

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Schraven

Die Rolle von SLP-76 bei der T-Zellrezeptor-vermittelten
Aktivierung des Integrins LFA-1 in T-Zellen

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 | Jessica Birkigt (geb. Horn) |
| aus | Schönebeck |
| Magdeburg | 2020 |

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Birkigt, Jessica:

Die Rolle von SLP-76 bei der T-Zellrezeptor-vermittelten Aktivierung des Integrins LFA-1 in T-Zellen

- 2020. - 100 Blatt, 18 Abbildungen, 14 Tabellen, 5 Anlagen

Kurzreferat

T-Zellen spielen die Hauptrolle bei der adaptiven Immunantwort. Ihre Fähigkeit zur Adhäsion ist entscheidend für die Induktion einer Immunantwort. Änderungen der Adhäsionseigenschaften von T-Zellen werden über die TZR (T-Zellrezeptor) -vermittelte Aktivierung des Integrins LFA-1 (*Leukocyte function-associated molecule 1*) reguliert. Obwohl die Bedeutung des zytosolischen Adapterproteins SLP-76 (*SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa*) für die T-Zell-Aktivierung, -Differenzierung und -Proliferation eindrücklich in der Literatur dokumentiert wurde, ist die Rolle dieses Adapterproteins bei TZR-induzierten Signalwegen, die zur Aktivierung von LFA-1 führen, noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wird beschrieben, dass mit Hilfe der RNAi (RNA-Interferenz) die Expression von endogenem SLP-76 in Jurkat T-Zellen reduziert werden kann. Die Reduktion der SLP-76-Expression in Jurkat T-Zellen resultiert in einer verminderten Aktivierung des Integrins LFA-1 nach Stimulation des TZRs. Die reduzierte LFA-1-Aktivierung geht einher mit Defekten in der T-Zelladhäsion an ICAM-1 (*Intercellular cell adhesion molecule 1*), dem Liganden von LFA-1, und mit Störungen der Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen. Bei den anschließenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von SLP-76 für die TZR-vermittelte Aktivierung der GTPase Rap1 (*Ras-related protein 1*) erforderlich ist. SLP-76 interagiert mit dem ADAP/SKAP55/RIAM (*Adhesion and degranulation-promoting adapter protein/Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa/Rap1-GTP-interacting adapter molecule*) -Modul und ist verantwortlich für die Rekrutierung dieses Moduls an die Plasmamembran. Bei einer reduzierten SLP-76-Expression wird die Polymerisation von F (filamentösem) -Aktin und die Aktivierung der GTPase Rac nach Stimulation des TZRs inhibiert. Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit von SLP-76 an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist, die die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 beeinflussen können.

Schlüsselwörter:

SLP-76, LFA-1, Rap1, ADAP/SKAP55/RIAM-Modul, Rac

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Dokumentationsblatt | I |
| Inhaltsverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Immunsystem..... | 1 |
| 1.2 T-Zellen | 2 |
| 1.2.1 Die Aktivierung der T-Zellen..... | 3 |
| 1.3 Integrine | 6 |
| 1.3.1 Die Aktivierung von LFA-1 in T-Zellen | 7 |
| 1.3.2 TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 | 8 |
| 1.3.3 Leukozyten-Adhäsionsdefekt | 10 |
| 1.4 Adapterproteine | 11 |
| 1.4.1 Das zytosolische Adapterprotein SLP-76..... | 12 |
| 1.5 RNA-Interferenz | 14 |
| 1.6 Ziele | 15 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Material | 17 |
| 2.1.1 Laborgeräte..... | 17 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 2.1.3 Reagenzien..... | 17 |
| 2.1.4. Kits | 17 |
| 2.1.5 Rekombinante Proteine | 17 |
| 2.1.6 Größenstandards | 18 |
| 2.1.7 Bakterienstamm..... | 18 |
| 2.1.8 Eukaryotische Zelllinien | 18 |
| 2.1.9 Vektoren | 18 |
| 2.1.10 shRNA-Konstrukte..... | 19 |
| 2.1.11 Antikörper..... | 19 |
| 2.1.11.1 Primäre Antikörper | 19 |
| 2.1.11.2 Sekundäre Antikörper | 19 |
| 2.1.12 Software und Datenbanken | 19 |
| 2.2 Methoden | 20 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden..... | 20 |
| 2.2.1.1 Chemische Transformation und Kultivierung von Bakterien..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA..... | 20 |
| 2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung..... | 20 |
| 2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| 2.2.2 Zellbiologische Methoden..... | 21 |
| 2.2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien | 21 |
| 2.2.2.2 Zellzahlbestimmung..... | 21 |
| 2.2.2.3 Elektroporation | 22 |
| 2.2.2.4 Adhäsionsassay | 22 |
| 2.2.2.5 Konjugatbildung | 23 |
| 2.2.3 Biochemische Methoden | 23 |
| 2.2.3.1 Stimulation von Jurkat T-Zellen und Herstellung von Lysaten | 23 |
| 2.2.3.2 GST-Pulldown-Assay zur Messung der Aktivität von Rap1 und Rac | 24 |
| 2.2.3.3 Isolierung von zytosolischen- und plasmamembranhaltigen Fraktionen..... | 24 |
| 2.2.3.4 Proteinbestimmung modifiziert nach Bradford | 25 |
| 2.2.3.5 Immunpräzipitation | 25 |
| 2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 25 |
| 2.2.4 Immunologische Methoden..... | 26 |
| 2.2.4.1 Western Blot | 26 |
| 2.2.4.2 Durchflusszytometrie..... | 27 |
| 2.2.4.2.1 Oberflächenexpression des TZR und CD18..... | 28 |
| 2.2.4.2.2 Calciummessung..... | 28 |
| 2.2.4.2.3 Löslicher ICAM-1-Bindungstest..... | 29 |
| 2.2.4.2.4 CD69-Expression | 29 |
| 2.2.4.2.5 Bestimmung des F-Aktin Gehalts..... | 29 |
| 2.2.4.2.6 Intrazelluläre Färbung für SLP-76, ADAP, SKAP55 und RIAM | 30 |
| 2.2.4.2.7 Intrazelluläre Färbung zur Detektion von phosphorylierter ERK1/2, ZAP-70 und PLC γ 1 | 30 |
| 2.2.4.3 Integrinmultimerisierung | 31 |
| 2.2.5 Statistische Analyse der Daten..... | 31 |
| 3 Ergebnisse | 32 |
| 3.1 Etablierung der RNA-Interferenz von SLP-76 in Jurkat T-Zellen..... | 32 |
| 3.2 Einfluss der verminderten SLP-76-Expression auf die TZR-vermittelte Aktivierung von PLC γ 1 und ERK1/2, der Calciumfreisetzung sowie der CD69-Hochregulation..... | 33 |
| 3.3 Die Reduktion der SLP-76-Expression inhibiert die TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung..... | 37 |
| 3.4 Inhibition der TZR-vermittelten Affinität und Avidität von LFA-1 nach Reduktion der SLP-76-Expression..... | 39 |
| 3.5 Identifizierung von SLP-76-regulierenden Signalwegen, die an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt sind | 41 |

| | |
|--|---------------|
| 3.5.1 Der Einfluss von SLP-76 auf die TZR-vermittelte Aktivierung von Rap1 | 42 |
| 3.5.2 SLP-76 interagiert mit dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul | 43 |
| 3.6 Inhibition der Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM-Moduls und Rap1 an die Plasmamembran nach Verlust der SLP-76-Expression | 45 |
| 3.7 Einfluss von SLP-76 auf die TZR-vermittelte F-Aktinpolymerisation und Aktivierung der GTPase Rac | 46 |
| 4 Diskussion | 49 |
| 4.1 Die funktionelle Bedeutung von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Aktivierung von Jurkat T-Zellen | 49 |
| 4.2 TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung | 50 |
| 4.3 TZR-vermittelte Signalwege für die LFA-1-Aktivierung | 51 |
| 4.3.1 SLP-76 bei der TZR-vermittelten Rap1-Aktivierung | 51 |
| 4.3.2 SLP-76 und das ADAP/SKAP55-Modul | 52 |
| 4.4 Die Rolle von SLP-76 bei TZR-vermittelten Signalwegen für die Aktinreorganisation | 54 |
| 4.4.1 Die Rolle von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Aktivierung von der GTPase Rac | 54 |
| 4.5 Schlussfolgerung | 56 |
| 4.6 Ausblick | 58 |
| Zusammenfassung | XII |
| Literaturverzeichnis | XIV |
| Publikationen | XXVII |
| Danksagung | XXVIII |
| Ehrenerklärung | XXIX |
| Darstellung des Bildungsweges | XXX |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Abi-2 | <i>Abl Interactor-2</i> |
| ADAP | <i>Adhesion and degranulation-promoting adapter protein</i> |
| AG | Arbeitsgruppe |
| Ak | Antikörper |
| AP-1 | <i>Activator-protein-1</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | antigenpräsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Arp2/3 | <i>Actin-related proteins 2 and 3</i> |
| Bcl10 | <i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Carma1 | <i>Caspase recruitment domain containing membrane-associated guanylate kinase protein-1</i> |
| CBM | Carma1/Bcl10/MALT1 |
| CCR | C-C-Motiv-Chemokinrezeptor |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| CMVp | Cytomegalie-Virus-Promotor |
| CR3 | <i>Complement receptor 3</i> |
| CXCR | C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor |
| CXCL | C-X-C-Motiv-Chemokin |
| CTL | <i>Cytotoxic T cell</i> |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DAG | Diacylglycerol |
| DNA | <i>Desoxyribonuclein acid</i> |
| dsDNA | <i>double stranded DNA</i> |
| dsRNA | <i>double stranded RNA</i> |
| DZ | dendritische Zellen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FERM | <i>4.1 protein, ezrin, radixin, moesin</i> |

| | |
|-----------------|---|
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| g | Erdbeschleunigung |
| Gads | <i>Grb2-related adapter downstream of Shc</i> |
| GB-Fragment | <i>Gads-Binding-Fragments</i> |
| GEF | GTP-Austauschfaktor |
| Grb2 | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HBSS | Hank's gepufferte Salzlösung |
| H+L | <i>Heavy and light chain</i> |
| HEM-1 | <i>Hematopoietic protein-1</i> |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazinethansulfonat |
| H1p | H1-RNA-Polymerase-III-Promotor |
| ICAM | <i>Intercellular cell adhesion molecule</i> |
| IFN γ | Interferon γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-Triphosphat |
| IS | Immunologische Synapse |
| ITAM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| Itk | <i>Interleukin-2-inducible T-cell kinase</i> |
| iTregs | induzierbare regulatorische T-Zellen |
| JNK1 | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| Kap. | Kapitel |
| kDa | Kilo-Dalton |
| LAD | Leukozyten Adhäsionsdefekt |
| LAT | <i>Linker of Activated T cells</i> |
| LB | Lauria Broth |
| Lck | <i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> |
| LCP2 | <i>Lymphocyte cytosolic protein 2</i> |
| LFA-1 | <i>Leukocyte function-associated molecule 1</i> |
| LM | <i>Lauryl maltoside/N-dodecyl-β-D-maltoside</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MALT1 | <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i> |
| Mac1 | <i>Macrophage-1 antigen</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |

| | |
|------------------|--|
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| miRNA | <i>micro RNA</i> |
| MIDAS | <i>Metal ion-dependent adhesion site</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| Mst1 | <i>Mammalian Ste20-like protein kinase 1</i> |
| Nck | <i>Non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i> |
| NFAT | <i>Nuclear factor of activated T cells</i> |
| NFκB | <i>Nuclear factor kappa of B cells</i> |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NP-40 | Nonidet P40 |
| nTregs | natürliche Tregs |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAK | p21-aktivierte-Kinase |
| PAMPS | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffert saline</i> |
| PBS-CM | <i>Phosphate buffert saline with Calcium and Magnesium</i> |
| PBST | PBS mit Tween 20 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIS | Präimmunserum |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLCγ1 | <i>Phospholipase Cγ1</i> |
| PMA | <i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pSMAC | <i>peripheral supramolecular activation cluster</i> |
| Rap1 | <i>Ras-related protein 1</i> |
| RapL | <i>Regulator for adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues</i> |
| Ras | <i>Rat sarcoma</i> |
| RBD | Rap1/Rac-bindene-Domäne |
| RIAM | <i>Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i> |
| RISC | <i>RNA interference specificity complex</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SA | Superantigen |

| | |
|--------|---|
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> |
| shRNA | <i>Short hairpin RNA</i> |
| SH | <i>Src homology</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SKAP55 | <i>Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa</i> |
| SLP-76 | <i>SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa</i> |
| SMAC | <i>Supramolecular activation cluster</i> |
| Sos | <i>Son of sevenless</i> |
| Sra-1 | <i>Specifically Rac associated protein-1</i> |
| Src | <i>Sarcoma-associated kinase</i> |
| SV40p | <i>Simian-Virus 40- Promotor</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | <i>Tris buffert saline</i> |
| TBSM | Tyrosin-basierte Signalmotive |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| Treg | Regulatorische T-Zelle |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan |
| UV | ultraviolett |
| v/v | Volumen/Volumen |
| VCAM | Vascular cell-adhesion molecule |
| VLA-4 | <i>Very late antigen-4</i> |
| WAVE | <i>WASp verprolin homologous</i> |
| WASp | <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> |
| WB | Western Blot |
| w/v | Gewicht/Volumen |
| Y | Tyrosin |
| ZAP-70 | <i>Zeta-associated protein of 70 kDa</i> |

Abbildungsverzeichnis

| <u>Abbildung</u> | | <u>Seite</u> |
|------------------|--|--------------|
| Abb. 1.1 | T-Zelldifferenzierung in den sekundären lymphatischen Organen | 3 |
| Abb. 1.2 | TZR-vermittelte Signalwege | 6 |
| Abb. 1.3 | Verschiedene Konformationen des Integrins LFA-1 | 8 |
| Abb. 1.4 | Domänenstruktur und Bindungspartner von SLP-76 | 13 |
| Abb. 1.5 | Mechanismus der RNA-Interferenz und der Aufbau des pCMS3-Vektors | 15 |
| Abb. 3.1 | Etablierung der shRNA-Interferenz von SLP-76 in Jurkat T Zellen | 34 |
| Abb. 3.2 | Durchflusszytometrische Analyse der Signalmoleküle nach Reduktion der SLP-76-Expression | 35 |
| Abb. 3.3 | Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von PLC γ 1 und ZAP-70 nach Reduktion der SLP-76-Expression | 37 |
| Abb. 3.4 | Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 und der Expression von CD69 | 39 |
| Abb. 3.5 | Einfluss der Reduktion von SLP-76 auf die Adhäsion und die T-Zellinteraktion mit B-Zellen | 41 |
| Abb. 3.6 | Inhibition der TZR-vermittelten Affinität und Avidität von LFA-1 nach Reduktion der SLP-76-Expression | 43 |
| Abb. 3.7 | Die Aktivierung von Rap1 nach TZR- und PMA-Stimulation | 45 |
| Abb. 3.8 | Interaktion von SLP-76 mit ADAP, SKAP55, RIAM und Rap1 | 47 |
| Abb. 3.9 | Die SLP-76-abhängige Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM -Moduls zusammen mit Rap1 an die Plasmamembran | 48 |
| Abb. 3.10 | Durchflusszytometrische Bestimmung des TZR-vermittelten F-Aktin gehalts | 49 |
| Abb. 3.11 | Die TZR-vermittelte Aktivierung von Rac | 50 |
| Abb. 4.1 | Schematische Darstellung der Signalwege, bei denen SLP-76 möglicherweise an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt ist | 59 |
| Abb. 4.2 | Der Rekonstitutionsvektor pCMS4 | 60 |

Tabellenverzeichnis

| <u>Tabelle</u> | | <u>Seite</u> |
|----------------|----------------------------------|--------------|
| Tab. 2.1 | Laborgeräte | 18 |
| Tab. 2.2 | Verbrauchsmaterialien | 18 |
| Tab. 2.3 | Reagenzien | 18 |
| Tab. 2.4 | Kits | 18 |
| Tab. 2.5 | Rekombinanten Proteine | 18 |
| Tab. 2.6 | Größenstandards | 19 |
| Tab. 2.7 | Bakterienstamm | 19 |
| Tab. 2.8 | Eukaryontische Zelllinien | 19 |
| Tab. 2.9 | Vektoren | 19 |
| Tab. 2.10 | shRNA-Konstrukte | 20 |
| Tab. 2.11 | Zielsequenzen der RNAi | 20 |
| Tab. 2.12 | Primäre Antikörper | XXXVI |
| Tab. 2.13 | Sekundäre Antikörper | XXXVIII |
| Tab. 2.14 | Pipettierschema für die SDS-PAGE | 27 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem vereint drei Formen der Abwehr: eine epitheliale Barriere, das angeborene und das erworbene Immunsystem (Parkin und Cohen 2001). Die erste Abwehr, die epitheliale Barriere, geschieht bereits an der Haut, den Schleimhäuten des Bronchialsystems oder des Gastrointestinaltrakts. Physikalische, chemische und antimikrobielle Barrieren wirken gemeinsam, um den Körper vor dem Eintritt des Pathogens zu schützen. Immunzellen werden aktiviert, wenn Pathogene diese Barrieren überwinden. Hier wird zwischen zwei Systemen unterschieden: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Parkin und Cohen 2001). Als angeborenes Immunsystem bezeichnet man die erste Immunabwehr ohne Aufbau eines Gedächtnisses für das Immunsystem (Turvey und Broide 2010). Die zellulären Komponenten sind basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, gewebeständige Makrophagen, dendritische Zellen (DZ) und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Turvey und Broide 2010). Phagozytierende Zellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und DZs besitzen keimbahnkodiert Mustererkennungsrezeptoren (*PAMPS (Pattern of recognition receptor)*) (Akira et al. 2006). Mit Hilfe dieser Rezeptoren können sie erregerabhängige und hochkonservierte molekulare Muster wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), DNA oder Zuckerstrukturen erkennen und die Pathogene phagozytieren. Diese Zellen produzieren Chemokine und Zytokine, die als humorale Bestandteile dieser Abwehr bezeichnet werden, um weitere Immunzellen zu rekrutieren bzw. zu aktivieren (Mackay 2001; Dinarello 2007). Zu den weiteren humoralen Faktoren gehören auch Akute-Phase-Proteine (Gruys et al. 2005) und das Komplementsystem (Sarma und Ward 2011). Das Zusammenspiel von diesen verschiedenen humoralen und zellulären Komponenten der unspezifischen Abwehr ermöglicht es, eine Vielzahl von Pathogenen meist innerhalb von wenigen Stunden zu eliminieren.

Das erworbene Immunsystem wird aktiviert, wenn es der unspezifischen Abwehr nicht gelingt, die Pathogene, Toxine oder entartete körpereigene Zellen zu töten bzw. zu entfernen. Die DZs stellen die Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem her (Palucka und Banchereau 1999). Sie erkennen, prozessieren und präsentieren Antigene, wie Peptide, über ihre MHC (Major histocompatibility complex) -Moleküle den Lymphozyten (Zellen des adaptiven Immunsystems) und werden daher auch als antigenpräsentierenden Zellen (APZ) bezeichnet (Parkin und Cohen 2001). Lymphozyten werden anhand ihrer Funktion in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden (B- und T-Zellen) (Parkin und Cohen 2001). B- und T-Lymphozyten gemein ist ihre Antigen-spezifität. Das bedeutet, dass jede Zelle klonale Antigenrezeptoren exprimiert, die jeweils nur ein spezifisches Antigen erkennen. Ein entscheidender Unterschied zwischen beiden Immunsystemen ist, dass die Zellen der spezifischen Abwehr langlebige Gedächtniszellen bilden (Mackay und Andrian 2001), die eine sehr schnelle und effektive Antwort bei erneutem Antigenkontakt mit z. B. dem gleichen Pathogen

ermöglichen. Als humorale Komponenten wirken auch hier Chemokine (Mackay und Andrian 2001), Zytokine (Dinarello 2007) sowie Antikörper (Ak) (Schroeder und Cavacini 2010), die von den B-Zellen produziert werden.

1.2 T-Zellen

Für die Induktion der adaptiven Immunantwort sind T-Zellen unabdingbar. Die Entwicklung dieser Zellen findet in zwei verschiedenen, primären lymphatischen Organen statt. T-Vorläuferzellen entwickeln sich im Knochenmark und wandern dann in den Thymus, um hier zu naiven T-Zellen zu reifen (Zúñiga-Pflücker 2004; Koch und Radtke 2011). Diese naiven T-Zellen sind charakterisiert durch die Expression ihrer Oberflächenstrukturmarker CD (*Cluster of differentiation*) (Bernard und Bousmell 1984), dem CD3-Komplex, dem T-Zellrezeptor (TZR) und CD28. Sie werden durch die Expression der beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 (CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen) unterschieden.

Naive T-Zellen wandern dann im Blut in die sekundären lymphatischen Organe wie z. B. der Milz und Lymphknoten (Andrian und Mackay 2000; Cyster 1999). Im Lymphknoten angekommen, laufen die T-Zellen entlang des fibroblastischen retikulären Netzwerkes in die T-Zellzone, wo sich DZs befinden (Förster et al. 2008). Die Fibroblasten dieses Netzwerkes produzieren die Chemokine CCL19 und CCL21, welche an den Chemokinrezeptor CCR7 auf den T-Zellen bindet und die Zellen so in die T-Zellzone navigieren (Ebert et al. 2005; Förster et al. 2008). Innerhalb der T-Zellzone kommt es bei einer erfolgreichen Erkennung des Peptid-beladenen MHC-Moleküls auf den DZs über den TZR der T-Zellen zur Differenzierung zu Effektorzellen. CD8⁺ T-Zellen erkennen spezifisch über MHC-Klasse-I (Neefjes et al. 2011) von DZs präsentierte Antigene (Kreuzpräsentation) (Heath und Carbone 2001). Nach der Aktivierung reifen sie zu zytotoxischen T-Zellen (*Cytotoxic T cell* (CTL)). Sie sind darauf spezialisiert, viral infizierte Zellen oder entartete Zellen zu töten (Abb. 1.1) (Zhang und Bevan 2011). CD4⁺ T-Zellen erkennen hingegen spezifisch Antigene, die über MHC-Klasse-II von DZs präsentiert werden (Berger und Roche 2009). Durch zusätzliche Signale der DZs wie kostimulatorische Moleküle und das umgebende Zytokinmilieu können CD4⁺ T-Zellen zu Effektor-T-Zellen (TH1, TH2 und TH17) sowie zu induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iTregs) differenzieren (Grogan et al. 2001; Kimura und Kishimoto 2011; Swain et al. 1991) (Abb.1.1).

Die Effektor-T-Zellen haben unterschiedliche Funktionen. TH1-Zellen produzieren z. B. Interferon- γ (IFN γ), das für die Aktivierung von Makrophagen zur Unterstützung der Zerstörung von intrazellulären Erregern benötigt wird (Schroder et al. 2004) (Abb. 1.1). TH2-Zellen aktivieren B-Zellen in der B-Zell-Zone und induzieren die Antikörperbildung (z. B. Immunglobulin (Ig) E (IgE)) sowie deren Affinitätsreifung. Basophile und eosinophile Granulozyten bekämpfen zusammen mit IgE mehrzellige Parasiten wie z. B. Würmer (Makepeace et al. 2012; Erb 2007). Eine entscheidende Rolle in einer frühen Phase der adaptiven Immunantwort spielen TH17-Zellen. Sie stimulieren dermale Epithelzellen zur Bildung von Chemokinen, welche verstärkt neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd locken,

um dort extrazelluläre Erreger eliminieren zu können (Abb. 1.1) (Pelletier et al. 2010). Effektor-T-Zellen ($CD4^+/CD8^+$) können langlebige Gedächtniszellen bilden, die bereits antigenerfahren sind und dadurch eine schnellere und effektivere Immunantwort bei wiederkehrender Infektion ermöglichen können (Sallusto et al. 1999). Eine spezielle Untergruppe bei der T-Zelldifferenzierung stellen die regulatorischen T-Zellen dar (Le und Chao 2007). Zwei Formen sind bisher beschrieben worden: die natürlichen Tregs (nTregs), die sich im Thymus entwickeln, und die iTregs, die sich aus $CD4^+$ T-Zellen entwickeln. Sie regulieren die Stärke der Immunantwort und sind für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen in der Peripherie zuständig (Abb. 1.1) (Sakaguchi et al. 2006).

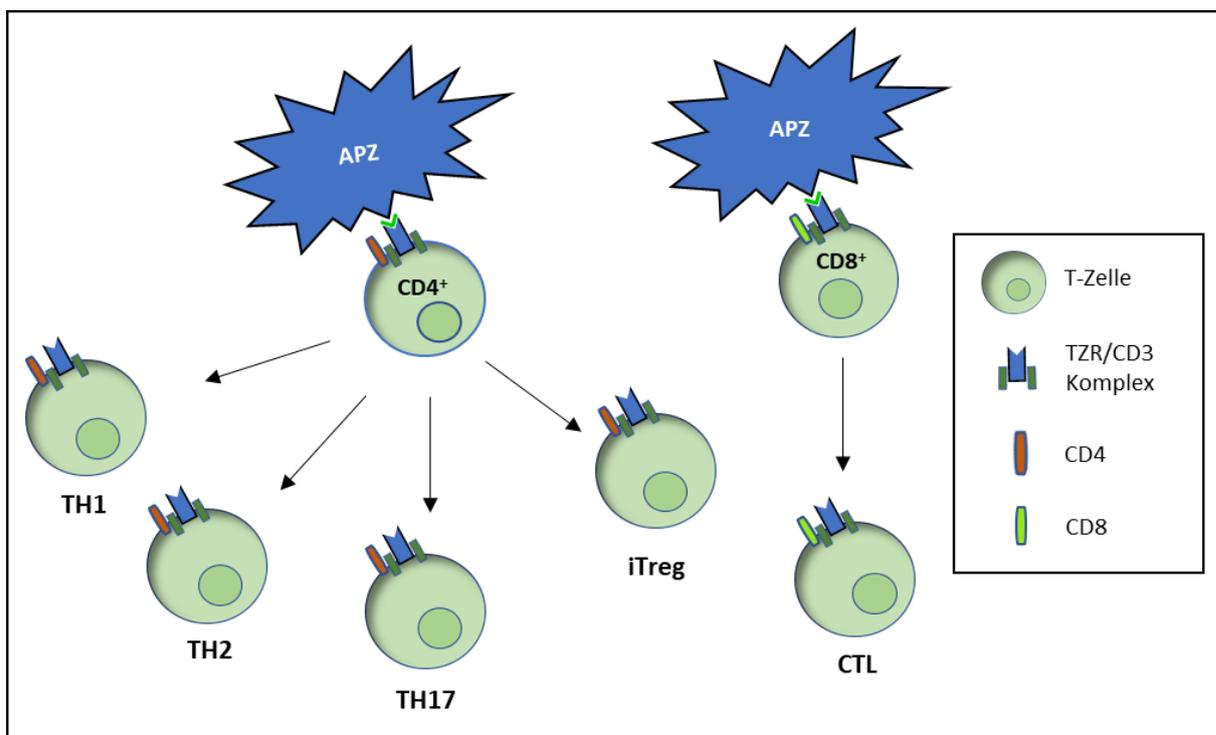


Abb. 1.1: T-Zelldifferenzierung in den sekundären lymphatischen Organen. Interagiert eine naive $CD4^+$ T-Zelle mit einer dendritischen Zelle und erkennt spezifisch den MHC-II-Peptid-Komplex über den TZR/CD3-Komplex kann sie in unterschiedliche Effektor T-Zellen differenzieren. Aus diesem T-Zelltyp können sich TH1, TH2, TH17 und induzierbare regulatorische T-Zellen (iTregs) entwickeln, welche verschiedene Funktionen bei der adaptiven Immunantwort ausüben. $CD8^+$ T-Zellen, die über ihren TZR/CD3-Komplex MHC-I-Peptid-Komplexe erkennen, differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL).

1.2.1 Die Aktivierung der T-Zellen

In der T-Zellzone des Lymphknotens treffen naive $CD4^+$ T-Zellen auf DZs, die antigene Peptide über ihre MHC-II-Moleküle präsentieren. T-Zellen, deren TZR das Peptid-beladene MHC-II-Molekül erkennt, werden aktiviert. Für eine vollständige Aktivierung benötigen $CD4^+$ T-Zellen ein zweites Signal zur Differenzierung und Proliferation. Dieses zweite Signal wird über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf T-Zellen und CD80/86 auf DZs vermittelt (Harris und Ronchese 1999; Acuto und Michel 2003). Bei der Interaktion zwischen naiven $CD4^+$ T-Zellen und DZs kommt es zur Ausbildung einer

Kontaktstelle, die als immunologische Synapse (IS) bezeichnet wird (Grakoui et al. 1999). Adhäsionsmoleküle, die an Integrine binden sowie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Richtung der Kontaktstelle vermitteln, sind am Aufbau und Stabilität der IS beteiligt und tragen somit zur Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten bei (Reichardt et al. 2010; Yokosuka und Saito 2010).

