3  $\mu\text{l}$  der Probenlösungen in ein Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz (Reagenz A:Reagenz B 50:1) hinzugefügt und die Platte für 10 min bei 65 °C inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 562 nm im Multi-Detektions-Plattenlesegerät (BioTek Instruments) bestimmt und die Proteinkonzentration errechnet.



### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet [171]. Hierbei erfolgt die Auftrennung der Proteine anhand ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Gel entsprechend der Größe der Proteine. Um zu verhindern, dass die Eigenladung der Proteine Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt, wurden die Proteine der Proben mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Es binden 2-3 SDS-Moleküle an jede Aminosäure in einem Protein und aufgrund der negativ geladenen Sulfatgruppen von SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert [172]. Des Weiteren verhindert SDS die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, was zur Denaturierung der Proteine führt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die unpolaren Kohlenwasserstoffketten des SDS die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteine behindert. Um die vollständige Denaturierung der Proteine sicherzustellen, wurden die Proben auch mit Dithiothreitol (DTT) behandelt, welches die Protein-internen Disulfidbrücken spaltet [173]. Sowohl SDS als auch DTT sind Teil des 5x Probenpuffers, mit dem 5-20 µg Protein jeder Probe versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgekocht wurden. Damit es möglich war, das Molekulargewicht der einzelnen Proteine zu bestimmen, wurde zusätzlich zu den Proben der Proteinstandard *Precision All Blue* (BioRad) bekannter Größe (siehe 2.1.12) mit auf das Gel aufgetragen.

Zum Herstellen der Gele wurde eine Gießapparatur der Firma Biorad verwendet. Sie wurde genutzt, um Gele mit einer Dicke von 1 mm zu gießen. Zu Beginn wurde ein Trenngel mit einem 10 %igen Anteil von Acrylamid gegossen, da sich dort Proteine zwischen 20 und 80 kDa am effizientesten auftrennen lassen. Hierbei war zu beachten, dass beim Ansetzen des Gels der Radikalkettenstarter APS sowie der Katalysator TEMED als letztes hinzugegeben wurden, da durch ihre Zugabe die Polymerisation des Gels ausgelöst wird. Nach dem Gießen des Trenngels wurde das Gel mit 2-Propanol bis zu seiner vollständigen Polymerisation überschichtet. Nach dem Abgießen des 2-Propanols wurde an das Trenngel ein 5 %iges Sammelgel angeschlossen, das einen saureren pH als das Trenngel aufwies. Es hat die Funktion, die Proteine beim Eintritt in das Sammelgel zu einer scharfen Bande zu fokussieren. Erst im Trenngel findet die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht statt. Die Elektrophorese wurde in Laemmli-Puffer mit einer Spannung von 80 V durchgeführt. Dies galt, solange sich die Proben im Sammelgel befanden. Sobald die Proben ins Trenngel gewandert waren, wurde die Spannung auf 120 V gesteigert. Nach erfolgreicher SDS-PAGE wurde das Gel für einen anschließenden Western Blot (siehe Abschnitt 2.4.4) verwendet.

**Puffer-Zusammensetzung**

<b>SDS Probenpuffer</b>	<b>1x Laemmli-Laufpuffer</b>
0,28 M Tris-HCl pH 8	25 mM Tris
30 % (m/v) Glycerol	200 mM Glycin
10 % (m/v) SDS	0,1 % (m/v) SDS
60 mM DTT	
0,0012 % (v/v) Bromphenol-Blau	

**Polyacrylamidgel-Zusammensetzung**

	<b>Sammelgel 5 %</b>	<b>Trenngel 10 %</b>
A. bidest	3,4 ml	1,9 ml
30 % (v/v) Acrylamid	830 $\mu$ l	1,7 ml
10 % (v/v) SDS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
1,0 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8	630 $\mu$ l	-
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8	-	1,3 ml
APS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	2 $\mu$ l

**2.4.4 Proteintransfer (Western Blot)**

Das Western Blot-Verfahren dient der Immobilisierung von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Anschließend können sie spezifisch per Immundetektion (siehe Abschnitt 2.4.5) nachgewiesen werden. Für den Transfer der Proteine wurde das Nassblot-Verfahren verwendet [174]. Hierbei wird ein elektrisches Feld angelegt, was das Wandern der sich im Polyacrylamid-Gel befindlichen, SDS-gebundenen und damit negativ geladenen Proteine zur Anode induziert [175]. Dies sorgt dafür, dass die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden.

Zu Beginn wurden sowohl Schwämme, Whatman-Filterpapiere als auch die Nitrozellulose-Membran in kaltem Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde die Western Blot-Kassette zusammengesetzt. Hierzu wurden auf die schwarze Seite der Kassette ein Schwamm, drei Whatman-Filterpapiere, das Gel, die Nitrozellulose-Membran, drei weitere Filterpapiere und ein zweiter Schwamm gelegt. Um zu verhindern, dass sich Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran ausbildeten, wurden sie mit einer 5 ml Pipette herausgestrichen. Die geschlossene Kassette konnte nun zusammen mit einem Kühlakku in die Western Blot-Kammer eingesetzt werden, welche daraufhin mit kaltem Transferpuffer geflutet wurde. Der Transfer der Proteine wurde für 2 h mit 80 V bei 4 °C durchgeführt.

### **1x Transfer-Puffer**

192 mM Glycin

25 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

pH 8,3

### **2.4.5 Immundetektion einzelner Proteine auf Nitrozellulose-Membranen**

Für den Nachweis spezifischer Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran wurde das ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Verfahren der Firma Pierce verwendet (siehe Abbildung 2.11). Hierbei wurde das Protein von Interesse mit einem Antikörper markiert, der ein spezifisches Epitop des Zielproteins erkennt. Im Anschluss wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet. An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welches in der Lage ist, unter alkalischen Bedingungen und der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol zu katalysieren [176]. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde genutzt, um einen Röntgenfilm zu schwärzen. Die Schwärzung des Films erfolgt an der Position, an der sich das Ziel-Protein befindet und die Stärke des Signals korreliert direkt mit der Proteinmenge auf der Membran.

Nach dem erfolgreichem Transfer der Proteine einer SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3) auf die Nitrozellulose-Membran (siehe Abschnitt 2.4.4) wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper blockiert. Dies wurde durch die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C mit 5 % (m/v) Milchpulver oder BSA in TBST (*Tris-buffered saline with Tween20*) unter konstanter Bewegung auf der Wippe erreicht. Die Blockierlösung wurde durch 1-2 Waschschrte mit 10 ml TBST-Puffer von der Membran entfernt. Nun wurde die Membran mit dem primären Antikörper, der in 5 ml TBST-Puffer gemäß Herstellerangaben gelöst wurde, für 2-4 h bei RT oder für 18 h bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Mit 4-6 Waschschrten wurde der Rest der primären Antikörperlösung entfernt. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, der in 10 ml TBST-Puffer mit einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurde. Die Membran wurde mit dem sekundären Antikörper für 1-2 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Es folgten weitere 4-6 Waschschrte mit TBST, um die ungebundenen Reste des sekundären Antikörpers zu entfernen. Nun konnte die Membran mit 1 ml der ECL-Lösung (Lösung A: Lösung B 1:1) betröpfelt werden. Nach 2-minütiger Inkubation wurde die ECL-Lösung abgetupft und die Membran in eine Filmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer konnte daraufhin ein lichtsensitiver Film auf die Membran aufgelegt werden. Der Film wurde für 1-10 min durch die Membran belichtet. Anschließend wurde der Film im *Medical Film Processor SRX-101A* der Firma Konica entwickelt.

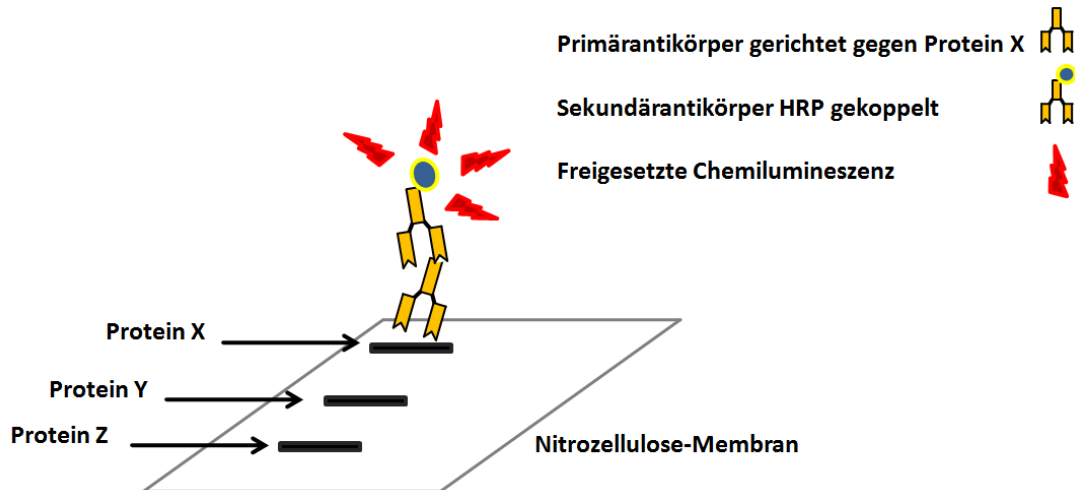


Abbildung 2.11: **Immundetektion.** Die Nitrozellulose-Membran, welche transferierte Proteine einer SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.3) enthält, wird mit Primärantikörpern, die ein spezifisches Epitop des Zielproteins x binden, inkubiert. Die gebundenen Primärantikörper werden wiederum von Sekundärantikörpern gebunden, welche die Fc-Region des Primärantikörpers erkennen. An die Sekundärantikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welches die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, dessen freigesetzte Chemilumineszenz zur Schwarzfärbung lichtsensitiver Filme führt. Die Abbildung wurde entnommen aus: Felix Tolksdorf. *Untersuchungen zur Funktion von Cytohesinen bei der Internalisierung von T-Zell-Rezeptor-Komplexen.* Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Bonn, 2011[177].

#### TBST-Puffer

140 mM NaCl

50 mM Tris pH 7,5

0,05 % (v/v) Tween 20

#### 2.4.6 Blot-Regeneration

Um die Membranen eines Western Blots für weitere Immundetektionen von Proteinen zu verwenden, mussten die primären und sekundären Antikörper von der Membran entfernt werden (*stripping*). Um die spezifische Bindung der Antikörper an ihr Antigen aufzulösen, wurde die Membran in 12 ml *Stripping*-Puffer für 15 min bei 55 °C auf der Heizplatte inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS sorgt, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, für die Denaturierung der Antikörper. Des Weiteren sorgte das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol für die Spaltung der Protein-internen Disulfidbrücken der Antikörper, was auch zum Denaturierungsprozess der Antikörper beitrug. Nach der Inkubation im *Stripping*-Puffer wurde die Membran 6 x mit 10 ml TBST (siehe Abschnitt 2.4.5) für 10 min auf der Wippe gewaschen, bevor sie wieder für eine weitere Immundetektion eines Proteins (siehe Abschnitt 2.4.5) eingesetzt werden konnte.

### ***Stripping-Puffer***

---

73,75 ml A. bidest  
0,8 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
6,25 ml 1 M Tris-HCL, pH 6,8  
20 ml 10 % (v/v) SDS

### **2.4.7 Co-Immunpräzipitation**

Die Co-Immunpräzipitation wurde verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Hierfür wurden die Konstrukte der beiden zu untersuchenden Proteine mittels Calciumphosphat-Transfektion (siehe Abschnitt 2.3.5) in HEK 293T-Zellen transfiziert. Wichtig ist hierbei, dass eines der Proteine mit einer IG-Markierung exprimiert wurde. Dieses Protein war in der Lage, von magnetischen Protein G-gekoppelten *Dynabeads* gebunden zu werden. Protein G ist Bestandteil der Zellwand von Bakterien und weist eine sehr hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG auf [178]. Sollte eine Protein-Protein-Interaktion vorliegen, würde auch das zweite Protein über das IG-markierte Protein an die *Dynabeads* gebunden und präzipitiert werden. Interagieren die Proteine nicht miteinander, sollte mit den *Dynabeads* nur das IG-markierte Protein präzipitiert werden. Um eine unspezifische Bindung des zweiten Proteins an die IG-Markierung auszuschließen, wurde eine weitere Co-Immunpräzipitation mit dem zweiten Protein und nur dem IG-Tag, das durch einen IG-Leervektor exprimiert wurde, durchgeführt.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, mit Igepal-Lysepuffer lysiert. 20  $\mu$ g wurden als Expressionskontrolle abgenommen und, wie in Abschnitt 2.4.3 erklärt, für eine SDS-PAGE weiterverarbeitet. Von den restlichen Lysaten wurden gleiche Mengen für die Co-Immunpräzipitation verwendet. Die Proben wurden mit kaltem Igepal-Lysepuffer so verdünnt, dass alle Proben eine Proteinkonzentration von 2000  $\mu$ g/ml aufwiesen. Bevor zu jeder Probe jeweils 50  $\mu$ l *Dynabeads* hinzugegeben werden konnten, mussten diese erst 2 x mit Hilfe eines Magnetständers mit 500  $\mu$ l kaltem Igepal-Lysepuffer gewaschen werden. Es folgte eine Inkubation für 90 min bei 4 °C auf dem Drehrad, was die Bindung der *Dynabeads* an das IG-markierte Protein erlaubte. Mit Hilfe von Magnetständern wurden nun die *Dynabeads*, welche das IG-markierte Protein und mit diesem interagierende Proteine gebunden hatten, von dem restlichen Lysat abgetrennt und 5 x mit kaltem Igepal-Lysepuffer gewaschen. Das Ablösen der Proteine (Elution) von den *Dynabeads* wurde durch Aufnahme des *Bead/Zell*-Gemisches in 20  $\mu$ l 2 x SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.4.3) und anschließendem Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 min erreicht. Für die Auswertung der Co-Immunpräzipitation wurde mit den aufgearbeiteten Proben eine SDS-PAGE (siehe 2.4.3) mit anschließendem Western Blot (siehe Abschnitt 2.4.4) und Immundetektion (siehe Abschnitt 2.4.5) durchgeführt.

## 2.5 Tierexperimentelle Methoden

### 2.5.1 Genotypisierung von OT-I Mäusen

Für die Genotypisierung von OT-I Mäusen wurde den Mäusen die Schwanzvene mit der Spitze eines Skalpels angeritzt, so dass wenige Tropfen Blut in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen werden konnten. Anschließend wurden die Proben bei 850 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in 500  $\mu$ l RBC-Puffer aufgenommen und für 5 min inkubiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Der RBC-Puffer sorgt für einen starken osmotischen Druck, dem hauptsächlich Erythrozyten nicht standhalten können. Das eindringende Wasser bringt die Erythrozyten zum Platzen, während die restlichen Lymphozyten dem Druck standhalten können. Um das freigesetzte Hämoglobin abzutrennen, wurden die Proben bei 850 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun konnten die T-Zellen mit V $\alpha$ 2- und V $\beta$ 5.1-spezifischen Antikörpern angefärbt werden. Nur Proben aus OT-I positiven Mäusen weisen eine große Population an doppelt positiven Zellen auf. Im Gegensatz dazu weisen OT-I negative Mäuse diese Population nicht auf (siehe Abbildung 2.12). Zum Färben der Zellen wurden sie in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen, welchem 1:200 anti-V $\alpha$ 2 PE und anti-V $\beta$ 5.1 APC zugesetzt wurde. Anschließend wurden sie für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Zum Abschluss wurden die Proben mit 1 ml PBS gewaschen, für 10 min mit 300 x g abzentrifugiert, in 150  $\mu$ l PBS aufgenommen und am FACS eingemessen.

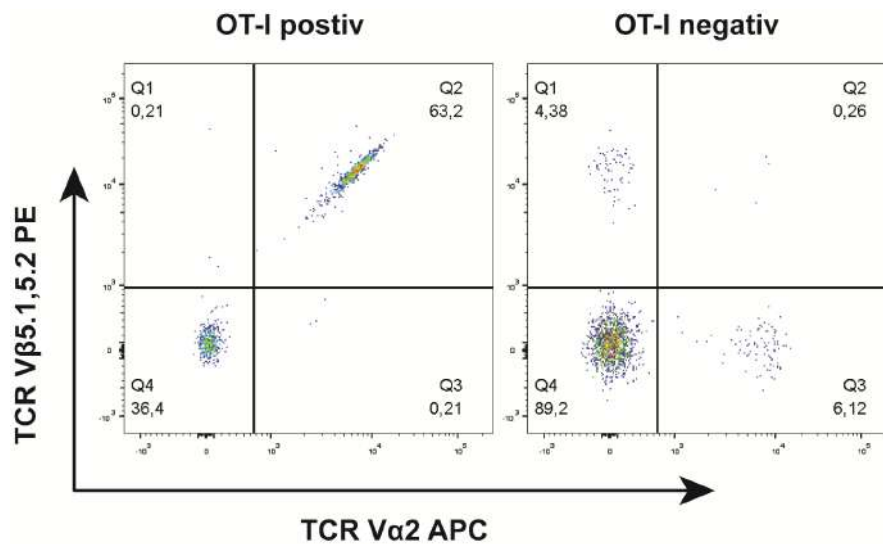


Abbildung 2.12: **Genotypisierung von OT-I Mäusen.** Gezeigt wird die anti-V $\alpha$ 2 und anti-V $\beta$ 5.1 Färbung von Blutproben einer OT-I positiven (links) und einer OT-I negativen (rechts) Maus. Nur die Blutprobe der OT-I positiven Maus weist eine große doppelt positive Population auf.

**RBC-Lysepuffer**

155 mM Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)  
 10 mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)  
 0,1 mM EDTA  
 A. bidest

**2.5.2 Genotypisierung von Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen**

Die Genotypisierung von Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgte über ein kleines Stück Schwanzspitze, das den Mäusen mit einer sterilen Schere abgeschnitten wurde. Zur Extraktion der DNA aus der Schwanzspitze wurde diese mit 200 µl 50 mM NaOH-haltiger Lösung für 20 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde sie kurz für 1 min mit 16.000 x g abzentrifugiert. Zur Neutralisation wurde zu den Proben 70 µl 1 M Tris/HCl pH 8.0 hinzugegeben. Es folgte eine 4-minütige Zentrifugation mit 1.500 x g bei 4 °C. Daraufhin wurde die Genotypisierungs-PCR (siehe Abschnitt 2.2.13) nach den unten abgebildeten Protokollen mit 2 µl des DNA-enthaltenden Überstandes durchgeführt. Die PCR wurde entweder mit der Dream Taq Polymerase oder mit der Titanium Taq Polymerase durchgeführt.

Für die Genotypisierung wurde eine 3 Primer-Strategie gewählt. Das heißt, dass je nachdem, ob ein Wildtyp-Allel oder ein Knockout-Allel in der Maus vorhanden ist, ein unterschiedlich großes PCR-Produkt gebildet wird. Sollte die Maus heterozygot sein, also sowohl ein wt als auch ein Knockout-Allel besitzen, so werden zwei PCR-Produkte gebildet. Das wt Allel-PCR-Produkt weist eine Größe von 500 bp auf, während das Knockout PCR-Produkt nur 257 bp groß ist. Zum Auftrennen und Bestimmen der Größe der Genotypisierungs-PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5) durchgeführt. Abbildung 3.9 zeigt die Agarosegelelektrophorese-Auftrennung der Genotypisierungs-PCR-Produkte von einer wt, cyth3<sup>-/-</sup> und einer heterozygoten (cyth3<sup>-/+</sup>) Maus.

**Primersequenzen:**

TG-380:	cacatgggacacacaatcgc
TG-381:	aataggaacttcggttccggc
TG-387:	acagacttcgctgtggtgag

**Dream Taq PCR Program**

Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
3 min	95 °C	1
3 s	95 °C	30 x
30 s	54 °C	
30 s	72 °C	
5 min	72 °C	1
∞	4 °C	1

**Dream Taq Mastermix**

A. bidest	13 µl
10x DreamTaq Puffer	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,4 µl
TG-380 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
TG-381 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
TG-387 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
Dream Taq	0,2 µl
DNA	2 µl

**Titanium Taq PCR Program**

Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
3 min	95 °C	1
30 s	95 °C	35 x
1 min	68 °C	
3 min	68 °C	1
∞	4 °C	1

**Titanium Taq Mastermix**

A. bidest	12,95 µl
10x PCR Puffer	0,4 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,8 µl
TG-380 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
TG-381 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
TG-387 Primer (20 pmol/µl)	0,8 µl
Titanium Taq	0,25 µl
DNA	2 µl

**2.5.3 *In vivo* Infektionsexperiment**

Um den Einfluss von Cytohesin-3 und Arl4d auf die zelluläre Immunantwort bei einer Virusinfektion zu analysieren, wurde ein *in vivo* Infektionsexperiment durchgeführt. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 2.13 abgebildet.



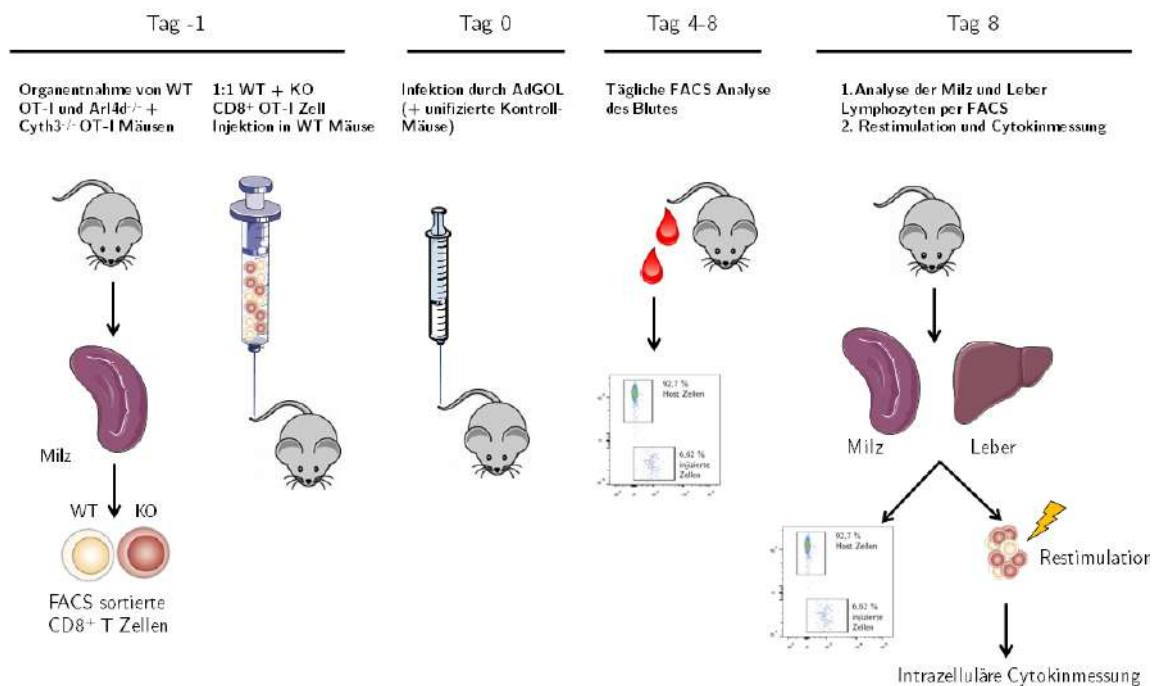


Abbildung 2.13: **Ablauf des *in vivo* Infektionsexperimentes.** An Tag -1 erfolgt die Entnahme der Milz bei wt sowie Cyth3<sup>-/-</sup> oder Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> Mäusen. Aus der Milz werden naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS isoliert. Anschließend werden wt sowie ko OT-I<sup>+</sup> Zellen in einem 1:1 Verhältnis in eine kongene wt Maus injiziert. An Tag 0 werden die wt Mäuse, welche die OT-I<sup>+</sup> Zellen erhalten haben, mit AdGOL infiziert. Ein Teil der Mäuse bleibt als Kontrolle uninfiziert. 4 Tage nach der Infektion werden die Mäuse täglich an den Schwanzspitzen geblutet und das Blut wird auf das Vorkommen bzw. die Proliferation der injizierten OT-I<sup>+</sup> Zellen, welche spezifisch auf AdGOL-infizierte Zellen reagieren, analysiert. Am 8. Tag des Experimentes werden die Mäuse getötet und die Milz sowie Leber als Infektionsherd auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen per FACS untersucht. Zusätzlich wird ein Teil der Milz- und Leberassoziierten Lymphozyten restimuliert und ihre Cytokin-Produktion über intrazelluläre FACS-Färbung gemessen.

### 2.5.3.1 Isolierung naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Im ersten Schritt wurden, wie in 2.3.1 beschrieben, Lymphozyten aus der Milz von wt und Cyth3<sup>-/-</sup> oder Arl4d<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert. Es folgte die MACS-basierte Isolation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abschnitt 2.3.3) unter Verwendung des *CD8a T cell Isolation Kits* von Miltenyi. Um aus der gesamten CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation lediglich die naiven T-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer gegen CD8, CD44 und CD62L für 15 min bei 4 °C gefärbt. Anschließend wurden die CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>niedrig</sup> T-Zellen mittels FACS isoliert und bei 4 °C in RPMI +/+ Medium sortiert.

### 2.5.3.2 Adoptiver Zelltransfer

Die sortierten naiven CD8<sup>+</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen der Cyth3- beziehungsweise Arl4d-defizienten sowie wt Mäuse wurden mittels intravenöser Injektion mit 8\*10<sup>5</sup> Zellen/Maus (in PBS) in CD45.2<sup>+</sup> wt Mäuse transferiert. Die injizierten Zellen stammen alle aus Mäusen, die CD45.1 positiv waren und kein CD45.2 exprimieren. Dies ermöglicht später in FACS-Analysen, die injizierten Zellen von Wirtszellen zu unterscheiden. Um weiterhin die Unterscheidung der

injizierten Zellen zwischen wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> beziehungsweise Alrd4<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup>T-Zellen zu ermöglichen, wurden die wt Zellen aus Mäusen gewonnen, die CD90.1 positiv waren, während die ko T-Zellen CD90.1 negativ waren. Die verwendeten Mäuse und ihr Genotyp sind nochmal detailliert unten abgebildet.

**wt Wirtsmaus T-Zellen:**

CD45.1<sup>+/+</sup>, CD45.2<sup>-/-</sup>, CD90.1<sup>-/-</sup>, CD90.2<sup>+/+</sup>, Cyth3<sup>+/+</sup>, OT-I<sup>-</sup>

**Injizierte wt OT-I T-Zellen:**

CD45.1<sup>-/-</sup>, CD45.2<sup>+/+</sup>, CD90.1<sup>+/+</sup>, CD90.2<sup>-/-</sup>, Cyth3<sup>+/+</sup>, OT-I<sup>+</sup>

**Injizierte Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I T-Zellen:**

CD45.1<sup>-/-</sup>, CD45.2<sup>+/+</sup>, CD90.1<sup>-/-</sup>, CD90.2<sup>+/+</sup> Cyth3<sup>-/-</sup>, OT-I<sup>+</sup>

**2.5.3.3 Mausinfektion mit rekombinanten Adenoviren**

Einen Tag nach dem adoptiven Transfer wurden die Mäuse mit nicht replizierendem Ad-GOL infiziert. Hierbei handelt es sich um einen genetisch so modifizierten Adenovirus, das Hepatozyten infiziert. Durch die Modifikation ist es nicht in der Lage, sich zu vermehren. Weiterhin sorgt die Infektion des Virus dafür, dass die von ihm infizierten Zellen das Ovalbuminpeptid produzieren, welches von den transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird. Das Virus wurde in 200 µl Kochsalzlösung (0,9 %) verdünnt und mit 5\*10<sup>6</sup>PFU/Maus den Mäusen intravenös gespritzt. Als Kontrolle wurden einige Mäuse nur mit 200 µl Kochsalzlösung injiziert.

**2.5.3.4 Analyse der zellulären Immunantwort im Blut**

Vier Tage nach der Infektion wurden sowohl die infizierten als auch die uninfizierten Mäuse an der Schwanzvene geblutet. Um die injizierten OT-I<sup>+</sup>T-Zellen von den Wirts-T-Zellen zu unterscheiden, wurden die Proben gegen die kongenen Marker CD45.1, CD45.2 und CD90.1 gefärbt, wie in Abschnitt 2.3.11 beschrieben wurde. Um die Differenzierung der T-Zellen zu analysieren, wurden zusätzlich noch CD8, CD44, CD62L, KLRG1 und CD127 angefärbt.

**2.5.3.5 Analyse der zellulären Immunantwort in der Milz und in der Leber**

Acht Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und ihre Milz und Leber entnommen. Die Lymphozyten aus der Milz wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, isoliert und wie auch das Blut (siehe 2.5.3.4) per FACS analysiert. Für die Isolation der Leberassoziierten Lymphozyten wurde die Leber in GBSS aufgenommen und durch ein 250 µM Stahlsieb mit Hilfe eines Stempels gepresst. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension

mit GBSS aufgefüllt und einem Waschschrift mit 450 x g für 10 min unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 40 % Percoll Lösung (40 % Percoll in PBS v/v) und mit 2 ml Pancol unterschichtet. Nun folgte eine Gradientenzentrifugation mit 800 x g für 20 min ohne Bremse. Nach erfolgreicher Dichtegradientenzentrifugation konnte die obere Schicht des Gradienten, welche aus Hepatozyten und abgestorbenen Zellen bestand, entsorgt werden. Die untere Schicht, welche die Leber-assoziierten Lymphozyten beinhaltete, wurde entnommen. Sowohl die Milz-assoziierten, als auch die Leber-assoziierten Lymphozyten wurden für Folgeexperimente wie z.B. FACS-Analysen oder die *in vitro* Restimulation (siehe Abschnitt 2.5.3.6) weiterverwendet.

### 2.5.3.6 Restimulation der Milz sowie Leber-assoziiertes T-Zellen

Zusätzlich zur FACS-Analyse der nach Tag 8 isolierten Milz- sowie Leber-assoziierten T-Zellen wurde ein Teil restimuliert, um *in vitro* die IL-2 Produktion der T-Zellen aus dem *in vivo* Infektionsexperiment zu messen. Um dies zu ermöglichen, wurden die Zellen mit 5 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 200 ng/ml Ionomycin in RPMI1640+/+ für 4 h bei 37 °C restimuliert. Bei PMA handelt es sich um ein Struktur-analogon des Diacylglycerins, das zur Aktivierung der Proteinkinase C genutzt wird [179]. Ionomycin hingegen ist ein Ionophor, das dazu genutzt wird, Calciumionen aus dem extrazellulären Raum in die T-Zellen zu bringen, um calciumabhängige Signalwege zu aktivieren [180]. Durch beide Substanzen wurde die T-Zellaktivierung und Produktion von Cytokinen wie IL-2 induziert (siehe Abschnitt 1.1.2). Zusätzlich zu PMA und Ionomycin wurden zu den Zellen Brefeldin A und Monensin (1:1000) gegeben, was den Transport und die Sekretion von Cytokinen inhibiert [181]. Nach Ablauf der 4 h wurden die Zellen jeweils einem Waschschrift mit RPMI +/+ und einem mit PBS unterzogen. Hierbei wurden die Zellen mit 300 x g für 10 min abzentrifugiert.

### 2.5.3.7 Intrazelluläre Färbung von Cytokinen

Nach der Restimulation der Leber- und Milz-assoziierten Lymphozyten wurden die intrazellulär lokalisierten Cytokine angefärbt und per FACS analysiert. Im ersten Schritt wurden die restimulierten Zellen einem Waschschrift mit PBS unterzogen. Dazu wurden die Zellen mit 300 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Es folgte eine reguläre Färbung der Oberflächenmoleküle CD8, CD45.1, CD45.2, CD90.1 (siehe Abschnitt 2.3.11). Dies war essentiell, um bei der späteren FACS-Analyse wt, ko und Wirts-T-Zellen zu unterscheiden. Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen in 100 µl PFA (4 % w/v in PBS) für 10 min bei RT fixiert. Um die intrazelluläre Färbung von Cytokinen zu ermöglichen, wurden die Zellen einmal mit PERM-Puffer gewaschen. Abzentrifugiert wurden die Zellen mit 300 x g bei 4 °C. Die intrazelluläre Färbung wurde anschließend in 100 µl PERM-Puffer, welcher die Antikörper gegen IL-2 und IFN $\gamma$  enthielt, für 30 min auf Eis durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen ein weiteres Mal mit Permeabilisierungs-Puffer (Biolegend) gewaschen und in PBS für die FACS-Analyse aufgenommen.

## 3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes, welches die Funktion des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Cytohesin-3 in T-Zellen aufklären soll. Die Arbeit baut hauptsächlich auf Ergebnissen von Dr. Bianca Paul auf, welche sie während ihres Promotionsstudiums erhalten hatte. Sie konnte zeigen, dass Cytohesin-3 in aktivierten und anergen wt T-Zellen aus Black/6 Mäusen differentiell exprimiert wird [135]. Aktivierte T-Zellen sind im Vergleich zu naiven T-Zellen durch eine verstärkte Proliferation gekennzeichnet [182]. Des Weiteren ist die gesteigerte Produktion von Cytokinen wie z.B. IL-2 ein Kennzeichen von aktivierten T-Zellen [183]. Die gesteigerte Produktion und Ausschüttung von IL-2 durch aktivierte T-Zellen sorgen dafür, dass die T-Zellen IL-2 verstärkt aufnehmen und so einen autokrinen Signalweg auslösen, der zur Differenzierung und klonalen Expansion des T-Zellkompartiments führt. Für anerge T-Zellen ist hingegen beschrieben worden, dass sie sich in einem refraktären Zustand befinden und nicht mehr über den TCR-Signalweg (siehe 1.1.2) stimuliert werden können [65]. Dies hat zur Folge, dass das Unvermögen, Cytokine wie IL-2 zu produzieren, ein Markenzeichen der anergen T-Zellen ist [65]. Um aus naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivierte T-Zellen zu generieren, wurden sie mit DCs in Anwesenheit des Modellpeptids Ovalbumin kokultiviert (eine detaillierte Erklärung des Modellsystems ist in Abschnitt 2.3.8 zu finden). Für die Generierung anerer T-Zellen wurden naive T-Zellen hingegen mit LSECs (siehe Abschnitt 1.1.4.1) in Anwesenheit von Ovalbumin kokultiviert. Für die Expression von Cytohesin-3 konnte gezeigt werden, dass sie in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert ist, während sie in anergen CD8<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert ist. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die Regulation der Expression von Cytohesin-3 von zwei Signalwegen abhängt. Zum einen ist die Co-Stimulation von CD28 (siehe 1.1.2.3) als Teil der T-Zellaktivierung für die Herunterregulation von Cytohesin-3 in aktivierten T-Zellen essentiell. Für die Hochregulation von Cytohesin-3 stellte sich die Stimulation des inhibitorischen Rezeptors PD-1 als bedeutsam heraus. Cytohesin-3 scheint in aktivierten und anergen T-Zellen eine besondere Rolle innerhalb der Cytohesin-Proteinfamilie zu spielen, da andere Cytohesine wie z.B. Cytohesin-1 keine differentielle Expression aufweisen.

### 3.1 Expression von Cytohesin-3 in murinen und humanen T-Zellen

Durch Dr. Bianca Paul wurde bisher lediglich die Expression von Cytohesin-3 in CD8<sup>+</sup> murinen T-Zellen untersucht. Um ein vollständigeres Bild über die Expressionsregulation von Cytohesin-3 in aktivierten T-Zellen zu erhalten, wurde die Proteinexpression sowie

mRNA-Expression von Cytohesin-3 und weiteren Mitgliedern der Proteinfamilie in murinen und humanen T-Zellen untersucht.

### **3.1.1 Die Proteinexpression von Cytohesin-3 ist in murinen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert**

Die Proteinexpression von Cytohesin-3 und Cytohesin-1, als Beispiel eines weiteren Mitgliedes der Cytohesin-Proteinfamilie, wurde in murinen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Western Blot-Verfahren bestimmt. Hierzu wurden aus Lymphknoten und Milzen von wt Mäusen per negativer Selektion mittels MACS-Verfahren naive CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert, um den TCR-Signalweg zu induzieren, was zur Aktivierung der T-Zellen führt. 24 h, 48 h und 72 h nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet, lysiert und mit ihnen eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Per Immundetektion wurden Cytohesin-1 und -3 sowie Tubulin als Ladekontrolle nachgewiesen. Abbildung 3.1 zeigt, dass die Proteinexpression von Cytohesin-3 im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in aktivierten CD4<sup>+</sup> auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert ist. Die Expression von Cytohesin-3 nimmt graduell im Lauf der Zeit bis 72 h ab. Im Gegensatz zu Cytohesin-3 ist die Proteinexpression von Cytohesin-1 in aktivierten T-Zellen nicht verändert, was die besondere Rolle von Cytohesin-3 innerhalb der Cytohesin-Proteinfamilie in aktivierten T-Zellen weiter bekräftigt.

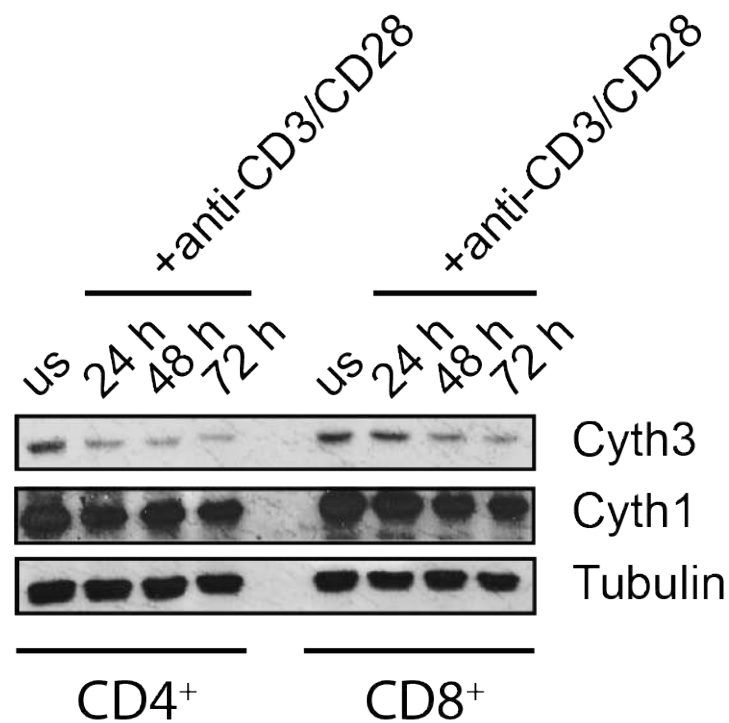


Abbildung 3.1: Die Cytohesin-3 Proteinexpression ist in aktivierten murinen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen spezifisch herunterreguliert. Murine naive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern *ex vivo* stimuliert, um sie zu aktivieren. 24 h, 48 h und 72 h nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und als Ausgangsmaterial für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot verwendet. Es wurden Cytohesin-1 und -3 sowie Tubulin als Ladekontrolle angefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 Experimenten ( $n=3$ ).

### 3.1.2 Die mRNA-Expression von Cytohesin-3 ist in murinen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert

Die mRNA-Expression des Cytohesin-3 Gens hat einen großen Einfluss darauf, in welcher Menge das Cytohesin-3 Protein in T-Zellen produziert wird. Daher wurde auch die mRNA-Expression von Cytohesin-3 in murinen naiven und aktivierten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen bestimmt. Dazu wurden erneut naive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen aus Milzen und Lymphknoten der wt Mäuse per negativer Selektion mittels MACS-Verfahren isoliert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bis 72 h mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert, um die T-Zellaktivierung auszulösen. Nach dem Ernten der Zellen erfolgte eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese. Mit diesem Ausgangsmaterial konnte eine qPCR durchgeführt werden, welche in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Sie zeigte, dass die Cytohesin-3 mRNA-Expression in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  aktivierten T-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um 90 % verringert ist. Die starke Herunterregulation war bereits 24 h nach Beginn der Stimulation vorhanden und veränderte sich bei längerer Stimulationsdauer nicht weiter.

