

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Untersuchungen zur Funktion der Proteinkinase B (PKB/Akt)
bei der Migration und Adhäsion von Maus-Lymphozyten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Benjamin Thabo Lapp
Francistown (Botswana)

2010

Dokumentationsblatt

Bibliografische Beschreibung

Benjamin Thabo Lapp:

„Untersuchungen zur Funktion der Proteinkinase B (PKB / Akt) bei der Migration und Adhäsion von Maus-Lymphozyten“ – 2010 – 103 Bl.; 26 Abb., 1 Tab.

Kurzreferat

Proteinkinase B (PKB, auch als Akt bezeichnet) ist eine zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase und reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, u.a. die Proliferation, den Zellzyklus, den Metabolismus und die Tumorgenese. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PKB auf die Migration und Adhäsion von Thymozyten und Lymphozyten untersucht.

Sowohl B- als auch T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten myrPKB transgener (tg) Mäuse zeigten im Vergleich zu B- und T-Zellen von Wildtyp-Mäusen eine signifikant gesteigerte Migration nach SDF-1 α -Stimulation. PKBtg Thymozyten verhielten sich entgegengesetzt zu den peripheren T-Zellen und migrierten schlechter als Wildtyp-Thymozyten. Hinsichtlich der Adhäsion an Fibronectin als auch an ICAM-1 zeigte sich ein inverses Bild zur Migration. Die schlechter migrierenden PKBtg Thymozyten adhärten nach PMA- und SDF-1 α -Stimulation signifikant besser an ICAM-1 und Fibronectin. Die besser migrierenden PKBtg CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten adhärten nach PMA- und SDF-1 α -Stimulation dagegen signifikant schlechter an ICAM-1 und Fibronectin als CD4⁺ T-Zellen von Wildtyp-Tieren. Analysen zur Expression des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 und des Integrins CD49d wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen PKBtg und Wildtyp-Zellen auf; die Expression von CD11a und CD18 waren auf PKBtg T-Zellen erhöht, trotz schlechterer Adhäsion an ICAM-1.

Durch durchflusszytometrische Untersuchungen und konfokale Mikroskopie wurde der Einfluss von PKB auf das Aktinskelett nachgewiesen. Der Anteil fibrillären Aktins, insbesondere in unstimulierten PKBtg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war im Vergleich zu Wildtyp-T-Zellen stark erhöht. Zudem polymerisierte zytoplasmatisches globuläres Aktin nach TCR/CD3-Stimulation vermehrt in PKBtg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass PKB die Migrations- und Adhäsionsprozesse von Thymozyten und peripheren T- und B-Zellen *in vitro* wesentlich beeinflusst und somit auch bei diesen Prozessen während der Immunabwehr *in vivo* eine wichtige Rolle spielen könnte.

Schlüsselwörter

Proteinkinase B (PKB/Akt) – Migration – Adhäsion – Aktin-Polymerisation

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einführung	7
1.1 Das Immunsystem	7
1.2 Die Reifung von T-Zellen	9
1.3 Die T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalleitung	10
1.4 Adhäsion	12
1.5 Migration	16
1.5.1 SDF-1 α und CXCR4-Rezeptoren bei der Migration	16
1.6 Proteinkinase B (PKB/Akt)	17
1.6.1 Aufbau und „Isoformen“ der PKB	18
1.6.2 Regulation der PKB	19
1.6.3 Physiologische Funktionen der PKB	20
1.7 Fragestellung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Mäuse	27
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	27
2.1.3 Datenauswertung und Computerprogramme	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Genotypisierung von Mäusen	31
2.2.2 Präparation lymphatischer Organe	37
2.2.3 Isolation von Lymphozytenpopulationen	39
2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	42
2.2.5 Migrationstest	43
2.2.6 Adhäsionstest	47
2.2.7 Messung der Aktin-Polymerisation	48
2.2.8 Aktinfärbung für die Konfokalmikroskopie	50
2.2.9 Statistische Analysen	51

3	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchungen zur Migration von Lymphozyten	52
3.1.1	Migration von Thymozyten	52
3.1.2	Migration von T- und B-Zellen	53
3.1.3	Migration von CD28-defizienten Lymphozyten	55
3.2	CXCR4-Expression auf Thymozyten und Lymphozyten	57
3.3	Untersuchungen zur Adhäsion von Lymphozyten	60
3.3.1	Adhäsion an Fibronectin	61
3.3.2	Adhäsion an ICAM-1	63
3.4	Analyse der CD11a-, CD18- und CD49d-Expression	65
3.5	Messung der F-Aktin-Polymerisation	67
3.5.1	Aktinpolymerisation nach CD3-Stimulation	68
3.5.2	Aktinpolymerisation nach SDF-1 α -Stimulation	70
3.6	Nachweis von F-Aktin durch Konfokalmikroskopie	73
4	Diskussion	74
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	92
7.1	Chemikalien und Reagenzien	92
7.2	Molekulargewichtsmarker	94
7.3	Antikörper	94
7.4	Zellstimulantien	96
7.5	Kits	97
7.6	Geräte und Instrumente	97
7.7	Plastikmaterialien	98
8	Danksagungen	99
9	Curriculum vitae	100
10	Publikationsverzeichnis	102
11	Erklärung	103

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Ag	Antigen
APC	antigen-präsentierende Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
bio	Biotin / biotinyliert
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	balanced salt solution
CD	cluster of differentiation
CsA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
DN	doppelt-negativ (Thymozyt)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt-positiv (Thymozyt)
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward side scatter
GF	Gesichtsfeld
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
IS	immunologische Synapse
k.o.	knock-out
kD	Kilodalton

LFA-1, -2, -3	lymphocyte function-associated antigen-1, -2, -3
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MI	Migrationsindex
min	Minute
myr	myristyliert
myrPKB	myristylierte Proteinkinase B
NK	natürliche Killerzelle
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	para-Formaldehyd
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
RT	Raumtemperatur
SALT	skin-associated lymphoid tissue
SDF-1 α	stromal-derived-factor-1 (= CXCL12)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
TCR	T-Zellrezeptor
tg	transgen(e)
Th1	T-Helferzelle vom Typ I
Th2	T-Helferzelle vom Typ II
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
VLA	very late activation antigen
wt	Wildtyp

1 Einführung

1.1 Das Immunsystem

Was sind die Ursachen von Krankheiten? Dass Krankheiten Ursachen haben müssen, die außerhalb des direkten Einflusses des Menschen stehen, und dass es Krankheiten gibt, die vom Menschen und seiner Lebensweise verursacht werden, wurde schon von Aristoteles in seiner „Nikomachischen Ethik“ vorausgesetzt. Auch waren es die Griechen, die das Übersinnliche und Magische aus den medizinischen Überlegungen auszuschließen begannen und sich auf die Beobachtung des erkrankten Wesens und seiner Umwelt konzentrierten.

Durch die Beobachtungen von Pockenimpfungen durch Mary Wortley Montagu, durch die Impfungen mit virulenten Pocken von Jan Ingenhousz und die Experimente Edward Jenners wurde die immense Bedeutung des Immunsystems im Ausgang des 18. Jahrhunderts erkannt. Jenner entdeckte den Zusammenhang zwischen dem Kontakt mit für den Menschen ungefährlichen Kuhpockenviren und dem daraus resultierenden verminderten Risiko an humanpathogenen Pockenviren zu erkranken.

Neben der Bekämpfung von Krankheitserregern, wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen, mit denen der menschliche Körper täglich konfrontiert wird, spielt das Immunsystem auch eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren. Infizierte sowie tumorartig veränderte Zellen können bei richtiger Erkennung durch das Immunsystem durch die entsprechenden Effektorzellen zum Absterben gebracht werden. Unterteilt wird das Immunsystem nach seiner Funktionsweise. Auf der einen Seite steht das angeborene, unspezifische System, das durch eine Vielzahl von evolutionsgeschichtlich alten Mechanismen zur Erregerneutralisierung beiträgt. Neben anatomischen und physiologischen Barrieren, wie Epithelien und zellulären Bestandteilen, die Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten umfassen, spielt das Komplementsystem als humoraler Arm eine bedeutende Rolle. Die Bekämpfung der Pathogene durch das angeborene System hinterlässt allerdings kein bleibendes immunologisches Gedächtnis.

Wichtigste Bestandteile des spezifischen Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten. Durch die klonale Expansion antigenspezifischer T- und B-Zellen wird eine effektive Immunantwort geschaffen, die zudem die Generierung von Gedächtniszellen beinhaltet. Die Feinabstimmung der Immunantwort wird über Zytokine, diverse Oberflächenrezeptoren und regulatorische T-Zellen gesteuert, die eine angemessene Reaktion des Immunsystems auf die entsprechenden Erreger sowie die Beendigung der Immunantwort nach erfolgreicher Elimination des Keimes sicherstellen. Im Gegensatz zum angeborenen Teil des Immunsystems verfügt das adaptive Immunsystem über antigenspezifische Rezeptoren: so exprimiert jede T- und B-Zelle auf ihrer Zelloberfläche einen ganz individuellen T-Zellrezeptor (TCR) bzw. B-Zellrezeptor (BCR), der für eine Antigenstruktur spezifisch ist.

T-Zellen erfüllen bei der Immunantwort zelluläre Aufgaben, wohingegen B-Zellen durch Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen die humorale Immunantwort stellen. Die von Plasmazellen sezernierten antigenspezifischen Antikörper sind in der Lage, pathogene Erreger zu opsonisieren. Die dadurch entstehenden Antigen-Antikörperkomplexe werden von Phagozyten wie Makrophagen erkannt und über Phagozytose eliminiert. Binden lösliche Antigene, z.B. virale Proteine, an den BCR, werden sie rezeptorvermittelt internalisiert und führen zur Aktivierung der B-Zellen. Anschließend werden die internalisierten Antigene prozessiert und die daraus resultierenden Peptide an der Zelloberfläche präsentiert. Diese Präsentation erfolgt über *major histocompatibility complex* Klasse II (MHC II)-Moleküle auf der Zelloberfläche der B-Zellen. Spezifische CD4⁺ T-Helferzellen (Th) erkennen über ihren TCR die MHC II-Peptid-Komplexe, werden dadurch aktiviert und fördern durch die Sekretion von Zytokinen und die Expression von kostimulatorischen Liganden die Aktivierung, klonale Expansion und Differenzierung der B-Zellen. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) töten virusinfizierte Zellen und Tumorzellen nach Erkennung virus- und tumorspezifischer Antigene, die über MHC I-Moleküle präsentiert werden. CTL induzieren in diesen Zellen die Apoptose über Fas-Fas-Liganden-Interaktionen und die Sekretion von Perforin, das Poren in der Zellmembran der Zielzelle ausbildet, wodurch die sekretierten Granzyme in die Zielzelle eindringen und diese zerstören können.

1.2 Die Reifung von T-Zellen

Das Immunsystem wird in primäres oder zentrales und sekundäres oder peripheres lymphatisches Gewebe unterteilt. Zu den primären Organen gehören der Thymus und das Knochenmark, in denen die Reifung von T- bzw. B-Lymphozyten stattfindet. Neben der freien Zirkulation im Blut sammeln sich Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen, zu denen neben der Milz, den Lymphknoten, den Tonsillen, dem Waldeyerschen Rachenring auch unter der Mukosa von Haut (SALT), im Respirationstrakt, Urogenitaltrakt und Gastrointestinaltrakt (MALT) liegendes lymphatisches Gewebe zählt. Bei der Reifung von T-Zellen im Thymus wandern lymphatische Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors / haematopoietic precursor*) aus dem Knochenmark in den Thymus ein.

Den Thymus unterteilt man makroskopisch in den Kortex (innerer und äußerer Kortex), den Ort der T-Zelldifferenzierungsprozesse, und das Mark (Medulla), den Ort der finalen T-Zellreifung [1]. Die lymphoiden Vorläuferzellen und frühen Differenzierungsstadien der Thymozyten exprimieren im Gegensatz zu den reifen T-Zellen weder TCR- noch die Korezeptormoleküle CD4 oder CD8 auf ihrer Zelloberfläche und werden daher als doppelt-negative (DN)-Zellen bezeichnet. Die Oberflächenmarker CD44 und CD25 [2] können im Maussystem zur weiteren Differenzierung der DN-Zellen in DN1 - DN4-Stadien eingesetzt werden: DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) und DN4 (CD44-CD25-) [3]. In den T-Zellvorläuferstadien DN3–DN4 wird der sog. prä-TCR auf der Zelloberfläche exprimiert, der aus einer pseudo präT α -Kette und einer rearrangierten TCR- β -Kette besteht. Dafür werden Abschnitte des Genoms, die für die TCR β -Kette kodieren, u.a. durch die Funktion der RAG-Gene (*recombinase activating gene*) miteinander kombiniert, zur Erzeugung einer individuellen TCR β -Kette [4, 5].

Im Übergang vom späten DN4-Stadium zum frühen CD4+CD8+ doppelt-positiven (DP)-Stadium wird die präT α -Kette durch eine rearrangierte TCR α -Kette ersetzt, so dass ein funktioneller $\alpha\beta$ -TCR exprimiert wird [6]. Nach Bildung eines TCR, der eigene MHC-Moleküle und präsentierte Selbstpeptide in Kombination mit CD4- oder CD8-MHC-Interaktionen erkennen kann, entscheidet die Stärke und Dauer des Kontaktes mit kortikalen und medullären Epithelzellen sowie dendritischen Zellen im cortico-

medullären Bereich über das weitere Schicksal der $\alpha\beta$ TCR DP-Zellen. Epithel- und dendritische Zellen exprimieren in hoher Dichte mit körpereigenen Selbstpeptiden beladene MHC I- und II-Moleküle. Sowohl ein zu „schwaches“ Signal (*death by neglect*) als auch ein zu „starkes“ Signal (negative Selektion) aus der Interaktion zwischen TCR- und MHC-Molekülen führt zur Apoptoseinduktion und resultiert in der Ausbildung zentraler Toleranz [7, 8]. DP-Zellen, die durch TCR/MHC/Peptid-Interaktionen „mittlerer“ Affinität positiv selektioniert wurden, differenzieren zu einfach-positiven (SP)-Zellen, wobei MHC-II/Selbstpeptid erkennende DP-Zellen zu CD4+ T-Zellen und MHC-I/Selbstpeptid erkennende DP-Zellen zu CD8+ T-Zellen reifen. SP-T-Zellen verlassen schließlich den Thymus und migrieren zur Erfüllung ihrer Aufgaben in die sekundären lymphatischen Organe [9].

1.3 Die T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalleitung

Nach dem Binden eines Antigens an den dafür spezifischen TCR und der zusätzlichen Aktivierung durch kostimulatorische Rezeptoren, wie CD28, werden unter der Formierung einer „immunologischen Synapse“ (IS) zahlreiche Signaltransduktionskaskaden angeschaltet, die zur Expression verschiedener Gene und der Aktivierung der T-Zelle führen. Generell wirken diese Signaltransduktionskaskaden über verschiedene membrangebundene und zytosolische Adapterproteine, Proteinkinasen und Phosphatasen, wobei die membranständigen Adaptermoleküle zyttoplasmatische Proteine an die Membran rekrutieren und so die frühen Schritte der Signalkette ermöglichen (siehe Abb. 1.1).

Der TCR-Komplex besteht aus zwei über eine Disulfidbrücke miteinander verbundenen Untereinheiten (α/β - oder γ/δ -Ketten), die wiederum jeweils aus einer konstanten (C) und einer variablen Domäne (V) bestehen. Die C-terminalen Enden der Ketten verankern den Rezeptor in der Membran und reichen bis in den cytoplasmatischen Raum [10]. Der heterodimere TCR ist mit dem aus sechs Peptidketten bestehenden CD3-Komplex (eine CD3 γ - und CD3 δ -Kette sowie zwei CD3 ϵ - und CD3 ζ -Ketten) assoziiert (TCR/CD3-Komplex), über den die Signaltransduktion initiiert wird [11].

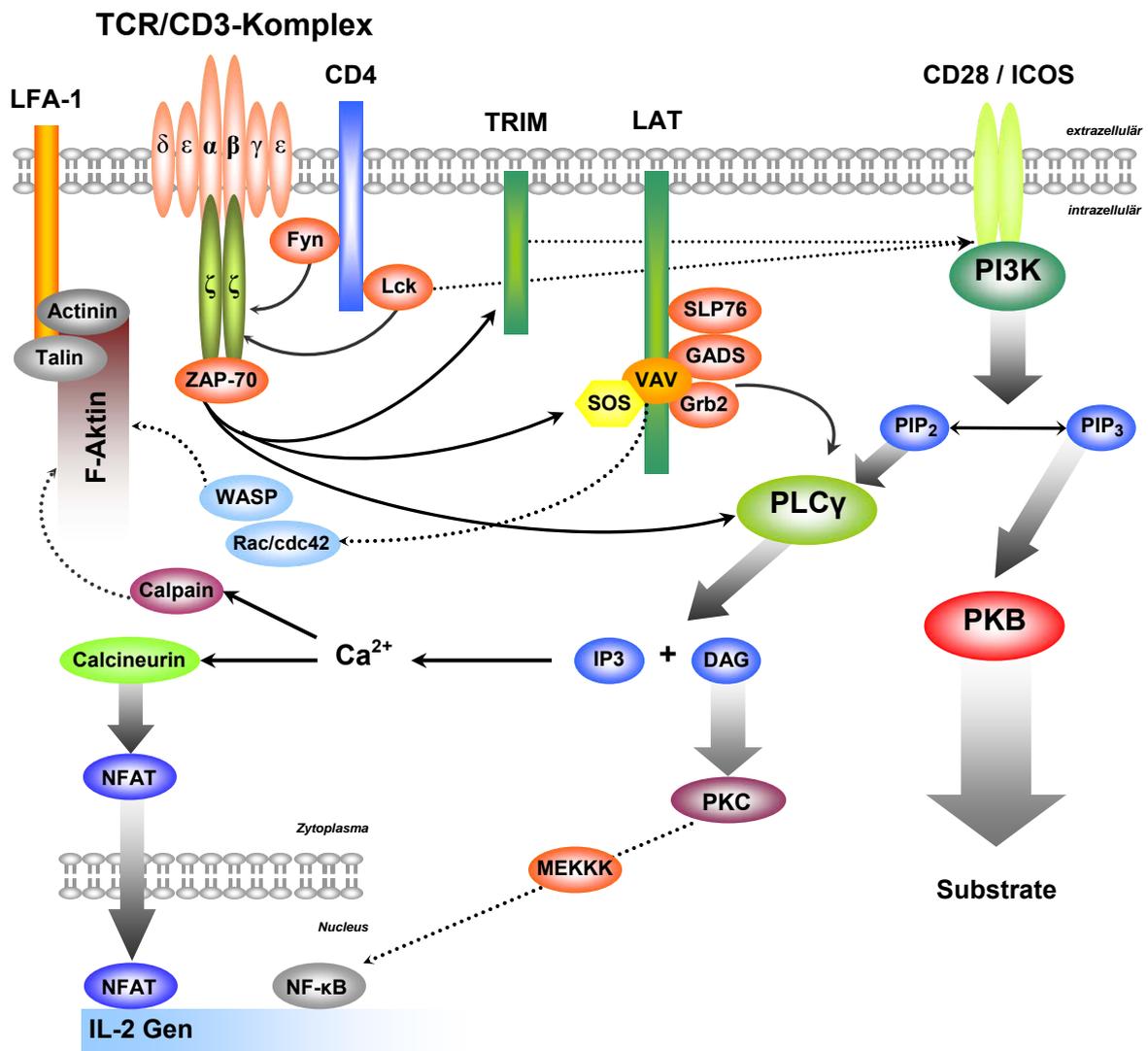


Abbildung 1.1 – Signalkaskade der T-Zellaktivierung. Schematische Darstellung wichtiger Signalproteine der T-Zellaktivierung; nach: (1) PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation; K. Okkenhaug et al.; Nature Reviews Immunology 3, 317-330; 2003; (2) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling; V. Hořejší, W. Zhang and B. Schraven; Nature Reviews Immunology 4, 603-616; 2004.

Nach Binden des spezifischen Antigens an den TCR werden zunächst die beiden Tyrosin-Proteinkinasen Lck und Fyn, beides Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, aktiviert. Lck ist konstitutiv mit den cytoplasmatischen Domänen der Korezeptoren CD4 und CD8 assoziiert, Fyn mit den cytoplasmatischen Domänen der CD3 ζ - und CD3 ϵ -Ketten [12]. Aktivierte Lck phosphoryliert die ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) der ζ -Ketten des TCR/CD3-Komplexes und ermöglicht derart

die Bindung der Kinase ZAP-70 (*ζ-chain associated protein*) an die ζ-Ketten, wonach ZAP-70 durch Lck phosphoryliert und aktiviert wird [13]. ZAP-70 wiederum phosphoryliert Transmembran- und Adapterproteine wie LAT (*linker of activated T cells*) und TRIM (*T cell receptor interacting molecule*), über die eine Vielzahl weiterer Signalproteine rekrutiert und aktiviert werden, u.a. Shc-Grb2-SOS, SLP76, PI3K und PLCγ (Phospholipase Cγ).

PLCγ spaltet membran-assoziiertes PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in die *second-messenger*-Moleküle DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Inositoltriphosphat), welches zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und zum Influx von extrazellulärem Ca²⁺ durch calciumregulierte Calciumkanäle (*CRAC channels*) der Plasmamembran führt. Über DAG werden Proteine der Proteinkinase C (PKC)-Familie aktiviert, die u.a. den Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor kappa B*) aktivieren. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt u.a. zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, die durch Dephosphorylierung die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) bewirkt. NFAT fungiert als Transkriptionsregulator zahlreicher Gene, u.a. von IL-2, IL-4 und FasL [14]. Über DAG und Ras Grp wird der Ras-MEK-ERK Signalweg und über PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) der PKB (Proteinkinase B)/Akt-Signalweg aktiviert.

Neben dem Signal durch den TCR sind kostimulatorische Signale für die T-Zell-Aktivierung, IL-2-Produktion und Zellproliferation erforderlich. Erwähnt seien der CD28-Rezeptor und ICOS (*inducible T-cell co-stimulator*), die beide ein sog. PI3K-bindendes Motiv (Tyr-Xaa-Xaa-Met) enthalten und zusätzlich zum TCR den PI3K/PKB-Signalweg aktivieren können [15, 16].

1.4 Adhäsion

Im Fall einer Infektion müssen die Zellen des Immunsystems über die Blutbahn in die Peripherie des Körpers zum Infektionsherd gelangen. Am Ort der Infektion müssen die Lymphozyten zunächst das Gefäßsystem verlassen, ein Prozess der als Extravasation oder endotheliale Transmigration bezeichnet wird [17]. Dazu bedarf es der Adhäsion der Lymphozyten an das Blutgefäßendothel, die über diverse Moleküle gesteuert wird und hauptsächlich in den postkapillären Venulen stattfindet, da hier die

hämodynamischen Scherkräfte am geringsten sind. Die der Migration vorangehende Adhäsion lässt sich in folgende Stadien differenzieren:

1. lockere Adhäsion (*rolling adhesion* bzw. *rolling interaction*)
2. feste Bindung (*tight adhesion* bzw. *tight binding*)
3. Diapedese / Extravasation

Nach der Aktivierung von Leukozyten durch Pathogene werden diverse Zytokine mit chemoattraktiver Wirkung, wie IL-8, MCP-1, IL-1 und TNF- α freigesetzt. Konsekutiv kommt es zu einer vermehrten Sekretion von Chemokinen und der Expression von Adhäsionsmolekülen durch das Endothel der Blut- oder Lymphgefäße. Zirkulierende Lymphozyten werden also zusätzlich zu einem Chemokingradienten gezielt durch die vermehrte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle an den Ort einer Infektion rekrutiert.

Bei den für die Adhäsion wichtigen Interaktionen, bei denen entweder Zellen mit Zellen (Zell-Zell-Interaktion) oder Zellen mit der Extrazellulärmatrix (ECM) interagieren, spielen mehrere Strukturfamilien von Adhäsionsmolekülen eine entscheidende Rolle. Die meisten der Adhäsionsmoleküle gehören zu einer der folgenden Gruppen:

Selektine

Selektine sind monomere, transmembranöse Glycoproteine, die N-terminal eine lectinähnliche Domäne besitzen [18]. Diese bindet schwach Kohlenhydrate – u.a. fucosylierte Oligosaccharide – und initiiert darüber die Leukozyten-Endothel-Interaktion (*rolling adhesion*) sowie Tumorzellmetastasierung [19]. Als Beispiele seien E-Selektin (CD62E), das auf Endothelzellen exprimiert wird, L-Selektin (CD62L) auf Leukozyten und P-Selektin (CD62P / GMP-140) auf Thrombozyten und Endothelzellen genannt.

Cadherine

Cadherine sind eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die sich als Liganden selbst binden können, also z.T. homophile Bindung eingehen. Verschiedene Vertreter dieser Familie weisen organspezifische Verteilungsmuster auf und werden dementsprechend E-Cadherin (epithelial), P-Cadherin (plazentar) und N-Cadherin (neuronal) genannt.

Immungloblinsuperfamilie (IgSF)

Die Adhäsionsmoleküle der IgSF umfassen neben den strukturell ähnlichen ICAMs (*intercellular adhesion molecule*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) auch NCAM (*neural cell adhesion molecule*) und interagieren mit den Integrinen. Bindung an ICAM-1 und -2 auf Endothelzellen befähigt Lymphozyten zur Diapedese. ICAM-3 ist wichtig für die Interaktionen von T-Zellen mit APCs, speziell dendritischen Zellen. Weitere Adhäsionsmoleküle sind CD2, CD48, und CD22.

Integrine

Entzündungsreaktionen aktivieren das Gefäßendothel und es kommt zur verstärkten Exprimierung von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und -2, zwei Adhäsionsmolekülen der IgSF. Diese sind Liganden für Integrine, die von Leukozyten exprimiert werden. Aus der rollenden, schwachen Adhäsion wird durch Konformationsänderung der Integrine in aktivierten T-Zellen eine feste Bindung (*tight adhesion*) möglich. Strukturell handelt es sich bei Integrinen um Heterodimere, bestehend aus einer großen α -Untereinheit (UE) mit Bindungsstellen für zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), die nicht-kovalent mit einer kleineren β -UE gepaart ist [20]. Bekannt sind 24 verschiedene α -UEen, die in verschiedensten Kombinationen mit 9 bekannten β -UEen auftreten können – alle theoretisch möglichen Kombinationen kommen dabei jedoch nicht vor. Leukozytenintegrine beinhalten hauptsächlich die β_2 -UE gepaart mit verschiedenen α -UEen. Beispielhaft für verschiedene Integrine seien das auf Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen exprimierte $\alpha_L\beta_2$ Integrin (LFA-1 oder CD11a / CD18) genannt, das ICAM-1 und ICAM-2 bindet, sowie $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5 oder CD49d / CD29), das Fibronectin bindet. Bindung des entsprechenden Liganden an das jeweilige Integrin führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, u.a. der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und PI3K/PKB-Signalwege (siehe Abb. 1.2).

Neben ihrer Funktion in der Adhäsion unterstützen Integrine auch die Kommunikation zwischen T-Zellen und APCs. Durch binden eines Antigen und konsekutiver TCR-Aktivierung kommt es über die intrazelluläre T-Zellrezeptor-Signaltransduktionskaskade zu einer Aktivierung der Integrine an der Zelloberfläche durch Konformations-

änderung und Akkumulation (*clustering*); dieser von „innen-nach-außen“ gerichtete Signalweg [21] wird über verschiedene Signalproteine ermöglicht (siehe Abb.1.2).