Der TZR setzt sich aus einer α - und einer β -Kette zusammen. Diese beiden Ketten sind nicht ausreichend für die Aktivierung der Lymphozyten, da ihre zytoplasmatischen Domänen zu kurz sind und keinerlei Signalmotive oder intrinsische Enzymaktivitäten besitzen. Die Signalübertragung des TZR wird durch den mit dem TZR-assoziierten CD3-Komplex (CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ) zusammen mit den homodimeren Zeta-(ζ)-Ketten vermittelt. Die zytoplasmatischen Domänen der CD3- und der ζ -Ketten enthalten ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) (Reth, 1989). Die Tyrosinreste in den ITAMs werden nach Antigenbindung an den TZR von den Tyrosinkinasen der Src (*Sarcoma-associated kinase*)-Familie Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) und Fyn phosphoryliert (Zamoyska et al. 2003). Die Phosphorylierung der homodimeren ζ -Ketten führt zur Rekrutierung der Tyrosinkinase ZAP-70 (*Zeta-associated protein of 70 kDa*) an die Plasmamembran, wo sie von Lck phosphoryliert und aktiviert wird (Au-Yeung et al. 2009). Die aktivierte ZAP-70 phosphoryliert eine Reihe von TBSM (Tyrosin-basierten Signalmotiven) in der zytoplasmatischen Domäne des transmembranösen Adapterproteins LAT (*Linker of activated T cells*) (Zhang et al. 1998). Die Phosphorylierung der TBSM erzeugt weitere Bindungsstellen für Proteine, die eine SH2 (*Src-homology 2*)-Domäne besitzen. Über diese SH2-Domäne binden die Adapterproteine Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) und Gads (*Grb2-related adaptor downstream of shc*) sowie die Kinase Itk (*Interleukin-2-inducible T-cell-kinase*) und die Lipase PLC γ 1 (*Phospholipase C gamma 1*) an phosphoryliertes LAT. Zusätzlich interagieren Gads, PLC γ 1 und Itk über ihre SH3 (*Src-homology 3*)-Domänen mit der prolinreichen Region des zytosolischen Adapterproteins SLP-76 (*SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa*) (Abb. 1.2) (Jordan et al. 2003). Die phosphorylierten TBSMs von SLP-76 ermöglichen zusätzlich eine induzierbare Interaktion mit dem GTP-Austauschfaktor Vav und dem Adapterprotein Nck (*Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*). Es entsteht ein membranständiger stabiler Komplex, aus LAT, SLP-76, Gads, Grb2, Itk, Vav und PLC γ 1, der auch als Calciuminitiationskomplex bezeichnet wird und über verschiedene Signalwege die Transkription von Genen steuert (Abb. 1.2) (Smith-Garvin et al. 2009). Die in diesem Calciuminitiationskomplex gebundene PLC γ 1 wird durch Itk phosphoryliert und aktiviert (Yablonski et al. 2001; Beach et al. 2007). Sie spaltet das membrangebundene Lipid PIP $_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in DAG (Diacylglycerol) und IP $_3$ (Inositol-1,4,5-Triphosphat) (Kim et al. 2000). IP $_3$ induziert die Ausschüttung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Calcium-gebundenes Calmodulin aktiviert die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Über diesen Signalweg kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) (Abb. 1.2) (Macian 2005). DAG aktiviert

die Serin/Threoninkinase C- θ (PKC θ). Diese aktivierte Kinase phosphoryliert Carma 1 (*Caspase recruitment domain containing membrane-associated guanylate kinase protein-1*) und zusammen mit Bcl10 (*B-cell lymphoma/leukemia 10*) und MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) kommt es zur Formation des CBM (Carma1/Bcl10/MALT1) -Komplexes (Rosebeck et al. 2011). Dieser Komplex löst dann einen Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*Nuclear factor kappa of B cells*) aus (Abb. 1.2) (Vallabhapurapu und Karin 2009).

Zusätzlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B rekrutiert DAG den GTP-Austauschfaktor RasGRP an die Plasmamembran und aktiviert die GTPase Ras (*Rat sarcoma*) (Jones et al. 2002). Neben RasGRP fungiert auch der GTP-Austauschfaktor Sos (*Son of sevenless*) in den T-Zellen als Aktivator von Ras (Boriack-Sjodin et al. 1998). Nach der TZR-vermittelten Phosphorylierung von LAT bindet Sos über das Adapterprotein Grb2 an LAT. Aktiviertes (GTP-beladenes) Ras leitet nun die Aktivierung einer Kaskade von Kinasen ein, welche schließlich zur Phosphorylierung der MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) führt und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (*Activator-protein-1*) initiiert (Smith-Garvin et al. 2009). Dieser reguliert unter anderem die Expression des frühen T-Zellaktivierungsmarkers CD69 (Castellanos et al. 1997). Zusammen mit AP-1 steuern NFAT und NF κ B Proliferation und Differenzierung der T-Zellen, die Zytokinfreisetzung (wie z. B. Interleukin (IL)-2) und die Expression von CD25, einem Bestandteil des IL-2-Rezeptors (Smith-Garvin et al. 2009). Neben der Transkription von Genen induziert die Stimulation des TZRs auch die Aktivierung von Integrinen, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

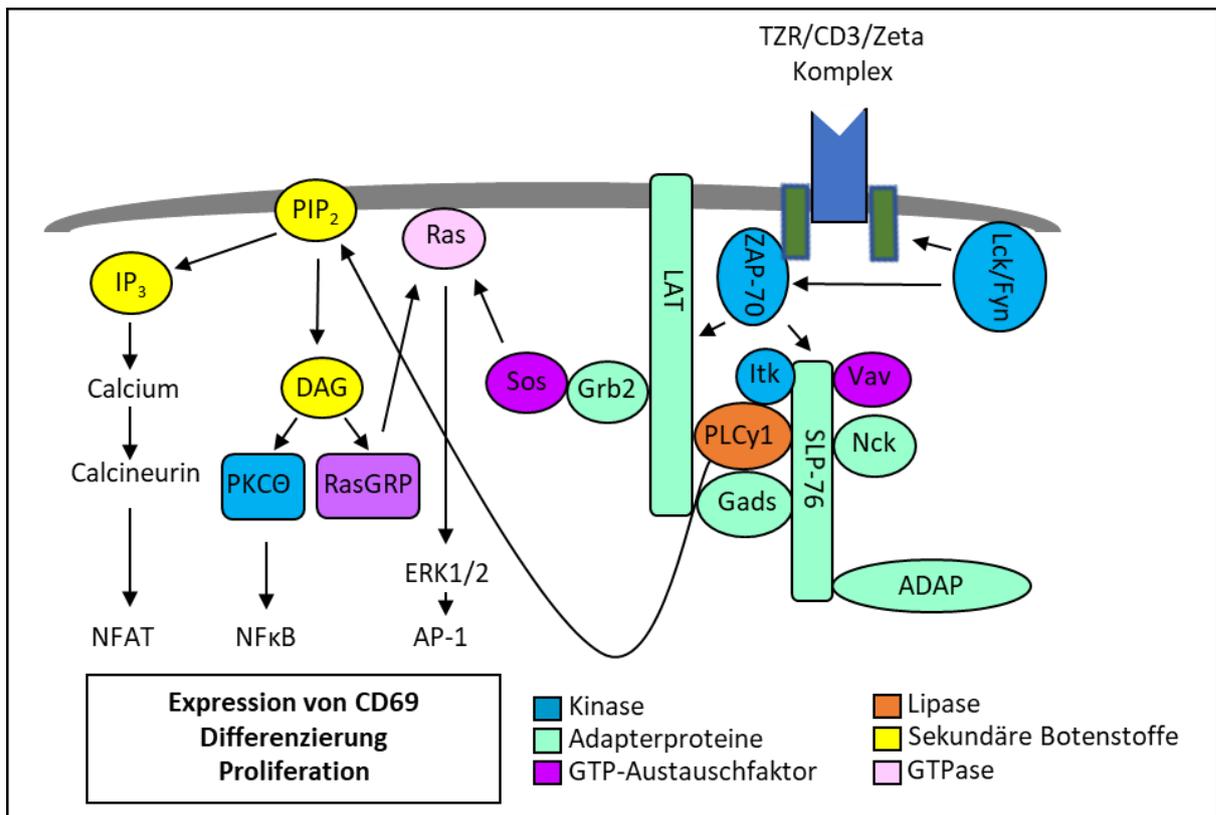


Abb. 1.2: TZR-vermittelte Signalwege. Die Erkennung des Peptid-beladenen MHC-II-Komplexes durch den TZR führt zur Phosphorylierung der ITAM-Motive des CD3-Komplexes und der Zeta-(ζ)-Ketten durch die Tyrosinkinase Lck und Fyn (Lck/Fyn). Die Tyrosinkinase ZAP-70 bindet an diese phosphorylierten ITAM-Motive und wird durch Lck aktiviert. ZAP-70 phosphoryliert die Adapterproteine LAT und SLP-76. Es bildet sich ein Calciuminitiationskomplex bestehend aus LAT, SLP-76, Grb2, Gads, Itk, Vav und PLCy1. Über verschiedene Signalwege werden daraufhin die Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT und AP-1 aktiviert. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren durch Gentranskription die T-Zell-Differenzierung und -Proliferation. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist an der Hochregulation von CD69 beteiligt (modifiziert nach Koretzky et al., 2006).

1.3 Integrine

Integrine vermitteln Zell-Zell-Kontakte und binden an extrazelluläre Matrixproteine. Sie sind heterodimere Plasmamembranproteine, die sich aus einer α- und einer β-Kette zusammensetzen. Bisher sind 18 α- und 8 β-Ketten für Vertebraten beschrieben worden, die in 24 verschiedenen Paarungen auftreten können (Kinashi 2005). Entscheidende Integrine, die auf T-Zellen exprimiert werden, sind das β2-Integrin LFA-1 (*Leukocyte function-associated antigen*; αLβ2 oder CD11a/CD18) und das β1-Integrin VLA-4 (*Very late antigen-4*; α4β1 oder CD49c/CD29) (Hogg et al. 2003; Ménasché et al. 2007b; Ménasché et al. 2007a). Als Liganden für LFA-1 konnten die Moleküle der interzellulären Adhäsionsfamilie ICAM 1-5 (*Inter cellular adhesion molecule 1-5*) identifiziert werden, wobei es sich bei ICAM-1 um den entscheidenden Liganden von LFA-1 handelt (Hogg et al. 2003). Die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1, welches auf den Endothelzellen der Hochendothelvenolen exprimiert wird, reguliert die Einwanderung der T-Zellen in den Lymphknoten. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 auf exprimierenden APZs wie B-Zellen und DZs ermöglicht die Formation und die Stabilisierung der IS (Hogg et al. 2003; Kinashi 2005; Abram und Lowell 2009). VLA-4 interagiert mit VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*) bzw. bindet an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin. Mit der Bindung von

VLA-4 an VCAM wird die T-Zelladhäsion auf Endothelzellen vermittelt und die Interaktion mit Fibronektin reguliert die Navigation der T-Zellen ins Gewebe wie z. B. zum Entzündungsort (Abram und Lowell 2009).

1.3.1 Die Aktivierung von LFA-1 in T-Zellen

Auf ruhenden T-Zellen kann nur eine schwache Interaktion von LFA-1 mit seinem Liganden nachgewiesen werden. Erst nach Stimulation des TZR mit einem Peptid-MHC-Komplex, durch Aktivierung der Chemokinrezeptoren (wie z. B. CXCR4 oder CCR7), nach Zugabe des DAG-Analogen PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*) oder nach Inkubation mit divalenten Kationen wie Mn^{2+} oder Mg^{2+} kommt es zur Aktivierung dieses Integrins (Mould 1996; Kolanus und Seed 1997; Hogg et al. 2003; Kinashi 2005). Intrazelluläre Signalprozesse, die zur Aktivierung von LFA-1 führen, werden als „*Inside-Out-Signaling*“ bezeichnet und sind für die Vermittlung von Adhäsionsprozessen der T-Zellen unabdingbar. Die Integrinaktivierung kann im Wesentlichen über zwei Ereignisse erklärt werden: Erhöhung von Affinität und Avidität. Die Affinitätserhöhung beruht auf einer Konformationsänderung innerhalb des Integrinmoleküls. Dagegen kommt es bei Aviditätserhöhungen zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts, welche die Aggregation mehrerer LFA-1 Moleküle (*Clustering*) auf der Zelloberfläche induziert (van Kooyk und Figdor 2000; Kinashi 2005). ICAM-1 gebundenes LFA-1 vermittelt seinerseits Signale in die T-Zelle, die wiederum Aktivierung, Differenzierung und Proliferation dieser Lymphozyten reguliert. Diese Signale werden als „*Outside-In-Signaling*“ bezeichnet (Rossetti et al. 2002; Abram und Lowell 2009). LFA-1 kann daher in bidirektionaler Richtung Signale übertragen.

Es ist bekannt, dass LFA-1 in drei unterschiedlichen Konformationen vorliegen kann, die jeweils unterschiedliche Affinitäten zum Liganden aufweisen (Lollo et al. 1993). Wie in Abb. 1.3 zu sehen ist, gibt es eine geschlossene (inaktive) Konformation, in der die gesamten extrazellulären Domänen und die Kopfgruppen der α - und β -Ketten eingeklappt sind. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 wird über die I-Domäne der Kopfgruppe von der α -Kette vermittelt (McDowall et al. 1998; Leitinger und Hogg 2000), welche in dieser Konformation für die Ligandenbindung nicht zugänglich ist. Ebenso interagieren Teile der Ektodomäne, der Transmembranregion sowie Abschnitte der zytoplasmatischen Domänen miteinander (Kinashi 2005; Gahmberg et al. 1997). Die intermediäre Konformation, die eine mittlere Affinität für den Liganden aufweist, zeigt eine gestreckte Form der extrazellulären Domänen. Die Kopfgruppe ist hier geschlossen. In der hochaffinen Konformation stehen die Kopfgruppen der α - und β -Ketten in Kontakt und sind offen, die gesamten anderen Teile der Ketten liegen voneinander separiert vor (Kinashi 2005; Gahmberg et al. 1997). Die Induktion der hochaffinen Konformation führt zur Aggregation mehrerer LFA-1-Moleküle (Aviditätsregulation, Abb. 1.3), die zur Stabilisierung der gestreckten Konformation und zur Verstärkung der Adhäsion beitragen (Kinashi 2005; Gahmberg et al. 1997).

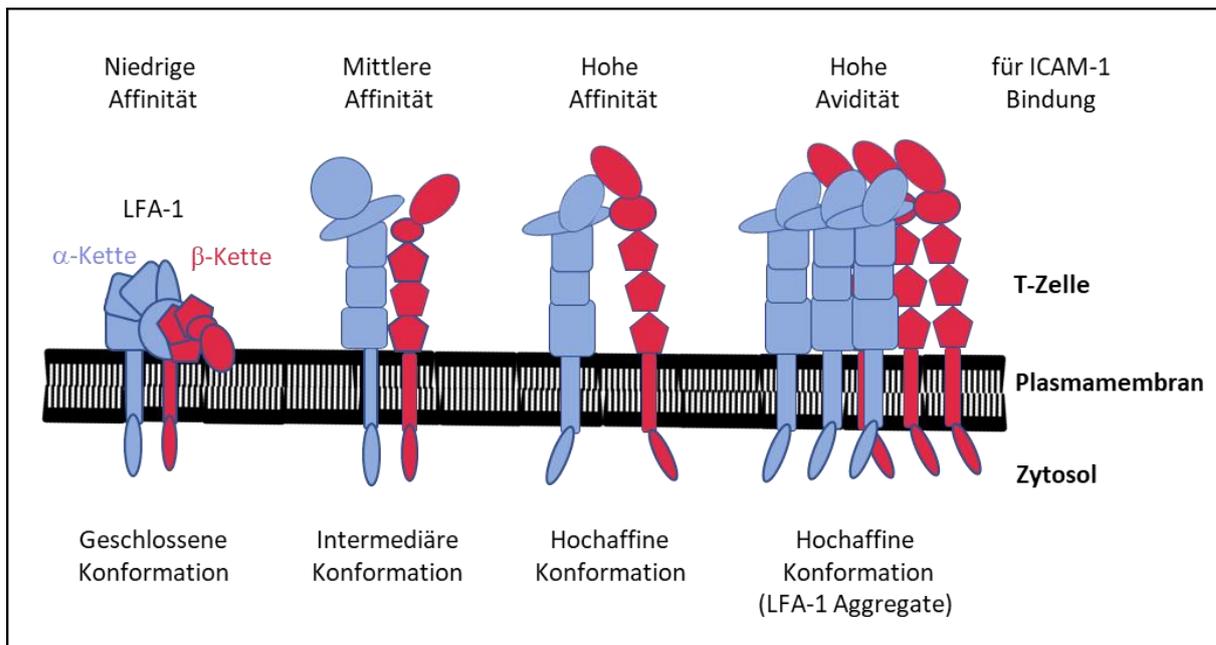


Abb. 1.3: Verschiedene Konformationen des Integrins LFA-1. Das Integrin LFA-1 besteht aus einer α - und einer β -Kette. Es werden drei Konformationen anhand ihrer Bindungsaffinität zu ICAM-1 unterschieden. In der geschlossenen, inaktiven Konformation mit geknickten Kopfgruppen ist die Affinität am geringsten. In der intermediären Konformation mit der gestreckten Form der extrazellulären Domänen bindet LFA-1 mit einer mittleren Affinität an seinen Liganden. Die hochaffine Konformation von LFA-1 mit separierten Ketten weist die höchste Affinität zu ICAM-1 auf. In dieser Konformation kommt es zur Aggregation von LFA-1, die zu einer erhöhten Adhäsion führt (modifiziert nach Hogg et al. 2003 und Kinashi 2005).

1.3.2 TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1

Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass der GTPase Rap1 (*Ras-related protein 1*) eine Schlüsselrolle bei der Integrin-vermittelten Adhäsion von T-Zellen zukommt (Mor et al. 2007). Transgene T-Zellen, die eine konstitutiv aktive Form von Rap1 (Rap-G12V) exprimieren, zeigen eine erhöhte basale Adhäsion gegenüber dem Liganden von LFA-1, welche nach Stimulation mit PMA noch weiter erhöht werden kann (Sebzda et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist die PMA-vermittelte Adhäsion in Rap1-defizienten T-Zellen gegenüber ICAM-1 stark reduziert (Duchniewicz et al. 2006). Nach Aktivierung von Rap1 interagiert die GTP-beladene Form von Rap1 mit Effektorproteinen, die Rap1-vermittelte Signale zur Aktivierung von LFA-1 weiterleiten. Zu diesen Effektorproteinen gehören RapL (*Regulator of adhesion and polarization enriched in Lymphoid tissue*) (Katagiri et al. 2003) und RIAM (*Rap1-GTP-interacting adapter molecule*) (Lafuente et al. 2004). In RapL-defizienten T-Zellen ist die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 reduziert (Katagiri et al. 2003). RapL interagiert konstitutiv mit der Serin/Threoninkinase Mst1 (*Mamalian Ste20 kinase 1*) und aktiviertem Rap1-G12V. Die Anwesenheit von Mst1 ist notwendig für die TZR- sowie die Rap1-G12V-vermittelte LFA-1-Aktivierung (Katagiri et al. 2006). Auch RIAM ist (wie RapL) nach Überexpression in Jurkat T-Zellen an der Aktivierung von LFA-1 beteiligt (Lafuente et al. 2004). Nach RNA (*Ribonucleic acid*) Interferenz (RNAi)-vermittelter Herunterregulation von RIAM in Jurkat T-Zellen ist die über eine konstitutiv aktive Form von Rap1 vermittelte basale bzw. PMA-induzierte Adhäsion der T-Zellen vermindert (Lafuente et al.

2004). Die Rekrutierung von Rap1 an die Plasmamembran nach TZR-Stimulation ist entscheidend für die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 (Lafuente et al. 2004; Bivona et al. 2004). In Abwesenheit von RIAM transloziert aktives Rap1 nicht mehr an die Plasmamembran (Lafuente et al. 2004). Diese Daten legen nahe, dass die Rekrutierung von aktiviertem Rap1 an die Plasmamembran für den Defekt in der LFA-1-Aktivierung verantwortlich ist.

Neben Rap1 und seinen Effektormolekülen wurden zwei Adapterproteine beschrieben, die an der TZR-vermittelten Adhäsion beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um die zytosolischen Adapterproteine ADAP (*Adhesion and degranulation promoting adapter protein*) und SKAP55 (*Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*) (Ménasché et al. 2007a). Als ein konstitutiver Interaktionspartner von ADAP wurde SKAP55 identifiziert (Marie-Cardine et al. 1997; Liu et al. 1998a). Diese Interaktion wird über die SH3-Domäne in SKAP55 und der prolinreichen Region in ADAP vermittelt (Marie-Cardine et al. 1997; Kliche et al. 2006). Wichtig anzumerken ist hier, dass alles in T-Zellen vorhandene Protein von SKAP55 mit ADAP assoziiert ist (Marie-Cardine et al. 1998a). Diese Interaktion zwischen ADAP mit SKAP55 ist für die stabile Expression von SKAP55 notwendig. So führt der Verlust der ADAP-Expression (nach RNAi von ADAP, in ADAP-defizienten Jurkat T-Zellen bzw. murinen ADAP-defizienten T-Zellen) zu einem Verlust der Expression von SKAP55 (Kliche et al. 2004; Huang et al. 2005; Togni et al. 2005). Die Daten belegen weiterhin, dass T-Zellen von der ADAP-*knock-out* Maus eine zweifach defiziente Mausvariante darstellen, bei der die Adapterproteine ADAP und SKAP55 fehlen (Kliche et al. 2004; Togni et al. 2005). SKAP55 und ADAP bilden daher in T-Zellen ein funktionelles Signalmodul (ADAP/SKAP55-Modul).

Durch das Expressionsdefizit von ADAP und/oder SKAP55 in T-Zellen (nach RNAi von ADAP oder SKAP55 oder in murinen ADAP- oder SKAP55-defizienten T-Zellen) konnte nach Stimulation des TZRs keine Aktivierung von LFA-1 und VLA-4 mehr induziert werden (Griffiths et al. 2001; Peterson et al. 2001; Kliche et al. 2006; Wang et al. 2007; Wang et al. 2003). In weiteren Experimenten konnte unsere Arbeitsgruppe (AG) zeigen, dass die Abwesenheit des ADAP/SKAP55-Moduls nicht die TZR-vermittelte Rap1-Aktivierung beeinflusst, sondern wie bei RIAM die Rekrutierung dieser GTPase an die Plasmamembran (Kliche et al. 2006). Weder das ADAP/SKAP55-Modul noch die beiden Adapterproteine allein waren in der Lage, eine Bindung mit Rap1 oder Rap1-G12V einzugehen. Als Verbindungsglied zwischen dem ADAP/SKAP55-Modul und Rap1 konnte RIAM identifiziert werden. RIAM interagiert konstitutiv mit dem ADAP/SKAP55-Modul und SKAP55 konnte dabei als der Interaktionspartner dieses Rap1-Effektorproteins identifiziert werden (Ménasché et al. 2007b). Vergleichbar, wie bei der Abwesenheit von RIAM, transloziert aktives Rap1 nach Verlust der Expression von dem ADAP/SKAP55-Modul oder von SKAP55 nicht mehr an die Plasmamembran. Diese Daten legen den Verdacht nahe, dass die Hauptfunktion des ADAP/SKAP55/RIAM-Moduls darin besteht, Rap1 nach TZR-Stimulation an die Plasmamembran zu rekrutieren. Allerdings ist der molekulare Mechanismus, wie dieses Modul an die Plasmamembran transloziert wird, bisher noch unbekannt. Ein

möglicher Kandidat wäre SLP-76, da dieses Adapterprotein nach TZR-Stimulation mit ADAP interagiert und damit für die Rekrutierung verantwortlich sein könnte (Abb. 1.2).

Zusätzlich zu den zytosolischen Adapterproteinen ADAP und SKAP55 sind noch Talin und Kindlin-3 als positiv regulierende Proteine bei der Aktivierung von LFA-1 in T-Zellen beschrieben worden (Kinashi 2005; Malinin et al. 2010). Beide Proteine enthalten eine FERM (*4.1 protein, ezrin, radixin, moesin*)-Domäne und interagieren direkt mit der zytosolischen Domäne der β -Kette von LFA-1 (Calderwood 2004; Plow et al. 2009). Der Verlust der Expression von Talin und Kindlin-3 in T-Zellen führt zu einer verminderten TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung und Adhäsion von T-Zellen (Simonson et al. 2006; Li et al. 2007; Manevich-Mendelson et al. 2009). Bei der LFA-1-Aktivierung scheinen beide Proteine die Induktion der hochaffinen Konformation von LFA-1 zu fördern, um so die Stabilisierung von LFA-1/ICAM-1 zu regulieren.

1.3.3 Leukozyten-Adhäsionsdefekt

Bei der Familie der $\beta 2$ -Integrine handelt es sich um die dominierende Gruppe von Integrinen, die auf Leukozyten exprimiert wird. Bisher sind vier verschiedene $\beta 2$ -Integrine bekannt: LFA-1 (CD11a/CD18), Mac1 (*Macrophage-1 antigen*), CR3 (*Complement receptor 3*) oder CD11b/CD18), CD11c/CD18 (CR4) und CD11d/CD18, die alle eine gemeinsame $\beta 2$ -Kette (CD18) besitzen (Kinashi 2005; Gahmberg et al. 1997).

LFA-1 wird auf allen Leukozyten exprimiert und wird nicht nur bei der adaptiven, sondern auch bei der unspezifischen Immunantwort wie z. B. der Diapedese von neutrophilen Granulozyten benötigt. Mac-1 konnte auf Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen nachgewiesen werden. Als Liganden dieses Integrin konnten der inaktivierte Komplementfaktor iC3b, Fibrinogen, Faktor X, LPS und ICAM-1 identifiziert werden (Rabb et al. 1993). CD11c/CD18 wird ebenfalls auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert und als Liganden wurden iC3b, LPS und der Fc-Rezeptor II (CD23) beschrieben (Lecoanet-Henchoz et al. 1995; Arnaout 1990). Mac1 und CD11c/CD18 spielen eine entscheidende Rolle bei Extravasation phagozytierender Zellen zum Entzündungsort und bei der Phagozytose von (opsionierten) Mikroorganismen (Arnaout 1990; Arnaout et al. 1983). CD11d/CD18 ist das am wenigsten charakterisierte Mitglied der $\beta 2$ -Integrine. Dieses Integrin wurde auf Monozyten und Makrophagen detektiert (Yakubenko et al. 2008) und bindet ICAM-3 und VCAM (van der Vieren et al. 1995; Grayson et al. 1998). Es wird angenommen, dass CD11d/CD18 die Adhärenz von Makrophagen und Monozyten moduliert. Eine geringe Expression dieses Integrins fördert die Monozyteneinwanderung, wohingegen eine erhöhte Expression von CD11d/CD18 den Verbleib von differenzierten Makrophagen an der Entzündungsstelle erleichtert (Yakubenko et al. 2008).

Bei den Leukozyten-Adhäsionsdefekten (LAD) handelt es sich um primäre Immundefekte mit einem gestörten Adhäsionsverhalten der Leukozyten. Bisher sind drei Formen bekannt. Der LAD Typ 1 beruht auf einem Defekt in der Synthese der $\beta 2$ -Kette (CD18) von LFA-1 und führt u. a. zur verstärkten

Blutungsneigung und einer verminderten Wundheilung, fehlender Eiterbildung, Leukozytose und einer erheblichen Beeinträchtigung der Immunität gegenüber bakteriellen Infektionen. Da die oben erwähnten β 2-Integrine eine essenzielle Rolle bei der Adhäsion von Granulozyten und Makrophagen an die Endothelwand der Blutgefäße und der sich anschließenden Diapedese spielen, sind sie nicht mehr in der Lage an den Infektionsherd zu gelangen, um dort (opsonisierte) Mikroorganismen zu beseitigen. Die molekulare Grundlage dieses Defektes bilden verschiedene Mutationen im extrazellulären Bereich der β 2-Kette (*ITGB2*-Gen (21q22.3)), die hauptsächlich in der I-ähnlichen Domäne der Kopfgruppe oder in der cysteinreichen Region liegen. Diese Mutationen verhindern die mRNA (*messenger RNA*) -Synthese, die Translation oder die Heterodimerformierung, sodass die Zelloberflächenexpression des Integrins vollständig zum Erliegen kommt bzw. stark reduziert ist. Die α -Ketten werden in LAD Typ 1 Patienten normal exprimiert, aber für die Heterodimerformierung dieser Integrine im Golgi-Apparat werden sowohl eine intakte α - als auch eine β 2-Kette benötigt (Etzioni 2009).

Beim LAD Typ 2 liegt eine Mutation im *SLC35C1*-Gen (11p11.2) vor, welches für den Guanosin-5'-diphosphat-Fukosetransporter kodiert. Bei diesem Typ kommt es zu einer Störung des Fokosestoffwechsels, was zum Fehlen des Fokose-exprimierenden Liganden der Selektine führt und somit das Rollen der Leukozyten am Endothel behindert (Yakubenia und Wild 2006).

Beim LAD Typ 3 findet man einen Defekt bei der Aktivierung der Integrine der β ₁-, β ₂- und β ₃-Familie. Die Expressionsrate der verschiedenen Integrine ist nicht betroffen. Verantwortlich ist eine Mutation des *FERMT3*-Gens (11q13.1), das für das Protein Kindlin-3 in Immunzellen kodiert. Kindlin-3 interagiert mit der β -Kette der Integrine und stabilisiert die hochaffine Konformation von LFA-1 (Manevich-Mendelson et al. 2009). Eine Aktivierungsstörung der Integrine resultiert in einer ähnlichen klinischen Symptomatik wie beim LAD Typ1 mit schweren, rezidivierenden Infektionen, einer ausgeprägten Leukozytose, Wundheilungsstörungen sowie dermalen und viszeralen Einblutungen (Wang et al. 2010).