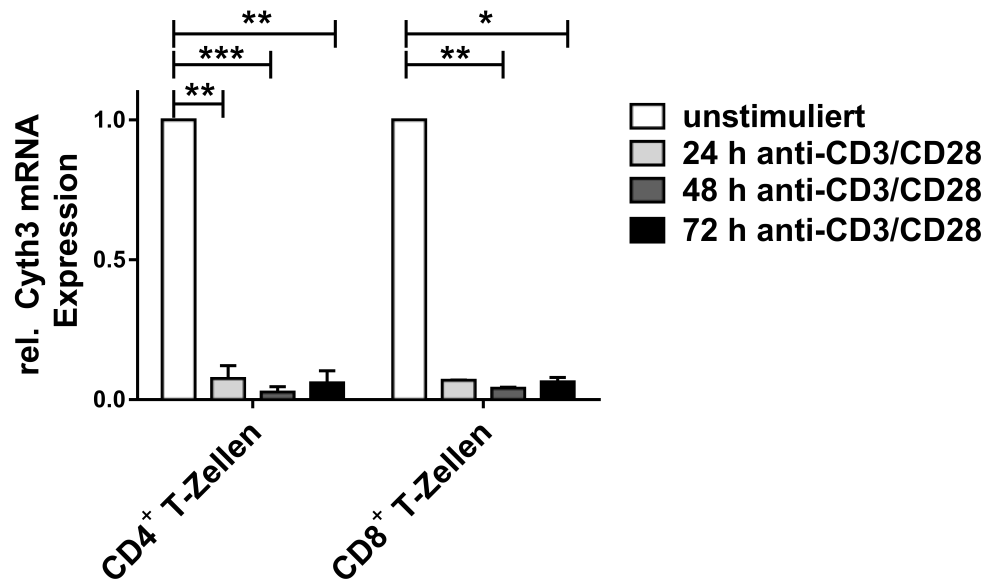


Abbildung 3.2: Die Cytohesin-3 mRNA-Expression ist in murinen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert. Murine naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörpern für einen Zeitraum von 24-72 h stimuliert, um sie zu aktivieren. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurde aus ihnen RNA isoliert und für die Synthese von cDNA verwendet. Diese wiederum stellte das Ausgangsmaterial für die qPCR dar. Die Cytohesin-3 Expression wurde auf die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert. In der Grafik ist der Mittelwert der relativen Cytohesin-3 Expression von jeweils 3 wt Mäusen (n=3) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$  (t-test)

### 3.1.3 Die Proteinexpression von Cytohesin-3 ist in humanen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert

Um zu belegen, dass die im murinen System entdeckten Erkenntnisse über die Expression von Cytohesin-3 auch relevant für das humane System sind, sollte untersucht werden, ob die Cytohesin-3 Protein- und mRNA-Expression auch in aktivierten humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert ist. Daher wurden aus dem Lymphozytenkonzentrat humaner Blutproben PBMCs isoliert. Diese waren Ausgangsmaterial für eine negative MACS-Selektion der naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die isolierten T-Zellen wurden anschließend mit anti-CD3/CD28-beschichteten *Beads* stimuliert, um die T-Zellaktivierung auszulösen. 24 h nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet, lysiert und mit ihnen eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot durchgeführt (siehe Abbildung 3.3). Per Immundetektion wurden Cytohesin-1, -2, -3 und -4 sowie AKTIN als Ladekontrolle nachgewiesen. Einzig für Cytohesin-3 konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in aktivierten CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert ist. Im Gegensatz zu Cytohesin-3 ist die Proteinexpression von Cytohesin-1 und -2 in aktivierten T-Zellen nicht verändert. Für die Proteinexpression von Cytohesin-4 konnte interessanterweise gezeigt werden, dass sie spezifisch nur in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert ist, während die Expression in aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht verändert ist.

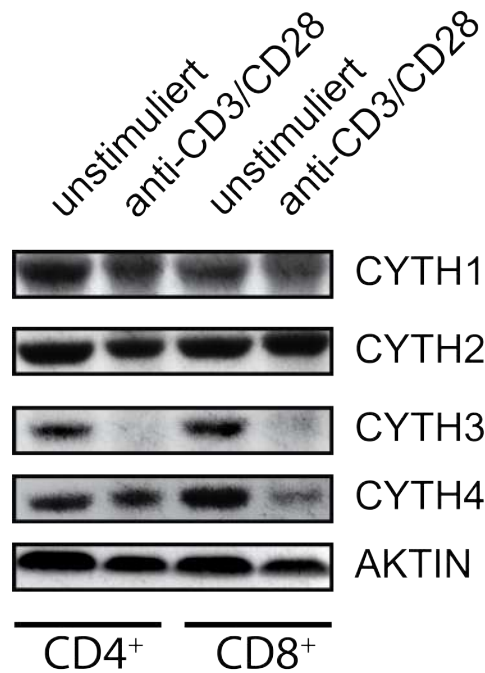


Abbildung 3.3: **Cytohesin-3 Proteinlevel sind in humanen aktivierten T-Zellen herunterreguliert.** Humane naive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  wurden mit anti-CD3/CD28-beschichteten *Beads* stimuliert, um sie zu aktivieren. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und für einen Western Blot verwendet, bei dem die Proteinexpression der Cytohesin-Familie analysiert wurde. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 Experimenten ( $n=3$ ).

### 3.1.4 Die mRNA-Expression von Cytohesin-3 ist in humanen aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spezifisch herunterreguliert

Zusätzlich zur Proteinexpressions-Analyse von Cytohesin-3 in aktivierten humanen T-Zellen wurde auch die mRNA-Expression von Cytohesin-3 untersucht, da diese Einfluss auf die Menge an produziertem Cytohesin-3 Protein in T-Zellen hat (siehe 3.1.2). Hierzu wurden erneut aus dem Lymphozytenkonzentrat humaner Blutproben PBMCs isoliert, welche für negative MACS-Selektionen von naiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen verwendet wurden. Anschließend wurden die isolierten T-Zellen mit anti-CD3/CD28 beschichteten *Beads* stimuliert, um die T-Zellaktivierung auszulösen. 24 h nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet, lysiert und ihre RNA isoliert. Diese wurde für eine cDNA-Synthese verwendet, die das Ausgangsmaterial für die in Abbildung 3.4 dargestellte qPCR war. Wie auch schon bei der Analyse der Proteinexpression der Cytohesine (siehe 3.1.3) ist die mRNA-Expression von Cytohesin-3 in aktivierten humanen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen spezifisch herunterreguliert. Auch die Analyse der mRNA-Expression von Cytohesin-4 bestätigt, dass dieses eine Sonderrolle einnimmt, da es lediglich in aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen, jedoch nicht in aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen herunterreguliert ist. Im Gegensatz zu Cytohesin-3 und -4 ist die mRNA-Expression von Cytohesin-1 und -2 in aktivierten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unverändert. Insgesamt lässt sich festhalten, dass sowohl die Analyse der Proteinexpression (siehe 3.1.3) sowie mRNA-Expression (siehe 3.1.4) der Cytohesin-Familie in humanen



T-Zellen ähnliche Ergebnisse lieferte wie die Analysen im murinen System (siehe 3.1.3 und 3.1.2). Dies bestätigt, dass Untersuchungen bezüglich der Rolle von Cytohesinen in murinen Immunzellen auch Aufschluss über ihre Rolle in humanen Immunzellen geben.

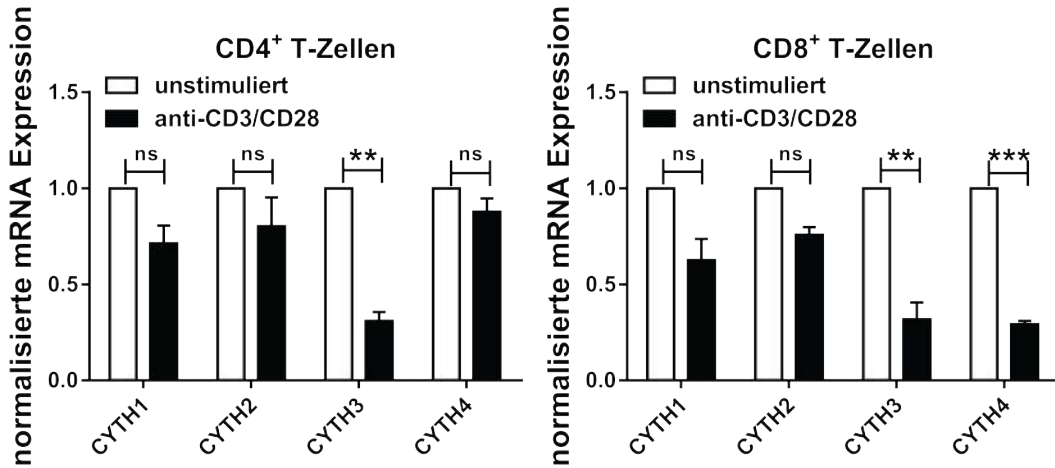


Abbildung 3.4: Die mRNA-Expression von Cytohesin-3 ist in humanen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert. Humane naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-beschichteten *Beads* stimuliert, um sie zu aktivieren. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und ihre RNA isoliert, welche für die Synthese von cDNA verwendet wurde. Die cDNA stellte das Ausgangsmaterial für die qPCR dar. Analysiert wurde die mRNA-Expression der gesamten Cytohesin-Familie. Die Expression der Cytohesine wurde auf die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. In der Grafik ist der Mittelwert der relativen Cytohesin-3 Expression von jeweils 3 Spendern (n=3) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.05 = \*, p < 0.01 = \*\*, p < 0.001 = \*\*\* (t-test)

## 3.2 Expression von Arl4d in murinen und humanen T-Zellen

Unsere Kooperationspartnerin Prof. Linda Diehl hat in Zusammenarbeit mit Dr. Bianca Paul bereits die spezifische CD28-Signalweg-abhängige Herunterregulation der Expression von Cytohesin-3 in aktivierten bzw. DC-stimulierten T-Zellen nachweisen können [135]. Zusätzlich konnten sie belegen, dass Cytohesin-3 in Abhängigkeit vom PD-1-Signalweg in anergen oder LSEC-stimulierten T-Zellen hochreguliert ist [135]. Daher waren wir daran interessiert, herauszufinden, welche anderen Proteine in anergen bzw. LSEC-stimulierten T-Zellen hochreguliert sind. Um dieser Frage nachzugehen, führte Prof. Linda Diehl einen DNA-Microarray mit LSEC-stimulierten und unstimulierten murinen T-Zellen durch. Bei der Analyse der differentiell regulierten Gene fiel ihr insbesondere das Gen Arl4d auf. Genau wie Cytohesin-3 war es laut den DNA-Microarray-Daten in LSEC-stimulierten T-Zellen hochreguliert. Dies war für uns besonders interessant, da Arl4d, wie in 1.2.1 und 1.2.2 detailliert beschrieben, zu der Familie der Arf GTPasen gehört. Arf GTPasen stellen wiederum die Ziele für die Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor-Familie der Cytohesine dar [124]. Über die Funktionen von Arl4d ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass Arl4d bei der Regulation von Membran-assoziierten Transportprozessen, der Aktin-Umstrukturierung und der Regulation der Morphologie von

Mitochondrien involviert ist [121, 122, 123]. Interessanterweise gibt es allerdings Hinweise, dass Arl4d die PH-Domäne von Cytohesin-2 bindet und dieses so an die Plasmamembran rekrutiert [121]. Es gibt also Indizien, die dafür sprechen, dass Arl4d mit Mitgliedern der Cytohesin-Familie interagiert. Über die Rolle von Arl4d in Immunzellen ist allerdings noch nichts bekannt. Da Arl4d in anergen bzw. LSEC-stimulierten T-Zellen ähnlich wie Cytohesin-3 reguliert ist, es zur Familie der ARFs gehört, welche potentielle Ziele der Cytohesin GEF-Funktion sind und schon belegt wurde, dass es mit Cytohesin-2 interagieren kann, wollten wir die Funktion von Arl4d in Immunzellen analysieren.

### **3.2.1 Die mRNA-Expression von Arl4d ist in aktivierten murinen T-Zellen herunterreguliert, während sie in anergen murinen T-Zellen PD-1-abhängig hochreguliert ist**

In Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl sollten die Ergebnisse des DNA-Microarray zunächst bestätigt werden. Da es keinen Antikörper gibt, der das Protein Arl4d bindet, wurde die Regulation der Expression von Arl4d auf mRNA-Ebene mittels PCR bestimmt. Hierzu wurden wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen mit verschiedenen Ovalbumin-beladenen APCs für einen Zeitraum von 5 Tagen kokultiviert. Nach 48 h wurden alle 24 h Proben entnommen und die Expression von Arl4d per PCR untersucht. Zum einen wurden die T-Zellen mit wt DCs kokultiviert, um sie zu aktivieren. Weiterhin wurden T-Zellen mit wt LSECs kokultiviert, was die T-Zellen anergisiert. Um zusätzlich festzustellen, ob eine potentielle Hochregulation der Arl4d-Expression wie bei Cytohesin-3 auch abhängig von dem PD-1-Signalweg ist, wurden in diesem Experiment wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen mit PD-L1-defizienten LSECs kokultiviert. Da es sich bei PD-L1 um den Liganden des PD-1 Rezeptors handelt, können die PD-L1<sup>-/-</sup>LSECs den PD-1-Signalweg der T-Zellen nicht stimulieren [184].

Die Abbildung 3.5 zeigt, dass zu jedem gemessenen Zeitpunkt die mRNA-Expression in aktivierten T-Zellen stark herunterreguliert ist. Im Vergleich zu der mRNA-Expression von Arl4d in naiven T-Zellen (gestrichelte Linie) ist die Expression in aktivierten T-Zellen nach 48 h auf 10 % reduziert. Im Gegensatz dazu ist zu jedem gemessenen Zeitpunkt die mRNA-Expression von Arl4d in anergen T-Zellen stark hochreguliert. Nach 48 h ist die mRNA-Expression von Arl4d in anergen T-Zellen ca. 3-fach höher als in naiven T-Zellen. Die Arl4d mRNA-Expression nimmt über den gemessenen Zeitraum von 5 Tagen leicht ab, so dass sie am fünften Tag im Vergleich zu naiven T-Zellen lediglich doppelt so hoch ist. Diese Daten belegen, dass die Arl4d mRNA-Expression in aktivierten und anergen T-Zellen vergleichbar reguliert ist wie die Expression von Cytohesin-3. Wurden die PD-L1-defizienten LSECs für die Kokultur mit den T-Zellen eingesetzt, zeigt sich, dass diese nicht in der Lage sind, die starke Hochregulation der Arl4d-mRNA zu induzieren. Es lässt sich sogar erkennen, dass die Arl4d mRNA-Expression in T-Zellen auf ca. 45 % reduziert wird, wenn sie mit PD-1-defizienten LSECs kokultiviert werden. Dies belegt, dass auch die Induktion der gesteigerten Arl4d-Expression ähnlich wie die Cytohesin-3 Expression abhängig vom PD-1-Signalweg ist.

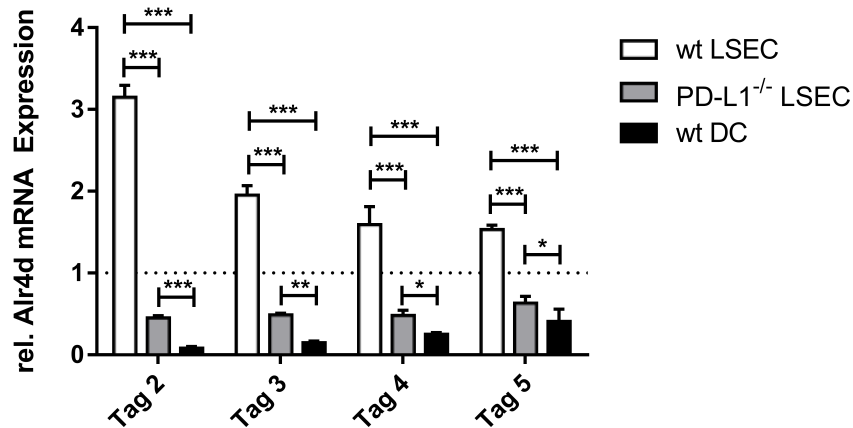


Abbildung 3.5: **Arl4d mRNA-Expression ist PD-1-abhängig in aktivierten und anergen murinen T-Zellen gegensätzlich reguliert.** Murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Ovalbumin beladenen DCs (führt zur Aktivierung der T-Zellen), LSECs (führt zur Anergisierung der T-Zellen) und PD-L1-defizienten LSECs kokultiviert. Zusätzlich wurden T-Zellen als Kontrolle unstimuliert belassen. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und ihre RNA isoliert, welche für die Synthese von cDNA verwendet wurde. Diese stellte das Ausgangsmaterial für die qPCR dar. Analysiert wurde die mRNA-Expression von Arl4d, welche auf das Referenzgens Gapdh normalisiert wurde. Zusätzlich wurden die Arl4d-Expression der stimulierten T-Zellen auf die Expression in naiven unstimulierten T-Zellen normalisiert (gestrichelte Linie). In der Grafik ist der Mittelwert der relativen Arl4d-Expression von jeweils 3 Mäusen (n=3) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$  (t-test)

### 3.2.2 Die mRNA-Expression von ARL4D ist in humanen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert

Es sollte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse, die über die Expression von Arl4d im murinen System erhalten wurden, auch relevant für das humane System sind. Daher sollte untersucht werden, ob die Arl4d mRNA-Expression auch in humanen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert ist, wie es bereits in Abschnitt 3.1.4 für Cytohesin-3 gezeigt werden konnte. Hierzu wurden aus dem Lymphozytenkonzentrat humaner Blutproben PBMCs isoliert. Diese wurden für die negative MACS-Selektion von naiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Nun wurden die isolierten T-Zellen mit anti-CD3/CD28 beschichteten *Beads* stimuliert, um die T-Zellaktivierung auszulösen. 24 h nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen geerntet, lysiert und ihre RNA isoliert. Es folgte eine cDNA-Synthese, die das Ausgangsmaterial für eine qPCR bildete, die in Abbildung 3.6 dargestellt ist. Wie schon bei der Analyse der mRNA-Expression von Cytohesin-3 (siehe 3.1.4) zeigt sich eindeutig, dass die mRNA-Expression von Arl4d in aktivierten humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert wird. Dies zeigt, dass die Ergebnisse, welche Aufschluss über die Expression von Arl4d T-Zellen geben und im murinen System gewonnen wurden, auch im humanen System reproduziert werden konnten. Die Untersuchungen bezüglich der Rolle von Arl4d in murinen Immunzellen können somit auch Aufschluss über ihre Rolle in humanen Immunzellen geben.

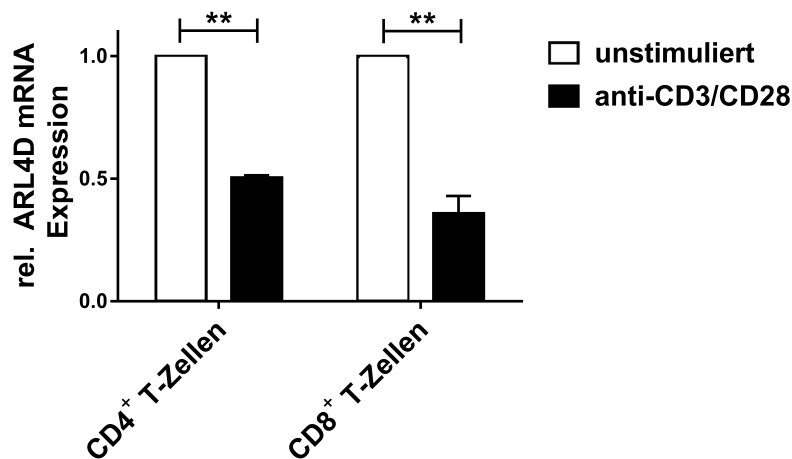


Abbildung 3.6: Die mRNA-Expression von ARL4D ist in humanen aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch herunterreguliert. Humane naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-beschichteten *Beads* stimuliert, um sie zu aktivieren. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und ihre RNA isoliert, welche für die Synthese von cDNA verwendet wurde. Diese stellte das Ausgangsmaterial für die qPCR dar. Analysiert wurde die mRNA-Expression von ARL4D, welche auf das Referenzgen GAPDH normalisiert wurde. In der Grafik ist der Mittelwert der relativen Arl4d-Expression von jeweils 3 Spendern (n=3) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.01 = **$  (t-test)

### 3.3 Arl4d interagiert mit Cytohesin-2, -3 und -4, jedoch nicht mit Cytohesin-1

Da in 3.2.1 gezeigt werden konnte, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d in aktivierten und anergen T-Zellen ähnlich reguliert wird und Arl4d zur Familie der Arfs gehört, welche Ziele für die GEF-Funktion von Cytohesinen sind, stellte sich die Frage, ob Arl4d ein Interaktionspartner von Cytohesin-3 ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Co-Immünpräzipitationen von Arl4d mit allen vier Mitgliedern der Cytohesin-Familie durchgeführt. Hierzu wurde das Fusionsprotein Ig-Arl4d G2A zusammen mit einem Flag-Cytohesin Fusionsprotein in HEK 239T-Zellen überexprimiert. Für dieses Experiment wurde ein Konstrukt verwendet, das für eine Punktmutante von Arl4d kodiert, welche an Stelle 2 der Aminosäuresequenz anstatt Glycin ein Alanin enthält. Dies hat zur Folge, dass diese Mutante von Arl4d nicht den Myristoyl-Anker enthält, welcher dafür sorgen würde, dass das Konstrukt in Membranen integriert (siehe Abschnitt 1.2.1). Dies ist wichtig, da die Integration in die Membran mit dem Prozess der Co-Immünpräzipitation interferiert. Weiterhin wurde von Li et al. die Arl4d G2A Variante bereits erfolgreich für Co-Immünpräzipitationen verwendet [122].

Nach der erfolgreichen Überexpression der Konstrukte wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe von *Dynabeads* (Life Technologies) das Fusionsprotein Ig-Arl4d G2A aus den Zelllysaten sowie Proteine, welche mit Arl4d interagieren, isoliert. Um auszuschließen, dass die mit Ig-Arl4d G2A isolierten Proteine an die Ig-Markierung binden, wurde eine Kontrolle angesetzt, bei der die Ig-Markierung ohne Arl4d mit den Cytohesinen überexprimiert wurde.

Wie man Abbildung 3.7 entnehmen kann, konnten in allen Experimenten jeweils Ig-Arl4d sowie die Ig-Kontrolle mithilfe der *Dynabeads* isoliert werden. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass Ig-Arl4d jeweils mit dem Flag-Cytohesin-2, -3 und -4 copräzipitiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte Cytohesin-1 nicht mit Arl4d copräzipitiert werden. Da in allen Kontrollansätzen, bei denen nur die Ig-Markierung überexprimiert wurde, keines der Cytohesine copräzipitiert werden konnte, lässt sich ausschließen, dass die Cytohesine an die Ig-Markierung von Arl4d binden. Insgesamt bedeutet es, dass Arl4d ein Interaktionspartner von drei der vier Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie ist. Insbesondere konnte die Vermutung bestätigt werden, dass Arl4d mit Cytohesin-3 interagiert.

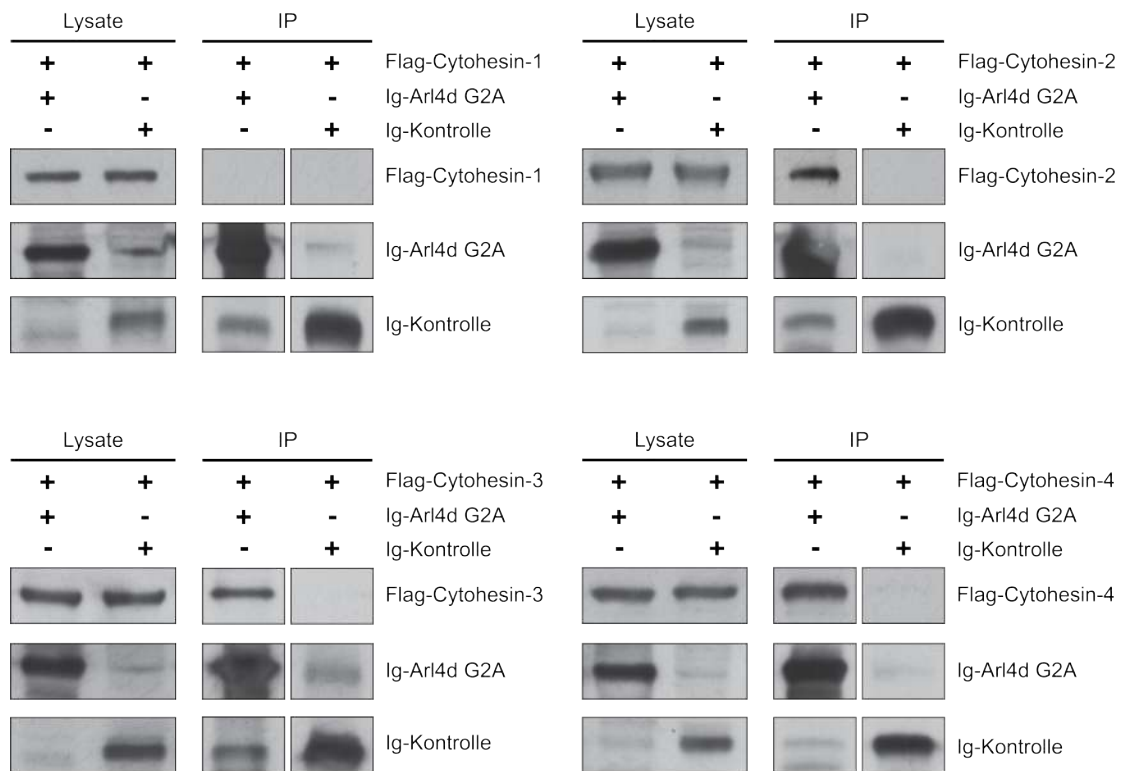


Abbildung 3.7: **Arl4d interagiert mit Cytohesin-2, -3 und -4, jedoch nicht mit Cytohesin-1.** In HEK 293T-Zellen wurden das Fusionsprotein Ig-Arl4d G2A oder die entsprechende Ig-Kontrolle jeweils mit einem Flag-markierten Cytohesin Fusionsprotein überexprimiert. Anschließend wurde eine Co-Immunpräzipitation mit Ig-Arl4d G2A und der Ig-Kontrolle durchgeführt. Auf den einzelnen Membranen wurden die jeweiligen Markierungen (Flag, Ig) der überexprimierten Proteine detektiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (n=3).

### 3.4 Charakterisierung der Cytohesin-3 Knockout-Maus

In 3.1 und 3.2 konnten wir feststellen, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d eine sehr ähnliche PD-1- bzw. CD28-abhängige Expressionsregulierung während der T-Zellaktivierung und -anergisierung aufweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-3 spezifisch mit Arl4d interagiert. Um nun den Einfluss von Cytohesin-3 und Arl4d auf die T-Zellaktivierung genauer zu untersuchen, benutzten wir gentechnisch veränderte Mäuse, die entweder defizient für Cytohesin-3 oder Arl4d sind. Sie werden im folgenden Cytohesin-3

Knockout-Maus ( $Cyth3^{-/-}$  Maus) bzw. Arl4d-Knockout-Maus ( $Arl4d^{-/-}$  Maus) genannt. Die  $Cyth3^{-/-}$ -Maus wurde beim International Knockout Mouse Consortium (IKMC) kommerziell erworben. Bei der  $Cyth3^{-/-}$ -Maus handelt es sich um einen vollständigen Knockout. Dies bedeutet, dass alle Zellen der Maus nicht in der Lage sind, das Cytohesin-3 Protein zu bilden. Um den Transkriptionsstopp des Cytohesin-3 Gens zu erreichen, wurde in den Cytohesin-3 Genlocus ein Konstrukt inseriert, welches auch einen PolyA-Abschnitt enthält, der zum Transkriptionsstopp des Gens führt [185]. Der veränderte Cytohesin-3 Genlocus ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Zwischen Exon 4 und 5 des Cytohesin-3 Gens befindet sich die LacZ neo Kasette, an die der PolyA-Abschnitt angeschlossen ist. Sie ist flankiert von zwei FRT-Sequenzen. Dies ermöglicht eine potentielle Entfernung der Kasette mithilfe des Flp/FRT-Systems, um eine konditionale Knockout-Maus zu erstellen. Exon 5 ist umgeben von zwei loxP sites. Sie spielen erst dann eine Rolle, wenn eine konditionale Knockout-Maus erzeugt werden soll. Nach dem Entfernen der LacZ oder LacZneo Kasette kann die Maus mit verschiedensten Cre-Mauslinien verpaart werden. Das Cre/loxP-System erlaubt das Herausschneiden des Exon 5, welches durch die loxP-Sequenzen flankiert ist. Dies ermöglicht, dass die Gendeletion des Cytohesin-3 Gens nur in Zellen erfolgt, die das Cre-Protein exprimieren [186]. Zu Beginn wurde die  $Cyth3^{-/-}$  Maus charakterisiert, um mögliche Phänotypen zu identifizieren, die auf die Funktion von Cytohesin-3 in verschiedenen Zelltypen zurückzuführen ist. Inzwischen wurden durch Dr. Bettina Jux durch Verpaarung mit verschiedenen Cre-Mauslinien auch zelltypspezifische Cytohesin-3 Knockout-Mäuse erstellt, die zu Beginn dieser Dr. Arbeit jedoch noch nicht vorhanden waren.



Abbildung 3.8: **Genlocus der  $Cyth3^{-/-}$  Maus.** Zwischen Exon 4 und 5 befindet sich die LacZ neo Kasette mit dem PolyA-Abschnitt, der zum Transkriptionsstopp des Cytohesin-3 Gens in allen Zellen der Maus führt. Die Kasette ist umgeben von zwei FRT-Sequenzen, welche über das Flp/FRT-System potentiell entfernt werden können, um eine konditionale Knockout-Maus zu erstellen. Weiterhin ist Exon 5 von zwei loxP Sequenzen flankiert. Dies erlaubt Exon 5, durch Verpaarungen der Maus mit Cre-Mauslinien zelltyp- oder gewebespezifisch entfernt zu werden.

Die Abbildung wurde von dem International Knockout Mouse Consortium (IKMC) erstellt.

### 3.4.1 Nachweis der Cytohesin-3 Defizienz auf DNA-Ebene

Um die Cytohesin-3 Defizienz in den  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen auf DNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine Genotypisierung-PCR wie in 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Die hierbei verwendete 3 Primer-Strategie sorgt dafür, dass DNA-Proben aus den Schwanzspitzen von wt Mäusen ( $Cyth3^{+/+}$ ), Knockout-Mäusen ( $Cyth3^{-/-}$ ) und heterozygoten Mäusen ( $Cyth3^{-/+}$ ) ein unterschiedliches PCR-Produkt bilden. Ist der Cytohesin-3 Genlocus einer Maus unverändert, so bildet sich ein PCR-Produkt mit der Größe von 500 bp. Sind die Schwanzspitzenproben von einer  $Cyth3^{-/-}$  Maus, so bildet sich ein wesentlich kleineres PCR-Produkt mit einer Größe von 256 bp. Sollten die Proben aus einer heterozygoten Maus stammen,

werden sowohl das große als auch das kleine PCR-Produkt gebildet und wir erhalten ein Doppelbandenmuster. In Abbildung 3.9 sind die PCR-Produkte beispielhaft von jeweils einer  $Cyth3^{-/-}$  sowie  $Cyth3^{+/+}$  und  $Cyth3^{+/-}$  Maus durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt worden.

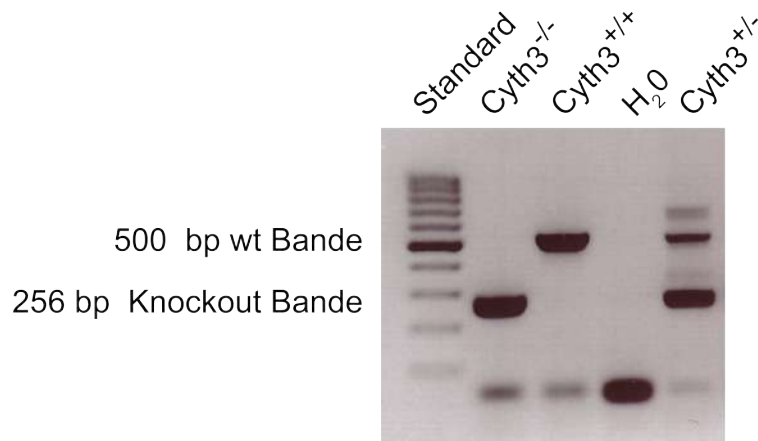


Abbildung 3.9: **Genotypisierung von  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen.** Mit den DNA-Proben der Schwanzspitzen von  $Cyth3^{-/-}$ ,  $Cyth3^{+/+}$  und  $Cyth3^{+/-}$  Mäusen wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt, deren Produkt zusammen mit dem *Generuler DNA Ladder* Standard auf einem Agarosegel aufgetragen wurde. Als Kontrolle wurde eine  $H_2O$  -PCR angesetzt, die kein Schwanzspitzenmaterial enthält. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme des Agarosegels von mehr als 100 analysierten Mäusen ( $n > 100$ ).

### 3.4.2 Nachweis der Cytohesin-3 Defizienz auf Proteinebene

Da die Funktionen von dem Protein Cytohesin-3 ausgeführt werden, war es essentiell, die Cytohesin-3 Defizienz der Knockout-Mäuse auch auf Proteinebene nachzuweisen. Hierzu wurden Milzen aus drei  $Cyth3^{+/+}$  und drei  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen präpariert. Aus ihnen wurden die Splenozyten isoliert, um anschließend die Proteinexpression von Cytohesin-3 in den Zelllysaten zu bestimmen. Mit den Zelllysaten wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt, auf dem später Cytohesin-3 Proteine nachgewiesen wurden. Als Ladekontrolle wurde Tubulin (Haushaltsgen) angefärbt. Abbildung 3.10 zeigt, dass nur in Proben aus  $Cyth3^{+/+}$  Mäusen das Cytohesin-3 Protein nachgewiesen werden konnte. Die Proben aus  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen hingegen waren defizient für das Cytohesin-3 Protein.

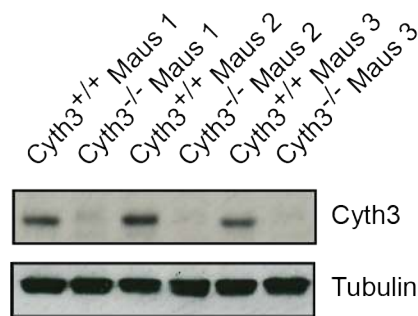


Abbildung 3.10: **Cyth3<sup>-/-</sup> Mäuse exprimieren kein Cytohesin-3 auf Proteinebene.** Mit den Zelllysaten der Splenozyten von drei Cyth3<sup>+/+</sup> und drei Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen (n=3) wurde eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Nachgewiesen wurde die Expression von Cytohesin-3. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich die Expression von Tubulin nachgewiesen.

### 3.4.3 Junge (6-8 Wochen alte) Cyth3<sup>-/-</sup> Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede im Gewicht ihrer Organe und Gewebestrukturen auf

Bevor wir den Einfluss der Cytohesin-3 Defizienz auf die T-Zellaktivierung der Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht haben, wurde zunächst festgestellt, ob die Cyth3<sup>-/-</sup> Mäuse offensichtliche Phänotypen aufweisen wie z.B. Unterschiede im Gewicht ihrer Organe. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Jux von 6-8 Wochen alten wt und Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen eine Reihe von Organen und Geweben isoliert und an der Feinwaage eingewogen. Es wurde entschieden, 6-8 Wochen alte Mäuse zu verwenden, weil dies das Alter der Mäuse ist, mit denen die meisten Experimente dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden. Zu den Organen und Geweben, die analysiert wurden gehören: Milz, Lunge, Gehirn, Niere, Herz, Testis, Leber, Muskel, subkutanes (sc) Fett, epididymales (epi) Fett und der Pankreas. Wie die Abbildung 3.11 zeigt, konnten für keines der untersuchten Organe oder Gewebe signifikante Gewichtsunterschiede zwischen wt und Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden.



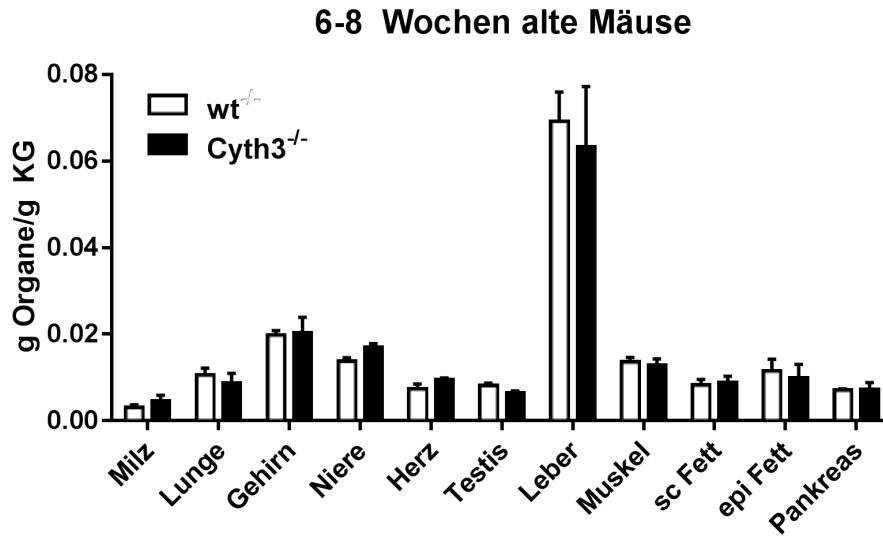


Abbildung 3.11: 6-8 Wochen alte  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede im Gewicht ihrer Organe und Gewebestrukturen auf. Die Organe und Gewebe wurden von 6-8 Wochen alten wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen isoliert und anschließend deren Gewicht bestimmt. In der Grafik ist der Mittelwert des Gewichts der Organe/Gewebe pro g Körpergewicht von jeweils 6 wt und  $Cyth3^{-/-}$  (n=6) Mäusen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.

#### 3.4.4 $Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf

Da das Hauptaugenmerk dieser Doktorarbeit auf der Analyse des Einflusses von Cytohesin-3 auf T-Zellfunktionen liegt, war es von besonderem Interesse, festzustellen, ob die Defizienz von Cytohesin-3 offensichtliche Veränderungen im Lymphozytenkompartiment auslöst. Um dies zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Jux die Milz und periphere Lymphknoten von wt und  $Cyth3^{-/-}$ -Mäusen isoliert und ihre T-Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurden die Milz- sowie Lymphknotenzellen gegen CD4 und CD8 gefärbt, um die T-Zellen in diese zwei Subpopulationen aufzuteilen. Weiterhin wurde CD44 und CD62l angefärbt, um die T-Zellpopulationen weiter in naive ( $CD62L^{hoch}$   $CD44^{niedrig}$ ), T-Effektor- ( $CD62L^{niedrig}$   $CD44^{hoch}$ ) und -Gedächtniszellen ( $CD62L^{hoch}$   $CD44^{hoch}$ ) aufzuteilen. CD62L ist ein Zelladhäsionsmolekül, das eine wichtige Rolle bei der Interaktion der T-Zellen mit Endothelzellen spielt. Die Expression von CD62L ermöglicht es den T-Zellen, in sekundäre lymphatische Gewebe einzudringen. Dies ist besonders wichtig für naive T-Zellen, die noch nicht durch ihr spezifisches Antigen aktiviert wurden. Naive T-Zellen müssen in sekundäre lymphatische Gewebe wie Lymphknoten einwandern können, um dort von APCs ihr spezifisches Antigen präsentiert zu bekommen. Weiterhin exprimieren auch T-Gedächtniszellen CD62L, um in Lymphknoten zu gelangen und auf ein weiteres Auftreten ihres Antigens zu warten. T-Effektorzellen exprimieren kein CD62L, da sie nicht in sekundären lymphatischen Geweben gebraucht werden, sondern in der Peripherie ihre Effektor-Funktion ausüben [187]. Bei CD44 handelt es sich um einen

Rezeptor für Hyaluronsäure, der die Zellkontakte und Kontakte mit der extrazellulären Matrix vermittelt. Es ist bekannt, dass CD44 von T-Gedächtniszellen exprimiert und als Marker für sie verwendet wird, jedoch ist seine genaue Funktion unbekannt [188].

Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, konnten weder in der Milz noch in den peripheren Lymphknoten von wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen signifikante Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der T-Zellpopulationen gefunden werden. Dies gilt sowohl für den Anteil an CD4 und CD8 positiven T-Zellen als auch für die Aufteilung dieser Zellen in naive T-Effektor- und T-Gedächtniszellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Defizienz von Cytohesin-3 keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des T-Zellkompartiments der  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse hat.