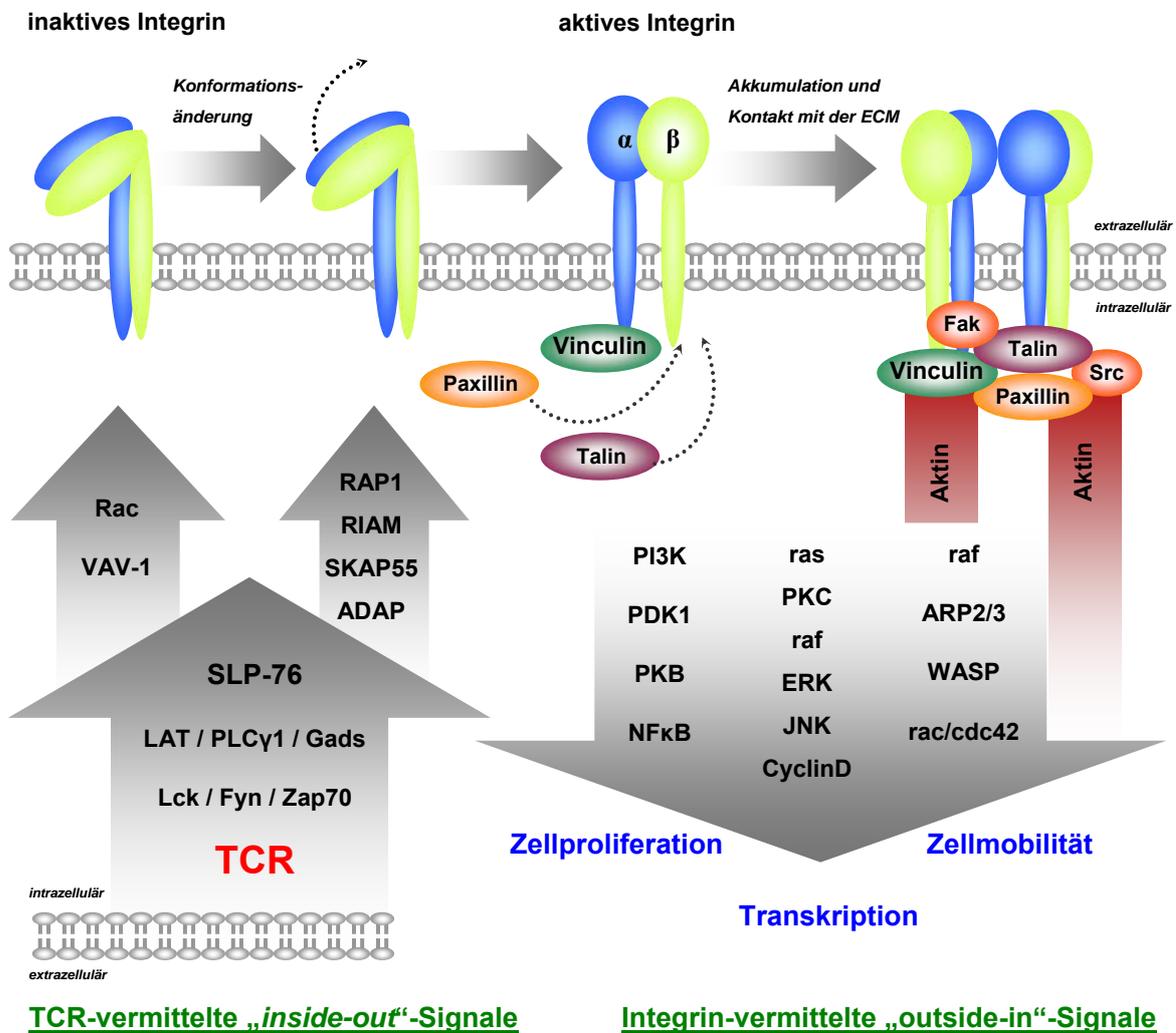


Abbildung 1.2 – Aktivierung von Integrinen (nach: (1) *ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling*; K. Legate, E. Montañez, O. Kudlacek and R. Füssler; Nature Reviews Molecular Cell Biology 7, 20-31; 2006); (2) Hynes; Cell 101: 673-687; 2002; (3) Homepage des Laboratory of Molecular Electron Microscopy (Stand November 2009); T. Walz, Center for Cellular and Molecular Dynamics; Harvard Medical School) und (4) *Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules*; G. Ménasché, S. Kliche, N. Bezman und B. Schraven; immunological Reviews; Vol. 218: 82-91; 2007

1.5 Migration

Nach der Adhäsion an Endothelzellen des Gefäßsystems und der Diapedese durch die Zellzwischenräume der Gefäßwand vollführen Lymphozyten eine zielgerichtete Bewegung entlang eines Chemokingradienten und verschiedenster Strukturelemente der Extrazellulärmatrix, bzw. durch das Parenchym verschiedenster Organe. Neben der Aktivierung von T-Zellen, deren Teilung und der Adhäsion am Endothel von Gefäßen, erfordert insbesondere die Migration eine streng kontrollierte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Auch der als *homing* bezeichnete Prozess, also das kontinuierliche Zirkulieren von Lymphozyten durch den Blutkreislauf bzw. die Lymphgefäße und letztendlich die Rückkehr in das lymphatische Organ, sind eng mit der Organisation des Aktin-Zytoskeletts verknüpft [22, 23].

1.5.1 SDF-1 α und CXCR4-Rezeptoren bei der Migration

Chemokine (**chemotaktische Zytokine**) können bei Zellen eine Wanderungsbewegung (Chemotaxis) auslösen; dabei bewegen sich Lymphozyten entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Konzentration. Chemokine sind 8 – 10 kDa große Zytokine und werden entsprechend der Position ihrer ersten beiden Cysteine in der AS-Sequenz in vier Gruppen (CXC, CC, C und CX3C) eingeteilt [24]. Sie spielen neben der Chemotaxis eine zentrale Rolle bei der Migration von Leukozyten im Gewebe und bei deren Auswanderung aus dem Blut.

Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt v.a. über heterotrimere G-Proteine der G_i-Familie [25, 26]. CXCR4 (SDF-1-Rezeptor, CD184), ein aus 352 AS bestehendes Transmembranprotein, bindet das CXC-Chemokin *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1, auch als CXCL-12 bekannt). Von dem Chemokin SDF-1 existieren zwei, durch alternatives „Spleißen“ entstehende Isoformen: SDF-1 α (89 AS) und SDF-1 β (C-Terminus um 4 AS verlängert) [27], deren funktioneller Unterschied bis lang nicht geklärt werden konnte, die aber über eine nahezu gleiche Affinität zum Rezeptor verfügen und eine unterschiedliche Expression in unterschiedlichen Geweben zeigen [28].

CXCR4 und sein spezifischer Ligand SDF-1 stehen im Blickpunkt aktueller Forschungsarbeiten, da neben seiner Funktion als „klassischer“ Chemokinrezeptor,

CXCR4 wichtig für die Hämatopoese, Organogenese und Angiogenese/Vaskularisation ist [29], wobei die Angiogenese u.a. VEGF-(*vascular endothelial growth factor*) vermittelt über den PKB/Akt-Signalweg abläuft [30]. Neben dem Chemokinrezeptor CCR5 ist CXCR4 der wichtigste Korezeptor für das Andocken und Eindringen von HIV in CD4+ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [31, 32]. CXCR4 spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle in Metastasierungsprozessen verschiedenster Tumoren [33, 34].

Das Binden von SDF-1 an CXCR4 führt zur Aktivierung verschiedener G-Protein-abhängiger (also durch Pertussis-Toxin inhibierbaren) sowie G-Protein-unabhängiger Signalwege, die letztendlich zur differentiellen Transkription und Migration führen [35]. Bei der G-Protein-abhängigen CXCR4-Signalgebung werden über aktivierte G_{α_i} -UE die Adenylatzyklase inhibiert und Tyrosinkinasen der Src-Familie aktiviert. Die $G_{\beta\gamma}$ -UE aktiviert u.a. die Phospholipase C β (PLC β) und die bereits erwähnte PI3K. Über $PI3K\gamma \rightarrow PIP3 \rightarrow PDK1 \rightarrow PKB/Akt \rightarrow NF-\kappa B$ -Signale wird die Migration und die Invasivität verschiedener Tumoren beeinflusst [36, 37]. PI3K beeinflusst die Migration zudem durch Veränderungen im Zytoskelett, insbesondere über Vav/Rac- und Cdc42/GEF-Signalwege [38] sowie über $PI3K \rightarrow PLC-\beta/DAG/PKC - IP3 Ca^{2+} \rightarrow PYK2 \rightarrow FAK /Crk/p130cas/Paxillin$ [39]. Der CXCR4-Ligand SDF-1 hat neben seinen chemotaktischen Aufgaben zudem entscheidenden Einfluss auf den *homing*-Prozess hämatopoetischer Stammzellen.

1.6 Proteinkinase B (PKB/Akt)

1977 entdeckte Staal mit seinen Mitarbeitern einen transformierenden Leukämie-Virus bei Mäusen, der mit einer hohen Inzidenzrate an spontanen Lymphomen einherging [40]. Ein als Akt8 bezeichneter Retrovirus wurde u.a. aus einem Thymom isoliert und die humanen Onkogene (PKB α und PKB β) in einem Adenokarzinom des Magens identifiziert und kloniert [41]. Das PKB Protoonkogen ist auf Chromosom 14q32 lokalisiert [42], proximal zum Lokus der schweren Kette der Immunglobuline [43]. Verschiedene Analysen in einer Vielzahl humaner Tumoren, u.a. im Ovarial- [44] und Pankreaskarzinom [45] deuteten schon früh auf eine entscheidende Rolle von PKB in der Onkogenese hin. PKB, auch als Akt bezeichnet, steht weiterhin im wissenschaftlichen Fokus, da neben dem Einfluss von PKB auf das Zellwachstum, die

Apoptose und Proliferation auch der Metabolismus, die Migration und die Angiogenese von PKB reguliert wird. Zudem wird der komplexe pathophysiologische Zusammenhang von PKB-Aktivität und multikausalen Krankheiten wie Typ-II Diabetes bzw. Zusammenhänge zwischen Veränderungen in den drei PKB-Genen und der Aggressivität von Tumoren stärker erkennbar [46-49].

1.6.1 Aufbau und „Isoformen“ der PKB

PKB ist eine Serin/Threonin-Kinase, die zumindest in einer ihrer „Isoformen“ in fast jedem menschlichen Gewebetyp exprimiert wird. PKB α und PKB β werden überwiegend im Gehirn, Thymus, Herz und in der Lunge gefunden [50], wohingegen PKB γ v.a. im Gehirn und im Hoden stark und im Herzen, in der Milz, in der Lunge und im Skelettmuskel schwach exprimiert wird [51]. Die Mitglieder der PKB-Familie zeigen in ihrem Aufbau die gleiche Grundstruktur.

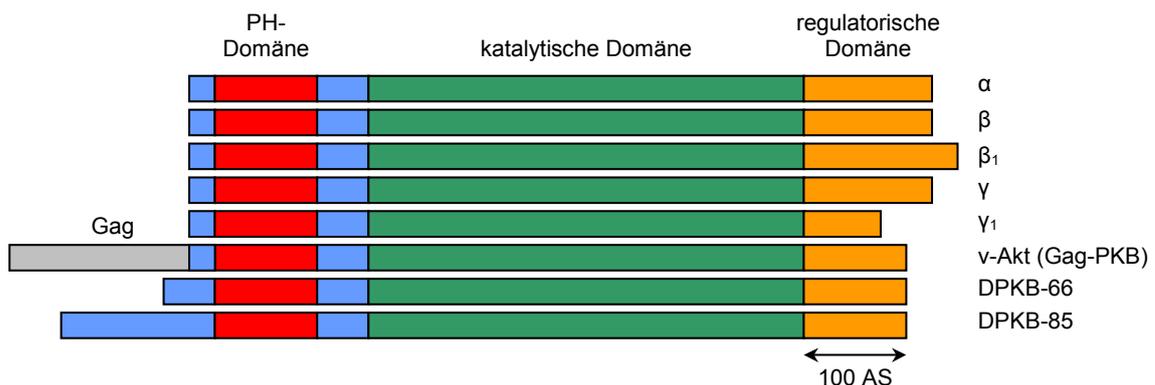


Abbildung 1.3 - Die Domänenstruktur der PKB/Akt Familie (nach: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.26 - No.11; 2001)

N-terminal enthält jede PKB eine PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne [52], gefolgt von einer zentralen katalytischen Kinase-Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne (siehe Abb. 1.3). Die PH-Domäne enthält etwa 100 Aminosäuren (AS) und dient zur Interaktion mit Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) an der Zellmembran [53]. Zusätzlich zu PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3 gibt es noch Gene für PKB β ₁, PKB γ und PKB γ ₁, die sich durch eine kürzere regulatorische Domäne auszeichnen, v-Akt (Gag-PKB), die der viralen PKB-Form entspricht und eine Fusion aus viralem Gag-Protein und der Maus-PKB α darstellt, und die beiden Formen DPKB-

66 und DPKB-85 (DPKB = *Drosophila* PKB), die bei *Drosophila melanogaster* gefunden wurden (Abb. 1.3).

1.6.2 Regulation der PKB

PKB ist ein Substrat der PI3K. Die Aktivierung der PI3K erfolgt u.a. durch den TCR, CD28, Zytokinrezeptoren und verschiedene Wachstumsfaktoren und führt zur Generierung von PIP₃ aus PIP₂. In T-Zellen konnte gezeigt werden, dass bei TCR-Aktivierung v.a. die p110 δ -Untereinheit der PI3K aktiviert wird, wohingegen die PI3K p110 γ -Untereinheit vorwiegend über Chemokinrezeptor-Signalwege angeschaltet wird [54, 55]. Die Translokation der zytosolischen inaktiven PKB an die Zellmembran wird durch Ubiquitynylierung (Ub) der Kinase-Domäne durch die E3-Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*TNF-receptor-associated-factor 6*) gefördert [56, 57]. Die über ihre PH-Domäne an die Zellmembran, bzw. PIP₃ gebundene PKB wird dort phosphoryliert und dadurch aktiviert. Über PI3K/PIP₃ aktivierte PDK-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) phosphoryliert PKB an Threonin 308 in der Kinase-Domäne. Die zweite Phosphorylierung von PKB an Serin 473 in der regulatorischen Domäne, wird über den Kinase-Komplex mTORC2, bestehend aus mTOR (*mammalian target of rapamycin* auch als *FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (FRAP1)* bekannt), rictor, Sin und mLST8 durchgeführt [58-62]. Aktivierte PKB kann sodann verschiedenste Substrate an der Zellmembran, im Zytosol und im Nukleus phosphorylieren. Die Aktivierung der PKB kann durch verschiedene Moleküle reguliert werden (siehe Abb. 1.4):

1. die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog on chromosome ten*), einem Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10, die die 3' Phosphatgruppe von PIP₃ entfernt;
2. CTMP (*Carboxyl-terminal modulator protein*) und
3. TRB3 (*Tribble homologue 3*), die beide die Phosphorylierung von Ser473 inhibieren;
4. PP2A (*Protein phosphatase 2A*), die PKB durch Dephosphorylierung inaktiviert.

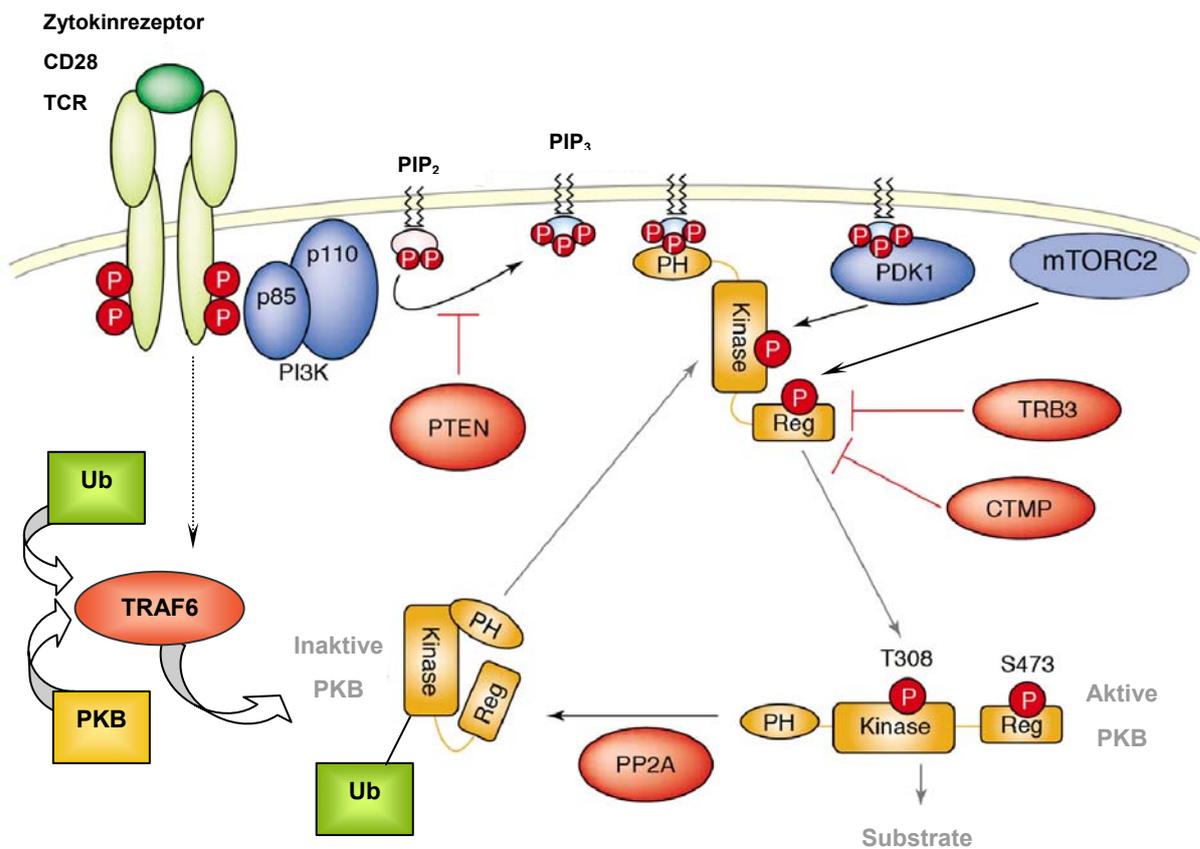


Abbildung 1.4 - Modell zur Aktivierung der Serin/Threonin Proteinkinase B (PKB) (nach: „Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts“; Derek P. Brazil, Zhong-Zhou Yang and Brian A. Hemmings; TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.29 - No.5 , 2004. Aktualisiert nach: „Blocking Akt-ivity“ von David F. Restuccia and Brian A. Hemmings; Science Vol. 325 – Seite 1083, 2009)

1.6.3 Physiologische Funktionen der PKB

Die PKB-„Isoformen“ sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt [63-66]. PKB-Substrate weisen eine / mehrere minimale Erkennungssequenzen mit der Aminosäure (AS)-Sequenz R-X-R-X-X-S/T auf, wobei X eine beliebige AS sein kann und S/T (Serin oder Threonin) die Phosphorylierungsstelle darstellt [67, 68]. Von den etwa 100 in Frage kommenden Substraten weisen allerdings 25% keine kanonische PKB-Phosphorylierungssequenz auf, und ein Großteil der Substrate ist bis jetzt nur in *in-vitro* Kinase-Assays [69] und nicht in T-Zellen untersucht worden.

Analysen zur physiologischen Funktion der PKB umfassen die Generierung von PKBtg Tieren, wie die in dieser Arbeit verwendeten myrPKBtg Mäuse, sowie die Erzeugung von PKB knock-out (k.o.) Tieren. PKB $\alpha^{-/-}$ (Akt1 $^{-/-}$) Mäuse sind kleiner als

entsprechende Wildtyp-Tiere [70], zeigen im Thymus eine gesteigerte Apoptoserate [71], weisen eine gesteigerte neonatale Mortalität und aufgrund von Entwicklungsdefekten in Trophoblasten eine defekte Entwicklung der Plazenta mit reduzierter Größe auf [70]. PKB $\beta^{-/-}$ (Akt2 $^{-/-}$) Mäuse entwickeln einen durch Insulinresistenz verschiedenster peripherer Organe bedingten Diabetes [72] und zeigen wie PKB $\alpha^{-/-}$ Mäuse eine reduzierte Körpergröße [73].

Phänotypuntersuchungen von PKB $\gamma^{-/-}$ (Akt3 $^{-/-}$) Mäusen zeigen eine bis zu 25%ige Reduktion des Hirngewichts und der Hirngröße [74]. Aufgrund der relativ milden Phänotypveränderungen der PKB-einzeldefizienten Mäuse wurden Untersuchungen an PKB doppelt-defizienten (DKO) Mäusen vorgenommen. PKB α/β DKO Mäuse haben eine deutlich reduzierte Körpergröße, Defekte in der Hautentwicklung, Muskelatrophie und Defekte in der Entwicklung des Skelettsystems [75]; PKB α/γ DKO Mäuse zeigen bereits im embryonalen Stadium letale Veränderungen [76].

Insgesamt zeigen verschiedene Analysen zur PKB-Funktion, dass PKB entscheidenden Einfluss auf die Insulinsignalleitung, den Metabolismus und das Zellwachstum, den Zellzyklus, die Apoptose, sowie die Transkription ausübt.

1.6.3.1 Glukosemetabolismus

Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) wurde als eines der ersten zellulären Substrate von PKB beschrieben. Insulin stimuliert die Glycogensynthese über Phosphorylierung der GSK3 und Dephosphorylierung der Glycogensynthase. GSK3 wird durch Phosphorylierung der beiden Untereinheiten GSK3 α (Ser21) und GSK3 β (Ser9) durch PKB inhibiert, wodurch die Glycogensynthase durch GSK nicht mehr phosphoryliert und inhibiert wird [77, 78]. Überexpression einer membrangebundenen konstitutiv-aktiven PKB führt zur Zunahme der durch Insulin stimulierten Glucoseaufnahme durch die permanente Lokalisation von GLUT4 (*glucose transporter*) in die Plasmamembran [79, 80]. Untersuchungen isolierter Ratten-Fettzellen ergaben, dass PKB β in Fettzellen entlang des Aktinzytoskeletts in GLUT4-Speichervesikel transloziert wird [81]. Die Bedeutung der PKB innerhalb der PI3-K-vermittelten Insulinsignalkaskade wurde auch aus Versuchen mit k.o. Mäusen ersichtlich: homozygote Deletion von PKB β führte zu einer Insulinresistenz in Fettzellen, während Skelettmuskelzellen lediglich eine geringe

Abnahme der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme zeigten [72]. Diese Effekte traten bei PKB $\alpha^{-/-}$ Mäusen nicht auf [70].

1.6.3.2 Apoptose

BAD (*Bcl-2-associated death promoter protein*) ist ein proapoptotisch wirkendes Mitglied der Bcl-2-Familie, das an der Initiierung der Apoptose beteiligt ist, indem Bcl₂ und Bcl_x gebunden und inhibiert werden [82, 83]. Phosphorylierung an Serin 136 durch PKB verhindert die proapoptotische Funktion von BAD, indem die Interaktion mit Bcl₂ bzw. Bcl_x gehemmt wird. Die zyttoplasmatische Procaspase 9, bzw. durch Cytochrom C aus Mitochondrien und Apaf-1 in seine aktive Form gesplattene Caspase 9, gilt als ein weiterer Initiator der Apoptose [84]. Eine Ras-abhängige Serin 196-Phosphorylierung der Procaspase 9 durch PKB verhindert die Cytochrom C-induzierte Spaltung und Aktivierung der Procaspase und somit eine Apoptoseinduktion über die Caspase 9. In Fibroblasten konnte durch Mutation von Serin 196 zu Alanin eine reduzierte Apoptoseinduktion durch die Procaspase 9 aufgezeigt werden [85].

Weitere anti-apoptotische Effekte bewirkt PKB über die Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK) und des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die zur Transkription von *pro-survival* Genen führt [86], sowie durch die Phosphorylierung der MAPKinase kinase kinase (MEKK oder MAP3K) und der konsekutiven Inhibition des SAPKinase (*stress-activated protein kinase*) Signalweges [87].

1.6.3.3 Angiogenese

PKB steht in Zusammenhang mit der physiologischen und pathologischen Angiogenese (Neovaskularisation) und der Entwicklung von Tumoren. Einerseits hat PKB direkten Einfluss auf das Endothel, andererseits auf Tumorzellen, die pro-angiogene Signale produzieren. In PKB $\alpha^{-/-}$ Mäusen wurden Veränderungen in der Expression und Organisation von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wie Kollagen und Laminin, die reduzierte Expression von TSP-1 und -2 (Thrombospondin), eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine verminderte Reifung von Gefäßen beobachtet. Das Tumorwachstum und eine verstärkte pathologische Neovaskularisation wurden in Zusammenhang mit Abweichungen der ECM-Struktur und Gefäßarchitektur gebracht [88, 89].

In Endothelzellen kann der PI3K-PKB Signalweg über VEGF (*vascular endothelial growth factor*) aktiviert werden [90] und führt u.a. über Signalwege, die die mTORC1-Kinase-Aktivierung beinhalten, zu einer gesteigerten Transkription von HIF1 α und HIF1 β (*hypoxia-inducible factor*). HIF1 α wiederum führt in Endothelzellen zur Sekretion von VEGF und anderen proangiogenen Faktoren, die durch auto- und parakrine Signale die Angiogenese stimulieren [91-93]. Schließlich konnte gezeigt werden, dass PKB α für die Migration von Endothelzellen notwendig ist, wobei relevante nachgeschaltete Proteine bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden konnten [94].

1.6.3.4 PKB im Immunsystem

Bei der T-Zellaktivierung über TCR- und CD28-Signale kommt es über die Induktion der PI3K zur Aktivierung der PKB. Durch die Expression einer konstitutiv-aktiven Form der PKB α (gag-PKB) in der T-Zelllinie konnte im Mausmodell eine verminderte Suszeptibilität für verschiedene Induktoren der Apoptose aufgezeigt werden, darunter ionisierende Strahlung und Exposition mit Fas-L [95]. In DP-Thymozyten der gag-PKBtg Mäuse wurde eine verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L und eine verstärkte Aktivität von NF- κ B nachgewiesen. Ältere gag-PKBtg Tiere entwickelten Lymphadenopathien und Splenomegalien durch Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie B-Zellen. Außerdem zeigten sich multiple lymphozytäre Organinfiltrationen und erhöhte Serumkonzentrationen von IgA und IgG2a. Dies wurde mit einer PKB-induzierten Langlebigkeit aktivierter Zellen erklärt, die aus einer reduzierten Sensitivität gegenüber Fas-induzierter Apoptose resultiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass gag-PKB die T-Zellhomöostase und indirekt auch die B-Zellhomöostase beeinflusst und *in vivo* Entzündungsprozesse fördert [96].

Für PKB α wurde auch eine wichtige Rolle bei der Reifung von Thymozyten nachgewiesen, v.a. in der frühen Entwicklungsphase von Thymozyten, durch Einflussnahme auf die nachgeschalteten Signale des prä-TCR und durch Regulation der Genexpression der Interferon-Signaltransduktionskaskade [97]. In myrPKBtg Mäusen wurden eine gesteigerte Lck-Aktivität und erhöhte MEK-Erk-Signale in Thymozyten nachgewiesen [98], die die positive und negative Selektion DP-Thymozyten beeinflussen. In peripheren myrPKBtg CD4⁺ T-Zellen führt aktive PKB zu einer

reduzierten nukleären Akkumulation von NFATc1, NFATp, sowie von NFκBp65 und RelB [99].

Neuere Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass PKB ein wichtiges Signalmolekül bei der Generierung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) ist. T_{regs} sind eine spezialisierte Untergruppe der T_H -Zellen; sie unterdrücken die Aktivierung von T-Zellen und regulieren die T-Zellhomöostase sowie Selbsttoleranz und dadurch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Aufgrund spezifischer Marker und spezieller Zytokinprofile können T_{reg} sowohl phänotypisch als auch funktionell in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden. Bezüglich PKB konnte gezeigt werden, dass über die TCR/PI3K/PKB/mTOR-Signalkaskade die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 reguliert werden kann [100] und derart Einfluss auf die Entscheidung genommen wird, ob sich aus einer naiven T-Zelle eine Effektor-T-Zelle oder eine T_{reg} entwickelt [101]. Darüber hinaus konnte in Th17 Zellen, einer Interleukin 17 produzierenden Untergruppe der T Helferzellen für PKB eine Beeinflussung der TGF-β1/IL-6 vermittelten Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Th17 Zellen gezeigt werden. Interleukin 17 spielt u.a. in Autoimmunprozessen und allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle [102]. Weiterführend zeigten diese Experimente, dass durch Signale im Rahmen einer konstitutiv aktivierten PKB der Schweregrad einer experimentell-induzierten autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) günstig beeinflusst wird [102].

Hinsichtlich der Beeinflussung der Migration von T- und B-Zellen durch PKB ist noch wenig bekannt. Mehrere Untersuchungen an verschiedenen Krebszelllinien deuten aber auf eine wichtige Rolle von PKB bei der Migration hin. In MCF-10A Mamma-Epithelzellen konnte durch die Aktivierung der PKBα eine Abnahme der Migration und eine Verminderung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) – einem in der Tumormetastasierung beteiligtem Schritt – gezeigt werden [103]. Der inhibierende Effekt von PKBα auf die *in vitro* Migration und die Invasionseigenschaften von Brustkrebszelllinien (siehe Abb. 1.7) resultierte aus einer Degradation und Reduktion des Expressionsniveaus von NFAT, bedingt durch dessen Ubiquitylierung und proteasomale Degradation [104]. siRNA Experimente zur Deletion von PKBα, nicht aber von PKBβ, führten zu einer gesteigerten Erk1- und Erk2-Aktivität, die mit der verstärkten Migration einherging. Wie Erk dabei die Migration beeinflusst, ist allerdings nicht geklärt [103].

Bei Versuchen mit acht verschiedenen humanen Brust- und Ovarialzell-Karzinomen führte die Überexpression von PKB β zur verstärkten Expression von β 1-Integrinen und zu einer vermehrten Metastasierung sowie Invasion. Letzteres ist vermutlich durch eine Verstärkung der Eigenschaft, durch Kollagen IV (einem Hauptbestandteil der ECM und der Basalmembran) dringen zu können, bedingt [105]. Gleichwohl sind diese Effekte und Einflüsse von PKB α und PKB β nicht ohne weiteres auf andere Zelltypen übertragbar. Versuche von Zhou [106] mit embryonalen Mausfibroblasten zeigten in der Migration umgekehrte Ergebnisse bezüglich der Rolle von PKB α und PKB β , wobei PKB α einen pro- und PKB β einen anti-migratorischen Einfluss hatte.

Welche Funktion PKB bei der Migration und Adhäsion von T-Zellen und Thymozyten ausübt, ist nur unzureichend verstanden. Bekannt ist, dass PI3K-Signale die Entwicklung von Thymozyten beeinflussen [107] und in reifen T-Zellen die Proliferation, Differenzierung und das Wachstum nach T-Zellaktivierung fördern [108, 109]. Über PI3K nachgeschaltete Signalmoleküle, wie mTOR und Transkriptionsfaktoren der Foxo (*Forkhead box*)-Familie, wird das Repertoire an Adhäsionsmolekülen, wie der *lymph node homing*-Rezeptor CD62L, und Chemokinrezeptoren (z.B. CCR7) an der T-Zelloberfläche reguliert [110-112] und damit direkt Einfluss auf die Adhäsion und T-Zellmigration genommen. PKB, als eines der wichtigsten Effektormoleküle von PI3K, steht damit im Mittelpunkt dieser Regulationsmechanismen. Neuere Arbeiten zeigten, dass durch Veränderungen in der PH-Domäne der PDK1 die Aktivierung der PKB reduziert wird, und durch die reduzierte PKB-Aktivierung zwar nicht die T-Zellentwicklung, sehr wohl aber die Migration beeinflusst wird [113]. Abhängig u.a. von der Ligandenbindung an den TCR (*high* oder *low-affinity*) erfolgt durch PI3K und PDK1 eine unterschiedlich starke Aktivierung von PKB. Die sich aus der modifizierbaren PKB-Aktivierung ergebende Variabilität verschiedener Chemokinrezeptor- und Adhäsionsmolekülmuster an der Zelloberfläche ist ein Beitrag zur außergewöhnlichen Flexibilität der Immunantwort.