1.4 Adapterproteine

Per Definitionem besitzen Adapterproteine selbst keine enzymatische oder transkriptionelle Aktivität, aber sie verfügen über verschiedene Protein-Protein-Interaktionsdomänen und Tyrosin-basierte Signalmotive. Diese Domänen/Motive ermöglichen es ihnen, sowohl induzierbare als auch konstitutive Protein-Protein-Interaktionen mit anderen intrazellulären Signalmolekülen einzugehen. Diese Interaktionen vermitteln die Bildung großer Multimolekularkomplexe (Signalosome), wodurch die für diese Signalprozesse essenziellen Proteine zum richtigen Zeitpunkt in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Im folgenden Abschnitt wird die Funktion des zytosolischen Adapterproteins SLP-76 in T-Zellen detaillierter vorgestellt, da es im Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit stand.

1.4.1 Das zytosolische Adapterprotein SLP-76

SLP-76, auch bekannt unter dem Namen LCP2 (*Lymphocyte cytosolic protein 2*), wurde erstmals 1995 mit Hilfe eines *in vitro* "Grb2 binding assays" isoliert (Jackman et al. 1995). Als Genlokus wurde das Chromosom 5q33 identifiziert. Sowohl die humane als auch die murine cDNA (*complementary DNA*) kodieren für 533 Aminosäuren, die zu 84 % identisch sind (Wu und Koretzky 2004). SLP-76 besteht aus drei Domänen. Wie in Abb. 1.4 zu sehen ist, gibt es eine saure N-terminale Domäne, in der sich drei Tyrosin-Phosphorylierungsmotive befinden, eine zentrale prolinreiche Region und die C-terminale SH2-Domäne (Koretzky et al. 2006). SLP-76 wird in verschiedenen Zellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems exprimiert wie Thrombozyten, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, NK-Zellen sowie T- und B-Zellen (Koretzky et al. 2006).

SLP-76-defiziente Mäuse wurden 1998 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen generiert. 60% der Tiere starben aufgrund subkutaner Blutungen im pränatalen Entwicklungsstadium (Clements et al. 1998; Pivniouk et al. 1998). Adulte Tiere hatten verkleinerte Thymi und Lymphknoten und zeigten Anzeichen einer Splenomegalie (Clements et al. 1998). Sowohl im Blut, der Milz und im Lymphknoten konnten keine peripheren CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen gefunden werden. Der Verlust der peripheren T-Zellen konnte auf eine Blockade der Thymozytenentwicklung im CD4/CD8 doppelt negativem Stadium zurückgeführt werden (Clements et al. 1998; Pivniouk et al. 1998).

Die funktionelle Relevanz von SLP-76 bei TZR-vermittelten Signalprozessen wurde intensiv in Jurkat T-Zellen untersucht. Nach Überexpression dieses Adapterproteins in Jurkat T-Zellen konnte SLP-76 als ein positiver Regulator bei TZR-vermittelten Signalprozessen identifiziert werden (Motto et al. 1996). Mit Hilfe der SLP-76-defizienten Jurkat T-Zelllinie J14 konnte belegt werden, dass die im Signalablauf vor SLP-76 befindlichen Tyrosinkinase ZAP-70 und Itk sowie das transmembranöse Adapterprotein LAT noch phosphoryliert werden können (Yablonski et al. 1998). Zusätzlich konnte mit dieser Jurkat T-Zelllinie gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von PLC γ 1 und die Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs sowie der Anstieg des intrazellulären Calciums und die Hochregulation von CD69 signifikant reduziert sind (Yablonski et al. 1998).

SLP-76 wurde über seine Interaktion mit Grb2 identifiziert. Liu und Kollegen konnten später zeigen, dass SLP-76 eine höhere Affinität zu Gads, einem Mitglied der Grb2-Familie, besitzt, welches konstitutiv mit der prolinreichen Region interagiert (Liu et al. 2003). Die SH2-Domäne von Gads bindet an das phosphorylierte Adapterprotein LAT und ermöglicht die Rekrutierung von SLP-76 an die Plasmamembran, um die Formation des Calciuminitiationskomplexes zu initiieren (s. Abb. 1.2) (Koretzky et al. 2006).

Zur Assemblierung des Komplexes interagiert PLC γ 1 mit der prolinreichen Region von SLP-76 (Yablonski et al. 2001). Die drei Tyrosin-Phosphorylierungsmotive von SLP-76 werden nach TZR-Stimulation von ZAP-70 phosphoryliert (Bubeck-Wardenburg et al. 1996; Fang und Koretzky 1999) und ermöglichen eine induzierbare Interaktion von Vav, Itk und Nck (Wu et al. 1996; Schneider et al. 2000;

Wunderlich et al. 1999). Vav und Itk sind an der Aktivierung von PLC γ 1 beteiligt (Schaeffer et al. 1999; Reynolds et al. 2002). Das zytosolische Adapterprotein Nck sowie Vav und Itk regulieren zusätzlich Aktin-modifizierende Signalwege, die den F-Aktin Gehalt in T-Zellen modifizieren (Fischer et al. 1998; Buday et al. 2002; Gomez-Rodriguez et al. 2007).

Die SH2-Domäne von SLP-76 interagiert mit phosphoryliertem ADAP (Musci et al. 1997; da Silva et al. 1997; Sauer et al. 2001). Für ADAP ist beschrieben worden, dass es an der TZR-vermittelten Regulation von CD69, CD25 und der IL-2 Freisetzung sowie der oben erwähnten Aktivierung von LFA-1 und VLA-4 beteiligt ist (Griffiths et al. 2001; Peterson et al. 2001). Nach Mutation der Tyrosinreste in ADAP, welche für die Interaktion von ADAP an die SH2-Domäne von SLP-76 verantwortlich sind (Wang et al. 2004), konnte eine verminderte Interaktion zwischen T-Zellen und APZs beobachtet werden (Wang et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben ADAP auch SLP-76 eine Rolle bei der TZR-vermittelten Regulation der Integrine spielt.

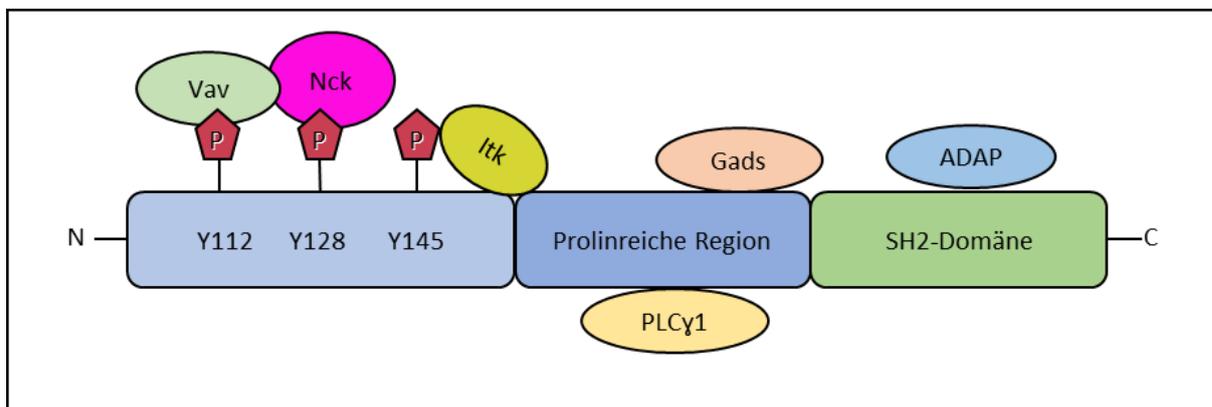


Abb. 1.4: Domänenstruktur und Bindungspartner von SLP-76. SLP-76 besteht aus einer N-terminalen sauren Domäne (in der sich drei Tyrosin (Y)-Phosphorylierungsmotive (Y112, Y128 und Y145) befinden), einer zentralen prolinreichen Region und einer C-terminalen SH2-Domäne. Zusätzlich sind die bekannten Interaktionspartner und die jeweiligen interagierenden Domänen/Motive dieses Adapterproteins dargestellt (modifiziert nach Koretzky et al. 2006).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nach Zerstörung des endogenen SLP-76/Gads-Komplexes durch Überexpression eines isolierten Gads-Binding-Fragments (GB-Fragment) selektiv die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 und VLA-4 reduziert wurde (Jordan et al. 2007). Die Zerstörung des endogenen SLP-76/Gads-Komplexes durch das GB-Fragment hat zur Folge, dass SLP-76 nicht mehr mit LAT interagiert und der Calciuminitiationskomplex nicht mehr assembliert wird (Singer et al. 2004) (s. Abb. 1.2). Diese Daten belegen, dass SLP-76 an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist, die eine Rolle bei der TZR-vermittelten Aktivierung von LFA-1 spielen könnten. Hierzu gehören z. B.

- ◆ die induzierbare Interaktion mit ADAP,

- ◆ die Assemblierung des Calciuminitiationskomplexes und die Aktivierung der PLC γ 1 (Da die von der PLC γ 1 generierten sekundären Botenstoffe GTP-Austauschfaktoren stimulieren, die für Aktivierung von Rap1 benötigt werden (Katagiri et al. 2004a) sowie
- ◆ die induzierbare Interaktion mit Vav, Itk und Nck (Abb. 1.2), da diese Moleküle die TZR-vermittelten Aktinpolymerisation regulieren, den Aufbau und die Stabilisierung der IS fördern sowie an der Aggregation der Integrine beteiligt sind (Buday et al. 2002; Krawczyk et al. 2002; Finkelstein et al. 2005).

Diese SLP-76-abhängigen Signalwege, die möglicherweise in der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung involviert sind, sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.5 RNA-Interferenz

Bei der RNAi handelt es sich um einen natürlichen und hochkonservativen Mechanismus, um die Expression von Genen zu verringern (Fire et al. 1998; Cerutti und Casas-Mollano 2006). Dieser Mechanismus basiert auf der Interaktion von kleinen RNA-Molekülen, wie siRNA (*small interfering RNA*) oder miRNA (*micro RNA*), mit der nach der Transkription gebildeten komplementären mRNA im Zytosol der Zelle. Die gebildete doppelsträngige RNA (*double stranded RNA* (dsRNA)) wird über zelleigene Enzymkomplexe abgebaut. Dieser Prozess verhindert die Translation der Boten-RNA (*messenger RNA* (mRNA)) in ein Protein und vermindert so die Expression des Genproduktes (Kurreck 2009).

In der Wissenschaft können verschiedene Formen der dsRNA verwendet bzw. in die Zelle eingeschleust werden, um das endogene RNAi-System zur posttranskriptionellen Gensuppression zu verwenden. Als dsRNA können entweder chemisch synthetisierte siRNA oder die Promotor-getriebene Expression von shRNA (*small hairpin RNA*) im Zellkern über einen transfizierten Vektor genutzt werden (Abb. 1.5A) (Kurreck 2009). Die gebildete primäre shRNA wird von diesem Vektor nach ihrer Prozessierung zu shRNA dann von Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Hier wird die shRNA über *Dicer*, einer Endoribonuklease, in eine 21 - 23 Basenpaare lange doppelsträngige siRNA geschnitten (Abb. 1.5A). Diese siRNA interagiert mit einem Komplex aus RNA und Proteinen, dem RISC (*RNA interference specificity complex*), wo der Komplementärstrang abgebaut wird und der verbliebende Folgestrang am RISC verbleibt. Dieser lagert sich an die Ziel-mRNA an. Diese mRNA wird degradiert und steht für die Translation des Gens nicht mehr zur Verfügung (Abb. 1.5A). In dieser Arbeit wurde zur Generierung der shRNA der pCMS3-Vektor verwendet (Abb. 1.5B). Dieser Vektor wurde unserer AG von Daniel D. Billadeau zur Verfügung gestellt (Gomez et al. 2005). Der Vektor besitzt zwei Promotoren: den H1-RNA-Polymerase-III-Promotor (H1p) und den *Simian Virus 40* -Promotor (SV40p). Die shRNA-kodierenden Oligonukleotide werden vom H1p transkribiert, wohingegen das Markergen EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) von dem SV40p exprimiert wird (Abb. 1.5B). Mit Hilfe dieses

Markergens können transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop oder am Durchflusszytometer identifiziert werden.

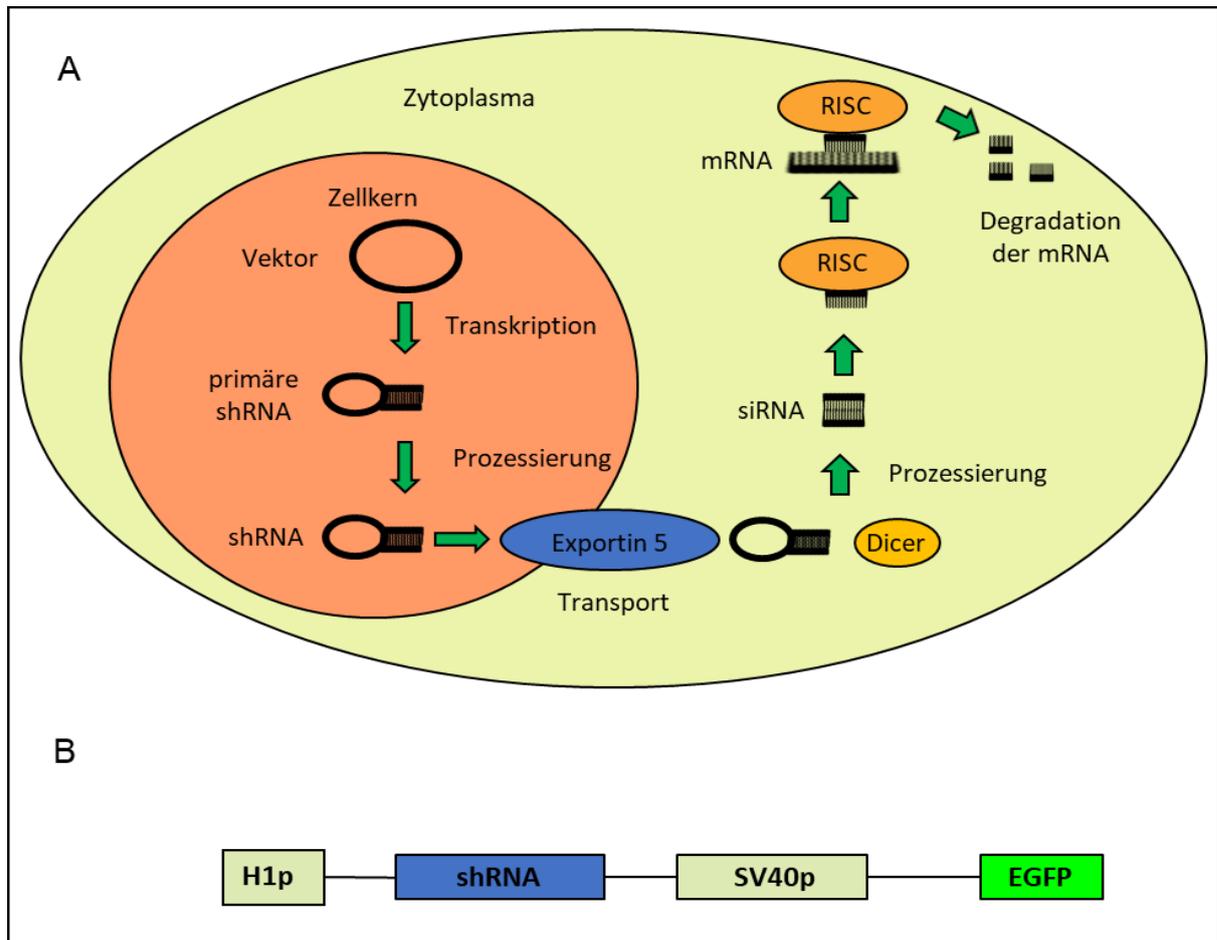


Abb. 1.5: Mechanismus der RNA-Interferenz und der Aufbau des pCMS3-Vektors. (A) Die Transkription der prä-shRNA von einem Vektor erfolgt im Zellkern und wird mit Hilfe eines Mikroprozessorkomplexes zur shRNA prozessiert. Über das Protein Exportin 5 wird die shRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma geschleust. Hier wird die shRNA über die Endoribonuklease Dicer in siRNA umgewandelt. Nach Bindung der siRNA an dem RISC (*RNA interference specificity complex*) wird der Komplementärstrang degradiert. Über den am RISC-gebundenen Leitstrang der siRNA erfolgen die Bindung an die Ziel-mRNA und deren Abbau. (B) Schematischer Aufbau des pCMS3-Vektors für die Generierung der shRNA. Der H1p (H1-RNA-Polymerase-III-Promotor) dient zur Generierung der prä-shRNA. Der *Simian Virus 40*-Promotor (SV40p) wird zur Translation von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) verwendet.

1.6 Ziele

Unsere Arbeitsgruppe hatte SLP-76-defiziente Jurkat T-Zelllinie J14 sowie die beiden Linien J14-76-11 und J14-76-18, welche SLP-76 reexprimieren, verwendet, um die funktionelle Bedeutung von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Integrinaktivierung zu untersuchen (Yablonski et al. 1998). Für die Integrine VLA-4 und LFA-1 wurden diese Zelllinien in einem statischen Adhäsionstest nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern (TZR), PMA und $MnCl_2$ auf ihre Fähigkeit zur Bindung an die immobilisierten Liganden Fibronectin und ICAM-1 verwendet. Für das Integrin VLA-4 wurde dabei festgestellt, dass in SLP-76-defizienten J14 Zellen keine Bindung nach TZR- und PMA-Stimulation beobachtet werden konnte. Diese verminderte Adhäsion nach TZR- und PMA-Stimulation wurde in den SLP-76 rekonstituierten

J14-76-11 und J14-76-18 Zellen aufgehoben. Bei der direkten Aktivierung von VLA-4 mit $MnCl_2$ waren alle drei Zelllinien in der Lage an Fibronektin zu binden. Im Gegensatz zur Aktivierung von VLA-4 konnte in J14 und den SLP-76 rekonstituierten J14-76-11 und J14-76-18 Jurkat T-Zellen mit keinem der drei Stimuli eine Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1 induziert werden. Eine mögliche Erklärung des Defekts bei der LFA-1-Aktivierung könnte eine drastisch reduzierte Expression des Integrins auf der Zelloberfläche sein. Überraschenderweise konnte die Expression von LFA-1 auf allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke von LFA-1 war vergleichbar mit der Wildtyp Jurkat T-Zelllinie JE6.1, die unsere AG schon erfolgreich für Untersuchungen zu Signalprozessen bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung verwendet hatte (Kliche et al. 2006; Ménasché et al. 2007b). Diese Vorarbeiten zeigen, dass diese SLP-76-defiziente Jurkat T-Zelllinie J14 sowie die beiden Linien J14-76-11 und J14-76-18 nicht für die Untersuchungen zur TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung verwendet werden können. Um die funktionelle Bedeutung von SLP-76 für die TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung zu untersuchen, wurde daher mittels RNA-Interferenz die Expression von SLP-76 in der Jurkat T-Zelllinie JE6.1 reduziert.

Folgende Fragestellungen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Führt die Reduktion der Expression von SLP-76 zu den gleichen TZR-vermittelten Defekten, wie sie von Yablonski et al. beschrieben wurden (Yablonski et al. 1998)? Zu diesen Defekten gehören eine verminderte PLC γ 1 und ERK1/2 Aktivierung, ein reduzierter Calciumeinstrom und der Verlust der Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69.
2. Vermittelt die Herunterregulation der Expression von SLP-76 einen Defekt bei der TZR-vermittelten Adhäsion von LFA-1 und bei der Interaktion mit APZs? In diese Untersuchungen sollten auch Experimente eingeschlossen werden, um die funktionelle Bedeutung von SLP-76 bei der Affinität und Avidität von LFA-1 aufzuklären.
3. An welchen Signalprozessen ist SLP-76 bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt? Hierfür sollte nach Reduktion der Expression von SLP-76 die Aktivierung der GTPase Rap1 untersucht werden. Da SLP-76 mit ADAP interagiert (Abb. 1.2), sollte zu dem überprüft werden, ob es sich um das ADAP/SKAP55/RIAM-Modul handelt, welches über RIAM aktiviertes Rap1 bindet. Da SLP-76 mit F-Aktin-regulierenden Signalmolekülen wie Vav, Itk und Nck interagiert (Abb. 1.2), sollte noch die Funktion von SLP-76 bei der F-Aktinpolymerisation analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers befinden sich im Anhang 1 ab S. XXXI (Tab. 2.1).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers sind im Anhang 2 ab S. XXXII (Tab. 2.2) aufgeführt.

2.1.3 Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers sind im Anhang 3 ab S. XXXIII (Tab. 2.3) aufgeführt.

2.1.4. Kits

Tab. 2.4: Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits in alphabetischer Reihenfolge, mit Angabe des Herstellers.

| Kits | Hersteller |
|--------------------------------|---------------------|
| Agfa Fixierung und Entwickler | Röntgen Bender GmbH |
| Nucleo Bond® Xtra Maxi Plus EF | Macherey-Nagel |
| Roti-Lumin 1 und 2 | Carl Roth |
| Roti-Nanoquant | Carl Roth |

2.1.5 Rekombinante Proteine

Tab. 2.5: Alle in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.

| Bezeichnung | Verwendung | Referenz/Quelle |
|--------------------|--------------------------------|--|
| Humanes ICAM-1-Fc | Adhäsionsstudien, DZ | R&D Systems |
| GST-RalGDS-RBD | Pull-down für aktiviertes Rap1 | Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kliche |
| GST-PAK-RBD | Pull-down für aktiviertes Rac | Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kliche |

DZ: Durchflusszytometrie

2.1.6 Größenstandards

Tab. 2.6: Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten DNA-Längenstandard.

| Bezeichnung | Hersteller | Fragmentlängen (Bp) |
|----------------|------------|---|
| 250 DNA-Leiter | Carl Roth | 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250 |

Der Längenstandard von vorgefärbten Proteinen (10-180 Kilo-Dalton (kDa)) von der Firma Fermentas wurde für die SDS (Sodium dodecyl sulfat) -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet.

2.1.7 Bakterienstamm

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstamm.

| Escherichia coli (E. coli.) | Genotyp | Verwendung | Referenz |
|-----------------------------|--|---------------------------------|----------------------------|
| DH10B | <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rps L Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMSmcrBC) Str^R λ⁻</i> | Zur Amplifikation von Plasmiden | (Casadaban und Cohen 1980) |

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 2.8: Die hier genannten Zelllinien wurden in den jeweiligen Experimenten in dieser Arbeit eingesetzt.

| Bezeichnung | Eigenschaften | Verwendung | Quelle/Referenz |
|-------------------------|--|---|----------------------|
| Jurkat T-Zellen (JE6.1) | humane T-Zelllinie von einem Patienten mit akuter Leukämie | transiente Expression von shRNAs und zum Einsatz in biochemischen sowie funktionalen Testsystemen | (Weiss et al., 1984) |
| Raji B-Zellen | Humane T-Zelllinie eines 11-jährigen Patienten mit Burkitt Lymphom | zum Einsatz in funktionalen Testsystemen | ATCC |

2.1.9 Vektoren

Tab. 2.9: Übersicht über alle in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren.

| Vektor | Resistenz | Verwendung | Quelle/Referenz |
|-------------|------------|---|---------------------|
| pmCherry C1 | Kanamycin | transiente Expression zur Identifizierung von Zellen in funktionalen Untersuchungen | Clontech |
| pCMS3 | Ampicillin | Klonierung von Oligonukleotiden zur RNA-Interferenz | (Gomez et al. 2005) |
| pSuper | Ampicillin | Klonierung von Oligonukleotiden zur RNA-Interferenz | Oligoengine |

2.1.10 shRNA-Konstrukte

Tab. 2.10: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Konstrukte mit den dazugehörigen Vektoren.

| Bezeichnung | Vektoren (Resistenz) | Verwendung | Quelle/Referenz |
|-------------|-------------------------------|--|--------------------|
| shK | pSuper, pCMS3 (Ampicillin) | transiente Expression der shRNA gegen Renilla | (Horn et al. 2009) |
| shSLP-76 | pSuper, pCMS3 (Ampicillin) | transiente Expression der shRNA gegen SLP-76 | (Horn et al. 2009) |

Tab. 2.11: Darstellung der Zielsequenzen der RNAi für die jeweiligen Gene.

| Gen | Zielsequenz der RNAi |
|---------|---------------------------|
| Renilla | 5`-CCAAGTAATGTAGGATCAA-3` |
| SLP-76 | 5`-CGAAGAGAGGAGGAGCATC-3` |

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primäre Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper (Ak) sind in Tab. 2.12 im Anhang 4 ab S. XXXVI aufgelistet.

2.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären Ak sind in Tab. 2.13 im Anhang 5 ab S. XXXVIII aufgelistet.

2.1.12 Software und Datenbanken

- BioLinx© (Proteinbestimmung)
- Corel Photopaint (Mikroskopie)
- EasyWin32 (Agarosegeldokumentation)
- FlowJo 7.6.3 (Durchflusszytometrie, Ca-Messung)
- CellQuest™ Pro (Durchflusszytometrie)
- PubMed (Literatursuche)
- GraphPad Prism 5 (Statistik)
- Microsoft Office (Word, Excel und PowerPoint) 2014

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Chemische Transformation und Kultivierung von Bakterien

Für die chemische Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* des Bakterienstammes DH10B der AG Kliche verwendet. 40 µl Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und mit 50 mM Calciumchloridlösung auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis, für 1 min bei 42 °C (ohne Schütteln) und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 µl SOC-Medium und die Suspension wurde im Thermomixer für 1 h bei 37 °C und 300 rpm (*revolutions per minute*) geschüttelt. 400 µl der Bakteriensuspension wurden in Abhängigkeit des Resistenzgens des verwendeten Plasmids auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Als Antibiotika wurden 200 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin verwendet. Von mehreren Bakterienkolonien wurde eine Vorkultur (5 ml Bakterienmedium (LB (Luria Broth) -Medium) mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt. Für eine Großkultur wurde 1 ml der Vorkultur mit 200 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) in einem 1 l Erlenmeyerkolben verwendet und wieder über Nacht bei 37 °C und 230 rpm geschüttelt.

- SOC-Medium: 0,5 % (w/v; Gewicht/Volumen) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton/Pepton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose in destilliertem Wasser (dH₂O)
- LB-Medium, flüssig: 1 % (w/v) Trypton/Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 85 mM NaCl
- LB-Agarplatten: 1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Flüssigmedium

2.2.1.2 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation großer Mengen an Plasmid-DNA aus 200 ml einer Großkultur wurde der *Nucleo Bond*[®] Xtra Maxi Plus EF Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte am Photometer (Kap. 2.2.1.3) und die Qualität der DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Kap. 2.2.1.4).

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines UV (Ultraviolett) -Spektrometers bestimmt. Die DNA-Proben wurden mit dH₂O verdünnt und die Absorption (A) für die beiden Wellenlängen bei 260 und 280 nm am Photometer gemessen. Die Konzentration der DNA (C in µg/µl) wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$C(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ (Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA) } / 1000$$

Als Maß für die Reinheit der Probe wurde der Quotient aus A 260 nm/A 280 nm ermittelt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um Verunreinigungen mit Proteinen auszuschließen.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese untersucht, um Kontamination mit RNA bzw. genomischer DNA auszuschließen. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus Rotalgen gewonnen. Für die elektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA wurden Gele mit 1 % (w/v) Agarose verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (Tris-Acetate-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) -Puffer) aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff bindet an DNA und kann aufgrund seiner Fluoreszenz im UV-Licht visualisiert werden. Diese Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Nach der Polymerisation der Agarose wurde die Plasmid-DNA (500 ng/5 µl) mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Als Größenstandard wurde ein 250 bp Marker verwendet. Die Auftrennung der Plasmid-DNA entsprechend ihrer Größe erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 - 100 V. Die Plasmid-DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

- 1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan) (pH 7,6), 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0)
- Agarosegellösung: 1 % (w/v) Agarose, 0,01 % (v/v, (Volumen/Volumen)) Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) in TAE-Puffer
- 5 x DNA-Probenpuffer: 50 % (w/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromophenolblau und 0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol in TAE Puffer

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dafür wurden sterile Plastikwaren verwendet. Aufzucht und Wachstum aller Linien erfolgte bei 37 °C, 96 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Anteil im Inkubationsschrank.

Die Jurkat T-Zellen JE6.1 und Raji B-Zellen wurden in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) -1640 - Medium mit 10 % fötalen Kälberserum (FCS) in Zellkulturflaschen kultiviert. Das FCS wurde vor der Verwendung hitzeinaktiviert (56 °C für 30 min). Diese Zellen wurden regelmäßig alle 48 - 72 h mit frischem Zellkulturmedium auf 0,06 - 0,12 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei allen Versuchen eine Zellzahl von 0,2 - 0,3 x 10⁶ Zellen/ml verwendet.