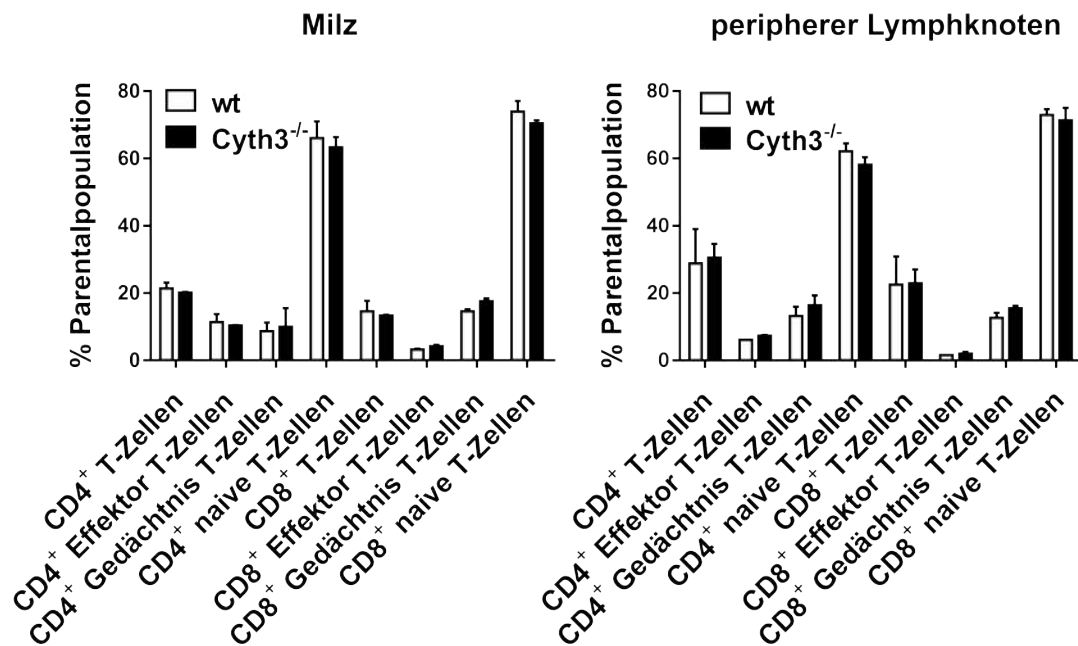


Abbildung 3.12:  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf. Die Milz und periphere Lymphknoten von wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen wurden isoliert und per Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde CD4, CD8 sowie zur Unterscheidung zwischen naiven ( $CD62L^{hoch} CD44^{niedrig}$ ), T-Effektor- ( $CD62L^{niedrig} CD44^{hoch}$ ) und T-Gedächtniszellen ( $CD62L^{hoch} CD44^{hoch}$ ) CD44 und CD62L angefärbt. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der unterschiedlichen T-Zellpopulationen an ihrer parental Population von jeweils 8 wt ( $n=8$ ) und 7  $Cyth3^{-/-}$  ( $n=7$ ) Mäusen mit der Standardabweichung (SD). Die Parentalpopulation der  $CD4^{+}$  und  $CD8^{+}$  T-Zellen sind hierbei jeweils die lebendigen Zellen.

### 3.4.5 $Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der absoluten Zellzahl immunologisch relevanter Organe auf

Neben dem Gewicht einzelner Organe (siehe Abschnitt 3.4.4) wurde auch analysiert, ob die Defizienz von Cytohesin-3 Einfluss auf die absolute Zellzahl immunologisch relevanter Organe wie der Milz, peripherer Lymphknoten und des Knochenmarks haben. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Jux die einzelnen Organe von wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen präpariert und aus ihnen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Mittels Durchfluss-

zytometrie wurde die Zellzahl der Einzelzellsuspensionen bestimmt. Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den absoluten Zellzahlen der immunologisch relevanten Organe von wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen gefunden werden.

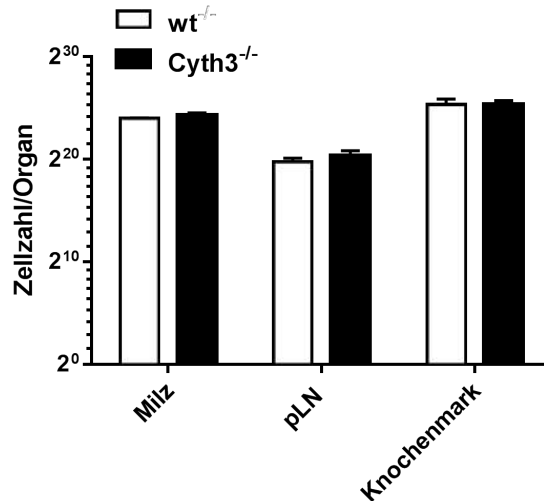


Abbildung 3.13:  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse weisen keine phänotypischen Unterschiede in der absoluten Zellzahl immunologisch relevanter Organe auf. Die Milz, periphere Lymphknoten (pLN) und das Knochenmark wurden aus wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen isoliert und aus ihnen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Mittels FACS wurde die Zellzahl der Einzelzellsuspensionen bestimmt. Dargestellt ist die absolute Zellzahl der Organe von jeweils 2 wt (n=2) und 4  $Cyth3^{-/-}$  (n=4) Mäusen mit der Standardabweichung (SD).

#### 3.4.6 $Cyth3^{-/-}$ Mäuse haben eine reduzierte Lebenserwartung

Um zu untersuchen, ob die Cytohesin-3 Defizienz Langzeitfolgen für die Mäuse und ihre Lebenserwartung hat, wurde das Überleben von 10 wt und 15  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen über einen Zeitraum von 100 Wochen untersucht. Abbildung 3.14 zeigt eindeutig, dass  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu wt Mäusen eine geringere Lebenserwartung haben. Während die ersten  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse bereits nach 40 Wochen starben, dauerte es bei den ersten wt Mäusen doppelt so lange. Nach 100 Wochen lebten lediglich noch 60 % der  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse, während noch ca. 90 % der wt Tiere am Leben waren. Dies belegt eindeutig, dass die Defizienz von Cytohesin-3 einen negativen Langzeiteffekt auf das Überleben der Mäuse hat.

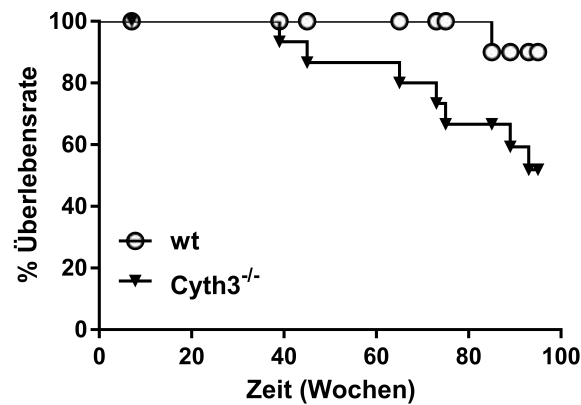


Abbildung 3.14: **Cy $th3^{-/-}$  Mäuse haben eine reduzierte Lebenserwartung.** Das Überleben von 10 wt (n=6) und 15 Cy $th3^{-/-}$  (n=15) Mäuse wurde über einen Zeitraum von 100 Wochen untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an lebenden wt und Cy $th3^{-/-}$  Mäusen zu den entsprechenden Zeitpunkten.

### 3.4.7 Seneszenz (50-100 Wochen alte) Cy $th3^{-/-}$ Mäuse zeigen einen Fellphänotyp

Während der Langzeituntersuchung der Lebenserwartung von Cy $th3^{-/-}$  Mäusen (siehe 3.4.6) entdeckten wir, dass die Cy $th3^{-/-}$  Mäuse Veränderungen in ihrem Fell aufwiesen. Rein durch die äußerliche Betrachtung von  $n > 10$  alten Mäusen war es möglich, wt und Cy $th3^{-/-}$  Mäuse zu differenzieren, da die Knockout-Mäuse im Vergleich zu den wt Tieren ein wesentlich struppigeres und zerzausteres Fell aufwiesen. Abbildung 3.15 enthält zwei Fotos, auf denen jeweils eine wt Maus mit normalem Fell und eine Cy $th3^{-/-}$  Maus mit dem Fellphänotyp abgebildet ist.

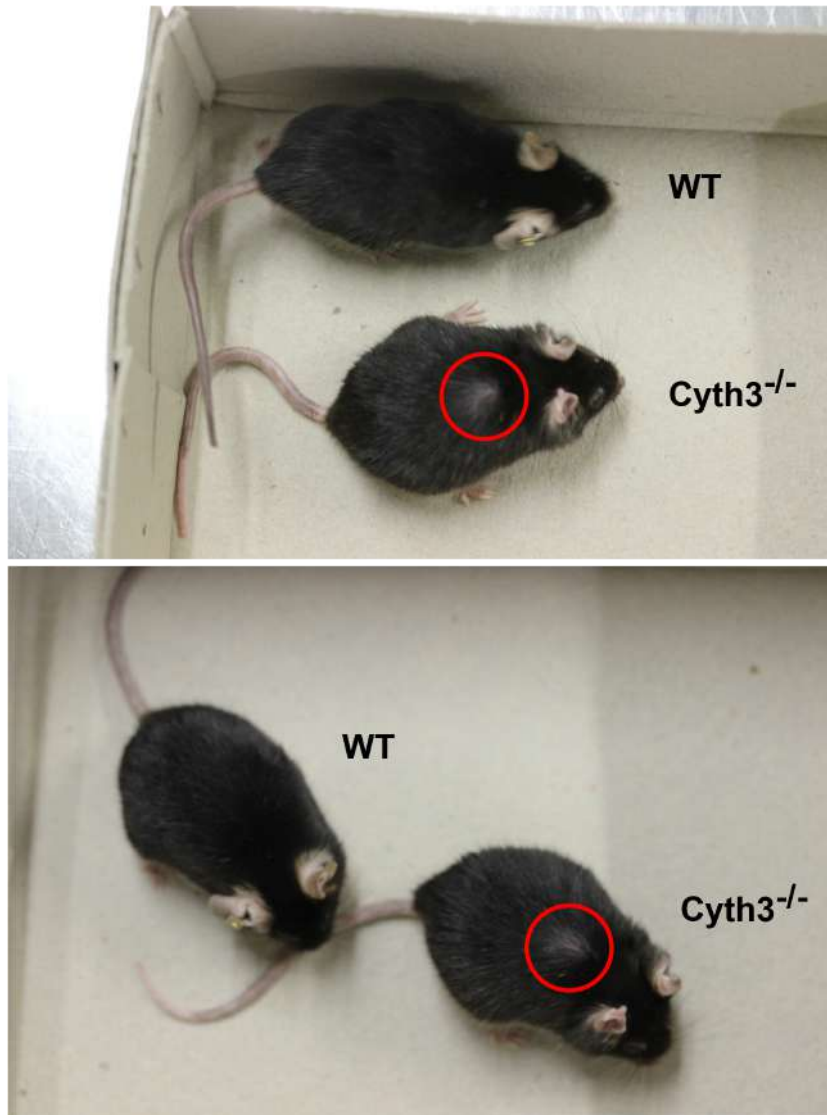


Abbildung 3.15: Seneszente (50-100 Wochen alte)  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse zeigen einen Fellphänotyp. Dargestellt sind zwei Fotos von 4 mindestens 70 Wochen alten wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen. Mit dem roten Kreis ist die auffällige Fellstruktur der  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse markiert.

#### 3.4.8 Seneszente (20-100 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse weisen im Vergleich zu wt Mäusen eine Gewichtsreduktion auf

Im Verlauf des Langzeitexperimentes zur Untersuchung der Lebenserwartung von  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen (siehe 3.4.6) wurde in regelmäßigen Abständen das Gewicht der beteiligten Mäuse bestimmt. Wie in Abbildung 3.16 darstellt, ist das Gewicht der jungen (bis 20 Wochen alten)  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den wt Kontrollen unverändert. Allerdings konnten wir feststellen, dass ab einem Alter von ca. 20 Wochen das Gewicht der  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den wt Kontrollen stark reduziert ist. Während das Gewicht der wt Tiere zwischen 30 und 35 g lag, erreichten die  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse durchschnittlich nur ein Gewicht von ca. 26 g. Dies entspricht einem um 20 % reduzierten Gewicht.

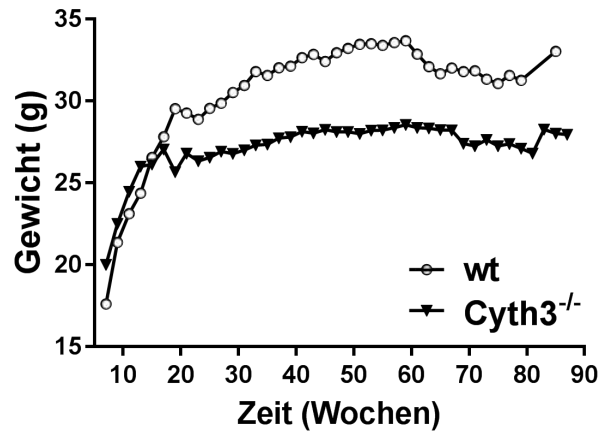


Abbildung 3.16: Seneszente (20-100 Wochen alte)  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse weisen im Vergleich zu wt Mäusen eine Gewichtsreduktion auf. Das Körpergewicht von 6 (n=10) wt und 15 (n=15)  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen wurde über einen Zeitraum von 90 Wochen alle zwei Wochen bestimmt. Aufgetragen ist der Durchschnitt des Körpergewichts der wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse zu den entsprechenden Zeitpunkten.

### 3.4.9 Seneszente (70-100 Wochen alte) $Cyth3^{-/-}$ Mäuse enthalten weniger epididymales Fett als wt Mäuse

Um zu untersuchen, welche Organe oder Gewebe der seneszenten  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse ein geringeres Gewicht aufweisen und somit für den Gewichtsphänotyp, der in Abschnitt 3.4.8 beschrieben wurde, verantwortlich sind, wurde ähnlich wie bei den jungen  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen (siehe Abschnitt 3.4.3) in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Jux das Gewicht verschiedenster Organe und Gewebe der seneszenten 70-100 Wochen alten  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse untersucht. Zu den Organen und Geweben, die analysiert wurden, gehören Milz, Lunge, Gehirn, Niere, Herz, Testis, Leber, Muskel, subkutanes (sc) Fett, epididymales (epi) Fett und der Pankreas. In Abbildung 3.17 ist deutlich zu erkennen, dass sich signifikante Unterschiede zwischen wt und  $Cyth3^{-/-}$  Mäusen bezüglich der Menge des epididymalen Fettes ausgebildet haben. Für alle weiteren untersuchten Organe und Gewebe konnte, wie auch schon bei den Jungtieren, kein Unterschied festgestellt werden. Das Ergebnis spricht dafür, dass das reduzierte Körpergewicht der seneszenten  $Cyth3^{-/-}$  Mäuse auf eine verminderte Ausbildung von epididymalem Fett zurückzuführen ist.

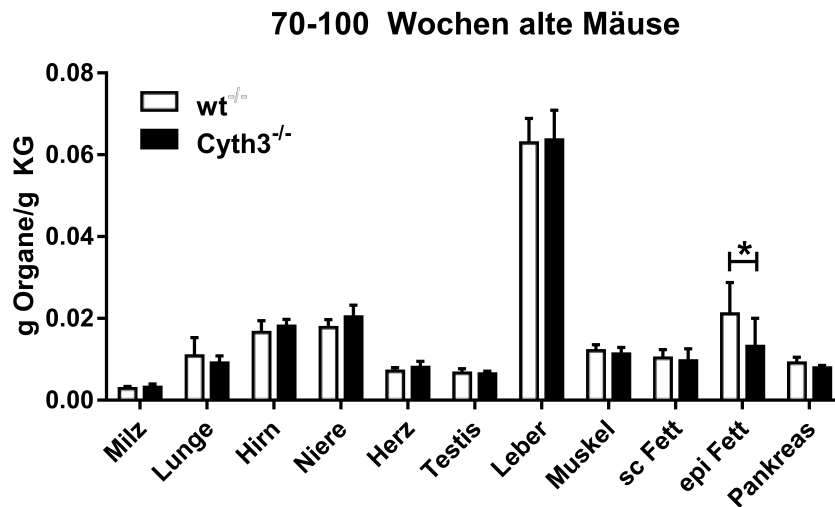


Abbildung 3.17: Seneszente (70-100 Wochen alte) Cyth3<sup>-/-</sup> Mäuse enthalten weniger epididymales Fett als wt Mäuse. Die Organe und Gewebe wurden von 70-100 Wochen alten wt und Cyth3<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und eingewogen. In der Grafik ist der Mittelwert des Gewichts der Organe/Gewebe pro g Körpergewicht von 6 wt und Cyth3<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.05 = *$  (t-test)

### 3.5 6-8 Wochen alte Arl4d<sup>-/-</sup> Mäuse weisen keine phänotypischen Auffälligkeiten in Gewicht und der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf

Da in dieser Arbeit neben der Funktion von Cytohesin-3 auch die Funktion von Arl4d im T-Zellkompartiment untersucht wurde, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl und Bernd Geers eine Phänotypisierung der Arl4d-Maus durchgeführt. Hierbei wurden im Gegensatz zu den Cyth-3<sup>-/-</sup> Mäusen nur junge Arl4d<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht, da alle Experimente zur Untersuchung der Funktion von Arl4d in T-Zellen mit jungen Arl4d<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt wurden. Diese Mäuse weisen genau wie die jungen Cyth-3<sup>-/-</sup> Mäuse (Details in den Abschnitten 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5 und 3.4.8) keine phänotypischen Auffälligkeiten im Gewicht, Zellzahl/Organ oder in der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf.

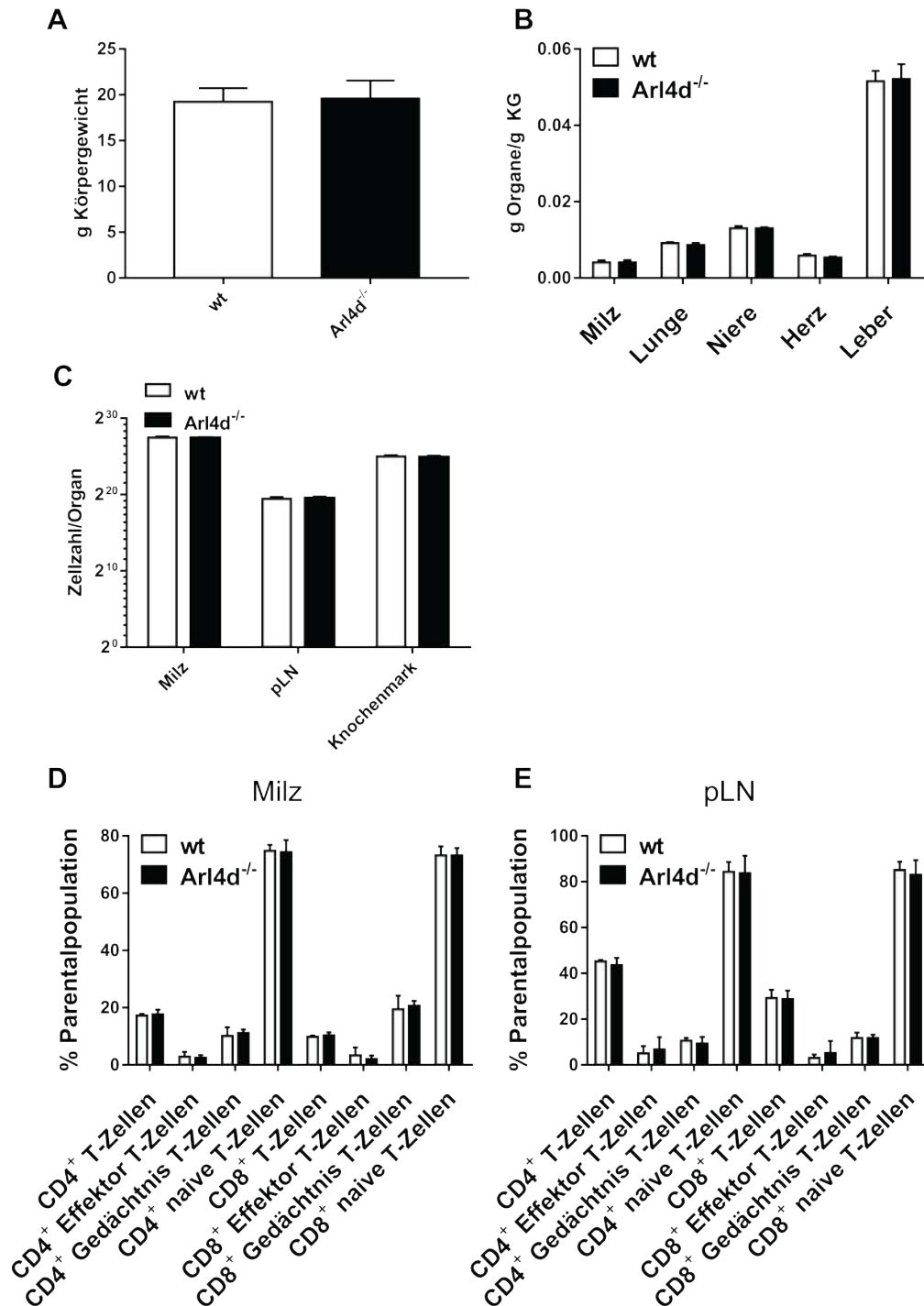


Abbildung 3.18: Junge (6-8 Wochen alte)  $Arl4d^{-/-}$  Mäuse weisen keine phänotypischen Auffälligkeiten in Gewicht und der zellulären Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf. (A) Das Körpergewicht von 6-8 Wochen alten wt und  $Arl4d^{-/-}$  Mäusen wurde bestimmt. (B) Anschließend wurden die Organe und Gewebe der Mäuse isoliert und deren Gewicht bestimmt. (C) Aus der Milz, den peripheren Lymphknoten (pLN) und dem Knochenmark wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die absolute Zellzahl der Einzelzellsuspensionen bestimmt. Die Milz (D) und peripheren Lymphknoten (E) von wt und  $Arl4d^{-/-}$  Mäusen wurden isoliert und per Durchflusszytometrie analysiert. Zur Differenzierung der T-Zellpopulationen wurden CD4 und CD8 angefärbt. Weiterhin wurde zur Unterscheidung zwischen naiven ( $CD62L^{hoch} CD44^{niedrig}$ ), T-Effektor- ( $CD62L^{niedrig} CD44^{hoch}$ ) und T-Gedächtniszellen ( $CD62L^{hoch} CD44^{hoch}$ ) CD44 und CD62L angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der unterschiedlichen T-Zellpopulationen an ihrer parental Population. Die Parentalpopulation der  $CD4^{+}$  und  $CD8^{+}$  T-Zellen besteht hierbei jeweils aus den lebendigen Zellen. In allen Grafiken ist jeweils der Mittelwert von 4 wt und  $Arl4d^{-/-}$  ( $n=4$ ) Mäusen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.



### 3.6 $Cyth3^{-/-}$ und $Arl4d^{-/-}$ T-Zellen produzieren mehr IL-2 als wt T-Zellen

In den Abschnitten 3.4.3- 3.4.5 und 3.5 konnte gezeigt werden, dass die jungen  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  Mäuse sich gerade im immunologischen Kompartiment nicht von jungen wt Tieren unterscheiden. Diese Beobachtungen wurden allerdings nur in Tieren bzw. mit T-Zellen gemacht, die keinem immunologischen Druck ausgesetzt waren. Da in den Abschnitten 3.1 und 3.2 eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Cytohesin-3 und  $Arl4d$ -Expression in murinen sowie humanen T-Zellen in aktivierten und anergen Zellen spezifisch reguliert ist und der Zustand der Aktivierung bzw. Anergisierung von naiven T-Zellen nur durch immunologischen Druck bzw. Stimulationen erreicht werden kann, wurde untersucht, ob  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen nach Stimulation phänotypische Veränderungen aufweisen [189]. Eines der Hauptmarkenzeichen der T-Zellaktivierung ist die gesteigerte Produktion des Cytokins IL-2 (siehe Abschnitt 1.1.5). Da die Induktion der IL-2 Produktion eines der Ergebnisse des T-Zellaktivierungs-Signalweges ist (siehe Abschnitt 1.1.2), sollten Proteine, die eine Rolle im T-Zellaktivierungs-Signalweg spielen, Einfluss auf die IL-2 Produktion haben. Daher wurde untersucht, ob  $Cyth3^{-/-}$  und/oder  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen nach der Stimulation eine veränderte IL-2 Produktion aufweisen.

Hierzu wurde in einem ersten Schritt aus den Milzen und Lymphknoten von wt und  $Cyth3^{-/-}$  sowie  $Arl4d^{-/-}$  Mäusen  $CD8^+$ T-Zellen mittels MACS-Verfahren isoliert. Anschließend wurde die T-Zellaktivierung und damit auch die IL-2 Produktion, wie auch schon in den Experimenten der Abschnitte 3.1 und 3.2 durch die Zugabe von anti-CD3/CD28 Antikörpern induziert. Nach 72 h Stimulation wurde der Überstand der Zellen entnommen und mittels ELISA-Verfahren die Konzentration von IL-2 bestimmt. Als Kontrolle fungierten unstimulierte Zellen. Abbildung 3.19 zeigt deutlich, dass die Zugabe von anti-CD3/CD28 Antikörpern die Produktion von IL-2 anregt. Sowohl im Überstand der stimulierten wt T-Zellen als auch im Überstand der Cytohesin-3- und  $Arl4d$ -defizienten T-Zellen konnte IL-2 in Konzentrationen zwischen 1500 und 3500 pg/ml festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnte in den Überständen der unstimulierten Proben der wt und Knockout T-Zellen kaum IL-2 nachgewiesen werden. Dies belegt, dass die Stimulation der T-Zellen und damit die Induktion der IL-2 Produktion durch die anti-CD3/CD28 Antikörper erfolgreich war. Weiterhin lässt sich erkennen, dass es große Unterschiede bei der Menge des produzierten IL-2 zwischen wt und Knockout T-Zellen gibt. Während im Überstand der wt Zellen im Durchschnitt ca. 2000 pg/ml IL-2 nachgewiesen wurde, konnte in den Überständen der Cytohesin-3 defizienten T-Zellen ca. 3700 pg/ml IL-2 und in den Überständen der  $Arl4d$ -defizienten T-Zellen ca. 3500 pg/ml IL-2 nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen wesentlich mehr IL-2 produzieren als die wt Kontrollen. Im Umkehrschluss sollte dies gleichzeitig bedeuten, dass das Cytohesin-3 und  $Arl4d$ -Protein eine inhibierende Wirkung auf die IL-2 Produktion hat. Ein weiterer Beleg dafür, dass insbesondere Cytohesin-3 die IL-2 Produktion beeinflusst, kam durch ein Experiment von Dr. Jessica Grell, bei dem sie zeigen konnte, dass siRNA-vermittelte Herunterregulation von

Cytohesin-3 zu einer gesteigerten IL-2 Promotoraktivität führt (unveröffentlichte Daten).

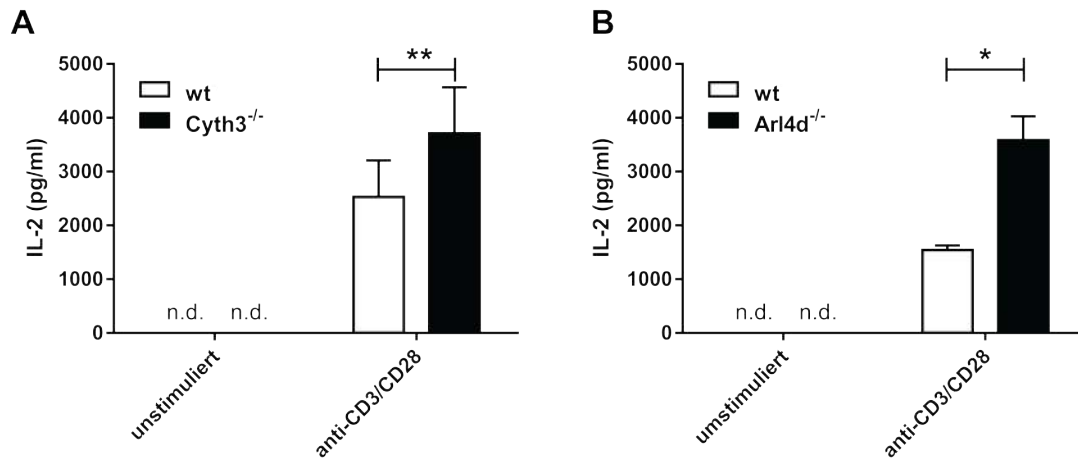


Abbildung 3.19: **Cyth3<sup>-/-</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen produzieren mehr IL-2 als wt T-Zellen.** Wt, Cyth3<sup>-/-</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Anschließend wurde die IL-2 Konzentration im Überstand der Zellen mittels ELISA bestimmt. Die Grafiken zeigen den Mittelwert der gemessenen IL-2 Konzentration des Überstandes mit der Standardabweichung (SD) von jeweils 6 wt und Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen (n=6), sowie 3 Arl4d<sup>-/-</sup> Mäusen mit den entsprechenden wt Kontrollmäusen (n=3).  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ , (t-test) n. d. Die Messerwerte waren zu gering für eine genaue Bestimmung

### 3.7 Cyth3<sup>-/-</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen produzieren mehr proinflammatorische Cytokine als wt T-Zellen

Da in Abschnitt 3.6 gezeigt werden konnte, dass Cytohesin-3 und Arl4d an der Regulation der Produktion des Cytokins IL-2 entscheidend beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob neben IL-2 Cytohesin-3 und Arl4d auch eine Rolle bei der Regulation weiterer Cytokine spielen. Weil die in 3.6 verwendete Methode des ELISA zur Analyse der IL-2 Konzentration im Überstand von stimulierten Zellen nur erlaubt, ein Cytokin simultan zu messen, wechselten wir die Analyse-Methode für das folgende Experiment. Mit Hilfe des *Cytometric Bead Array* (CBA) (siehe 2.3.10) ist es möglich, die Konzentration einer Vielzahl von Cytokinen in einer Probe gleichzeitig zu bestimmen. Wie in 3.6 beschrieben, wurden wieder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Cyth3<sup>-/-</sup> sowie Arl4d<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und anschließend mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert, um sie zu aktivieren, was die Produktion der Cytokine anregt. Als Kontrolle dienten wieder unstimulierte Zellen. Von den Überständen der stimulierten Zellen wurden alle 24 h für 72 h Proben entnommen, in denen die Konzentration der Cytokine IL-6, -17 sowie TNF $\alpha$  bestimmt wurde. Das Ergebnis eines exemplarischen von drei Experimenten ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Diese Darstellungsweise wurde gewählt, da sich zwischen den drei Experimenten größere kinetische Schwankungen bei der Produktion einzelner Cytokine gezeigt haben. Die sich abzeichnenden Unterschiede zwischen wt und Knockout-Proben war aber über alle drei Experimente ähnlich. Insbesondere fällt auf, dass die Kinetik der Cytokin-Produktion für die abgebildeten Cytokine bei CD8<sup>+</sup>

$Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen fast identisch ist. Für jedes der gemessenen und hier abgebildeten Cytokine zeigte sich, dass die Knockout-Zellen über einen Zeitraum von 48 h im Vergleich zu ihren wt Kontrollen mehr produzieren. Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen des CBA schließen, dass Cyth3 und Arl4d nicht nur die Regulation von IL-2, sondern auch weiterer proinflammatorischer Cytokine reguliert.

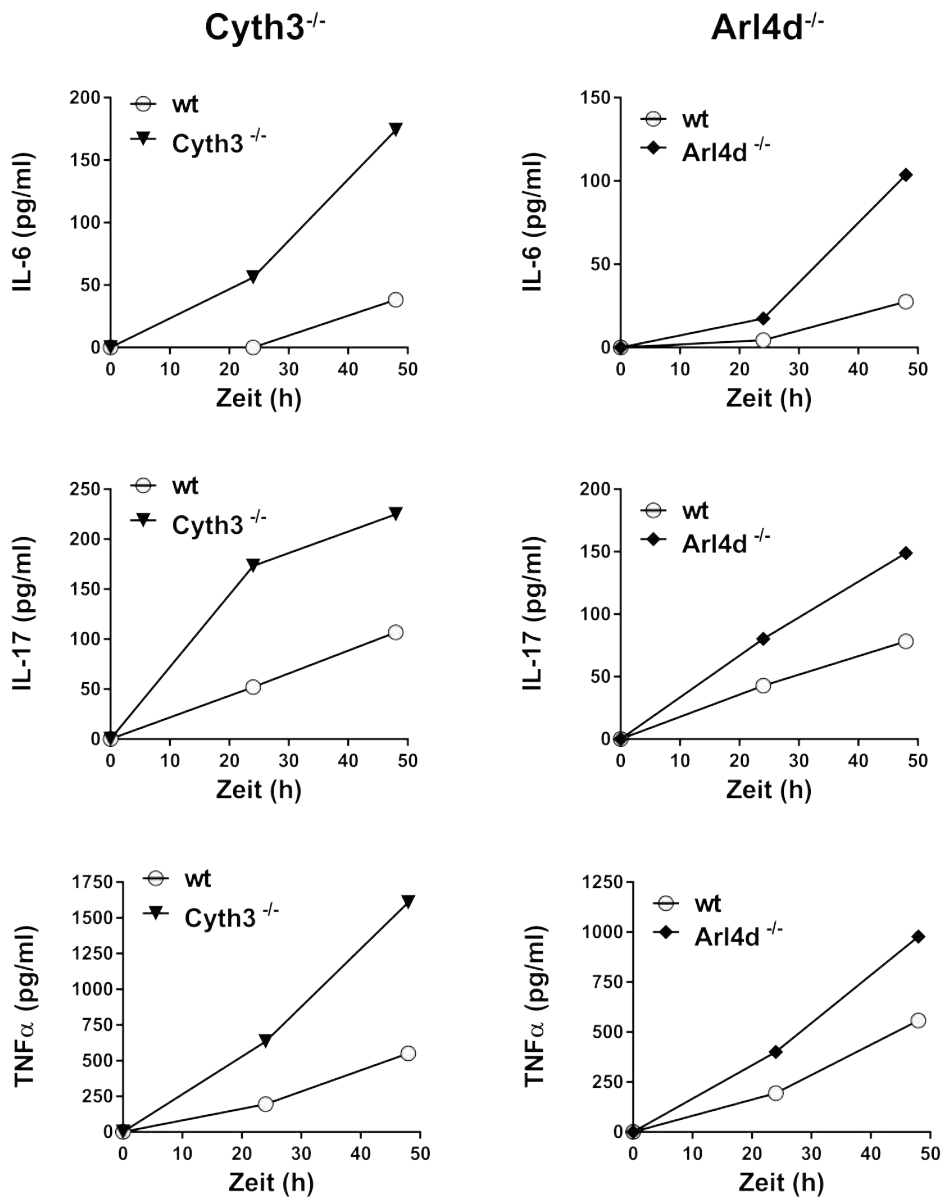


Abbildung 3.20:  $CD8^+Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen produzieren mehr IL-6, IL-17 und TNF $\alpha$  als wt T-Zellen. Wt,  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$   $CD8^+$  T-Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Alle 24 h wurden Proben von den Überständen der Zellen genommen, von denen die Konzentration der Cytokine IL-6, IL-17 und TNF $\alpha$  mittels CBA bestimmt wurde. Abgebildet ist ein exemplarisches Ergebnis von drei Experimenten (n=3).

### 3.8 Analyse der Funktion von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen im Rahmen einer Adenovirus-Infektion (AdGOL) *in vivo*

Bisher konnte gezeigt werden, dass Cytohesin-3 und Arl4d während T-Zellaktivierung und T-Zellenergie sehr ähnlich reguliert werden (siehe Abschnitte 3.1 und 3.2). Weiterhin konnten wir belegen, dass beide Proteine miteinander interagieren (siehe Abschnitt 3.3) sowie eine Rolle bei der Regulation der Produktion von Cytokinen wie IL-2 spielen (siehe Abschnitt 3.6, 3.7). All dies impliziert, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d generell wichtige Regulatoren in immunologischen Zellen wie T-Zellen sind. Die nächste Frage, die wir daher versucht haben zu klären, war, ob Cytohesin-3 und Arl4d eine entscheidende Rolle während Infektionen und deren Abwehr spielen. Der Prozess der Infektionsabwehr ist hier besonders interessant, weil dort die T-Zellen wichtige Funktionen übernehmen, wie detailliert in Abschnitt 1.1.1 beschrieben wurde.

Hierfür wurde ein *in vivo* Infektionsexperiment in Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl und Dr. Julita Mikulec durchgeführt. Ziel des Experimentes war es, den Einfluss von Cytohesin-3 und Arl4d auf die zelluläre Immunantwort bei einer Virusinfektion zu analysieren. Der detaillierte Ablauf des Experimentes ist in Abschnitt 2.5.3 im Material- und Methoden-Teil beschrieben. Zusätzlich ist der Ablauf schematisch in Abbildung 2.13 abgebildet. Kurz zusammengefasst wurden aus wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> oder Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> Mäusen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD62L<sup>hoch</sup> CD44<sup>niedrig</sup>) isoliert. Anschließend wurde eine 1:1 Mischung von wt und ko CD8<sup>+</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen hergestellt und in wt Mäuse mit einem unterschiedlichen kongenen Hintergrund transferiert (i.v.). Dadurch, dass sowohl die transferierten wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen als auch die transferierten Knockout OT-I<sup>+</sup> T-Zellen und die wt Wirtszellen einen unterschiedlichen kongenen Hintergrund hatten, war es möglich, die drei Zellpopulationen in Durchflusszytometrie-Analysen zu unterscheiden (siehe Abschnitt 2.5.3.2). 24 h nach dem Zelltransfer wurden die Wirtsmäuse mit einem rekombinanten Adenovirus (AdGOL) infiziert oder als Kontrolle mit PBS gespritzt. Der Virus infiziert Hepatozyten und induziert die Produktion des Ovalbuminpeptids in den infizierten Zellen, welches wiederum von den transfizierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse täglich an den Schwanzspitzen geblutet. Das Blut wurde daraufhin auf das Vorkommen bzw. die Proliferation der injizierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen, welche spezifisch auf AdGOL-infizierte Zellen reagieren, analysiert. Am 8. Tag des Experimentes wurden die Mäuse getötet und die Milz sowie Leber als Infektionsherd auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> Zellen per Durchflusszytometrie untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der Milz- und Leber-assoziierten Lymphozyten restimuliert und ihre Cytokin-Produktion über intrazelluläre Durchflusszytometrie-Färbung gemessen, um festzustellen, ob auch die Knockout T-Zellen dieses *in vivo* Infektionsexperimentes eine gesteigerte IL-2 Produktion aufweisen.

### 3.8.1 Die AdGOL Infektion löst eine starke zelluläre Immunantwort der transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen aus

In dem ersten Schritt des Experimentes sollte festgestellt werden, ob die AdGOL Infektion der Wirtsmäuse von den transferierten wt bzw.  $Cytl3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird und eine zelluläre Immunantwort auslöst. Um dies zu testen, wurden 4 Tage nach der Infektion mit AdGOL oder PBS als Kontrolle die Wirtsmäuse an der Schwanzvene alle 24 h geblutet und ihr Blut mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen von transferierten Zellen untersucht. Wie in 3.8 bereits erwähnt, unterscheiden sich die Wirtszellen und die transferierten Zellen durch kongene Marker. Während die Wirtszellen CD45.1 positiv und CD45.2 negativ waren, waren die transferierten wt sowie  $Cytl3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen CD45.1 negativ und CD45.2 positiv, was eine klare Unterscheidung im Durchflusszytometer ermöglichte. In Abbildung 3.21 A ist die Durchflusszytometrie-Analyse einer infizierten im Vergleich zu einer uninfizierten (PBS-injizierten) Kontrollmaus dargestellt. Es lässt sich deutlich erkennen, dass im Blut der uninfizierten Maus zwischen Tag 5 und 8 nach der Injektion der PBS-Kontrolle der Anteil an transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen unter einem Prozent in der gesamten CD8<sup>+</sup>T-Zellpopulation liegt. In dieser Maus hat also keine zelluläre Immunantwort der transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen stattgefunden. Im Gegensatz dazu fand man im Blut der mit AdGOL infizierten Maus, dass schon an Tag 4 nach der Infektion bereits über 6 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferierte OT-I<sup>+</sup> T-Zellen waren. Dies steigerte sich an Tag 5 sogar dramatisch auf 29 %, und an Tag 6 auf einen Spitzenwert von 41 %. Während Abbildung 3.21 A lediglich die exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse zweier Mäuse darstellt, ist in Abbildung 3.21 B und C die statistische Analyse aller Mäuse des Experimentes zusammengefasst. Figur B zeigt die Auswertung für die prozentualen Anteile der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen, während in Figur C die Auswertung für die absoluten Zellzahlwerte dargestellt ist. Sowohl Abbildung 3.21 B als auch C belegen, dass die Infektion mit AdGOL zu einer statistisch signifikanten Steigerung des Vorkommens von OT-I<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der infizierten Wirtsmäuse führt. Dies impliziert, dass die AdGOL Infektion von den transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird und diese eine zelluläre Immunantwort auslösen, was wiederum zur Folge hat, dass ihr Vorkommen im Blut der infizierten Mäuse stark ansteigt.