PKB ist somit ein zentrales Protein, involviert in diversen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden, in physiologischen Regulationsprozessen und in der Malignität und Metastasierung verschiedenster Tumoren.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Die Rolle der PKB bei den Migrations- und Adhäsionsprozessen von Lymphozyten ist unzureichend verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss erhöhte PKB-Signale auf die Migration und Adhäsion von Thymozyten und peripheren T- und B-Zellen ausüben. Als Modellsystem wurden Mäuse eingesetzt, die eine tg konstitutiv-aktive Form von PKB α (myrPKB) in Thymozyten, T- und B-Zellen exprimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

- C57BL/6 (Wildtyp)
- CD28 k.o. auf C57BL/6 Hintergrund
- OT1-TCRtg auf C57BL/6 Hintergrund
- myrPKBtg (heterozygot) auf C57BL/6 Hintergrund

Bei den PKBtg Mäusen handelt es sich um Tiere, die eine konstitutiv-aktive Form von PKB α (myrPKB) in T- und B-Lymphozyten exprimieren [98].

Alle verwendeten Tiere wurden vor den entsprechenden Versuchen durch die im Methodenteil beschriebene PCR genotypisiert.

Die verwendeten Tiere waren – soweit nicht anders gekennzeichnet – im Alter von acht bis zehn Wochen und wurden im zentralen Tierlabor, bzw. im Haus 30 der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg gezüchtet.

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Endlösung: Die Salze werden in 800 ml ddH₂O gelöst. Der pH-Wert wird mit HCl oder NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Das Volumen wird auf 1000 ml aufgefüllt, anschließend wird die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

<u>BSS (Balanced Salt Solution)</u>		
BSS I (10-fach):	Glukose	10,0 g
	KH ₂ PO ₄	0,6 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	2,3 g
	Phenolrot	0,1 g
		add 1000 ml ddH ₂ O
BSS II (10-fach):	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,86 g
	KCl	4,0 g
	NaCl	80,0 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,0 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0 g
		add 1000 ml ddH ₂ O
Endlösung:		
	1 x Volumen BSS I (10-fach)	
	+ 1 x Volumen BSS II (10-fach)	
	+ 8 x Volumina ddH ₂ O	
<u>BSS/BSA</u>		
BSS Lösung (s.o.) mit 10, 1 oder 0,1% BSA („Bovine“ Serum Albumin)		
<u>HBSS (Hank's balanced salt solution)</u>		
(w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ; w/o Phenolrot) Biochrom AG		
<u>PBS Dulbecco</u>		
(w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺) Biochrom AG		
<u>RPMI 1640 Medium</u>		
(w/o oder mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺) Biochrom AG		
<u>FACS Puffer</u>		
PBS 1x (w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺) mit 0,1% BSA und 0,01% Natriumazid		

Gey's Solution (für die Erythrozytenlyse)

<u>Stock A:</u>	NH ₄ Cl	35,0 g
	KCl	1,85 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1,5 g
	KH ₂ PO ₄	0,12 g
	Glukose	5,0 g
		add 1000 ml ddH ₂ O
<u>Stock B:</u>	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,42 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,14 g
	CaCl ₂	0,34 g
<u>Stock C:</u>	NaHCO ₃	2,25 g

Endlösung:

	70 Teile ddH ₂ O
+	20 Teile Lösung A
+	5 Teile Lösung B
+	5 Teile Lösung C

TAE Puffer (50x) für Gele

Tris-Base	242 g
EDTA	37,2 g
Essigsäure	57,1 ml
	mit HCl auf pH 8,0 einstellen
	mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen

1 x TAE Puffer:	980 ml ddH ₂ O
	+ 20 ml TAE Lösung (50 x)

DNA Ladepuffer

0,5% Xylene Cyanol
0,5% Bromphenolblau
50% Glycerol

<u>Mausschwanz-Lyse-Puffer</u>		
Für 100 ml:	50 mM Tris (pH 8,0)	5 ml 1M Lösung
	100 mM EDTA (pH 8,0)	20 ml 0,5 M Lösung
	100 mM NaCl	10 ml 1M Lösung
	1% w/v SDS	10 ml 10% Lösung
		+ 55 ml ddH ₂ O
<u>MACS Puffer</u>		
	PBS 1x (w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	100 ml
	EDTA	60 mg
	30%ige BSA-Lösung in PBS	1,6 ml
Vor der Nutzung muss die Lösung entgast werden.		

2.1.3 Datenauswertung und Computerprogramme

CellQuest Software	[FACS-Auswertung]	BD Biosciences
EndNote 6.0.2	[Referenzen, Zitate]	Thomson ISI Research Soft
SPSS 11.5.1	[Statistik-Programm]	SPSS Inc.
Prism 3.02	[Grafen, Statistiken]	GraphPad Software Incorporated

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung von Mäusen

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen

Der zu genotypisierenden Maus wurde ein 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten, um daraus die DNA für den PCR-Ansatz zu gewinnen. Dazu wurde dem Schwanzstück in einem Eppendorfgefäß 500 µl Schwanz-Lyse-Puffer und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) beigefügt und das Reaktionsgefäß über Nacht bei 50°C in einem Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Die sedimentierten Schwanzreste wurden durch kurzes Vortexen vermischt und die Proben anschließend für 5 Minuten gekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert und der abgenommene Überstand zu 500 µl Isopropanol zugesetzt. Durch leichtes Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde die DNA zum Ausfällen gebracht und anschließend an einer abgerundeten Glaspasteurpipette aufgewickelt. Die Pipettenspitze mit anhaftender DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Spitze der Pasteurpipette mit DNA wurde sodann abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl ddH₂O gegeben. Um die DNA wieder in Lösung zu bringen, wurden die Reaktionsgefäße für 15 Minuten im Heizblock bei 60°C unter Schütteln inkubiert. Die gelöste DNA konnte anschließend weiter verarbeitet werden (z.B. in einem PCR-Ansatz), bei 4°C im Kühlschrank kurzzeitig gelagert oder bei -20°C weggefroren werden.

2.2.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction / Polymerasekettenreaktion)

Um selektiv DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen zu vervielfältigen (Amplifikation), wird die Polymerase-Ketten-Reaktion verwandt. Voraussetzung für das Synthetisieren neuer DNA-Moleküle durch DNA-Polymerasen ist die vorangehende Trennung der komplementären DNA-Stränge, deren Sequenz vervielfältigt werden soll – dieser Schritt wird als Denaturierung bezeichnet. Erzielen kann man die Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95°C. Die DNA-Polymerasen (z.B. Taq-Polymerase) werden aus thermophilen Bakterien gewonnen, behalten also auch bei Temperaturen bis 100°C ihre Aktivität. Weitere Bestandteile der Reaktion, neben der Taq-Polymerase und der Template-DNA, sind ein spezifisches *Primer*-Paar,

die vier Desoxyribonukleosid-triphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und ein Puffer mit Mg^{2+} -Ionen (Kofaktor für die DNA-Polymerase). *Primer* sind Oligonukleotide aus 15-30 Nukleotiden, die mit ihrer komplementären Sequenz spezifisch an die *template*-DNA binden und die zu vervielfältigende Zielsequenz flankieren (einer in Vorwärts- der andere in Rückwärtsrichtung) und somit den Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden DNA-Sequenz definieren. Nach der Auftrennung der DNA-Doppelstränge hybridisieren die *primer* bei *primer*-spezifischen Temperaturen an die komplementäre DNA-Sequenz der Einzelstränge (*annealing*), und bieten somit der Polymerase ihren Startpunkt. Anschließend synthetisiert die Polymerase bei 72°C die komplementäre DNA-Sequenz (Elongation). Da die PCR aus vielen sich wiederholenden Syntheseschritten (bis zu 40 Zyklen) besteht, muss nach jeder Elongationsphase die DNA wieder denaturiert werden. Da neu synthetisierte DNA-Sequenzen der Taq-Polymerase dabei ebenfalls als *template* dienen, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA. Nach 25 Zyklen ist die Zielsequenz auf etwa das 10^6 -fache amplifiziert worden.

1. PCR-Ansatz zum Nachweis transgener PKB

Die PCR-Ansätze wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis pipettiert, wobei die DNA-Polymerase zum Schluss zugegeben wurde. Nach dem Mischen der Ansätze folgte die Inkubation im Thermocycler entsprechend dem PKB-Programm.

<i>PCR-Primer</i> für die Typisierung der PKB tg Mäuse:
<ul style="list-style-type: none"> • VA-fwd 5807: 5' AGA-TTT-CCT-GTC-CCC-TCT-CAG-G-3' (22mer) • VA-rev 6168: 5' TGT-TGG-ACC-CAG-CTT-TGC-AG-3' (20mer)

PCR-Ansatz: PKB

Substanz	Konzentration	Volumen für den Einzelansatz
Template-DNA (isolierte Mausschwanz-DNA)		1,0 µl

<i>Primer 1</i> (fwd)	10 μ M	1,0 μ l
<i>Primer 2</i> (rev)	10 μ M	1,0 μ l
dNTPs (Mix)	10 mM	0,4 μ l
MgCl ₂	25 mM	2,0 μ l
Taq-Puffer (10x)		2,0 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)		0,1 μ l
dd H ₂ O		12,5 μ l
Volumen je Ansatz		20,0 μ l

PCR-Programm: PKB

Schritt	Temperatur	Dauer
I. Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten
II. Amplifikation (31 Zyklen)		
- Denaturierung	94°C	1 Minute
- <i>Annealing</i>	55°C	1 Minute
- Elongation	72°C	1 Minute
III. Finale Elongation	72°C	1 Minute
IV. Lagerung	4°C	
erwartete Fragmentgröße:	360 bp	

2. PCR-Ansatz zum Nachweis des CD28 Gens

Die PCR-Ansätze wurden wie zuvor beschrieben pipettiert.

<i>PCR-Primer</i> für die Typisierung der CD28 k.o. Mäuse:
<ul style="list-style-type: none"> • CD28-1 (5288): 5' GGT-AAA-GCA-GTC-GCC-CCT-GCT-3' (21mer) • CD28-2 (5287): 5' CCT-GAG-TCC-TGA-TCT-GTC-AGA-CT-3' (23mer) • CD28-3 (Exon2): 5' ATT-CGC-CAA-TGA-CAA-GAC-GCT-GG-3' (23mer)

PCR-Ansatz: CD28 k.o.

Substanz	Konzentration	Volumen für den Einzelansatz
Template-DNA (isolierte Mausschwanz-DNA)		1,0 µl
<i>Primer</i> CD28 ^{-/-} (Primer 1)	10 µM	1,0 µl
<i>Primer</i> CD28 ^{-/-} (Primer 2)	10 µM	1,0 µl
<i>Primer</i> CD28 Exon2 (Primer 3)	10 µM	1,0 µl
dNTPs (Mix)	12,5 mM	0,4 µl
MgCl ₂	25 mM	2,0 µl
Taq-Puffer (10x)		2,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)		0,1 µl
dd H ₂ O		11,5 µl
Volumen je Ansatz		20,0 µl

PCR-Programm: CD28 k.o.

Schritt	Temperatur	Dauer
I. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
II. Amplifikation (40 Zyklen)		
- Denaturierung	95°C	1 Minute
- <i>Annealing</i>	58°C	1 Minute
- Elongation	72°C	1 Minute
III. Finale Elongation	72°C	7 Minuten
IV. Lagerung	4°C	
erwartete Fragmentgröße:	wt 700 bp k.o. 800 bp	

Zu beachten ist, dass die *annealing*-Temperatur *primer*-abhängig ist. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Für jedes *primer*-Paar wurde mit der PCR-Maschine ein Temperaturgradient gefahren, um die optimale *primer*-spezifische Hybridisierungstemperatur zu ermitteln.

2.2.1.3 Gelelektrophorese

Um DNA, Proteine oder RNA aus einem Gemisch nach ihrer Größe aufzutrennen, wird die Gelelektrophorese eingesetzt:

- Polyacrylamid-Gele für die Auftrennung von Proteinen
- Agarose-Gele für die Auftrennung von DNA oder RNA.

Das Gelpolymer stellt für wandernde Moleküle einen zu überwindenden Widerstand dar. Je größer, desto schwieriger ist es für das Molekül durch die Maschen des Gels zu wandern, es wandert langsamer. Umgekehrt ist die Situation für kleinere Moleküle; sie wandern schneller durch das Gel und befinden sich in der Laufrichtung weiter vorn/unten als die größeren Moleküle.

Die Trennschärfe eines Gels hängt von seiner Porosität ab, die ihrerseits von der Agarose- oder Polyacrylamid-Konzentration abhängig ist. Die Prozentigkeit des Gels wiederum wird nach dem Molekulargewicht der DNA gewählt.

Impuls für die Moleküle zu wandern, ist die an das Gel angelegte Spannung, die bewirkt, dass negativ-geladene Moleküle von der Kathode zur Anode wandern.

Bei DNA-Fragmenten ergibt sich die negative Ladung aus den Phosphatgruppen des Phosphodiester-Rückgrates. Diese Phosphogruppen sind bei neutralem pH polyanionisch und bewegen sich daher im elektrischen Feld von der Kathode (- Pol / schwarz) in Richtung der Anode (+ Pol / rot).

Nach Auftrennung im Agarose-Gel müssen die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel mit Ethidiumbromid behandelt. Hierbei handelt es sich um ein in die DNA interkalierendes Agens, das unter UV-Licht die DNA sichtbar macht. Durch den Vergleich der einzelnen DNA-Banden mit einem Nukleinsäure-Standard (DNA-Leiter) kann auf die Größe der Fragmente rückgeschlossen werden. Es gilt hierbei, dass die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentgröße ist.

Agarosekonzentration und optimale Trennbereiche

% Agarose	optimaler Trennbereich
0,3	5 – 60 kb
0,6	1 – 20 kb
0,7	0,8 – 10 kb
0,9	0,5, - 7 kb
1,2	0,4 – 6 kb
1,5	0,2 – 3 kb
2,0	0,1 – 2 kb

Tabelle 2.1 – Nach Sambrook et al. 1989

Aus: „Gentechnische Methoden (3. Auflage)“ Hrsg. Gangolf Schrimpf, Spektrum Akademischer Verlag / Gustav Fischer; Seite 67 / Tabelle 2 – 6.

2.2.1.4 Auftrennung von PCR-Produkten zum Nachweis tg PKB

Zum Nachweis der PKB-PCR-Produkte (Fragmentgröße von 360 bp) wurde ein 1,5% Agarose-Gel angesetzt. Dazu wurden 1,5 g NEEO-Ultra Agarose Pulver in 100 ml 1x TAE Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Lösung wurde in der Mikrowelle für 2 ½ Minuten bei 650 Watt erhitzt, und die flüssige Agarose in einen Elektrophoreserahmen gegossen und ein Kamm mit „Zähnen“ entsprechend der Anzahl der Ansätze eingespannt. Anschließend kühlte das Gel bis zur vollständigen Aushärtung ab.

Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt – dazu wurden einer 20 µl Probe 4 µl Ladepuffer beigemischt. Die Geltaschen wurden anschließend mit jeweils 10 µl des PCR-Mixes beladen (inklusive positiver und negativer Kontrolle), wobei die erste Geltasche mit einer DNA-Leiter zum Größenvergleich geladen wurde. Nach dem Beladen der Geltaschen wurde das Gel in der Elektrophoresekammer für ca. 30 – 45 Minuten unter Spannung (80 Volt) gesetzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 10 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad (Endkonzentration: 50 µg / ml) getaucht und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

2.2.1.5 Beispiel einer Gelelektrophorese zum Nachweis von tg PKB

Spur

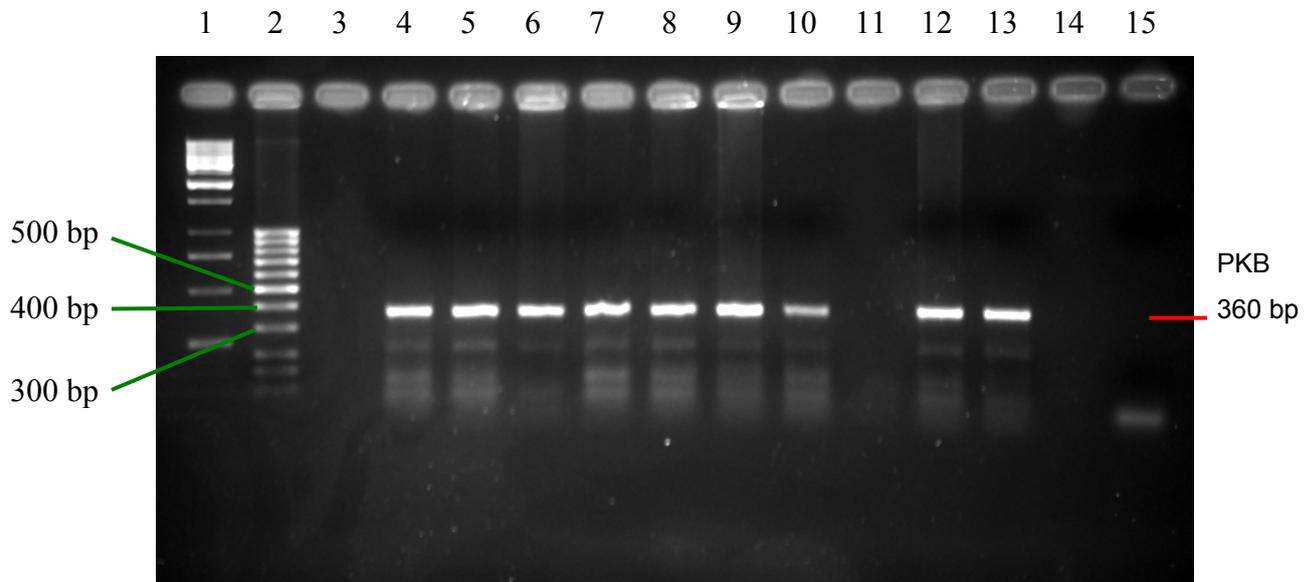


Abbildung 2.1 – Gelelektrophorese eines PKB-PCR-Ansatzes

Spur	Beladung
1	1 kb DNA-Leiter (unterste Bande 250 bp, vorletzte Bande 500 bp)
2	100 bp DNA-Leiter
3	leere Laufspur
4 - 10	DNA der zu typisierenden Mäuse
11	leere Laufspur
12	DNA einer PKB tg Maus (positive Kontrolle 1)
13	DNA einer PKB tg Maus (positive Kontrolle 2)
14	leere Laufspur
15	DNA einer Wildtyp-Maus (negative Kontrolle)

2.2.2 Präparation lymphatischer Organe

2.2.2.1 Herstellung einer Zellsuspension

Entsprechend der unterschiedlichen Versuchsanordnungen wurden den Mäusen Thymus, Lymphknoten oder Milz entnommen. Die Maus wurde dafür mit CO₂ getötet, auf einer Präparierplatte festgesteckt und die Bauchdecke aufpräpariert.

Die präparierten Lymphknoten (2 x inguinal bds., 2 x axillär superficial bds., 2 x axillär profund bds., 2 x mandibulär bds., 4-5 x mesenterial), Milz und Thymus wurden in einer 12-Napfplatte auf Eis in BSS/0,1%BSA separat gesammelt. Es wurde steril unter der Sterilbank gearbeitet.

Die jeweiligen Organe wurden durch ein Nylonzellsieb (Porengröße 70 µm) gerieben. Das Sieb wurde anschließend mit einer Pasteurpipette und BSS/0,1%BSA nachgespült. Die Zellsuspension wurde mittels einer Pasteurpipette aus den Petrischalen in ein entsprechend vorbeschriftetes 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und zentrifugiert (4°C / 1300 rpm / 5 min). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml BSS/0,1%BSA suspendiert, zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet sodann in 5 ml BSS/0,1%BSA aufgenommen.

Die Milz wurde für die Erythrozytenlyse in 2 ml Gey's Lösung resuspendiert und für 8 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml BSS/0,1%BSA wurde bei 4°C/1300 rpm/5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Milzzellen in 10 ml BSS/0,1% BSA aufgenommen.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Zellzählung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit PBS / 0,04% Trypanblau / 0,01% Na-Azid verdünnt (z.B. 1:50) und die Anzahl lebender Zellen (Trypanblau-negativ) in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Es gilt folgende Berechnungsformel für die Zellzahl:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Zellen wurden entsprechend der errechneten Konzentration auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Für FACS-Färbungen wurden 8-10 x10⁵ Zellen eingesetzt.

2.2.3 Isolation von Lymphozytenpopulationen

2.2.3.1 Isolation von CD4⁺ T-Zellen (negative Selektion)

Das Prinzip der negativen Selektion lässt sich folgendermaßen beschreiben: in ein Gemisch mit unterschiedlichen Zellpopulationen werden Primärantikörper gegeben, die sich spezifisch gegen Antigene an den Zelloberflächen der jeweiligen Populationen richten, die depletiert werden sollen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis werden ungebundene Antikörper gewaschen und Sekundärantikörper zugegeben, die in ihrer Antigenpezifität gegen den Primärantikörper gerichtet sind und am Fc-Teil mit magnetischen Mikropartikeln (*beads*) gekoppelt sind. Wird nun die Zellsuspension mit den markierten und den unmarkierten Zellen an einen Magneten (MACS-Gerät) gebracht, so werden die Antikörper/*bead*-gekoppelten Zellen aus dem Zellgemisch an den Magneten gezogen, wohingegen die unmarkierten – zu selektierenden – Zellen weiterhin in Lösung bleiben. Die Organe wurden wie beschrieben präpariert, durch ein steriles Zellsieb gerieben und die Zellen in PBS/0,1% BSA gewaschen. Anschließend wurden die gezählten und eingestellten Zellen zentrifugiert (1200 rpm / 4°C / 7 min) der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in jeweils 100 µl PBS / 1 x 10⁷ Zellen resuspendiert. Dieser Suspension wurde von den folgenden Antikörpern je 0,1 µl / 1 x 10⁷ Zellen zugegeben:

- NK1.1-Antikörper (Ratte-anti Maus)
- CD8 α -Antikörper (Ratte-anti Maus)
- MHCII-Antikörper (Ratte-anti Maus)
- CD11b-Antikörper (Ratte-anti Maus)
- Ter-119-Antikörper (Ratte-anti Maus)
- CD45R/B220-Antikörper (Ratte-anti Maus)
- IgG-Antikörper (Ziege-anti Maus)
- IgG-Antikörper (Maus-anti Ratte).

Die Zellen inkubierten 20 Minuten bei 4°C im Kühlschrank, wurden dann einmal mit 2 ml PBS / 1 x 10⁷ Zellen gewaschen (Zentrifugation bei 1200 rpm / 4°C / 7 min), der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 90 µl PBS / 1 x 10⁷ Zellen suspendiert. Zusätzlich wurden 10 µl Streptavidin-gekoppelte Magnet-*beads* / 1 x 10⁸ Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden nun für 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und

zwischendurch mehrmals kurz gemischt. Anschließend wurde das Röhrchen mit 8 ml PBS aufgefüllt, bei 1200 rpm / 4°C/ 7 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS / bis zu 1×10^8 Zellen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen am MACS-Gerät isoliert und die Zellzahl der nicht gebundenen, negativ selektionierten, CD4+ T-Zellen wurde in der Neubauerkammer bestimmt. Zur Kontrolle der Reinheit wurden Zellen für eine FACS-Färbung entnommen und der Anteil von CD4+ T-Zellen bestimmt. Die Reinheit der isolierten Zellen lag in der Regel bei über 95%. Nachfolgend ist die Reinheitskontrolle isolierter CD4+ T-Zellen aus einer PKBtg und einer Wildtyp-Maus (wt) nach Färbung mit CD3- und CD4-Ak und anschließender FACS-Analyse dargestellt. Der Anteil CD3+/CD4+ T-Zellen lag bei über 96%.

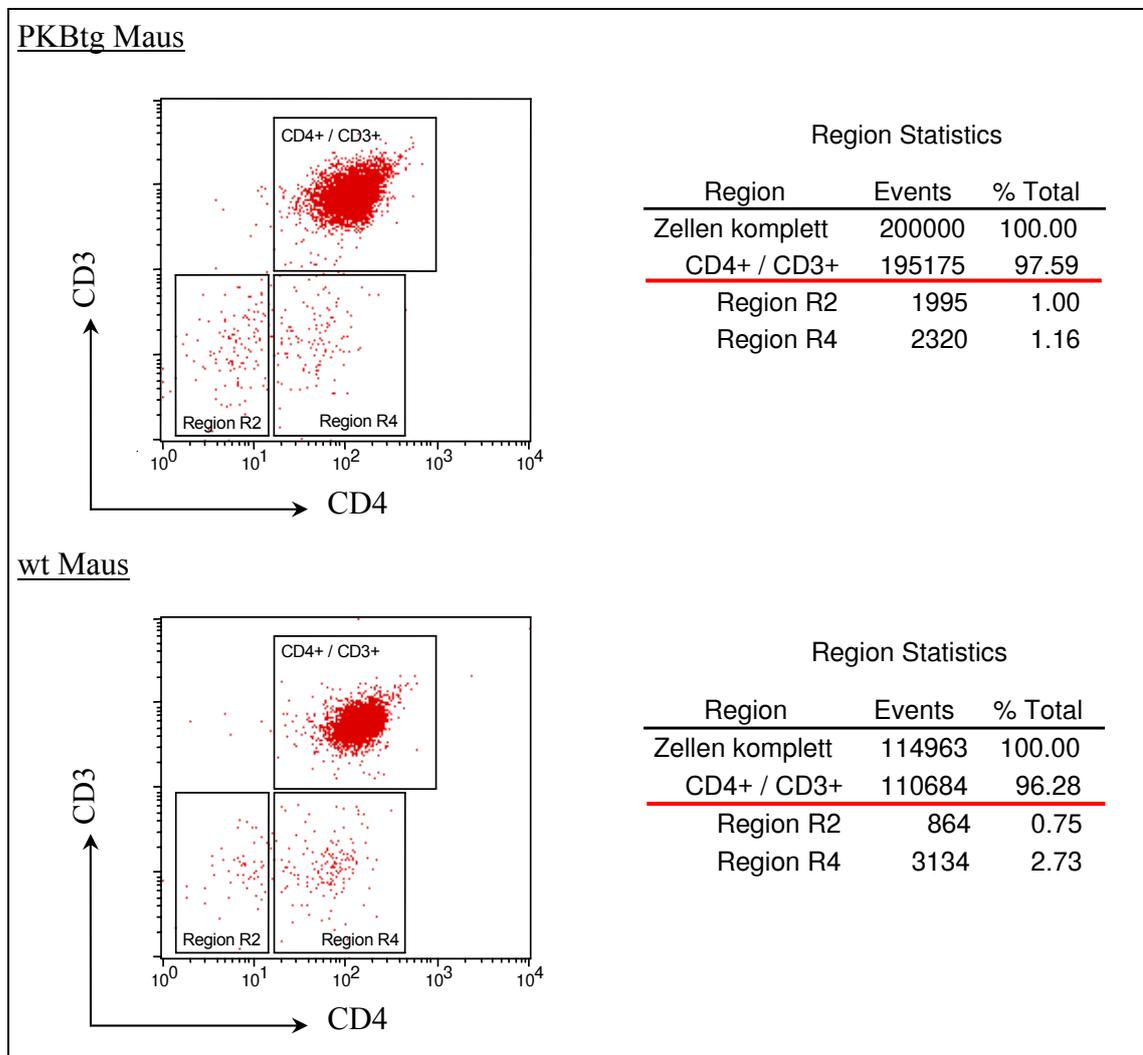


Abbildung 2.2 – Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit isolierter CD4+ T-Zellen

Zur negativen Isolation von CD4⁺ T-Zellen wurde auch ein T-Zell-Isolation-Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Milz- oder Lymphknotenzellen wurden hierzu in einem 15 ml Greiner-Röhrchen aufgenommen, die Zellen gezählt und anschließend zentrifugiert (1500 rpm / 8 min / 4°C). Nach der Zentrifugation wurde das Pellet für die Primärantikörper in 40 µl MACS-Puffer (siehe auch 2.1.3) / 1x10⁷ Zellen resuspendiert und mit 5 µl Biotin-Antikörper-Cocktail aus dem T-Zell-Kit / 1x10⁷ Zellen versetzt.

MACS - Puffer (bei 4° C gelagert)

- PBS (1x)
- 0,5 % BSA
- steril und unbedingt Ca²⁺- und Mg²⁺-frei

Die Suspension inkubierte 10 min bei 4°C im Kühlschrank. Danach wurden 30 µl MACS-Puffer und 10 µl anti-Biotin-microbeads / 1x10⁷ Zellen dazugeben. Die Suspension wurde erneut für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Das Röhrchen wurde bis zur 15 ml Marke mit MACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (1500 rpm / 8 min / 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml MACS-Puffer bis zu 1x10⁸ Zellen aufgenommen. Anschließend schloss sich die Trennung am MACS-Gerät an. Nach der Trennung wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm / 4°C / 8 min zentrifugiert und das Zellpellet je nach weiterer Versuchsplanung in PBS oder HBSS aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und zur Kontrolle der Reinheit wurde ein Aliquot der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3.2 Isolation von B-Zellen (negative Selektion)

Die negative Selektion von B-Zellen erfolgte mit einem B-Zell-Isolation-Kit der Firma Miltenyi Biotec. Die Milz wurde präpariert, durch ein Zellsieb gerieben, die gewonnenen Milzzellen wurden mit 10 ml PBS in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben, zentrifugiert (1300 rpm / 5 min / 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Dabei wurde stets steril und auf Eis gearbeitet. Anschließend wurde das Zellpellet in 8 ml PBS resuspendiert und die Zellen gezählt. Nach erneuter Zentrifugation (1300 rpm / 8 min / 4° C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in 45 µl MACS-Puffer / 1x10⁷ Zellen resuspendiert. Die Isolation der B-Zellen erfolgte analog zur oben geschilderten T-Zellisolation.