- Zellkulturmedium: RPMI-1640-Medium mit 10 % (v/v) FCS

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 µl der Zellkultursuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Dieser Azofarbstoff bindet Proteine im Zytosol. Abgestorbene Zellen mit defekter Zellmembran werden daher blau gefärbt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden alle Zellen,

die sich innerhalb von vier Großquadraten befinden, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus dem gemittelten Ergebnis dieser Zählung lässt sich, unter Berücksichtigung der Verdünnung (1:2) und der Standardmaße der Zählkammer, rechnerisch die Zellzahl wie folgt ermitteln:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Mittelwert der gezählten Zellen}) \times 2 (\text{Verdünnung}) \times 10000.$$

2.2.2.3 Elektroporation

Die Plasmid-DNA wurde mithilfe der Elektroporation in Jurkat T-Zellen transfiziert. Hierfür wurde ein elektrischer Impuls erzeugt, der die Zellmembran kurzzeitig durchlässig macht, sodass die DNA aus der Umgebung aufgenommen werden kann. Pro Transfektionsansatz wurden 20 Millionen (Mio.) Zellen verwendet, abzentrifugiert (301 g, 4 min, 20 °C) und in PBS-CM (*Phosphate buffert saline with Calcium and Magnesium*) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 350 µl PBS-CM resuspendiert und in die Elektroporationsküvette (4 mm) überführt. Nach Zugabe von bis zu 40 µg DNA (bzw. 20 µg shRNA-Konstrukt und 20 µg pmCherry-C1) wurde der Ansatz im *Gene Pulser II* bei 250 V und 950 µF elektroporiert. Nach der Entfernung des DNA-Gerinnensels wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit 25 ml frischem und 25 ml altem RPMI versetzt und kultiviert. 24 h nach der Elektroporation mit den verschiedenen Konstrukten zur RNAi wurden die Jurkat T-Zellen mit frischem Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $0,12 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und erst nach weiteren 24 h für die Experimente verwendet. Da der pCMS3 zur RNA-Interferenz unter dem SV40-Promotor das EGFP exprimiert, konnte 48 h nach der Transfektion der Jurkat T-Zellen eine Transfektionseffizienz von 90 – 80 % EGFP-exprimierenden Zellen im Durchflusszytometer ermittelt werden.

2.2.2.4 Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurde der Ligand ICAM-1 für das Integrin LFA-1 verwendet. Zuerst erfolgte die Immobilisierung von ICAM-1 (5 µg/50 µl) auf Petrischälchen. Diese Lösungen wurden in die Mitte der Petrischälchen aufgetropft und 120 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und dreimal mit 50 µl PBS gewaschen. Nach dem letzten Absaugen wurde das Schälchen mit Blockpuffer überschichtet, über Nacht bei 4 °C inkubiert und dann bei -20 °C gelagert. Pro Ansatz wurden 2 Mio. Jurkat T-Zellen benötigt und abzentrifugiert (4 min, 301 g, RT). Das Zellpellet wurde in 1 ml HBSS (Hank's gepufferter Salzlösung) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 30 min bei 37 °C stimuliert (10 µg/ml OKT3, 50 ng/ml PMA oder 1 mM MgCl₂ in HBSS). Die vorbereiteten Petrischälchen wurden mit je 1 ml HBSS gewaschen und dann erfolgte die Zugabe der Zellsuspension für weitere 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurden nicht adhärenzte Zellen nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml HBSS entfernt und die adhärenzten Zellen mit 1 ml PBS/3,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Zellzahl von grün fluoreszierendem Protein EGFP-positiven Zellen wurde mit Hilfe eines Rasterokulars am Fluoreszenzmikroskop von drei unabhängigen Flächen (je mm²) ermittelt.

- Fc-konjugierte humane ICAM-1-Stammlösung: (ICAM-1-Fc 10 µg/µl in PBS)
- Blockpuffer: 0,5 % BSA (w/v) in PBS
- PBS/3,5 % PFA: 3,5 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS

2.2.2.5 Konjugatbildung

Superantigene (SA) vernetzen die Vβ-Kette des TZR vieler T-Zellen mit den MHC-II-Molekülen der APZs (Fraser und Proft 2008), sodass sie für die Konjugatbildung von Jurkat T-Zellen mit den Raji B-Zellen als APZs verwendet werden können. Zur Unterscheidung der EGFP-positiven Jurkat T-Zellen von Raji B-Zellen wurden diese vor der Beladung mit SA SEE mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Far-Red-DDAO-SE gefärbt. 4 Mio. Raji B-Zellen wurden zweimal mit je 5 ml RPMI-1640 (4 min, 301 g, RT) in einem 15 ml Falconröhrchen gewaschen. Das Zellpellet wurde in 2 ml RPMI-1640 resuspendiert und zu diesem Ansatz 10 µl der *Far-Red-DDAO-SE*-Stammlösung gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C im Zellkulturinkubator wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Zellkulturmedium gewaschen, um nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde mit 20 µl des SA (SEE-Lösung) versetzt (beladene Zellen) und der verbliebene Ansatz mit 20 µl PBS für 1 h inkubiert (unbeladene Zellen). Nach 1 h Inkubation im Zellkulturinkubator wurden die Zellsuspensionen mit je 2 ml Zellkulturmedium gewaschen und in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Konjugation wurden jeweils 1×10^5 Jurkat T-Zellen in 200 µl Zellkulturmedium mit je 1×10^5 Raji B-Zellen in 200 µl Zellkulturmedium in einem FACS-Röhrchen gemischt und für 30 min in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension vorsichtig gemischt, um unspezifische Interaktionen zu reduzieren, und die Zellen wurden in 0,5 ml PBS/1 % PFA fixiert. Der prozentuale Anteil der Konjugate (doppelt-positive (grüne und rote) Zellen) wurde am Durchflusszytometer ermittelt.

- Far-Red-DDAO-SE Stammlösung: 0,5 M in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst
- Zellkulturmedium: RPMI-1640-Medium mit 10 % (v/v) FCS
- SEE-Lösung: 200 µg (w/v) SEE in PBS
- PBS/1 % PFA: 1 % (w/v) PFA in PBS

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Stimulation von Jurkat T-Zellen und Herstellung von Lysaten

Zur Stimulation von Jurkat T-Zellen für Western Blot (WB) -Analysen und zur Immunpräzipitation (IP) wurden pro Zeitpunkt $2 - 5 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert (4 min, 301 g, 20 °C). Das Zellpellet wurde in 300 - 1000 µl kaltem RPMI aufgenommen und die Zellen bis zur Stimulation auf Eis gestellt. Unmittelbar vor der Stimulation wurden die Zellen für 2 min bei 4 °C und 301 g abzentrifugiert und das Zellpellet in 300 - 1000 µl Ak-Gemisch (1:2 mAK C305-Überstand mit RPMI-1640) oder PMA (100 ng/ml) aufgenommen und unter Schütteln bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch die

Zugabe von 1 - 5 ml kaltem PBS abgestoppt und die Zellen nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 301 g, 4 °C) lysiert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lyse der Zellen mit dem frisch hergestellten Lauryl maltoside/N-dodecyl- β -D-maltoside (LM)/Nonidet P40 (NP40) -Lysepuffer. Das Zellpellet von 2 - 5 x 10⁶ Jurkat-Zellen wurde in 60 - 300 μ l Lysepuffer lysiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellbruchstücke entfernt (10 min, bei 16100 g, 4 °C) und das Lysat in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die Proteinbestimmung wurde eine 1:100 Verdünnung der Lysate angefertigt.

- LM/NP40-Lysepuffer: 1 % (v/v) NP40, 1 % (v/v) LM, 1 mM NaV, 50 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA, 10 mM NaF, 150 mM NaCl, Pefabloc®Sc (PEFA-Block) (10 μ g/ml) und 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)

2.2.3.2 GST-Pulldown-Assay zur Messung der Aktivität von Rap1 und Rac

Je 5 x 10⁶ Jurkat T-Zellen wurden wie im Kap. 2.2.3.1 beschrieben stimuliert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 500 μ l GTPase-Lysepuffer 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 min bei 12000 g und 4 °C abzentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Aliquots von 40 μ l je Probe wurden entnommen, um im Western Blot (WB) die Reduktion der Expression von SLP-76 bzw. die Expression der GTPasen zu ermitteln. Zu den Lysaten erfolgte im Anschluss die Zugabe von 20 μ g der GST-Fusionsproteine (Tab. 2.5) und 30 μ l Glutathion-Sepharose je Probe. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C unter ständiger Rotation des Gefäßes wurden die Proben für 30 s bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert und dreimal mit 500 μ l Lysepuffer gewaschen. Für die Analyse der präzipitierten GTPase in der SDS-PAGE, (Kap. 2.2.3.6) wurde die Sepharose mit 40 μ l 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und der Ansatz 5 min bei 99 °C aufgeköcht.

- GTPase-Lysepuffer: 50 mM TrisHCl (pH 7,4), 500 mM NaCl, 1 % (v/v) NP40, 10 % (w/v) Glycerin, 2,5 mM MgCl₂, 10 μ g/ml PEFA-Block, 25 mM NaF; 1 mM Vanadate und 1 mM PMSF
- 1 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris (pH 6,8), 10 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 1 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.3.3 Isolierung von zytosolischen- und plasmamembranhaltigen Fraktionen

Für die Isolierung von Plasmamembranen wurden 5 x 10⁶ Jurkat T-Zellen nicht stimuliert oder stimuliert (s. Kap. 2.2.3.1) mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und in 300 μ l hypotonischen Lysepuffer aufgenommen. Zum mechanischen Aufbrechen der Zellen wurde diese Suspension 20-mal durch eine 2 ml Spritze mit einer 27 G Kanüle aufgezogen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellkerne und noch intakte Zellen durch Zentrifugation (10 min, 100 g, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10 min, 16000 g, 4 °C). Der Überstand wurde aufgehoben (zytosolische Fraktion). Das Pellet wurde zweimal in 300 μ l hypotonischem Lysepuffer

gewaschen und in 100 µl NP-40-hypotonischem Lysepuffer resuspendiert. Für die Proteinbestimmung wurde eine 1:50 Verdünnung der Lysate verwendet.

- Hypotonischer Lysepuffer: 10 mM Hydroxyethylpiperazinethansulfonat (HEPES) (pH 7,4), 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF
- NP-40-hypotonischer Lysepuffer: 10 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40

2.2.3.4 Proteinbestimmung modifiziert nach Bradford

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde die zu untersuchende Probe mit einer Roti[®]-Nanoquant-Lösung nach Angaben des Herstellers versetzt und am Photometer vermessen. In der Roti[®]-Nanoquant-Lösung ist der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G* enthalten, der an Proteine bindet und das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Als Referenz diente eine BSA-Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 100 µg/ml). Die Auswertung erfolgte am ELISA Reader Dynatech MR 5000 mit Hilfe des Programms BioLinX[©].

2.2.3.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) beschreibt die Ausfällung von Antigen-Ak-Komplexen (Firestone und Winguth 1990). Koimmunpräzipitationsstudien wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um konstitutive und induzierbare Interaktionen von SKAP55 oder SLP-76 zu untersuchen. Hierfür wurden Proteinmengen von 200 µg von unbehandelten bzw. stimulierten Jurkat T-Zellen verwendet. Lysate von unstimulierten bzw. stimulierten humanen primären T-Zellen (500 µg Totalprotein) wurden mir von Frau. Dr. S. Kliche zur Verfügung gestellt. Die Lysate wurden mit LM/NP40-Lysispuffer (Kap. 2.2.3.1) auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Die Konzentrationen, der für die in der IP verwendeten Ak, sind der Tab. 2.12 zu entnehmen. Pro Ansatz erfolgte dann die Zugabe von 30 µl immobilisiertem Protein A (für Kaninchenseren (Richman et al. 1982)) bzw. Protein G (für Schafseren (Akerström und Björck 1986)) an Agarose-Beads. Zur IP wurden die Ansätze für 2 h bei 4 °C unter ständiger Rotation des Gefäßes inkubiert. Nach beendeter Präzipitation wurden die Beads (1 min, 6000 g, 4 °C) abzentrifugiert und dreimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Für die Analyse der Präzipitate in der SDS-PAGE (Kap. 2.2.3.6) wurden die Beads mit 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 99 °C für 10 min gekocht.

- Waschpuffer: 0,1 % (v/v) LM, 0,1 % (v/v) NP-40, 1 mM PMSF, 10 nM NaF, 0,15 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7,8)
- 1 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris (pH 6,8), 10 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 1 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Dazu wurden die

Proteinproben mit 1 x bzw. 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 - 10 min bei 99 °C auf dem Thermoblock gekocht. In diesem Schritt denaturieren Proteine, binden an das ionische Detergenz SDS und werden dadurch negativ geladen. Das führt dazu, dass ihre Eigenladung überlagert wird (Reynolds und Tanford 1970). Für die Auftrennung wurde eine Trägersubstanz aus polymerisiertem Acrylamid verwendet. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und dann in einem Trenngel der Größe nach aufgetrennt. Innerhalb einer angelegten Spannung (120 V) wanderten die Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht in Richtung der Anode (Laemmli 1970). Ein vorgefärbter Proteinmarker diente als Richtwert für die Abschätzung der Molekulargewichte. In Tab. 2.14 sind die Pipettierschemata für die Trenngele (10 % oder 12,5 %) und Sammelgele (für zwei Versuchsansätze) dargestellt.

Tab. 2.14: Pipettierschema für die SDS-PAGE.

| Zusammensetzung | Trenngel (10 %) | Trenngel (12,5 %) | Sammelgel (5 %) |
|----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| dH ₂ O | 3,75 ml | 3 ml | 5,15 ml |
| Trenngelpuffer | 2,25 ml | 2,25 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | - | 2,1 ml |
| Acrylamidlösung 30 % | 3 ml | 3 ml | 1,13 ml |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | 12,5 µl | 12,5 µl | 12,5 µl |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | 60µl | 60 µl | 60 µl |

- 1 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris (pH 6,8), 10 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 1 % (w/v) Bromphenolblau
- 5 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris (pH 6,8), 50 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 1 % (w/v) Bromphenolblau
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris (pH 6,8), 0,4 % (w/v)
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- APS-Lösung: 10 % APS (w/v) in dH₂O

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Western Blot

Im Western Blot (WB) wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mittels Ak-Färbung spezifisch detektiert (Towbin et al. 1979). Für den Transfer der Proteine wurde das Semi-Dry-Verfahren bei einer konstanten Stromstärke (z. B. 140 mA für ein Gel) für 1 h verwendet (Tovey und Baldo 1987). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit einer Ponceau-S-Lösung gefärbt, um das

Bandenmuster der Proteine sichtbar zu machen und zu kontrollieren, ob die Proteine gleichmäßig und ohne Luftblasen auf die Membran übertragen wurden. Vor der Inkubation mit dem primären Ak wurde die Membran 1 h mit Blockpuffer auf dem Schüttler inkubiert, um verbliebene Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und so spätere unspezifische Bindungen des Ak an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem entsprechenden primären Ak (Tab. 2.12) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für je 5 min mit Tween 20 -haltigen PBS (PBST)-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Ak (Tab. 2.13) inkubiert. Nach weiteren drei Waschgängen wie zuvor beschrieben wurde die Membran für 1 min mit dem Roti-Lumin behandelt, welches eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion auslöste. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran wurde das Chemilumineszenzsignal übertragen und anschließend der Film entwickelt. Um verschiedene Proteine zu detektieren, wurde die Membran für 45 min mit einer Natriumazidlösung inkubiert. Das Natriumazid inaktiviert die an den sekundären Ak gebundene Peroxidase und damit dessen Chemilumineszenzsignal. Anschließend konnte nach dreimaligem Waschen die Membran zur Detektion weiterer Proteine mit Ak einer anderen Spezies verwendet werden.

- Transferpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037 % SDS, 20 % (v/v) Methanol
- Ponceau S-Lösung: 2 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure
- PBST-Waschpuffer: 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS (pH 8,6)
- Blockpuffer: 5 % (w/v) Milchpulver in PBST
- Tris-gepufferte Saline (TBS) für Strippuffer: 10 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl
- Natriumazidlösung: 1 % (w/v) Natriumazid in TBS (*Tris buffert saline*)

2.2.4.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)) können Zellen (oder kleinste Teilchen) nach ihrer Größe, Oberflächenstruktur und ihrer intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden. In meinen Versuchen wurden Oberflächenrezeptoren oder intrazelluläre Moleküle in T-Zellen mit Ak detektiert. Die Ak sind entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder können durch eine indirekte Markierung mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten (Fluorescein Isothiocyanat (FITC) oder Allophycocyanin (APC)) sekundären Ak nachgewiesen werden. Diese Fluorophor-markierten Zellen werden im Durchflusszytometer mit einem Laserstrahl angeregt und das emittierte Licht kann anhand seiner Wellenlänge ein farbabhängiges, spezifisches Signal auslösen und dann detektiert werden.

2.2.4.2.1 Oberflächenexpression des TZR und CD18

Für die Analyse von Oberflächenrezeptoren wie dem TZR oder der β -Kette des Integrins LFA-1 (CD18) auf Jurkat T-Zellen wurden 2×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 301 g, 4 °C) und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden jeweils in 100 μ l kaltem PBS resuspendiert, welches den entsprechenden Ak enthielt. Nach dem Mischen der Ansätze wurden diese für 30 min auf Eis inkubiert. Die Ak-Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml kaltem PBS gestoppt und die Zellen sedimentiert (5 min, 301 g, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 100 μ l des verdünnten FITC/APC-konjugierten sekundären Ak resuspendiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die nur den sekundären Ak enthielt. Die Proben wurden für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und dann mit eiskaltem 1 ml PBS gewaschen (5 min, 301 g, 4 °C). Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300 μ l PBS/1 % PFA fixiert und am Durchflusszytometer gemessen. Die Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Ak sind in den Tab. 2.12 und Tab. 2.13 angegeben.

2.2.4.2.2 Calciummessung

Jurkat T-Zellen wurden auf eine Zellzahl von $0,3 \times 10^6$ /ml mit Zellkulturmedium (ohne Phenolrot) in einem FACS-Röhrchen eingestellt und gewaschen (301 g, 4 min, RT). Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Der Farbstoff Indo-1 wurde eingesetzt, um die Freisetzung von Calcium in der FACS-Analyse messen zu können. Nach der Zugabe von 5 μ l der Indo-1-Lösung pro Ansatz wurden die Zellen vorsichtig gemischt und für 45 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Überschüssige Indo-1-Lösung wurde durch einmaliges Waschen (301 g, 4 min, RT) entfernt. Das in 1 ml Zellkulturmedium resuspendierte Zellpellet wurde für weitere 30 min im Inkubator belassen. Nach dem Waschen (301 g, 4 min, RT) wurden die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gestellt. Vor der Messung wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und für 5 min bei 37 °C im Thermomixer (ohne Schütteln) inkubiert. Anschließend wurde die Probe in ein FACS-Röhrchen überführt und am analytischen Durchflusszytometer (LSR-Gerät) gemessen. Nach 30 s wurden die Zellen mit 20 μ l anti-CD3-Ak C305 stimuliert. Nach dem Abklingen des TZR-vermittelten Calciumeinstroms erfolgte die Zugabe von 10 μ l der Ionomycinlösung. Ionomycin wirkt als Ionophore, transportiert Calcium durch Membranen und dient als Nachweis für das Vorhandensein von intrazellulärem Calcium.

- Zellkulturmedium: RPMI-1640 ohne Phenolrot mit 10 % (v/v) FCS
- Indo-1-Lösung: 1 μ g/ μ l in DMSO
- Ionomycinlösung: 0,1 μ g Ionomycin in PBS

2.2.4.2.3 Löslicher ICAM-1-Bindungstest

Zum Nachweis der Induktion der hochaffinen Konformation der Integrine auf Jurkat T-Zellen wurde der lösliche ICAM-1- und VCAM-Bindungstest verwendet. Jurkat T-Zellen ($0,5 \times 10^5$ pro Ansatz) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, pelletiert (5 min, 301 g, RT) und mit verschiedenen Reaktionsansätzen (je 500 μ l) behandelt:

- 1) HBSS + BSA (10 μ g/ml) + ICAM-1 Fc (20 μ g/ml)
- 2) HBSS + OKT3 (10 μ g/ml) + ICAM-1 Fc (20 μ g/ml)
- 3) HBSS + BSA (10 μ g/ml) + ICAM-1Fc (20 μ g/ml) + PMA (100 ng/ml) oder
- 4) HBSS + BSA (10 μ g/ml) + ICAM-1 Fc (20 μ g/ml) + Mg^{2+} /EDTA (1 mM $MgCl_2$ und 1 mM EDTA)

Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 37 °C im CO_2 -Brutschrank inkubiert und anschließend mit 1 ml eiskaltem HBSS gewaschen (5 min, 301 g, 4 °C). Zur Detektion des gebundenen ICAM-1-Fc (oder von VCAM-Fc) wurden die Zellpellets mit 500 μ l FITC oder APC-konjugierten Ziege-anti-human-IgG (Fc-spezifisch) sekundären Ak (Tab. 2.13) in HBSS für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 1 ml eiskaltem HBSS wurden die Zellen in 300 μ l PBS/1 % PFA fixiert und am Durchflusszytometer gemessen.

2.2.4.2.4 CD69-Expression

Für die Induktion der CD69-Expression in Jurkat T-Zellen wurden die Löcher einer 48-Loch-Platte am Vortag mit je 500 μ l PBS + anti-CD3-Ak OKT3 (1 μ g/ml) oder + Bovines Serumalbumin (BSA) (1 μ g/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach 24 h wurden die Löcher dreimal mit je 500 μ l PBS gewaschen. Jurkat T-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^5 /ml in RPMI mit 1 % FCS eingestellt. Je 500 μ l dieser Zellsuspension wurden in ein Loch der 48-Lochplatte gegeben und die Platte für 12 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen auf BSA-behandelten Löchern zusätzlich mit 100 ng/ml PMA stimuliert. Nach 12 h wurden unbehandelte oder stimulierte Zellen in FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 301 g, 4 °C). Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen jeweils mit 100 μ l APC-konjugierter CD69-Ak-Lösung in PBS resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen (5 min, 301 g, 4 °C). Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300 μ l PBS/1 % PFA fixiert und am Durchflusszytometer gemessen.

2.2.4.2.5 Bestimmung des F-Aktin gehalts

Zur Detektion des filamentösen Aktins (F-Aktin) wurde das Toxin Phalloidin des grünen Knollenblätterpilzes verwendet. Jurkat T-Zellen ($0,5 \times 10^5$ pro Ansatz) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 301 g, RT). Das Zellpellet wurde in 500 μ l PBS + anti-CD3-Ak OKT3 (10 μ g/ml) oder PBS + BSA (10 μ g/ml) resuspendiert und für 15 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Stimulation wurde durch die Zugabe von 500 μ l der F-Aktinfärbelösung gestoppt. Nach 15 min

Inkubation wurden die Zellen mit PBS/1 % PFA gewaschen (5 min, 301 g, 4 °C), in 300 µl PBS/3,5 % PFA resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen.

- F-Aktinfärbelösung: 4 % (w/v) PFA, 2 µg/ml Phalloidin-Alexa Fluor 633 und 0,2 % Triton X-100 in PBS
- PBS/3,5 % PFA: 3,5 % (w/v) PFA in PBS

2.2.4.2.6 Intrazelluläre Färbung für SLP-76, ADAP, SKAP55 und RIAM

Zur Detektion der oben genannten Proteine wurde mir das Protokoll der AG Kliche zur Verfügung gestellt. Die Spezifität der verwendeten Ak wurde vorher in Anwesenheit oder nach Verlust/Reduktion der Expression dieser Proteine getestet (Horn et al. 2009). Jurkat T-Zellen (1×10^6 /ml) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und die Zellen abzentrifugiert (301 g, 4 min, RT). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl Fixierlösung resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer 1 gewaschen (301 g, 4 min bei RT) und zur Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in 500 µl Permeabilisierungspuffer für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die Ak (Tab. 2.12) wurden in Waschpuffer 2 verdünnt und das Zellpellet in 100 µl der Ak-Lösung aufgenommen. Nach 1h Inkubation bei RT wurden die Zellen zweimal mit jedem Waschpuffer gewaschen (301 g, 4 min, RT) und die Zellpellets in 100 µl der verdünnten APC-konjugierten sekundären Ak-Lösung (Tab. 2.13) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min im Dunkeln bei RT erfolgte die Entfernung nicht gebundener sekundärer Ak nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml Waschpuffer 2 (301 g, 4 min bei RT). Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellpellets in 500 µl PBS/1 % PFA resuspendiert.

- Fixierungslösung: 2 % PFA (v/v) in PBS
- Saponinlösung: 10 % (w/v) Saponin in HBSS
- Waschpuffer 1: 2 % (v/v) FCS in HBSS
- Permeabilisierungspuffer: 2 % (v/v) FCS, 0,5 % (v/v) Saponin in HBSS
- Waschpuffer 2: 2 % (v/v) FCS, 0,2 % (v/v) Saponin in HBSS

2.2.4.2.7 Intrazelluläre Färbung zur Detektion von phosphorylierter ERK1/2, ZAP-70 und PLC γ 1

Je 1×10^6 Jurkat T-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 5 min mit dem anti-CD3-Ak C305 stimuliert (s. Kap. 2.2.3.1). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml kaltem PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) gestoppt und die Zellen nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 301 g, 4 °C) nach Zugabe von 1 ml PBS/2 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurde die Zellen abzentrifugiert (5 min, 301 g, 4 °C) und in 1 ml PBS/Methanol zur Permeabilisierung aufgenommen. 300 µl dieser Zellsuspension wurden abzentrifugiert und zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen in 100 µl PBS/BSA für 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit 500 µl PBS/BSA wurden die Zellen in 100

µl Ak-Lösung in PBS/BSA (Tab. 2.12) aufgenommen und 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen (5 min, 301 g, 4 °C) mit 2 ml PBS/BSA wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

- PBS/2 % PFA: 2 % (v/v) PFA in PBS
- PBS/Methanol: 90 % Methanol (v/v) in PBS
- PBS/BSA: 0,5 % BSA (w/v) in PBS

2.2.4.3 Integrinmultimerisierung

Zur Entfernung der Schutzschicht auf den Reaktionsfeldern der Adhäsionsobjektträger wurden diese zweimal in 50 ml dH₂O gewaschen und in 50 ml eiskaltem PBS gelagert. Die Jurkat T-Zellen (1×10^6) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (4 min, 301 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 200 µl Ak-Lösung zur Stimulation für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der nicht gebundenen Ak wurde die Suspension zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen (4 min, 301 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 200 µl Streptavidinlösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Stimulation der Zellen wurde durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS gestoppt. Nach der Zentrifugation (4 min, 301 g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und 20 µl der Suspension wurden auf die Reaktionsfelder des Adhäsionsobjektträgers gegeben. Zum Absetzen der Zellen wurde der Objektträger 15 min auf Eis inkubiert und nicht gebundene Zellen in 50 ml eiskaltem PBS entfernt. Die Zellen auf den Reaktionsfeldern des Objektträgers wurden mit 20 µl Fixierlösung für 15 min bei RT fixiert. Der Objektträger wurde zweimal in 50 ml PBS für 5 min gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 20 µl Blocklösung für 15 min bei RT blockiert. Nach dem Waschen des Objektträgers wurden die fixierten Zellen auf den Reaktionsfeldern mit 20 µl einer FITC-konjugierten CD18-Ak-Lösung in Blockpuffer für 1 h bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach dreimaligem Waschen in je 50 ml PBS für 5 min wurden 15 µl Eindeckmedium auf die Reaktionsfelder gegeben und diese mit einem Deckglas (24 x 50 mm) abgedeckt. Am nächsten Tag wurden die beiden Gläser mit Nagellack abgedichtet, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden dann am konfokalen Lasermikroskop auf die TZR-vermittelte Integrinmultimerisierung untersucht.

- Ak-Lösung zur Stimulation: 5 µg/µl Biotin-konjugierter anti-CD3-Ak (UCHT) in RPMI-1640
- Streptavidinlösung: 2,5 µg/ml Streptavidin in RPMI-1640
- Fixierlösung: 3,5 % (w/v) PFA in PBS
- Blocklösung: 5 % (v/v) Pferdeserum in PBS
- Eindeckmedium: 2,4 g Mowiol 4-88 und 6 g Glycerin wurden gelöst in 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5)

2.2.5 Statistische Analyse der Daten

Die statistische Signifikanz von Unterschieden wurde mit Hilfe des Student-t-Tests bestimmt (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001). Die Standardfehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Interferenz von SLP-76 in Jurkat T-Zellen

Für alle Experimente wurde die Jurkat T-Zelllinie JE6.1 verwendet. In dieser Zelllinie konnte unsere AG die Expression von SKAP55 herunterregulieren, um die Funktion dieses zytosolischen Adapterproteins bei der TZR-vermittelten Adhäsion zu untersuchen (Kliche et al. 2006). Für die Etablierung der shRNA Interferenz wurden zuerst unterschiedliche Mengen des Konstrukts zur shRNA von SLP-76 (shSLP-76; pCMS3-shSLP-76) in Jurkat T-Zellen elektroporiert, um die optimale Menge an DNA für die Reduktion dieses Adapterproteins zu ermitteln. Als Negativkontrolle diente das Konstrukt pCMS3-shK (shK), bei dem die Zielsequenz der shRNA gegen das Gen Luziferase gerichtet ist. Dieses Enzym wird nicht in humanen T-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurden von ruhenden Transfektanten Zelllysate hergestellt und im Western Blot (WB) auf die Reduktion der SLP-76-Expression untersucht. Wie in Abb. 3.1 gezeigt, konnte eine deutliche Reduktion der endogenen SLP-76-Expression in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an DNA nachgewiesen werden. Bei der Elektroporation von 40 µg des pCMS3-shSLP-76 Vektors wurde im Vergleich zum Kontrollvektor shK die Expression von SLP-76 im WB nicht mehr detektiert (Abb. 3.1). Um zu überprüfen, ob die RNA-Interferenz von SLP-76 nicht die Expression von ADAP, SKAP55 und RIAM beeinflusst, wurde das Expressionsniveau dieser Proteine ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Reduktion der SLP-76-Expression hatte keinen Einfluß auf die Expression der beiden zytosolischen Adapterproteine sowie dem Rap1 Effektorprotein RIAM (Abb. 3.1).