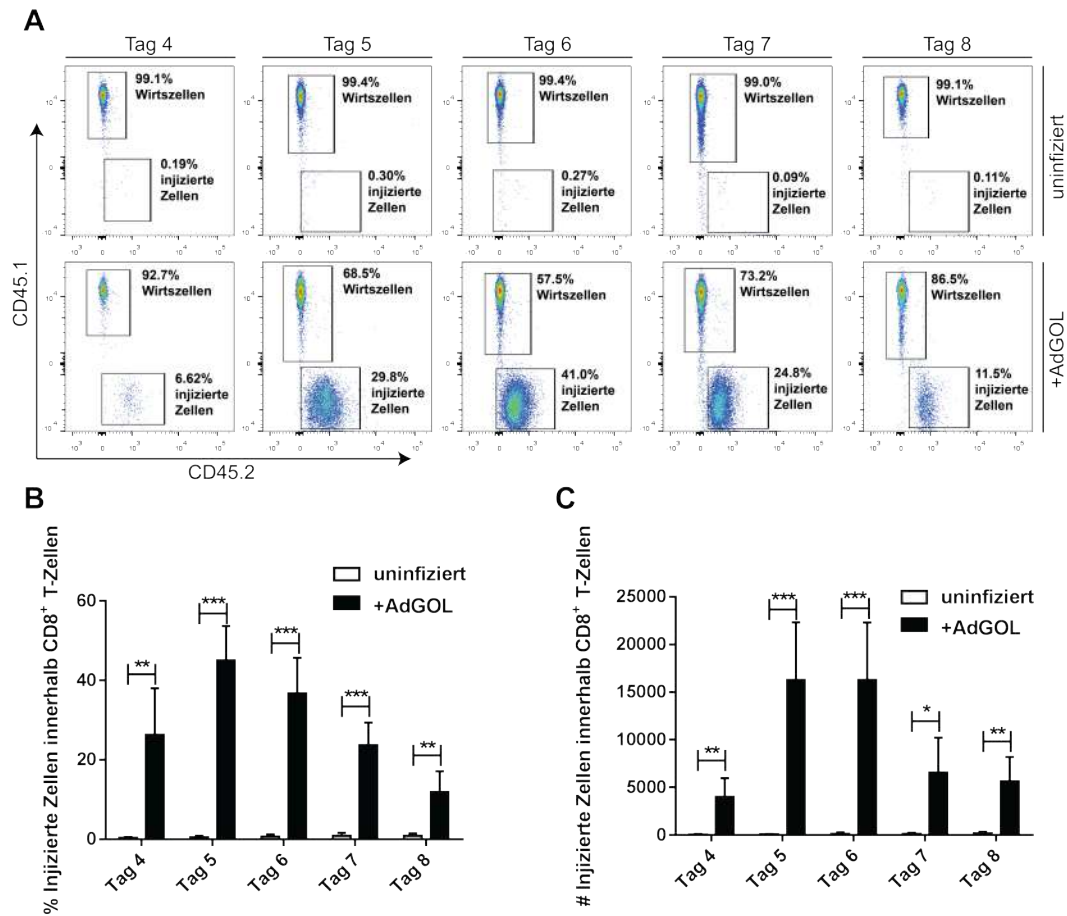


Abbildung 3.21: Die AdGOL Infektion löst eine starke zelluläre Immunantwort der transferierten OT-I<sup>+</sup>T-Zellen aus. Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL oder PBS als Kontrolle injiziert. 4 Tage nach der Infektion wurde das Blut alle 24 h auf das Vorkommen der transferierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in der gesamten CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation analysiert. Figur A zeigt die exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse einer infizierten im Vergleich zu einer uninfizierten Wirtsmaus. Abbildung B (prozentualer Anteil der Populationen) und C (absolute Zellzahlen der Populationen) zeigt die statistische Auswertung aller im Experiment verwendeten Mäuse. In den Grafiken ist der Mittelwert des prozentualen Anteils bzw. der absoluten Zellzahl von jeweils 6 infizierten Mäusen (n=6) und 4 uninfizierten Mäusen (n=4) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.05 = \*, p < 0.01 = \*\*, p < 0.001 = \*\*\* (t-test)

### 3.8.2 Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort gegen AdGOL im Blut *in vivo*

Weil wir in 3.8.1 belegen konnten, dass die AdGOL Infektion zu einer zellulären Immunantwort der transferierten wt und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen führt, stellte sich die Frage, ob beide Zelltypen in gleicher Weise auf die Infektion reagieren oder ob die Defizienz von Cytohesin-3 einen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort hat. Daher wurde analysiert, in welchem Verhältnis die transferten wt und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der infizierten Mäuse auftreten. Da initial die wt und ko Zellen in einem Verhältnis von 1:1 in die Wirtsmäuse gespritzt wurden, würde man erwarten, dass sich auch ein 1:1 Verhältnis der transferten Zellen im Blut der infizierten Wirtsmäuse finden lässt, falls Cytohesin-3

keine Rolle bei der zellulären Immunantwort spielen sollte. Da alle bisherigen Ergebnisse allerdings darauf hindeuten, dass Cytohesin-3 eine Rolle bei der zellulären Immunantwort spielt, sollten sich Unterschiede in Verhältnis der transfizierten Zellen im Blut der infizierten Mäuse finden lassen.

Abbildung 3.22 A zeigt, dass auch 4 Tage nach der Infektion (Beginn der zellulären Immunantwort) die wt und  $Cy3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen fast in einem 1:1 Verhältnis im Blut der infizierten Maus vorkamen. Allerdings veränderte sich dieses Verhältnis innerhalb der nächsten Tage drastisch. So wurde 6 Tage nach der Infektion bereits ein Anteil von ca. 60 %  $Cy3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> im Vergleich zu 40 % wt OT-I<sup>+</sup>T-Zellen im Blut gefunden. Dieses Ungleichgewicht stieg an Tag 7 und 8 noch weiter, so dass ca. 85 % und 90 % der gefundenen transfizierten T-Zellen Cytohesin-3 defizient waren. Da in Abbildung A die exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse von nur einer Maus dargestellt ist, ist in B und C die statistische Analyse aller Mäuse des Experimentes dargestellt. Auch in der Zusammenfassung aller Mäuse des Experimentes zeigte sich, dass die  $Cy3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen die zelluläre Immunantwort im Blut dominieren. Im Durchschnitt waren 8 Tage nach der Infektion ca. 70 % der gemessenen transfizierten Zellen defizient für Cytohesin-3 und nur ca 30 % waren wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Auch die Analyse der absoluten Zellzahlen, die in C abgebildet ist, zeigt ein ähnliches Bild. Insgesamt implizieren die Daten, dass Cytohesin-3 eine entscheidende Rolle bei der zellulären Immunantwort gegen Infektionen *in vivo* spielt, da die defizienten Zellen wesentlich stärker als die wt Zellen reagieren. Wenn die Defizienz von Cytohesin-3 zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort führt, bedeutet dies wiederum, dass das Protein selber eine suppressive Wirkung auf die zelluläre Immunantwort hat.

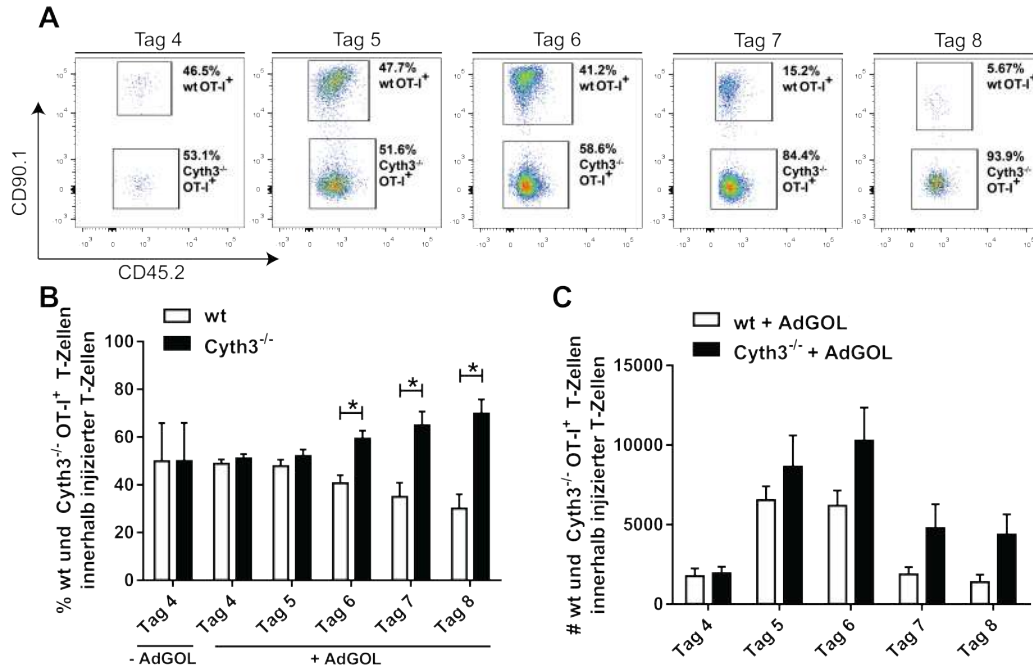


Abbildung 3.22: **Cyth3<sup>-/-</sup>T-Zellen dominieren die zelluläre Immunantwort gegen die AdGOL Infektion im Blut.** Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL oder PBS als Kontrolle injiziert. 4 Tage nach der Infektion wurde das Blut der infizierten Mäuse alle 24 h mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. In Figur A ist eine exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse einer infizierten Maus über einen Zeitraum von 4 Tagen dargestellt. Abbildung B (prozentualer Anteil der Populationen) und C (absolute Zellzahlen der Populationen) zeigen die statistische Auswertung aller im Experiment verwendeten Mäuse. In den Grafiken ist der Mittelwert von jeweils 6 infizierten (n=6) und 4 uninfizierten Mäusen (n=4) mit dem Standardfehler (SEM) dargestellt. p < 0.05 = \* (t-test)

### 3.8.3 Die Cytohesin-3 Defizienz hat keinen Einfluss auf die Differenzierung zu Effektor und Gedächtnis T-Zellen während der AdGOL Infektion *in vivo*

Eine mögliche Erklärung für die in 3.8.2 gezeigte Dominanz der Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup>T-Zellen in der zellulären Immunantwort während der AdGOL Infektion könnte eine bessere Aktivierung und Differenzierung zu Effektor T-Zellen im Vergleich zu wt OT-I<sup>+</sup>T-Zellen sein. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die im Blut der infizierten Mäuse identifizierten wt und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup>T-Zellen weiter auf ihre Expression der Markermoleküle CD44 und CD621 untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.4.4 detailliert beschrieben wurde, dienen diese Markermoleküle dazu, die T-Zellpopulation in naive Effektor und Gedächtnis T-Zellen aufzuteilen. Abbildung 3.23 A zeigt die Durchflusszytometrie-Analyse des Blutes einer mit AdGOL infizierten Maus im Zeitraum von 4 bis 8 Tagen nach der Infektion. Für die Ausbildung von Effektor und Gedächtnis T-Zellen ließen sich keine Unterschiede zwischen den wt und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup>T-Zellen finden. Wie zu erwarten war, waren zu Beginn der zellulären Immunantwort (Tag 4) der Großteil (ca. 95 %) der im Blut identifizierten OT-I<sup>+</sup>T-Zellen Effektor T-Zellen. Es konnten kaum naive T-Zellen (fast 0 %) und nur eine kleine Menge (ca. 5 %) Gedächtnis T-Zellen gefunden werden. Diese Beobachtung galt



sowohl für die wt als für die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen. Den Erwartungen entsprechend veränderte sich das Verhältnis der Effektor zu Gedächtnis T-Zellen während der nächsten 4 Tage. So konnten weiterhin fast keine naiven OT-I<sup>+</sup>T-Zellen im Blut gefunden werden, dafür stieg der prozentuale Anteil der Gedächtnis T-Zellen auf ca. 30 % an Tag 8 an. Dies zog mit sich, dass sich der Anteil an Effektor T-Zellen auf ca. 60 % reduziert hatte. Auch diese Verschiebung zu einem größeren Anteil an Gedächtnis T-Zellen an Tag 8 nach der Infektion war sowohl in der wt als auch Cytohesin-3 defizienten T-Zellpopulation zu finden. Während in Abbildung 3.23 A die exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse von nur einer Maus dargestellt ist, wird in B und C die statistische Analyse der Differenzierung zu Effektor (B) und Gedächtnis (C) T-Zellen aller Mäuse des Experimentes dargestellt. Für beide Zellpopulationen ließen sich, wie schon in der Durchflusszytometrie-Analyse der exemplarischen Maus in Abbildung A angedeutet, keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen feststellen. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Cytohesin-3 Defizienz in T-Zellen zu keinem Unterschied bei der Differenzierung zu Effektor und Gedächtnis T-Zellen führt.

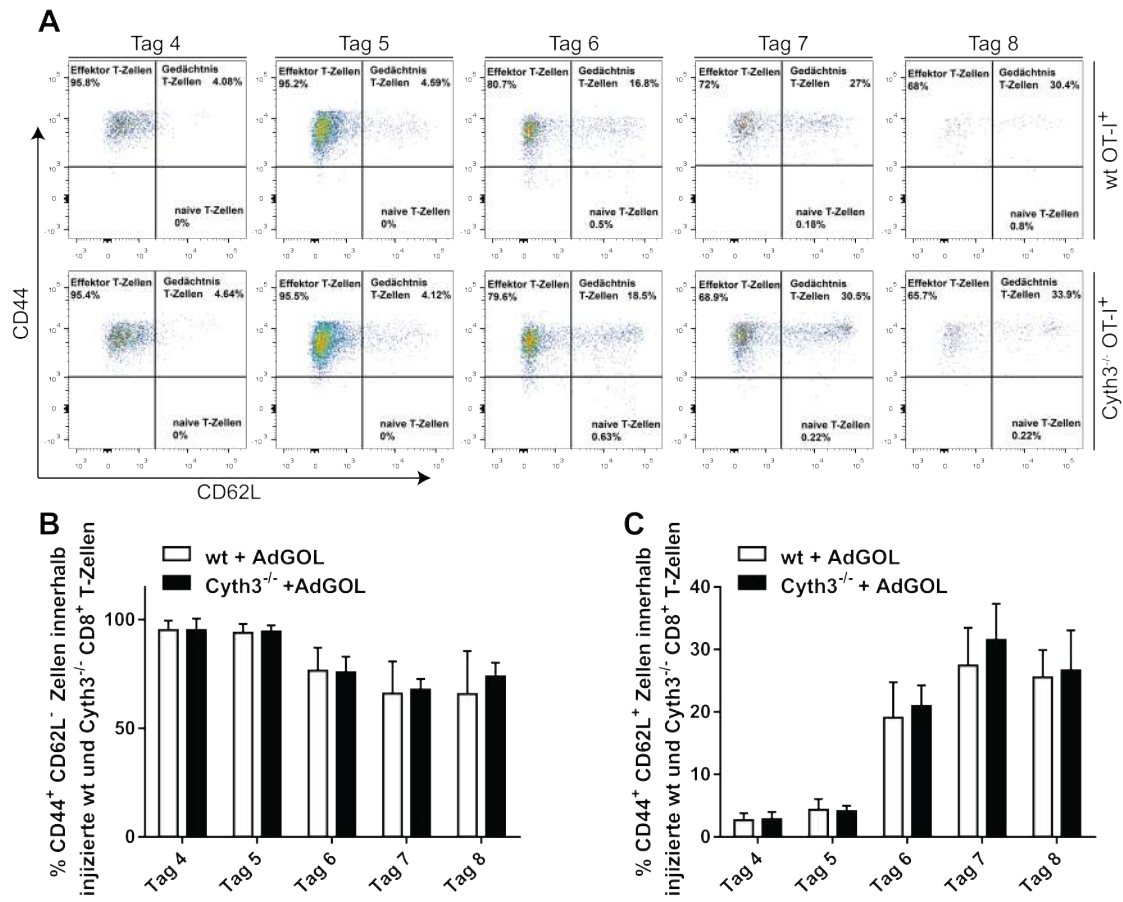


Abbildung 3.23: Die Differenzierung von wt und  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen zu Effektor und Gedächtnis T-Zellen während der AdGOL Infektion *in vivo* ist unverändert. Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurde das Blut der infizierten Mäuse alle 24 h mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen und ihre Expression der Markermoleküle CD44 und CD62L analysiert. Die Expression der Markermoleküle erlaubt eine Aufteilung der T-Zellpopulation in naive, Effektor und Gedächtnis T-Zellen. In Figur A ist eine exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse einer infizierten Maus über einen Zeitraum von 4 Tagen dargestellt. Abbildung B (Effektor T-Zellen) und C (Gedächtnis T-Zellen) zeigen den Mittelwert von 6 infizierten Mäusen (n=6) mit der Standardabweichung (SD).

### 3.8.4 Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort gegen AdGOL in der Milz und Leber *in vivo*

8 Tage nach der Infektion der Mäuse mit AdGOL wurde das Experiment abgebrochen und die Mäuse getötet, um ihre Milz und Leber zu präparieren. Dies ermöglichte zum einen, zu untersuchen, inwieweit die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen auch im Infektionsherd Leber präsent sind und zum anderen konnte ihr Anteil in der Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ bestimmt werden. Abbildung 3.24 zeigt, dass sowohl in der Leber als auch der Milz die zelluläre Immunantwort zum Großteil von  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>T-Zellen durchgeführt wurde. Sowohl im prozentualen Anteil (A, C) als auch in den absoluten Zellzahlen (B, D) dominieren die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup>ihre entsprechenden wt Kontrollen im Verhältnis von 3:1. Diese Beobachtung gilt sowohl für die Leber (A, B) als auch für die Milz (C, D). Aus

diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Cytohesin-3 Defizienz nicht nur zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort im Blut führt, wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, sondern dass sich dieser Phänotyp auch in dem Infektionsherd Leber und in der Milz nachweisen lässt.

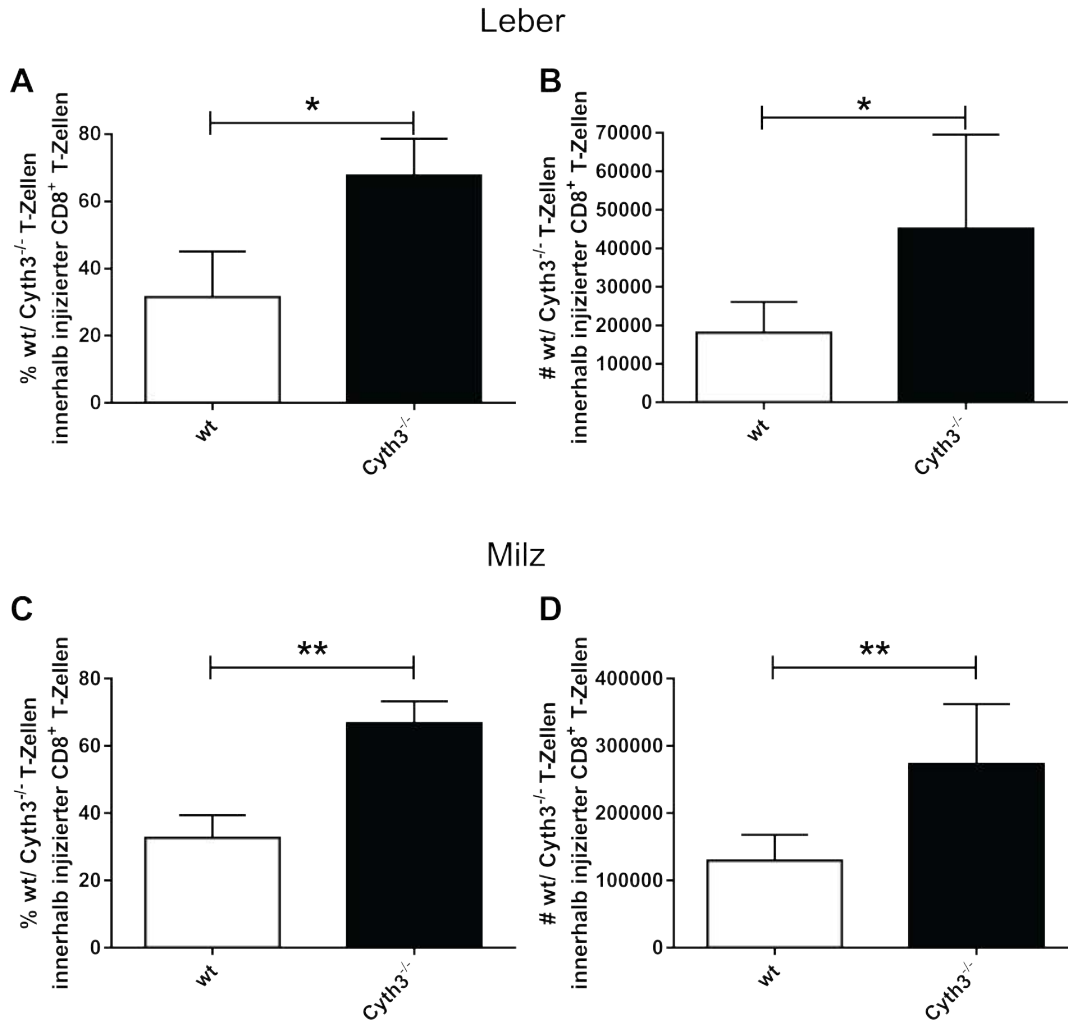


Abbildung 3.24: **Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen dominieren die zelluläre Immunantwort gegen AdGOL in der Leber und Milz *in vivo*.** Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Infektionsherd Leber sowie die Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Mittels Durchflusszytometrie-Analyse wurde das Vorkommen der injizierten wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in den Organen bestimmt. Abbildung **A** (prozentualer Anteil) und **B** (absolute Zellezahlen) zeigen den Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung (SD) von 6 Lebern (n=6) von infizierten Mäusen. Die Abbildungen **C** (prozentualer Anteil) und **D** (absolute Zellzahlen) zeigen den Mittelwert von 6 Milzen (n=6) infizierter Mäuse mit entsprechender Standardabweichung (SD). 0.05 = \*, p < 0.01 = \*\* (t-test)

### 3.8.5 Die $Cyth3^{-/-}$ OT-I<sup>+</sup> T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes haben eine gesteigerte IL-2 und IFN $\gamma$ Produktion im Vergleich zu wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen

In Abschnitt 3.6 und 3.7 konnten wir bereits eindeutig in einem *in vitro* Experiment zeigen, dass die Defizienz von Cytohesin-3 zu einer gesteigerten Produktion von Cytokinen wie z.B. IL-2 durch die T-Zellen führt. Da IL-2, wie in Abschnitt 1.1.5 beschrieben, eine essentielle Rolle bei der Induzierung der Proliferation von T-Zellen spielt, könnte eine gesteigerte Produktion von IL-2 durch die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erklären, warum sie die zelluläre Immunantwort gegen die AdGOL Infektion gegenüber den wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen dominieren. Um zu testen, ob auch die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes eine gesteigerte IL-2 Produktion haben, wurden die isolierten Lymphozyten der Milz der mit AdGOL infizierten Mäuse mit PMA/Ionomycin restimuliert, um ihre IL-2 Produktion anzuregen. Als Kontrolle fungierten unstimulierte Ansätze. Nach der Stimulation wurden die Zellen fixiert und eine Färbung der Markermoleküle CD8, CD45.1, CD45.2 und CD90.1 durchgeführt, um die zwei transfizierten Zellpopulationen sowie die Wirtszellen voneinander unterscheiden zu können. Weiterhin wurde eine intrazelluläre Färbung von IL-2 sowie IFN $\gamma$ , das neben IL-2 das hauptsächlich aktivierende Cytokin für zytotoxische T-Zellen ist, durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Produktion dieser Cytokine treffen zu können [190]. Abbildung 3.8.5 zeigt den prozentualen Anteil an IL-2 (A) und IFN $\gamma$  (B) produzierenden  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> und wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen der Milzen. Es lässt sich eindeutig erkennen, dass sowohl der prozentuale Anteil an IL-2 produzierenden  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen als auch der prozentuale Anteil an IFN $\gamma$  produzierenden  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu ihren wt Kontrollen signifikant höher ist. Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle bis zu 4 mal mehr  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen IL-2 produzierten. Auch bei der Analyse der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der IFN $\gamma$  produzierenden  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen im Schnitt mehr als doppelt so groß ist wie der Anteil an IFN $\gamma$  produzierenden wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen. Insgesamt bestätigen die Daten die Vermutung, dass mehr der transfizierten Cytohesin-3 defizienten T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes IL-2 und IFN $\gamma$  produzieren, was eine mögliche Erklärung für die gesteigerte zelluläre Immunantwort auf die AdGOL Infektion dieser Zellen ist.

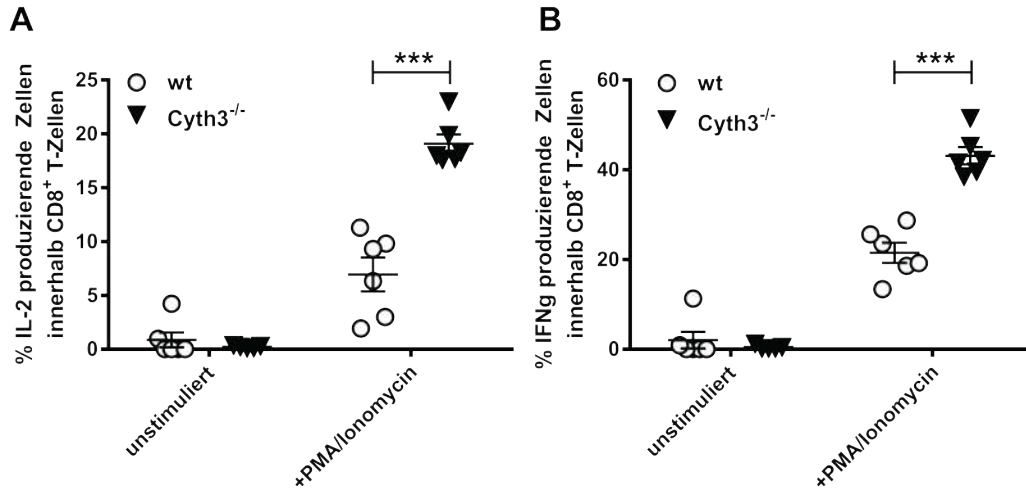


Abbildung 3.25: Die  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes haben eine gesteigerte IL-2 und IFN $\gamma$  Produktion im Vergleich zu wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen. Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Die Milz-assoziierten Lymphozyten wurden zur Induktion der IL-2 Produktion mit PMA/Ionomycin restimuliert. Anschließend wurde eine Färbung von CD8, CD45.1, CD45.2 und CD90.1 durchgeführt, um die transferten wt und Knockout-Zellen sowie die Wirtszellen voneinander im Durchflusszytometrie-Profil zu unterscheiden. Die darauffolgende intrazelluläre Färbung der Cytokine IL-2 und IFN $\gamma$  sollte Aufschluss über die Produktion dieser Cytokine geben. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung (SD) des prozentualen Anteils der IL-2 (A) und IFN $\gamma$  (B) produzierenden T-Zellen der Milz von 6 (n=6) infizierten Mäusen.  $p < 0.001 = ***$  (t-test)

### 3.8.6 $Cyth3^{-/-}$ OT-I<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich verstärkt in *short-lived effector cells* (SLECs)

Da in den Abschnitten 3.6 und 3.8.5 bereits belegt wurde, dass eine Cytohesin-3 Defizienz zu einer gesteigerten IL-2 Produktion führt, sollte dies auch einen Effekt auf die Differenzierung dieser Zellen haben. So ist z.B. bekannt, dass eine verstärkte IL-2 Aufnahme die Differenzierung der T-Zellen zu *short-lived effector cells* (SLECs) induzieren kann [191]. SLECs sind terminal differenzierte Effektor-Zellen, die durch Apoptose nach der Klärung der Infektion absterben [99]. Sie zeichnen sich durch eine hohe Expression des Markers KLRG1 und eine niedrige Expression des Markers CD127 (Untereinheit des IL-7 Rezeptors) aus [192]. Da die transferten  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes (siehe Abschnitt 3.8.5) verstärkt IL-2 produzierten, stellte sich die Frage, ob die verstärkte IL-2 Produktion und Aufnahme zu einer verstärkten Differenzierung zu SLECs führt. Um diese Frage zu klären, wurde während der Analyse des Blutes sowie der Leber und Milz Zellen der infizierten Mäuse die Expression der SLEC-Marker KLRG1 und CD127 auf den T-Zellen bestimmt. Wie in Grafik 3.26 A zu erkennen ist, zeichnet sich bereits 6 Tage nach der Infektion ab, dass im Blut im Vergleich zu den wt Kontrollen verstärkt  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> SLECs gebildet werden. An Tag 7 und 8 ist dieser Unterschied sogar signifikant. Genauso wie im Blut wurden auch in den Organen Leber und Milz (siehe Abbildung 3.26 B und C) signifikant mehr SLECs von den  $Cyth3^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen ge-

bildet. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die verstärkte IL-2 Produktion und Aufnahme der Knockout T-Zellen zu einer veränderten Differenzierung zu SLECs führt.

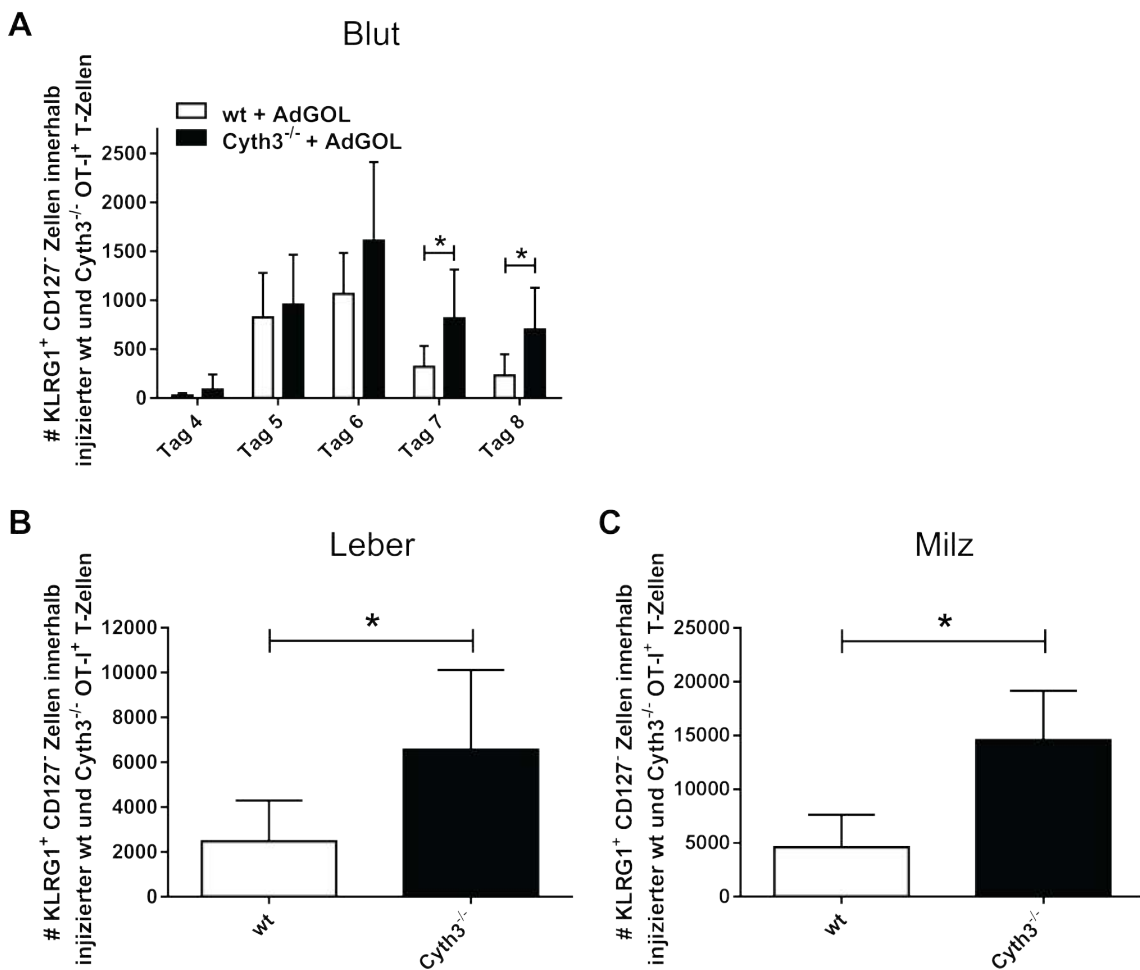


Abbildung 3.26: **Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich verstärkt in *short-lived effector cells* (SLECs).** Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurde das Blut (A) der infizierten Mäuse alle 24 h mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen und deren Expression der Markermoleküle KLRG1 und CD127 analysiert, um festzustellen, wieviele SLECs gebildet wurden. SLECs sind KLRG1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Infektionsherd Leber (B) sowie die Milz (C) als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Anschließend wurde auch in diesen Organen die Expression der Markermoleküle auf den vorhandenen wt und Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. In den Grafiken ist der Mittelwert von jeweils 6 infizierten Mäusen (n=6) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.05 = \* (t-test)

### 3.8.7 Auch Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen dominieren die zelluläre Immunantwort gegen eine AdGOL Infektion und weisen eine gesteigerte IL-2 Produktion auf, die zur verstärkten Differenzierung zu SLECs führt

In den Abschnitten 3.8.1 bis 3.8.6 wurde das *in vivo* Infektionsexperiment ausgewertet, bei dem Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in die Wirtsmäuse gespritzt wurden. Das gleiche Experiment wurde auch in Zusammenarbeit mit Dr. Julita Mikulec und Prof. Linda Diehl

mit  $\text{Arl4d}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Die Auswertung der Daten des Experimentes wurde hierbei größtenteils von Dr. Julita Mikulec durchgeführt [193]. Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Phänotyp der  $\text{Arl4d}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in dem *in vivo* Infektionsexperiment dem der  $\text{Cyth3}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen sehr ähnlich ist.

Wie wir bereits in den Abschnitten 3.8.2 und 3.8.4 detailliert nachgewiesen haben, dass die  $\text{Cyth3}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen die zelluläre Immunantwort gegen die AdGOL Infektion im Blut, der Leber (Infektionsherd) sowie in der Milz im Vergleich zu wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen dominieren, konnten wir vergleichbare Ergebnisse für die  $\text{Arl4d}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen erhalten (siehe Abbildung 3.27). Zusätzlich produzieren auch die  $\text{Arl4d}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt IL-2 und IFN $\gamma$  (siehe Abbildung 3.28), wie wir bereits für die  $\text{Cyth3}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in Abschnitt 3.8.5 belegen konnten. Abbildung 3.29 bestätigt weiterhin, dass die gesteigerte IL-2 Produktion der  $\text{Arl4d}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen genau wie bei den  $\text{Cyth3}^{-/-}$  OT-I<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abschnitt 3.8.6) zu einer verstärkten SLEC-Bildung führt.

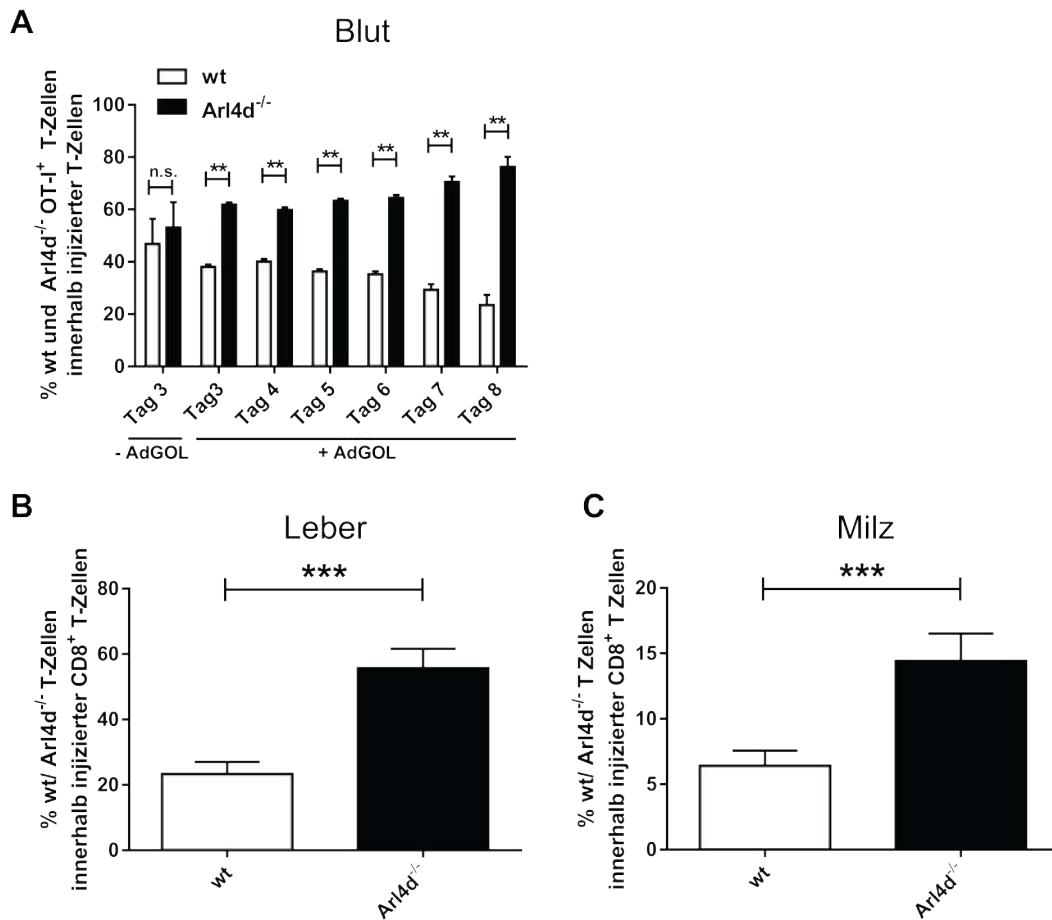


Abbildung 3.27: **Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen dominieren die zelluläre Immunantwort gegen die AdGOL Infektion im Blut, der Leber und der Milz.** Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL oder PBS als Kontrolle injiziert. (A) 3 Tage nach der Infektion wurde das Blut der infizierten Mäuse alle 24 h mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen der wt OT-I<sup>+</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Infektionsherd Leber (B) sowie die Milz (C) als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Mittels Durchflusszytometrie-Analyse wurde der prozentuale Anteil der injizierten wt OT-I<sup>+</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen in den Organen bestimmt. In den Grafiken ist der Mittelwert von jeweils 6 infizierten (n=6) und 4 uninfizierten Mäusen (n=4) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$  (t-test)



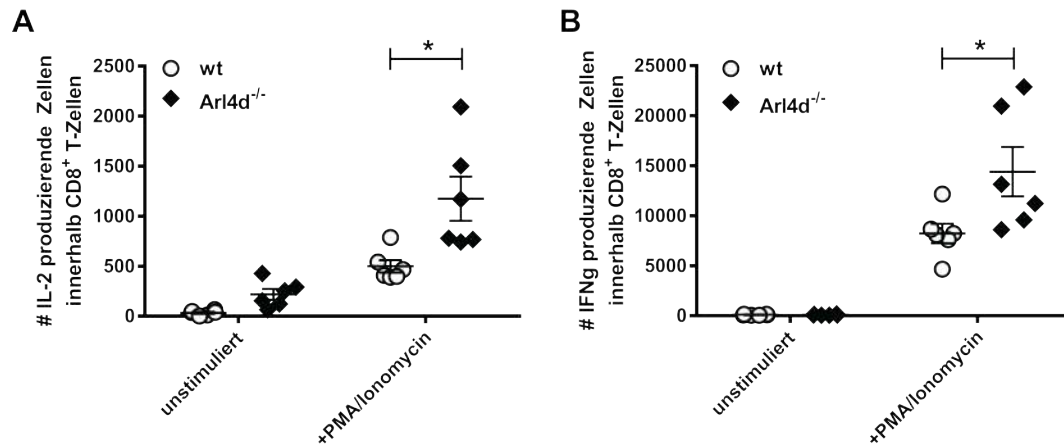


Abbildung 3.28: Die *Arl4d*<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes haben im Vergleich zu wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen eine gesteigerte IL-2 und IFN $\gamma$  Produktion. Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und *Arl4d*<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Infektionsherd Leber sowie die Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Die Leber- und Milz-assoziierten Lymphozyten wurden zur Induktion der IL-2 Produktion mit PMA/Ionomycin restimuliert. Anschließend wurde eine Färbung von CD8, CD45.1, CD45.2 und CD90.1 durchgeführt, um die transferierten wt und Knockout-Zellen sowie die Wirtszellen voneinander im FACS-Profil zu unterscheiden. Die darauffolgende intrazelluläre Färbung der Cytokine IL-2 und IFN $\gamma$  sollte Aufschluss über die Produktion dieser Cytokine geben. Die Abbildungen **A** und **B** zeigen jeweils den prozentualen Anteil der IL-2 (**A**) und IFN $\gamma$  (**B**) produzierenden T-Zellen der Milz. In den Grafiken ist der Mittelwert von jeweils 6 infizierten Mäusen (n=6) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.05 = \* (t-test)

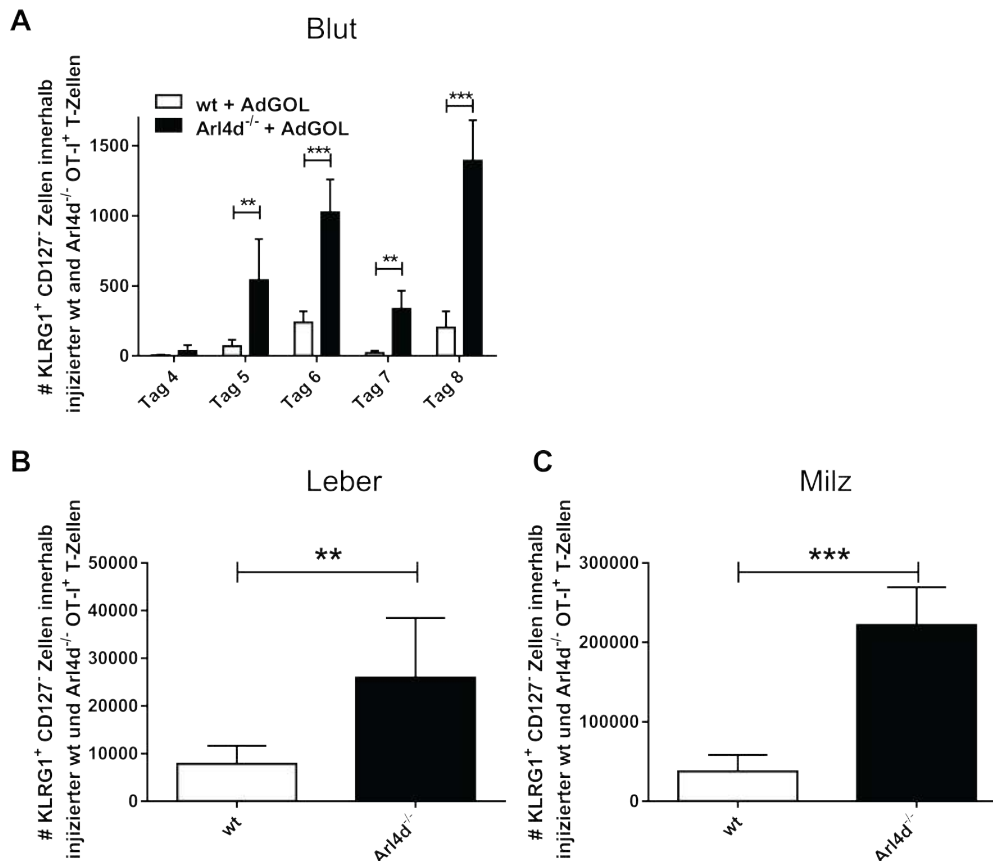


Abbildung 3.29: **Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich verstärkt in *short-lived effector cells* (SLECs).** Wirtsmäuse, in die wt OT-I<sup>+</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden, wurden mit AdGOL infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurde das Blut (A) der infizierten Mäuse alle 24 h mittels Durchflusszytometrie auf das Vorkommen der OT-I<sup>+</sup> T-Zellen und deren Expression der Markermoleküle KLRG1 und CD127 analysiert, um festzustellen, wieviele SLECs gebildet wurden. SLECs sind KLRG1<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen. 8 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Infektionsherd Leber (B) sowie die Milz (C) als größtes sekundäres lymphatisches Organ präpariert. Anschließend wurde auch in diesen Organen die Expression der Markermoleküle auf den vorhandenen wt und Cytb3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. In den Grafiken ist der Mittelwert von jeweils 6 infizierten Mäusen (n=6) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.01 = \*\*, p < 0.001 = \*\*\* (t-test)

### 3.9 Stimulation durch LSECs und DCs führt zur divergenten Phosphorylierung von Akt und Erk in T-Zellen, die abhängig vom PD-1-Signalweg ist

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d während der T-Zellaktivierung herunter- und während der T-Zellanergisierung hochreguliert ist (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2). Des Weiteren konnte belegt werden, dass der PD-1-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Expression beider Proteine spielt (siehe Abschnitt 3 und 3.2.1). Genauso konnte *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d in ähnlicher Weise die Produktion von IL-2 negativ regulieren, da die Defizienz der jeweiligen Proteine zu einer gesteigerten IL-2 Produkti-

on in den T-Zellen führt (siehe Abschnitt 3.6, 3.7, 3.8.5 und 3.8.7). Es ist bekannt, dass die induzierte IL-2 Produktion ein Markenzeichen der T-Zellaktivierung und essentiell für die Induktion der Proliferation und Differenzierung der aktivierten T-Zellen während einer Immunantwort ist [183]. Die Frage, die sich nun stellte, war, welche Signalproteine des T-Zellaktivierungs-Signalweges durch Cytohesin-3 und Arl4d beeinflusst werden, was schlussendlich Einfluss auf die IL-2 Produktion nimmt. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen, welche wieder durch DCs und LSECs unterschiedlich stimuliert wurden. Da wir belegen konnten, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen jeweils gegensätzlich reguliert ist, je nachdem, mit welchen APCs die T-Zellen stimuliert werden, sollten Signalproteine, die durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert werden, auch unterschiedlich aktiviert werden, je nachdem, ob die T-Zelle durch DCs oder LSECs stimuliert wird.