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Abkürzung FACS steht für *fluorescence activated cell sorter*. Im Durchflusszytometer werden fluoreszenzmarkierte Zellen von einem Laserstrahl erfasst. Dabei kommt es zu einer Anregung der an die Ak gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Lichtenergie bestimmter Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird über ein optisches System gebündelt, zerlegt, detektiert und analysiert. Für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ergibt sich jeweils ein spezifisches Signal, über das eine Aussage über die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper und somit vorhandenen Antigene gemacht werden kann. Daneben lässt sich auch eine Aussage über die Größe der Zellen und deren Granularität machen. Bei Färbungen mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen können demzufolge fünf unterschiedliche Parameter detektiert werden – neben den drei Fluoreszenzmarkern das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter FSC*), ein Maß für die Zellgröße, und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter SSC*), ein Maß für die Granularität der Zellen.

Die Zellen werden in einem laminaren Strom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und innerhalb kürzester Zeit lassen sich große Mengen an Zellen analysieren. Demzufolge hat die Durchflusszytometrie einen großen Anwendungsbereich, der neben absoluten Zellzahlbestimmungen, funktionellen Untersuchungen, Lymphozytentypisierungen auch intrazelluläre Anfärbungen, z.B. für DNA- und Zellzyklusanalysen und Zytokine ermöglicht.

FACS-Färbung

$0,8 \cdot 10^6$ Zellen wurden zu 2 ml FACS-Puffer zugesetzt. Die Suspension wurde bei 4°C / 1300 rpm / 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Bei der Färbung von Milzzellen wurden Fc-bindende Antikörper zugesetzt, um ein unspezifisches Binden der fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Fc-Rezeptoren von B-Zellen zu unterbinden. Hierzu wurden die Zellen mit 10 µl einer 1:100 Verdünnung des „Fc-Blocks“ für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 3 ml FACS-Puffer versetzt, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

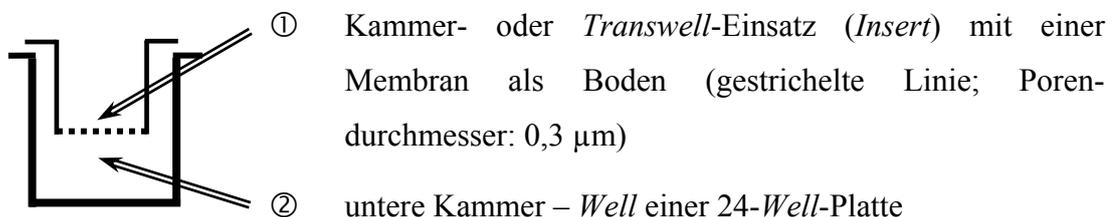
Bei einem Färbeschritt mit einem biotinkoppelten Ak wurde dieser Färbeschritt zuerst angesetzt. 100 µl PBS mit verdünntem Biotin-Ak wurden auf die Zellen gegeben und 30

min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Biotin-Ak durch Zugabe von 3 ml FACS-Puffer und Zentrifugation entfernt.

Im zweiten Färbeschritt wurden in 100 µl FACS-Puffer alle weiteren Antikörper (PE-Ak, FITC-Ak) in den entsprechenden Konzentrationen sowie Streptavidin-PE-Cy5 (bindet an Biotin) zugegeben und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper und ungebundenes Streptavidin wurden wiederum in einem Waschschrift mit 3 ml FACS-Puffer entfernt. Am Ende der Färbung wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und es folgte die Messung am FACS-Gerät.

2.2.5 Migrationstest

Beim Migrationstests wird analysiert, ob und wie gut Zellen gegen einen Chemokingradienten migrieren. Dazu wurde in einen Napf (*Well*) einer 24-*Well*-Platte Medium mit oder ohne Chemokin (SDF-1 α) vorgelegt. In die obere Kammer, einem in den *Well* gehängten Einsatz, wurde die Zellsuspension gegeben und der Kammer- oder *Transwell*-Einsatz wurde in den entsprechenden *Well* gehängt, sodass die Zellen durch die Membran des Einsatzes in die untere Kammer wandern konnten.



Für die durchgeführten Migrationstests wurden Lymphozyten aus der Milz, den Lymphknoten sowie Thymozyten eingesetzt.

Beschichtung der *Transwell*-Einsätze mit Fibronectin

Zur Beschichtung der *Transwell*-Einsätze (*Inserts*) wurde eine Fibronectin (FN)-Lösung mit 6,5 µg FN / ml PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺) angesetzt und die *Inserts* mit je 100µl der FN-Lösung durch vorsichtiges Auftropfen beschichtet. Nach 90 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das FN vorsichtig mit einem feinen Pipettenspitzenaufsatz abgesaugt und alle beschichteten *Inserts* zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen, d.h. PBS aufgetropft und wieder abgesaugt. Anschließend trockneten die *Inserts* 1 min bei

RT und standen für die Zellbeladung bereit. Die 12 beschichteten Inserts einer Migrationsplatte wurden nach folgendem Schema in die Reihen A und B einer 24-Well-Platte gehängt:

	1	2	3	4	5	6
A	1 Insert 1 WT # 1	2 Insert 3 WT # 2	3 Insert 5 WT # 3	4 Insert 7 PKB # 1	5 Insert 9 PKB # 2	6 Insert 11 PKB # 3
B	7 Insert 2 WT # 1	8 Insert 4 WT # 2	9 Insert 6 WT # 3	10 Insert 8 PKB # 1	11 Insert 10 PKB # 2	12 Insert 12 PKB # 3
C	500 µl Medium - SDF	500 µl Medium - SDF				
D	500 µl Medium + SDF	500 µl Medium + SDF				

- Reihe A und Reihe B: jeweils sechs FN-beschichtete *Inserts*
- Reihe C: keine *Inserts* (nur mit Medium befüllte *Wells*) – negative Kontrolle ohne Chemokin
- Reihe D: keine *Inserts* (mit Medium und SDF-1 α befüllte *Wells*) – positive Kontrolle
- weißer Bereich (Spalte 1, 2, 3): für Zellen aus drei Wildtyp-Mäusen
- grauer Bereich (Spalte 4, 5, 6): für Zellen aus drei PKBtg oder CD28 k.o. Mäusen

Während der Inkubationszeit zur Beschichtung der *Inserts* wurde Versuchsmedium aus folgenden Komponenten angesetzt:

- RPMI 1640 mit
- 10 mM Hepes (pH 7,4) und
- 0,1 % BSA (aus 10% Stock in PBS)

Die präparierten Organe wurden separat in 7 ml PBS (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) aufgenommen, durch ein steriles Zellsieb gerieben, die Zellen zentrifugiert (1300 rpm / 5 min / 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet jeweils in 10 ml PBS resuspendiert, zentrifugiert (1300 rpm / 5 min / 4°C) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Danach wurde das Zellpellet in RPMI-Medium resuspendiert (Milz und Thymus in 8 ml, Lymphknoten in 4 ml), die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf 12×10^6 Zellen/ml eingestellt. 12×10^6 Zellen/ml RPMI wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt, dieses zentrifugiert (6000 rpm / 2 min / 4°C) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Versuchs-RPMI-Medium suspendiert, die Zellen abermals zentrifugiert (6000 rpm / 2 min / 4 °C) und der Überstand verworfen. Schließlich wurde das Zellpellet aus 12×10^6 Zellen in 600 μl Versuchsmedium suspendiert.

Anschließend wurde die 24-Well-Platte nach dem obigen Schema beladen. Dazu wurden 500 μl Versuchsmedium in die entsprechenden *Wells* (untere Kammer – Reihe C und D) vorgelegt und mit 100 ng/ml SDF-1 α versehen (nur Reihe D). Die beschichteten *Inserts* (obere Kammer) wurden mit je 200 μl Zellsuspension beladen (4×10^6 Zellen je Kammer). Die beladenen *Inserts* wurden in die Reihen C und D umgehängt, wobei darauf geachtet wurde, dass unter den eingehängten *Inserts* keine Luftblasen verblieben. Die 24-Well-Platten wurden für 2,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Beendigung der Migration wurden 50 μl einer 0,1 M EDTA-Lösung in jede untere Kammer zugesetzt. Die Platte wurde für 15 Minuten auf einen Schüttler bei RT gestellt, und die *Inserts* danach vorsichtig aus den Kammern entfernt und verworfen. Die Suspensionen mit den migrierten Zellen wurden aus den jeweiligen *Wells* in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit CD4-, CD8- und B220-Ak gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

Der Migrationsindex (MI) entspricht dem Quotienten aus der Anzahl der Zellen, die unter dem Einfluss von SDF-1 α durch die Membran migriert sind, dividiert durch die Anzahl der Zellen, die ohne Chemokineinfluss migriert sind. Nachfolgend ist ein Beispiel eines Migrationsversuchs von Milz-Zellen aufgeführt. Bei der FACS-Analyse wurde die Anzahl migrierter Zellen über einen Zeitraum von 20 Sekunden gemessen.

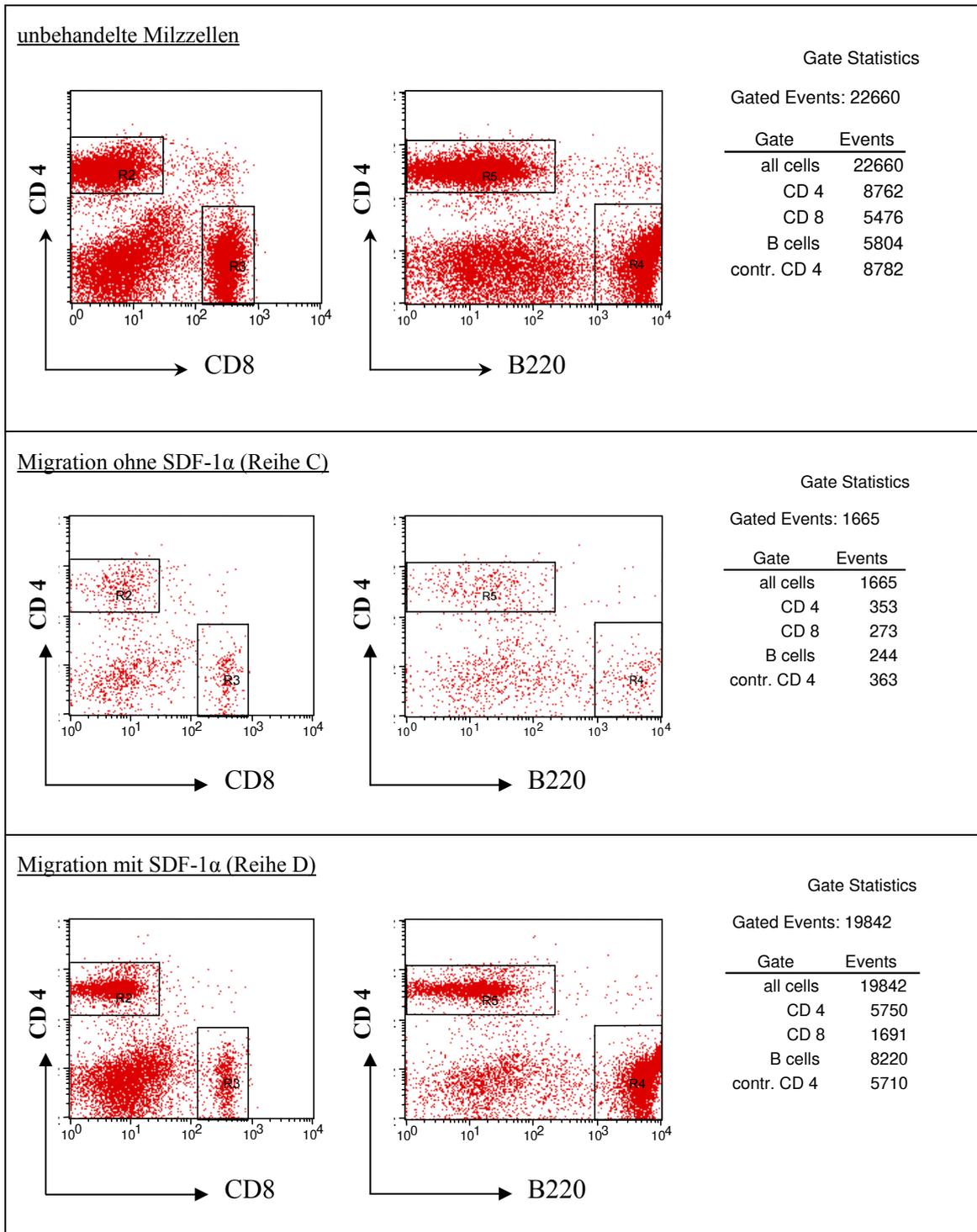


Abbildung 2.3 – FACS-Analyse eines Migrationsversuchs von Milz-Zellen (Events = Zellzahl; R bzw. Gate = Region, d.h. R2 = CD4+ T-Zellen, R3 = CD8+ T-Zellen, R4 = B-Zellen und R5 = CD4+ T-Zellen).

Errechnung des Migrationsindexes:

Region	Zellpopulation	Migrationsindex (MI)
• R2	CD4+ Zellen (CD4/CD8-Färbung)	5750 / 353 = 16,29
• R3	CD8+ Zellen	1691 / 273 = 6,19
• R4	B-Zellen	8220 / 244 = 33,69
• R5	CD4+ Zellen (CD4/B220-Färbung)	5710 / 363 = 15,73

2.2.6 Adhäsionstest

Die Adhäsionstests wurden mit Thymozyten, B-Zellen aus der Milz und CD4+ T-Zellen aus Lymphknoten durchgeführt.

Für den Adhäsionsversuch wurden Petrischalen auf der Bodenaußenseite mit einem Kreis von 0,7 cm Durchmesser markiert. FN wurde auf eine Konzentration von 2 µg / 50 µl PBS eingestellt und es wurden 50 µl in den markierten Kreis aufgetropft und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde das FN abpipetiert und der FN-Kreis dreimal mit 50 µl PBS gewaschen. Sodann wurde die ganze Fläche der Petrischale mit 1 ml 1,5% BSA in PBS versetzt und die Petrischalen ÜN bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Verwendete Lösungen:

- FN (Stock: 1µg/µl in PBS; Arbeitskonzentration 2 µg/50 µl)
- PBS, w/o Ca²⁺ und Mg²⁺
- HBSS
- 1,5% (w/v) BSA Fraktion V in PBS – zum Blocken (Stock: 10%)
- 3,5 % PFA in PBS – zum Fixieren

Am Tag des Adhäsionsversuches wurden die entsprechenden Mäuse getötet, die Lymphknoten und der Thymus präpariert. Es wurden die inguinalen, die axillären, die mandibulären und die mesenterialen Lymphknoten verwendet. Die Organe wurden in 7 ml HBSS aufgenommen, durch ein Zellsieb gerieben, die Zellsuspension in Greiner

Röhrchen gegeben, zentrifugiert (1300 rpm / 5 min / RT), der Überstand (ÜS) abgesaugt und das Zellpellet erneut in 7 ml HBSS aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt (1:50 Verdünnung in Trypanblau) und jeweils 4×10^6 Thymozyten in ein entsprechendes Eppendorf Reaktionsgefäß umgefüllt. CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten wurden mittels MACS-Methodik isoliert (s.u. 2.2.3.1). Nach Trennung am MACS wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der ÜS abgesaugt, das Zellpellet in 6 ml HBSS aufgenommen und die Zellen gezählt. Je 4×10^6 Thymozyten und CD4⁺ T-Zellen wurden mit MnCl₂, PMA, SDF1- α oder CD3 ϵ -Ak (Biotin-Ak mit anschließender Kreuzvernetzung durch Streptavidin) stimuliert.

Stimulationsbedingungen und Konzentrationen:

- Kontrolle 1: kein Stimulus (negative Kontrolle)
- Kontrolle 2: 2 mM MnCl₂ in PBS (positive Kontrolle)
- PMA: 100 ng/ml
- SDF-1 α : 100 ng/ml
- CD3 ϵ -Ak: 10 μ g/ml

Nach Zugabe der Stimuli inkubierten die Zellen in den Reaktionsgefäßen mit geöffnetem Deckel für 30 min bei 37°C im Brutschrank.

Die beschichteten Petrischalen vom Vortag wurden auf RT gebracht, einmal mit 1 ml HBSS gewaschen, die stimulierten Zellen aus dem Reaktionsgefäß auf die Petrischalen gegeben und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension aus der Petrischalen vorsichtig abgesaugt und jede Petrischale 3x mit jeweils 1 ml HBSS für jeweils 10 min auf einem Schüttler gewaschen.

Die adhärirten Zellen wurden mit 1 ml 3,5 % PFA in PBS fixiert und die an FN adhärirten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt.

2.2.7 Messung der Aktin-Polymerisation

Zur Messung der Aktinpolymerisation wurden isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten verwandt.

Zur **Stimulation** wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

- SDF-1 α : 100 ng/ml
 - CD3 ϵ -Ak: 10 μ g/ml
 - Streptavidin: 20 μ g/ μ l
- (zur Kreuzvernetzung der CD3 ϵ -Biotin-Antikörper)

FA-T-Puffer:

- 4 % PFA in PBS
- 0,2 % Saponin in PBS

Zu jeder Versuchsreihe gehörten drei Ansätze:

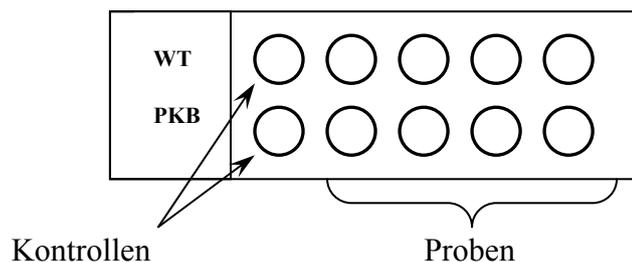
1. Zellen ohne jegliche Färbung – nur mit FA-T Puffer behandelt
2. unstimulierte, mit TRITC-Phalloidin gefärbte und in FA-T-Puffer fixierte Zellen (Negativkontrolle)
3. Stimulierte, mit TRITC-Phalloidin gefärbte und in FA-T-Puffer fixierte Zellen (Positivkontrolle)

Für die Stimulation wurden die Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Zeitwert wurden jeweils 100 μ l der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen verteilt. Sodann wurden 100 μ l des Stimulus in der entsprechend angegebenen Konzentration bei RT zugegeben. Bei der Stimulation mit dem CD3 ϵ -Ak inkubierte der Primärantikörper zuerst für eine Minute bei RT, anschließend wurde nach Zugabe von Streptavidin die Zeit entsprechend der Stimulation mit SDF-1 α gemessen. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden 100 μ l des FA-T Puffers zum Stoppen der Stimulation und Fixierung der Zellen zugesetzt. Das FACS-Röhrchen wurde kurz gevortext, die Zellen inkubierten für 15 Minuten bei RT und anschließend wurden 100 μ l einer 1:200 TRITC-Phalloidin-Lösung in PBS für 15 min zugegeben (Stock-Konzentration 0,1 mg / 1 ml Ethanol). Anschließend wurden 3 ml PBS zugesetzt, bei 1200 rpm / 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 300 μ l PBS / 1% PFA aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.8 Aktinfärbung für die Konfokalmikroskopie

Für die Aktinfärbung wurden isolierte CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten von OT1-TCR-PKBtg und OT1-TCRtg Mäusen auf 1×10^6 /ml eingestellt. Für die Stimulation wurden je 200 μ l der Zellsuspension für 1 min mit CD3 ϵ -Biotin-Ak in einer Konzentration von 5 μ g/ml versetzt und anschließend Streptavidin in einer Konzentration von 10 μ g/ml zur Kreuzvernetzung der Ak beigefügt. Entsprechend der einzelnen Zeitwerte wurde die Stimulation durch Zufügen von 1 ml eiskaltem PBS 0,5% BSA gestoppt, das Eppendorf Reaktionsgefäß bei 6000 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 μ l 4°C kaltem PBS 0,5% BSA aufgenommen.

Die mit Poly-L-Lysin vorbeschichteten Objektträger wurden einmal in ddH₂O gewaschen und auf Eis gelegt. Die einzelnen kreisförmigen Sektoren des Objektträgers wurden mit je 20 μ l der Zellsuspension beladen und für 10 min inkubiert.



Nicht adhärierte Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS abgewaschen. Anschließend wurden die Zellen in den einzelnen Sektoren mit 20 μ l 3,5% PFA in PBS für 15 min fixiert und einmal mit PBS gewaschen und gefärbt. Dazu wurde der Objektträger für 10 min in PBS 0,2% Saponin getaucht, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit 20 μ l PBS 0,5% BSA für 15 min zum unspezifischen Blocken bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 20 μ l einer verdünnten 1:200 TRITC-Phalloidin-Lösung (in PBS/0,5%BSA) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen, getrocknet und mit Mowiol eingedeckt.

2.2.9 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen der Daten wurden die Softwareprogramme SPSS - Version 11.5.1 (SPSS[®] Inc.) und Microsoft[®] Excel 2000, Microsoft Corporation, benutzt.

Vor der Testauswahl zur statistischen Berechnung der Migration wurde mit den Daten eine Kolmogorov-Smirnov-Anpassungsanalyse durchgeführt. Bei der Migration von CD28 k.o. Lymphozyten wurde mit dem Standard-t-Test für zwei unabhängige Stichproben gearbeitet. Signifikanzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ sind entsprechend gekennzeichnet.

Zum Signifikanznachweis bei der Migration von PKBtg und Wildtyp-Lymphozyten wurde der Mann-Whitney-Test als nichtparametrischer Test verwandt. Alle errechneten Signifikanzen waren ebenfalls im Standard-t-Test signifikant. Allerdings konnte in der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungsanalyse (die asymptotische Signifikanz sollte hierbei gegen 1 streben) keine Normalverteilung für alle gegebenen Parameter nachgewiesen werden. Aus diesem Grund und um der Erfüllung der Testkriterien eines nichtparametrischen Tests Rechnung zu tragen, wurde die Analyse der Daten mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Verglichen wurden bei den entsprechenden Analysen jeweils die Einzelwerte der PKBtg Tiere gegen die der Wildtyp-Tiere; p-Werte kleiner als 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant angegeben.

Bei der Adhäsion wurde zum Signifikanznachweis der Standard-t-Test für die Mittelwertgleichheit verwandt. In der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungsanalyse wurde eine Normalverteilung für alle gegebenen Parameter nachgewiesen. Alle weiteren Kriterien zur Erfüllung des T-Tests waren gegeben; p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Migration von Lymphozyten

PKB beeinflusst die Zellmigration, die Invasion in die Extrazellulärmatrix und letztendlich auch die Metastasierungseigenschaften verschiedenster Tumorzellen. In dieser Arbeit sollte der Einfluss aktiver PKB auf das Migrationsverhalten lymphatischer Zellen bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die *in vitro* Migration PKBtg Lymphozyten unter dem Einfluss des Chemokins SDF-1 α mit Wildtyp-Zellen verglichen und der jeweilige Migrationsindex bestimmt. Dieser entspricht dem Quotienten aus der Anzahl migrierter Zellen unter SDF-1 α -Gabe dividiert durch die Zellzahl der ohne Chemokin migrierten Zellen.

3.1.1 Migration von Thymozyten

Bei der Untersuchung der Migrationseigenschaften von Thymozyten wurden Gesamt-Thymozyten von PKBtg und Wildtyp-Mäusen eingesetzt. 4×10^6 Thymozyten wurden mit SDF-1 α (100 ng/ml) für 2,5 Stunden im Transwell-System bei 37°C inkubiert. Die Unterscheidung der migrierten Thymozyten in DP-, DN-, CD4 SP- und CD8 SP-Thymozyten wurde durchflusszytometrisch anhand der Analyse der CD4- und CD8-Expression der migrierten Zellen getroffen.

Aus der Abbildung 3.1 geht hervor, dass von den vier genannten Thymozytenpopulationen die DP-Thymozyten, sowohl bei den PKBtg als auch bei den Wildtyp-Mäusen, die stärkste Migration auf SDF-1 α zeigten. Sie wanderten im Mittel 2-3x besser als SP- und DN-Thymozyten. Interessanterweise migrierten alle Thymozytensubpopulationen der PKBtg Mäuse schlechter, da sie einen ca. 50% niedrigeren Migrationsindex (MI) als die entsprechenden Populationen der Wildtyp-Mäuse aufwiesen.

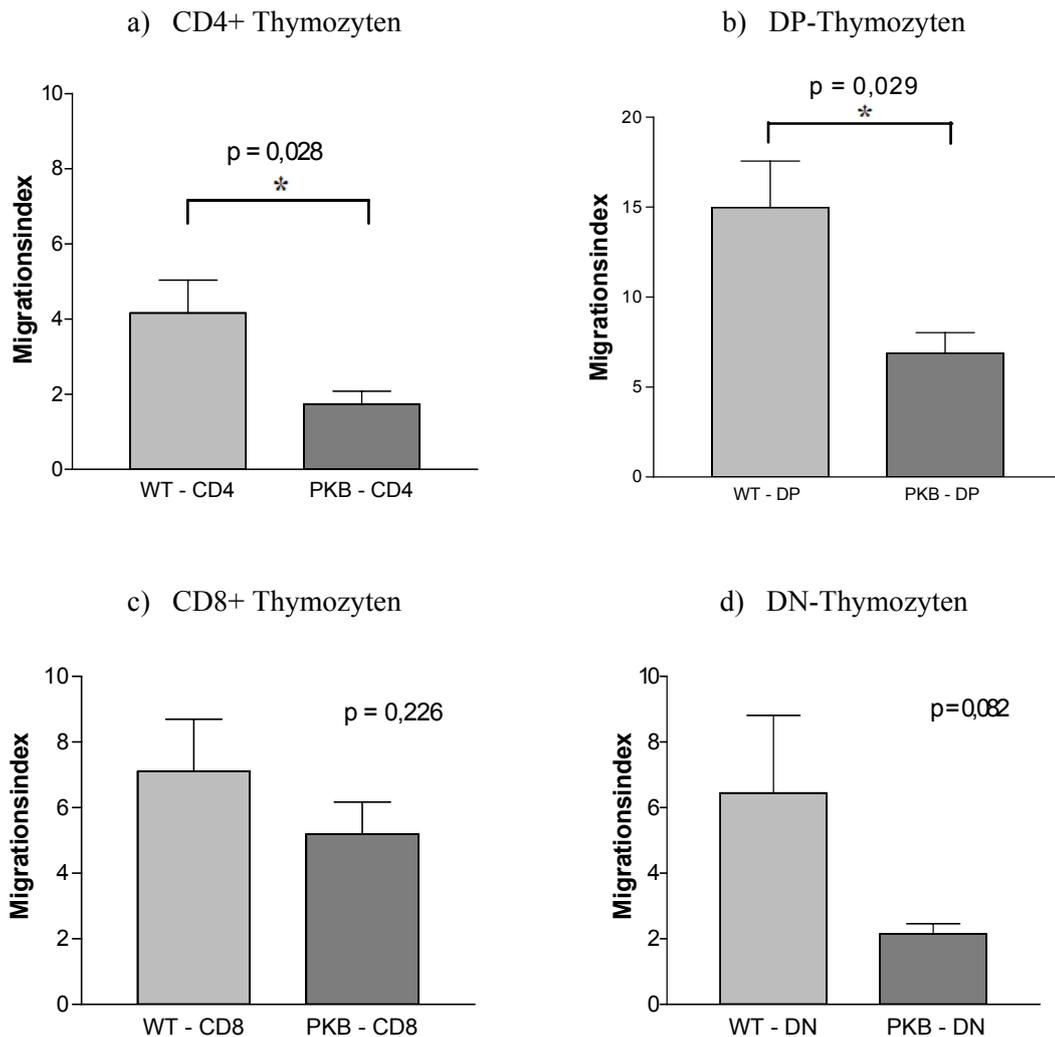


Abbildung 3.1 – Vergleich der Migration von DN-, CD4+, CD8+ und DP-Thymozyten von PKBtg (PKB) und Wildtyp-Mäusen (WT) auf SDF-1 α (100 ng/ml), dargestellt als Migrationsindex (MI) [n = jeweils 10 Mäuse; Mann-Whitney-Test; *p < 0.05].

3.1.2 Migration von T- und B-Zellen

3.1.2.1 Lymphozyten der Milz

Bei der Beurteilung der Migrationseigenschaften von Lymphozyten der Milz wurden Milzsuspensionen von PKBtg und Wildtyp-Mäusen eingesetzt. Die Unterscheidung der migrierten Zellen in CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie B-Zellen wurde durch anschließende FACS-Färbung und Analyse der CD4-, CD8- und B220-Expression getroffen. Sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen aus der Milz von PKBtg Mäusen wiesen einen höheren Migrationsindex (Abb. 3.2) als die entsprechenden Lymphozyten

aus Wildtyp-Mäusen auf. PKBtg CD4⁺ T-Zellen der Milz migrierten im Mittel doppelt so gut wie Wildtyp CD4⁺ T-Zellen; PKBtg CD8⁺ T-Zellen wanderten ca. 30% mehr als CD8⁺ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen.