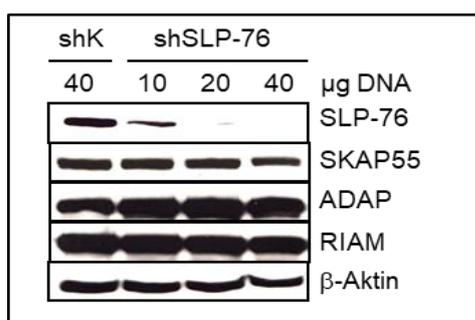


Abb. 3.1: Etablierung der shRNA-Interferenz von SLP-76 in Jurkat T Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen DNA der Konstrukte pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurden von diesen Zellen Lysate für den WB angefertigt und auf die Expression von SLP-76, ADAP, SKAP55 und RIAM untersucht. Die Detektion von β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer WB von jeweils drei durchgeführten Experimenten.

Zusätzlich wurde die Reduktion der SLP-76-Expression in der Durchflusszytometrie verifiziert (Abb. 3.2A). Da der in dieser Studie verwendete pCMS3-Vektor über den SV40-Promotor (s. Abb. 1.5B) EGFP exprimiert, können in den Transfektanten gezielt EGFP-positive Zellen mit dieser Methode analysiert werden. Ebenfalls konnte mit dieser Methode in den shSLP-76-Transfektanten eine deutlich verminderte Reduktion der Expression von SLP-76 bis zu ca. 90 % ermittelt werden. Auch mit dieser Technik hatte die Reduktion der Expression von SLP-76 keinen Einfluss auf die Proteinexpression von ADAP, SKAP55 oder RIAM (Abb. 3.2A). Zusätzlich wurde auch die Expression der für meine Arbeit

relevanten Oberflächenrezeptoren den TZR und CD18 von LFA-1 miteinbezogen. Die Reduktion der SLP-76-Expression hatte keine Auswirkungen auf die Expression dieser Rezeptoren (Abb. 3.2B).

Diese Daten zeigen, dass die Reduktion der Expression von SLP-76 mittels shRNA in Jurkat T-Zellen erfolgreich etabliert werden konnte. Die Expression von ADAP, SKAP55 und RIAM wurde durch die Reduktion der SLP-76-Expression nicht beeinflusst.

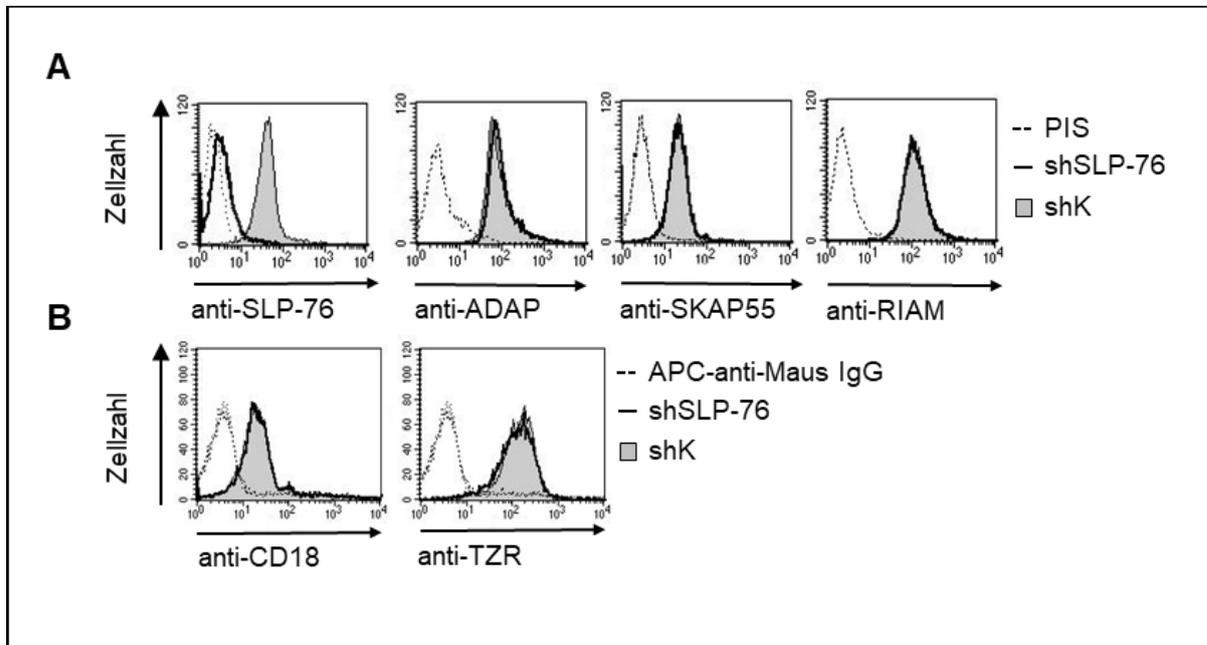


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Analyse der Signalmoleküle nach Reduktion der SLP-76-Expression. (A) In Jurkat T-Zellen, die mit 40 μ g shSLP-76- und shK-transfiziert waren, wurde nach 48 h die Expression von SLP-76, ADAP, SKAP55 und RIAM in der intrazellulären Färbung dieser Proteine in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Als Negativkontrolle zum Nachweis der Expression von ADAP und SLP-76 wurde ein Präimmunserum (PIS) vom Schaf verwendet. Als Negativkontrolle zum Nachweis der Expression von SKAP55 und RIAM wurde ein mAk gegen GST aus der Ratte verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf/Ratte-IgG-Ak detektiert. Das Expressionsniveau der Proteine in den Zellen wurde am Durchflusszytometer gezielt in GFP-positiven Zellen untersucht. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (n = 2). (B) Die Transfektanten wurden ebenfalls mit einem CD3-Ak (TZR) oder CD18-Ak (LFA-1) inkubiert. Gebundene Ak wurden mit einem APC-konjugierten anti-Maus-IgG-Ak nachgewiesen. Am Durchflusszytometer wurden gezielt auf GFP-exprimierende Zellen die Expression der Rezeptoren ermittelt. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind gezeigt (n = 2).

3.2 Einfluss der verminderten SLP-76-Expression auf die TZR-vermittelte Aktivierung von PLC γ 1 und ERK1/2, der Calciumfreisetzung sowie der CD69-Hochregulation

Yablonski und Kollegen konnten in der SLP-76-defizienten Jurkat T-Zelllinie J14 zeigen, dass die TZR-vermittelte Aktivierung von PLC γ 1 inhibiert ist (Yablonski et al. 1998). Die Studie von Kim et al. belegt, dass die Phosphorylierung von Y783 (Tyrosin 783) essenziell für die Aktivierung der PLC γ 1 ist (Kim et al. 1991). Daher wurde überprüft, ob nach Reduktion der SLP-76-Expression die TZR-induzierte Phosphorylierung von PLC γ 1 an Y783 reduziert war. In diese Untersuchungen wurde auch die TZR-vermittelte Aktivierung von ZAP-70 einbezogen, da SLP-76 ein physiologisches Substrat von ZAP-70 ist (Bubeck Wardenburg et al. 1996) und der Verlust von SLP-76 nicht die Phosphorylierung von ZAP-70

inhibiert (Yablonski et al. 1998). Um die Aktivität von ZAP-70 zu untersuchen, wurde Y319 ausgewählt, welches in der Interdomäne B lokalisiert ist und an der Aktivierung dieser Kinase beteiligt ist (Williams et al. 1999). Für die Messung der Phosphorylierung von PLC γ 1 an Y783 und der von ZAP-70 an Y319 wurden phosphospezifische Ak in der Durchflusszytometrie eingesetzt.

Jurkat T-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor shK und dem shSLP-76 Vektor transfiziert. Nach 48 h wurde die Reduktion der SLP-76-Expression nur in den shSLP-76-Transfektanten bestätigt (Abb. 3.3A). Die Zellen wurden nicht aktiviert oder mit einem CD3-Ak für 5 min. stimuliert. Zur Detektion der phosphorylierten PLC γ 1 an Y783 oder der von ZAP-70 an Y319 wurden APC-konjugierte Ak verwendet. In den shK-Transfektanten wurde nach Stimulation des TZR eine verstärkte Phosphorylierung an Y783 der PLC γ 1 nachgewiesen (Abb. 3.3B). Im Gegensatz zu shK-Transfektanten konnte in TZR-stimulierten shSLP-76-transfizierten Zellen keine erhöhte Y783-Phosphorylierung der PLC γ 1 festgestellt werden. Im Gegensatz zur reduzierten Y783-Phosphorylierung der PLC γ 1 in shSLP-76 transfizierten Jurkat T-Zellen konnte nach Stimulation des TZR sowohl in shSLP-76-, als auch in den shK-Transfektanten eine vergleichbare Y319-Phosphorylierung der ZAP-70 ermittelt werden (Abb. 3.3B). Diese Daten legen nahe, dass die Reduktion der SLP-76-Expression die TZR-vermittelte Phosphorylierung von PLC γ 1 an Y783 reduziert, aber die Aktivierung von ZAP-70 an Y319 nicht beeinflusst.

Die reduzierte Phosphorylierung von PLC γ 1 an Y783 in stimulierten SLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen legt den Verdacht nahe, dass die Aktivität dieses Enzyms inhibiert ist und demzufolge auch die TZR-vermittelte Freisetzung von Calcium gestört ist. Um die TZR-vermittelte Calciumfreisetzung in diesen Transfektanten zu ermitteln, wurden sie mit dem Calcium-Indikator Indo-1 beladen (Grynkiewicz et al. 1985). Wie in Abb. 3.3C gezeigt, konnte in shK-transfizierten Zellen eine TZR-induzierte Calciumfreisetzung nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den shK-Transfektanten konnte bei den shSLP-76-transfizierten Zellen keine TZR-vermittelte Calciumfreisetzung initiiert werden. Das Ionophor Ionomycin transportiert Calciumionen durch Membranen (Liu und Hermann 1978) und kann zur Überprüfung der Beladung der Zellen mit Indo-1 verwendet werden. Die Zugabe von Ionomycin belegt, dass die shSLP-76-Transfektanten mit dem Calcium-Indikator beladen waren und, dass sie in der Lage waren, Calcium aus dem extrazellulären Raum einzuführen.

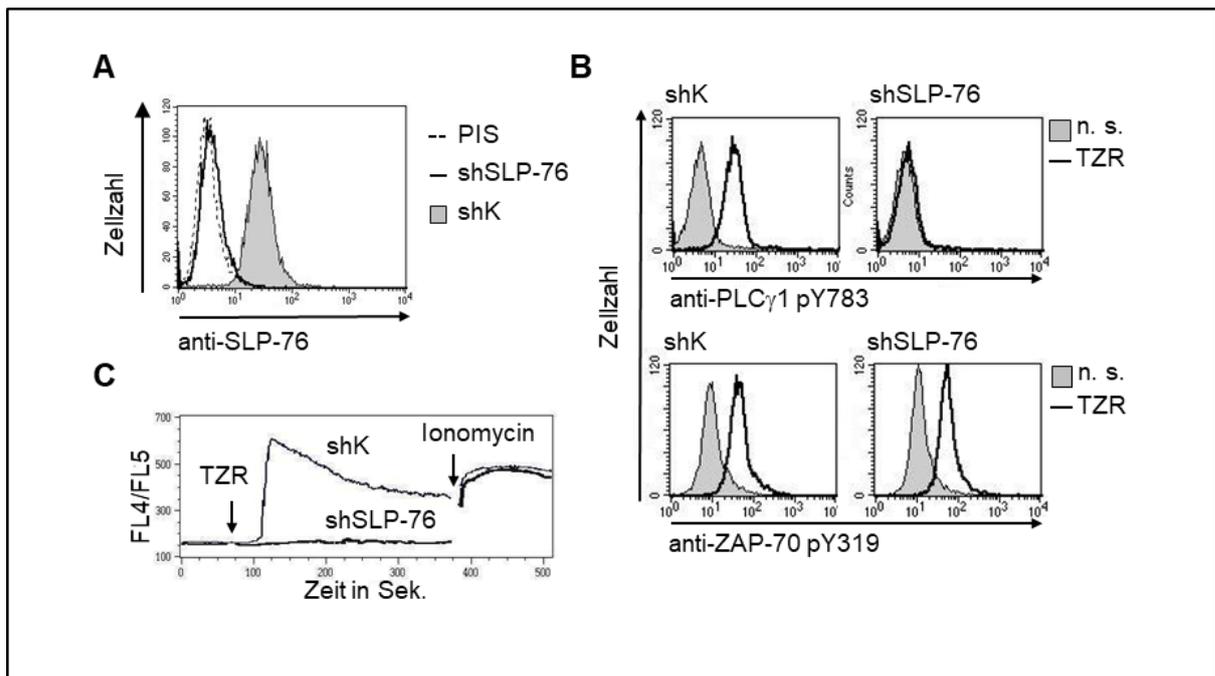


Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von PLC γ 1 und ZAP-70 nach Reduktion der SLP-76-Expression. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurde die Expression von SLP-76 in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein PIS vom Schaf verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf-IgG-Ak detektiert. Die Reduktion der SLP-76-Expression wurde am Durchflusszytometer gezielt in EGFP-exprimierenden Zellen untersucht. Ein Histogramm eines repräsentativen Experimentes ist dargestellt ($n = 3$). (B) Die Transfektanten, wie beschrieben in (A), wurden nicht stimuliert (n. s.) oder mit CD3-Ak für 5 min aktiviert. Zur Detektion des Aktivierungszustands der Enzyme wurden APC-konjugierte anti-PLC γ 1-pY783- oder anti-ZAP-70-pY319-Ak verwendet. EGFP-exprimierende T-Zellen wurden in der Durchflusszytometrie auf die Phosphorylierung von PLC γ 1 oder ZAP-70 analysiert. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind gezeigt ($n = 3$). (C) Die Transfektanten, wie beschrieben in (A), wurden mit dem Calcium-Indikator Indo-1 beladen. Die Messung der Calciumfreisetzung erfolgte am Durchflusszytometer in EGFP-exprimierenden Zellen. Die Pfeile markieren die Zugabe von CD3-Ak (TZR) oder von Ionomycin. Ein Histogramm eines repräsentativen Experimentes ist dargestellt ($n = 3$).

Als einen weiteren Defekt konnten Yablonski und Kollegen in der SLP-76-defizienten Jurkat T-Zelllinie J14 feststellen, dass die TZR-vermittelte Aktivierung der beiden MAP-Kinasen ERK1/2 drastisch reduziert ist (Yablonski et al. 1998). Daher wurden die shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen und die entsprechenden shK-Transfektanten auf die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation des TZRs in der Durchflusszytometrie untersucht. Für diese Untersuchungen wurde ein APC-konjugierter Ak verwendet, der die Phosphorylierung von T202 und Y204 von ERK1/2 erkennt. Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten sK und shSLP-76 transfiziert. Nach 48 h wurde die Reduktion der SLP-76-Expression im Durchflusszytometer überprüft (Abb. 3.4.A). Nach Stimulation des TZR konnte in den shK-Transfektanten eine Phosphorylierung von ERK1/2 an T202 und Y204 detektiert werden, wohingegen keine Phosphorylierung der MAP-Kinasen bei den stimulierten shSLP-76-transfizierten Zellen beobachtet wurde (Abb. 3.4B).

Yablonski und Kollegen konnten auch zeigen, dass nach Behandlung mit PMA die Aktivierung der MAP-Kinasen in SLP-76-defizienten Jurkat T-Zelllinie J14 wiederhergestellt werden konnte (Yablonski et al. 1998). PMA ist ein Struktur analogon von Diacylglycerol (DAG). PLC γ 1 generiert nach Spaltung von PIP $_2$ DAG (Kim et al. 2000). Dieser sekundäre Botenstoff ist als Aktivator der GTPase Ras bekannt, welche die Phosphorylierung von ERK1/2 initiiert (Jones et al. 2002; Stone 2006). Wie in der Abb. 3.4B zu sehen ist, konnte nach Zugabe von PMA sowohl in shSLP-76- als auch in shK-Transfektanten eine vergleichbar starke Phosphorylierung der beiden ERK1/2 Kinasen induziert werden.

Aktivierte ERK1/2 induzieren die Expression des Transkriptionsfaktors AP-1. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche der T-Zellen (Castellanos et al. 1997). Daher habe ich in dem folgenden Experiment untersucht, ob nach Reduktion der SLP-76 die TZR-vermittelte Expression von CD69 reduziert ist. shSLP-76 oder shK-transfizierte Zellen wurden mit CD3-Ak stimuliert. Die Expression von CD69 wurde in der Durchflusszytometrie ermittelt. In CD3-Ak-stimulierten shK-Transfektanten konnte die Expression von CD69 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu aktivierten shK-Transfektanten konnte nach Stimulation des TZRs die Hochregulation von CD69 nach Reduktion der SLP-76 Expression nicht festgestellt wurde (Abb. 3.4C). Die Zugabe von PMA konnte in shSLP-76- sowie in shK-transfizierten Zellen eine vergleichbare starke Expression von CD69 induzieren (Abb. 3.4C).

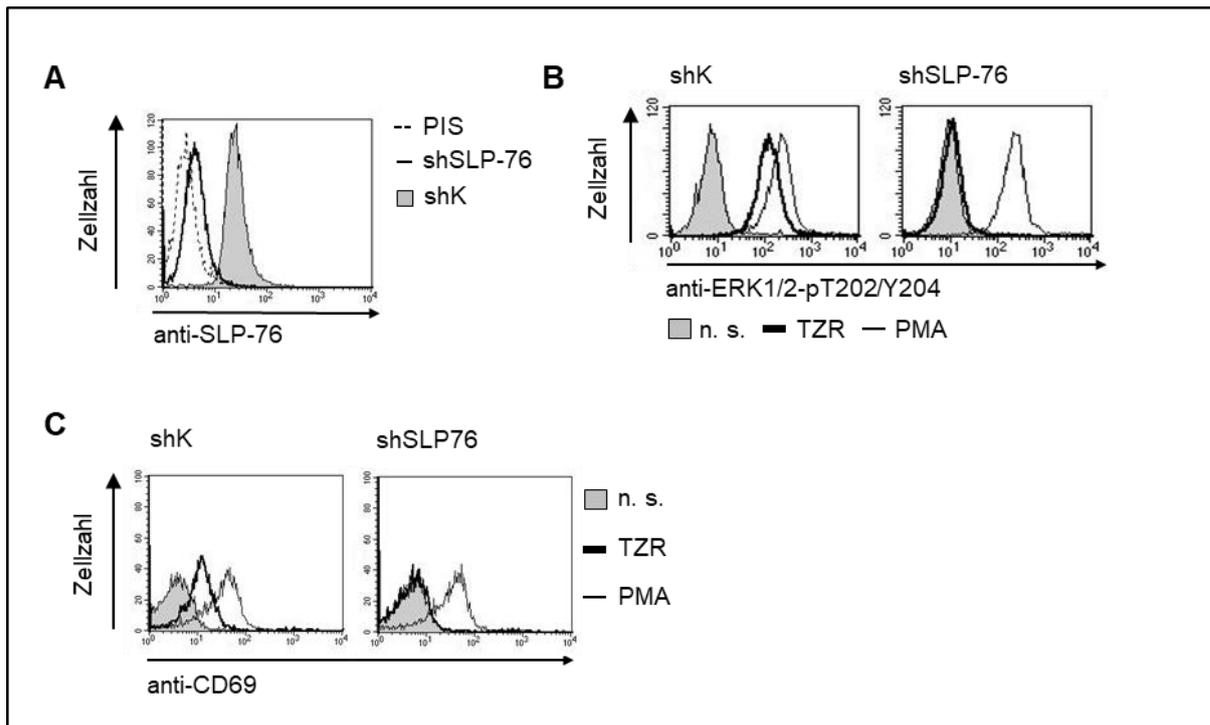


Abb. 3.4: Durchflusszytometrische Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 und der Expression von CD69.

(A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurde die Expression von SLP-76 in der Durchflusszytometrie untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein PIS vom Schaf verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf-IgG-Ak detektiert und die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer auf EGFP-exprimierenden Zellen. Ein Histogramm eines repräsentativen Experimentes ist gezeigt (n = 3). (B) Die Transfektanten, wie beschrieben in (A), wurden nicht stimuliert (n. s.), mit CD3-Ak (TZR) oder mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 5 min stimuliert. Für die Detektion dieser MAP-Kinasen wurde ein APC-konjugierte anti-ERK1/2 pT202/Y204 verwendet. EGFP-exprimierende T-Zellen wurden gezielt in der Durchflusszytometrie auf die Phosphorylierung dieser Kinasen analysiert. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (n = 3). (C) Die Transfektanten, wie beschrieben in (A), wurden nicht stimuliert (n. s.) und mit Platten-gebundenen CD3-Ak (TZR) oder mit PMA für 12 h stimuliert. Anschließend wurde für die Detektion von CD69 ein APC-konjugierter CD69-Ak eingesetzt. Am Durchflusszytometer wurden gezielt EGFP-positive Zellen untersucht. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (n = 3).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die Vektor-basierende RNA-Interferenz zur Reduktion der endogenen Expression von SLP-76 zu den gleichen Defekten (verminderte PLC γ 1- und ERK1/2-Phosphorylierung, reduzierte Calciumfreisetzung und CD69-Hochregulation) führt. Diese stimmen mit denen von Yablonski et al. überein, die für die SLP-76-defizienten Jurkat T-Zelllinie J14 beschrieben wurden (Yablonski et al. 1998).

3.3 Die Reduktion der SLP-76-Expression inhibiert die TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung

In einem Adhäsionsassay habe ich die funktionelle Relevanz von SLP-76 in Jurkat T-Zellen auf ihre Fähigkeit zur Bindung an immobilisierten ICAM-1, dem Liganden von LFA-1, untersucht. shK- und shSLP-76-transfizierte Zellen (Abb. 3.5A) wurden entweder nicht stimuliert oder mit verschiedenen Stimuli (CD3-Ak (TZR), PMA und MnCl₂) aktiviert. Wie aus Abb. 3.5B hervorgeht, zeigen CD3-Ak- oder

PMA-stimulierte shSLP-76-transfizierte Zellen im Vergleich zu shK-Transfektanten eine signifikante reduzierte Adhäsion an ICAM-1. Im Gegensatz zur TZR oder PMA Stimulation binden divalente Kationen wie Mn^{2+} direkt an die konservierte Mn^{2+} -Bindungsstelle in der I-Domäne der α -Kette von LFA-1 und induzieren den hochaffinen Aktivierungszustand des Integrins, der die Adhäsion erzeugt (Hogg et al. 1994). Die Stimulation mit $MnCl_2$ induzierte sowohl in shK- als auch in shSLP-76-transfizierten Zellen eine vergleichbare erhöhte Adhärenz an ICAM-1 (Abb. 3.5B). Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit von SLP-76 nur für die TZR- und PMA-vermittelten Signalwege der Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 erforderlich ist.

Da LFA-1-vermittelte Adhäsionsprozesse an der Interaktion von T-Zellen mit APZs beteiligt sind (Kinashi 2005), wurde dies anschließend im Konjugatassay untersucht. Für die Interaktion von T-Zellen mit APZs wurden Raji B-Zellen verwendet. Die B-Zellen wurden mit Superantigen (SA) beladen, um eine Vernetzung der MHC-II-Moleküle mit der β -Kette des TZR von T-Zellen zu vermitteln (Li et al. 1999). Zur Unterscheidung der EGFP-exprimierenden T-Zellen wurden die Raji B-Zellen mit dem rotfluoreszierenden Farbstoff DDAO-SE gefärbt. Raji-B-Zellen (mit oder ohne SA-Beladung) wurden mit den Transfektanten im gleichen Verhältnis gemischt und inkubiert. Der prozentuale Anteil der Konjugate (doppelt-positive Zellen) wurde in der Durchflusszytometrie ermittelt. Bei den shK-Transfektanten wurde mit SA-behandelten Raji B-Zellen eine verstärkte Konjugatbildung beobachtet (Abb. 3.5C). Im Gegensatz zu den shK-Transfektanten wurde nach Reduktion der SLP-76 Expression eine stark verminderte Interaktion mit SA-behandelten B-Zellen ermittelt (Abb. 3.5C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwesenheit von SLP-76 in Jurkat T-Zellen für die TZR-vermittelte Adhäsion an ICAM-1 und der Interaktion von T-Zellen mit APZs erforderlich ist.

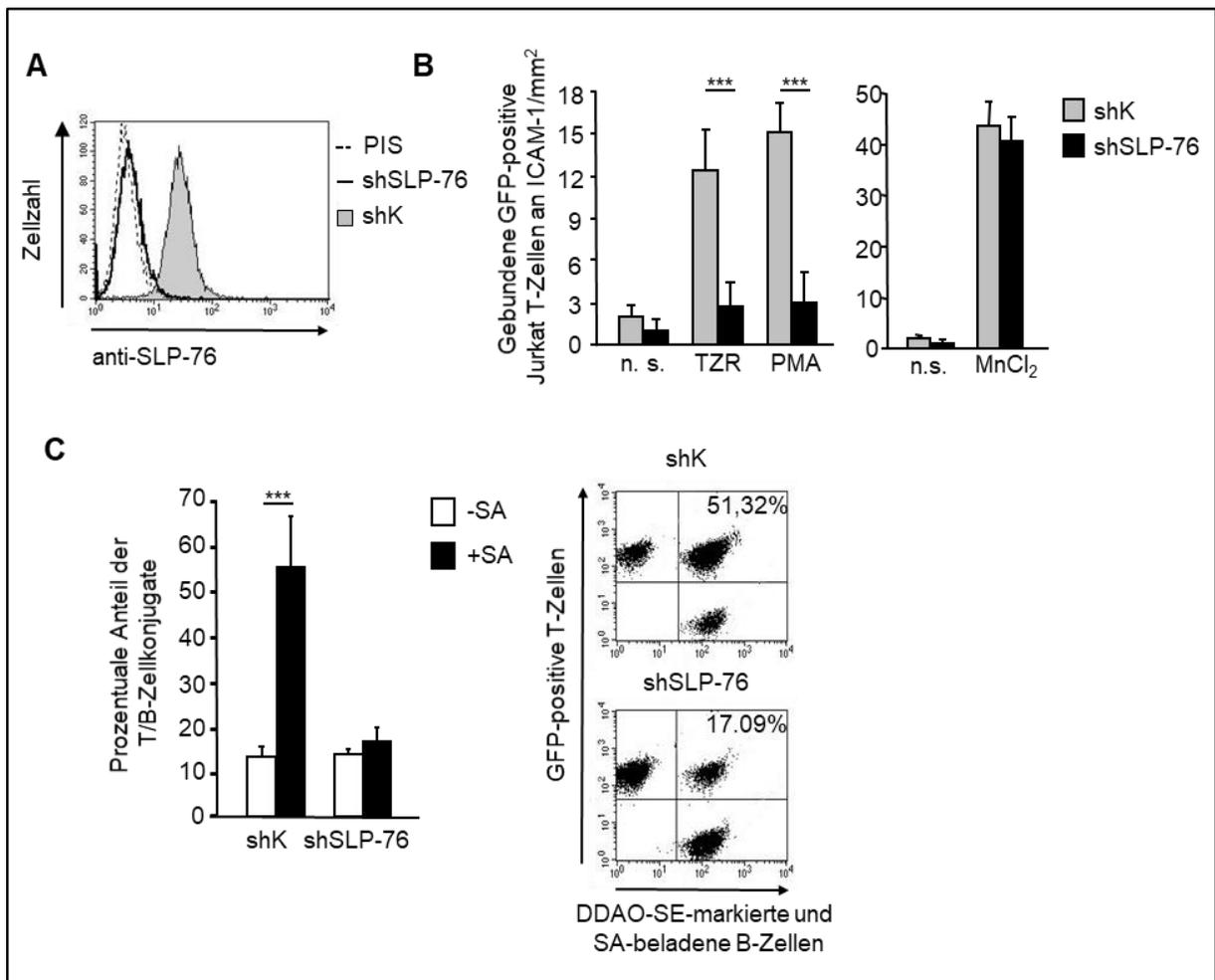


Abb. 3.5: Einfluss der Reduktion von SLP-76 auf die Adhäsion und die T-Zell-Interaktion mit B-Zellen. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurde die Expression von SLP-76 in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein PIS vom Schaf verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf-IgG-Ak detektiert. Am Durchflusszytometer wurden gezielt EGFP-exprimierende Zellen analysiert. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (n = 3). (B) Die Transfektanten wurden nicht stimuliert (n. s.) und mit CD3-Ak (TZR), PMA oder MnCl₂ aktiviert. Die Zellen wurden auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion auf ICAM-1-beschichteten Schalen untersucht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wobei die Zellzahl von EGFP-positiven Zellen in einem Feld mit definierter Größe ermittelt wurde (n = 3; SEM (Standard error of the mean) ***p ≤ 0,001). (C) B-Zellen wurden mit oder ohne SA (-SA und +SA) beladen und mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff DDAO-SE markiert. Die B-Zellen und die Transfektanten wurden im gleichen Verhältnis miteinander gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Fixierung wurde der prozentuale Anteil der EGFP- und DDAO-SE-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie quantifiziert (links; n = 3; SEM ***p ≤ 0,001). Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (rechts).