Das Signalprotein Akt ist eine wichtige Achse des T-Zellsignalweges, welche über die CD28-vermittelte Co-Stimulation aktiviert wird, was wiederum auf den Transkriptionsfaktor AP-1 wirkt, welcher essentiell für die Induktion der IL-2 Produktion ist (siehe Abschnitt 1.1.2) [194]. Neben IL-2 reguliert Akt auch die Produktion von IFN $\gamma$  in T-Zellen [194]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da wir in Abschnitt 3.8.5 zeigen konnten, dass die Cytohesin-3- und Arl4d-defizienten T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes sowohl eine gesteigerte IL-2 als auch IFN $\gamma$  Produktion haben. Ein weiterer interessanter Aspekt von Akt ist, dass es auch die Proliferation sowie das Überleben der T-Zellen durch Inhibition der Apoptose reguliert [52]. Dies ist besonders relevant, da sowohl eine veränderte Überlebensrate als auch eine gesteigerte Proliferation der Cytohesin-3- und Arl4d-defizienten T-Zellen eine Erklärung für die gesteigerte zelluläre Immunantwort im *in vivo* Infektionsexperiment sein könnte.

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül, das Teil des T-Zellaktivierungs-Signalweges ist und Einfluss auf die IL-2 Produktion hat, ist Erk. Wie detailliert in Abschnitt 1.1.2 erläutert, wird es über den T-Zell-Rezeptor-Signalweg während der Stimulation der T-Zellen aktiviert. Erk gehört zu den MAP-Kinasen, welche auf den Transkriptionsfaktor Fos wirken und ihn aktivieren, der wiederum an den IL-2 Promotor bindet und somit auch die IL-2 Produktion auf transkriptioneller Ebene reguliert [195, 196]. Genau wie Akt ist Erk auch ein bekannter Regulator der Proliferation sowie des Überlebens von T-Zellen [197].

Um zu testen, ob Akt und Erk ein unterschiedliches Aktivierungsprofil aufweisen, je nachdem, mit welchen APCs die T-Zellen stimuliert wurden, haben wir ihren Phosphorylierungstatus in T-Zellen, welche mit DCs stimuliert wurden, mit dem Phosphorylierungstatus von T-Zellen verglichen, welche mit LSECs stimuliert wurden. Als Kontrolle wurden unstimulierte T-Zellen verwendet. Abbildung 3.30 zeigt, dass wie zu erwarten eine Stimulation durch DCs zu einer starken Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt und Erk führt. Im Gegensatz dazu konnten in unstimulierten Zellen fast kein phosphoryliertes Akt und Erk nachgewiesen werden. Vergleicht man nun die Menge an phosphoryliertem Akt und Erk der T-Zellen, welche mit DCs stimuliert wurden, mit den Phosphorylierungsleveln der T-Zellen, die mit LSECs stimuliert wurden, zeigt sich ein erheblicher Unterschied. Die

LSEC-stimulierten T-Zellen enthalten wesentlich geringere Mengen an phosphoryliertem Erk und Akt, was sie somit zu Signalproteinen macht, die durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert werden könnten.

Wir wissen durch unsere und die Experimente von Bianca Paul, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d abhängig vom PD-1-Signalweg ist (siehe Abschnitt 3 und 3.2.1) [135]. Weiterhin vermuten wir, dass die Akt und Erk Aktivität bzw. Phosphorylierung durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert werden könnte. Wenn dies der Fall sein sollte, müsste ein Eingriff in den PD-1-Signalweg auch Einfluss auf die Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Akt und Erk haben. Um diese Theorie zu testen, wurden auch T-Zellen mit LSECs stimuliert, welche defizient für PD-L1 waren. Da es sich bei PD-L1 um den Liganden des PD-1-Rezeptors handelt, können die PD-L1<sup>-/-</sup> LSECs den PD-1-Signalweg der T-Zellen nicht stimulieren. In Abbildung 3.30 ist deutlich zu sehen, dass die Phosphorylierunglevel von Akt an Serin 473 und Erk wesentlich höher ist, wenn T-Zellen mit den PD-L1-defizienten LSECs stimuliert wurden, im Vergleich zu den Phosphorylierungleveln von Akt und Erk in T-Zellen, welche mit wt LSECs stimuliert wurden.

Mit diesem Experiment konnten wir zeigen, dass die Signalproteine Erk und Akt unterschiedlich aktiviert werden, je nachdem, mit welchen APCs T-Zellen stimuliert werden. Weiterhin zeigt das Experiment, dass der PD-1-Signalweg eine essentielle Rolle für die Aktivität beider Signalproteine spielt. Beide Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass sowohl die Erk als auch Akt Aktivität durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert sein könnte.

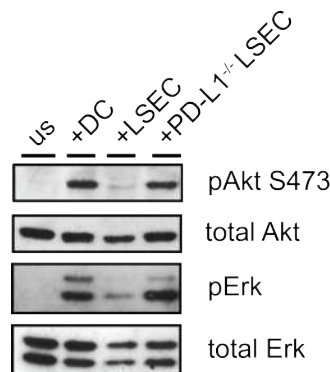


Abbildung 3.30: **Stimulation durch LSECs und DCs führt zur divergenten Phosphorylierung von Akt und Erk in T-Zellen, die abhängig vom PD-1-Signalweg ist.** wt OT-I<sup>+</sup> T-Zellen wurden entweder mit Ovalbumin-beladenen DCs, LSECs oder PD-L1<sup>-/-</sup> LSECs für 24 h stimuliert. Als Kontrolle fungierten unstimulierte T-Zellen. Nach 24 h wurden die T-Zellen lysiert und die Phosphorylierung der Signalproteine Erk und Akt (S473) mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot-Verfahren analysiert. (n=1)

### 3.10 Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Aktivität der Signalproteine Akt und Erk in T-Zellen negativ

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.9 deuten an, dass Cytohesin-3 und Arl4d bei der Regulation der Signalproteine Akt und Erk beteiligt sein könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen,

benutzten wir zwei verschiedene Ansätze. Zum einen wurde untersucht, ob eine Überexpression von Cytohesin-3 und Arl4d Einfluss auf die Aktivität der Signalproteine hat und zum anderen wurde analysiert, ob Akt und Erk in Cytohesin-3 und Arl4d-defizienten T-Zellen im Vergleich zu ihren wt Kontrollen nach Stimulation unterschiedlich stark phosphoryliert sind.

### 3.10.1 Überexpression von Cytohesin-3 und Arl4d reduziert die AKT Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen

Um festzustellen, ob Cytohesin-3 und Arl4d einen direkten Einfluss auf die Aktivität bzw. Phosphorylierung des Signalproteins Akt haben, wurden verschiedene Konstrukte von Cytohesin-3 und Arl4d in Jurkat T-Zellen überexprimiert. Bei Jurkat T-Zellen handelt es sich um eine humane T-Zelllinie, die aus einem Patienten mit akuter Leukämie isoliert wurde [143]. Jurkats sind eine schon lange etablierte T-Zelllinie, mit deren Hilfe viele Bestandteile des TCR-Signalweges aufgeklärt wurden [14]. Im Gegensatz zu primären T-Zellen lassen sich Jurkat T-Zellen effizienter transfizieren, was die Untersuchung des Einflusses der Cytohesin- und Arl4d-Konstrukte auf die Akt Phosphorylierung vereinfacht. Neben Cytohesin-3 wurde auch Cytohesin-1 überexprimiert, um zu untersuchen, ob ein möglicher Effekt von Cytohesin-3 auf die AKT Phosphorylierung spezifisch ist. Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz eine Punktmutante von Cytohesin-3 überexprimiert. Bei Cytohesin-3 E161K wurde die Konstrukt-DNA so mutiert, dass sich an der Stelle 161 des Proteins ein Lysin (K) anstatt der Glutaminsäure (E) befindet. Diese einzelne Mutation sorgt dafür, dass diese Variation von Cytohesin-3 keine GEF-Aktivität aufweist (detailliert in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2) [135].

Um die Funktion von Arl4d auf die AKT Phosphorylierung zu untersuchen, wurden zwei Mutanten ausgewählt, die schon von Li et al. beschrieben wurden. Zum einen Arl4d Q80L und zum anderen Arl4d G2A [122]. Bei Arl4d Q80L handelt es sich um eine dominant aktive Mutante von Arl4d, die konstant GTP gebunden hat. Bei ihr befindet sich an Stelle 80 der Proteinsequenz ein Leucin (L) anstatt des Glutamins (Q). Arl4d G2A ist hingegen eine inaktive Mutante von Arl4d, da ihr durch die Mutation der N-Myristoyl-Anker entfernt wurde und die Mutante so nicht mehr mit Membranen interagieren kann. Diese Mutante enthält an Stelle 2 der Aminosäuresequenz ein Alanin (A) anstatt eines Glycins (G). Jedes Konstrukt, das in diesem Experiment überexprimiert wurde, war ein Fusionsprotein mit eGFP, was später eine leichte Identifikation der erfolgreich transfizierten Zellen im FACS ermöglichte. Um zu kontrollieren, dass eGFP oder der Prozess der Transfektion keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT hat, wurde im Kontrollansatz nur eGFP überexprimiert. 24 h nach der Transfektion der Jurkat T-Zellen mit den Konstrukten wurde eine intrazelluläre Färbung des phosphorylierten AKT durchgeführt. Hierbei wurde sowohl die AKT Phosphorylierung an Serin an der Stelle 473 (Abbildung 3.31 A, B) der Aminosäuresequenz als auch die AKT Phosphorylierung an Threonin (Abbildung 3.31 C, D) an der Stelle 308 der Aminosäuresequenz untersucht.

In den Abbildungen 3.31 A und C ist deutlich zu erkennen, dass die Überexpression von Cytohesin-3 in Jurkat T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der AKT Phosphorylierung sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 führt. Dieser Effekt von Cytohesin-3 ist abhängig von der GEF-Aktivität von Cytohesin-3, da die Überexpression der GEF-inaktiven Mutante von Cytohesin-3 (Cyth3 E161K) keinen Effekt auf die Phosphorylierung von AKT hat. Weiterhin scheint der Effekt von Cytohesin-3 auf AKT spezifisch für Cytohesin-3 zu sein, da die Überexpression von Cytohesin-1 keinen Einfluss die Phosphorylierung von AKT hat.

Ähnlich wie Cytohesin-3 führt die Überexpression der dominant aktiven Mutante von Arl4d (Arl4d Q80L) sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 in Jurkat T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von AKT (siehe Abbildung 3.31 B, D). Wird hingegen die Mutante von Arl4d überexprimiert, der die essentielle Funktion fehlt, sich über den N-Myristoyl-Anker in Membranen zu integrieren (Arl4d G2A), hat dies keinen Einfluss auf die AKT Phosphorylierung. Dies zeigt, wie essentiell der N-Myristoyl-Anker für Arl4d ist, um seine zellulären Funktionen durchzuführen. Insgesamt bestätigt dieses Experiment die Vermutung, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d an der Regulation der Aktivität bzw. Phosphorylierung des Signalproteins AKT in Jurkat T-Zellen beteiligt ist. Wie zu erwarten war, regulieren Cytohesin-3 und Arl4d die Phosphorylierung von AKT in Jurkat T-Zellen negativ.

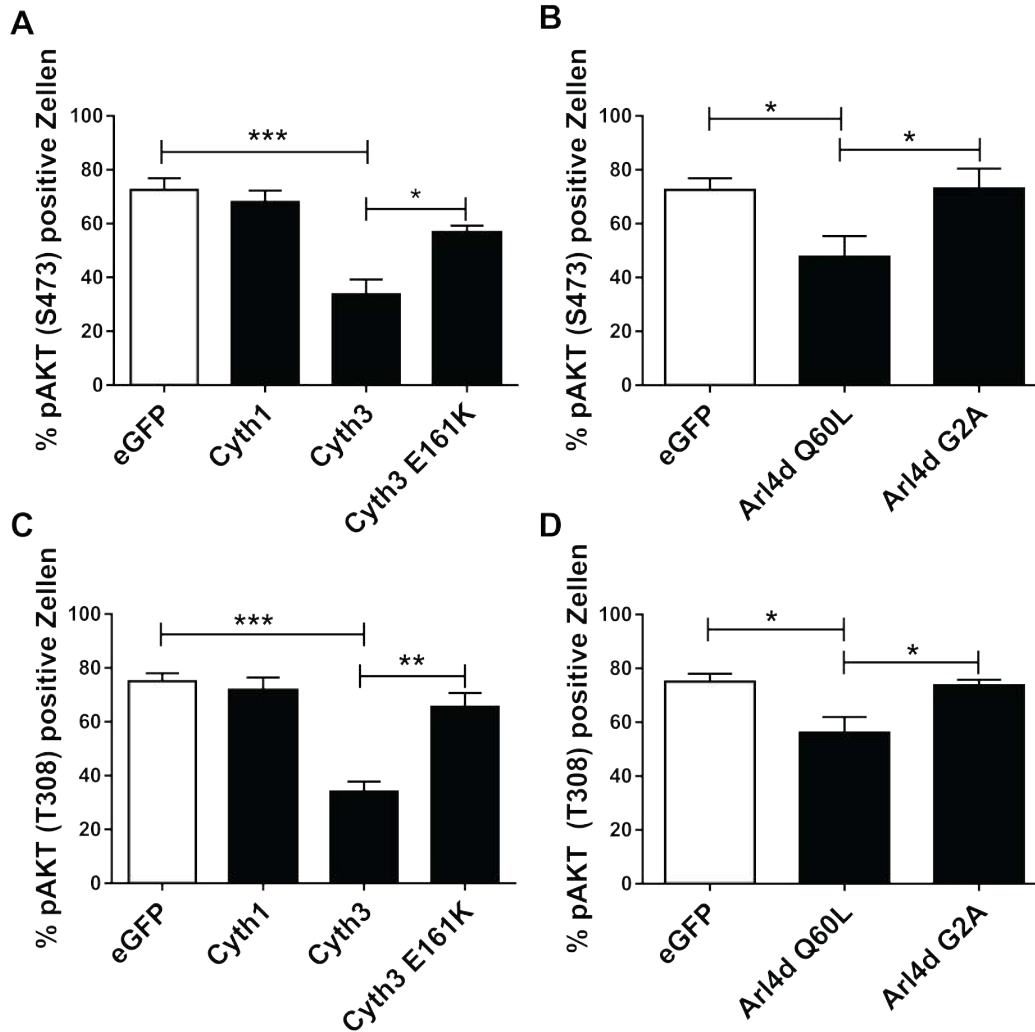


Abbildung 3.31: **Überexpression von Cytohesin-3 und Arl4d reduziert die AKT Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen.** Jurkat T-Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten transfiziert, die die Expression von eGFP-Cytohesin-3 und eGFP-Arl4d-Fusionsproteinen induzieren. Zu den überexprimierten Cytohesin-Konstrukten gehörten neben Cytohesin-3 und -1 die GEF-inaktive Variante von Cytohesin-3 Cyth3 E161K. Von Arl4d wurde eine dominant aktive Variante (Arl4d Q80L) und eine Variante, deren N-Myristoyl-Anker fehlt (Arl4d G2A), überexprimiert. Als Kontrolle fungierte ein Ansatz, in dem lediglich ein eGFP-exprimierender Vektor transfiziert wurde. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen permeabilisiert und das intrazelluläre AKT angefärbt. Anschließend wurden per Durchflusszytometrie die eGFP-positiven (erfolgreich transfizierten) Zellen auf die Phosphorylierung von intrazellulärem AKT untersucht. In den Grafiken ist der Mittelwert aus 3-6 Überexpressionsexperimenten ( $n \geq 3$ ) der einzelnen Konstrukte mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$  (t-test)

### 3.10.2 Arl4d-Defizienz führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Akt in T-Zellen

In Abschnitt 3.10.1 konnten wir bereits zeigen, dass die Überexpression von Cytohesin-3 und Arl4d einen negativen Einfluss auf die Akt Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen hat. Daher stellte sich die Frage, ob wir einen gegenteiligen Effekt, also eine erhöhte Phosphorylierung der Signalproteine, in den primären murinen T-Zellen unserer Cytohesin-3 und

Arl4d Knockout-Mäuse feststellen können.

Um diese Hypothese zu testen, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl spezifisch ausgewählt, den Einfluss von Cytohesin-3 und Arl4d auf die Akt Phosphorylierung in LSEC-stimulierten OT-I<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, da wir in Abschnitt 3.2.1 belegen konnten, dass diese Zellen eine gesteigerte Expression von Cytohesin-3 und Arl4d aufweisen [135]. Wenn die beiden Proteine einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt haben, sollte die Defizienz der Proteine den größten Effekt in LSEC-stimulierten T-Zellen zeigen, da die stimulierten wt Zellen hier die höchste Expression der Proteine aufweisen. Anders sieht es in DC-stimulierten T-Zellen aus. Da eine DC-Stimulation der wt T-Zellen zu einer sehr starken Reduktion der Cytohesin-3 und Arl4d-Expression führt (siehe Abschnitt 3.1.3, 3.1.4, 3.2.1 und 3.2.2), sollte der Einfluss der Gendeletion in diesen Zellen keinen großen Effekt haben.

48 h nach Beginn der Stimulation der wt oder Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen mit OVA-beladenen LSECs wurden die Zellen fixiert und sowohl CD3 zur Identifikation der T-Zellen als auch CD25 als Aktivierungsmarker angefärbt [198]. CD25 ist die IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL2RA), die zusammen mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette (IL2RB, IL2RG) den hoch affinen IL-2 Rezeptor bildet (siehe Abschnitt 1.1.5 für eine detaillierte Beschreibung). Ein weiterer Parameter, der analysiert wurde und Aufschluss über den Aktivierungsstatus der T-Zellen gibt, ist der FSC (*Forward Scatter*) [199]. Es ist bekannt, dass eine proliferierende T-Zelle einen sogenannten Lymphoblast bildet, der sich durch ein vergrößertes Zell- und Nukleusvolumen auszeichnet, was sich wiederum in einer Steigerung des FSC niederschlägt [200]. Um neben CD3 und CD25 das intrazelluläre phosphorylierte Akt an den Stellen S473 und T308 anzufärben, wurden die Zellen permeabilisiert.

Abbildung 3.32 zeigt eindeutig, dass wie erwartet die LSEC-stimulierten Arl4d-defizienten OT-I<sup>+</sup>T-Zellen im Vergleich zu den wt Kontrollen ein erhöhtes Akt Phosphorylierungslevel und damit eine gesteigerte Akt Aktivierung haben. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnten eine gesteigerte CD25-Expression und FSC-Werte der Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen im Vergleich zu den wt Kontrollen gefunden werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Arl4d-Defizienz die Anergie-induzierende Wirkung der LSEC- bzw. PD-1-vermittelten Stimulation der T-Zellen inhibiert. Die gesteigerten FSC-Werte der stimulierten Arl4d<sup>-/-</sup>T-Zellen deuten darauf hin, dass diese Zellen sich vermehrt teilen, was wiederum eine Erklärung für das verstärkte Vorkommen der Knockout T-Zellen in Blut, Leber und Milz der infizierten Mäuse des *in vivo* Infektionsexperimentes ist (siehe Abschnitt 3.8.7). Bis zum Ende meiner Promotionszeit konnte dieses Experiment nur mit Arl4d-defizienten T-Zellen durchgeführt werden, jedoch haben wir Prof. Linda Diehl mehrere Cyth3<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> Mäuse geschickt, so dass sie in der Lage sein wird, dieses Experiment mit Cyth3-defizienten T-Zellen zu wiederholen.



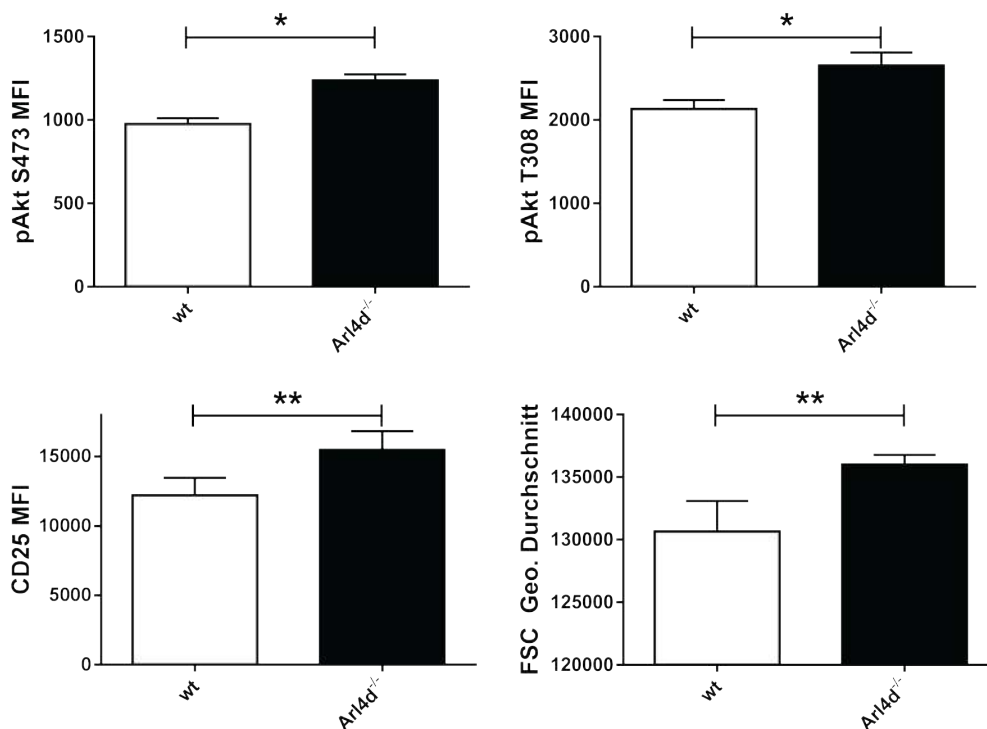


Abbildung 3.32: *Arl4d*<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen weisen nach LSEC-Stimulation einhergehend mit gesteigerten Aktivierungsmarkern eine verstärkte Akt Aktivierung auf. Wt und *Arl4d*<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit OVA-beladenen LSECs für 48 h stimuliert. Nach 48 h wurden die T-Zellen der Kokultur über eine anti-CD3-Färbung im FACS identifiziert. Anschließend wurde in bzw. auf den CD3<sup>+</sup> T-Zellen intrazelluläres phosphoryliertes Akt an den Stellen S473, T308 sowie CD25 angefärbt und der FSC mittels Durchflusszytometrie analysiert. In den Grafiken ist der Mittelwert aus 3 Experimenten (n=3) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.05 = \*, p < 0.01 = \*\*, (t-test)

### 3.11 Zwei Hypothesen zur Klärung der gesteigerten zellulären Immunantwort der *Cyth3*<sup>-/-</sup> und *Arl4d*<sup>-/-</sup> T-Zellen während des *in vivo* Infektionsexperimentes

Wir konnten in den Abschnitten 3.6, 3.7, 3.8.5 und 3.8.7 belegen, dass Cytohesin-3- und *Arl4d*-defiziente T-Zellen mehr IL-2 produzieren. Dies gilt sowohl für *in vitro* stimulierte Knockout T-Zellen als auch für die Knockout T-Zellen aus dem *in vivo* Infektionsexperiment. Im *in vivo* Infektionsexperiment führte dieser Phänotyp zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort gegen das Virus (siehe Abschnitt 3.8.2, 3.8.4 und 3.8.7). In Abschnitt 3.10 konnten wir dann zeigen, dass die Signalproteine Akt und Erk, welche mitverantwortlich dafür sind, die Produktion von IL-2 in T-Zellen zu kontrollieren, durch Cytohesin-3 und *Arl4d* reguliert werden. Sowohl IL-2 selber als auch die Signalproteine Akt und Erk sind dafür bekannt, das Überleben und die Proliferation von T-Zellen zu regulieren [183, 195, 196, 197]. Interessanterweise können sowohl eine veränderte Überlebensfähigkeit als auch eine veränderte Proliferationsrate erklären, warum die Cytohesin-3- und *Arl4d*-

defizienten T-Zellen in der zellulären Immunantwort des *in vivo* Infektionsexperimentes die wt T-Zellen dominieren. Sollte die Überlebensfähigkeit der Knockout T-Zellen erhöht sein, sterben im Verlauf der Zeit weniger Knockout-Zellen, was nach einiger Zeit zu einer größeren Menge an Knockout T-Zellen im Vergleich zu wt Zellen führt. Dies würde erklären, warum wir mehr Cytohesin-3- und Arl4d-defiziente T-Zellen im Blut, der Leber und der Niere von infizierten Mäusen des *in vivo* Infektionsexperimentes gefunden haben (siehe Abschnitt 3.8.2, 3.8.4 und 3.8.7).

Allerdings könnte dies auch eine gesteigerte Proliferationsrate der Cytohesin-3- und Arl4d-defizienten T-Zellen erklären. Wäre die Proliferationsrate der Knockout-Zellen erhöht, würden sie sich während der zellulären Immunantwort schneller und damit häufiger teilen. Dies würde wiederum auch potentiell erklären, warum wir wesentlich mehr Cytohesin-3- und Arl4d-defiziente T-Zellen im Blut, der Leber und der Niere von infizierten Mäusen des *in vivo* Infektionsexperimentes gefunden haben. Es gibt also zwei Hypothesen, die schematisch in Abbildung 3.33 dargestellt sind und den Phänotyp des *in vivo* Infektionsexperimentes erklären.

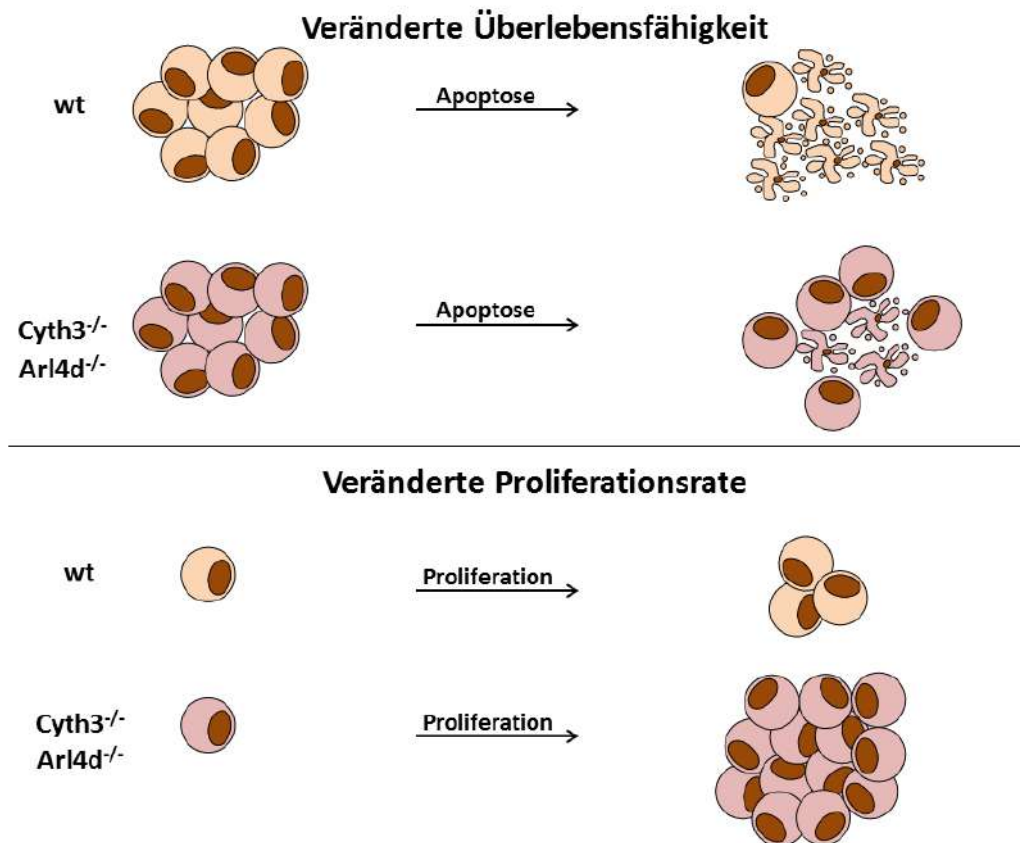


Abbildung 3.33: **Zwei Hypothesen zur Klärung der gesteigerten zellulären Immunantwort der  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen während des *in vivo* Infektionsexperimentes.** Die Ergebnisse der *in vivo* Infektionsexperimente (siehe Abschnitt 3.8) belegen, dass sowohl  $Cyth3^{-/-}$  als auch  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen im Vergleich zu wt Kontrollen vermehrt im Blut, der Leber und der Niere von infizierten Mäusen auftreten. Dieser Phänotyp lässt sich durch zwei Hypothesen erklären. Zum einen könnten die Knockout T-Zellen eine gesteigerte Überlebensfähigkeit haben, was zur Folge hat, dass während der Infektion weniger Knockout T-Zellen absterben und sich so in den Geweben ansammeln, was zu einer verstärkten zellulären Immunantwort führt. Zum anderen könnten die Knockout T-Zellen auch eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen. Dies hätte zur Folge, dass sich die Knockout T-Zellen schneller und häufiger teilen. Dies könnte auch erklären, warum sich mehr Knockout T-Zellen in den Geweben ansammeln und zu einer verstärkten zellulären Immunantwort der Knockout T-Zellen führen.

### 3.11.1 Cytohesin-3 und Arl4d haben keinen Einfluss auf das Überleben von T-Zellen

Um die Überlebensfähigkeit der  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$   $CD8^{+}$  T-Zellen im Vergleich zu wt  $CD8^{+}$  T-Zellen zu testen, wurden sie aus der Milz und aus den Lymphknoten der Knockout-Mäuse bzw. wt Mäuse mittels MACS-Verfahren isoliert. Anschließend wurden sowohl die Knockout T-Zellen als auch wt T-Zellen für 72 h kultiviert und alle 24 h das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen bzw. die Viabilität mittels einer Propidiumiodid (PI)-Färbung bestimmt. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator, der durch perforierte Zellmembranen von toten Zellen, jedoch nicht durch funktionsfähige Membranen lebender Zellen, dringen kann. In den toten Zellen interkaliert PI in die DNA und färbt die Zellen so an [164].

Zusätzlich zu den unbehandelten T-Zellen wurden Ansätze mit den homeostatischen Cytokinen IL-7 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml) oder einer Kombination von beiden stimuliert. Dies diente dazu, festzustellen, ob die Defizienz von Cytohesin-3 oder Arl4d Einfluss auf die Signalwege haben, die das Überleben der T-Zellen sicher stellen. Es ist bekannt, dass sowohl IL-7 als auch IL-15 eine entscheidende Rolle für die Homeostase der T-Zellen spielen. Beide sind essentiell, um das Überleben der T-Zellen sowie ihre Proliferation zu fördern [165, 166, 167].

Abbildung 3.34 zeigt eindeutig, dass je länger die unbehandelten primären T-Zellen kultiviert werden, desto mehr T-Zellen sterben. Während zu Beginn des Experimentes fast 100 % der Zellen lebten, nahm der prozentuale Anteil der lebenden Zellen bereits nach 24 h auf 30 bis 40 % ab. Nach 72 h sank der Anteil der lebenden Zellen drastisch auf 5-20 %. Diese Beobachtung galt sowohl für wt T-Zellen als auch für  $Cy3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen. Der kinetische Verlauf ist fast deckungsgleich für die wt und Knockout T-Zellen. Dies impliziert, dass Cytohesin-3 und Arl4d keinen direkten Einfluss auf das Überleben der T-Zellen haben.

Vergleicht man nun die unbehandelten Ansätze mit den Ansätzen, denen die homeostatischen Cytokine zugesetzt wurden, fällt auf, dass sowohl der Zusatz von IL-7 und IL-15 als auch die Kombination von beiden zu einer drastischen Steigerung der Überlebensfähigkeit der T-Zellen führte. Der Zusatz von IL-7 steigerte den prozentualen Anteil an lebenden Zellen von 5-20 % nach 72 h in den unbehandelten Proben auf ca. 60 %. Der Effekt von IL-15 auf die T-Zellen war nicht ganz so drastisch wie der von IL-7. Jedoch konnte auch durch den Zusatz von IL-15 der prozentuale Anteil an lebenden Zellen von 5-20 % nach 72 h auf 40-60 % gesteigert werden. Wurde eine Kombination von beiden Cytokinen zu den Zellen gegeben, führte dies auch zu einer Steigerung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen auf 60 %. Da die Kombination beider Cytokine den Anteil an lebenden Zellen nicht höher steigerte als der Zusatz der einzelnen Cytokine, ist davon auszugehen, dass die Kombination der Cytokine keinen additiven Effekt auf die Zellen ausübt. Da auch hier die Defizienz von Cytohesin-3 und Arl4d zu keiner Veränderung der Sterberate führt, scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d keinen Einfluss auf die Regulation des Überlebens der T-Zellen haben.

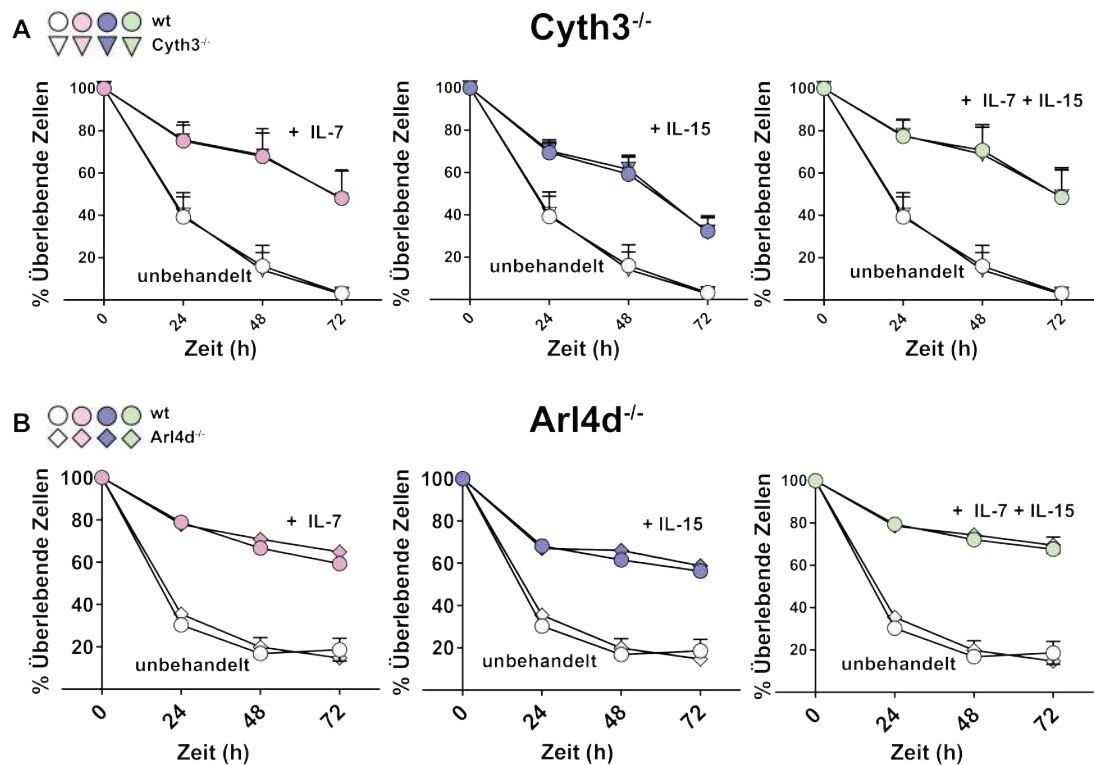


Abbildung 3.34: **Cyth3<sup>-/-</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen weisen keine veränderte Überlebensfähigkeit auf.** wt, Cyth3<sup>-/-</sup> (A) und Arl4d<sup>-/-</sup> (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 72 h bei 37 °C kultiviert. Während ein Teil der Ansätze unbehandelt war, wurden den anderen Ansätzen die homeostatischen Cytokine IL-7 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml) oder eine Kombination von beiden zugesetzt. Alle 24 h wurde die Viabilität der T-Zellen mittels PI-Durchflusszytometrie-Färbung bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen mehrerer unabhängiger Experimente (Cyth3<sup>-/-</sup> n=3, Arl4d<sup>-/-</sup> n=6) mit dem Standardfehler (SEM).

### 3.11.2 Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in T-Zellen

Nachdem die Ergebnisse des Experimentes aus Abschnitt 3.11.1 darauf hindeuten, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d keinen Einfluss auf das Überleben der T-Zellen haben, wollten wir untersuchen, ob die zweite Hypothese aus Abbildung 3.33 erklären kann, warum die Defizienz von Cytohesin-3 und Arl4d zu einem gesteigerten Vorkommen der Knockout T-Zellen in Blut, Leber und Milz von infizierten Mäusen und damit zu einer gesteigerten zellulären Immunantwort führt. Die zweite Hypothese besagt, dass Cytohesin-3- und Arl4d-defiziente T-Zellen eine gesteigerte Proliferationsrate haben könnten. Für diese Hypothese spricht, dass bekannt ist, dass das Sinalprotein Akt sowie das Cytokin IL-2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Proliferation von T-Zellen spielen [52, 201]. Da wir zeigen konnten, dass Cytohesin-3 und Arl4d beide sowohl die Aktivierung von Akt (siehe Abschnitt 3.10) als auch die Produktion von IL-2 in T-Zellen regulieren (siehe Abschnitt 3.6, 3.7 und 3.8.5) liegt die Vermutung nahe, dass beide Proteine auch Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen haben.