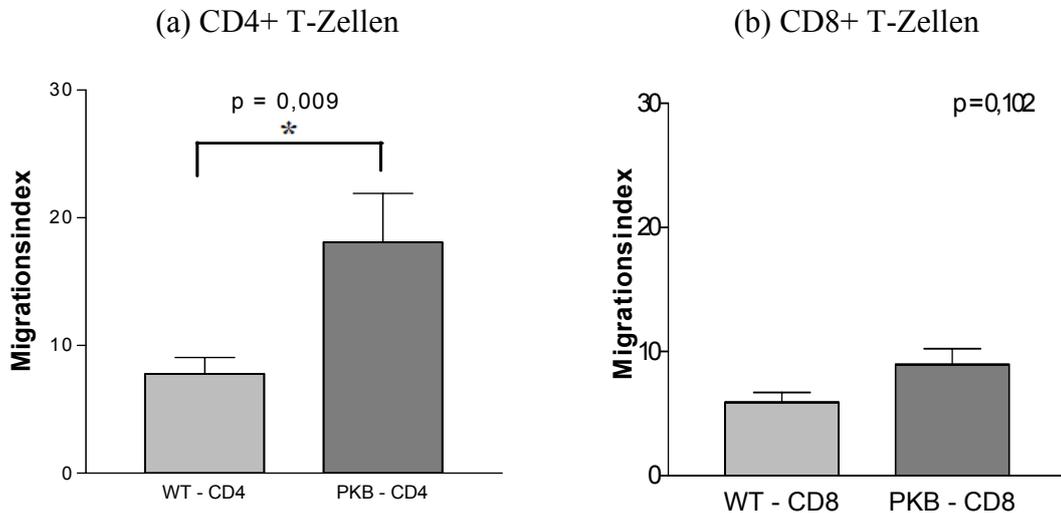
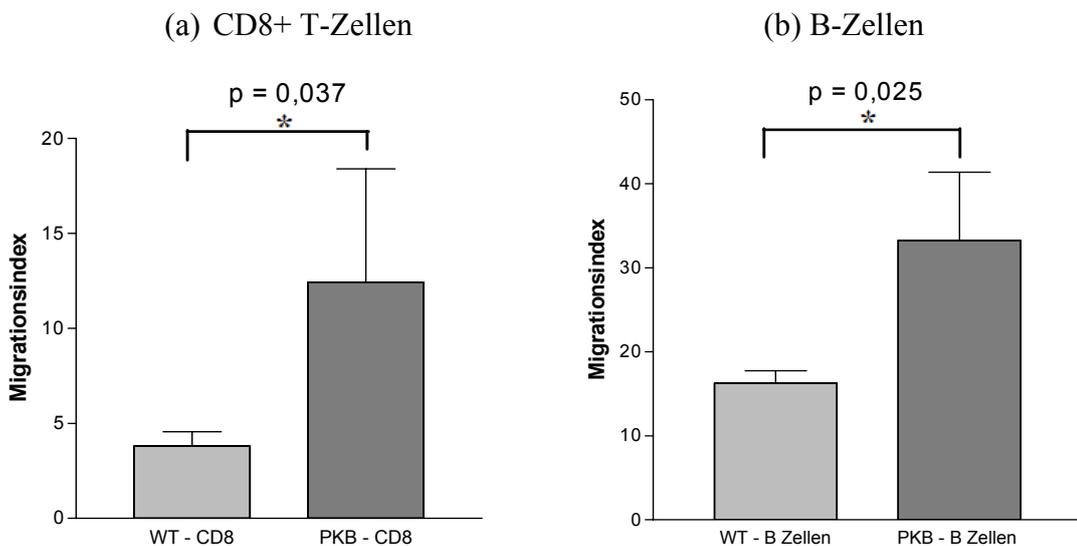


Abbildung 3.2 – Migration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Milz aus PKBtg (PKB) und Wildtyp-Mäusen (WT) auf SDF-1 α , dargestellt als MI [n = jeweils 9 Mäuse; Mann-Whitney-Test; *p < 0.05;].

3.1.2.2 Lymphozyten der Lymphknoten

Bei den Untersuchungen zur Migration von Lymphozyten aus Lymphknoten wurden isolierte CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sowie B-Zellen von PKBtg mit den Zellpopulationen aus Wildtyp-Mäusen verglichen. PKBtg T-Zellen und B-Zellen migrierten mehr als doppelt so gut wie vergleichbare Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen.



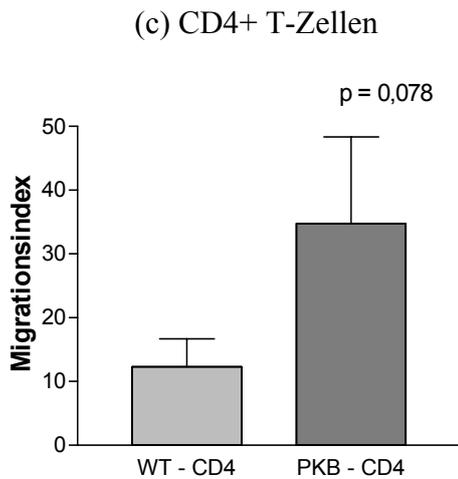


Abbildung 3.3 – Vergleich der Migration von T- und B-Zellen aus Lymphknoten von PKBtg und Wildtyp-Mäusen nach Stimulation mit SDF-1 α [n = jeweils 6 Mäuse aus drei Experimenten; Mann-Whitney-Test; *p < 0.05].

3.1.3 Migration von CD28-defizienten Lymphozyten

CD28 ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül für die T-Zellaktivierung und CD28-defiziente (CD28 k.o.) T-Zellen zeigen eine verringerte T-Zellaktivierung und Proliferation nach TCR-Stimulation. Es sollte hier untersucht werden, ob CD28-Defizienz die Migration von T-Zellen beeinflusst. In den jeweiligen Versuchen wurde das Migrationsverhalten von T-Zellen aus Lymphknoten und Milz sowie das von B-Zellen aus Lymphknoten untersucht.

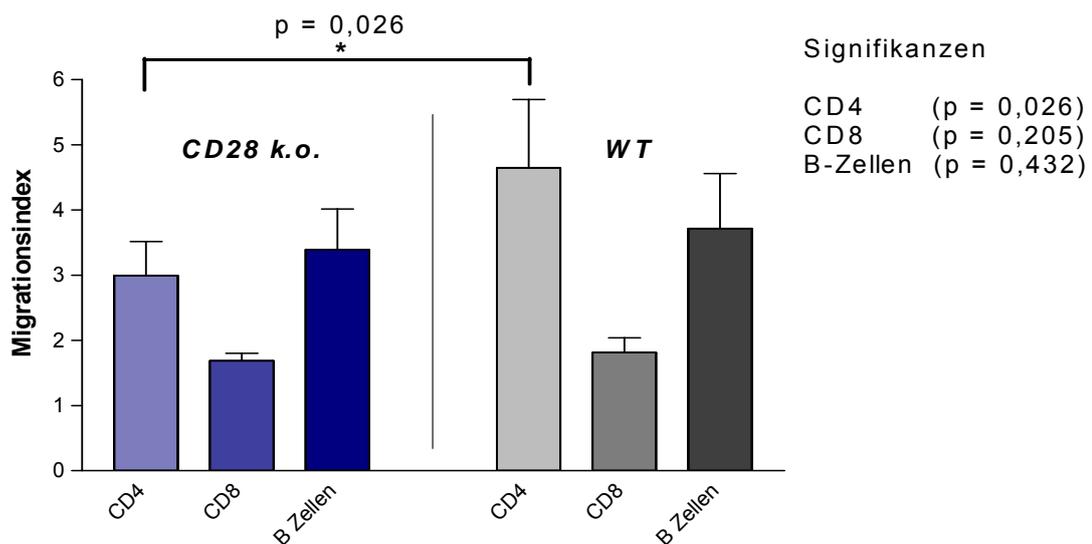


Abbildung 3.4 – Vergleich der Migration von T- und B-Zellen aus Lymphknoten von CD28 k.o. und Wildtyp-Mäusen [n = jeweils 6 Mäuse aus drei Experimenten; Standard-T-Test; *p < 0.05].

Bei den Experimenten zur Migration von Lymphozyten aus Lymphknoten (Abb. 3.4) wiesen CD28 k.o. CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den wildtypischen CD4⁺ T-Zellen einen um etwa ein Drittel reduzierten Migrationsindex auf. CD8⁺ T-Zellen von CD28 k.o. und Wildtyp-Mäusen migrierten dagegen gleich gut. B-Zellen, die kein CD28 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sollten durch CD28-Defizienz nicht betroffen sein und zeigten das gleiche Migrationsverhalten wie wildtypische B-Zellen.

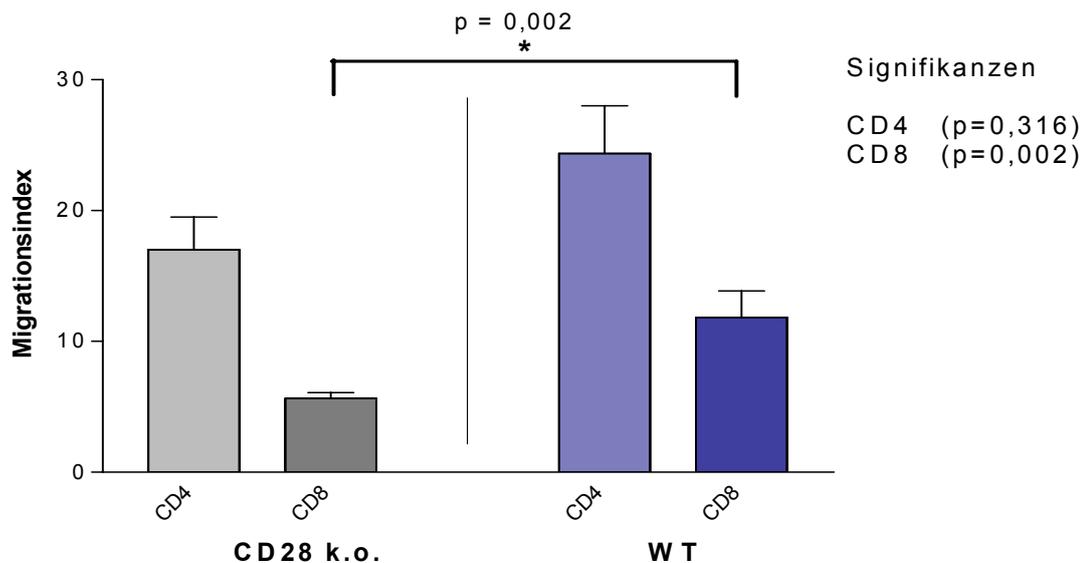


Abbildung 3.5 – Vergleich der Migration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von CD28 k.o. und Wildtyp-Mäusen [n = jeweils 6 Mäuse aus drei Experimenten; Standard-T-Test; *p < 0.05].

CD4⁺ T-Zellen und v.a. CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von CD28 k.o. Mäusen migrierten schlechter als die entsprechenden Wildtyp-Zellen (Abb. 3.5).

Zusammenfassend zeigen die Versuche zur Migration, dass erhöhte PKB-Signale die Migration beeinflussen. Sowohl B- als auch T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten PKBtg Mäuse zeigten nach SDF-1 α Stimulation im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ein signifikant gesteigertes Migrationsverhalten. Ferner reagierten CD28 k.o. T-Zellen schlechter auf SDF-1 α als Wildtyp-Zellen. PKBtg Thymozyten verhielten sich interessanterweise entgegengesetzt zu den peripheren T-Zellen, da sie weniger gut als die Wildtyp-Thymozyten migrierten. Dies zeigt, dass PKB-Signale die Migration von Thymozyten und peripheren Lymphozyten differenziell beeinflussen.

3.2 CXCR4-Expression auf Thymozyten und Lymphozyten

CXCR4 ist ein alpha-Chemokinrezeptor, der spezifisch für SDF-1 α / β (auch CXCL12 genannt) ist. CXCR4 ist zudem einer der Chemokinrezeptoren, der es HI-Viren ermöglicht, CD4⁺ T-Zellen zu infizieren. Da PKBtg Thymozyten und periphere Lymphozyten Unterschiede in der SDF-1 α -induzierten Migration aufwiesen, stellte sich die Frage, ob das unterschiedliche Migrationsverhalten durch unterschiedliche Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche der verschiedenen Lymphozyten-Populationen bedingt ist. Daher wurde die Expression von CXCR4 durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.1.1 CXCR4-Expression auf Thymozyten

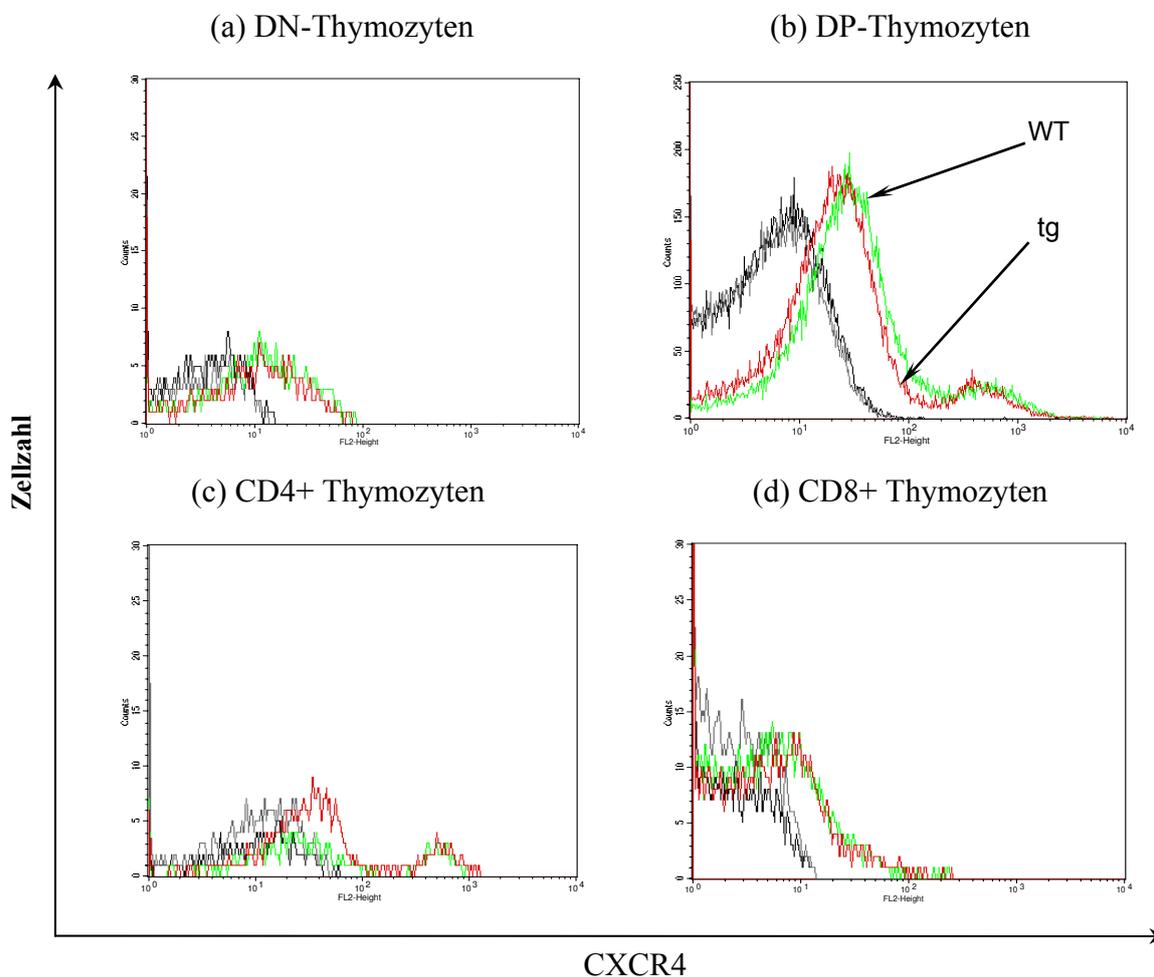


Abbildung 3.6 - CXCR4-Expression auf Thymozyten-Subpopulationen von PKBtg und WT-Mäusen nach Färbung mit CD4-, CD8- und CXCR4-Antikörpern und durchflusszytometrischer Analyse. Die rote Linie kennzeichnet die CXCR4-Expression auf PKBtg Zellen, die grüne Linie die Expression auf WT-Zellen. Isotypkontrolle für PKBtg Zellen dunkelgrau; für WT-Zellen hellgrau.

Zunächst wurde die CXCR4-Expression auf Thymozyten-Subpopulationen von PKBtg und WT-Mäusen analysiert. Wie aus Abb. 3.6 hervorgeht, war die CXCR4-Expression sowohl auf DN- und DP-Thymozyten als auch auf CD8⁺ und CD4⁺ Thymozyten zwischen PKBtg und WT-Tieren vergleichbar.

3.2.1.2 CXCR4-Expression auf peripheren Lymphozyten

Milzzellen wurde zur Analyse der CXCR4-Expression mit Ak gegen CD4, CD8 oder B220, IgM sowie CXCR4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

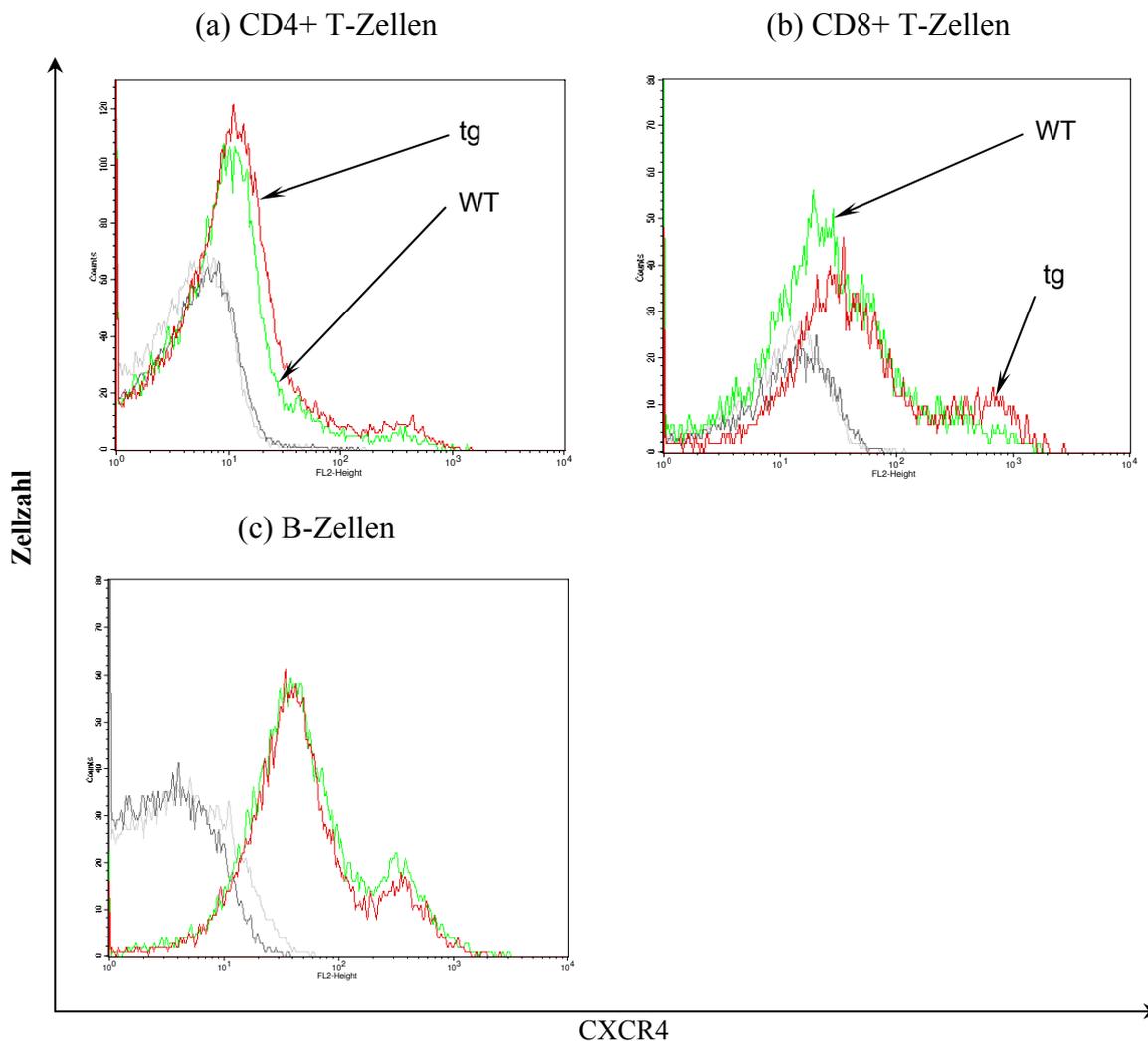


Abbildung 3.7 - CXCR4-Expression auf Lymphozyten der Milz. CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche von (a) CD4⁺ T-Zellen, (b) CD8⁺ T-Zellen und (c) B-Zellen der Milz. Die rote Linie kennzeichnet die Expression von CXCR4 auf PKBtg Zellen, die grüne Linie die Expression auf WT-Zellen. Die Isotypkontrollen sind grau dargestellt. Die Abb. ist repräsentativ für jeweils vier analysierte Mäuse.

Die Expression von CXCR4 auf Lymphozyten der Lymphknoten wurde wie für Milzzellen beschrieben durchgeführt.

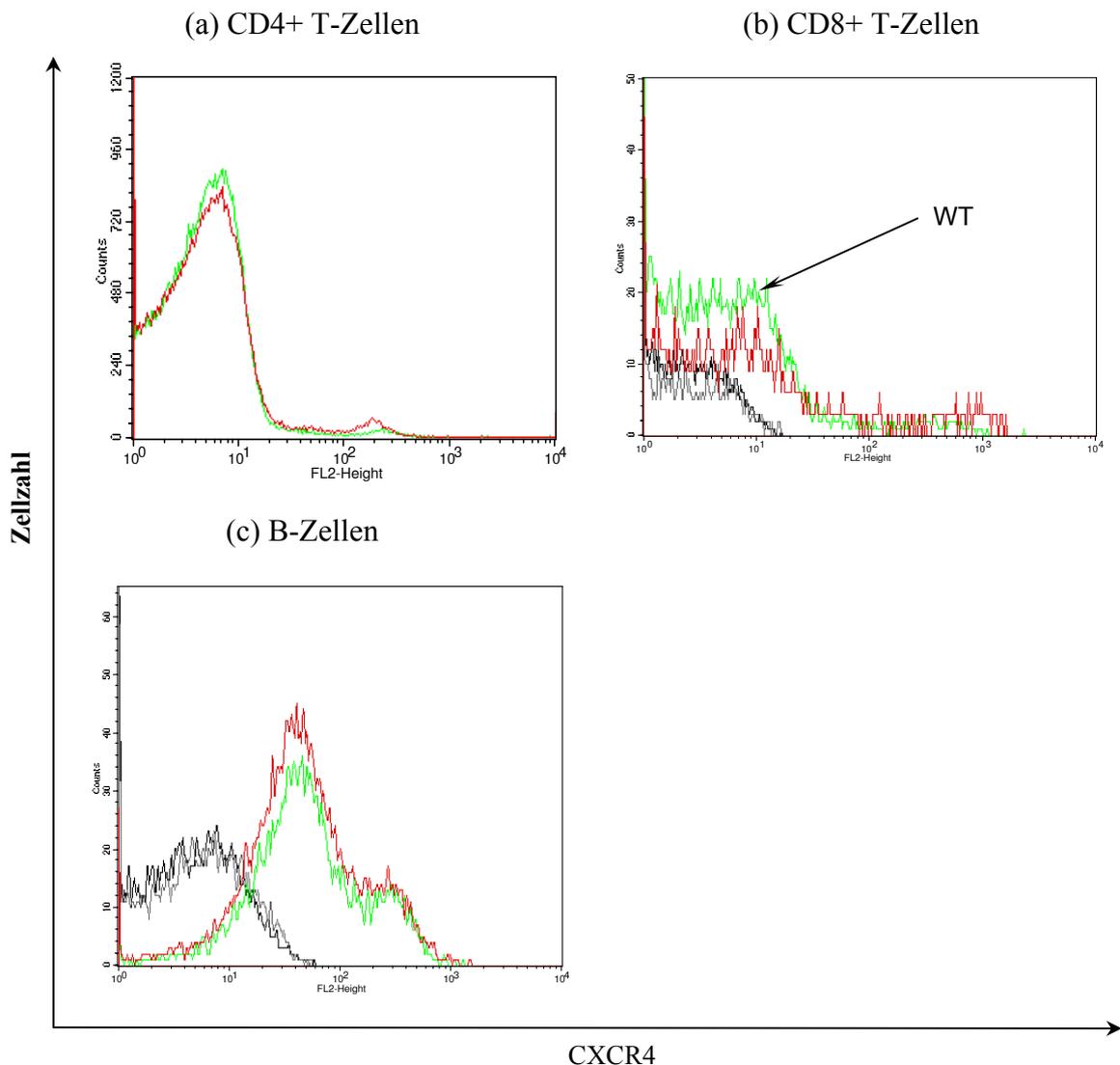


Abbildung 3.8 – CXCR4-Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen und B-Zellen aus Lymphknoten.

Dargestellt ist die Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche von (a) CD4+ und (b) CD8+ T-Zellen sowie (c) B-Zellen aus den Lymphknoten an repräsentativen Beispielen. Die rote Linie kennzeichnet die Expression von CXCR4 auf PKBtg Zellen, die grüne Linie die Expression der WT Zellen, die grauen Linien die Isotypkontrollen.

Die Analyse der CXCR4-Expression auf T-Lymphozyten der Milz zeigte eine sehr schwache Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen, die vergleichbar zwischen WT- und PKBtg-Zellen war. B-Zellen zeigten eine stärkere und vergleichbare CXCR4-Expression. Auf CD4+ und CD8+ T-Zellen der Lymphknoten (Abb. 3.8) konnte die CXCR4-Expression trotz mehrmaliger Färbungen nur sehr schlecht nachgewiesen

werden, was auf eine noch niedrigere Expression von CXCR4 als auf T-Zellen der Milz hinweist. Lediglich eine sehr kleine Population, wahrscheinlich voraktivierte Zellen, zeigten eine starke CXCR4-Färbung. Unterschiede zwischen PKBtg und WT-Zellen waren nicht vorhanden. Dagegen war die Expression auf B-Zellen gut nachweisbar, aber auch hier wurden keine Unterschiede zwischen WT- und PKBtg-Zellen gefunden.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass PKBtg T-Zellen und B-Zellen sowie Thymozyten verglichen mit WT-Mäusen keine wesentlichen Unterschiede in der CXCR4-Expression aufweisen.

3.3 Untersuchungen zur Adhäsion von Lymphozyten

Um im Falle einer Infektion zum Entzündungsherd zu gelangen, müssen Lymphozyten gegebenenfalls größere Distanzen überwinden. Am Ort der Infektion müssen die Lymphozyten das Blut- und Lymphsystem verlassen. Dazu ist zunächst die Adhäsion an das Endothel notwendig, die über verschiedene Moleküle gesteuert wird. Verwoben mit großen extrazellulären Proteoglycanen bilden faserige Matrixproteine wie Kollagen, Elastin und Fibronectin (FN) ein querverstrebtes Netzwerk, das der Extrazellulärmatrix (ECM) Festigkeit und Elastizität verleiht. Einige dieser Proteine sind multiadhäsiv; sie enthalten Bindungsstellen für mehrere verschiedene Matrixmoleküle [114]. FN ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das bei vielen physiologischen Abläufen, u.a. der Reparatur von Geweben, der Embryogenese, der Blutgerinnung und Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle spielt. FN besitzt separate Domänen für die Bindung von Fibrin, Heparansulfat, Kollagen und die Plasmamembranproteinfamilie der Integrine [114], etwa dem α -Integrin VLA-4 (CD49d). Integrine vermitteln die Signalübertragung zwischen dem Zellinneren von Lymphozyten und der ECM oder Endothelzellen.

In vitro kann die Adhäsionsfähigkeit von Zellen untersucht werden, indem man den Zellen verschiedene Liganden bietet, an die sie spezifisch adhärieren können. Ungebundene Zellen werden gewaschen und die spezifisch adhärerten Zellen ausgezählt. In der Arbeit wurde die Adhäsion an FN sowie an ICAM (Interzelluläres Zell-Adhäsions-Molekül) untersucht, mit der Fragestellung, ob erhöhte PKB-Signale auch die Adhäsion von Lymphozyten beeinflussen.

3.3.1 Adhäsion an Fibronektin

In den folgenden Versuchen wurde die Adhäsion von Thymozyten und CD4⁺ T-Zellen an FN aus PKBtg mit WT-Mäusen verglichen. Dafür wurden CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten isoliert, die Zellen mit PMA, SDF-1 α , CD3-Ak oder MnCl₂ stimuliert und anschließend für eine halbe Stunde in den FN-beschichteten Petrischalen bei 37°C inkubiert. MnCl₂ diente dabei als positive Kontrolle, da es Bindungsstellen der Integrine besetzt, die über eine Konformationsänderung des Moleküls die Adhäsion ermöglichen [115]. Die adhärenierten Zellen wurden fixiert und je Petrischale drei Gesichtsfelder (GF) ausgezählt.

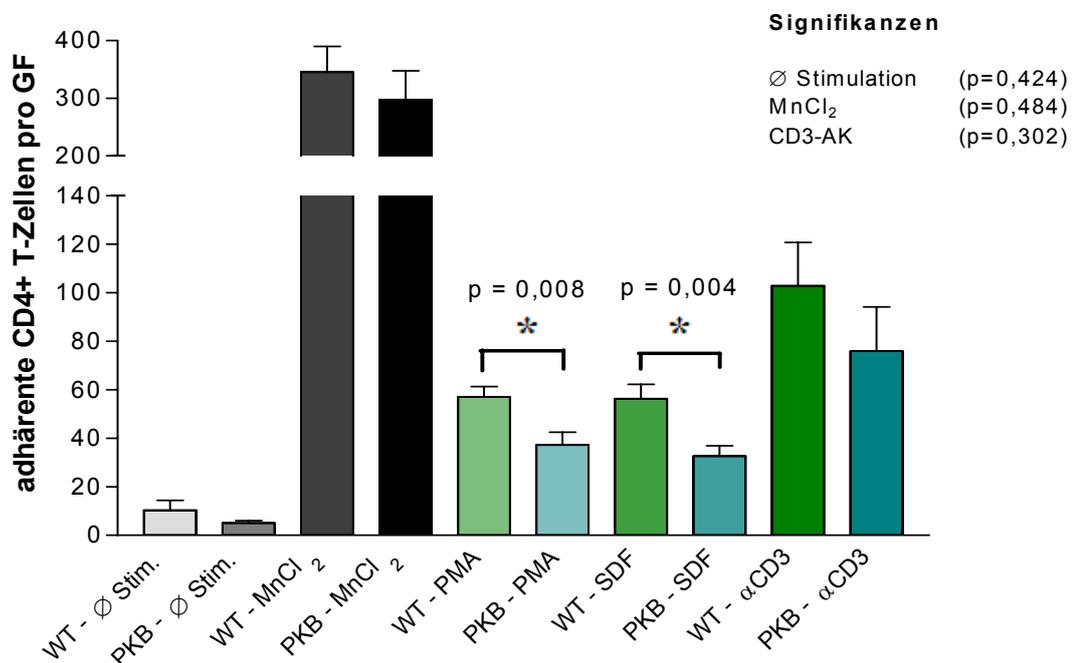


Abbildung 3.9 – Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten an Fibronektin. Der Graph zeigt die Zellzahlen an FN adhärenierter CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten von WT-Mäusen und PKBtg-Mäusen pro Gesichtsfeld nach Stimulation mit PMA (100 ng/ml), SDF-1 α (100 ng/ml), CD3-Ak (10 μ g/ml) und MnCl₂ (2 mM); n = jeweils 12 Mäuse; T-Test für die Mittelwertgleichheit: * p < 0.05.