3.4 Inhibition der TZR-vermittelten Affinität und Avidität von LFA-1 nach Reduktion der SLP-76-Expression

In T-Zellen regulieren TZR-vermittelte Signalwege die Affinitäts- und Aviditätsänderungen von LFA-1 (Kinashi 2005). Ob der Defekt in der TZR-vermittelten Adhäsion nach Reduktion von SLP-76 mit einer verminderten Affinität von LFA-1 korreliert, wurde in einem löslichen ICAM-1-Fc-Bindungstest untersucht. Für diesen Versuch wurden shK- und shSLP-76-transfizierte Jurkat T-Zellen verwendet. Nur in den shSLP-76-Transfektanten konnte eine Reduktion der SLP-76-Expression nachgewiesen werden

(Abb. 3.6A). Die Transfektanten wurden in Anwesenheit von löslichem ICAM-1-Fc mit einem CD3-Ak, PMA oder $MgCl_2$ stimuliert. Wie in Abb. 3.6B dargestellt ist, konnte eine erhöhte Bindung von löslichem ICAM-1-Fc der shK-Transfektanten nach Stimulation des TZR oder PMA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den shK-Transfektanten konnte bei den aktivierten (CD3-Ak und PMA) shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen keine vermehrte Bindung von löslichem ICAM-1-Fc beobachtet werden. Vergleichbar mit den Adhäsionsdaten (Abb. 3.5) induzierte die Zugabe von $MgCl_2$ sowohl bei den shK- als auch bei den shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen eine gleiche Bindung von löslichem ICAM-1-Fc (Abb. 3.6B).

In den folgenden Experimenten wurde dann die Rolle von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Integrinaggregation (Avidität von LFA-1) untersucht. Da für die Aggregatbildung von LFA-1 ein FITC-konjugierter CD18-Ak in der Mikroskopie eingesetzt werden sollte, konnten die Konstrukte pCMS3-shSLP-76 und pCMS3-shK nicht verwendet werden. Daher wurden Konstrukte zur shRNA für SLP-76 bzw. shK, die in dem pSuper Vektor vorlagen, verwendet. Im Unterschied zu dem pCMS3-Vektor besitzt der pSuper-Vektor keine unabhängige Expressionskassette für das EGFP. Zur Identifizierung der mit shK- und shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen wurden die Zellen mit dem Vektor-pmCherry-C1 kotransfiziert. Dieser Vektor kodiert für mCherry, ein rotfluoreszierendes Protein. Zur Induktion der LFA-1-Aggregate wurden die transfizierten Zellen mit einem biotinylierten-CD3-Ak inkubiert, und durch Zugabe von Streptavidin wurde der TZR kreuzvernetzt. Die Detektion von LFA-1 erfolgte mit Hilfe des FITC-markierten Aks gegen CD18 und die anschließende Untersuchung der Aggregate erfolgte am konfokalen Mikroskop, wobei gezielt mCherry-exprimierende Zellen untersucht wurden. Wie in Abb. 3.6C gezeigt, wurde in ca. 80 % der shK-transfizierten mCherry-positiven T-Zellen eine Aggregation von LFA-1 festgestellt wurde. Eine repräsentative Aufnahme ist in Abb. 3.6C gezeigt. Im Gegensatz zu den shK-Transfektanten konnte bei shSLP-76-transfizierten pmCherry-positiven Jurkat T-Zellen nur eine Aggregation in ca. 30 % der untersuchten Zellen beobachtet werden. Bei den meisten Transfektanten wurde dagegen eine gleichmäßige Verteilung von LFA-1 auf der Plasmamembran beobachtet (Abb. 3.6C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwesenheit von SLP-76 für die TZR-vermittelte Affinitäts- und Aviditätsregulation von LFA-1 erforderlich ist. An welchen Signalwegen SLP-76 bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt ist, wird im nächsten Kapitel untersucht.

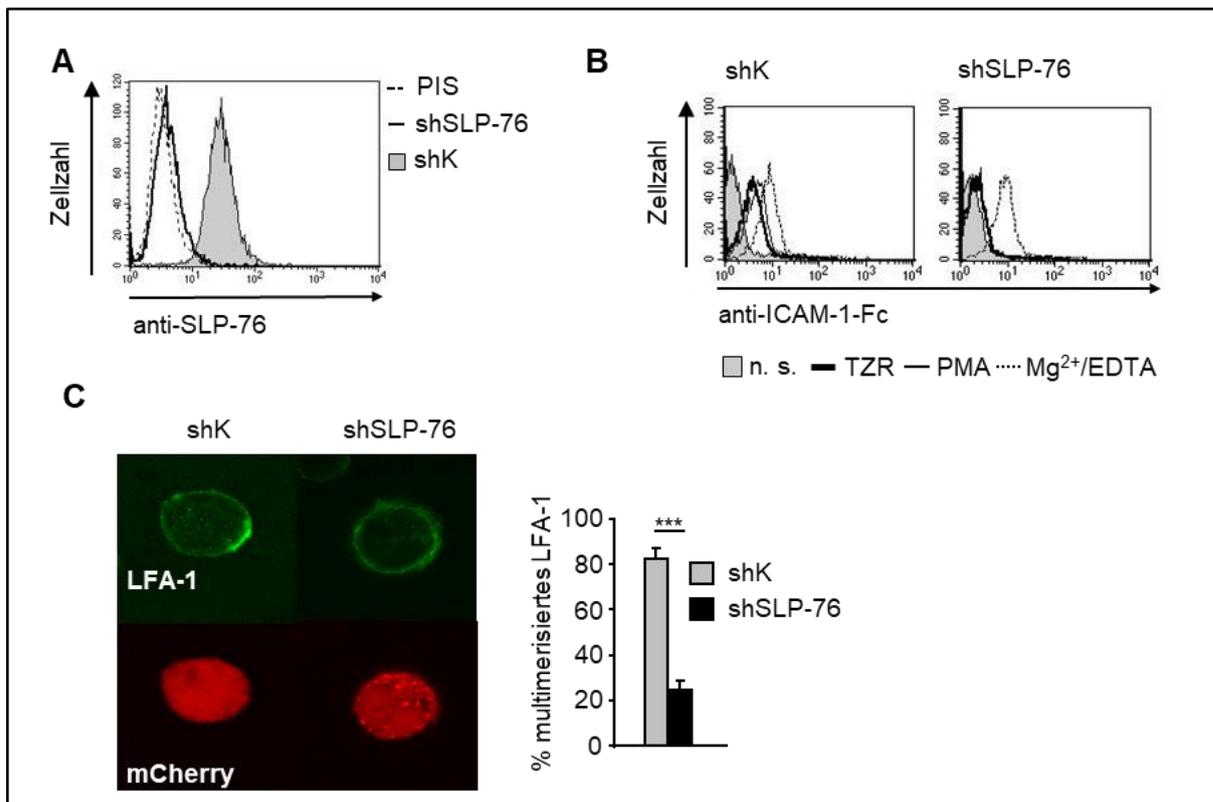


Abb. 3.6: Inhibition der TZR-vermittelten Affinität und Avidität von LFA-1 nach Reduktion der SLP-76-Expression. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurde die Expression von SLP-76 in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein PIS vom Schaf verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf-IgG-Ak detektiert. Am Durchflusszytometer wurden gezielt EGFP-exprimierende Zellen analysiert. Ein Histogramm eines repräsentativen Experimentes ist dargestellt (n = 3). (B) Die Transfektanten wurden nicht stimuliert (n. s.), mit CD3-Ak (TZR), PMA oder MgCl₂ in Anwesenheit von löslichen ICAM-1-Fc inkubiert. Für die Detektion von gebundenem ICAM-1-Fc wurde ein APC-konjugierter anti-human-IgG-Fc-Ak verwendet. Am Durchflusszytometer wurden gezielt EGFP-positive Zellen untersucht. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt (n = 3). (C) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pSuper-shSLP-76 (shSLP-76) und pSuper-shK (shK) in Kombination mit dem pmCherryC1 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Transfektanten mit einem biotinylierten CD3-Ak inkubiert und nach Zugabe von Streptavidin für 5 min stimuliert. Die Zellen wurden auf Adhäsionsobjektträger abgesetzt und fixiert. Zur Detektion von LFA-1 wurde ein FITC-konjugierter anti-CD18-Ak verwendet. Die Auswertung der Zellen erfolgte am konfokalen Mikroskop. Je Experiment wurden 50 pmCherry-positive Zellen analysiert (n = 3; SEM ***p ≤ 0,001).

3.5 Identifizierung von SLP-76-regulierenden Signalwegen, die an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt sind

In der Literatur sind verschiedene Signalwege beschrieben, die bei der TZR-vermittelten Aktivierung von LFA-1 beteiligt sind (Kinashi 2005). Zu diesen Signalprozessen gehören die Aktivierung der GTPase Rap1 und die Interaktion von SLP-76 mit ADAP (Bos 2005; Wang et al. 2004). Ebenfalls beeinflussen Signalmoleküle, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, die Aktivierung von LFA-1 und den Aufbau bzw. die Stabilisierung der IS (Huang und Burkhardt 2007). Daher wird diesem Abschnitt die funktionelle Relevanz von SLP-76 für diese Signalwege untersucht.

3.5.1 Der Einfluss von SLP-76 auf die TZR-vermittelte Aktivierung von Rap1

Um die Aktivierung von Rap1 zu untersuchen, wurde ein GST-Pulldown-Assay unter Verwendung des GST-Fusionsproteins RalGDS mit Rap1-bindender-Domäne (RBD) durchgeführt. Dieses GST-RBD-Fusionsprotein interagiert mit der aktivierten, der GTP-beladenen Form von Rap1 (Franke et al. 1997). Für diese Experimente wurden shK- und shSLP-76-transfizierte Jurkat T-Zellen nicht aktiviert oder zu verschiedenen Zeitpunkten mit CD3-Ak stimuliert. Von den Transfektanten wurden Lysate hergestellt und Aliquots entnommen, um im WB die Reduktion der SLP-76-Expression und die totale Expression von Rap1 zu untersuchen (Abb. 3.7A). Die aktivierte GTPase wurde nach Zugabe des GST-RBD-Fusionsproteins und Glutation-Sepharose präzipitiert und der Anteil des GTP-gebundenen Rap1 Proteins im WB untersucht. Wie in Abb. 3.7A zu sehen ist, wurde in den shK-transfizierten Zellen eine Aktivierung von Rap1 bereits nach 2 min TZR-Stimulation festgestellt. Diese TZR-vermittelte Aktivierung von Rap1 war bis zu einer Stimulationsdauer von 10 min nachweisbar. Dagegen konnte in shSLP-76-transfizierten Zellen keine Aktivierung von Rap1 zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation des TZR detektiert werden. Wichtig anzumerken ist, dass die Reduktion der SLP-76-Expression keinen Einfluss auf die totale Expression von Rap1 hatte (Abb. 3.7A).

Liu et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von Jurkat T-Zellen mit PMA Rap1 aktiviert (Liu et al. 2002). Daher habe ich mich gefragt, ob die verminderte PMA-induzierte Adhäsion bzw. ICAM-1-Bindung (Abb. 3.5B und 3.6B) in shSLP-76-transfizierten Zellen mit einer reduzierten Aktivierung von Rap1 korreliert. Um diese Frage zu beantworten, wurden shK- und shSLP-76-transfizierte Jurkat T-Zellen mit einem CD3-Ak oder PMA stimuliert. Im WB wurden Aliquots der generierten Lysate auf die Reduktion der SLP-76-Expression untersucht (Abb. 3.7B). Nach Stimulation des TZR oder nach Zugabe von PMA konnte in shK-Transfektanten eine Rap1-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 3.7B). Überraschenderweise wurde nur nach PMA-Zugabe, aber nicht nach TZR-Stimulation, eine Aktivierung der GTPase Rap1 in shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen beobachtet (Abb. 3.7B). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Strukturanalogon von DAG in Abwesenheit von SLP-76 die Rap1-Aktivierung wiederherstellen kann.

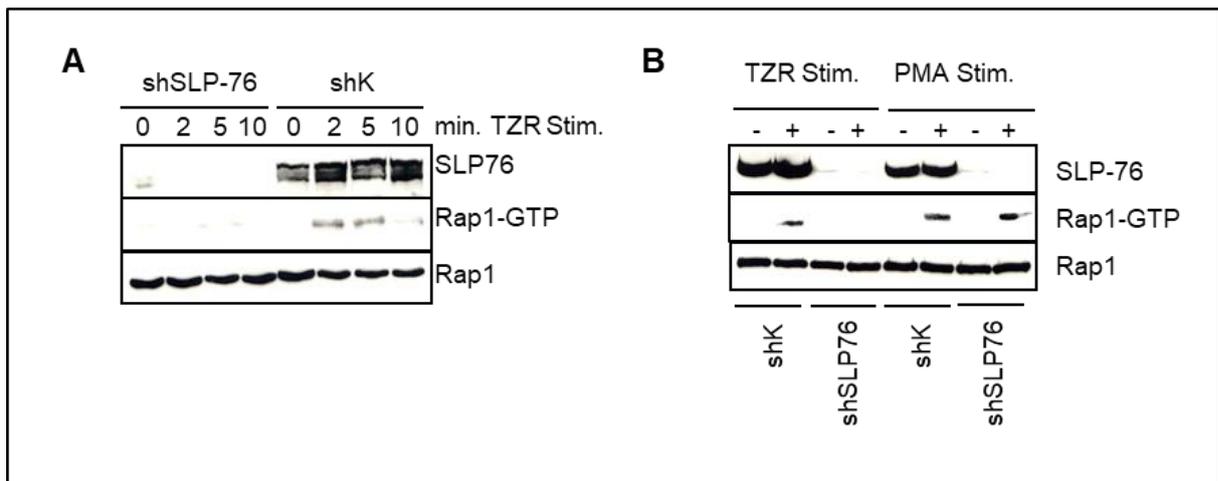


Abb. 3.7: Die Aktivierung von Rap1 nach TZR- und PMA-Stimulation. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurden die Transfektanten zu verschiedenen Zeitpunkten mit CD3-Ak (TZR) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, und ein Aliquot von diesen Lysaten wurde entnommen, um im WB die Expression von SLP-76 und Rap1 zu analysieren (linkes Panel). Von den verbliebenden Lysaten wurde die aktivierte GTPase Rap1 mit dem GST-RalGDS Fusionsprotein in Kombination mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden im WB auf gebundenes Rap1 untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (B) Transfektanten, wie unter (A) beschrieben, wurden mit CD3-Ak (+) oder PMA (+) für 5 min stimuliert und anschließend lysiert. In diesen Lysaten wurde, wie unter (A) beschrieben, im WB die Expression von SLP-76 und Rap1 untersucht (rechtes Panel). Die Präzipitate wurden ebenfalls im WB auf gebundenes Rap1 analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.5.2 SLP-76 interagiert mit dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul

Verschiedene Studien belegen, dass ADAP eine induzierbare Interaktion mit SLP-76 eingeht (Veale et al. 1999; Raab et al. 1999; da Silva et al. 1997; Musci et al. 1997; Wang et al. 2004). Zusätzlich konnten Wang und Kollegen zeigen, dass die Interaktion zwischen SLP-76 und ADAP für die TZR-vermittelte Integrinaktivierung von Bedeutung ist (Wang et al. 2004). So induziert die Expression einer ADAP-Tyrosinmutante, die nicht mehr an die SH2-Domäne von SLP-76 binden kann, eine verminderte Interaktion zwischen T-Zellen und APZs (Wang et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese induzierbare Interaktion von SLP-76 mit ADAP eine Rolle bei der TZR-vermittelten Regulation von LFA-1 spielt. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Koimmunpräzipitationsstudien einen Komplex identifizieren, der sich aus dem ADAP/SKAP55 -Modul und dem Rap1-Effektorprotein RIAM zusammensetzt. In diesem Komplex interagiert RIAM zum einen konstitutiv mit SKAP55 (Ménasché et al. 2007b) und bindet zum anderen die GTP-beladene Form von Rap1 (Lafuente et al. 2004). Daher habe ich mich gefragt, ob die mit SLP-76 interagierende Fraktion von ADAP die Komponenten SKAP55 und RIAM enthält und in aktivierten T-Zellen mit Rap1 assoziiert ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Lysate von nicht aktivierten und mit CD3-Ak stimulierten Jurkat-T-Zellen und primären humanen T-Zellen hergestellt. Aus den Lysaten wurde SLP-76 präzipitiert und im WB auf die Assoziation mit SKAP55, RIAM und Rap1 untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein Präimmenserum (PIS) verwendet. Wie in Abb. 3.8A gezeigt, konnte in ruhenden T-Zellen (Jurkat T-Zellen und primäre

humane T-Zellen) keine Assoziation von SLP-76 mit ADAP, SKAP55 und RIAM nachgewiesen werden. Erst nach TZR-Stimulation konnte in beiden T-Zelltypen eine induzierbare Interaktion von SLP-76 mit ADAP, SKAP55, RIAM und Rap1 detektiert werden. Eine unspezifische Bindung dieser Proteine wurde nicht festgestellt, wenn ein Präimmenserum in der Immunpräzipitation eingesetzt wurde (Abb. 3.8A). Da ich, wie in Abb. 3.7 dargestellt, zeigen konnte, dass die Anwesenheit von SLP-76 für die TZR-vermittelte Aktivierung von Rap1 notwendig ist, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob nach Reduktion der SLP-76-Expression die Interaktion von Rap1 mit RIAM inhibiert ist. Hierfür wurden Lysate von unbehandelten oder mit einem CD3-Ak stimulierten shK- und shSLP-76-Transfektanten hergestellt. Aus den Lysaten wurde SKAP55 präzipitiert und im WB auf die Assoziation mit SLP-76, ADAP, RIAM und Rap1 untersucht. In SKAP55-Präzipitaten von TZR-stimulierten shK-Transfektanten konnte eine induzierbare Interaktion des ADAP/RIAM -Moduls mit Rap1 und SLP-76 im WB detektiert werden (Abb. 3.8B). Bei der Analyse der SKAP55-Präzipitate im WB von aktivierten shSLP-76-Transfektanten konnte hingegen keine Interaktion mit SLP-76 sowie von Rap1 mit ADAP/RIAM nachgewiesen werden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das mit SLP-76 assoziierte ADAP in einem Komplex mit SKAP55, RIAM und Rap1 vorliegt. Außerdem führt die Reduktion der SLP-76-Expression zu keinerlei Beeinträchtigung der Interaktion von ADAP mit SKAP55 und RIAM, nur die induzierbare Interaktion von Rap1 mit RIAM wurde in aktivierten T-Zellen beeinflusst.

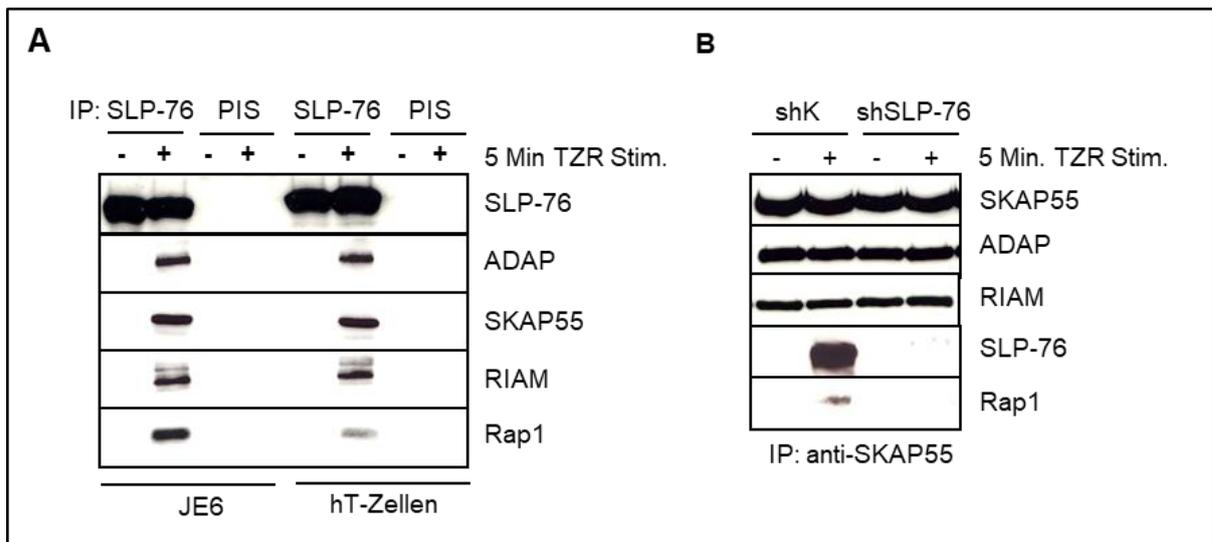


Abb. 3.8: Interaktion von SLP-76 mit ADAP, SKAP55, RIAM und Rap1. (A) Jurkat T-Zellen bzw. primäre humane T-Zellen wurden nicht stimuliert (-) oder mit CD3-Ak für 5 min stimuliert (+). Lysate von diesen Zellen wurden hergestellt und zur Immunpräzipitation (IP) mit einem SLP-76-Ak aus dem Schaf bzw. einem Präimmunsereum (PIS) vom Schaf (Negativkontrolle) eingesetzt. Die Präzipitate wurden im WB mit den angegebenen Ak analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (B) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurden die Transfektanten nicht stimuliert (-) oder mit CD3-Ak für 5 min aktiviert (+). Lysate von diesen Zellen wurden zur Immunpräzipitation (IP) mit einem SKAP55-Ak eingesetzt. Die Präzipitate wurden im WB mit den angegebenen Ak analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.6 Inhibition der Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM-Moduls und Rap1 an die Plasmamembran nach Verlust der SLP-76-Expression

SLP-76 interagiert konstitutiv mit dem Adapterprotein Gads und wird nach Stimulation des TZR an das phosphorylierte transmembranöse Adapterprotein LAT an die Plasmamembran rekrutiert. Daher sollte experimentell untersucht werden, ob die reduzierte Expression von SLP-76 die Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM -Moduls inklusive Rap1 an die Plasmamembran verhindert. Dazu wurden shK- und shSLP-76-transfizierte Jurkat T-Zellen nicht aktiviert oder mit CD3-Ak stimuliert. Von diesen Zellen wurde das Zytosol von der Plasmamembran getrennt und isoliert. Diese Fraktionen wurden im WB analysiert. Als Positivkontrolle der Fraktionierung dienten dabei Ak zur Detektion von ERK1/2 für das Zytosol und von LAT für die Plasmamembran. Wichtig anzumerken ist hier, dass die inaktive Form von Rap1 in endosomalen Vesikeln vorliegt, wohingegen die GTP-beladene Form von Rap1 an der Plasmamembran lokalisiert ist (Bivona et al., 2004). Bei der hier verwendeten biochemischen Methode zur Isolation der Plasmamembranfraktion wurden endosomale Vesikel nach Waschen des membranhaltigen Pellets mit hypotonischen Waschpuffer entfernt, sodass nur die Fraktion von Rap1 an der Plasmamembran aber nicht im Zytosol detektiert wurde (Kliche et al., 2006). In Abb. 3.9 ist zu sehen, dass in den ruhenden shK-Transfektanten in der Plasmamembranfraktion keine Anreicherung von SLP-76, dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul oder Rap1 festzustellen war. Erst nach TZR-Stimulation waren diese Proteine in der Plasmamembranfraktion nachweisbar. Im Gegensatz zu den shK-

Transfektanten konnte nach Reduktion der SLP-76-Expression ein stark vermindertes Vorliegen des ADAP/SKAP55/RIAM-Moduls in der Plasmamembranfraktion nach TZR-Stimulation beobachtet werden. ADAP, SKAP55 und RIAM befanden sich in den shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen verstärkt in der zytosolischen Fraktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von SLP-76 für die Rekrutierung von dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul inklusive von Rap1 an die Plasmamembran notwendig ist.

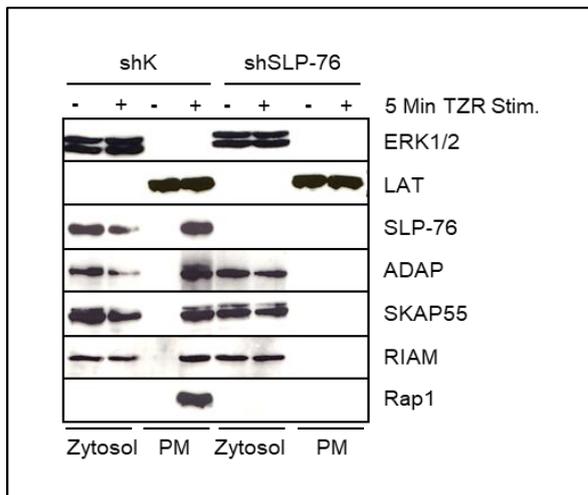


Abb. 3.9: SLP-76-abhängige Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM -Moduls zusammen mit Rap1 an die Plasmamembran. Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurden die Transfektanten mit CD3-Ak für 5 min stimuliert. Zytosolische und Plasmamembranfraktionen wurden von diesen Transfektanten isoliert und im WB auf SLP-76 und dessen Interaktionspartner mit den entsprechenden Ak untersucht. Die Reinheit der Fraktionierung wurde durch die Analyse der Moleküle ERK1/2 für das Zytosol und LAT für die Plasmamembran bestätigt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.7 Einfluss von SLP-76 auf die TZR-vermittelte F-Aktinpolymerisation und Aktivierung der GTPase Rac

Bei der Interaktion von T-Zellen mit APZs kommt es zu einer Akkumulation von F (filamentösem)-Aktin im Bereich der Kontaktzone der IS (Huang und Burkhardt 2007). Von zwei induzierbaren Interaktionspartnern von SLP-76, dem GTP-Austauschfaktor für Rho-GTPasen Vav und der Tyrosinkinase Itk, ist bekannt, dass sie den TZR-vermittelten F-Aktin Gehalt regulieren (Fischer et al. 1998; Labno et al. 2003). Meine Daten zur Konjugatbildung (Abb. 3.6C) haben gezeigt, dass shSLP-76-Transfektanten eine verminderte Interaktion mit SA-beladenen Raji B-Zellen als APZs eingehen. Daher wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die Reduktion der SLP-76-Expression einen Defekt im TZR-vermittelten F-Aktin Gehalt hervorruft. Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten shK- und shSLP-76-transfiziert. Nach 48 h wurde die Reduktion der SLP-76-Expression in shSLP-76-transfizierten Zellen festgestellt (Abb. 3.10A). Diese Transfektanten wurden nicht stimuliert oder mit einem CD3-Ak aktiviert. Zur Detektion des F-Aktins in den Transfektanten wurde Alexa633-konjugiertes Phalloidin verwendet. Wie aus der Abb. 3.10B und C hervorgeht, konnte kein Unterschied im Gehalt von F-Aktin in nicht aktivierten shK- und shSLP-76-transfizierten Jurkat T-Zellen festgestellt werden. Erst nach Stimulation des TZRs wurde ein erhöhter F-Aktin Gehalt in shK-Transfektanten gemessen (Abb. 3.10B und C). Im Gegensatz zu shK-transfizierten Zellen konnte in shSLP-76-transfizierten Transfektanten keine Zunahme des F-Aktin Gehalts ermittelt werden. Hier verblieb der Gehalt des F-Aktins auf dem Niveau von nicht stimulierten shK- bzw. shSLP76-T-Zellen (Abb. 3.10 und C).