Ein weiteres Argument, dass dafür spricht, dass Cytohesin-3- und Arl4d-defiziente T-

Zellen eine gesteigerte Proliferationsrate haben könnten, beruht auf der Beobachtung, dass LSEC-stimulierte Arl4d<sup>-/-</sup> OT-I<sup>+</sup> T-Zellen größere FSC-Werte aufweisen (siehe Abschnitt 3.10.2), was wiederum ein charakteristisches Zeichen für proliferierende T-Zellen ist [200, 199].

Um zu analysieren, ob Cytohesin-3 Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen hat, wurde ein CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)-basierendes Proliferationsexperiment durchgeführt. Bei CFSE handelt es sich um eine unpolare Esterverbindung, welche in Zellen diffundieren kann. Dort wird CFSE von unspezifischen Esterasen in ein polares Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften umgewandelt. Wenn sich eine mit CFSE beladene Zelle während der Proliferation teilt, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt. Dies führt zu einer Verdünnung des Farbstoffes in den Tochterzellen. Damit einher geht eine Reduktion der Intensität der Fluoreszenz der Tochterzellen im Vergleich zur Mutterzelle, was im FACS gemessen werden kann. Je geringer die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellen ist, desto häufiger haben sie sich geteilt [168].

Für das Experiment wurden Splenozyten von wt und Cyth3<sup>-/-</sup> Mäusen isoliert, mit CFSE beladen und für 72 h mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert, um ihre Proliferation zu induzieren. Alle 24 h wurden die Zellen am FACS eingemessen, um zu bestimmen, wie stark sie proliferiert sind. Durch die Färbung von CD4 und CD8 konnten auch die beiden T-Zellpopulationen innerhalb der Splenozyten unterschieden werden. In Abbildung 3.35 ist zu erkennen, dass 24 h nach Beginn der Stimulation noch kein Unterschied zu der unstimulierten Zellpopulation zu erkennen war. Sowohl die stimulierten als auch unstimulierten Zellen bilden nur eine Population, die stark CFSE-positiv ist, was dafür spricht, dass 24 h nach Beginn der Stimulation noch keine Zellteilung stattgefunden hatte. Diese Beobachtung galt sowohl für CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.35 A) als auch für CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Abbildung 3.35 B). Vergleicht man wt und Cyth3<sup>-/-</sup> Zellen miteinander, ließen sich nach 24 h noch keine Unterschiede erkennen. 48 h nach Beginn der Stimulation bildeten sich bei den stimulierten Zellen drei Zellpopulationen mit unterschiedlich starker CFSE-Färbung aus, während die unstimulierten Zellen weiterhin nur eine Population mit stark CFSE-positiven Zellen aufwiesen. Dies spricht dafür, dass die Induktion der Proliferation durch die Stimulation mit den Antikörpern erfolgreich war und die Zellen anfangen sich zu teilen. Interessant ist, dass sowohl die CD8<sup>+</sup> als auch die CD4<sup>+</sup>Cyth3<sup>-/-</sup>T-Zellen im Vergleich zu ihren wt Kontrollen wesentlich stärker proliferierten. Dies lässt sich daran erkennen, dass die Populationen mit geringerer CFSE-Intensität (Peaks 2 und 3) der Cyth3<sup>-/-</sup> T-Zellen schon wesentlich stärker ausgebildet waren als ihre wt Pendanten. Die Cytohesin-3 defizienten Ansätze hatten nach 48 h bereits ein sehr stark ausgebildete dritte Population mit geringer CFSE-Intensität (Zellen, die sich zweimal geteilt haben), während sich diese Population in den wt Ansätzen gerade erst formierte. Dieser Phänotyp war auch 72 h nach Beginn der Stimulation noch deutlich zu erkennen. Nach 72 h hatten sich die Zellen bereits so häufig geteilt, dass sich sechs Populationen mit unterschiedlich starker CFSE-Intensität ausgebildet hatten. Die sechs Populationen waren sowohl in den wt als auch Cytohesin-3 defizienten Ansätzen zu erkennen. Allerdings zeigte sich auch wieder deut-

lich, dass die Cyth3-defizienten T-Zellen stärker proliferieren, weil ihre Populationen mit der geringsten CFSE-Intensität (Zellen, die sich vermehrt geteilt haben) wesentlich stärker ausgeprägt waren als bei den wt Kontrollen. Ein weiteres Indiz dafür, dass Cytohesin-3 defiziente T-Zellen verstärkt proliferieren, ist, dass die initiale Population der Zellen, die sich noch nicht geteilt hatten, noch recht groß bei den wt T-Zellen war, während sie bei den Knockout T-Zellen nur noch sehr gering vorhanden war. Vergleicht man die Proliferation der CD8<sup>+</sup> mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen, fällt auf, dass sowohl bei wt als auch bei den Cytohesin-3 defizienten Ansätzen die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen stärker war als die der CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Dies spiegelte sich an den höheren Peaks der Populationen mit geringerer CFSE-Intensität wieder. Dieses Phänomen war zu erwarten, da es schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde [202]. Weiterhin ist es möglich, neben den FACS-Plots den "*Division Index*" der wt und Cytohesin-3 defizienten T-Zellen zu bestimmen. Der *Division Index* ist die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen, die eine Zelle aus der anfänglichen Population vollzogen hat. Dies Wert beinhaltet auch Zellen, die sich nicht geteilt haben. Der *Divisions Index* wird mit Hilfe eines Algorithmus des Programms FlowJo berechnet (<http://docs.flowjo.com/vx/experiment-based-platforms/proliferation/>). Die Abbildungen 3.35 C und D zeigen, dass 48 h und 72 h nach Beginn der Stimulation im Durchschnitt aller drei unabhängigen Experimente sich signifikant mehr CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>Cyth3<sup>-/-</sup> T-Zellen als wt Kontrollen geteilt haben. Zusammengefasst belegt dieses Experiment, dass eine Cytohesin-3 Defizienz sowohl in CD8<sup>+</sup> als auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer gesteigerten Proliferation nach Stimulation führt.

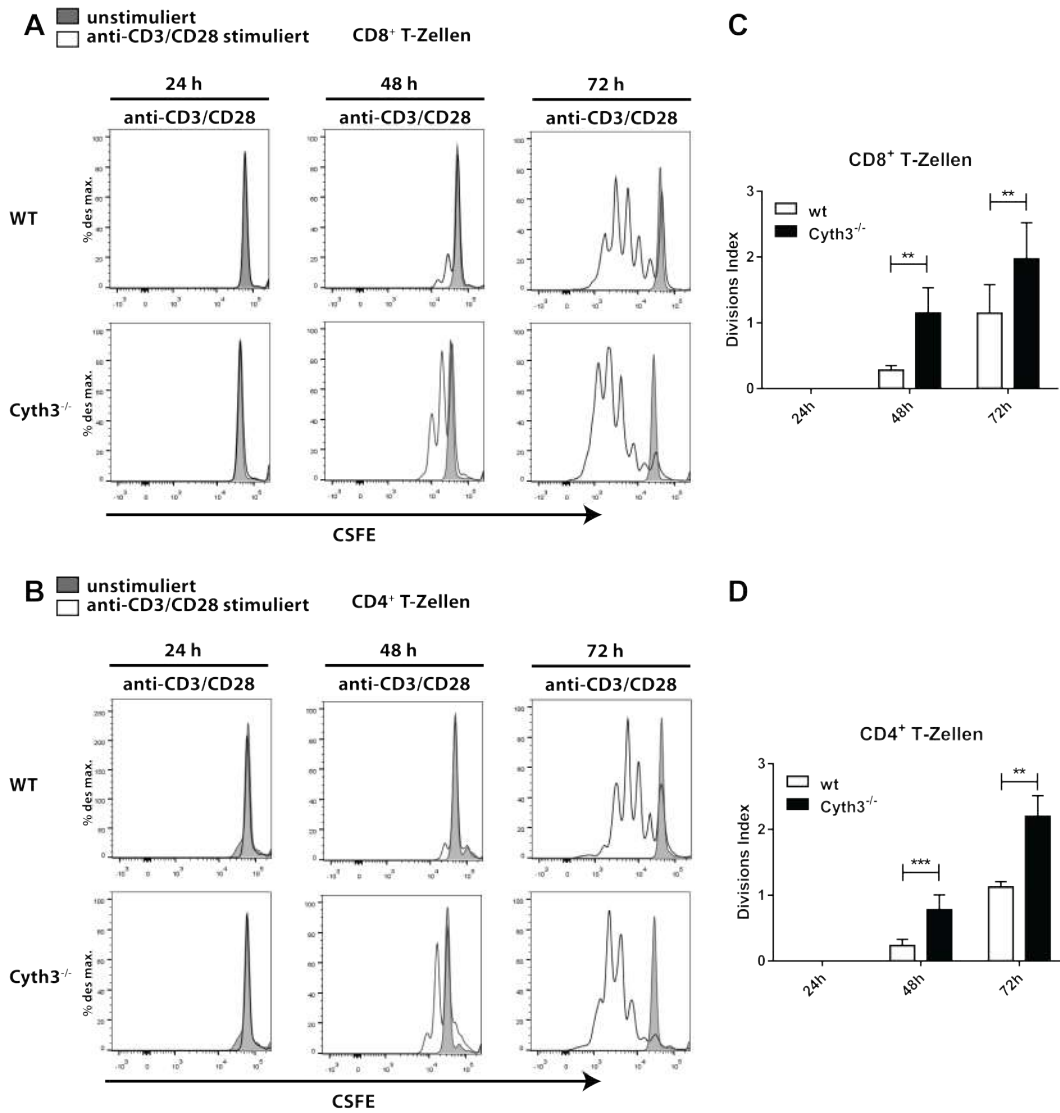


Abbildung 3.35: **Cytohesin-3 Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Die Splenozyten aus Wt und Cyth3<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit CFSE beladen und mit anti-CD3/CD28 für 72 h stimuliert. Als Kontrolle fungierten unstimulierte Splenozyten. Alle 24 h wurden die Zellen am FACS eingemessen, um ihre Proliferationsrate zu bestimmen. Durch die Färbung von CD4 und CD8 wurden die T-Zell-Subpopulationen in den Splenozyten identifiziert. Abbildung **A** zeigt ein exemplarisches Ergebnis von drei Experimenten zur Bestimmung der Proliferation von CD8<sup>+</sup> wt und Cyth3<sup>-/-</sup> T-Zellen. Abbildung **B** hingegen zeigt ein exemplarisches Ergebnis von drei Experimenten zur Bestimmung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> wt und Cyth3<sup>-/-</sup> T-Zellen. In **C** und **D** ist der jeweilige Mittelwert dreier unabhängiger Experimente (n=3) des *Division Index* der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. p < 0.01 = \*\*, p < 0.001 = \*\*\* (t-test)

### 3.11.3 Arl4d-Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in T-Zellen

Neben Cytohesin-3 wurde natürlich auch der Einfluss von Arl4d auf die Proliferation von T-Zellen bestimmt. Hierfür haben wir zusammen mit unserem Kooperationspartner Prof. Linda Diehl das Experiment, welches in 3.11.2 beschrieben wurde, mit CD8<sup>+</sup> wt und Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen wiederholt. Wie Abbildung 3.36 zeigt, konnte auch belegt werden, dass die Defizienz zu einer gesteigerten Proliferation der T-Zellen führt. Auch die Arl4d<sup>-/-</sup> T-



Zellen hatten 48 h nach Beginn der Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern größere Populationen mit geringerer CFSE-Intensität, was dafür spricht, dass sich die Knockout-Zellen vermehrt geteilt haben. Dieselbe Beobachtung konnte auch 72 h nach Beginn der Stimulation getätigt werden. Nach 72 h hatten sich die wt und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen bereits so oft geteilt, dass sich sechs Populationen mit unterschiedlicher CFSE-Intensität ausgebildet hatten. Genau wie bei den Cytohesin-3 defizienten T-Zellen gehören die meisten  $Arl4d^{-/-}$ -T-Zellen den Populationen mit geringer CFSE-Intensität an. Des Weiteren ist die Initialpopulation (T-Zellen, die sich noch nicht geteilt haben) der wt T-Zellen im Vergleich zu den  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen wesentlich größer, was auch dafür spricht, dass die  $Arl4d$ -Defizienz zu einer gesteigerten Proliferation in T-Zellen führt. Wie auch für die  $Cyth3^{-/-}$  wurde der *Division Index* (siehe Abschnitt 3.11.1) für  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen bestimmt. Abbildung 3.36 B bestätigt, dass auch der *Division Index* der  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen im Vergleich zu den wt Kontrollen signifikant erhöht ist. Insgesamt bestätigen die Daten aus den letzten beiden Abschnitten, dass sowohl Cytohesin-3 als auch  $Arl4d$  eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Proliferation in T-Zellen spielen, was erklären könnte, warum wir, wie in dem im Abschnitt 3.8 beschriebenen, im *in vivo* Infektionsexperiment eine verstärkte zelluläre Immunantwort der Knockout T-Zellen im Blut, der Milz und der Leber feststellen konnten.

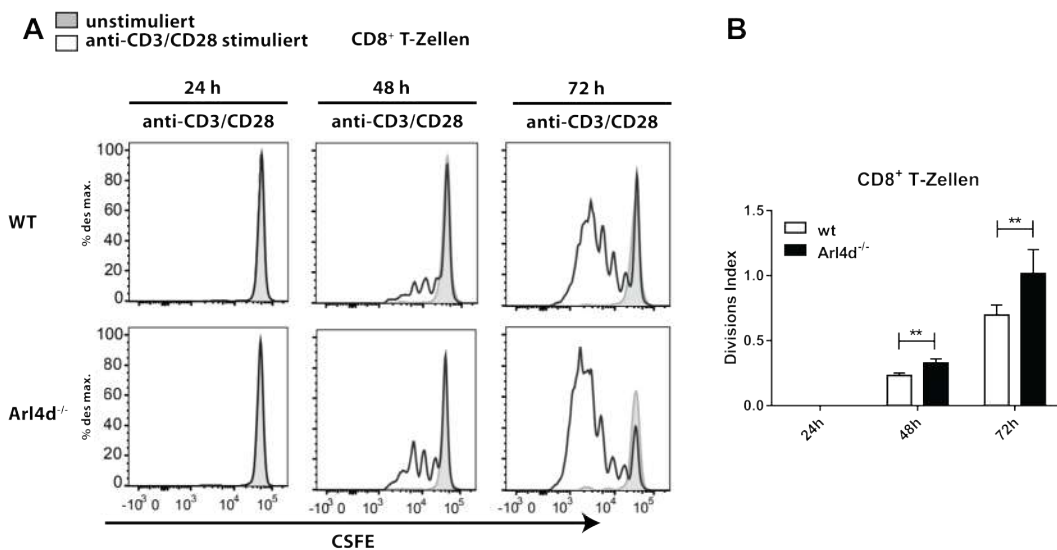


Abbildung 3.36:  **$Arl4d$ -Defizienz führt zu einer gesteigerten Proliferation in  $CD8^+$  T-Zellen.** Die Splenozyten aus wt und  $Arl4d^{-/-}$ -Mäusen wurden mit CFSE beladen und mit anti-CD3/CD28 Antikörpern für 72 h stimuliert. Als Kontrolle fungierten unstimulierte Splenozyten. Alle 24 h wurden die Zellen am FACS eingemessen, um ihre Proliferationsrate zu bestimmen. Durch die Färbung CD8 wurden die T-Zell-Subpopulationen in den Splenozyten identifiziert. Abbildung A zeigt ein exemplarisches Ergebnis von drei Experimenten ( $n=3$ ) zur Bestimmung der Proliferation von  $CD8^+$  wt und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen. In B ist der jeweilige Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ( $n=3$ ) des *Division Index* der  $CD8^+$  T-Zellen mit der Standardabweichung (SD) dargestellt.  $p < 0.01 = **$  (t-test)

## 4 Diskussion

### 4.1 Cytohesin-3 und sein Interaktionspartner Arl4d sind Markerproteine für anergische T-Zellen

Die Regulation der Aktivität des Immunsystems ist essentiell für die Verteidigung unseres Körpers gegen Pathogene, Bakterien, Pilze, Viren oder andere Parasiten. Genauso wichtig ist allerdings auch das Beenden von Immunreaktionen nach erfolgreicher Bekämpfung der Pathogene oder das Unterbinden von Immunreaktionen zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen und um negative Auswirkungen auf das gesunde Gewebe auszuschließen. Weiterhin ist es für das Immunsystem von großer Bedeutung, zwischen selbst und nicht selbst zu unterscheiden. Die zentralen (Thymus) und peripheren Toleranzmechanismen haben sich entwickelt und verhindern die Lymphozyten-vermittelte Zerstörung des eigenen Gewebes. Da die negative Selektion im Thymus nicht zu 100 % perfekt abläuft, entkommen einige autoreaktive Zellen der negativen Selektion. Für diesen Fall benutzt der Körper die periphere Toleranz, um die Aktivität dieser Zellen herunterzufahren. Sowohl das erfolgreiche Beenden von Immunreaktionen als auch die Inaktivierung von potentiell autoreaktiven Zellen werden von Signalproteinen mit suppressiven Eigenschaften reguliert. Wir konnten Cytohesin-3 und Arl4d als zwei Proteine mit suppressiven Eigenschaften identifizieren, die aktiv Prozesse der T-Zellaktivierung wie die Cytokin-Produktion oder Proliferation unterdrücken und so die T-Zellvermittelte Immunantwort regulieren.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. Bianca Paul und Korthäuer et al. wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Cytohesin-3 in anergischen und aktivierten T-Zellen detaillierter untersucht. Sie konnten zeigen, dass Cytohesin-3 in aktivierten und anergischen murinen T-Zellen differentiell exprimiert wird [135, 203]. Wir konnten diese Beobachtungen für die Cytohesin-3 Proteinexpression im murinen System bestätigen. Zusätzlich konnten wir feststellen, dass sowohl in  $CD4^+$  als auch in  $CD8^+$  T-Zellpopulationen im murinen System die Cytohesin-3 Proteinexpression stark herunterreguliert wird, wenn die T-Zellen über TCR-Stimulation und CD28 Co-Stimulation aktiviert werden (siehe Abschnitt 3.1.3). Weiterhin wurden für eine vollständige Analyse der Expression von Cytohesin-3 auch die mRNA-Level in den stimulierten Zellen untersucht. Wir detektierten, dass auch die mRNA-Expression von Cytohesin-3 in aktivierten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen spezifisch herunterreguliert ist (siehe Abschnitt 3.1.4). Um zu belegen, dass die gewonnenen Erkenntnisse aus dem murinen System auch relevant für das humane System sind, wurde auch die Expression von Cytohesin-3 in humanen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen untersucht. In den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 konnten wir belegen, dass Cytohesin-3 sowohl auf Proteinebene als auch

seine mRNA in humanen aktivierten T-Zellen herunterreguliert wird, wie es auch im murinen System der Fall ist. Dies impliziert, dass Erkenntnisse, die wir im murinen System über die Funktion von Cytohesin-3 gewinnen, höchstwahrscheinlich auch Informationen über die Funktion von Cytohesin-3 im menschlichen Körper liefern.

Durch den von Prof. Linda Diehl durchgeführten Microarray von LSEC-stimulierten und unstimulierten T-Zellen konnte *Arl4d* als ein Gen identifiziert werden, dessen Expression nach Stimulation durch die LSECs in T-Zellen hochreguliert wurde. Diese Daten konnten durch eine qPCR-Analyse der *Arl4d*-Expression in unstimulierten, DC-stimulierten und LSEC-stimulierten T-Zellen bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Gleichzeitig belegte dieses Experiment, dass auch die Expression von *Arl4d* ähnlich wie die Expression von Cytohesin-3 in aktivierten T-Zellen stark herunterreguliert wird.

Es ist bekannt, dass GEFs, zu denen auch Cytohesin-3 gehört, den Guanin-Nukleotid-Austausch an Arf und *Arf-like* Proteinen, zu denen *Arl4d* gehört, mit Hilfe der Sec7-Domäne durchführen [204]. Bisher konnten Hofmann et al. nur zeigen, dass *Arl4d* mit Cytohesin-2 interagieren kann, daher untersuchten wir, ob *Arl4d* auch mit Cytohesin-3 interagiert [121]. In Abschnitt 3.3 konnten wir zum einen die Ergebnisse von Hofmann et al. reproduzieren und gleichzeitig auch bestätigen, dass *Arl4d* neben Cytohesin-2 auch mit Cytohesin-3 interagiert. Die Aktivität von GEFs und ihren Zielproteinen ist fest miteinander verknüpft. DiNitto et al. entdeckten, dass die Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie eine autoinhibitorische Konformation in Lösung einnehmen, die wiederum in einer wechselseitigen Beziehung von Arf-Proteinen aufgelöst werden kann [205, 206]. Dies impliziert, dass Arfs oder *Arf-like* Proteine wie *Arl4d* zum einen ein Substrat für Cytohesin-3 und gleichzeitig aber auch ein Aktivator für Cytohesin-3 darstellen könnten. Diese wechselseitige Abhängigkeit könnte auch erklären, warum die Expression und die Phänotypen der Gendeletion von Cytohesin-3 und *Arl4d* in T-Zellen ähnlich ist.

Es konnte bereits für verschiedene Proteine, die ähnlich wie Cytohesin-3 und *Arl4d* immunsuppressive Eigenschaften wie die Kontrolle der Cytokin-Produktion und Proliferation der Zellen aufweisen, gezeigt werden, dass sie in anergen T-Zellen spezifisch hochreguliert werden. Beispielsweise wird die Expression der Ubiquitinligase GRAIL ähnlich wie bei Cytohesin-3 und *Arl4d* in anergen T-Zellen hochreguliert und durch den CD28 Co-Stimulations-Signalweg herunterreguliert [207]. GRAIL trägt zur T-Zellenergie bei, indem es zum einen den Abbau von co-stimulatorischen Molekülen wie CD40L und CD83 durch das Anheften von Ubiquitinresten induziert und zum anderen in die Reorganisation des Aktinzytoskeletts eingreift, was sich negativ auf die T-Zell/APC-Interaktion ausübt [207, 208, 209, 210]. Weiterhin ist GRAIL wie Cytohesin-3 und *Arl4d* bei der Inhibition der Cytokin-Produktion der T-Zellen beteiligt [211]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen weisen *grail*<sup>-/-</sup> T-Zellen eine erhöhte Cytokin-Produktion und Proliferationsrate auf [212, 213, 214]. Einen ähnlichen Phänotyp konnten wir in den Abschnitten 3.6, 3.7, 3.11.2 und 3.11.3 auch für Cytohesin-3 und *Arl4d* Knockout T-Zellen nachweisen. Neben GRAIL gibt es noch weitere Ubiquitinligasen wie Itch und Cbl-b, für die gezeigt werden konnte, dass sie suppressive Eigenschaften haben, die Cytokin-Produktion regulieren und

deren Expression in anergen T-Zellen hochreguliert ist [215, 216, 217, 218, 219].

Doch nicht nur die Expression und Phänotypen der Gendelektionen dieser Ubiquitinligasen in T-Zellen ähneln den Phänotypen von Cytohesin-3 und Arl4d, auch weitere Signalproteine, die zu den Proteinkinasen gehören, weisen diese Eigenschaften auf. Zu ihnen zählt die Proteinkinase Fyn. Fyn kontrolliert die proximale Signalweiterleitung des TCR durch die Regulation der Bindung von ZAP-70 an den TCR-Komplex und induziert so Anergie [220]. Wie es typisch für viele negative Signalfaktoren der T-Zellen ist, wird auch die Expression von Fyn in anergen T-Zellen spezifisch hochreguliert [221]. Genauso wie bei GRAIL, Cytohesin-3 und Arl4d führt auch eine Inhibition von Fyn zu einer gesteigerten Proliferation der T-Zellen [220].

Die Daten implizieren, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d sowie die zellulären Prozesse, die sie regulieren, denen typischer Markerproteine der T-Zellanergie entspricht. Zusätzlich sind auch die Phänotypen der Gendelektion von Cytohesin-3 und Arl4d den Phänotypen von Markerproteinen der T-Zellanergie ähnlich. Zusammengefasst deutet alles darauf hin, dass wir mit Cytohesin-3 und Arl4d zwei Markerproteine für anerge T-Zellen entdeckt haben.

## 4.2 Trotz hoher Sequenzhomologie weisen die Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie funktionelle Unterschiede auf

Zellen exprimieren viele Proteine, die eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen, da sie während der Evolution von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen. Häufig üben Proteine, die untereinander sehr hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen, auch dieselben oder ähnliche zelluläre Funktionen aus. Manche Proteine können sogar funktionell durch homologe Proteine ersetzt werden. Diese Redundanz wurde z.B. für Mitglieder der Connexinproteine gezeigt, welche die intrazellulären Verbindungen (*Gap junctions*) bilden [222]. Auch die Proteine der Cytohesin-Familie weisen starke Sequenzhomologien untereinander auf und könnten daher potentiell redundante Funktionen ausführen.

Bei der Analyse der Expression von Cytohesin-3 in humanen T-Zellen wurde zusätzlich die Expression der restlichen Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Cytohesin-3 eine Sonderstellung in der Familie der Cytohesine einnimmt, da es das einzige Cytohesin war, das spezifisch in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen herunterreguliert wurde. Die Expression von Cytohesin-1 und -2 veränderte sich nach der Stimulation bzw. Aktivierung der T-Zellen nicht. Dies spricht dafür, dass die Funktion dieser Cytohesine in T-Zellen nicht redundant zur Funktion von Cytohesin-3 ist. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass die Cytohesin-4 Protein- und mRNA-Expression nach Stimulation in aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen stark herunterreguliert ist. Gleichzeitig wird die Expression von Cytohesin-4 in aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen nicht verändert. Diese Beobachtung erklärt, warum Ogasawara et al. in ihrer Analyse der Expression von Cytohesin-4 in Lymphozyten in nur ca. 80 % der  $CD8^+$  T-Zellen eine Cytohesin-4 Expression detektierten

[127]. Bei den restlichen 20 % handelt es sich höchstwahrscheinlich um aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen, bei denen die Expression von Cytohesin-4 herunterreguliert wurde. Weiterhin deutet diese Beobachtung an, dass Cytohesin-4, obwohl seine Sequenz bis auf drei Basenpaare in Exon 10 mit der Cytohesin-1 Sequenz identisch ist, eine spezifische Funktion in CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, die unterschiedlich zur Funktion von Cytohesin-1 ist.

Während unserer Co-Immünpräzipitationen (siehe Abschnitt 3.3) konnten wir feststellen, dass Arl4d neben Cytohesin-2 auch mit Cytohesin-3 und -4 interagiert. Die einzige Ausnahme machte Cytohesin-1, für das Arl4d nicht als Interaktionspartner identifiziert werden konnte. Obwohl Cytohesin-1 und -3 zu über 80 % in ihrer Sequenz übereinstimmen, scheinen diese Proteine große Unterschiede aufzuweisen, was ihre Expression, Interaktionspartner und zellulären Funktionen angeht. Dafür spricht, dass wir zeigen konnten, dass lediglich die Überexpression von Cytohesin-3 zu einer stark reduzierten Aktivierung von Akt führt, während die Überexpression von Cytohesin-1 keinen Effekt auf die Aktivierung von Akt hatte (siehe Abschnitt 3.10.1). Weiterhin fand bereits Dr. Bianca Paul heraus, dass Cytohesin-1 und -3 gegensätzliche Effekte auf die Aktivierung des IL-2 Promotors haben. Durch ein IL-2 Reportergenexperiment entdeckte sie, dass Cytohesin-1 die IL-2 Promotoraktivität steigert, während Cytohesin-3 sie unterdrückt [135]. Antagonistische Funktionen homologer Proteine sind schon länger bekannt. Ein Beispiel hierfür sind STAT1 und STAT3, die antagonistische Effekte auf Apoptose und Proliferation haben, obwohl sie eine hohe Sequenzhomologie aufweisen [223]. Dieses Phänomen ist auch für die Mitglieder der Cytohesin-Proteinfamilie beschrieben worden, da beispielsweise durch Oh et al. gezeigt werden konnte, dass Cytohesin-2 und Cytohesin-3 auch gegensätzliche Funktion bei der Regulation der des Integrin-Recyclings haben und damit unterschiedlich auf Zellmigration und Zelladhäsion einwirken [224].

Einer der wenigen strukturellen Unterschiede zwischen Cytohesin-1 und -3 ist die Expression des Di- bzw. Tri-Glycin-Motivs in der PH-Domäne (siehe Abschnitt 1.2.2). Cytohesin-1 wird zu >80 % mit dem Tri-Glycin-Motiv exprimiert, während Cytohesin-3 zu >80 % mit dem Di-Glycin exprimiert wird [126, 127]. Dies führt dazu, dass Cytohesin-1 und -3 unterschiedliche Affinitäten zu den Membranlipiden PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> aufweisen. So bindet Cytohesin-3 im Vergleich zu Cytohesin-1 vermehrt an PIP<sub>3</sub>. Das ist relevant, da PIP<sub>3</sub> ein sekundärer Botenstoff ist, der während der T-Zellaktivierung gebildet wird (siehe Abschnitt 1.1.2) und wichtige Signalmoleküle wie z.B. Akt an die Plasmamembran rekrutiert, um vollständig aktiviert zu werden [225]. Durch die hohe Affinität von Cytohesin-3 zu PIP<sub>3</sub> könnte es dazu beitragen, die Rekrutierung wichtiger Signalmoleküle der T-Zellaktivierung wie Akt zu behindern, da sie um PIP<sub>3</sub> kompetitieren. Dies könnte erklären, warum lediglich Cytohesin-3 die Aktivierung von Akt vermindert und eine suppressive Wirkung auf T-Zellen hat.

### 4.3 Cytohesin-3 und Arl4d sind negative Signalfaktoren der T-Zellaktivierung, deren Expression über CD28 und PD-1 kontrolliert wird

Wir konnten im murinen und im humanen System sowohl für Cytohesin-3 als auch für Arl4d nachweisen, dass ihre Expression auf der Protein- und mRNA-Ebene stark reduziert wird, wenn die T-Zellen aktiviert werden. Zusätzlich konnte Dr. Bianca Paul zeigen, dass die Expression von Cytohesin-3 in anergen T-Zellen stark hochreguliert ist. Wir konnten eine ähnliche Expression für Arl4d feststellen. Essentiell für die Regulierung der Expression von Cytohesin-3 und Arl4d sind die Signalwege der Co-Rezeptoren CD28 und PD-1. Die Aktivierung des Co-Rezeptors CD28 ist an einer erfolgreichen Aktivierung der T-Zellen entscheidend beteiligt. Bindet CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen die Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche auf der Oberfläche von professionellen APCs wie DCs exprimiert werden, führt dies zur intrazellulären Phosphorylierung des YXXM-Motivs von CD28, was die Rekrutierung und Aktivierung der PI3-Kinase auslöst [50, 49]. Die PI3-Kinase ist ein weiterer entscheidender Signalfaktor der T-Zellaktivierung, da sie die Phosphorylierung des Membranlipids PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> induziert, was in der Rekrutierung von Akt über seine PH-Domäne an die Plasmamembran resultiert [51]. Die Aktivierung von Akt während der T-Zellaktivierung fördert zum einen die Proliferation von T-Zellen und zum anderen das Überleben der Zellen durch die Inhibierung von Zelltod-Signalwegen [52]. Eine weitere Funktion der CD28-Stimulation liegt in der Unterstützung des TCR-Signals (Siehe Abschnitt 1.1.2.2). Dazu wird das intrazelluläre YXN-Motiv phosphoryliert, um das Adapterprotein Grb2 zu rekrutieren [53]. Grb2 aktiviert zusammen mit SOS und Vav das Signalprotein Ras [54]. Diese wiederum löst wie in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben über den MAP-Kinase-Signalweg, der das Signalprotein Erk enthält, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 aus, was zur erfolgreichen Aktivierung der T-Zellen und damit zur Induzierung der IL-2 Produktion führt. Die von CD28 ausgelöste Aktivierung der PI3-Kinase, die zur Aktivierung von Akt führt, scheint ein wichtiger Regulationsfaktor für die Kontrolle der Cytohesin-3-Herunterregulation während der T-Zellaktivierung zu sein, da Dr. Bianca Paul nachweisen konnte, dass eine Inhibition der PI3-Kinase gleichzeitig auch die Herunterregulation von Cytohesin-3 während der T-Zellaktivierung inhibiert [135]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die von CD28 ausgehende Aktivierung der Signalproteine Akt und Erk maßgeblich reziprok von Cytohesin-3 und Arl4d beeinflusst werden. Dieser Punkt wird in Abschnitt 4.5 der Diskussion nochmal detailliert aufgegriffen.

Neben dem Co-Rezeptor CD28, dessen Aktivierung die Herunterregulation der Cytohesin-3- und Arl4d-Expression induziert, spielt der Co-Rezeptor PD-1 die entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Hochregulation der Expression beider Proteine. Zu den Liganden des PD-1-Rezeptors gehören PD-L1 und PD-L2. Besonders PD-L1 hat ein breites Expressionsmuster. Es wird von DCs, anderen professionellen APCs, nicht professionellen APCs, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und auch verstärkt von vielen Zellen exprimiert, die nicht

hämatopoetischen Ursprungs sind, wie z.B. LSECs. Die Expression von PD-L1 wird insbesondere durch inflammatorische Cytokine wie IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  induziert [226, 227]. Bindet PD-1 seinen Liganden, entscheidet dies darüber, ob T-Zellen aktiviert bleiben oder in einen inaktiven Zustand übergehen, indem die Proliferation, Cytokin-Produktion und zytolytische Funktionen inhibiert bzw. reduziert werden [228]. Weiterhin kann PD-1 auch Anergie in T-Zellen auslösen. So konnten beispielsweise Tsushima et al. zeigen, dass die Stimulation von PD-1 zur Induktion der T-Zellanergie in peripheren lymphatischen Organen führt [66]. Die Aktivierung des PD-1-Signalweges durch die Bindung des Liganden induziert die Rekrutierung der Phosphatasen SHP1 und SHP2, welche die Aufgabe haben, proximale Signalmoleküle des TCR-Signalweges wie ZAP-70, PKC- $\theta$  und CD3 $\zeta$  zu dephosphorylieren und somit den Signalweg zu unterdrücken [229]. Da Cytohesin-3 und Arl4d beide hochreguliert werden, wenn der PD-1-Signalweg aktiv ist, könnte man spekulieren, dass sie zu den negativen Auswirkungen des PD-1-Signalweges beitragen. In der Tat konnten wir feststellen, dass Cytohesin-3 und Arl4d sowohl die Cytokin-Produktion von IL-2 sowie weitere proinflammatorische Cytokine negativ regulieren und für die Reduzierung der Akt Aktivität verantwortlich sind. Dies sind beides Signalkaskadenergebnisse, für die beschrieben wurde, dass sie auch ein Resultat der erfolgreichen Induzierung des PD-1-Signalweges sind [228, 230, 231]. Dies impliziert, dass Cytohesin-3 und Arl4d wichtige Bestandteile des PD-1-Signalweges und seiner suppressiven Wirkung auf T-Zellen sind.

In den letzten Jahren wurde PD-1 bzw. der von dem Rezeptor ausgehende Signalweg häufig zum Ziel der Medikamenten-Entwicklung zur Bekämpfung verschiedenster Krankheiten wie Krebs, AIDS und der Alzheimer-Krankheit [232, 233, 234, 235, 236]. Da besonders viele Tumorzellen den negativen Signalfaktor PD-L1 exprimieren, ermöglicht die Blockierung des Signalweges eine verstärkte T-Zellantwort gegen den Tumor. Dieses Prinzip führte bereits zur Entwicklung von Medikamenten wie Nivolumab (Opdivo, Bristol Myers Squibb) oder Pembrolizumab (Keytruda, Merck), die seit 2014 zur Bekämpfung von Lungen-, Haut-Blut- und Nierenkrebs eingesetzt werden [237, 238, 239, 240, 232]. Dies belegt, dass ein großes therapeutisches Potential in der Modulation von negativen Signalfaktoren liegt, zu denen auch Cytohesin-3 und Arl4d gehören. Da bereits erfolgreich niedermolekulare Verbindungen wie SecinH3 hergestellt wurden, die zur Inhibition der Aktivität von Cytohesinen genutzt werden, besteht die Möglichkeit zu testen, ob eine Inhibition von Cytohesin-3 dazu beitragen kann, eine verstärkte T-Zellantwort gegen bestimmte Tumorarten auszulösen [133]. Die Möglichkeiten sind hier nicht nur auf Krebs beschränkt. Auch viele Symptome von Autoimmunkrankheiten könnten durch die Modulation von negativen Signalfaktoren wie PD-1 oder Cytohesin-3 und Arl4d bekämpft werden.

Dass Cytohesine eine wichtige Rolle in Krebszellen spielen, ist bereits bekannt. Für verschiedene Mitglieder der Cytohesin-Familie konnte bereits gezeigt werden, dass sie verstärkt in mehreren Krebsarten exprimiert werden. So sind Cytohesin-3 und -2 beispielsweise in Leberzellkarzinoma (HCC) hochreguliert [241, 242]. Pan et al. konnten zeigen, dass alle Cytohesine in Zellen von kolorektalen Karzinoma exprimiert werden [243]. Weiterhin belegen verschiedene Studien, dass eine Inhibition der Cytohesine sich durch SecinH3 oder eine

siRNA-vermittelte Herunterregulation positiv auf Leber-, Prostata-, Darm- und Lungenkrebs auswirkt [241, 244, 243, 245]. Dies impliziert, dass eine Modulation der Cytohesin-Funktion nicht nur in Immunzellen, sondern auch in Krebszellen selber zu einem positiven Krankheitsverlauf führen kann.

#### 4.4 Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Produktion proinflammatorischer Cytokine und beeinflussen so die zelluläre Immunantwort gegen Infektionen

Da sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d in aktivierten T-Zellen stark herunterreguliert ist, gingen wir davon aus, dass sie Einfluss auf die Signalkaskade der T-Zellaktivierung nehmen (siehe Abschnitt 1.1.2). Da die Signalkaskade unter anderem in der Induktion der IL-2 Produktion mündet, erwarteten wir, dass sie Einfluss auf die IL-2 Produktion haben. So konnten wir sowohl *in vitro* als auch für die Zellen des *in vivo* Adenovirus-Infektionsexperimentes zeigen, dass eine Cytohesin-3 und Arl4d-Defizienz zu einer gesteigerten IL-2 Produktion in T-Zellen führt (siehe Abschnitt 3.6, 3.8.5 und 3.8.7). Dies bedeutet, dass die Proteine selber eine suppressive Wirkung auf die IL-2 Produktion haben. Diese These wird unterstützt durch ein IL-2 Reporterexperiment, bei dem Dr. Bianca Paul entdeckte, dass Cytohesin-3 die IL-2 Promotoraktivität unterdrückt [135]. Neben der gesteigerten IL-2 Produktion konnten wir zeigen, dass Cytohesin-3- und Arl4d-defiziente T-Zellen auch IL-6, IL-17, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  verstärkt produzieren. Dies bedeutet, dass Cytohesin-3 und Arl4d nicht nur suppressiv auf die IL-2 Produktion wirken, sondern auch die Produktion vieler weiterer proinflammatorischer Cytokine supprimiert. IL-2, IL-6, IL-17, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  haben alle gemeinsam, dass ihre Produktion durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert wird [246, 247, 248]. Da ein weiterer Reporterexperiment von Dr. Bianca Paul belegen konnte, dass Cytohesin-3 die Promotoraktivität von NF- $\kappa$ B reduziert, ist davon auszugehen, dass Cytohesin-3 seine inhibitorische Wirkung auf die Produktion der proinflammatorischen Cytokine über die Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges ausübt.

Es ist bekannt, dass als Antwort auf virale Infektionen wie z.B. eine Adenovirus-Infektion viele antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu SLECs (*short lived effector cells*) differenzieren [192, 249]. Hierfür ist es essentiell, dass für die T-Zellen eine große Verfügbarkeit von IL-2 vorhanden ist und sie auf IL-2 reagieren können [250, 251, 98, 96, 252]. Hierzu trägt hauptsächlich die starke Induktion der IL-2 Produktion durch die T-Zellen selber bei. In unseren *in vivo* Infektionsexperimenten konnten wir sowohl feststellen, dass antigenspezifische Cyth3<sup>-/-</sup> sowie Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen verstärkt IL-2 produzieren als auch sich verstärkt in SLECs differenzieren. Dies ist übereinstimmend mit den Beobachtungen von Boulet et al., die auch in ihren *in vivo* Experimenten eine verstärkte Differenzierung der T-Zellen zu SLECs in Abhängigkeit von IL-2 nachweisen konnten [191].