Abbildung 3.9 zeigt, dass zwischen unstimulierten und mit MnCl₂ stimulierten WT- und PKBtg Zellen Unterschiede in der Adhäsion an FN auftraten, die allerdings nicht signifikant waren. MnCl₂ führte zu einer sehr starken Adhäsion der Zellen, die ca. 5fach höher als bei den anderen Stimulationsbedingungen war. Bei CD3-Stimulation ergab sich eine Reduktion in der Adhäsion in PKBtg CD4⁺ T-Zellen gegenüber WT-Zellen,

diese war im Rahmen der Untersuchungen aber nicht signifikant ($p=0,302$). Dagegen zeigten PKBtg Zellen nach Aktivierung durch PMA sowie SDF-1 α eine deutliche und signifikante Reduktion von ca. 30% in der Adhäsion an FN im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

In gleicher Weise wurden Gesamt-Thymozyten von Wildtyp- und PKBtg Mäusen hinsichtlich ihrer Adhäsion an FN analysiert.

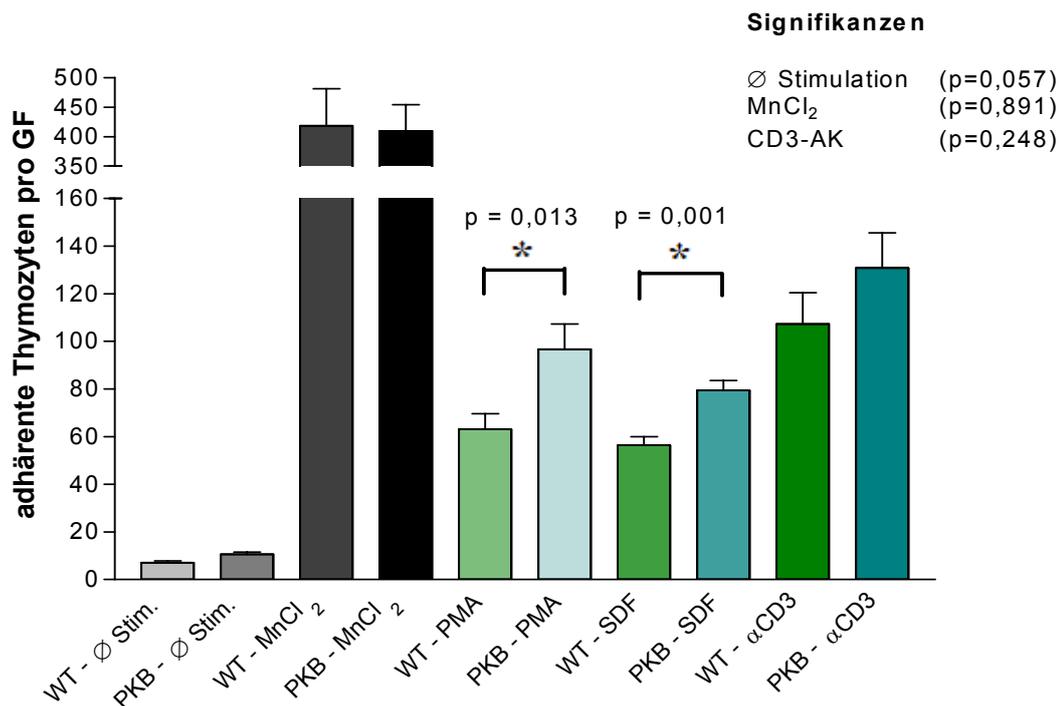


Abbildung 3.10 – Adhäsion von Thymozyten aus PKBtg und WT-Mäusen an Fibronectin.

Gesamt-Thymozyten von PKBtg und WT-Mäusen wurden mit PMA (100 ng/ml), SDF-1 α (100 ng/ml), MnCl₂ (2 mM) oder CD3-Ak (10 μ g/ml) stimuliert und die Adhäsion an Fibronectin bestimmt. Der Graph zeigt die Anzahl adhärerter Thymozyten pro ausgezähltem Gesichtsfeld (GF); n = jeweils 12 Mäuse; T-Test für die Mittelwertgleichheit; * $p < 0.05$.

Abbildung 3.10 zeigt, dass nicht und mit MnCl₂ stimulierte Wildtyp- und PKBtg Thymozyten gleich gut adhäreren. Nach CD3-Stimulation waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Interessanterweise adhärerten PKBtg Thymozyten aber deutlich besser an FN, wenn sie mit PMA oder SDF-1 α stimuliert wurden. Insgesamt geht aus den Versuchen zur Adhäsion an FN hervor, dass myrPKB die Adhäsion von Thymozyten sowie CD4⁺ T-Zellen nach PMA- und SDF-1 α -

Stimulation beeinflusst, aber keinen signifikanten Einfluss bei CD3-Stimulation aufweist. Während erhöhte PKB-Signale somit die Adhäsion von Thymozyten steigern, führen PKB-Signale in peripheren CD4⁺ T-Zellen zu einer verminderten Adhäsion an Fibronektin.

3.3.2 Adhäsion an ICAM-1

ICAM-Moleküle sind am Bindungsprozess zwischen Zellen oder an die ECM involviert. Sie bestehen aus einer intrazellulären Domäne, die mit dem Zytoskelett interagiert, einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne, die andere Zelladhäsionsmoleküle (*homophilic binding*) oder die ECM (*heterophilic binding*) binden kann. ICAM-1 (CD54) gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und wird vorwiegend von aktiviertem Endothel exprimiert. Zu den Liganden gehören LFA-1 (CD11a / CD18) und Mac-1 (CD11b / CD18) auf diversen Lymphozyten.

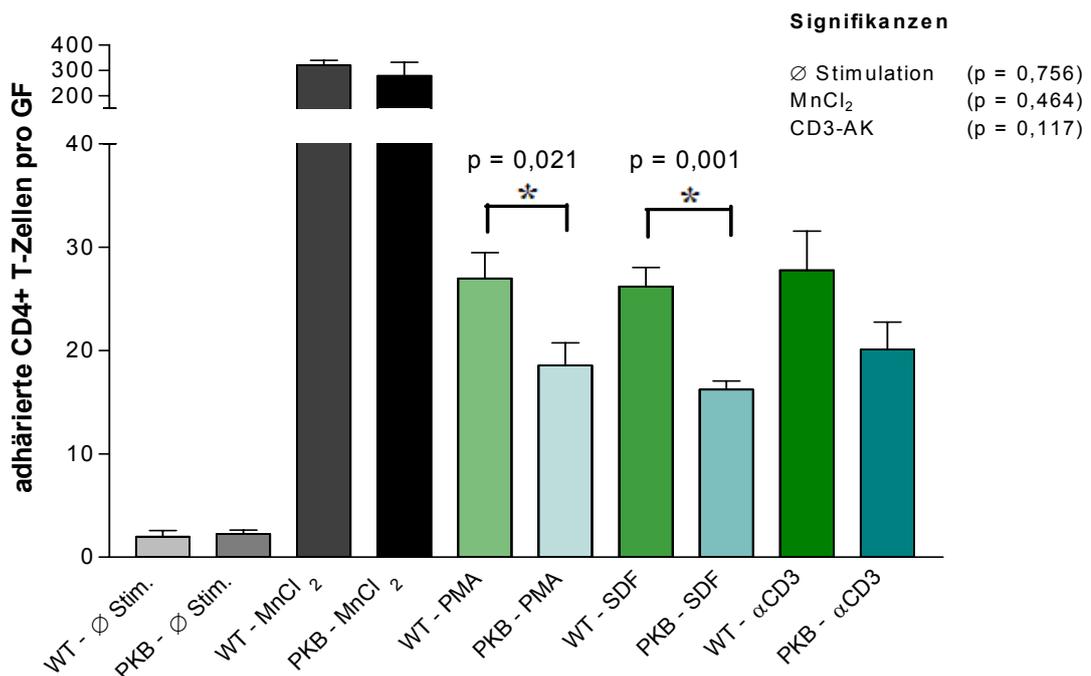


Abbildung 3.11 – Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten an ICAM-1.

Der Graph zeigt die Anzahl adhärerter CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten von Wildtyp- im Vergleich zu PKBtg Mäusen nach Stimulation mit PMA (100 ng/ml), SDF-1α (100 ng/ml), CD3-Ak (10 µg/ml) und MnCl₂ (2 mM) für 30 min.; n = jeweils 9 Mäuse; T-Test für die Mittelwertgleichheit; *p < 0.05.

Bei den Analysen zur Adhäsion an ICAM-1 wurden aus Lymphknoten isolierte CD4⁺ T-Zellen und Thymozyten von PKBtg und Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Zellen

wurden, wie bei der Adhäsion an FN beschrieben mit PMA, SDF-1 α , CD3-Ak sowie MnCl₂ aktiviert, wobei MnCl₂ als positive Kontrolle fungierte.

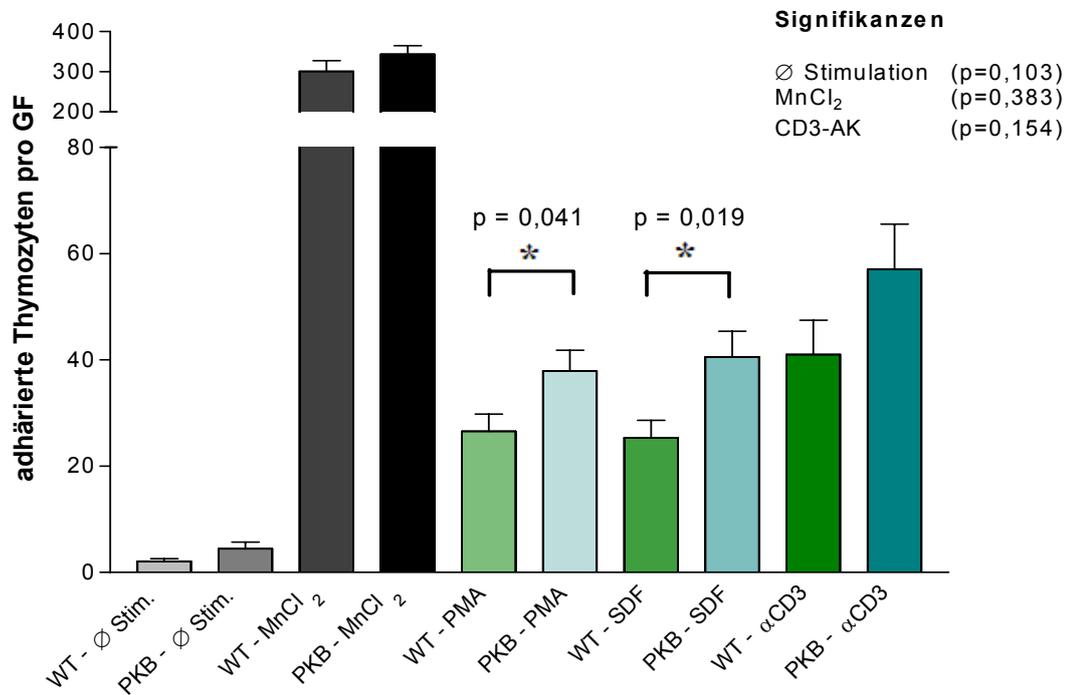


Abbildung 3.12 – Adhäsion von Thymozyten aus PKBtg und WT-Mäusen an ICAM-1.

Thymozyten von PKBtg und WT-Mäusen wurden für 30 min mit PMA (100 ng/ml), SDF-1 α (100 ng/ml), MnCl₂ (2 mM) und CD3-Ak (10 μ g/ml) stimuliert und die Adhäsion der Zellen an ICAM-1 bestimmt. Der Graph zeigt die Anzahl adhärrierter Thymozyten pro ausgezähltem Gesichtsfeld (GF); n = jeweils 9 Mäuse; T-Test für die Mittelwertgleichheit; *p < 0.05.

Wie aus der Abbildung 3.11 hervorgeht, zeigten CD4⁺ T-Zellen aus PKBtg und WT-Mäusen nach Aktivierung durch MnCl₂ eine gleich starke Adhäsion an ICAM-1. Dagegen wiesen PKBtg CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit PMA sowie SDF-1 α eine um ca. 30% reduzierte Adhäsion auf. Nach CD3-Stimulation kam es ebenfalls zu einer reduzierten Adhäsion PKBtg CD4⁺ T-Zellen, die allerdings nicht signifikant war. Somit haben erhöhte PKB-Signale bei PMA- oder SDF-1 α Stimulationsbedingungen einen negativen Einfluss auf die Adhäsion.

In analoger Weise wurde die Adhäsion von Thymozyten untersucht (Abb. 3.12). Hier zeigten PKBtg Thymozyten nach Stimulation mit PMA und SDF-1 α eine signifikant erhöhte Adhäsion an ICAM-1, während bei MnCl₂-Gabe keine Unterschiede

nachweisbar waren. Bei CD3-Stimulation zeigten PKBtg Zellen auch eine erhöhte Adhäsion, jedoch ergab sich in den Versuchen keine Signifikanz.

Insgesamt zeigen die Versuche zur Adhäsion sowohl an ICAM-1 als auch an Fibronectin, dass erhöhte PKB-Signale in Thymozyten deren Adhäsion fördern, während PKB-Signale in peripheren CD4⁺ T-Zellen deren Adhäsion verringern.

3.4 Analyse der CD11a-, CD18- und CD49d-Expression

Leukozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl an Molekülen, die an Adhäsionsprozessen beteiligt sind, darunter β 1- und β 2-Integrine.

Zu dem β 2-Integrinen gehören neben LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*; CD11a/CD18, α L β 2-Integrin), das an ICAM-1 bindet noch drei weitere $\alpha\beta$ -heterodimere Moleküle: Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*, CD11b/CD18, α M β 2-Integrin), CR4 (*complement receptor 4*, CD11c/CD18, α X β 2-Integrin) und das α d β 2-Integrin (CD11d/CD18, ITAD-Antigen).

Zu den β 1-Integrinen gehören u.a. das α 4 β 1-Integrin (CD49d/CD29), das an Fibronectin, VCAM-1, MAdCAM-1 und Kollagen bindet [116].

Die vorherigen Versuche zeigten ein deutlich verändertes Verhalten von PKBtg Zellen hinsichtlich der SDF-1 α - sowie PMA-induzierten Adhäsion an FN und ICAM-1. Es stellte sich daher die Frage, ob PKBtg und Wildtyp-Zellen eine unterschiedliche Oberflächenexpression von ICAM-1- bzw. FN-Rezeptoren aufweisen. Für die Versuche wurden Lymphknoten von Wildtyp- und PKBtg Mäusen präpariert und die Zellen von jeweils zwei Tieren gepoolt. Anschließend wurden die Lymphknotenzellen für CD4, CD8, CD11a, CD18 oder CD49d gefärbt und die Expression der entsprechenden Moleküle durchflusszytometrisch bestimmt.

Hinsichtlich der Expression von CD11a und CD18, also LFA-1 (Abb. 3.13), zeigten PKBtg CD4⁺ T-Zellen und noch stärker PKBtg CD8⁺ T-Zellen eine höhere Expression als Wildtyp-Zellen. Die CD49-Expression auf CD4⁺ T-Zellen war in PKBtg Zellen vergleichbar, aber in PKBtg CD8⁺ T-Zellen deutlich schwächer als in WT-Zellen.

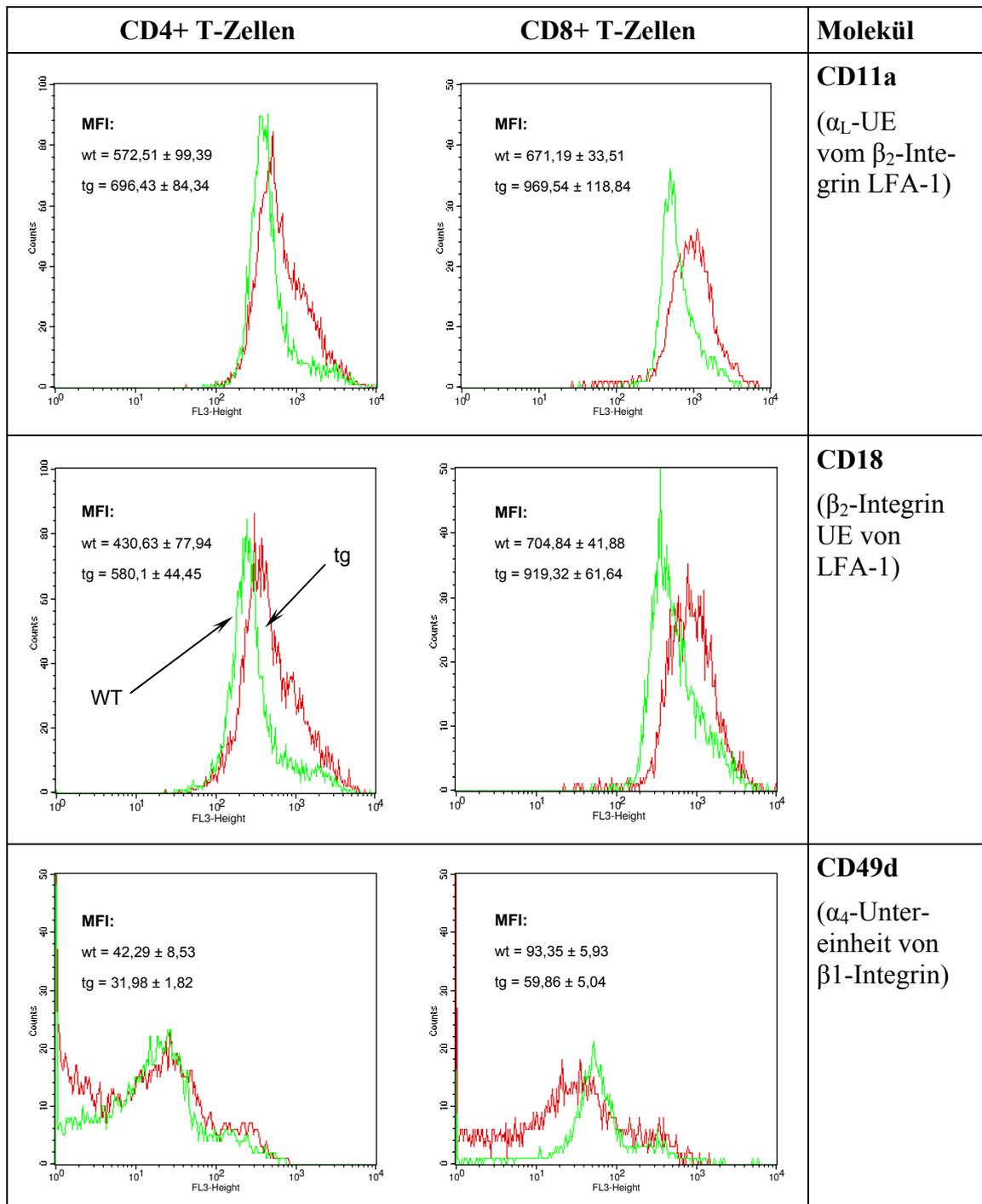


Abbildung 3.13 – Expression von CD11a, CD18 und CD49d auf CD4+ und CD8+ T-Zellen aus Lymphknoten von PKBtg Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Histogramme von Wildtyp- (grüne Linie) oder PKBtg T-Zellen (rote Linie). Die MFI (*mean fluorescence intensity*)-Werte mit Standardabweichung repräsentieren je 3 PKBtg sowie Wildtyp-Mäuse.

3.5 Messung der F-Aktin-Polymerisation

Aktin liegt in zwei Formen vor: globuläres (G-)Aktin kann unter einem ATP-verbrauchenden Prozess zu fibrillärem (F-)Aktin polymerisieren. Neben zellformstabilisierenden Aufgaben als Bestandteil des Zytoskeletts wird Aktin eine wichtige Rolle bei der Zellmigration im Sinne eines gerichteten Auf- und Abbauprozesses des F-Aktins und konsekutiv erfolgreicher Migration zugeschrieben.

In welchem Ausmaß nach Zellstimulation eine Aktinpolymerisation stattfindet, kann untersucht werden, indem die Aktinpolymere zu einem bestimmten Zeitpunkt arretiert, gefärbt und mittels FACS-Analyse dargestellt werden. Dafür wird TRITC-gekoppeltes Phalloidin (Toxin von *Amanita phalloides*) eingesetzt, das an Aktin bindet. In den folgenden Versuchen wurde die Aktinpolymerisation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten von PKBtg und Wildtyp-Mäusen vor und nach Stimulation mit CD3-Ak und SDF1- α untersucht.

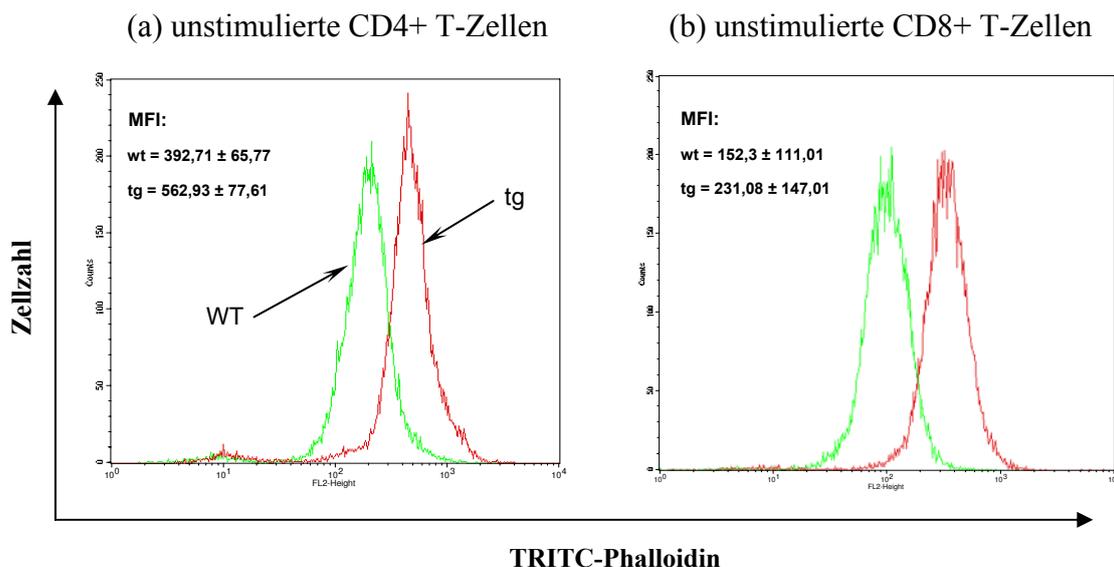


Abbildung 3.14 – F-Aktin in unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus PKBtg (rote Linie) und Wildtyp-Mäusen (grüne Linie) wurden mit TRITC-Phalloidin gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Stärke der Phalloidin-Fluoreszenz spiegelt die Menge an F-Aktin wieder. Die angegebene MFI und Standardabweichung stammt von jeweils 6 Mäusen aus 3 Versuchen.

Dafür wurden isolierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit Formaldehyd fixiert und für 15 min mit TRITC-Phalloidin gefärbt und dann am Durchflusszytometer analysiert (Abb.3.14). Mehrere Versuche zeigten, dass CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen aus PKBtg Mäusen in unstimuliertem Zustand im Vergleich zu unstimulierten WT-Zellen eine deutlich erhöhte Menge von F-Aktin aufwiesen.

3.5.1 Aktinpolymerisation nach CD3-Stimulation

In einer weiteren Versuchsreihe wurden isolierte CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten mit biotin-gekoppelten CD3-Ak und anschließendem *cross-linking* der Ak durch Streptavidin stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Aktinpolymerisation durch Färbung mit TRITC-Phalloidin analysiert.

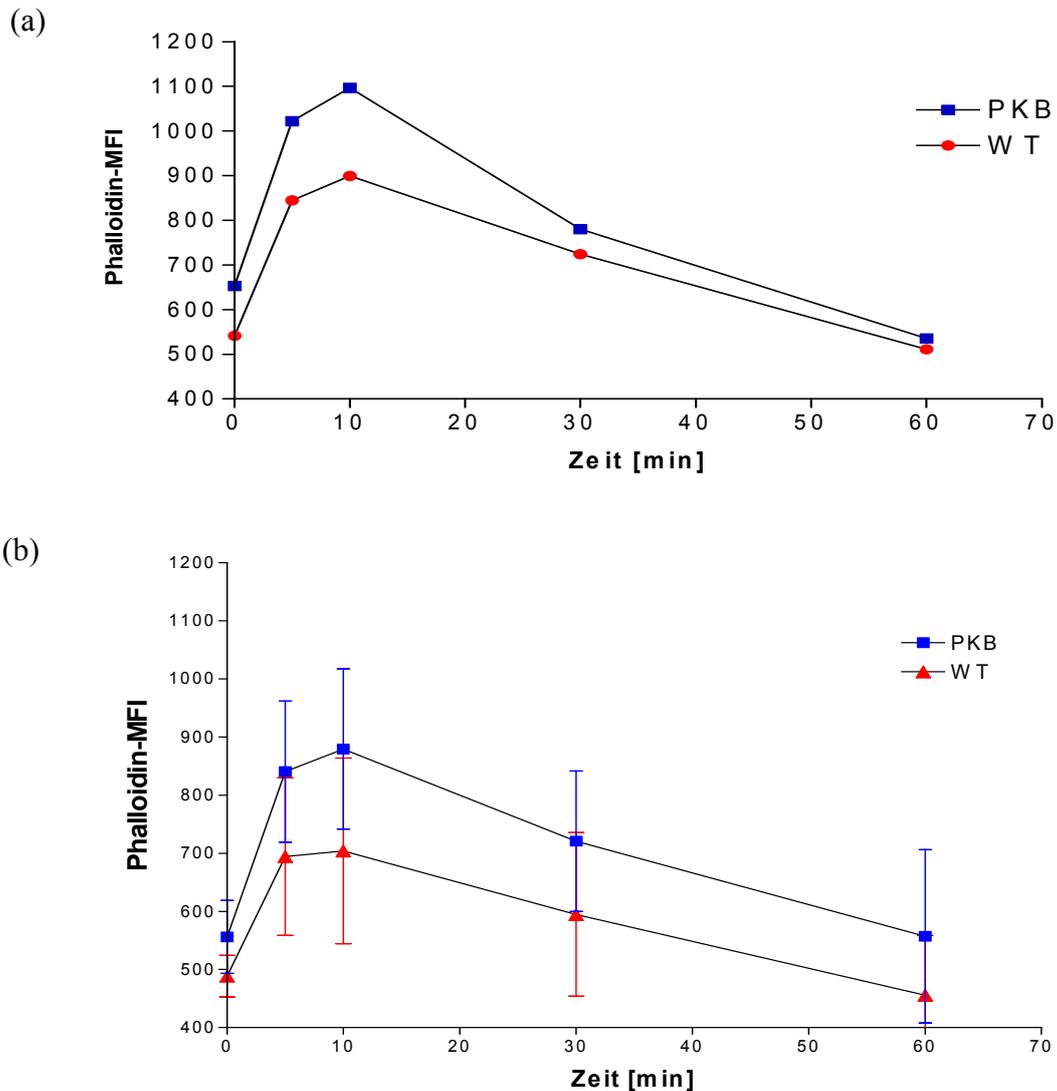


Abbildung 3.15 – F-Aktinpolymerisation isolierter CD4⁺ T-Zellen von PKBtg und Wildtyp-Mäusen. CD4⁺ T-Zellen wurden jeweils für 5, 10, 30 oder 60 min mit CD3-Ak [10 µg/ml] und Streptavidin [20 µg/µl] stimuliert und die F-Aktinpolymerisation mittels TRITC-Phalloidin durchflusszytometrisch bestimmt; a) der Graph zeigt die mittlere Phalloidin-FITC Fluoreszenz eines Experiments; b) Phalloidin-FITC Fluoreszenz von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 Wildtyp- und PKBtg Mäusen.

Die Abbildung 3.14 (a) zeigt einen Einzelversuch mit CD4⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten einer PKBtg und einer Wildtyp-Maus. In Abbildung 3.14 (b) sind die

Werte zur F-Aktinpolymerisation nach CD3-Stimulation von drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die hohen Standardabweichungen ergaben sich dabei aus der Tatsache, dass in den einzelnen Versuchen bereits die Werte von unstimulierten Zellen sehr unterschiedlich waren. Die Unterschiede zwischen WT- und PKBtg Zellen bezüglich des Verlaufs der Aktinpolymerisation waren aber in den drei Experimenten vergleichbar.

Die Versuche zur F-Aktinpolymerisation nach CD3-Stimulation bei CD4+ T-Zellen zeigten, dass bereits ohne Stimulation, d.h. zum Zeitpunkt 0, der Anteil von F-Aktin in PKBtg CD4+ T-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen auffällig erhöht ist. Nach CD3-Stimulation polymerisierte globuläres Aktin etwas stärker in den PKBtg CD4+ Zellen nach 5 und 10 Minuten; 30 Minuten nach Stimulation war der Anteil fibrillären Aktins durch Degradation bei persistierendem Unterschied zwischen PKBtg und Wildtyp-Zellen rückläufig, so dass 60 Minuten nach Stimulation die Menge von F-Aktin ungefähr auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt war.

Abb. 3.16 zeigt einen analogen Versuch für CD8+ T-Zellen aus Lymphknoten von WT- und PKBtg Mäusen.