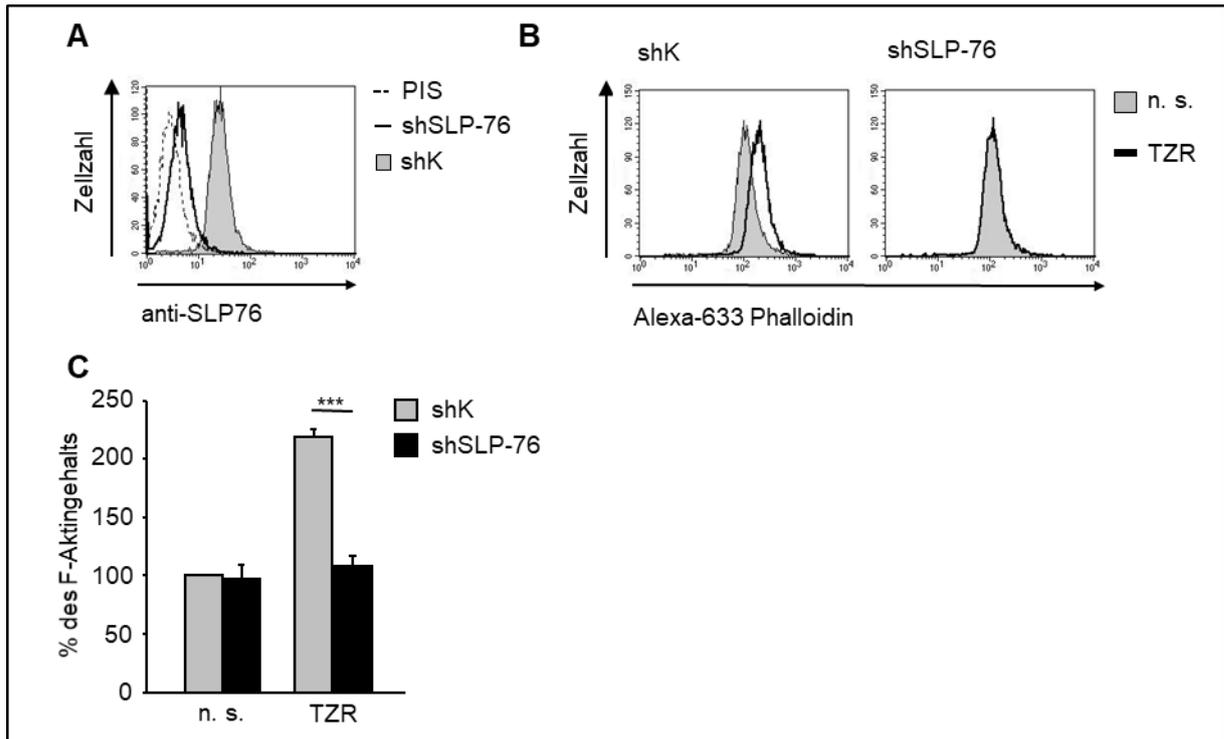


Abb. 3.10: Durchflusszytometrische Bestimmung des TZR-vermittelten F-Aktinergehalts. (A) Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurde die Expression von SLP-76 in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein PIS vom Schaf verwendet. Gebundene Ak wurden mit APC-konjugierten sekundären Ziege-anti-Schaf-IgG-Ak detektiert. Im Durchflusszytometer wurden gezielt EGFP-exprimierenden Zellen untersucht. Ein Histogramm eines repräsentativen Experimentes ist gezeigt (n = 3). (B) Die Transfektanten wurden nicht stimuliert (n. s.) oder für 5 min mit einem CD3-Ak (TZR) für stimuliert. Nach der Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und mit Alexa633-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Der F-Aktinergehalt wurde in der Durchflusszytometrie für EGFP-exprimierenden Zellen ermittelt. Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind gezeigt (n = 3). (C) Für das Balkendiagramm wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von unbehandelten shK-transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt, um die Zunahme bzw. Abnahme des F-Aktinergehalts in den Transfektanten zu berechnen (n = 3; SEM ***p ≤ 0,001).

Vav ist ein GTP-Austauschfaktor für Rho-GTPasen. Zu dieser Familie der Rho-GTPasen gehört die GTPase Rac, die über Vav aktiviert wird (Tybulewicz 2005). Ähnliche Defekte, wie ein reduzierter F-Aktinergehalt und LFA-1-Aktivierung konnten auch in Rac-defizienten T-Zellen gezeigt werden (Villalba et al. 2001; García-Bernal et al. 2005). Um zu überprüfen, ob die Reduktion der Expression von SLP-76 einen Einfluss auf die TZR-vermittelte Aktivierung von Rac hat, wurde diese in einem *GST-Pull-down-Assay* untersucht. Für die Bindung der aktivierten Form von Rac wurde das GST-Fusionsprotein p21-aktivierte-Kinase-Rac-bindene-Domäne (*PAK-RBD*) verwendet (Geijsen et al. 1999). Hierfür wurden shK- und shSLP-76-transfizierte Jurkat T-Zellen nicht aktiviert oder zu verschiedenen Zeitpunkten mit CD3-Ak stimuliert. Von den Zellen wurden Lysate generiert und Aliquots entnommen, die im WB auf die Reduktion der SLP-76-Expression und die totale Expression von Rac untersucht wurden (Abb. 3.11). Die aktivierte GTPase wurde nach Zugabe des GST-PAK-RBD-Fusionsproteins in Kombination mit der

Glutathion-Sepharose präzipitiert und der Anteil des GTP-gebundenen Rac Proteins im WB analysiert. Wie in der Abb. 3.11 zu sehen ist, zeigten die shK-transfizierten Zellen eine erhöhte Aktivierung von Rac in einem Stimulationszeitraum von 2 - 10 min. Dagegen war in den TZR-stimulierten shSLP-76-transfizierten Zellen eine verminderte Aktivierung von Rac nachweisbar. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Anwesenheit von SLP-76 in Jurkat T-Zellen bei TZR-vermittelten Signalwegen zur Erhöhung des F-Aktingehalts und zur Aktivierung der GTPase Rac notwendig ist. Diese Defekte könnten eine mögliche Erklärung sein, warum SLP-76-defiziente T-Zellen eine verminderte Interaktion mit APZs, wie den in Abb. 3.6C verwendeten SA-beladene Raji B-Zellen, aufweisen.

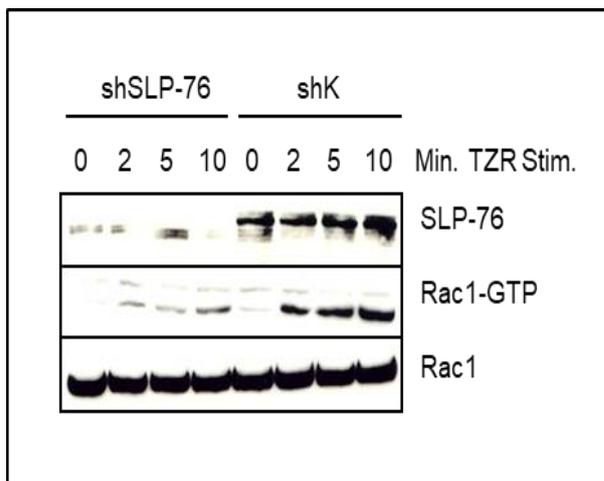


Abb. 3.11: TZR-vermittelte Aktivierung von Rac. Jurkat T-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMS3-shSLP-76 (shSLP-76) und pCMS3-shK (shK) elektroporiert. Nach 48 h wurden die Transfektanten zu verschiedenen Zeitpunkten mit CD3-Ak stimuliert. Von diesen Transfektanten wurden Lysate hergestellt. Ein Aliquot dieser Lysaten wurde entnommen, um im WB auf die Expression von SLP-76 und Rac zu analysiert. Von den verbleibenden Lysaten wurde nach Zugabe des GST-PAK-RBD-Fusionsproteins in Kombination mit Glutathion-Sepharose aktiviertes Rac präzipitiert. Diese Präzipitate wurden im WB auf Rac analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

4 Diskussion

Für die Induktion der adaptiven Immunantwort wandern naive T-Zellen in SLOs, wie dem Lymphknoten. Nach dem Erreichen der T-Zellzone scannen sie Peptid-beladene MHC-II-Moleküle auf dendritischen Zellen. Bei einer erfolgreichen Erkennung des Peptids, präsentiert auf den MHCII-Molekülen über den TZR, kommt es zur Aktivierung (Expression von CD69), Differenzierung und Proliferation von T-Zellen. Zusätzlich zu diesen Signalprozessen induziert die Stimulation des TZRs die Aktivierung des Integrins LFA-1. Das zytosolische Adapterprotein SLP-76 ist eine zentrale Komponente bei der TZR-vermittelten Aktivierung von T-Zellen. Mithilfe der RNA-Interferenz von SLP-76 in Jurkat T-Zellen konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass dieses Molekül ebenfalls an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung (*inside-out signaling*) beteiligt ist und LFA-1-abhängige *outside-in*-Signale wie die T-Zell-Adhäsion und die Interaktion von T-Zellen mit APZs reguliert.

Zu den Signaltransduktionsprozessen, an denen SLP-76 bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt ist, gehören:

- die Aktivierung der GTPase Rap1,
- die induzierbare Interaktion von SLP-76 mit dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul inklusive Rap1,
- die Rekrutierung dieses Moduls zusammen mit Rap1 an die Plasmamembran sowie
- die TZR-vermittelte F-Aktinpolymerisation und die Aktivierung der GTPase Rac.

4.1 Die funktionelle Bedeutung von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Aktivierung von Jurkat T-Zellen

Die von Yablonski und Kollegen im Jahr 1998 generierte SLP-76-defiziente Zelllinie J14 wurde bereits in mehreren Publikationen erfolgreich zum Studium der funktionellen Rolle dieses Moleküls bei TZR-vermittelten Signalwegen eingesetzt (Wu und Koretzky 2004; Koretzky et al. 2006). In meiner Arbeit habe ich die Methode der Vektor-basierenden RNA-Interferenz zur Reduktion der Expression von SLP-76 in der parentalen Jurkat T-Zelllinie JE6.1 verwendet. Diese Technik wurde in unserer AG bereits mehrfach erfolgreich angewendet (Kliche et al. 2006; Ménasché et al. 2007b; Kuropka et al. 2015; Witte et al. 2017; Waldt et al. 2018).

Es ist bekannt, dass SLP-76 für die TZR-vermittelte Phosphorylierung von PLC γ 1 und ERK1/2 sowie die Freisetzung von Calcium und die aktivierungsabhängige Expression von CD69 verantwortlich ist (Yablonski et al. 1998). Diese Defekte konnte ich nach Reduktion der SLP-76-Expression in der Jurkat T-Zelllinie JE6.1 feststellen (Abb. 3.3 und 3.4). Ebenfalls konnte unsere Arbeitsgruppe diese oben beschriebenen Defekte auch nach Reduktion der SLP-76-Expression in primären humanen T-Zellen verifizieren (Horn et al. 2009).

4.2 TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung

Verschiedene Studien belegen, dass die Anwesenheit von SLP-76 für die Adhäsion an Fibronectin, dem Liganden von dem β 1-Integrin VLA-4, nach Stimulation des TZR benötigt wird (Epler et al. 2000; Nguyen et al. 2008; Ophir et al. 2013). Für diese Untersuchungen wurde die SLP-76-defiziente Zelllinie J14 verwendet. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bestätigen, dass die TZR- und PMA-vermittelte Adhäsion in dieser T-Zelllinie gegenüber Fibronectin gestört ist (Dr. S. Kliche unpublizierte Daten). Diese Defekte wurden in den SLP-76 rekonstituierten J14-76-11 und J14-76-18 Zellen aufgehoben. Bei der direkten Aktivierung von VLA-4 mit $MnCl_2$ waren alle drei Zelllinien in der Lage an Fibronectin zu binden (Dr. S. Kliche unpublizierte Daten).

Überraschenderweise konnte unsere AG in weiteren Vorarbeiten weder mit CD3-Ak, PMA oder mit $MnCl_2$ eine Adhäsion dieser Zellen (defiziente sowie rekonstituierte Linien) an immobilisiertem ICAM-1 (Ligand für LFA-1) beobachten. Diese Defekte in der Adhäsion korrelierten nicht mit einer verminderten Oberflächenexpression von LFA-1 auf diesen Linien im Vergleich zu der parentalen Jurkat-T-Zelllinie JE6.1 (Dr. S. Kliche, nicht publizierte Daten), welche einen Einfluss auf die Adhäsion haben könnte.

Die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 erfolgt über die beiden N-terminalen Ig-Domänen des Liganden und der I-Domäne in der extrazellulären Domäne von CD11a (McDowall et al. 1998; Leitinger und Hogg 2000; Knorr und Dustin 1997). Diese I-Domäne enthält eine konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindestelle, die auch als Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS, *Metal ion-dependent adhesion site*) bezeichnet wird (Lee et al. 1995). Die Bindung der divalenten Kationen an dieses Motiv induziert direkt die hochaffine Konformation dieses Integrins (McDowall et al. 1998; Leitinger und Hogg 2000). Zur Generierung der SLP-76-defizienten Zelllinie J14 wurde die parentale Jurkat T-Zelllinie JE6.1 chemisch mutagenisiert (Yablonski et al., 1998) und anschließend auf eine reduzierte TZR-vermittelte CD69 Hochregulation ein entsprechender Zellklon selektioniert. Es ist daher möglich, dass durch die chemische Mutagenese eine oder mehrere Mutationen in der Aminosäuresequenz der Ligandenbindungsstelle bzw. des MIDAS-Motivs eingeführt wurden, die die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 verhindern. Solche Mutationen in der Aminosäuresequenz der Ligandenbindungsstelle und/oder des MIDAS-Motivs könnten eine Erklärung dafür sein, warum die Jurkat T-Zell-Linie J14 (sowie die rekonstituierten Linien) nach Zugabe von $MnCl_2$ nicht an immobilisiertes ICAM-1 binden.

Mit Hilfe der RNAi von SLP-76 konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass die Anwesenheit von SLP-76 in der Jurkat T-Zelllinie JE6.1 für die TZR-induzierte Aktivierung des Integrins LFA-1 essentiell ist. Meine Daten weisen darauf hin, dass nach Reduktion der SLP-76-Expression in Jurkat T-Zellen die TZR-vermittelte Affinität und Avidität von LFA-1 reduziert ist (*inside-out-signaling*, Abb. 3.6). Diese Defekte bei der LFA-1-Aktivierung nach Reduktion der endogenen SLP-76-Expression korrelieren mit einer verminderten Adhäsion der T-Zellen gegenüber ICAM-1 und einer reduzierten Interaktion von T-Zellen mit APZs (*outside-in-signaling*, Abb. 3.5). Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Defekte bei der TZR-

vermittelten Aktivierung von LFA-1 auch nach Reduktion der SLP-76-Expression in primären humanen T-Zellen verifizieren (Horn et al. 2009).

4.3 TZR-vermittelte Signalwege für die LFA-1-Aktivierung

SLP-76 besitzt definitionsgemäß keine enzymatische oder transkriptionelle Aktivität, verfügt jedoch über verschiedene Protein-Protein-Interaktionsdomänen und Tyrosin-basierte Signalmotive. Mithilfe dieser Domänen/Motive kann SLP-76 konstitutive oder induzierbare Protein-Protein-Interaktionen mit anderen intrazellulären Signalmolekülen eingehen, um eine Signalplattform aufzubauen, die die TZR-vermittelte Aktivierung der Lymphozyten steuert (Wu und Koretzky 2004; Koretzky et al. 2006). Von einer Vielzahl dieser Interaktionspartner ist ebenfalls bekannt, dass sie an Signalwegen beteiligt sind, die die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 regulieren. Zu diesen Interaktionspartnern gehören PLC γ 1 (Katagiri et al. 2004b), Itk (Finkelstein et al. 2005), Vav (Krawczyk et al. 2002; Ardouin et al. 2003), Nck (Lettau et al. 2014) und ADAP (Peterson et al. 2001; Griffiths et al. 2001). Die funktionelle Relevanz der Interaktionspartner von SLP-76 für die LFA-1-Aktivierung wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.3.1 SLP-76 bei der TZR-vermittelten Rap1-Aktivierung

Ein kritischer Regulator bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung, der T-Zell-Adhäsion sowie der Interaktion von T-Zellen mit APZs ist die GTPase Rap1 (Mor et al. 2007; Su et al. 2015). Verschiedene Studien belegen, dass die Aktivierung von Rap1 von der Expression der PLC γ 1 abhängt (Katagiri et al. 2004b; Ghandour et al. 2007; Peak et al. 2008). Die beiden Botenstoffe Calcium und DAG, die nach Hydrolyse von PIP $_2$ von PLC γ 1 erzeugt werden, aktivieren individuell oder in Kombination den Calcium- und DAG-abhängigen GTP-Austauschfaktor CalDAG-GEFI, der wiederum Rap1 aktiviert (Kawasaki et al. 1998). Ein Defekt in der Aktivierung der PLC γ 1 nach Reduktion der SLP-76-Expression (siehe Abb. 3B und C) könnte eine verminderte Aktivierung von CalDAG-GEFI zur Folge haben und somit für die reduzierte Aktivierung von Rap1 nach Stimulation des TZR verantwortlich sein.

Ein weiterer Mechanismus, der ebenfalls von SLP-76 gesteuert wird, könnte zu dem Defekt bei der TZR-vermittelten Aktivierung von Rap1 beitragen. Zwei Studien belegen, dass SLP-76 für die Aktivierung und die Rekrutierung von PKC θ an die Plasmamembran mitverantwortlich ist (Herndon et al. 2001; Dienz et al. 2003). Diese Serin/Threoninkinase gehört zur Gruppe der neuen PKCs (Brezar et al. 2015). Aufgrund struktureller Unterschiede in der C2-Domäne wird PKC θ unabhängig von Calcium nur über DAG aktiviert, wohingegen klassische PKCs für deren Aktivierung DAG und Calcium benötigen (Steinberg 2008). Die Studie von Letschka et al. konnte zeigen, dass PKC θ mit dem GTP-Austauschfaktor Rap1-GEF2 interagiert und dieses GEF am Serin 960 (S960) phosphoryliert. Nach Mutation von S960 zu Alanin (S960A) in Rap1-GEF2 (wodurch diese Stelle nicht mehr phosphoryliert wird) konnte eine Rap1-Aktivierung in den Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Komplementär

resultierte die Mutation von Serin 960 in Asparaginsäure (S960E, *Phospho-Mimikry*) in einer konstitutiven Rap1-Aktivierung (Letschka et al. 2008). Diese Daten zeigen, dass die TZR-vermittelte Rap1-Aktivierung durch Phosphorylierung des GTP-Austauschfaktors Rap1-GEF2 über PKC θ reguliert wird. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust von SLP-76 mehrere Signalwege beeinflusst, die für die TZR-induzierte Aktivierung von Rap1 von Bedeutung sind.

Abb. 3.7B zeigt, dass nach Behandlung mit PMA (DAG-Analogen) eine Rap1-Aktivierung nach Reduktion der SLP-76-Expression induziert werden konnte. Für diese Rap1-Aktivierung könnten sowohl die PMA-abhängige CalDAG-GEFI- (Kawasaki et al. 1998), als auch die PMA-vermittelte PKC θ -Aktivierung von Rap1-GEF2 (Letschka et al. 2008) verantwortlich sein. Überraschenderweise rekonstituierte diese PMA-vermittelte Rap1-Aktivierung in Abwesenheit von SLP-76 nicht die LFA-1-Aktivierung (Abb. 3.6B) oder die Adhäsion der T-Zellen an ICAM-1 (Abb. 3.5C). Diese Daten deuten darauf hin, dass zusätzlich zur Aktivierung von Rap1 noch andere Signalprozesse beteiligt sein müssen, die für die *inside-out*-Aktivierung von LFA-1 benötigt werden. Zwei Studien belegen, dass die Rekrutierung von konstitutiv aktivem Rap1 über seine Effektorproteine RIAM und RapL an die Plasmamembran ein weiterer kritischer Schritt bei der LFA-1-Aktivierung ist (Lafuente et al. 2004; Katagiri et al. 2006). Daher ist es möglich, dass die Anwesenheit von SLP-76 nicht nur für die Aktivierung dieser GTPase benötigt wird, sondern zusätzlich auch für die Rekrutierung von Rap1 an die Plasmamembran verantwortlich ist.

4.3.2 SLP-76 und das ADAP/SKAP55-Modul

Die TZR-vermittelte Interaktion zwischen SLP-76 und ADAP wurde bereits in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben (Musci et al. 1997; da Silva et al. 1997; Veale et al. 1999; Raab et al. 1999). Von ADAP sind zwei Populationen beschrieben worden. Ca. 70 % der ADAP-Moleküle liegen in einem Komplex mit SKAP55 vor (Marie-Cardine et al. 1998b). Dieser Komplex steuert die Integrinaktivierung (Wang et al. 2003; Kliche et al. 2006; Wang et al. 2007). Die verbliebenen 30 % sind mit dem CBM-Komplex assoziiert (Medeiros et al. 2007) und bewirken die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Medeiros et al. 2007). Strukturfunktionsanalysen bestätigen, dass der an SLP-76 assoziierte Pool von ADAP vermutlich nicht an der Aktivierung von NF κ B, sondern an der Integrinaktivierung beteiligt ist. Die Assoziation zwischen ADAP mit SLP-76 wird über die Tyrosine in Position 595 und 651 von ADAP und der SH2-Domäne von SLP-76 vermittelt (Geng et al. 1999). Die Expression einer ADAP-Mutante, in der diese Tyrosine zu Phenylalanin mutiert wurden (und die daher nicht mehr an die SH2-Domäne von SLP-76 binden kann), resultiert in einer verminderten Interaktion zwischen T-Zellen und APZs und einer reduzierten TZR-vermittelten Adhäsion gegenüber ICAM-1 (Wang et al. 2004; Sylvester et al. 2010). Wie in Abb. 3.8A dargestellt, konnte ich die Interaktion von SLP-76 mit ADAP nur nach Stimulation des TZR sowohl in Jurkat T-Zellen als auch in primären humanen T-Zellen bestätigen. In diesen

Koimmunpräzipitationsstudien von SLP-76 konnte ich zuzüglich zu ADAP auch SKAP55 als Interaktionspartner nachweisen. Daher gehe ich davon aus, dass die Fraktion von ADAP und SKAP55, die mit SLP-76 assoziiert ist, an der Integrinaktivierung beteiligt ist. Die Annahme wird unterstützt, da ich zusätzlich zu SKAP55 auch das Rap1-Effektorprotein RIAM sowie Rap1, in SLP-76-Präzipitaten von aktivierten T-Zellen detektieren konnte. Von RIAM und Rap1 ist bekannt, dass sie an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt sind (Lafuente et al. 2004; Ménasché et al. 2007b; Mor et al. 2007).

Basierend auf den Koimmunpräzipitationsstudien in Abb. 3.8A, favorisiere ich ein Modell, dass die induzierbare Interaktion zwischen SLP-76 und ADAP für die Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM-Moduls zusammen mit aktiviertem Rap1 an die Plasmamembran verantwortlich ist. Die Daten in Abb. 3.9 bestätigen dieses Modell, da nach Reduktion der SLP-76-Expression eine verminderte Rekrutierung der Komponenten des Moduls an die Plasmamembran festzustellen war. Wichtig anzumerken ist hier, dass die Reduktion der SLP-76-Expression keinen Einfluss auf die Expression und die konstitutive Assoziation zwischen ADAP, SKAP55 und RIAM hatte, sondern nur die Assoziation von Rap1 mit RIAM beeinträchtigt war (Abb. 3.1, 3.2 und 3.8). Diese beeinträchtigte Assoziation ist vermutlich auf den reduzierten Aktivierungszustand von Rap1 nach Reduktion der SLP-76 Expression zurückzuführen, da nur die GTP-beladene Form von Rap1 mit RIAM interagiert (Lafuente et al. 2004).

Zusätzlich zur Interaktion von SKAP55 mit RIAM konnte die Arbeitsgruppe von Chris Rudd zeigen, dass SKAP55 auch konstitutiv an RapL bindet (Raab et al. 2010). Zwei ADAP/SKAP55 -Module wurden darauffolgend identifiziert, die entweder konstitutiv mit RIAM oder mit RapL assoziiert sind (Kliche et al. 2012). Ein ADAP/SKAP55 -Modul ist assoziiert mit Mst-Kinasen und GTP-beladenem Rap1-gebundenem RapL. In diesem Komplex interagiert RapL mit der zytoplasmatischen Domäne der α L-Kette von LFA-1 (Katagiri et al. 2003; Kliche et al. 2012). Das andere ADAP/SKAP55 -Modul interagiert mit Mst-Kinasen und RIAM. Die Interaktion von GTP-beladenem, Rap1-gebundenem RIAM mit Talin vermittelt die Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne der β ₂-Kette von LFA-1 (Kliche et al. 2012; Patsoukis et al. 2017). Daher ist es möglich, dass die Anwesenheit von SLP-76 nicht nur für die Aktivierung von Rap1 benötigt wird, sondern zusätzlich auch für die Rekrutierung des ADAP/SKAP55/RIAM -Moduls (und vermutlich auch des ADAP/SKAP55/RapL -Moduls) zusammen mit der GTP-beladenen Form von Rap1 an die Plasmamembran in die Nähe von LFA-1 verantwortlich ist, so dass diese beiden ADAP/SKAP55 -Module mit den zytoplasmatischen Domänen von LFA-1 interagieren können. Neuere Daten unserer AG bestätigen diese Annahme. Witte et al. konnten in Koimmunpräzipitationstudien von SKAP55 eine induzierbare Interaktion von SLP-76 mit den beiden Rap1-Effektorproteinen RapL und RIAM, die mit den unterschiedlichen ADAP/SKAP55 -Modulen interagieren, nachweisen (Witte et al. 2017). Meine Daten unterstützen ein Modell, in dem die Aktivierung von Rap1 und die Rekrutierung von Rap1 an die Plasmamembranen zwei miteinander in

Beziehung stehende Prozesse sind, aber auf der molekularen Ebene über verschiedene Signalereignisse kontrolliert und auf der Ebene von SLP-76 organisiert werden (s. Abb. 4.1).

4.4 Die Rolle von SLP-76 bei TZR-vermittelten Signalwegen für die Aktinreorganisation

Neben der Aktivierung und dem Transport von Rap1 ist die Reorganisation des Aktinzytoskeletts entscheidend an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt (Billadeau et al. 2007; Burkhardt et al. 2008). Bei der Interaktion von T-Zellen mit APZs kommt es zur Ausbildung der IS, die mit einer starken Aktinreorganisation (Lamellipodienbildung) einhergeht (Billadeau et al. 2007; Burkhardt et al. 2008). Der erhöhte F-Aktin Gehalt (F-Aktinpolymerisation), der mit einer Lamellipodienbildung einhergeht, findet in der pSMAC (*peripheral Supramolecular activation cluster*) der IS statt, wo auch das Integrin LFA-1 lokalisiert ist. Auf der intrazellulären Seite stellt Talin (vermutlich auch Kindlin-3), welches die offene Konformation von LFA-1 stabilisiert und parallel mit dem F-Aktin interagiert, die Verbindung zum Zytoskelett her, um so die Stabilisierung der IS zu gewährleisten, die für die Aktivierung der T-Zellen benötigt wird (Billadeau et al. 2007; Burkhardt et al. 2008).

In meiner Arbeit konnte ich beobachten, dass die Reduktion der SLP-76 Expression in aktivierten Jurkat T-Zellen eine F-Aktinpolymerisation verhindert (Abb. 3.10). Der Defekt in der TZR-vermittelten F-Aktinpolymerisation konnte auch nach Reduktion der Expression von SLP-76 in humanen primären T-Zellen gezeigt werden (Horn et al. 2009). Komplementär zur shRNA von SLP-76 wurde durch Überexpression von SLP-76 eine drastische Erhöhung des TZR-vermittelten F-Aktin Gehalts im Vergleich zu parentalen Jurkat T-Zellen beobachtet (Bubeck Wardenburg et al. 1998).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von SLP-76-reduzierten humanen T-Zellen mit SA-beladenen Raji B-Zellen konnte ebenfalls keine Akkumulation des F-Aktins (sowie von Talin und LFA-1) in der IS beobachtet werden (Horn et al. 2009). Diese Daten deuten darauf hin, dass SLP-76 für die F-Aktinpolymerisation und die damit verbundene Bildung von Lamellipodien in der Kontaktstelle benötigt wird (Horn et al. 2009). Im Gegensatz zu meinem Daten konnte Baarda Saad et al. eine normale Lamellipodienbildung in TZR-stimulierten SLP-76-defizienten J14 Jurkat T-Zellen in einem Spreadingassay beobachten (Barda-Saad et al. 2005). Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist bisher nicht klar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich im Laufe der Jahre in der SLP-76-defiziente Zelllinie J14 durch den Selektionsdruck (die Abwesenheit von SLP-76) Kompensationsmechanismen entwickelt haben, die eine TZR-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts ermöglichen, welche aber nach der kurzen Zeit der transienten Reduktion der SLP-76-Expression nicht auftreten.

4.4.1 Die Rolle von SLP-76 bei der TZR-vermittelten Aktivierung von der GTPase Rac

Der von mir beobachtete Defekt in der F-Aktinpolymerisation (Abb. 3.10) ist vermutlich auf eine verminderte Aktivierung der GTPase Rac (Abb. 3.11) zurückzuführen. Es ist jedoch bekannt, dass eine

andere Studie keinen Defekt in der Rac-Aktivierung nach TZR-Stimulation beobachtet hatte (Ku et al. 2001). Auch in dieser Studie wurde die SLP-76-defiziente Zelllinie J14 verwendet. Die Gründe für diese unterschiedlichen Befunde in Bezug auf die Rac-Aktivierung sind derzeit unklar. Eine mögliche Ursache könnten, wie bereits oben erwähnt, Kompensationsmechanismen sein, die eine Rac-Aktivierung in dieser Zelllinie ermöglichen.

Die Aktivierung von Rac erfolgt über den GTP-Austauschfaktor Vav (Tybulewicz 2005). Zusätzlich wird die Aktivierung und Rekrutierung von Vav über die Kinase Itk gesteuert (Tybulewicz 2005; Gomez-Rodriguez et al. 2007). Sowohl Vav als auch Itk interagieren mit SLP-76 nach Stimulation des TZR (Wu und Koretzky 2004; Koretzky et al. 2006). Von beiden Molekülen ist bekannt, dass sie für die TZR-vermittelte F-Aktinpolymerisation, die Akkumulation von F-Aktin in der IS, die Aggregation von LFA-1, die Adhäsion an ICAM-1 und für die Interaktion mit APZs benötigt werden (Tybulewicz 2005; Gomez-Rodriguez et al. 2007).