Neben der vermehrten Bildung von SLECs konnten wir in unserem *in vivo* Experiment identifizieren, dass die antigenspezifischen Cyth3<sup>-/-</sup> und Arl4d<sup>-/-</sup> T-Zellen mehr expan-



dieren und die zelluläre Immunantwort gegenüber den wt T-Zellen dominieren (siehe Abschnitt 3.8.2, 3.8.4 und 3.8.7). Es wurden im Vergleich zu den wt T-Zellen wesentlich mehr Knockout T-Zellen im Blut, der Milz und in dem Infektionsherd Leber detektiert. Dies ist höchstwahrscheinlich auch auf die erhöhte IL-2 Produktion der Knockout-Zellen zurückzuführen, da bereits sowohl Redeker et al. als auch D'Souza et al. belegen konnten, dass T-Zellen während Infektionen verstärkt expandieren, wenn sie hohen IL-2 Levels ausgesetzt sind [253, 95]. Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d-defiziente Mäuse eine verbesserte Immunantwort gegen Infektionen aufweisen und schneller kurieren. Um dies zu belegen, sollten sowohl wt als auch die Knockout-Mäuse infiziert und die Klärung der Viren analysiert werden. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl durchgeführt. Da jedoch selbst innerhalb der infizierten wt Mäuse bereits enorme Schwankungen bezüglich der Fähigkeit, die Infektion zu bereinigen, festgestellt werden konnten, konnten die Daten nicht ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt). Um zu bestätigen, dass die Defizienz von sowohl Cytohesin-3 als auch Arl4d zu einer verbesserten Klärung von Infektionen führt, sollte in Zukunft ein anderer experimenteller Aufbau gewählt werden, der zu einer robusteren und vergleichbaren Infektion von Mäusen führt und so bessere Vergleiche zwischen wt und Knockout-Mäusen erlaubt. Zusätzlich könnte man davon ausgehen, dass die Knockout-Mäuse aufgrund der fehlenden suppressiven Wirkung von Cytohesin-3 oder Arl4d Probleme beim Regulieren von Immunreaktionen haben könnten. Dies könnte insbesondere bedeuten, dass die Mäuse anfälliger sind bzw. verstärkte Symptome in Modellen zu Erforschung von Autoimmunerkrankungen zeigen. Für diese Hypothese spricht, dass andere immunsuppressive Proteine wie GRAIL, Itch und Cbl-b, deren Expression und Gendeletionsphänotypen, wie in Abschnitt 4.1 detailliert beschrieben, denen von Cytohesin-3 und Arl4d ähneln, mit Autoimmun- und inflammatorischen Krankheiten verknüpft sind. So führt die Gendeletion von Cbl-b zu spontanen Autoimmunkrankheiten, die sich durch die Infiltration von aktivierten T- und B-Lymphozyten in multiple Organe und einem verstärkten Gewebeschaden auszeichnet [219]. Die Lymphozyten dieser Mäuse produzieren verstärkt Cytokine wie IL-2 und hyperprolifrieren ähnlich dem Phänotyp der  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen. Egawa et al. konnten auch zeigen, dass die Cbl-b sowie GRAIL-Expression in T-Zellen für die Remission von Patienten mit Colitis ulcerosa, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, wichtig sind [254].

Die verstärkte Bildung der Knockout-Zellen im Vergleich zu den wt Kontrollen im *in vivo* Infektionsexperiment könnte auf unterschiedliche Prozesse, die durch Cytohesin-3 und Arl4d beeinflusst werden, zurückzuführen sein. Laut einer unserer Hypothesen (siehe Abbildung 3.33) gingen wir davon aus, dass die Knockout-Zellen eine verbesserte Überlebensrate haben und sich daher über die Zeit im Blut, der Milz und der Leber ansammeln. Alternativ hätten die Knockout-Zellen auch eine verstärkte Proliferationsrate aufweisen können. Wie sich in Abschnitt 3.11.1 herausstellte, scheinen die  $Cyth3^{-/-}$  und  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen keine veränderten Überlebensfähigkeiten aufzuweisen. Wir konnten keine Unterschiede zwischen der Überlebensrate der Knockout T-Zellen und wt Kontrollen feststellen, egal ob sie un-

behandelt waren oder ob homeostatische Cytokine wie IL-7 und IL-15, die das Überleben sowie die Proliferation der T-Zellen fördern, zugesetzt wurden [165, 166, 167]. Um diesen Punkt auszuweiten, würde es sich anbieten, ein Folgeexperiment durchzuführen, bei dem die Zellen verstärkt gestresst werden, um festzustellen, ob Cytohesin-3 und Arl4d einen Einfluss auf stressinduzierte Apoptose haben. Zu den möglichen Stressfaktoren, die Apoptose induzieren, gehören unter anderem Strahlung, Nährstoffmangel, Hypoxie oder erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen [255, 256, 257, 258]. Weiterhin könnte man untersuchen, ob Cytohesin-3 und Arl4d die Apoptoseinduktion durch extrinsische Signale wie die Fas-Fas-Ligand-vermittelte Apoptoseinduktion beeinflussen [259].

Um zu testen, ob die stimulierten Knockout-Zellen eine verstärkte Proliferationsrate aufweisen, haben wir mit ihnen ein CFSE-Proliferationsexperiment durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.11.2 und 3.11.3 belegen, dass sowohl Cytohesin-3- als auch Arl4d-defiziente T-Zellen nach Aktivierung eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen. Fasst man die Ergebnisse der beiden Experimente zusammen, implizieren sie, dass die verstärkte Ansammlung von antigenspezifischen Knockout T-Zellen in dem Blut, der Milz und der Leber von Mäusen des *in vivo* Infektionsexperimentes wahrscheinlich auf die erhöhte Proliferationsrate der Knockout T-Zellen und nicht auf eine veränderte Apoptoserate zurückzuführen ist. Inwieweit die gesteigerte IL-2 Produktion der Knockout T-Zellen für die gesteigerte Proliferationsrate verantwortlich ist, könnte ein Experiment beantworten, bei dem die Knockout-Zellen durch Stimulation zur Proliferation gebracht und gleichzeitig IL-2-blockierende Antikörper zu den Zellen gegeben werden.

## **4.5 Cytohesin-3 und Arl4d regulieren die Akt und Erk Aktivität und beeinflussen so die Proliferation und IL-2 Produktion von T-Zellen**

Um festzustellen, welche Signalproteine durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert werden und Einfluss auf die IL-2 Produktion sowie die Proliferationsrate der T-Zellen haben, untersuchten wir, welche Signalproteine ein unterschiedliches Aktivitätsprofil in DC- und LSEC-stimulierten T-Zellen aufweisen. Da wir belegen konnten, dass die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen jeweils gegensätzlich reguliert ist, je nachdem, mit welchen APCs die T-Zellen stimuliert werden, sollten Signalproteine, die durch Cytohesin-3 und Arl4d reguliert werden, auch unterschiedlich aktiviert werden, je nachdem, ob die T-Zelle durch DCs oder LSECs stimuliert wird. Wir konnten nachweisen, dass die Signalproteine Akt und Erk in LSEC-stimulierten T-Zellen jeweils schwach phosphoryliert sind, während sie in DC-stimulierten T-Zellen sehr stark phosphoryliert sind (siehe Abschnitt 3.9). Das Aktivitätsprofil der beiden Signalproteine scheint mit der Expression von Cytohesin-3 und Arl4d negativ zu korrelieren. Dies impliziert, dass Cytohesin-3 und Arl4d die Aktivität bzw. Phosphorylierung von Akt oder Erk negativ beeinflussen könnten. Diese Vermutung konnten wir bestätigen, da zum einen die Überexpression eines Cytohesin-3 und

Arl4d-Konstrukts jeweils die Akt Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen stark inhibiert und zum anderen die Akt Phosphorylierung in LSEC-stimulierten Arl4d Knockout T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen zunimmt (siehe Abschnitte 3.10.1 und 3.10.2). Der Einfluss von Cytohesin-3 auf Akt ist abhängig von der GEF-Aktivität von Cytohesin-3, da die Überexpression einer GEF-inaktiven Mutante von Cytohesin-3 keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Akt hatte. Damit Arl4d seine Funktion auf die Akt Phosphorylierung ausüben konnte, muss es in der Lage sein, sich über seinen N-Myristoyl-Anker in Membranen zu integrieren, wo es seine Funktion als *Arf-like* GTPase ausführt. Man könnte also vermuten, dass Cytohesin-3 ein GEF für Arl4d ist und Cytohesin-3 über seine GEF-Aktivität Arl4d beeinflusst, welches wiederum in Membranen integriert sein muss, um einen Effekt auf Akt oder im Signalweg vorgeschaltete Proteine zu haben. Dass Cytohesin-3 die Aktivität von Erk beeinflusst, konnte durch ein Experiment von Dr. Jessica Grell gezeigt werden, bei dem sie die Cytohesin-3 Expression in T-Zellen durch siRNA herunterreguliert hatte, was zu einer verstärkten Phosphorylierung von Erk führte (unveröffentlichte Daten). Akt ist ein essentielles Signalprotein des T-Zellsignalweges, welche über die CD28-vermittelte Co-Stimulation aktiviert wird. Akt wirkt auf den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher wichtig für die Induktion der IL-2 Produktion ist [194]. Neben IL-2 reguliert Akt auch die Produktion von IFN $\gamma$  in T-Zellen [194]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da wir in Abschnitt 3.8.5 zeigen konnten, dass die Cytohesin-3- und Arl4d-defizienten T-Zellen des *in vivo* Infektionsexperimentes sowohl eine gesteigerte IL-2- als auch IFN $\gamma$ -Produktion aufweisen. Weiterhin reguliert Akt auch die Proliferation von T-Zellen und könnte daher für die gesteigerte Proliferationsrate der Knockout T-Zellen mitverantwortlich sein [52]. Neben Akt ist auch Erk ein wichtiges Signalmolekül des T-Zellaktivierungs-Signalweges, das die IL-2 Produktion der T-Zellen induziert. Wie detailliert in Abschnitt 1.1.2 erläutert, wird Erk über den T-Zell-Rezeptor-Signalweg während der Stimulation der T-Zellen aktiviert. Erk gehört zu den MAP-Kinasen, welche auf den Transkriptionsfaktor Fos wirken und ihn aktivieren, der wiederum an den IL-2 Promotor bindet und somit auch die IL-2 Produktion auf transkriptioneller Ebene reguliert [195, 196]. Genau wie Akt ist Erk auch ein bekannter Regulator der Proliferation von T-Zellen [197]. Zusammengenommen deutet die Datenlage an, dass Cytohesin-3 und Arl4d über die Beeinflussung der Signalproteine Akt und Erk Einfluss auf den T-Zellaktivierungs-Signalweg haben und somit die IL-2 Produktion und Proliferation der Zellen regulieren.

Die Frage, die sich nun stellt, ist, wie genau Cytohesin-3 und Arl4d Einfluss auf Akt oder Erk nehmen können. Entweder könnten sie direkt mit den Signalproteinen interagieren oder Proteine regulieren, die oberhalb von Akt und Erk im Signalweg liegen. Erste Ergebnisse deuten an, dass Cytohesin-3 und Arl4d über das Multidomänen-Gerüstprotein CNK (*connector enhancer of ksr*) auf Akt und Erk wirken. Dass CNK in der Aktivierung von Erk involviert ist, ist bekannt, da es mit Raf interagiert und dessen Aktivität steuert [260, 261, 262]. Bei Raf handelt es sich um ein Mitglied des MAP-Kinase-Signalweges, das sich oberhalb von Erk befindet und somit wichtig für seine Aktivierung ist [263]. Zusätzlich interagiert und reguliert CNK direkt Akt und somit auch die Proliferation

der Zellen [264, 265]. Wir selber konnten reproduzieren, dass CNK sowohl mit Raf als auch mit Akt interagiert (Daten nicht gezeigt). Lim et al. und Venkateswarlu et al. konnten zeigen, dass CNK mit Cytohesin-2 in Säugetieren interagiert, während Hahn et al. die Interaktion von Steppke, dem einzigen Cytohesin in *Drosophila*, mit CNK nachweisen konnten [140, 266, 267]. Dies veranlasste uns, eine Interaktionsstudie der gesamten Cytohesin-Familie mit CNK1 und CNK3 durchzuführen, um festzustellen, ob insbesondere Cytohesin-3 mit CNK interagiert. Es wurde sowohl CNK1 als auch CNK3 analysiert, da CNK1 das in Säugetieren am meisten exprimierte CNK ist, CNK3 jedoch verstärkt in T-Zellen exprimiert wird. Durch Co-Immunpräzipitationen konnten wir zeigen, dass alle Cytohesine mit CNK1 interagieren, jedoch Cytohesin-3 der einzige Interaktionspartner von CNK3 ist (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt zum einen die Beobachtungen von Lim et al., Venkateswarlu et al. und Hahn et al., zum anderen belegt es, dass auch Cytohesin-3 sowohl mit CNK1 als auch CNK3 interagiert. Gerade dass Cytohesin-3 der einzige Interaktionspartner von CNK3 ist, bestätigt die besondere Rolle von Cytohesin-3 in diesem Signalweg und unterstreicht die funktionellen Unterschiede zu Cytohesin-1, die bereits in Abschnitt 4.2 angesprochen wurden. Die initialen Ergebnisse deuten an, dass Cytohesin-3 über das CNK-Gerüstprotein direkt Einfluss auf Akt und damit die Proliferation der T-Zellen nimmt. Zusätzlich könnte man vermuten, dass Cytohesin-3 über CNK Einfluss auf die Aktivität von Raf und damit den MAP-Kinase-Signalweg inklusive Erk nimmt. Diese Hypothesen, die auf den initialen Beobachtungen beruhen, gilt es in Zukunft durch weitere Experimente zu bestätigen oder zu widerlegen.

## 4.6 Cytohesin-3 wird benötigt für die vollständige Insulinrezeptor-Aktivierung und Veränderungen des metabolischen Phänotyps von Mäusen während des Alterns

Das Hauptthema dieser Arbeit ist die Untersuchung der Funktion von Cytohesin-3 in T-Zellen. Um dieser Frage nachzugehen, benutzten wir gentechnisch veränderte Mäuse, die defizient für Cytohesin-3 sind. Bei der anfänglichen Charakterisierung der vollständigen Knockout-Maus, bei der eine Gendefizienz von Cytohesin-3 in allen Zellen vorliegt, entdeckten wir einige Phänotypen, die höchstwahrscheinlich nicht auf die Funktion von Cytohesin-3 in T-Zellen zurückzuführen ist. Das reduzierte Körpergewicht und die geringere Ausbildung des epididymalen Fettgewebes in alternden  $Cy3^{-/-}$  Mäusen scheint eher auf den Einfluss von Cytohesin-3 auf den metabolisch relevanten Signalweg des Insulinrezeptors zurückzuführen zu sein. Hafner et al. und Lim et al. implizierten bereits, dass Cytohesine bei der Modulation des Insulinrezeptor-Signalweges involviert sind [133, 140]. Interessanterweise fanden diese Studien auch genau wie in dieser Arbeit einen Einfluss der Cytohesine auf den PI3K/Akt-Signalweg. Cytohesine scheinen also nicht nur in T-Zellen die Phosphorylierung von Akt zu regulieren. Es scheint ein allgemeines Phänomen der

Cytohesin-Familie zu sein, unabhängig vom Zelltyp, in dem sie exprimiert werden. Dass Cytohesine in die Regulation des Insulin-Signalweges eingreifen, ist bekannt. Beispielsweise führt die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit SecinH3 (ein pan-Cytohesin-Inhibitor) zu einer Inhibierung des durch Insulin ausgelösten Recyclings des Glukosetransporters Glut4 [268]. Weiterhin löst die siRNA-vermittelte Herunterregulation von Cytohesin-3 in der humanen Hepatocarcinomazelllinie HepG2 eine reduzierte Reaktion auf Insulin aus [133]. Nicht nur in Säugetieren beeinflusst Cytohesin-3 den Insulin-Signalweg, denn bereits in *Drosophila* konnte beobachtet werden, dass sich die Inhibition oder siRNA-vermittelte Herunterregulierung des Cytohesin-Orthologs Steppke auf den Insulin-Signalweg auswirkt. So weisen Steppke-defiziente Larven eine reduzierte Körpergröße und Gewicht auf, die unseren Beobachtungen der seneszenten Cytohesin-3 Knockout-Mäuse ähnlich sind [134]. Dies belegt, dass die Regulation des Körpergewichts des Organismus durch Cytohesin-3 stark konserviert ist.

Da metabolische Krankheiten in der westlichen Welt weit verbreitet sind und insbesondere Typ 2-Diabetes weltweit die 9. häufigste Todesursache ist und jeder 11. Erwachsene an Diabetes Typ 2 erkrankt ist, ist es enorm wichtig, den Insulin-Signalweg und seine Mitglieder zu untersuchen, um unser Wissen über die Krankheit zu steigern und infolgedessen mögliche innovative Therapien zu entwickeln [269, 270]. Daher ist die Untersuchung des Einflusses von Cytohesin-3 in metabolischen Signalwegen wie dem Insulin-Signalweg ein eigenständiges Projekt in unserem Labor, das hauptsächlich von Dr. Bettina Jux bearbeitet wird. Durch ihre Experimente konnte sie zeigen, dass *Cyth3<sup>-/-</sup>* Mäuse eine reduzierte Insulinrezeptor-Aktivität in der Leber und im Fettgewebe aufweisen. Die Defizienz von Cytohesin-3 führt in den Mäusen zu einer Deregulierung des Insulins-Signalweges inklusive Akt und Erk, was sich auf die Aktivität von verschiedenen Enzymen ausübt, die zu einer Veränderung der Glykolyse, Gluconeogenese und Lipogenese führt (unveröffentlichte Daten). Dies wiederum hat zur Folge, dass die seneszenten *Cyth3<sup>-/-</sup>* Mäuse im Vergleich zu den wt Mäusen eine Gewichtsreduktion und weniger Fettgewebe aufweisen. Eine Erklärung für eine geringere Lebenserwartung oder den eigenartigen Fellphänotyp der *Cyth3<sup>-/-</sup>* Mäuse konnte sie in ihren bisherigen Experimenten allerdings auch nicht entdecken.

### 4.7 Zusammenfassung

Die Regulation der Aktivität des Immunsystems ist ein essentieller Bestandteil einer erfolgreichen Abwehr von Pathogenen durch unseren Körper. Sowohl die Aktivierung des Immunsystems als auch das Herunterfahren von Immunantworten nach erfolgreicher Bekämpfung von eindringenden Pathogenen sind Prozesse, die durch eine Vielzahl von Signalproteinen reguliert werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit, die einen Einblick über die Funktionen des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Cytohesin-3 und des *Arf-like* Proteins *Arl4d* in T-Zellen liefern sollte, entdeckten wir, dass Cytohesin-3 und *Arl4d* zwei Proteine mit suppressiven Eigenschaften sind, die maßgeblich die Aktivität von T-Zellen beeinflussen.

Aufbauend auf der Arbeit von Dr. Bianca Paul konnten wir in Zusammenarbeit mit Prof. Linda Diehl feststellen, dass Cytohesin-3 und Arl4d sowohl auf der Protein- als auch auf mRNA-Ebene in aktivierten bzw. DC-stimulierten T-Zellen stark herunterreguliert sind. Im Gegensatz dazu ist die Cytohesin-3- und Arl4d-Protein- und mRNA-Expression in anergen bzw. LSEC-stimulierten T-Zellen stark hochreguliert. Entscheidend für die Induktion der Expression von Cytohesin-3 und Arl4d ist der PD-1-Signalweg. Wird dieser blockiert, wird sowohl die Cytohesin-3- als auch die Arl4d-Expression nicht hochreguliert. Obwohl die meisten Experimente dieser Arbeit im murinen System durchgeführt wurden, konnten wir auch in stimulierten humanen T-Zellen feststellen, dass die Cytohesin-3- und Arl4d-Expression stark herunterreguliert wird und damit bestätigen, dass Daten, die wir im murinen System sammeln, auch für das Verständnis der Funktion von Cytohesin-3 im Menschen relevant sind.

Durch unsere Interaktionsstudien konnten wir nachweisen, dass Arl4d ein Interaktionspartner von Cytohesin-3 ist. Da die Expression beider Proteine während der T-Zellaktivierung und -anergisierung spezifisch reguliert werden, gingen wir davon aus, dass sie einen Effekt auf den TCR-Signalweg haben, für dessen Untersuchung wir Mäuse verwendet haben, die defizient für das entsprechende Gen sind. Wir konnten *in vitro* nachweisen, dass die Defizienz von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen zu einer gesteigerten Produktion von IL-2 und proinflammatorischen Cytokinen führt. Auch für die Zellen eines *in vivo* Infektionsexperimentes konnten wir nachweisen, dass sie verstärkt IL-2 produzieren und sich aufgrund dessen verstärkt zu SLECS (*short-lived effector cells*) differenzieren. Weiterhin konnten wir feststellen, dass die zelluläre Immunantwort von  $Cy3^{-/-}$  oder  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen im Vergleich zu den wt Kontrollen wesentlich stärker ausgeprägt ist. Dies ließ sich durch die Tatsache begründen, dass wir identifizieren konnten, dass sowohl  $Cy3^{-/-}$  als auch  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen eine verstärkte Proliferationsrate aufweisen.

Im nächsten Schritt untersuchten wir, über welche Signalproteine Cytohesin-3 und Arl4d Einfluss auf den TCR-Signalweg nehmen, was sich wiederum in der veränderten IL-2 Produktion und Proliferation auswirkt. Unsere Daten implizieren, dass sowohl die Aktivität von Akt als auch der MAP-Kinase Erk, die Teil des TCR-Signalweges sind, in aktivierten und anergen T-Zellen unterschiedlich reguliert sind. Dr. Jessica Grell konnte bereits in ihren Experimenten zeigen, dass Cytohesin-3 die Aktivität von Erk beeinflusst. Zusätzlich belegten unsere Experimente, dass die Überexpression von Cytohesin-3- und Arl4d-Konstrukten zu einer Verringerung der Phosphorylierung von Akt in T-Zellen führt. Übereinstimmend mit diesen Experimenten fanden wir eine verstärkte Phosphorylierung von Akt in stimulierten  $Arl4d^{-/-}$  T-Zellen. Dies bedeutet, dass Cytohesin-3 und Arl4d über die Regulierung der Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Akt und Erk den TCR-Signalweg beeinflussen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei Cytohesin-3 und Arl4d um zwei negative Signalfaktoren handelt, die die Cytokin-Produktion regulieren, was wiederum Einfluss auf die Proliferation und damit die zelluläre Immunantwort von T-Zellen hat. Sie stellen damit potentiell zwei neue Ziele für pharmakologische Untersuchungen dar, die das Ziel haben, Medikamente zur Kontrolle der Aktivität des Immunsystems zu finden.

## 4.8 Grafisches Modell zur Beschreibung der Funktion von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen

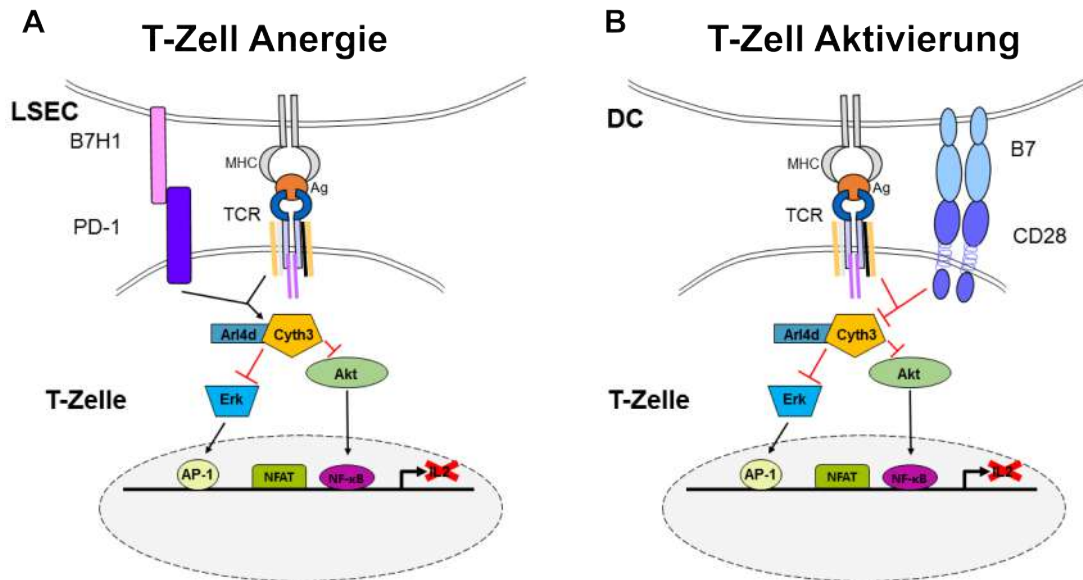


Abbildung 4.1: Modell zur Funktion von Cytohesin-3 und Arl4d in T-Zellen. (A) In anergen T-Zellen wird die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d über den PD-1-Signalweg hochreguliert. Dies führt dazu, dass sie inhibitorisch auf die Signalproteine Akt und Erk einwirken, was zu einer verringerten Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B am IL-2 Promotor führt. Dies hat wiederum eine reduzierte IL-2 Produktion der T-Zellen zur Folge, was in einer verringerten Proliferationsrate resultiert. (B) In aktivierten T-Zellen wird die Expression von Cytohesin-3 und Arl4d über den CD28-Signalweg herunterreguliert. Dies führt dazu, dass Cytohesin-3 und Arl4d nicht mehr Akt und Erk inhibieren. Die gesteigerte Akt und Erk Aktivität führt über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B zu einer verstärkten IL-2 Produktion. Diese wirkt wiederum autokrin auf die T-Zellen und steigert deren Proliferationsrate und Differenzierung zu SLECs.

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha oder anti
$\mu$	Mikro
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
AIRE	Autoimmunregulator
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren
ARL	<i>ARF-like proteins</i>
ARNO	<i>ARF nucleotide-binding site opener</i>
ARP	<i>ARF-related proteins</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BM-DC	<i>bone marrow-derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CC	<i>coiled-coil</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CE	<i>capacitance extender</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CNK	<i>connector enhancer of ksr</i>
CRAC	<i>calcium release-activated calcium channel</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
Cy	Cyanin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreithol
ECL	Elektrochemilumineszenz



## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
et al.	Et alteres (lat.: und andere)
F	Farad
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GBSS	Gey's gepufferte Salzlösungen
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym
h	Stunde
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMMEI	<i>Institutes of Molecular Medicine and Experimental Immunology</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
i.v.	intravenös
I $\alpha$ B	Inhibitor von $\alpha$ B
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
k	Kilo
KG	Körpergewicht
Ko	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>leukocyte function antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	<i>liver sinusoidale epithelial cell</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

m	Meter; Milli
M	Molarität (mol/l)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mol	Mol
m/v	Masse pro Volumen
n	Nano; Anzahl n der durchgeführten Versuche
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>natural killer</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i>
PNK	T4 Polynukleotid-Kinase
OKT	<i>Orthoclone</i>
OVA	Ovalbumin
p	Pico
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Propidiumiodid
PI-3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pLN	periphere Lymphknoten
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> oder Mustererkennungsrezeptor
RAS	<i>Rat sarcoma</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

rGM-CSF	<i>Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp-Alkaline-Phosphatase</i>
sc	subkutan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
SHP	<i>SH2-containing phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tag	Proteinmarkierung (z.B. GFP, Flag)
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T <sub>H</sub> 1	Typ1-T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 2	Typ2-T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 17	Typ17-T-Helferzellen
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TGN	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vf	Verdünnungsfaktor
VLE	<i>very low endotoxin</i>
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

# Literaturverzeichnis

- [1] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, John Wilson, and Tim Hunt. *Molecular biology of the cell*. Garland Science Taylor and Francis Group, New York, NY, sixth edition edition, 2015.
- [2] Kenneth M. Murphy and Casey Weaver. *Janeway's immunobiology*. GS Garland Science Taylor & Francis Group, New York and London, 9th edition edition, 2017.
- [3] Stephen L. Nutt, Philip D. Hodgkin, David M. Tarlinton, and Lynn M. Corcoran. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews. Immunology*, 15(3):160–171, 2015.
- [4] Stephan Halle, Olga Halle, and Reinhold Förster. Mechanisms and dynamics of t cell-mediated cytotoxicity in vivo. *Trends in immunology*, 38(6):432–443, 2017.
- [5] Jamie Rossjohn, Stephanie Gras, John J. Miles, Stephen J. Turner, Dale I. Godfrey, and James McCluskey. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual review of immunology*, 33:169–200, 2015.
- [6] S. G. Fleury, G. Croteau, and R. P. Sékaly. Cd4 and cd8 recognition of class ii and class i molecules of the major histocompatibility complex. *Seminars in immunology*, 3(3):177–185, 1991.
- [7] Ute Koch and Freddy Radtke. Mechanisms of t cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27:539–562, 2011.
- [8] Divya K. Shah and Juan Carlos Zúñiga-Pflücker. An overview of the intrathymic intricacies of t cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(9):4017–4023, 2014.
- [9] Jean-Philippe Girard, Christine Moussion, and Reinhold Förster. Hevs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology*, 12(11):762–773, 2012.
- [10] María Angélica Santana and Fernando Esquivel-Guadarrama. Cell biology of t cell activation and differentiation. *International review of cytology*, 250:217–274, 2006.
- [11] Michele Barry and R. Chris Bleackley. Cytotoxic t lymphocytes: All roads lead to death. *Nature reviews. Immunology*, 2(6):401–409, 2002.

- [12] Tiffany Caza and Steve Landas. Functional and phenotypic plasticity of cd4(+) t cell subsets. *BioMed research international*, 2015:521957, 2015.
- [13] Jinfang Zhu, Hidehiro Yamane, and William E. Paul. Differentiation of effector cd4 t cell populations (\*). *Annual review of immunology*, 28:445–489, 2010.
- [14] Jennifer E. Smith-Garvin, Gary A. Koretzky, and Martha S. Jordan. T cell activation. *Annual review of immunology*, 27:591–619, 2009.
- [15] J. Valenzuela, C. Schmidt, and M. Mescher. The roles of il-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive cd8 t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(12):6842–6849, 2002.
- [16] J. D. Ashwell and R. D. Klausner. Genetic and mutational analysis of the t-cell antigen receptor. *Annual review of immunology*, 8:139–167, 1990.
- [17] J. J. Sussman, J. S. Bonifacino, J. Lippincott-Schwartz, A. M. Weissman, T. Saito, R. D. Klausner, and J. D. Ashwell. Failure to synthesize the t cell cd3-zeta chain: Structure and function of a partial t cell receptor complex. *Cell*, 52(1):85–95, 1988.
- [18] Ugo D’Oro, Ivana Munitic, George Chacko, Tatiana Karpova, James McNally, and Jonathan D. Ashwell. Regulation of constitutive tcr internalization by the zeta-chain. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(11):6269–6278, 2002.
- [19] H. Clevers, B. Alarcon, T. Wileman, and C. Terhorst. The t cell receptor/cd3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annual review of immunology*, 6:629–662, 1988.
- [20] R. D. Klausner, J. Lippincott-Schwartz, and J. S. Bonifacino. The t cell antigen receptor: Insights into organelle biology. *Annual review of cell biology*, 6:403–431, 1990.
- [21] Craig H. Bassing, Wojciech Swat, and Frederick W. Alt. The mechanism and regulation of chromosomal v(d)j recombination. *Cell*, 109(2):S45–S55, 2002.
- [22] B. A. Irving and A. Weiss. The cytoplasmic domain of the t cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 64(5):891–901, 1991.
- [23] Paul E. Love and Sandra M. Hayes. Itam-mediated signaling by the t-cell antigen receptor. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6):a002485, 2010.
- [24] Anne-Marie K. Wegener and Bernard Malissen. Analysis of the (yxyl/i)<sub>2</sub> signalling motifs found in the cytoplasmic segment of the mouse cd3- $\zeta$  chain. In Sudhir Gupta, William E. Paul, Anthony DeFranco, and Roger M. Perlmutter, editors, *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation V*, volume 365 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 45–51. Springer US, Boston, MA, 1994.

- [25] Yili Li, Yiyuan Yin, and Roy A. Mariuzza. Structural and biophysical insights into the role of cd4 and cd8 in t cell activation. *Frontiers in immunology*, 4:206, 2013.
- [26] Maxim N. Artyomov, Mieszko Lis, Srinivas Devadas, Mark M. Davis, and Arup K. Chakraborty. Cd4 and cd8 binding to mhc molecules primarily acts to enhance lck delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39):16916–16921, 2010.
- [27] Charles Janeway. *Immunobiology: The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside]*. Garland Publ, New York, NY, 5. ed. edition, 2001.
- [28] Edgar Serfling, Friederike Berberich-Siebelt, Sergei Chuvpilo, Eriks Jankevics, Stefan Klein-Hessling, Thomas Twardzik, and Andris Avots. The role of nf-at transcription factors in t cell activation and differentiation11we dedicate this review to prof. dr. rigomar rieger (gatersleben), a great scientist and man, on the occasion of his 70th birthday. one of us (e.s.) had the pleasure of working in his department. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1498(1):1–18, 2000.
- [29] Jan Schulze-Luehrmann and Sankar Ghosh. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa b. *Immunity*, 25(5):701–715, 2006.
- [30] M. Rincón and R. A. Flavell. Ap-1 transcriptional activity requires both t-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary t lymphocytes. *The EMBO journal*, 13(18):4370–4381, 1994.
- [31] Onur Boyman and Jonathan Sprent. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 12(3):180–190, 2012.
- [32] Haopeng Wang, Theresa A. Kadlecsek, Byron B. Au-Yeung, Hanna E. Sjölin Goodfellow, Lih-Yun Hsu, Tanya S. Freedman, and Arthur Weiss. Zap-70: An essential kinase in t-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5):a002279, 2010.
- [33] J. Yoder, C. Pham, Y. M. Iizuka, O. Kanagawa, S. K. Liu, J. McGlade, and A. M. Cheng. Requirement for the slp-76 adaptor gads in t cell development. *Science (New York, N. Y.)*, 291(5510):1987–1991, 2001.
- [34] Lucio Cocco, Matilde Y. Follo, Lucia Manzoli, and Pann-Ghill Suh. Phosphoinositide-specific phospholipase c in health and disease. *Journal of lipid research*, 56(10):1853–1860, 2015.
- [35] Amy H. Andreotti, Pamela L. Schwartzberg, Raji E. Joseph, and Leslie J. Berg. T-cell signaling regulated by the tec family kinase, itk. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7):a002287, 2010.

- [36] Lawrence P. Kane and Arthur Weiss. The pi-3 kinase/akt pathway and t cell activation: Pleiotropic pathways downstream of pip3. *Immunological reviews*, 192:7–20, 2003.
- [37] T. Jayaraman, E. Ondriasová, K. Ondrias, D. J. Harnick, and A. R. Marks. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for t-cell receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13):6007–6011, 1995.
- [38] Pratima Thakur and Alla F. Fomina. Density of functional  $ca^{2+}$  release-activated  $ca^{2+}$  (crac) channels declines after t-cell activation. *Channels (Austin, Tex.)*, 5(6):510–517, 2011.
- [39] Jun O. Liu. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in t-cell activation. *Immunological reviews*, 228(1):184–198, 2009.
- [40] Jeroen P. Roose, Marianne Mollenauer, Vikas A. Gupta, James Stone, and Arthur Weiss. A diacylglycerol-protein kinase c-rasgrp1 pathway directs ras activation upon antigen receptor stimulation of t cells. *Molecular and cellular biology*, 25(11):4426–4441, 2005.
- [41] Xiao-Ping Zhong, Ehmonie A. Hainey, Benjamin A. Olenchock, Haoran Zhao, Matthew K. Topham, and Gary A. Koretzky. Regulation of t cell receptor-induced activation of the ras-erk pathway by diacylglycerol kinase zeta. *The Journal of biological chemistry*, 277(34):31089–31098, 2002.
- [42] Wei Zhang and Hui Tu Liu. Mapk signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research*, 12(1):9–18, 2002.
- [43] B. Kaminska, L. Kaczmarek, S. Zangenehpour, and A. Chaudhuri. Rapid phosphorylation of elk-1 transcription factor and activation of map kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation. *Molecular and cellular neurosciences*, 13(6):405–414, 1999.
- [44] Rebecca G. Baker, Matthew S. Hayden, and Sankar Ghosh. Nf- $\kappa$ b, inflammation, and metabolic disease. *Cell metabolism*, 13(1):11–22, 2011.
- [45] Sivakumar Vallabhapurapu and Michael Karin. Regulation and function of nf-kappab transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27:693–733, 2009.
- [46] Alain Israël. The ikk complex, a central regulator of nf-kappab activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3):a000158, 2010.
- [47] Hu Zeng, Lie Di, Guoping Fu, Yuhong Chen, Xiang Gao, Langlai Xu, Xin Lin, and Renren Wen. Phosphorylation of bcl10 negatively regulates t-cell receptor-mediated nf-kappab activation. *Molecular and cellular biology*, 27(14):5235–5245, 2007.

- [48] Jing Cheng, Angela Montecalvo, and Lawrence P. Kane. Regulation of nf- $\kappa$ b induction by tcr/cd28. *Immunologic research*, 50(2-3):113–117, 2011.
- [49] David M. Sansom, Claire N. Manzotti, and Yong Zheng. What’s the difference between cd80 and cd86? *Trends in immunology*, 24(6):313–318, 2003.
- [50] Jonathan S. Boomer and Jonathan M. Green. An enigmatic tail of cd28 signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(8):a002436, 2010.
- [51] Michael P. Czech. Pip2 and pip3. *Cell*, 100(6):603–606, 2000.
- [52] Marisa M. Juntilla and Gary A. Koretzky. Critical roles of the pi3k/akt signaling pathway in t cell development. *Immunology letters*, 116(2):104–110, 2008.
- [53] Pavel Riha and Christopher E. Rudd. Cd28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self/nonself*, 1(3):231–240, 2010.
- [54] J. A. Nunès, Y. Collette, A. Truneh, D. Olive, and D. A. Cantrell. The role of p21ras in cd28 signal transduction: Triggering of cd28 with antibodies, but not the ligand b7-1, activates p21ras. *The Journal of experimental medicine*, 180(3):1067–1076, 1994.
- [55] Julie M. Curtsinger and Matthew F. Mescher. Inflammatory cytokines as a third signal for t cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 22(3):333–340, 2010.
- [56] Matthew F. Mescher, Julie M. Curtsinger, Pujya Agarwal, Kerry A. Casey, Michael Gerner, Christopher D. Hammerbeck, Flavia Popescu, and Zhengguo Xiao. Signals required for programming effector and memory development by cd8+ t cells. *Immunological reviews*, 211:81–92, 2006.
- [57] Julie M. Curtsinger, Debra C. Lins, and Matthew F. Mescher. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive cd8 t cells: Dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine*, 197(9):1141–1151, 2003.
- [58] Pujya Agarwal, Arvind Raghavan, Sarada L. Nandiwada, Julie M. Curtsinger, Paul R. Bohjanen, Daniel L. Mueller, and Matthew F. Mescher. Gene regulation and chromatin remodeling by il-12 and type i ifn in programming for cd8 t cell effector function and memory. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(3):1695–1704, 2009.
- [59] Daniel L. Mueller. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature immunology*, 11(1):21–27, 2010.
- [60] J. Sprent and H. Kishimoto. The thymus and central tolerance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1409):609–616, 2001.



- [61] Geraldo A. Passos, Cesar A. Speck-Hernandez, Amanda F. Assis, and Daniella A. Mendes-da Cruz. Update on aire and thymic negative selection. *Immunology*, 153(1):10–20, 2018.
- [62] Yaoyao Shi and Mingzhao Zhu. Medullary thymic epithelial cells, the indispensable player in central tolerance. *Science China. Life sciences*, 56(5):392–398, 2013.
- [63] Hiroyuki Takaba and Hiroshi Takayanagi. The mechanisms of t cell selection in the thymus. *Trends in immunology*, 38(11):805–816, 2017.
- [64] J. Derbinski, A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology*, 2(11):1032–1039, 2001.
- [65] Ronald H. Schwartz. T cell anergy. *Annual review of immunology*, 21:305–334, 2003.
- [66] Fumihiko Tsushima, Sheng Yao, Tahiro Shin, Andrew Flies, Sarah Flies, Haiying Xu, Koji Tamada, Drew M. Pardoll, and Lieping Chen. Interaction between b7-h1 and pd-1 determines initiation and reversal of t-cell anergy. *Blood*, 110(1):180–185, 2007.
- [67] Leonard J. Appleman and Vassiliki A. Boussiotis. T cell anergy and costimulation. *Immunological reviews*, 192:161–180, 2003.
- [68] S. Grundstrom, M. Dohlsten, and A. Sundstedt. Il-2 unresponsiveness in anergic cd4+ t cells is due to defective signaling through the common  $\gamma$ -chain of the il-2 receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(3):1175–1184, 2000.
- [69] Lokesh A. Kalekar, Shirdi E. Schmiel, Sarada L. Nandiwada, Wing Y. Lam, Laura O. Barsness, Na Zhang, Gretta L. Stritesky, Deepali Malhotra, Kristen E. Pauken, Jonathan L. Linehan, M. Gerard O’Sullivan, Brian T. Fife, Kristin A. Hogquist, Marc K. Jenkins, and Daniel L. Mueller. Cd4(+) t cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory t cell precursors. *Nature immunology*, 17(3):304–314, 2016.
- [70] E. John Wherry. T cell exhaustion. *Nature immunology*, 12(6):492–499, 2011.
- [71] Daniel L. Barber, E. John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P. Allison, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, and Rafi Ahmed. Restoring function in exhausted cd8 t cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077):682–687, 2006.
- [72] Joel Crespo, Haoyu Sun, Theodore H. Welling, Zhigang Tian, and Weiping Zou. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 25(2):214–221, 2013.
- [73] E. John Wherry, Sang-Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalia, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L. Barber, and Rafi Ahmed. Molecular signature of cd8+ t cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 27(4):670–684, 2007.