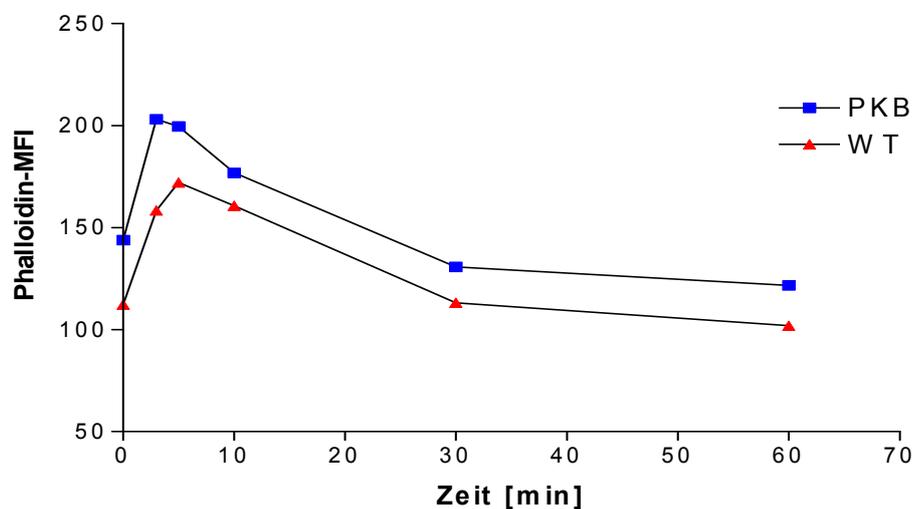


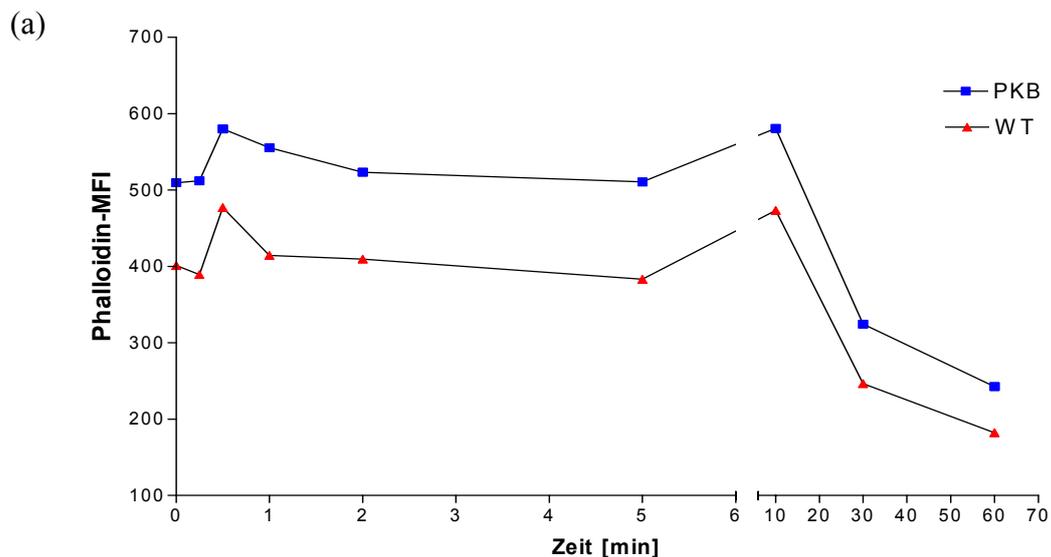
Abbildung 3.16 - F-Aktinpolymerisation in CD8+ T-Zellen aus PKBtg und Wildtyp-Mäusen nach Stimulation für 2, 5, 10, 30 und 60 min mit kreuzvernetztem CD3-Ak [10µg/ml].

Ebenso wie CD4⁺ T-Zellen, zeigten CD8⁺ T-Zellen aus PKBtg Mäusen bereits ohne Stimulation einen höheren Anteil fibrillären Aktins, der nach CD3-Stimulation erhalten blieb.

Somit führen PKB-Signale in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu einer Zunahme fibrillären Aktins in „ruhenden“ Zellen. Bei TCR/CD3-Stimulation wird innerhalb von 2-10 min in WT- und PKBtg T-Zellen eine starke Aktinpolymerisation induziert, die sodann abnimmt, so dass 60 min nach Stimulation die Menge an F-Aktin etwa mit dem Ausgangsniveau unstimulierter Zellen vergleichbar ist.

3.5.2 Aktinpolymerisation nach SDF-1 α -Stimulation

SDF-1 α ist ein Chemokin, das proinflammatorisch wirkt und Lymphozytenmigration induziert. Da Lymphozytenaktivierung mit einer Reorganisation des Zytoskeletts einhergeht, wurde der Einfluss von SDF-1 α auf die Aktinpolymerisation zwischen WT- und PKBtg-T-Zellen verglichen. Dazu wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen aus Lymphknoten isoliert und mit SDF-1 α [100 ng/ml] stimuliert. Die Menge an F-Aktin wurde in unstimulierten Zellen sowie 15, 30 und 60 sec, bzw. 2, 5, 10, 30 und 60 min nach Stimulation bestimmt.



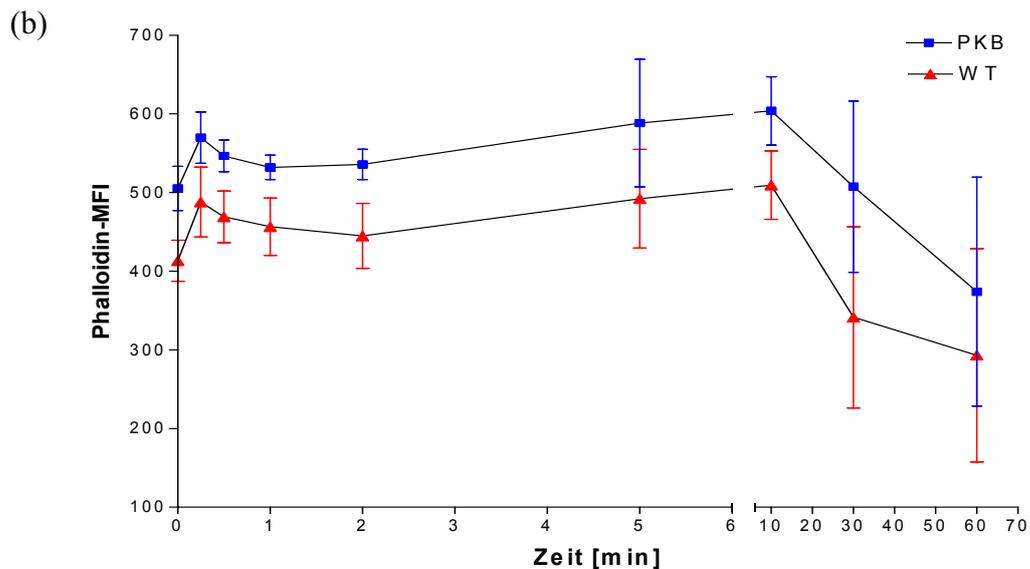


Abbildung 3.17 – F-Aktin in CD4+ T-Zellen aus Lymphknoten von PKBtg und WT-Mäusen. CD4+ T-Zellen wurden mit SDF-1 α [100 ng/ml] für 15, 30 und 60 sec, sowie 2, 5, 10, 30 und 60 min stimuliert und die Menge an F-Aktin mittels TRITC-Phalloidin Bindung an F-Aktin durchflusszytometrisch bestimmt. In Graph (a) ist ein Einzelversuch von gepoolten T-Zellen aus jeweils zwei WT- und PKBtg Mäusen dargestellt. In Graph (b) sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Entgegen der Stimulation mit CD3-Ak fanden die Aktinpolymerisationsprozesse nach SDF-1 α -Stimulation nicht in einem 2-5-minütigem Zeitrahmen ihr Maximum, sondern bereits innerhalb der ersten Minuten. Danach kam es rasch zu einer Abnahme an F-Aktin, allerdings wurde nach 10 min eine zweite Polymerisationsphase beobachtet. Nach 30 und vermehrt nach 60 min war die Menge an F-Aktin in beiden CD4+ T-Zelltypen deutlich geringer als in den unstimulierten Zellen. Auch in diesen Versuchen zeigte sich, dass PKBtg Zellen bereits in unstimuliertem Zustand ein höheres Niveau an F-Aktin aufweisen. Die SDF-1 α -induzierte Zunahme an F-Aktin war zwischen WT- und PKBtg Zellen allerdings vergleichbar.

Analog zu CD4+ T-Zellen wurde die SDF-1 α -induzierte Aktinpolymerisation in CD8+ T-Zellen von WT- und PKBtg Mäusen untersucht. Auch hier erfolgte eine verstärkte Aktinpolymerisation innerhalb der ersten Minute, wonach ein leichter Abfall an F-Aktin zu beobachten war. Im Gegensatz zu CD4+ T-Zellen blieb die Menge an F-Aktin bis 60 min in CD8+ WT-T-Zellen auf einem höheren Niveau als in unstimulierten Zellen. CD8+ PKBtg T-Zellen zeigten nach Stimulation eine geringere Aktinpolymerisation und nach 60 min war das F-Aktinniveau unstimulierter Zellen erreicht.

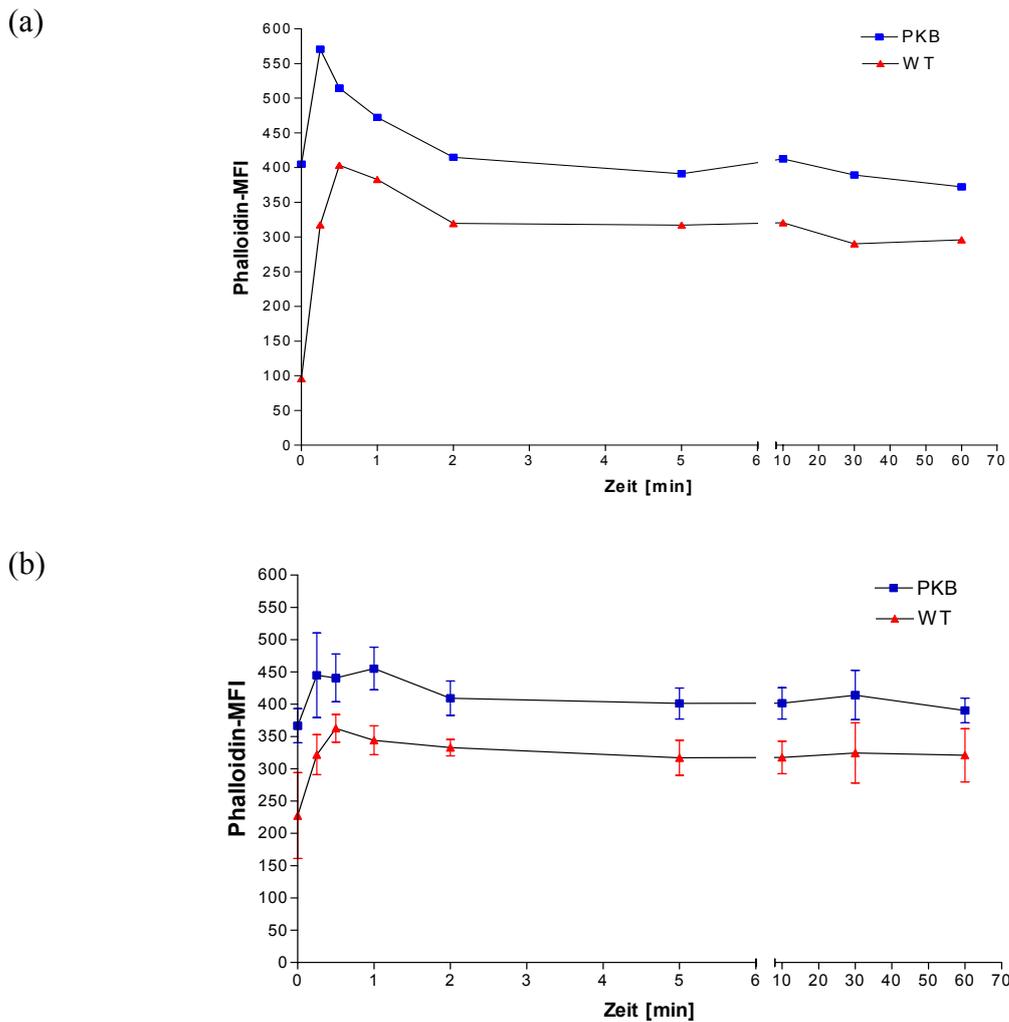


Abbildung 3.18 – F-Aktinpolymerisation in CD8+ T-Zellen von PKBtg und WT-Mäusen nach Stimulation mit SDF-1 α . In Graph (a) ist ein Einzelversuch von gepoolten CD8+ T-Zellen aus jeweils zwei WT- und PKBtg-Mäusen dargestellt. Graph (b) zeigt die Durchschnittswerte von drei unabhängigen Versuchen. Die Stimulation erfolgte mit SDF-1 α für 15, 30, 60 sec, bzw. 2, 5, 10, 30 und 60 min.

Zusammengefasst lässt sich aus den Versuchen zur F-Aktinpolymerisation ableiten, dass sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen von PKBtg-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Zellen bereits in unstimuliertem Zustand einen markant höheren Anteil an fibrillärem Aktin aufweisen. Nach CD3-Stimulation von CD4+ und CD8+ PKBtg- sowie WT-T-Zellen polymerisierte globuläres Aktin vermehrt zu fibrillärem Aktin mit einem Maximum bei etwa 5 min nach Stimulation. Zu späteren Zeitpunkten (30-60 min) kam es zu einer starken Abnahme an F-Aktin auf das Niveau unstimulierter Zellen. Nach SDF-1 α -Stimulation wurde das Maximum der Aktin-Polymerisation innerhalb der

ersten Minute nachgewiesen. In CD4+ T-Zellen fiel das Niveau an F-Aktin nach 60 min auf das Niveau nicht-stimulierter Zellen. Dies war auch für PKBtg CD8+ T-Zellen der Fall, nicht aber für WT-CD8+ T-Zellen, die ein höheres Niveau von F-Aktin aufrecht erhielten. Somit haben erhöhte PKB-Signale einen deutlichen Einfluss auf das Aktinskelett, da sie Veränderungen in der Menge an zytoplasmatischem F-Aktin bewirken.

3.6 Nachweis von F-Aktin durch Konfokalmikroskopie

Die vorherigen Versuche zeigten interessanterweise, dass PKBtg T-Zellen erhöhte Mengen an F-Aktin bereits in ruhenden Zellen aufweisen. Dies sollte durch konfokale Mikroskopie bestätigt werden. Dabei wurden CD8+ T-Zellen aus OT1-TCRtg Mäusen untersucht, die eine Population einheitlich antigenspezifischer T-Zellen darstellen, sowie CD8+ T-Zellen aus OT1-TCR / PKB doppeltransgenen Mäusen.

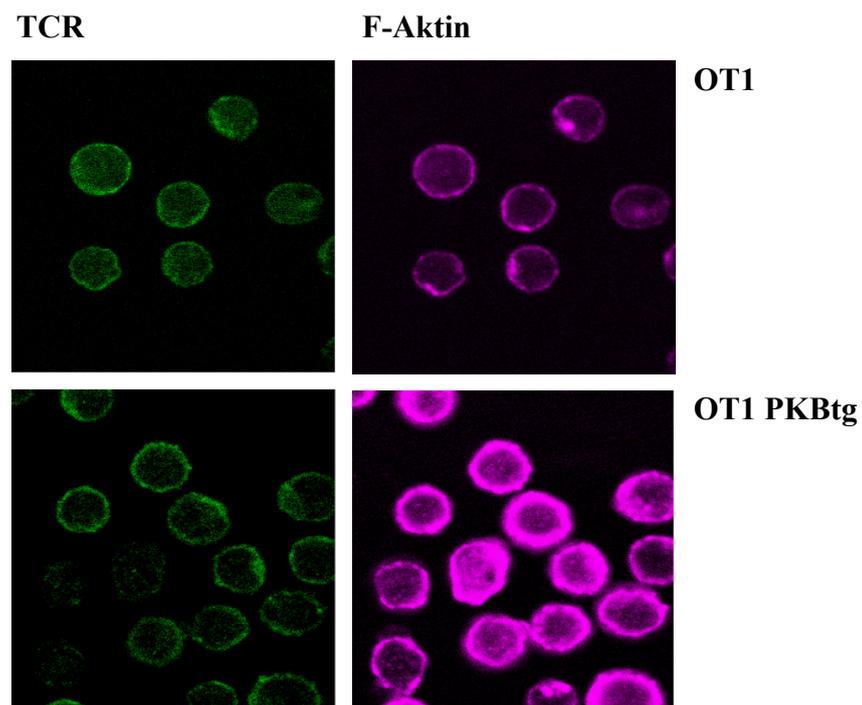


Abbildung 3.19 – Nachweis der TCR-Expression und von F-Aktin in unstimulierten CD8+ T-Zellen aus OT1- und OT1-PKBtg-Mäusen. Die Zellen wurden mit TCR-FITC-Ak und TRITC-Phalloidin gefärbt und am Konfokalmikroskop untersucht.

Abbildung 3.19 zeigt, dass die TCR-Expression in WT- und PKBtg T-Zellen ähnlich ist. Dagegen weisen OT1-PKBtg CD8+ T-Zellen einen deutlich breiteren „Ring“ an F-Aktin auf als die entsprechenden OT1+ CD8+ T-Zellen.

4 Diskussion

Eine zielgerichtete zelluläre Bewegung ist der Grundstein für Wachstum und Organogenese, für den Erhalt einer lebensnotwendigen Homöostase, für die Wundheilung und für die Funktion des Immunsystems. Außerdem hat die Zellmobilität entscheidenden Einfluss auf die Metastasierungsfähigkeit verschiedenster Tumoren. Eine zielgerichtete Beweglichkeit von Zellen (Migration) entlang eines Gradienten, z.B. eines Chemokins (Chemotaxis), wird einerseits durch die zielgerichtete Organisation von filamentösem F-Aktin, andererseits über Adhäsionsmoleküle, wie Integrine, gelenkt [117]. Der Einfluss von PKB auf die Zellmigration, auf Adhäsionsprozesse, die Invasion der ECM und die Metastasierungseigenschaften von Tumoren ist unvollständig geklärt. Dies liegt zum einen daran, dass unterschiedliche „Isoformen“ von PKB in unterschiedlichen Zelltypen und Tumorgeweben die Migration entweder hemmen oder verstärken. Darüber hinaus scheint es entscheidend zu sein, ob die entsprechenden PKB-„Isoformen“ in den jeweiligen Geweben homo- oder heterozygot exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse untersucht, die heterozygot eine konstitutiv-aktive Form der PKB α (myrPKB) in T- und auch in B-Zellen exprimieren. Versuche zur Migration von Thymozyten auf SDF-1 α zeigten, dass alle Thymozytenpopulationen PKBtg Tiere schlechter migrierten als die entsprechenden Wildtyp-Populationen. Von den vier (DN, DP, CD4⁺ und CD8⁺) Thymozytenpopulationen wiesen DP-Thymozyten sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den PKBtg Mäusen die besten Migrationseigenschaften auf. Sie wanderten im Mittel dreimal besser als die anderen Thymozytenpopulationen.

Periphere CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von PKBtg Tieren wiesen einen höheren Migrationsindex auf als CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Wildtyp-Mäusen. Sie migrierten nach SDF-1 α -Gabe im Mittel doppelt so gut wie die entsprechenden Wildtyp-Zellen. Dies trifft auch für CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen aus den Lymphknoten PKBtg Mäuse zu. Bei den Experimenten zur SDF-1 α -induzierten Migration von T- sowie B-Zellen aus Lymphknoten von CD28^{-/-} Mäusen zeigten CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen einen um etwa 1/3 reduzierten Migrationsindex im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen,

während CD8⁺ T-Zellen beider Mauslinien gleich gut migrierten. B-Zellen aus CD28^{-/-} Mäusen migrierten nach SDF-1 α -Gabe so gut wie B-Zellen aus Wildtyp-Mäusen. Dies ist zu erwarten, da B-Zellen kein CD28 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und daher durch CD28-Defizienz nicht betroffen sein sollten. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD28-Signale die T-Zellmigration auf SDF-1 α positiv beeinflussen. Da PKB u.a. über CD28-Ligation aktiviert wird, stellt sich für zukünftige Versuche die Frage, ob erhöhte PKB-Signale in CD28^{-/-} Mäusen ein Fehlen von CD28 bei der T-Zellmigration ersetzen kann. Zudem soll geklärt werden wie PKB auf molekularer Ebene die SDF-1 α -induzierten Signalprozesse beeinflusst.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion von Thymozyten und CD4⁺ T-Zellen aus PKBtg und Wildtyp-Tieren an Fibronectin (FN) und ICAM-1 (CD54) verglichen. Dabei wurden die Zellen mit PMA, SDF-1 α , CD3-Ak oder MnCl₂ stimuliert. ICAM-1 gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und wird u.a. auf aktiviertem Endothel exprimiert. Zu den Liganden gehören LFA-1 (CD11a / CD18) und Mac-1 (CD11b / CD18), die auf verschiedenen Lymphozyten exprimiert werden. Bei den Versuchen zur Adhäsion an FN und ICAM-1 zeigte sich, dass myrPKB die Adhäsion sowohl von Thymozyten als auch von CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten beeinflusst: CD4⁺ T-Zellen aus PKBtg Mäusen adhärirten schlechter, während PKBtg Thymozyten, die eine signifikant schlechtere SDF-1 α -induzierte Migration aufwiesen, besser als WT-Thymozyten an FN und ICAM-1 adhärirten.

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung diese Resultate für die adaptive Immunantwort und die durch PKB gesteigerte Entwicklung von Lymphomen haben könnte. Es ist anzunehmen, dass Migration und Adhäsion miteinander gekoppelt sind. Eine zu intensive Adhäsion, z.B. an das Endothel, reduziert die Fähigkeit zur Extravasation und Migration; andererseits ist ohne Adhäsion das Verlassen des Gefäßsystems und die anschließende Migration durch die ECM nicht möglich. In der Einleitung wurde der Phänotyp der einzelnen PKB-defizienten Mäuse dargestellt. Zum weiteren Verständnis obiger Fragestellung können Experimente mit PKBtg Mäusen aufgeführt werden, die genutzt wurden, um den Einfluss von PKB auf verschiedene zelluläre Signaltransduktionskaskaden zu ergründen.

Die Generierung transgener Mäuse, die durch N-terminale Myristylierung der PKB eine konstitutiv-aktive Form der PKB in T-Lymphozyten exprimieren, wie die in dieser

Arbeit verwendeten tg Mäuse, zeigten die Entwicklung vom Lymphomen; ein Großteil der Tiere starb zwischen dem 100. und 200. Lebenstag [95, 118, 119]. Genauere Untersuchungen der Thymi dieser Tiere zeigten, dass die Thymozyten größer als die nicht-transgener Mäuse waren, die Thymi sich in ihrer Größe aber nicht unterschieden, da die Gesamtzellzahl der Thymozyten der tg Tiere deutlich niedriger war [118]. Diskutiert wurden diese Ergebnisse dahingehend, dass Thymus-interne Mechanismen durch Einflussnahme auf die Zellproliferation die Organgröße regulieren. Isolierte Thymozyten PKBtg Mäuse zeigten in Kultur eine gesteigerte Zellzyklusprogression und erhöhte Zyklin D3-Spiegel [76]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch myrPKB die positive und negative Selektion von Thymozyten beeinflusst wird, und PKB über Lck, Erk, Cbl-c, und GSK3 die Aktivierung von T-Zellen beeinflusst [98]. Der Einfluss aktiver PKB auf die frühen Entwicklungsphasen von Thymozyten beruht auf deren Interaktion mit vom prä-TCR ausgehenden Signalprozessen sowie der Regulation der durch IFN- γ -induzierten Signaltransduktionskaskade in den DN – DP Differenzierungsstadien [97]. Es könnte daher sein, dass die beobachtete schlechtere Migration und stärkere Adhäsion PKBtg Thymozyten die Differenzierungs- und Selektionsprozesse der Thymozyten beeinflusst.

In peripheren T-Zellen ist PKB ein wichtiger Effektor der PI3K [120], die entscheidend die Migration über den Phospholipid-Signalweg steuert [121]. In *Dictyostelium*, einem Schleimpilz, konnte durch Deletion gezeigt werden, dass bei Fehlen von PI3K1,2,3 die Zellen langsamer migrieren und eine reduzierte Zellpolarität aufweisen [122]. Auch für PKB und PKBR-1 (*PKB related protein 1*; dem Protein fehlt die PH-Domäne und es ist konstitutiv an die Membran gebunden) konnte in *Dictyostelium* ein entscheidender Einfluss auf die Migration aufgezeigt werden: PKBR-1^{-/-} Zellen zeigten Defekte in der Morphogenese und PKB^{-/-} PKBR-1^{-/-} Zellen zeigten starke Defekte in der Chemotaxis und Zell-Polarität [123]. Weiterhin konnte in Brustkrebszelllinien für PKB α ein inhibierender Effekt auf die *in vitro* Migration und die Invasionseigenschaften nachgewiesen werden, der durch die Degradation und verminderte Expression von NFAT, bedingt durch dessen Ubiquitylierung und proteasomale Degradation [104] bedingt ist. Weiterhin wurde durch siRNA-Experimente zur Deletion von PKB α , nicht aber von PKB β , über eine gesteigerte Erk1- und Erk2-Aktivität, eine gesteigerte Migration nachgewiesen. Der genaue Zusammenhang zwischen Erk und Beeinflussung

der Migration wurde allerdings nicht geklärt [103]. Überexpression von PKB β in verschiedenen humanen Brust- und Ovarialzell-Karzinomen führte zu einer gesteigerten Expression von β 1-Integrinen und konsekutiv zu einer gesteigerten Metastasierung sowie Invasivität, Letzteres vermutlich bedingt durch die Fähigkeit, besser durch Kollagen IV dringen zu können [105]. Gleichwohl sind diese Effekte von PKB α und PKB β nicht ohne weiteres auf andere Zelltypen übertragbar. Versuche von Zhou [106] mit embryonalen Mausfibroblasten zeigten in der Migration umgekehrte Ergebnisse bezüglich der Rolle von PKB α und PKB β , wobei PKB α einen pro- und PKB β einen anti-migratorischen Einfluss hatte.

Neuere Arbeiten zeigen eine weitere interessante Regulation mittels eines *feed-back* Mechanismus über den bereits beschriebenen mTOR-Signalweg. Von mTOR gibt es zwei Komplexe: mTORC1 und mTORC2. Nach TCR-Aktivierung kommt es über PI3K zur Aktivierung von PKB – u.a. über eine Phosphorylierung durch mTORC2. Aktivierte PKB wiederum führt über mTORC1-Aktivierung zu einer gesteigerten Translation [56] und nimmt zudem Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung und -funktion [101]. Besonders interessant ist nun, dass mTORC1 über negative *feed-back* Mechanismen die Aktivierung von mTORC2 über PI3K hemmen kann [101, 124]. Durch eine konstitutiv aktivierte PKB, wie in unseren Versuchen verwandt, wäre dieser negative *feed-back* Mechanismus teils außer Kraft gesetzt und könnte zur gesteigerten Zellmobilität beitragen, zumal bekannt ist, dass PI3K- und TOR-Signalwege bei der Regulation der zellulären Polarität, der Organisation des Zytoskeletts und der Migration einen entscheidenden Einfluss haben [117].

Hinsichtlich der erhöhten Migration und verminderten Adhäsion peripherer T-Zellen PKBtg Mäuse, wäre es daher möglich, dass die adaptive Immunantwort durch verstärkt migrierende Zellen beschleunigt und effektiver ablaufen könnte. Im Gegenzug könnte eine verstärkte Zellmobilität, gekoppelt mit einer verminderten Zelladhäsion, zu einer vermehrten Dissemination transformierter oder autoreaktiver Zellen führen und so Erkrankungen fördern.

Eine verstärkte Expression eines oder mehrerer Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche von T- oder B-Zellen bedingt eine veränderte Adhäsion und Migration. In dieser Arbeit war die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a (α_L -Untereinheit des

Integrins LFA-1) und CD18 (β_2 -Integrin-Untereinheit, bzw. β -Kette der LFA-1-Familie), welche ICAM-1 binden, in PKBtg CD4⁺ T-Zellen, und deutlicher noch in PKBtg CD8⁺ T-Zellen, gegenüber den entsprechenden WT-Zellen deutlich gesteigert. Die Expression von CD49d, der α_4 -Integrin-Untereinheit, die zusammen mit CD29 an VCAM-1, MAdCAM-1, Fibronektin und Kollagen bindet, zeigte dagegen auf CD4⁺ T-Zellen keine Unterschiede und wies auf PKBtg CD8⁺ T-Zellen eine nur leicht schwächere Expression als auf den entsprechenden Wildtyp-Zellen auf. Die Adhäsion an ICAM-1 und FN war in den PKBtg Zellen dennoch reduziert. Das heißt, dass gesteigerte PKB-Signale *in vitro* zwar die Integrinexpression fördern, aber nicht zwangsläufig zu einer reduzierten Adhäsion führen.

Für eine zielgerichtete zelluläre Bewegung ist an erster Stelle der entsprechende Rezeptor für das jeweilige Chemokin maßgeblich. Nach Bindung des Chemokins werden über den Rezeptor mehrere Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die über eine Lokalisationsänderung zellulärer Komponenten in einer Bewegung der stimulierten Zelle enden. CXCR4 ist der spezifische Chemokinrezeptor für SDF-1 α/β . Aufgrund des deutlichen Einflusses erhöhter PKB-Signale auf die Migration von Thymozyten und peripheren Lymphozyten wurde die Expressionsstärke von CXCR4 auf den entsprechenden Zellpopulationen analysiert. Bei fehlenden Unterschieden in der CXCR4-Expression sollte das unterschiedliche Migrationsverhalten durch PKB-bedingte Veränderungen in der Signaltransduktionskaskade der CXCR4-Rezeptoren hervorgerufen werden. Untersuchungen zur CXCR4-Expression auf B-Zellen und Thymozyten ergaben in PKBtg Mäusen im Vergleich zur CXCR4-Expression auf WT-Zellen keine signifikanten Unterschiede. PKBtg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Milz und Lymphknoten wiesen eine leicht erhöhte, nicht signifikante Mehrexpression von CXCR4 auf. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass PKB über die durch CXCR4 aktivierte Signaltransduktionskaskade Einfluss auf die Migration nimmt, und nicht durch erhöhte CXCR4-Expression. Diese Mechanismen wären in zukünftigen Untersuchungen weiter abzuklären.

Migration sowie Adhäsion gehen mit einer Reorganisation des Zytoskeletts einher. Wichtig dabei ist die Polymerisation von globulärem (G-) zu fibrillärem / filamentösem (F-) Aktin. Interessanterweise zeigten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen von PKBtg Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen WT-Zellen bereits in unstimuliertem

Zustand einen höheren Anteil fibrillären Aktins. Auch in den Versuchen nach Stimulation mit SDF-1 α zeigte sich der erhöhte Spiegel von fibrillärem Aktin in PKBtg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die erhöhte Menge an F-Aktin in unstimulierten Zellen wurde durch Konfokalmikroskopie bestätigt. PKB nimmt damit Einfluss, auf die F-Aktinpolymerisation und könnte darüber zur gesteigerten Migration der PKBtg Zellen beitragen.

Für fortführende Arbeiten stellt sich die Frage, über welche Signalmoleküle PKB Veränderungen im Aufbau des F-Aktin-Skeletts bewirkt. Die sog. *leading edge* oder Spitze der Zelle weist eine erhöhte Konzentration an Enzymen auf, die Aktin aktivieren und modifizieren können [117]. Dazu gehören der Arp2/3-Komplex, WAVE/Scar, WASP und ADF/cofilin [125-127]. Es ist bekannt, dass PI3K über PKB und Aktin-modifizierende Enzyme die Migration beeinflusst. Bindung von SDF-1 α an den CXCR4-Rezeptor aktiviert über die heterotrimere G-Protein-UE $\beta\gamma$ PI3K, was zur Bildung von PIP3 führt. Membrangebundenes PIP3 rekrutiert weitere Signalmoleküle an die Zellmembran der *leading edge*, darunter PDK1, RhoGEFs (*guanine exchange factors* der Rho-GTPasen) und PKB [117]. PKB, aktiviert durch PDK1 und mTORC2, führt u.a. zur Phosphorylierung von Girdin [128], das zur F-Aktinpolymerisation beiträgt. Weitere wichtige Moleküle für die Aktinpolymerisation gehören zur Familie der Rho-GTPasen, darunter Rac und Cdc42. Rac führt zur WAVE/Scar-Aktivierung, Cdc42 zur WASP-Aktivierung. Ebenso kann Ras (*Rat sarcoma*), ein Proto-Onkogen über PI3K die Effektorproteine IQGAP (*IQ motif containing GTPase activating protein*), WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) und WAVE (*WASP family Verprolin-homologous protein*) aktivieren, die letztendlich die Aktin-Polymerisation induzieren [129]. Zusätzlich können Ras-Effektoren, wie der mTOR-Komplex2 (TORC2), PI3K-unabhängig über PKB als Effektorprotein Einfluss auf die Aktinpolymerisation nehmen [130]. Insgesamt sind die molekularen Prozesse PKB-bedingter Veränderungen im Aktinzytoskelett von T-Zellen weitgehend unverstanden. Die PKBtg Zellen stellen daher ein interessantes Modell für weiterführende molekulare/biochemische Untersuchungen dar.

5 Zusammenfassung

Proteinkinase B (PKB), eine zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase, reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, u.a. den Glukosemetabolismus, die Apoptose, die Transkription und Proliferation von Zellen. Da PKB zudem bei der Tumorinitiation- und -progression sowie der Metastasierung lymphatischer u.a. Tumoren eine zentrale Rolle spielt, ist es von großem Interesse, die Funktion der PKB in Lymphozyten genau zu verstehen, insbesondere hinsichtlich der pharmakologischen Einflussnahme auf die PKB-Aktivität und dadurch induzierter Veränderungen der Lymphozytenfunktionen.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, den Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die Migration und Adhäsion muriner Thymozyten und peripherer T- und B-Zellen zu untersuchen. Dabei wurden transgene (tg) Mäuse eingesetzt, die eine myristoylierte konstitutiv-aktive Form der PKB α (myrPKB) in T- und B-Zellen exprimieren. Sowohl T- als auch B-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten PKBtg Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine signifikant gesteigerte Migration nach Stimulation mit dem Chemokin SDF-1 α . Thymozyten verhielten sich interessanterweise entgegengesetzt, d.h. PKBtg Thymozyten migrierten schlechter als die entsprechenden Populationen von Wildtyp-Mäusen. Hinsichtlich der Adhäsion an Fibronectin sowie ICAM-1 zeigte sich ein inverses Bild zur Migration. Die schlechter migrierenden PKBtg Thymozyten adhärten nach PMA- und SDF-1 α -Stimulation signifikant besser an ICAM-1 und Fibronectin, während die besser migrierenden PKBtg CD4⁺ T-Zellen nach PMA- und SDF-1 α -Stimulation signifikant schlechter an ICAM-1 und Fibronectin adhärten als wildtypische CD4⁺ T-Zellen. Da wichtige kostimulatorische Signale der T-Zellaktivierung, wie CD28, auch zur PKB-Aktivierung führen, wurden CD28-defiziente Lymphozyten untersucht. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten CD28-defizienter Mäuse zeigten gegenüber wildtypischen T-Zellen ein vermindertes Migrationsverhalten, während B-Zellen CD28-defizienter Mäuse, wie zu erwarten, so gut wie wildtypische Zellen migrierten.

Analysen zur Expression des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 auf Thymozyten, T- und B-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen PKBtg und Wildtyp-Zellen. Die Expression der LFA1-Untereinheiten CD11a und CD18, die für die Bindung an

ICAM-1 verantwortlich sind, war in PKBtg CD4⁺ T-Zellen, und deutlicher noch in PKBtg CD8⁺ T-Zellen gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Zellen gesteigert, obwohl PKBtg Zellen schlechter an ICAM-1 adhärirten. Die Expression von CD49d, der α 4-Untereinheit des Fibronektin-Rezeptors, war in PKBtg CD4⁺ T-Zellen vergleichbar mit Wildtyp-Zellen und in PKBtg CD8⁺ T-Zellen leicht reduziert. Die beobachteten Unterschiede in der Migration und Adhäsion zwischen Wildtyp- und PKBtg Zellen resultieren somit aus PKB-vermittelten Veränderungen in den von den entsprechenden Rezeptoren initiierten Signaltransduktionskaskaden.

Durchflusszytometrische Untersuchungen und konfokal-mikroskopische Analysen zeigten ferner, dass aktive PKB das Aktinskelett beeinflusst. Der Anteil fibrillären Aktins (F-Aktin), insbesondere in unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, war im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in den PKBtg-Zellen deutlich erhöht. Die nach CD3- und SDF-1 α -Stimulation induzierte F-Aktinpolymerisation zeigte in Wildtyp- und PKBtg T-Zellen ähnliche Kinetiken.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass aktive PKB die SDF-1 α -induzierte Migration sowie die Adhäsion an ICAM-1 und Fibronektin von Lymphozyten und Thymozyten *in vitro* entscheidend beeinflusst. Ferner fördert aktive PKB die Ausbildung von F-Aktin in T-Zellen. Es ist daher anzunehmen, dass PKB-bedingte Veränderungen in der Migration und Adhäsion von Lymphozyten *in vivo* bedeutende Auswirkungen auf die Immunantwort haben könnten: sowohl in positiver Weise - im Sinne einer verstärkten Immunabwehr durch gesteigerte Zellmotilität – als auch in negativer Weise, z.B. durch erhöhte Mobilität transformierter Lymphozyten. Zukünftige Untersuchungen sollten die molekularen Mechanismen beleuchten, über die PKB Migration, Adhäsion und Aktinpolymerisation beeinflusst, auch in Hinblick darauf, durch gezielte pharmakologische Aktivierung oder Inhibition der PKB-Signalkaskade die Immunantwort bei Erkrankungen und Metastasierungsprozessen zu beeinflussen.

Summary

Protein kinase B (PKB) is a cytoplasmic serine/threonine-kinase which regulates several cellular processes, including cell cycle, glucose metabolism, apoptosis or transcription. Since PKB is involved in tumor initiation/progression including leukemia and promotes the metastasis formation, it is of great interest to understand PKB's effects on T cell function.

The influence of active PKB on migration and adhesion of murine thymocytes and peripheral lymphocytes was investigated in this study. As a model system transgenic (tg) mice were used expressing a constitutively active form of PKB α (myrPKB) in T and B cells. Both, T and B cells from spleen and lymph node of myrPKBtg mice showed significantly increased migration after SDF-1 α stimulation. Interestingly, myrPKBtg thymocytes showed the opposite behaviour – they migrated less well than thymocytes from wildtype (wt) mice. In terms of adhesion, myrPKBtg thymocytes adhered significantly better to ICAM-1 and fibronectin after PMA and SDF-1 α stimulation than wt thymocytes. In contrast, myrPKBtg CD4⁺ T cells from lymph nodes showed reduced adhesion to ICAM-1 and fibronectin after PMA and SDF-1 α stimulation compared to wt CD4⁺ cells. Co-stimulatory signals for T cell activation and remodeling/polymerization of the actin skeleton are provided via accessory receptors such as CD28. CD4⁺ T cells from lymph node and spleen, as well as CD8⁺ T cells from spleen of CD28 k.o. mice showed diminished migration in comparison to wt T cells, whereas B cells from CD28 k.o. mice migrated as well as wt B cells.

Flow cytometric analysis revealed no significant difference in the expression of the SDF-1 α receptor CXCR4 on wt and myrPKBtg T cells and thymocytes. Expression of the LFA-1-subunits CD11a and CD18, important for binding to ICAM-1 was increased on myrPKBtg CD4⁺ and even more on myrPKBtg CD8⁺ T cells. In contrast CD49d expression, involved in binding to fibronectin, was similar on wt and myrPKBtg cells. Thus, the observed differences in migration and adhesion between wt and myrPKBtg cells seem to result from PKB-initiated changes in intracellular signaling cascades.

Furthermore, confocal microscopy and flow cytometric analyses revealed that elevated PKB-signals influence the actin skeleton. The amount of fibrillar (F-) actin, especially

in unstimulated T cells, was strongly increased in myrPKBtg T cells compared to wt cells.

Altogether, the results of this work strongly suggest that PKB is an important regulator of migration and adhesion processes of thymocytes and peripheral lymphocytes *in vitro*. *In vivo*, PKB's influence on migration and adhesive processes could present a double-edged sword: on one hand eliciting positive consequences in terms of enhanced immune defense by increased cell motility, on the other hand evoking negative effects due to enhanced adhesion and increased migration of transformed or autoreactive cells. Thus, our data provide further evidence, that PKB is an important clinical target whose pharmaceutical activation/inhibition would strongly affect the immune response in infectious and autoimmune diseases as well as in the process of metastasis.

6 Literaturverzeichnis

1. Lind, E.F., et al., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
2. Ceredig, R. and T. Rolink, *A positive look at double-negative thymocytes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 888-97.
3. Godfrey, D.I., et al., *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4244-52.
4. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
5. Shinkai, Y., et al., *Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes*. Science, 1993. **259**(5096): p. 822-5.
6. von Boehmer, H. and H.J. Fehling, *Structure and function of the pre-T cell receptor*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 433-52.
7. von Boehmer, H., H.S. Teh, and P. Kisielow, *The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful*. Immunol Today, 1989. **10**(2): p. 57-61.
8. Sprent, J. and H. Kishimoto, *The thymus and negative selection*. Immunol Rev, 2002. **185**: p. 126-35.
9. Bommhardt, U., et al., *Molecular and cellular mechanisms of T cell development*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(3): p. 263-80.
10. Abbas, A., *Cellular and Molecular Immunology (5th edition)*. 2003, Philadelphia: Saunders.
11. Gobel, T.W. and L. Bolliger, *Evolution of the T cell receptor signal transduction units*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **248**: p. 303-20.
12. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7990-8000.
13. Neumeister, E.N., et al., *Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3171-8.
14. Yoshida, H., et al., *The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 115-24.
15. Ward, S.G., C.H. June, and D. Olive, *PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation?* Immunol Today, 1996. **17**(4): p. 187-97.
16. Ward, S.G. and D.A. Cantrell, *Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 332-8.
17. Muller, W.A. and G.J. Randolph, *Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 698-704.

18. Wein, M., et al., *Comparison of human eosinophil and neutrophil ligands for P-selectin: ligands for P-selectin differ from those for E-selectin*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(3): p. 315-9.
19. Barthel, S.R., et al., *Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(11): p. 1473-91.
20. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
21. Menasche, G., et al., *Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 82-91.
22. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
23. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
24. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
25. Murphy, P.M., *International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 227-9.
26. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
27. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
28. Hesselgesser, J., et al., *Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 877-83.
29. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
30. Liang, Z., et al., *CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(3): p. 716-22.
31. Lusso, P., *HIV and the chemokine system: 10 years later*. Embo J, 2006. **25**(3): p. 447-56.
32. Agrawal, L., et al., *Anti-HIV therapy: Current and future directions*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(16): p. 2031-55.
33. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1761-7.
34. Zlotnik, A., *Chemokines and cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(9): p. 2026-9.
35. Kucia, M., et al., *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion*. J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 233-45.
36. Rehman, A.O. and C.Y. Wang, *SDF-1alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-kappaB*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 19888-94.

37. Huang, Y.C., et al., *Stromal cell-derived factor-1 enhances motility and integrin up-regulation through CXCR4, ERK and NF-kappaB-dependent pathway in human lung cancer cells*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **74**(12): p. 1702-12.
38. Volinsky, N., A. Gantman, and D. Yablonski, *A Pak- and Pix-dependent branch of the SDF-1alpha signalling pathway mediates T cell chemotaxis across restrictive barriers*. *Biochem J*, 2006. **397**(1): p. 213-22.
39. Le, Y., et al., *CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2582-90.
40. Staal, S.P., J.W. Hartley, and W.P. Rowe, *Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(7): p. 3065-7.
41. Staal, S.P., *Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
42. Staal, S.P., et al., *The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32*. *Genomics*, 1988. **2**(1): p. 96-8.
43. Bertness, V.L., et al., *Characterization of the breakpoint of a t(14;14)(q11.2;q32) from the leukemic cells of a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990. **44**(1): p. 47-54.
44. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(19): p. 9267-71.
45. Miwa, W., et al., *Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **225**(3): p. 968-74.
46. Bellacosa, A., et al., *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting*. *Adv Cancer Res*, 2005. **94**: p. 29-86.
47. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(8): p. 606-19.
48. Martelli, A.M., et al., *Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2006. **20**(6): p. 911-28.
49. Dillon, R.L., D.E. White, and W.J. Muller, *The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(9): p. 1338-45.
50. Jones, P.F., et al., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4171-5.
51. Coffey, P.J., J. Jin, and J.R. Woodgett, *Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation*. *Biochem J*, 1998. **335**(Pt 1): p. 1-13.
52. Haslam, R.J., H.B. Koide, and B.A. Hemmings, *Pleckstrin domain homology*. *Nature*, 1993. **363**(6427): p. 309-10.

53. Harlan, J.E., et al., *Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. *Biochemistry*, 1995. **34**(31): p. 9859-64.
54. Oak, J.S., et al., *Lymphocyte cell motility: the twisting, turning tale of phosphoinositide 3-kinase*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 1109-13.
55. Okkenhaug, K., K. Ali, and B. Vanhaesebroeck, *Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(2): p. 80-7.
56. Restuccia, D.F. and B.A. Hemmings, *Cell signaling. Blocking Akt-ivity*. *Science*, 2009. **325**(5944): p. 1083-4.
57. Yang, W.L., et al., *The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation*. *Science*, 2009. **325**(5944): p. 1134-8.
58. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 179-83.
59. Hresko, R.C. and M. Mueckler, *mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40406-16.
60. Zeng, Z., et al., *Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3509-12.
61. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
62. Bozulic, L., et al., *PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival*. *Mol Cell*, 2008. **30**(2): p. 203-13.
63. Hanada, M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1697**(1-2): p. 3-16.
64. Remy, I. and S.W. Michnick, *Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(4): p. 1493-504.
65. Obata, T., et al., *Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36108-15.
66. Lawlor, M.A. and D.R. Alessi, *PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?* *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 16): p. 2903-10.
67. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. *FEBS Lett*, 1996. **399**(3): p. 333-8.
68. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *PKB/AKT: functional insights from genetic models*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(10): p. 760-8.
69. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
70. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 38349-52.

71. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
72. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
73. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 197-208.
74. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
75. Peng, X.D., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1352-65.
76. Yang, Z.Z., et al., *Physiological functions of protein kinase B/Akt*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 2): p. 350-4.
77. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
78. Cross, D.A., et al., *Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue*. FEBS Lett, 1997. **406**(1-2): p. 211-5.
79. Kohn, A.D., et al., *Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11937-43.
80. Kohn, A.D., et al., *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31372-8.
81. Peyrollier, K., et al., *A role for the actin cytoskeleton in the hormonal and growth-factor-mediated activation of protein kinase B*. Biochem J, 2000. **352 Pt 3**: p. 617-22.
82. Downward, J., *How BAD phosphorylation is good for survival*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. E33-5.
83. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 177-82.
84. Huang, W., et al., *Transcriptional up-regulation and activation of initiating caspases in experimental glaucoma*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 673-81.
85. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [see comments]*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
86. Barthel, A. and L.O. Klotz, *Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress*. Biol Chem, 2005. **386**(3): p. 207-16.
87. Kim, A.H., et al., *Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 893-901.
88. Somanath, P.R., et al., *Akt1 in endothelial cell and angiogenesis*. Cell Cycle, 2006. **5**(5): p. 512-8.

89. Chen, J., et al., *Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1188-96.
90. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
91. Gordan, J.D. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(1): p. 71-7.
92. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
93. Axelson, H., et al., *Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 554-63.
94. Ackah, E., et al., *Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2119-27.
95. Jones, R.G., et al., *Protein Kinase B Regulates T Lymphocyte Survival, Nuclear Factor kappaB Activation, and Bcl-X(L) Levels In Vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1721-1734.
96. Parsons, M.J., et al., *Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cell homeostasis and promotes inflammation*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 42-8.
97. Fayard, E., et al., *Deletion of PKBalpha/Akt1 affects thymic development*. PLoS ONE, 2007. **2**(10): p. e992.
98. Na, S.Y., et al., *Constitutively active protein kinase B enhances Lck and Erk activities and influences thymocyte selection and activation*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1285-96.
99. Patra, A.K., S.Y. Na, and U. Bommhardt, *Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4812-20.
100. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
101. Bruno, L. and M. Merkenschlager, *Directing T cell differentiation and function with small molecule inhibitors*. Cell Cycle, 2008. **7**(15): p. 2296-8.
102. Pierau, M., et al., *Protein kinase B/Akt signals impair Th17 differentiation and support natural regulatory T cell function and induced regulatory T cell formation*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6124-34.
103. Irie, H.Y., et al., *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 1023-34.
104. Yoeli-Lerner, M., et al., *Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT*. Mol Cell, 2005. **20**(4): p. 539-50.
105. Arboleda, M.J., et al., *Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 196-206.
106. Zhou, G.L., et al., *Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 36443-53.

107. Webb, L.M., et al., *Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2783-7.
108. Cornish, G.H., L.V. Sinclair, and D.A. Cantrell, *Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15*. Blood, 2006. **108**(2): p. 600-8.
109. Okkenhaug, K., et al., *Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice*. Science, 2002. **297**(5583): p. 1031-4.
110. Fabre, S., et al., *FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 2980-9.
111. Kerdiles, Y.M., et al., *Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 176-84.
112. Sinclair, L.V., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 513-21.
113. Waugh, C., et al., *Phosphoinositide (3,4,5)-triphosphate binding to phosphoinositide-dependent kinase 1 regulates a protein kinase B/Akt signaling threshold that dictates T-cell migration, not proliferation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(21): p. 5952-62.
114. Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Biochemie*. Vol. 3. 2001: Springer. 328-329.
115. Lynam, E.B., et al., *Enhanced aggregation of human neutrophils by MnCl₂ or DTT differentiates the roles of L-selectin and beta 2-integrins*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(3): p. 356-64.
116. Evans, R., et al., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.
117. Sasaki, A.T. and R.A. Firtel, *Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(9-10): p. 873-95.
118. Malstrom, S., et al., *Tumor induction by an Lck-MyrAkt transgene is delayed by mechanisms controlling the size of the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 14967-72.
119. Rathmell, J.C., et al., *Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma*. Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2223-32.
120. Kane, L.P., J. Lin, and A. Weiss, *It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation*. Trends Immunol, 2002. **23**(8): p. 413-20.
121. Kolsch, V., P.G. Charest, and R.A. Firtel, *The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 5): p. 551-9.
122. Takeda, K., et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinases in chemotaxis in Dictyostelium*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11874-84.
123. Meili, R., C. Ellsworth, and R.A. Firtel, *A novel Akt/PKB-related kinase is essential for morphogenesis in Dictyostelium*. Curr Biol, 2000. **10**(12): p. 708-17.
124. Bhaskar, P.T. and N. Hay, *The two TORCs and Akt*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 487-502.

125. Mullins, R.D., W.F. Stafford, and T.D. Pollard, *Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from Acanthamoeba*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 331-43.
126. Nozumi, M., et al., *Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 239-46.
127. Myers, S.A., L.R. Leeper, and C.Y. Chung, *WASP-interacting protein is important for actin filament elongation and prompt pseudopod formation in response to a dynamic chemoattractant gradient*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(10): p. 4564-75.
128. Enomoto, A., et al., *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 389-402.
129. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
130. Lee, S., et al., *TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in Dictyostelium*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4572-83.

7 Anhang

7.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>Chemikalien</i>	<i>Firma</i>
Aceton	AppliChem
Agarose	Roth / Invitrogen
anti-FITC microbeads	Miltenyi Biotec
Bromphenolblau	Roth
BSA Fraktion V	Roth
Calciumchlorid	Roth
Chloroform	Roth
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma / Roth
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas
EDTA-disodium	Serva
Eisessig / Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol (99%, entwässert)	Zentralapotheke der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Formaldehyd (37%)	Sigma
HEPES	Sigma
Isopropanol	Zentralapotheke
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Mangan(II)chlorid - Tetrahydrat	Sigma
Natriumacetat	Roth

Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumfluorid	Roth / Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Saponin	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Roth
Tris	AppliChem / Roth
Triton X-100	Roth
Trizol	Invitrogen
Trypanblau (0,4%)	Gibco BRL
Xylen Cyanol FF	Roth
β -Mercaptoethanol	Gibco BRL

<i>Spezielle Reagenzien</i>	<i>Firma</i>
Fibronektin (rein) – aus humanem Plasma	Roche Diagnostics
Phalloidin-TRITC (aus Amanita phalloides)	Sigma-Aldrich / Fluka

<i>Enzyme für die PCR</i>	<i>Firma</i>
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Sigma
Protease Inhibitor Tabletten / „complete mini“	Roche

<i>PCR-Reagenzien</i>	<i>Firma</i>
dNTPs - 100 mM	Roth
Taq DNA und GoTaq [®] Flexi DNA Polymerase (Kit inklusive 10x / 5x PCR-Puffer und MgCl ₂)	Promega, Amersham

<i>PCR-Primer</i>
Die für die PKB- und CD28 k.o.- PCR verwendeten Primer sind im Methodenteil im PCR-Kapitel aufgelistet.

7.2 Molekulargewichtsmarker

<u>DNA Größenmarker</u>	
• 100 bp-DNA Leiter	Roth
• GeneRuler [™] 1 kb DNA Leiter (0,5 mg DNA/ml)	MBI Fermentas
• 6x "loading dye solution"	MBI Fermentas

7.3 Antikörper

<i>Antikörper für die T-Zellisolation</i>				
<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus NK1.1 (NKR-P1B, NKR-P1C)	NK-1.1	PK136	IgG _{2a} , κ	BD Biosciences
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus CD4 (L3T4)	CD4	GK1.5	IgG _{2b} , κ	BD Biosciences
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus CD8α (Ly-2)	CD8	53-6.7	IgG _{2a} , κ	BD Biosciences
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus I-A/I-E (MHC II)	BALB/c Maus Langhanszellen	2G9	IgG _{2a} , κ	BD Biosciences

- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus CD11b	(Integrin α_M -Kette, Mac-1 α -Kette)	M1/70	IgG _{2b} , κ	BD Biosciences
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus Ter-119 (Ly-76)	Fetale Mausleberzellen	Ter-119	IgG _{2b} , κ	BD Biosciences
- Biotin-gekoppelter Ratte-anti-Maus CD45R/B220	B220+ Zellen	RA3-&B2	IgG _{2a} , κ	BD Biosciences
- Ziege-anti-Maus IgG (H+L)		70966	IgG	Dianova, Jackson
- Maus-anti-Ratte IgG (H+L)		68376	IgG	Dianova, Jackson

Antikörper für die FACS-Färbung

<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>	<i>Typ</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
- Hamster-anti-Maus CD3 ϵ	CD3 ϵ	FITC	145-2C11	BD Biosciences
- Ratte-anti-Maus CD4	CD4	FITC, PE, Biotin	GK1.5	BD Biosciences
- Ratte-anti-Maus CD5	CD5	Biotin	53-7.3	BD Biosciences
- Ratte-anti-Maus CD8 α	CD8 α	FITC, PE, Biotin	53-6.7	BD Biosciences
- Ratte-anti-Maus CD45R / B220	CD45R (B220)	FITC, Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences

CXCR-4 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>	<i>Typ</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
- Ratte-anti-Maus CD184	CXCR4 (CD184)	PE	2B11 Lot #: 49411 Lot #: 60570	BD Biosciences

<i>Integrin-Antikörper</i>				
<i>Antikörper</i>	<i>Rezeptor bindet</i>	<i>Typ</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
- <u>Ratte-anti-Maus CD11a</u> (LFA-1 α -Kette ; α_1 -Integrin-Untereinheit)	• ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50)	Biotin	M17/4	BD Biosciences
- <u>Ratte-anti-Maus CD18</u> (β -Kette der LFA-1- Familie; β_2 -Integrin-Untereinheit)	• ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50)	Biotin	M18/2	BD Biosciences
- <u>Ratte-anti-Maus CD49d</u> (α_4 -Integrin-Untereinheit)	• VCAM-1, MAdCAM-1, Fibronektin Kollagen	Biotin	R1-2	BD Biosciences

<i>Weitere Antikörper und Streptavidin</i>	<i>Hersteller</i>
- Rekombinante Maus ICAM-1 / Fc Chimäre	R&D Systems
- „AffiniPure“ Ziege anti-human IgG, Fc	Dianova / Jackson ImmunoResearch
- Ziege F(ab) ₂ anti-Maus IgM	Caltag Laboratories
- Streptavidin – PE / Cy5	BD Biosciences

7.4 Zellstimulantien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Mangan(II)chlorid	Aldrich
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat)	Sigma
rekombinantes murines SDF-1 α (CXCL-12)	Tebu-bio / PeproTech Inc.
CD3 ϵ -Antikörper (145-2C11)	BD Biosciences

7.5 Kits

B-Zell-Isolation-Kit (Maus)	Miltenyi Biotec
CD4+ T-Zell-Isolation-Kit (Maus)	Miltenyi Biotec

7.6 Geräte und Instrumente

FACS Calibur	BD Biosciences
Konfokalmikroskop LEICA TCS SP2	Leica
Thermo-Cycler (PCR)	
<ul style="list-style-type: none"> • T₃₀₀₀ Thermocycler 	Biometra
<ul style="list-style-type: none"> • PTC-200 Peltier Thermal Cycler 	MJ Research
Zentrifugen:	
<ul style="list-style-type: none"> • Multifuge 3 S-R 	Heraeus
<ul style="list-style-type: none"> • Mikrozentrifuge 200 R 	Hettich – Zentrifugen
<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge 5415 D 	Eppendorf
37°C Wasserbad GFL-1083	GFL
Elektrophoresenetzgerät – E835 (300V – 500 mA)	Consort
Brutschrank CB 210 (37°C, CO ₂)	Binder
AutoMACS - Gerät	Miltenyi Biotec
Sterilbank – Hera safe	Heraeus
Vortexer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Thermomixer 5436	Eppendorf
Heiz-/Rührplatte	Yellow line MSH basic
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Gelkammern, Kämme	Biorad

7.7 Plastikmaterialien

6-, 12-, 24- und 96- <i>Well</i> -Platten	Greiner
1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Research
15 ml und 50 ml Röhren	Greiner
6,5 mm <i>Transwell</i> [®] mit 3,0 µm Porendurchmesser Polycarbonatmembran <i>Insert</i> , Modell # 3415	Corning B.V. Life Sciences
FACS-Röhren	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf Research
Spritzen (5 ml)	BD Discardit [™] II
Zellsiebe (<i>Cell Strainer</i>) 70 µm Nylon	BD Falcon [™]
<i>Dispenser</i> -Pipetten (1, 5, 10 und 25 ml)	TPP / Falcon
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging

10 Publikationsverzeichnis

Originalarbeit

- Mandy Pierau, Swen Engelmann, Dirk Reinhold, **Thabo Lapp**, Burkhard Schraven, and Ursula H. Bommhardt. „*Protein Kinase B/Akt Signals Impair Th17 Differentiation and Support nTreg Function and iTreg Formation*”. *Journal of Immunology* 2009; 183 (10): 6124-6134. Epub 2009 Oct 19.

Poster

- Mandy Pierau, Swen Engelmann, Thomas Drewes, **Thabo Lapp**, Dirk Reinhold, Burkhard Schraven, and Ursula Bommhardt. „*Cross-talk between PKB/Akt and TGF β signalling in T cell activation*“. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI) 05.-08.09.2007, Heidelberg, Deutschland.
- Ceren Ergorul, Arjun Ray, **Benjamin Thabo Lapp**, Dan Yi Wang, Wei Huang, Cynthia L. Grosskreutz (Department of Ophthalmology, Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA). “*Endogenous Elevation of HIF1- α Levels Does Not Lead to Neovascularization in the Glaucomatous Retina*”. Annual ARVO 2008 Meeting 27.04.-01.05.2008, Fort Lauderdale, FL, USA.