- [74] M. Adibzadeh, H. Pohla, A. Rehbein, and G. Pawelec. Long-term culture of monoclonal human t lymphocytes: Models for immunosenescence? *Mechanisms of ageing and development*, 83(3):171–183, 1995.
- [75] R. B. Effros. Replicative senescence in the immune system: Impact of the hayflick limit on t-cell function in the elderly. *American journal of human genetics*, 62(5):1003–1007, 1998.
- [76] Arne N. Akbar and Sian M. Henson. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature reviews. Immunology*, 11(4):289–295, 2011.
- [77] V. Appay, D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. Hiv-specific cd8(+) t cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *The Journal of experimental medicine*, 192(1):63–75, 2000.
- [78] G. Pawelec and R. Solana. Immunoageing - the cause or effect of morbidity. *Trends in immunology*, 22(7):348–349, 2001.
- [79] P. A. Knolle, A. Uhrig, S. Hegenbarth, E. Löser, E. Schmitt, G. Gerken, and A. W. Lohse. Il-10 down-regulates t cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and experimental immunology*, 114(3):427–433, 1998.
- [80] Andrea Kristina Horst, Katrin Neumann, Linda Diehl, and Gisa Tiegs. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cellular & molecular immunology*, 13(3):277–292, 2016.
- [81] Angus W. Thomson and Percy A. Knolle. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology*, 10(11):753–766, 2010.
- [82] A. Limmer, J. Ohl, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to cd8+ t cells results in antigen-specific t-cell tolerance. *Nature medicine*, 6(12):1348–1354, 2000.
- [83] A. H. Lau, A. de Creus, L. Lu, and A. W. Thomson. Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: Fact or fiction? *Gut*, 52(8):1075–1078, 2003.
- [84] Johanne Poisson, Sara Lemoine, Chantal Boulanger, François Durand, Richard Moreau, Dominique Valla, and Pierre-Emmanuel Rautou. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of hepatology*, 66(1):212–227, 2017.

- [85] Jeng-Jiann Chiu and Shu Chien. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological reviews*, 91(1):327–387, 2011.
- [86] Mark D. Turner, Belinda Nedjai, Tara Hurst, and Daniel J. Pennington. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1843(11):2563–2582, 2014.
- [87] Jun-Ming Zhang and Jianxiong An. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2):27–37, 2007.
- [88] Thomas R. Malek and Iris Castro. Interleukin-2 receptor signaling: At the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, 33(2):153–165, 2010.
- [89] T. Taniguchi and Y. Minami. The il-2/il-2 receptor system: A current overview. *Cell*, 73(1):5–8, 1993.
- [90] Xinquan Wang, Mathias Rickert, and K. Christopher Garcia. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors. *Science (New York, N. Y.)*, 310(5751):1159–1163, 2005.
- [91] Thomas R. Malek. The biology of interleukin-2. *Annual review of immunology*, 26:453–479, 2008.
- [92] F. Granucci, C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli. Inducible il-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nature immunology*, 2(9):882–888, 2001.
- [93] Thomas A. Waldmann. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature reviews. Immunology*, 6(8):595–601, 2006.
- [94] T. M. Kündig, H. Schorle, M. F. Bachmann, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and I. Horak. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science (New York, N. Y.)*, 262(5136):1059–1061, 1993.
- [95] Warren N. D’Souza and Leo Lefrançois. Il-2 is not required for the initiation of cd8 t cell cycling but sustains expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(11):5727–5735, 2003.
- [96] Joshua J. Obar, Michael J. Molloy, Evan R. Jellison, Thomas A. Stoklasek, Weijun Zhang, Edward J. Usherwood, and Leo Lefrançois. Cd4+ t cell regulation of cd25 expression controls development of short-lived effector cd8+ t cells in primary and secondary responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1):193–198, 2010.

- [97] Jae-Ho Cho, Onur Boyman, Hee-Ok Kim, Bumsuk Hahm, Mark P. Rubinstein, Chris Ramsey, David M. Kim, Charles D. Surh, and Jonathan Sprent. An intense form of homeostatic proliferation of naive cd8+ cells driven by il-2. *The Journal of experimental medicine*, 204(8):1787–1801, 2007.
- [98] Vandana Kalia, Surojit Sarkar, Shruti Subramaniam, W. Nicholas Haining, Kendall A. Smith, and Rafi Ahmed. Prolonged interleukin-2 $\alpha$  expression on virus-specific cd8+ t cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity*, 32(1):91–103, 2010.
- [99] Surojit Sarkar, Vandana Kalia, W. Nicholas Haining, Bogumila T. Konieczny, Shruti Subramaniam, and Rafi Ahmed. Functional and genomic profiling of effector cd8 t cell subsets with distinct memory fates. *The Journal of experimental medicine*, 205(3):625–640, 2008.
- [100] Axel Kallies, Annie Xin, Gabrielle T. Belz, and Stephen L. Nutt. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector cd8(+) t cells and memory responses. *Immunity*, 31(2):283–295, 2009.
- [101] Rachel L. Rutishauser, Gislaine A. Martins, Sergey Kalachikov, Anmol Chandele, Ian A. Parish, Eric Meffre, Joshy Jacob, Kathryn Calame, and Susan M. Kaech. Transcriptional repressor blimp-1 promotes cd8(+) t cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory t cell properties. *Immunity*, 31(2):296–308, 2009.
- [102] Haina Shin, Shawn D. Blackburn, Andrew M. Intlekofer, Charly Kao, Jill M. Angelosanto, Steven L. Reiner, and E. John Wherry. A role for the transcriptional repressor blimp-1 in cd8(+) t cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 31(2):309–320, 2009.
- [103] Johannes L. Bos, Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. Gefs and gaps: Critical elements in the control of small g proteins. *Cell*, 129(5):865–877, 2007.
- [104] Crislyn D’Souza-Schorey and Philippe Chavrier. Arf proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5):347–358, 2006.
- [105] Alison K. Gillingham and Sean Munro. The small g proteins of the arf family and their regulators. *Annual review of cell and developmental biology*, 23:579–611, 2007.
- [106] Julie G. Donaldson and Catherine L. Jackson. Arf family g proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(6):362–375, 2011.
- [107] J. G. Donaldson and A. Honda. Localization and function of arf family gtpases. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 4):639–642, 2005.

- [108] R. Beck, M. Rawet, M. Ravet, F. T. Wieland, and D. Cassel. The copi system: Molecular mechanisms and function. *FEBS letters*, 583(17):2701–2709, 2009.
- [109] Juan S. Bonifacino and Jennifer Lippincott-Schwartz. Coat proteins: Shaping membrane transport. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(5):409–414, 2003.
- [110] Dusanka Deretic, Andrew H. Williams, Nancy Ransom, Valerie Morel, Paul A. Hargrave, and Anatol Arendt. Rhodopsin c terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to adp-ribosylation factor 4 (arf4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9):3301–3306, 2005.
- [111] Jill Kuglin Schweitzer, Alanna E. Sedgwick, and Crislyn D’Souza-Schorey. Arf6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Seminars in cell & developmental biology*, 22(1):39–47, 2011.
- [112] R. L. Boshans, S. Szanto, L. van Aelst, and C. D’Souza-Schorey. Adp-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with rac1 and rhoa. *Molecular and cellular biology*, 20(10):3685–3694, 2000.
- [113] Daniel Humphreys, Anthony C. Davidson, Peter J. Hume, Laura E. Makin, and Vassilis Koronakis. Arf6 coordinates actin assembly through the wave complex, a mechanism usurped by salmonella to invade host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42):16880–16885, 2013.
- [114] Nagaraj Balasubramanian, David W. Scott, J. David Castle, James E. Casanova, and Martin Alexander Schwartz. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nature cell biology*, 9(12):1381–1391, 2007.
- [115] H. A. Brown, S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter, and P. C. Sternweis. Adp-ribosylation factor, a small gtp-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase d activity. *Cell*, 75(6):1137–1144, 1993.
- [116] A. Honda, M. Nogami, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Nakamura, H. Watanabe, K. Kawamoto, K. Nakayama, A. J. Morris, M. A. Frohman, and Y. Kanaho. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small g protein arf6 in membrane ruffle formation. *Cell*, 99(5):521–532, 1999.
- [117] Rudy Behnia and Sean Munro. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438(7068):597–604, 2005.
- [118] B. Antony, S. Beraud-Dufour, P. Chardin, and M. Chabre. N-terminal hydrophobic residues of the g-protein adp-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon gdp to gtp exchange. *Biochemistry*, 36(15):4675–4684, 1997.

- [119] Masato Kawasaki, Kazuhisa Nakayama, and Soichi Wakatsuki. Membrane recruitment of effector proteins by arf and rab gtpases. *Current opinion in structural biology*, 15(6):681–689, 2005.
- [120] Zhongzhen Nie and Paul A. Randazzo. Arf gaps and membrane traffic. *Journal of cell science*, 119(Pt 7):1203–1211, 2006.
- [121] Irmgard Hofmann, Amanda Thompson, Christopher M. Sanderson, and Sean Munro. The arl4 family of small g proteins can recruit the cytohesin arf6 exchange factors to the plasma membrane. *Current biology : CB*, 17(8):711–716, 2007.
- [122] Chun-Chun Li, Tsai-Chen Chiang, Tsung-Sheng Wu, Gustavo Pacheco-Rodriguez, Joel Moss, and Fang-Jen S. Lee. Arl4d recruits cytohesin-2/arno to modulate actin remodeling. *Molecular biology of the cell*, 18(11):4420–4437, 2007.
- [123] Chun-Chun Li, Tsung-Sheng Wu, Chun-Fang Huang, Li-Ting Jang, Yu-Tsan Liu, Shu-Ting You, Gunn-Guang Liou, and Fang-Jen S. Lee. Gtp-binding-defective arl4d alters mitochondrial morphology and membrane potential. *PloS one*, 7(8):e43552, 2012.
- [124] Waldemar Kolanus. Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunological reviews*, 218:102–113, 2007.
- [125] W. Nagel, P. Schilcher, L. Zeitlmann, and W. Kolanus. The ph domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Molecular biology of the cell*, 9(8):1981–1994, 1998.
- [126] J. K. Klarlund, W. Tsiaras, J. J. Holik, A. Chawla, and M. P. Czech. Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of grp1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. *The Journal of biological chemistry*, 275(42):32816–32821, 2000.
- [127] M. Ogasawara, S. C. Kim, R. Adamik, A. Togawa, V. J. Ferrans, K. Takeda, M. Kirby, J. Moss, and M. Vaughan. Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for adp-ribosylation factors. *The Journal of biological chemistry*, 275(5):3221–3230, 2000.
- [128] P. Chardin, S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Béraud-Dufour, C. L. Jackson, and M. Chabre. A human exchange factor for arf contains sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608):481–484, 1996.
- [129] E. Meacci, S. C. Tsai, R. Adamik, J. Moss, and M. Vaughan. Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for adp-ribosylation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5):1745–1748, 1997.

- [130] M. Franco, J. Boretto, S. Robineau, S. Monier, B. Goud, P. Chardin, and P. Chavrier. Arno3, a sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for adp ribosylation factor 1, is involved in the control of golgi structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17):9926–9931, 1998.
- [131] S. E. Langille, V. Patki, J. K. Klarlund, J. M. Buxton, J. J. Holik, A. Chawla, S. Corvera, and M. P. Czech. Adp-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor grp1. *The Journal of biological chemistry*, 274(38):27099–27104, 1999.
- [132] Thomas Quast, Barbara Tappertzhofen, Cora Schild, Jessica Grell, Niklas Czeloth, Reinhold Förster, Ronen Alon, Line Fraemohs, Katrin Dreck, Christian Weber, Tim Lämmermann, Michael Sixt, and Waldemar Kolanus. Cytohesin-1 controls the activation of rhoa and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells. *Blood*, 113(23):5801–5810, 2009.
- [133] Markus Hafner, Anton Schmitz, Imke Grüne, Seergazhi G. Srivatsan, Bianca Paul, Waldemar Kolanus, Thomas Quast, Elisabeth Kremmer, Inga Bauer, and Michael Famulok. Inhibition of cytohesins by secinh3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444(7121):941–944, 2006.
- [134] Bernhard Fuss, Thomas Becker, Ingo Zinke, and Michael Hoch. The cytohesin steppe is essential for insulin signalling in drosophila. *Nature*, 444(7121):945–948, 2006.
- [135] Bianca Paul. *Bedeutung von Cytohesin-3 in der Signaltransduktions-Kontrolle der T-Zellaktivierung*. Phd thesis, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität zu Bonn, Bonn, 2007.
- [136] W. Kolanus, W. Nagel, B. Schiller, L. Zeitlmann, S. Godar, H. Stockinger, and B. Seed. Alpha 1 beta 2 integrin/lfa-1 binding to icam-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, 86(2):233–242, 1996.
- [137] S. Kliche, W. Nagel, E. Kremmer, C. Atzler, A. Ege, T. Knorr, U. Koszinowski, W. Kolanus, and J. Haas. Signaling by human herpesvirus 8 kaposin a through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Molecular cell*, 7(4):833–843, 2001.
- [138] Omar D. Perez, Dennis Mitchell, Gina C. Jager, Sharon South, Chris Murriel, Jacqueline McBride, Lee A. Herzenberg, Shigemi Kinoshita, and Garry P. Nolan. Leukocyte functional antigen 1 lowers t cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and jun-activating binding protein 1. *Nature immunology*, 4(11):1083–1092, 2003.
- [139] Mirko G. Theis, Alexander Knorre, Bettina Kellersch, Jörg Moelleken, Felix Wieland, Waldemar Kolanus, and Michael Famulok. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31):11221–11226, 2004.

- [140] Junghwa Lim, Ming Zhou, Timothy D. Veenstra, and Deborah K. Morrison. The cnk1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling. *Genes & development*, 24(14):1496–1506, 2010.
- [141] Douglas Hanahan. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4):557–580, 1983.
- [142] M. J. Casadaban, J. Chou, and S. N. Cohen. In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *Journal of bacteriology*, 143(2):971–980, 1980.
- [143] A. Weiss, R. L. Wiskocil, and J. D. Stobo. The role of t3 surface molecules in the activation of human t cells: A two-stimulus requirement for il 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(1):123–128, 1984.
- [144] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by dna from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1):59–74, 1977.
- [145] Jeffrey H. Miller. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 11. print edition, 1992.
- [146] R. Radloff, W. Bauer, and J. Vinograd. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex dna: The closed circular dna in hela cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(5):1514–1521, 1967.
- [147] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic acids research*, 7(6):1513–1523, 1979.
- [148] J. B. Le Pecq and C. Paoletti. A new fluorometric method for rna and dna determination. *Analytical biochemistry*, 17(1):100–107, 1966.
- [149] Michael R. Green and Joseph Sambrook. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 4. ed. edition, 2012.
- [150] A. Novogrodsky and J. Hurwitz. The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. i. phosphorylation at 5'-hydroxyl termini. *The Journal of biological chemistry*, 241(12):2923–2932, 1966.
- [151] I. R. Lehman. Dna ligase: Structure, mechanism, and function. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4166):790–797, 1974.
- [152] Harvey Lodish. *Molecular cell biology*. Media connected. Freeman, New York, NY, 4. ed., [nachdr.] edition, 2002.



- [153] Scott F. Gilbert. *Developmental biology*. Sinauer Assoc, Sunderland, Mass., 6. ed. edition, 2000.
- [154] Karin Schneider. *Untersuchung der molekularen Funktion des Stammzellfaktors Trim71 in der Karzinogenese*. Phd thesis, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität zu Bonn, Bonn, 2014.
- [155] Kun Zhang and JianFeng Chen. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration*, 6(1):20–29, 2012.
- [156] F. Granucci, E. Ferrero, M. Foti, D. Aggujaro, K. Vettoretto, and P. Ricciardi-Castagnoli. Early events in dendritic cell maturation induced by lps. *Microbes and infection*, 1(13):1079–1084, 1999.
- [157] F. L. Graham and A. J. van der Eb. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 dna. *Virology*, 52(2):456–467, 1973.
- [158] U. Zimmermann. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et biophysica acta*, 694(3):227–277, 1982.
- [159] Annette Trickett and Yiu Lam Kwan. T cell stimulation and expansion using anti-cd3/cd28 beads. *Journal of immunological methods*, 275(1-2):251–255, 2003.
- [160] S. R. Clarke, M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. Characterization of the ovalbumin-specific tcr transgenic line ot-i: Mhc elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology*, 78(2):110–117, 2000.
- [161] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- [162] N. M. GREEN. Avidin. 1. the use of (14-c)biotin for kinetic studies and for assay. *The Biochemical journal*, 89:585–591, 1963.
- [163] Nigel C. Veitch. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3):249–259, 2004.
- [164] Hervé Lecoœur. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: Influence of endogenous endonucleases. *Experimental cell research*, 277(1):1–14, 2002.
- [165] Linda M. Bradley, Laura Haynes, and Susan L. Swain. Il-7: Maintaining t-cell memory and achieving homeostasis. *Trends in immunology*, 26(3):172–176, 2005.
- [166] Hang-Rae Kim, Kyung-A Hwang, Sung-Hwan Park, and Insoo Kang. Il-7 and il-15: Biology and roles in t-cell immunity in health and disease. *Critical reviews in immunology*, 28(4):325–339, 2008.

- [167] M. Berard, K. Brandt, S. B. Paus, and D. F. Tough. Il-15 promotes the survival of naive and memory phenotype cd8+ t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(10):5018–5026, 2003.
- [168] C. R. Parish. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology*, 77(6):499–508, 1999.
- [169] N. K. Garlie, A. V. LeFever, R. E. Siebenlist, B. L. Levine, C. H. June, and L. G. Lum. T cells coactivated with immobilized anti-cd3 and anti-cd28 as potential immunotherapy for cancer. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 22(4):336–345, 1999.
- [170] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85, 1985.
- [171] U. K. LAEMMLI. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [172] Alexander J. Ninfa, David P. Ballou, and Marilee Benore. *Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology*. Wiley, Hoboken, NJ, 2. ed. edition, 2010.
- [173] William Konigsberg. [13] reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. In *Enzyme Structure, Part B*, volume 25 of *Methods in Enzymology*, pages 185–188. Elsevier, 1972.
- [174] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4350–4354, 1979.
- [175] Aaron Goldman, Jeanine A. Ursitti, Jacek Mozdzanowski, and David W. Speicher. Electroblotting from polyacrylamide gels. *Current protocols in protein science*, 82:10.7.1–16, 2015.
- [176] U. Isacson, J. Kowalewska, and G. Wettermark. Kinetic investigations of reactions between inorganic chlorine compounds and luminol. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 40(9):1653–1656, 1978.
- [177] Felix Tolksdorf. *Untersuchungen zur Funktion von Cytohesinen bei der Internalisierung von T-Zell-Rezeptor-Komplexen*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität zu Bonn, Bonn, 2011.
- [178] L. Björck and G. Kronvall. Purification and some properties of streptococcal protein g, a novel igg-binding reagent. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(2):969–974, 1984.

- [179] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*, 257(13):7847–7851, 1982.
- [180] T. Chatila, L. Silverman, R. Miller, and R. Geha. Mechanisms of t cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(4):1283–1289, 1989.
- [181] A. J. Schuerwegh, W. J. Stevens, C. H. Bridts, and L. S. de Clerck. Evaluation of monensin and brefeldin a for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry*, 46(3):172–176, 2001.
- [182] Nathan D. Pennock, Jason T. White, Eric W. Cross, Elizabeth E. Cheney, Beth A. Tamburini, and Ross M. Kedl. T cell responses: Naive to memory and everything in between. *Advances in physiology education*, 37(4):273–283, 2013.
- [183] Nerea Osinalde, Helle Moss, Onetsine Arrizabalaga, Miren J. Omaetxebarria, Blagoy Blagoev, Ana M. Zubiaga, Asier Fullaondo, Jesus M. Arizmendi, and Irina Kratchmarova. Interleukin-2 signaling pathway analysis by quantitative phosphoproteomics. *Journal of proteomics*, 75(1):177–191, 2011.
- [184] Yvette E. Latchman, Spencer C. Liang, Yin Wu, Tatyana Chernova, Raymond A. Sobel, Martina Klemm, Vijay K. Kuchroo, Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe. Pd-11-deficient mice show that pd-11 on t cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29):10691–10696, 2004.
- [185] Nick J. Proudfoot. Ending the message: Poly(a) signals then and now. *Genes & development*, 25(17):1770–1782, 2011.
- [186] Hicham Bouabe and Klaus Okkenhaug. Gene targeting in mice: A review. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1064:315–336, 2013.
- [187] Stefanie Wedepohl, Figen Beceren-Braun, Sebastian Riese, Konrad Buscher, Sven Enders, Gesche Bernhard, Karin Kilian, Véronique Blanchard, Jens Dernedde, and Rudolf Tauber. L-selectin—a dynamic regulator of leukocyte migration. *European journal of cell biology*, 91(4):257–264, 2012.
- [188] Bas J. G. Baaten, Cheng-Rui Li, Mia F. Deiro, Melissa M. Lin, Phyllis J. Linton, and Linda M. Bradley. Cd44 regulates survival and memory development in th1 cells. *Immunity*, 32(1):104–115, 2010.

- [189] Tomohiro Yamamoto, Makoto Hattori, and Tadashi Yoshida. Induction of t-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of t-cell receptor stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunology*, 121(3):383–391, 2007.
- [190] Jamie R. Schoenborn and Christopher B. Wilson. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, 96:41–101, 2007.
- [191] Salix Boulet, Jean-François Daudelin, and Nathalie Labrecque. Il-2 induction of blimp-1 is a key in vivo signal for cd8+ short-lived effector t cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(4):1847–1854, 2014.
- [192] Nikhil S. Joshi, Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R. Urso, James Hagman, Laurent Gapin, and Susan M. Kaech. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector cd8(+) t cell fates via the graded expression of t-bet transcription factor. *Immunity*, 27(2):281–295, 2007.
- [193] Julita Mikulec. *New inhibitory pathways in CD8 T cell function*. Phd thesis, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität zu Bonn, Bonn, 2015.
- [194] L. P. Kane, P. G. Andres, K. C. Howland, A. K. Abbas, and A. Weiss. Akt provides the cd28 costimulatory signal for up-regulation of il-2 and ifn-gamma but not th2 cytokines. *Nature immunology*, 2(1):37–44, 2001.
- [195] Ronald H. Schwartz. T cell clonal anergy. *Current Opinion in Immunology*, 9(3):351–357, 1997.
- [196] Alan J. Whitmarsh. Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8):1285–1298, 2007.
- [197] Warren N. D’Souza, Chiung-Fang Chang, April M. Fischer, Manqing Li, and Stephen M. Hedrick. The erk2 mapk regulates cd8 t cell proliferation and survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(11):7617–7629, 2008.
- [198] Maria Shipkova and Eberhard Wieland. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(17-18):1338–1349, 2012.
- [199] Ralph M. Böhmer, Esther Bandala-Sanchez, and Leonard C. Harrison. Forward light scatter is a simple measure of t-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(8):646–652, 2011.
- [200] T. K. Teague, L. Munn, K. Zygourakis, and B. W. McIntyre. Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry*, 14(7):772–782, 1993.

- [201] R. Or, H. Renz, N. Terada, and E. W. Gelfand. Il-4 and il-2 promote human t-cell proliferation through symmetrical but independent pathways. *Clinical immunology and immunopathology*, 64(3):210–217, 1992.
- [202] Byron B. Au-Yeung, Julie Zikherman, James L. Mueller, Judith F. Ashouri, Mehrdad Matloubian, Debra A. Cheng, Yiling Chen, Kevan M. Shokat, and Arthur Weiss. A sharp t-cell antigen receptor signaling threshold for t-cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35):E3679–88, 2014.
- [203] U. Korthäuer, W. Nagel, E. M. Davis, M. M. Le Beau, R. S. Menon, E. O. Mitchell, C. A. Kozak, W. Kolanus, and J. A. Bluestone. Anergic t lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(1):308–318, 2000.
- [204] A. Peyroche, S. Paris, and C. L. Jackson. Nucleotide exchange on arf mediated by yeast gea1 protein. *Nature*, 384(6608):479–481, 1996.
- [205] Jonathan P. DiNitto, Anna Delprato, Meng-Tse Gabe Lee, Thomas C. Cronin, Shao-hui Huang, Adilson Guilherme, Michael P. Czech, and David G. Lambright. Structural basis and mechanism of autoregulation in 3-phosphoinositide-dependent grp1 family arf gtpase exchange factors. *Molecular cell*, 28(4):569–583, 2007.
- [206] Danièle Stalder, Hélène Barelli, Romain Gautier, Eric Macia, Catherine L. Jackson, and Bruno Antonny. Kinetic studies of the arf activator arno on model membranes in the presence of arf effectors suggest control by a positive feedback loop. *The Journal of biological chemistry*, 286(5):3873–3883, 2011.
- [207] Chan C. Whiting, Leon L. Su, Jack T. Lin, and C. Garrison Fathman. Grail: A unique mediator of cd4 t-lymphocyte unresponsiveness. *The FEBS journal*, 278(1):47–58, 2011.
- [208] Neil B. Lineberry, Leon L. Su, Jack T. Lin, Greg P. Coffey, Christine M. Seroogy, and C. Garrison Fathman. Cutting edge: The transmembrane e3 ligase grail ubiquitinates the costimulatory molecule cd40 ligand during the induction of t cell anergy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3):1622–1626, 2008.
- [209] Leon L. Su, Hideyuki Iwai, Jack T. Lin, and C. Garrison Fathman. The transmembrane e3 ligase grail ubiquitinates and degrades cd83 on cd4 t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(1):438–444, 2009.
- [210] Jill M. Schartner, William T. Simonson, Sarah A. Wernimont, Lauren M. Nettenstrom, Anna Huttenlocher, and Christine M. Seroogy. Gene related to anergy in lymphocytes (grail) expression in cd4+ t cells impairs actin cytoskeletal organization during t cell/antigen-presenting cell interactions. *The Journal of biological chemistry*, 284(50):34674–34681, 2009.

- [211] Niroshana Anandasabapathy, Gregory S. Ford, Debra Bloom, Claire Holness, Violette Paragas, Christine Seroogy, Heidi Skrenta, Marie Hollenhorst, C. Garrison Fathman, and Luis Soares. Grail: An e3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic cd4+ t cells. *Immunity*, 18(4):535–547, 2003.
- [212] Martin A. Kriegel, Chozhavendan Rathinam, and Richard A. Flavell. E3 ubiquitin ligase grail controls primary t cell activation and oral tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39):16770–16775, 2009.
- [213] Roza Nurieva, Sunil Thomas, Thang Nguyen, Natalia Martin-Orozco, Ying Wang, Murali-Krishna Kaja, Xue-Zhong Yu, and Chen Dong. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *The EMBO journal*, 25(11):2623–2633, 2006.
- [214] Roza I. Nurieva, Shuling Zheng, Wei Jin, Yeonseok Chung, Yongliang Zhang, Gustavo J. Martinez, Joseph M. Reynolds, Sung-Ling Wang, Xin Lin, Shao-Cong Sun, Guillermina Lozano, and Chen Dong. The e3 ubiquitin ligase grail regulates t cell tolerance and regulatory t cell function by mediating t cell receptor-cd3 degradation. *Immunity*, 32(5):670–680, 2010.
- [215] Vijay G. Bhoj and Zhijian J. Chen. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458(7237):430–437, 2009.
- [216] Amy Erica Lin and Tak W. Mak. The role of e3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive t cells. *Current Opinion in Immunology*, 19(6):665–673, 2007.
- [217] Daniel L. Mueller. E3 ubiquitin ligases as t cell anergy factors. *Nature immunology*, 5(9):883–890, 2004.
- [218] J. M. Scharfner, C. G. Fathman, and C. M. Seroogy. Preservation of self: An overview of e3 ubiquitin ligases and t cell tolerance. *Seminars in immunology*, 19(3):188–196, 2007.
- [219] K. Bachmaier, C. Krawczyk, I. Kozieradzki, Y. Y. Kong, T. Sasaki, A. Oliveira-dos Santos, S. Mariathasan, D. Bouchard, A. Wakeham, A. Itie, J. Le, P. S. Ohashi, I. Sarosi, H. Nishina, S. Lipkowitz, and J. M. Penninger. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor cbl-b. *Nature*, 403(6766):211–216, 2000.
- [220] Andrew R. O. Watson, David K. Janik, and William T. Lee. Superantigen-induced cd4 memory t cell anergy. i. staphylococcal enterotoxin b induces fyn-mediated negative signaling. *Cellular immunology*, 276(1-2):16–25, 2012.

- [221] H. Quill, M. P. Riley, E. A. Cho, J. E. Casnellie, J. C. Reed, and T. Torigoe. Anergic th1 cells express altered levels of the protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(9):2887–2893, 1992.
- [222] Peter Bedner, Christian Steinhäuser, and Martin Theis. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochimica et biophysica acta*, 1818(8):1971–1984, 2012.
- [223] A. Stephanou and D. S. Latchman. Opposing actions of stat-1 and stat-3. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 23(3):177–182, 2005.
- [224] Seung Ja Oh and Lorraine C. Santy. Differential effects of cytohesins 2 and 3 on beta1 integrin recycling. *The Journal of biological chemistry*, 285(19):14610–14616, 2010.
- [225] M. Osaki, M. Oshimura, and H. Ito. Pi3k-akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 9(6):667–676, 2004.
- [226] Marcus Mühlbauer, Martin Fleck, Christian Schütz, Thomas Weiss, Matthias Froh, Christian Blank, Jürgen Schölmerich, and Claus Hellerbrand. Pd-11 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates t cell apoptosis. *Journal of hepatology*, 45(4):520–528, 2006.
- [227] Michael J. Eppihimer, Jason Gunn, Gordon J. Freeman, Edward A. Greenfield, Tetyana Chernova, Jamie Erickson, and John P. Leonard. Expression and regulation of the pd-11 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 9(2):133–145, 2002.
- [228] James L. Riley. Pd-1 signaling in primary t cells. *Immunological reviews*, 229(1):114–125, 2009.
- [229] Kelly-Ann Sheppard, Lori J. Fitz, Julie M. Lee, Christina Benander, Judith A. George, Joe Wooters, Yongchang Qiu, Jason M. Jussif, Laura L. Carter, Clive R. Wood, and Divya Chaudhary. Pd-1 inhibits t-cell receptor induced phosphorylation of the zap70/cd3zeta signalosome and downstream signaling to pktheta. *FEBS letters*, 574(1-3):37–41, 2004.
- [230] Richard V. Parry, Jens M. Chemnitz, Kenneth A. Frauwirth, Anthony R. Lanfranco, Inbal Braunstein, Sumire V. Kobayashi, Peter S. Linsley, Craig B. Thompson, and James L. Riley. Ctla-4 and pd-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 25(21):9543–9553, 2005.
- [231] Shunsuke Chikuma, Seigo Terawaki, Tamon Hayashi, Ryusuke Nabeshima, Takao Yoshida, Shiro Shibayama, Taku Okazaki, and Tasuku Honjo. Pd-1-mediated sup-

- pression of il-2 production induces cd8+ t cell anergy in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11):6682–6689, 2009.
- [232] Nicholas L. Syn, Michele W. L. Teng, Tony S. K. Mok, and Ross A. Soo. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology*, 18(12):e731–e741, 2017.
- [233] Sara Gandini, Daniela Massi, and Mario Mandalà. Pd-l1 expression in cancer patients receiving anti pd-1/pd-l1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 100:88–98, 2016.
- [234] Xin Wang, Feifei Teng, Li Kong, and Jinming Yu. Pd-l1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and therapy*, 9:5023–5039, 2016.
- [235] Filippos Porichis and Daniel E. Kaufmann. Role of pd-1 in hiv pathogenesis and as target for therapy. *Current HIV/AIDS reports*, 9(1):81–90, 2012.
- [236] Kutu Baruch, Aleksandra Deczkowska, Neta Rosenzweig, Afroditi Tsitsou-Kampeli, Alaa Mohammad Sharif, Orit Matcovitch-Natan, Alexander Kertser, Eyal David, Ido Amit, and Michal Schwartz. Pd-1 immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory in mouse models of alzheimer’s disease. *Nature medicine*, 22(2):135–137, 2016.
- [237] Suzanne L. Topalian, F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, Richard D. Carvajal, Jeffrey A. Sosman, Michael B. Atkins, Philip D. Leming, David R. Spigel, Scott J. Antonia, Leora Horn, Charles G. Drake, Drew M. Pardoll, Lieping Chen, William H. Sharfman, Robert A. Anders, Janis M. Taube, Tracee L. McMiller, Haiying Xu, Alan J. Korman, Maria Jure-Kunkel, Shruti Agrawal, Daniel McDonald, Georgia D. Kollia, Ashok Gupta, Jon M. Wigginton, and Mario Sznol. Safety, activity, and immune correlates of anti-pd-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*, 366(26):2443–2454, 2012.
- [238] Drew M. Pardoll. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4):252–264, 2012.
- [239] Douglas B. Johnson, Chengwei Peng, and Jeffrey A. Sosman. Nivolumab in melanoma: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*, 7(2):97–106, 2015.
- [240] Raghav Sundar, Byoung-Chul Cho, Julie R. Brahmer, and Ross A. Soo. Nivolumab in nsclc: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*, 7(2):85–96, 2015.



- [241] Ying Fu, Jun Li, Ming-Xuan Feng, Xiao-Mei Yang, Ya-Hui Wang, Yan-Li Zhang, Wenxin Qin, Qiang Xia, and Zhi-Gang Zhang. Cytohesin-3 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumor growth and vascular invasion. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(5):2123–2132, 2014.
- [242] Kedong Xu, Jie Gao, Xue Yang, Yingmin Yao, and Qingguang Liu. Cytohesin-2 as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*, 29(6):2211–2218, 2013.
- [243] Tao Pan, Junfeng Sun, Jun Zhou, Zhixuan Fu, Yiwang Hu, Shu Zheng, and Suzhan Zhang. Function and mode of action of cytohesins in the epidermal growth factor pathway in colorectal cancer cells. *Oncology letters*, 5(2):521–526, 2013.
- [244] Zhang Weizhong, Gao Shuohui, Qin Hanjiao, Man Yuhong, Yang Xiaohua, Cao Jian, and Li Lisen. Inhibition of cytohesin-1 by sirna leads to reduced igfr signaling in prostate cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 44(7):642–646, 2011.
- [245] Anke Bill, Anton Schmitz, Katharina König, Lukas C. Heukamp, Jeffrey S. Hannam, and Michael Famulok. Anti-proliferative effect of cytohesin inhibition in gefitinib-resistant lung cancer cells. *PloS one*, 7(7):e41179, 2012.
- [246] Toby Lawrence. The nuclear factor nf-kappab pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6):a001651, 2009.
- [247] Mi-La Cho, Jung-Won Kang, Young-Mee Moon, Hyo-Jung Nam, Joo-Yeon Jhun, Seong-Beom Heo, Hyun-Tak Jin, So-Youn Min, Ji-Hyeon Ju, Kyung-Su Park, Young-Gyu Cho, Chong-Hyeon Yoon, Sung-Hwan Park, Young-Chul Sung, and Ho-Youn Kim. Stat3 and nf-kappab signal pathway is required for il-23-mediated il-17 production in spontaneous arthritis animal model il-1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(9):5652–5661, 2006.
- [248] Antonio Sica, Linda Dorman, Vincenzo Viggiano, Marco Cippitelli, Paritosh Ghosh, Nancy Rice, and Howard A. Young. Interaction of nf- $\kappa$ b and nfat with the interferon- $\gamma$  promoter. *The Journal of biological chemistry*, 272(48):30412–30420, 1997.
- [249] Courtney R. Plumlee, Joshua J. Obar, Sara L. Colpitts, Evan R. Jellison, W. Nicholas Haining, Leo Lefrancois, and Kamal M. Khanna. Early effector cd8 t cells display plasticity in populating the short-lived effector and memory-precursor pools following bacterial or viral infection. *Scientific reports*, 5:12264, 2015.
- [250] Wolfgang Kastenmuller, Georg Gasteiger, Naeha Subramanian, Tim Sparwasser, Dirk H. Busch, Yasmine Belkaid, Ingo Drexler, and Ronald N. Germain. Regulatory t cells selectively control cd8+ t cell effector pool size via il-2 restriction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(6):3186–3197, 2011.

- [251] Matthew A. Williams, Aaron J. Tyznik, and Michael J. Bevan. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of cd8+ memory t cells. *Nature*, 441(7095):890–893, 2006.
- [252] Melanie Wiesel, Josh Crouse, Gregor Bedenikovic, Andrew Sutherland, Nicole Joller, and Annette Oxenius. Type-i ifn drives the differentiation of short-lived effector cd8+ t cells in vivo. *European journal of immunology*, 42(2):320–329, 2012.
- [253] Anke Redeker, Suzanne P. M. Welten, Miranda R. M. Baert, Sandra A. Vloemans, Machteld M. Tiemessen, Frank J. T. Staal, and Ramon Arens. The quantity of autocrine il-2 governs the expansion potential of cd8+ t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(10):4792–4801, 2015.
- [254] Satoshi Egawa, Hideki Iijima, Shinichiro Shinzaki, Sachiko Nakajima, Jun Wang, Jumpei Kondo, Shuji Ishii, Toshiyuki Yoshio, Takanobu Irie, Tsutomu Nishida, Yoshimi Kakiuchi, Masakazu Yasumaru, Harumasa Yoshihara, Tatsuya Kanto, Masahiko Tsujii, Shingo Tsuji, and Norio Hayashi. Upregulation of grail is associated with remission of ulcerative colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 295(1):G163–G169, 2008.
- [255] William C. Dewey, Clifton C. Ling, and Raymond E. Meyn. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 33(4):781–796, 1995.
- [256] Sun Ok Hwang and Gyun Min Lee. Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 99(3):678–685, 2008.
- [257] Ataman Sendoel and Michael O. Hengartner. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 29(3):168–176, 2014.
- [258] Mark P. Mattson and Sic L. Chan. Calcium orchestrates apoptosis. *Nature cell biology*, 5(12):1041–1043, 2003.
- [259] Harald Wajant. The fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science (New York, N. Y.)*, 296(5573):1635–1636, 2002.
- [260] A. Clapéron and M. Therrien. Ksr and cnk: Two scaffolds regulating ras-mediated raf activation. *Oncogene*, 26(22):3143–3158, 2007.
- [261] Thomas M. Lanigan, Albert Liu, Yang Z. Huang, Lin Mei, Ben Margolis, and Kun-Liang Guan. Human homologue of drosophila cnk interacts with ras effector proteins raf and rlf. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(14):2048–2060, 2003.

- [262] Algirdas Ziogas, Karin Moelling, and Gerald Radziwill. Cnk1 is a scaffold protein that regulates src-mediated raf-1 activation. *The Journal of biological chemistry*, 280(25):24205–24211, 2005.
- [263] L. Chang and M. Karin. Mammalian map kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824):37–40, 2001.
- [264] R. D. Fritz, Z. Varga, and G. Radziwill. Cnk1 is a novel akt interaction partner that promotes cell proliferation through the akt-foxo signalling axis. *Oncogene*, 29(24):3575–3582, 2010.
- [265] Nimesh Bhaskaran and Serhiy Souchelnytskyi. Systemic analysis of tgfbeta proteomics revealed involvement of plagl1/cnk1/rassf1a/src network in tgfbeta1-dependent activation of erk1/2 and cell proliferation. *Proteomics*, 8(21):4507–4520, 2008.
- [266] Kanamarlapudi Venkateswarlu. Interaction protein for cytohesin exchange factors 1 (ipcef1) binds cytohesin 2 and modifies its activity. *The Journal of biological chemistry*, 278(44):43460–43469, 2003.
- [267] Ines Hahn, Bernhard Fuss, Annika Peters, Tamara Werner, Andrea Sieberg, Dominic Gosejacob, and Michael Hoch. The drosophila arf gef steppke controls mapk activation in egfr signaling. *Journal of cell science*, 126(Pt 11):2470–2479, 2013.
- [268] Jian Li, Andrew W. Malaby, Michael Famulok, Hisataka Sabe, David G. Lambright, and Victor W. Hsu. Grp1 plays a key role in linking insulin signaling to glut4 recycling. *Developmental cell*, 22(6):1286–1298, 2012.
- [269] Aruna Pradhan. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: Inflammatory basis of glucose metabolic disorders. *Nutrition reviews*, 65(12 Pt 2):S152–6, 2007.
- [270] Yan Zheng, Sylvia H. Ley, and Frank B. Hu. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(2):88–98, 2018.