Die Funktion von Vav besteht darin, einen ausreichenden Pool aktiviertes Rac zu erzeugen, um die F-Aktin-Polymerisation durch Aktivierung von Proteinen der WASp- (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) Familie zu initiieren (Takenawa und Miki 2001). Zu dieser Familie gehört auch das WAVE2- (*WASp verprolin homologous*) Protein, welches in hämatopoetischen Zellen, wie Lymphozyten, exprimiert wird (Suetsugu et al. 1999). WAVE2 bildet zusammen mit dem Rac-Bindeprotein Sra-1 (*Specifically Rac associated protein 1*), HEM-1 (*Hematopoietic protein-1*) und Abi-2 (*Abl Interactor-2*) einen Komplex (Gautreau et al. 2004). GTP-beladenes Rac, gebunden an Sra-1 in diesem Komplex, induziert die Rekrutierung an die Plasmamembran, wo lokal der Arp2/3- (*Actin-related proteins 2 and 3*) Komplex aktiviert wird und die F-Aktinpolymerisation für die Lamellipodienbildung eingeleitet wird (Steffen et al. 2004). In drei Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von WAVE2 in Jurkat T-Zellen für die TZR-vermittelte F-Aktinpolymerisation, die Akkumulation von F-Aktin und die Rekrutierung von Talin in die IS, die Adhäsion an Fibronectin und für die Interaktion mit APZs benötigt wird (Nolz et al. 2006; Nolz et al. 2007; Nolz et al. 2008). Meine Daten (die verminderte Aktinreorganisation sowie die Rac-Aktivierung nach Reduktion der SLP-76-Expression) stimmen mit einem Modell überein, bei dem in Abwesenheit von SLP-76, die über Vav/Itk-regulierte Rac-vermittelte Aktivierung des WAVE2-Komplexes und des Arp2/3-Komplexes inhibiert ist.

Interessanterweise kommt es nach Reduktion der WAVE2-Expression in Jurkat T-Zellen zu einer verminderten Rap1-Aktivierung nach Stimulation des TZR (Nolz et al. 2008). In dieser Studie wurde dieser Defekt auf eine verminderte Rekrutierung des GTP-Austauschfaktors C3G von Rap1 an die Plasmamembran zurückgeführt (Nolz et al. 2008). Zusätzlich zu der verminderten F-Aktinpolymerisation, weisen Vav- sowie Itk-defiziente T-Zellen einen Defekt bei der TZR-vermittelten Aktivierung der PLC γ 1 und der Calciumfreisetzung auf (Liu et al. 1998b; Costello et al. 1999; Schaeffer et al. 1999; Reynolds et al. 2002; Altman et al. 2004; Knyazhitsky et al. 2012). Da die beiden Botenstoffe Calcium und DAG für die Aktivierung der GTP-Austauschfaktoren zur Rap1-Aktivierung benötigt

werden, wäre es von Interesse, zu überprüfen, ob in diesen T-Zellen ein Defekt bei der TZR-vermittelten Rap1-Aktivierung vorliegt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zur Aktivierung von Rac noch andere Signalprozesse, wie die Aktivierung von Rap1, beteiligt sind, die von diesen Molekülen reguliert werden und damit zusätzlich an der Aktivierung von LFA-1 beteiligt sind.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammengefasst belegen meine Daten, dass das Adapterprotein SLP-76 eine zentrale Position einnimmt, um verschiedene Signalwege zu koordinieren, die an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt sind. Diese molekularen Ereignisse sind in der Abb. 4.1 zusammengefasst.

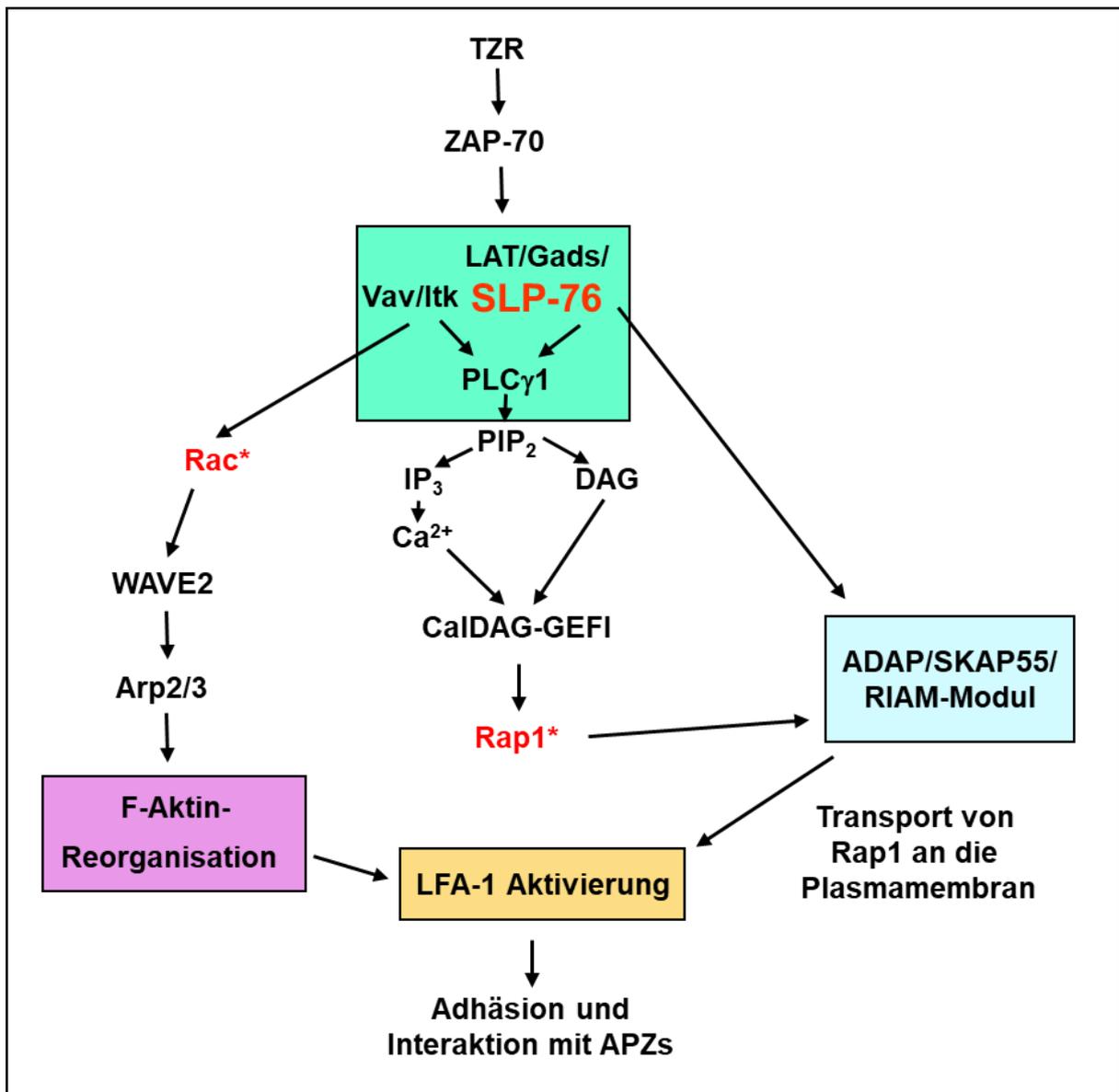


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Signalwege, bei denen SLP-76 möglicherweise an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt ist. Die Stimulation des TZR aktiviert über die proximale Tyrosinkinase Lck (nicht gezeigt) ZAP-70. ZAP-70 phosphoryliert die Adapterproteine LAT und SLP-76 und es kommt zur Bildung des Calciuminitiationskomplexes (bestehend aus: LAT, SLP-76, Gads, Vav, Itk und PLC γ 1). Aktivierte PLC γ 1 hydrolysiert PIP $_2$ zu IP $_3$ und DAG. IP $_3$ induziert die Calcium-Freisetzung. Ca $^{2+}$ und DAG sind an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B beteiligt. Diese sekundären Botenstoffe aktivieren den GTP-Austauschfaktor CalDAG-GEFI, um Rap1 zu aktivieren (Rap1*). Aktiviertes Rap1 wird über das Effektorprotein RIAM (oder RapL), welches in einem Komplex mit ADAP/SKAP55-Modul vorliegt nach Interaktion mit SLP-76 an die Plasmamembran rekrutiert. Der phosphorylierte GTP-Austauschfaktor Vav aktiviert Rac (Rac*), welches nach Bindung an den WAVE2-Komplex die F-Aktinpolymerisation (Lamellipodienbildung) initiiert. Talin stabilisiert zusammen mit dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul die offene Konformation von LFA-1. Zusätzlich interagiert Talin mit F-Aktin und stellt die Verbindung zum Zytoskelett her. Alle diese molekularen Ereignisse sind an der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt und regulieren die T-Zell-Adhäsion und die Interaktion von T-Zellen mit APZs.

4.6 Ausblick

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse belegen, dass SLP-76 an der Initiierung von Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist, die eine Rolle bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung spielen könnten. Um die Bedeutung der Tyrosinmotive, der Gads-Bindungsdomäne sowie der SH2-Domäne von SLP-76 für die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 näher zu untersuchen, sollte ein Rekonstitutionsvektor für SLP-76 generiert werden, mit dem einerseits die Expression von endogenem SLP-76 reduziert wird und gleichzeitig FLAG-SLP-76- oder SLP-76-Mutanten für eine Struktur-funktionsanalyse reexprimieren werden können.

Bei diesem Rekonstitutionsvektor handelt es sich um den pCMS4-Vektor, der auf einer Weiterentwicklung des in dieser Promotionsarbeit verwendeten pCMS3 von Daniel Billadeau beruht (Gomez et al. 2006). Dieser pCMS4-Vektor enthält neben dem H1-Promotor (H1p) zur Generierung der shRNA gegen SLP-76 und dem SV40-Promotor (SV40p), von dem EGFP exprimiert wird, zusätzlich einen Cytomegalie-Virus-Promotor (CMVp), der die Reexpression von shRNA resistentem SLP-76 erlaubt (Abb. 4.2).

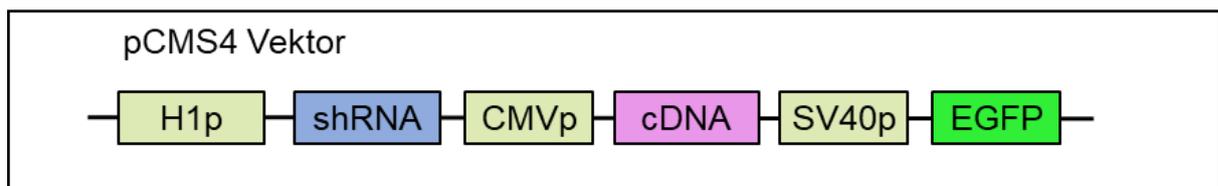


Abb. 4.2: Der Rekonstitutionsvektor pCMS4. Der pCMS4-Vektor enthält drei Promotoren: H1p (H1-RNA Polymerase-III-Promotor), CMVp (Cytomegalie-Virus-Promotor) und SV40p (*Simian Virus 40*-Promotor). Hinter dem CMVp befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (MKS). Die generierte, mutierte shRNA-resistente cDNA von SLP-76 kann in diese MKS kloniert werden und wird gleichzeitig mit einem FLAG-Tag versehen. Mithilfe des FLAG-Tags können das reexprimierte SLP-76 oder dessen Mutanten von dem endogen exprimierten SLP-76 unterschieden werden.

Dieses Vektorsystem wurde bereits in mehreren Studien zur shRNA von verschiedenen Molekülen sowie deren gleichzeitige Reexpression vom Wildtyp und der Mutanten in Jurkat T-Zellen verwendet (Gomez et al. 2006; Nolz et al. 2007; Jung et al. 2016). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte diese Rekonstitutionsvektoren bereits erfolgreich zur Reduktion der Expression von ADAP und SKAP55 sowie der Serin/Threoninkinase Ndr2 und gleichzeitiger Reexpression vom Wildtyp oder der Mutanten dieser Proteine für Struktur-funktionsanalysen bei der Integrinaktivierung einsetzen (Kuropka et al. 2015; Witte et al. 2017; Waldt et al. 2018).

Zusätzlich könnten uns verschiedene Rekonstitutionsvektoren von verschiedenen Mutanten für Protein-Protein-Interaktionsdomänen oder der Tyrosinmotive von SLP-76 helfen herauszufinden, welche konstitutiven oder induzierbaren Interaktionspartner von SLP-76 z. B. bei der Aktivierung der GTPasen Rap1 und Rac oder bei der gestörten F-Aktin-Bildung beteiligt sind. Mit diesen Experimenten

zur Strukturfunktionsanalyse von SLP-76 sollte es möglich sein, die Proteine zu identifizieren, die an den verschiedenen Signalwegen bei der TZR-vermittelten LFA-1-Aktivierung beteiligt sind.

Zusammenfassung

Für die Induktion einer adaptiven Immunantwort müssen T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe einwandern, um dann in der T-Zellzone mit dendritischen Zellen zu interagieren. Die Interaktion zwischen dem TZR (T-Zellrezeptor) auf T-Zellen mit Peptid-beladenen MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen (APZ (antigenpräsentierenden Zellen)) führt zur Ausbildung der IS (immunologischen Synapse). Die Formation und Stabilisierung der IS geht einher mit der Aktivierung des Integrins LFA-1 (*Leukocyte function-associated molecule 1*) (*inside-out-signaling*) und der Akkumulation von F (filamentösem)-Aktin und dessen Reorganisation in der Kontaktstelle, um so die Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle einzuleiten und zu unterstützen (*outside-in-signaling*). Verschiedene Adapterproteine sind an der Initiierung der TZR-vermittelten Aktivierung von Lymphozyten beschrieben worden. Zu diesen gehört auch SLP-76 (*SH2-containing leukocyte protein of 76 kDa*), welches eine essenzielle Rolle bei TZR-vermittelter Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T-Zellen spielt. Ob SLP-76 zusätzlich an Signalwegen beteiligt war, welche die TZR-vermittelte LFA-1-Aktivierung und Aktinreorganisation regulieren, ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle von SLP-76 für *inside-out*-Signalprozesse nach RNA-Interferenz in Jurkat T-Zellen untersucht. Unter Verwendung von biochemischen und zellbiologischen Techniken konnten nach Reduktion der SLP-76-Expression in Jurkat T-Zellen bereits bekannte Defekte bei der T-Zell-Aktivierung bestätigt werden. Zu diesen SLP-76-abhängigen Prozessen gehörte eine gestörte Aktivierung der PLC γ 1, die Freisetzung von Calcium, die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und die Induktion der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von SLP-76 in dieser T-Zelllinie zu einer verminderten Aktivierung des Integrins LFA-1 nach Stimulation des TZR führt (*inside-out-signaling*). Die reduzierte LFA-1-Aktivierung nach Reduktion der SLP-76-Expression korrelierte mit einer verminderten T-Zell-Adhäsion an ICAM-1 (*Intercellular cell adhesion molecule 1*), dem Liganden von LFA-1, und in einer gestörten Interaktion zwischen T-Zellen und SA (Superantigen)-beladenen B-Zellen, die als APZs verwendet wurden (*outside-in-signaling*). Eine Schlüsselrolle bei der TZR-vermittelten Aktivierung von LFA-1 nimmt die Aktivierung der GTPase Rap1 die über das ADAP/SKAP55/RIAM-Modul an die Plasmamembran rekrutiert wird. Biochemische Untersuchungen ergaben, dass die TZR-vermittelte Aktivierung von Rap1 in Abwesenheit von SLP-76 gestört ist. In Koimmunpräzipitationsstudien konnte erstmalig eine induzierbare Interaktion von SLP-76 mit dem ADAP/SKAP55/RIAM-Modul nachgewiesen werden. Die Reduktion der SLP-76-Expression führte zu einer verminderten Rekrutierung dieses Moduls an die Plasmamembran. TZR-vermittelte Signalprozesse, die die Aktinreorganisation regulieren, sind ebenfalls an der Aktivierung von LFA-1 beteiligt. Nach RNA-Interferenz von SLP-76 konnte in TZR-stimulierten Jurkat T-Zellen ein verminderter F-Aktin Gehalt sowie ein Defekt in der Aktivierung der GTPase Rac nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Anwesenheit von SLP-76 an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist, die die TZR-vermittelte Aktivierung von LFA-1 und die Aktinreorganisation regulieren.

Literaturverzeichnis

- 1 Abram, Clare L.; Lowell, Clifford A. (2009): The ins and outs of leukocyte integrin signaling. In: *Annual review of immunology* 27, S. 339–362. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132554.
- 2 Acuto, Oreste; Michel, Frédérique (2003): CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (12), S. 939–951. DOI: 10.1038/nri1248.
- 3 Akerström, B.; Björck, L. (1986): A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (22), S. 10240–10247.
- 4 Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- 5 Altman, Amnon; Kaminski, Sandra; Busuttil, Valere; Droin, Nathalie; Hu, Junru; Tadevosyan, Yuri et al. (2004): Positive feedback regulation of PLCgamma1/Ca(2+) signaling by PKCtheta in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway. In: *European journal of immunology* 34 (7), S. 2001–2011. DOI: 10.1002/eji.200324625.
- 6 Andrian, U. H. von; Mackay, C. R. (2000): T-cell function and migration. Two sides of the same coin. In: *The New England journal of medicine* 343 (14), S. 1020–1034. DOI: 10.1056/NEJM200010053431407.
- 7 Ardouin, Laurence; Bracke, Madelon; Mathiot, Anne; Pagakis, Stamatis N.; Norton, Trisha; Hogg, Nancy; Tybulewicz, Victor L. J. (2003): Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. In: *European journal of immunology* 33 (3), S. 790–797. DOI: 10.1002/eji.200323858.
- 8 Arnaout, M. A. (1990): Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. In: *Blood* 75 (5), S. 1037–1050.
- 9 Arnaout, M. A.; Todd, R. F.; Dana, N.; Melamed, J.; Schlossman, S. F.; Colten, H. R. (1983): Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol). In: *The Journal of clinical investigation* 72 (1), S. 171–179.
- 10 Au-Yeung, Byron B.; Deindl, Sebastian; Hsu, Lih-Yun; Palacios, Emil H.; Levin, Susan E.; Kuriyan, John; Weiss, Arthur (2009): The structure, regulation, and function of ZAP-70. In: *Immunological reviews* 228 (1), S. 41–57. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00753.x.
- 11 Barda-Saad, Mira; Braiman, Alex; Titerence, Rachel; Bunnell, Stephen C.; Barr, Valarie A.; Samelson, Lawrence E. (2005): Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. In: *Nature immunology* 6 (1), S. 80–89. DOI: 10.1038/ni1143.
- 12 Bazil, V.; Stefanová, I.; Hilgert, I.; Kristofová, H.; Vaněk, S.; Horejsí, V. (1990): Monoclonal antibodies against human leucocyte antigens. IV. Antibodies against subunits of the LFA-1 (CD11a/CD18) leucocyte-adhesion glycoprotein. In: *Folia biologica* 36 (1), S. 41–50.
- 13 Beach, Dvora; Gonen, Ronnie; Bogin, Yaron; Reischl, Ilona G.; Yablonski, Deborah (2007): Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma1. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (5), S. 2937–2946. DOI: 10.1074/jbc.M606697200.
- 14 Berger, Adam C.; Roche, Paul A. (2009): MHC class II transport at a glance. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 1), S. 1–4. DOI: 10.1242/jcs.035089.

- 15 Bernard, Alain; Boumsell, Laurence (1984): The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on human leucocyte differentiation antigens. In: *Human immunology* 11 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/0198-8859(84)90051-x.
- 16 Billadeau, Daniel D.; Nolz, Jeffrey C.; Gomez, Timothy S. (2007): Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (2), S. 131–143. DOI: 10.1038/nri2021.
- 17 Bivona, Trever G.; Wiener, Heidi H.; Ahearn, Ian M.; Silletti, Joseph; Chiu, Vi K.; Philips, Mark R. (2004): Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. In: *The Journal of cell biology* 164 (3), S. 461–470. DOI: 10.1083/jcb.200311093.
- 18 Boriack-Sjodin, P. A.; Margarit, S. M.; Bar-Sagi, D.; Kuriyan, J. (1998): The structural basis of the activation of Ras by Sos. In: *Nature* 394 (6691), S. 337–343. DOI: 10.1038/28548.
- 19 Bos, Johannes L. (2005): Linking Rap to cell adhesion. In: *Current opinion in cell biology* 17 (2), S. 123–128. DOI: 10.1016/j.ceb.2005.02.009.
- 20 Brezar, Vedran; Tu, Wen Juan; Seddiki, Nabila (2015): PKC-Theta in Regulatory and Effector T-cell Functions. In: *Frontiers in immunology* 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00530.
- 21 Bubeck Wardenburg, J.; Fu, C.; Jackman, J. K.; Flotow, H.; Wilkinson, S. E.; Williams, D. H. et al. (1996): Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (33), S. 19641–19644.
- 22 Bubeck Wardenburg, J.; Pappu, R.; Bu, J. Y.; Mayer, B.; Chernoff, J.; Straus, D.; Chan, A. C. (1998): Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. In: *Immunity* 9 (5), S. 607–616.
- 23 Buday, László; Wunderlich, Livius; Tamás, Peter (2002): The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. In: *Cellular signalling* 14 (9), S. 723–731.
- 24 Burkhardt, Janis K.; Carrizosa, Esteban; Shaffer, Meredith H. (2008): The actin cytoskeleton in T cell activation. In: *Annual review of immunology* 26, S. 233–259. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347.
- 25 Calderwood, David A. (2004): Integrin activation. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 5), S. 657–666. DOI: 10.1242/jcs.01014.
- 26 Castellanos, M. C.; Muñoz, C.; Montoya, M. C.; Lara-Pezzi, E.; López-Cabrera, M.; Landázuri, M. O. de (1997): Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (11), S. 5463–5473.
- 27 Cerutti, Heriberto; Casas-Mollano, J. Armando (2006): On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. In: *Current genetics* 50 (2), S. 81–99. DOI: 10.1007/s00294-006-0078-x.
- 28 Clements, J. L.; Yang, B.; Ross-Barta, S. E.; Eliason, S. L.; Hrstka, R. F.; Williamson, R. A.; Koretzky, G. A. (1998): Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5375), S. 416–419.
- 29 Costello, Patrick S.; Walters, Alice E.; Mee, P. Joseph; Turner, Martin; Reynolds, Lucinda F.; Prisco, Antonella et al. (1999): The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- κ B pathways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (6), S. 3035–3040.
- 30 Cyster, J. G. (1999): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5447), S. 2098–2102. DOI: 10.1126/science.286.5447.2098.

- 31 da Silva, Antonio J.; Li, Zhuwen; Vera, Cristina de; Canto, Eduardo; Findell, Paul; Rudd, Christopher E. (1997): Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14), S. 7493–7498.
- 32 Dienz, Oliver; Möller, Andreas; Strecker, Andreas; Stephan, Nadja; Krammer, Peter H.; Dröge, Wulf; Schmitz, M. Lienhard (2003): Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and phospholipase C gamma 1 are required for NF-kappa B activation and lipid raft recruitment of protein kinase C theta induced by T cell costimulation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (1), S. 365–372. DOI: 10.4049/jimmunol.170.1.365.
- 33 Dinarello, Charles A. (2007): Historical insights into cytokines. In: *European journal of immunology* 37 Suppl 1, S34-45. DOI: 10.1002/eji.200737772.
- 34 Duchniewicz, Marlena; Zemojtel, Tomasz; Kolanczyk, Mateusz; Grossmann, Steffen; Scheele, Jürgen S.; Zwartkuis, Fried J. T. (2006): Rap1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. In: *Molecular and cellular biology* 26 (2), S. 643–653. DOI: 10.1128/MCB.26.2.643-653.2006.
- 35 Ebert, Lisa M.; Schaerli, Patrick; Moser, Bernhard (2005): Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. In: *Molecular immunology* 42 (7), S. 799–809. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.06.040.
- 36 Epler, J. A.; Liu, R.; Chung, H.; Ottoson, N. C.; Shimizu, Y. (2000): Regulation of beta 1 integrin-mediated adhesion by T cell receptor signaling involves ZAP-70 but differs from signaling events that regulate transcriptional activity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (9), S. 4941–4949. DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.4941.
- 37 Erb, Klaus J. (2007): Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? In: *European journal of immunology* 37 (5), S. 1170–1173. DOI: 10.1002/eji.200737314.
- 38 Etzioni, Amos (2009): Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. In: *Current opinion in immunology* 21 (5), S. 481–486. DOI: 10.1016/j.coi.2009.07.005.
- 39 Fang, N.; Koretzky, G. A. (1999): SLP-76 and Vav function in separate, but overlapping pathways to augment interleukin-2 promoter activity. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (23), S. 16206–16212.
- 40 Finkelstein, Lisa D.; Shimizu, Yoji; Schwartzberg, Pamela L. (2005): Tec kinases regulate TCR-mediated recruitment of signaling molecules and integrin-dependent cell adhesion. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (9), S. 5923–5930.
- 41 Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
- 42 Firestone, Gary L.; Winguth, Sandra D. (1990): [52] Immunoprecipitation of proteins. In: Murray P. Deutscher (Hg.): *Methods in enzymology*, Bd. 182. San Diego: Academic Press (Methods in Enzymology), S. 688–700.
- 43 Fischer, K. D.; Kong, Y. Y.; Nishina, H.; Tedford, K.; Marengère, L. E.; Koziarzki, I. et al. (1998): Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. In: *Current biology : CB* 8 (10), S. 554–562.

- 44 Förster, Reinhold; Davalos-Misslitz, Ana Clara; Rot, Antal (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (5), S. 362–371. DOI: 10.1038/nri2297.
- 45 Franke, B.; Akkerman, J. W.; Bos, J. L. (1997): Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. In: *The EMBO journal* 16 (2), S. 252–259. DOI: 10.1093/emboj/16.2.252.
- 46 Fraser, John D.; Proft, Thomas (2008): The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. In: *Immunological reviews* 225, S. 226–243. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.
- 47 Gahmberg, C. G.; Tolvanen, M.; Kotovuori, P. (1997): Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. In: *European journal of biochemistry* 245 (2), S. 215–232.
- 48 García-Bernal, David; Wright, Natalia; Sotillo-Mallo, Elena; Nombela-Arrieta, César; Stein, Jens V.; Bustelo, Xosé R.; Teixidó, Joaquin (2005): Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. In: *Molecular biology of the cell* 16 (7), S. 3223–3235. DOI: 10.1091/mbc.E04-12-1049.
- 49 Gautreau, Alexis; Ho, Hsin-yi H.; Li, Jiayu; Steen, Hanno; Gygi, Steven P.; Kirschner, Marc W. (2004): Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13), S. 4379–4383. DOI: 10.1073/pnas.0400628101.
- 50 Geijsen, N.; van Delft, S.; Raaijmakers, J. A.; Lammers, J. W.; Collard, J. G.; Koenderman, L.; Coffey, P. J. (1999): Regulation of p21rac activation in human neutrophils. In: *Blood* 94 (3), S. 1121–1130.
- 51 Geng, L.; Raab, M.; Rudd, C. E. (1999): Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (11), S. 5753–5757.
- 52 Ghandour, Haifa; Cullere, Xavier; Alvarez, Angeles; Luscinskas, Francis W.; Mayadas, Tanya N. (2007): Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin-mediated human T-cell adhesion. In: *Blood* 110 (10), S. 3682–3690. DOI: 10.1182/blood-2007-03-077628.
- 53 Gomez, Timothy S.; Hamann, Michael J.; McCarney, Sean; Savoy, Doris N.; Lubking, Casey M.; Heldebrant, Michael P. et al. (2005): Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. In: *Nature immunology* 6 (3), S. 261–270. DOI: 10.1038/ni1168.
- 54 Gomez, Timothy S.; McCarney, Sean d.; Carrizosa, Esteban; Labno, Christine M.; Comiskey, Erin O.; Nolz, Jeffrey C. et al. (2006): HS1 Functions as an Essential Actin-Regulatory Adaptor Protein at the Immune Synapse. In: *Immunity* 24 (6), S. 741–752. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.03.022.
- 55 Gomez-Rodriguez, Julio; Readinger, Julie A.; Viorritto, Irene C.; Mueller, Kristen L.; Houghtling, Richard A.; Schwartzberg, Pamela L. (2007): Tec kinases, actin, and cell adhesion. In: *Immunological reviews* 218, S. 45–64. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00534.x.
- 56 Grakoui, A.; Bromley, S. K.; Sumen, C.; Davis, M. M.; Shaw, A. S.; Allen, P. M.; Dustin, M. L. (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5425), S. 221–227.
- 57 Grayson, Mitchell H.; van der Vieren, Monica; Sterbinsky, Sherry A.; Michael Gallatin, W.; Hoffman, Patricia A.; Staunton, Donald E.; Bochner, Bruce S. (1998): $\alpha\beta$ 2 Integrin Is

- Expressed on Human Eosinophils and Functions as an Alternative Ligand for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1). In: *The Journal of experimental medicine* 188 (11), S. 2187–2191.
- 58 Griffiths, E. K.; Krawczyk, C.; Kong, Y. Y.; Raab, M.; Hyduk, S. J.; Bouchard, D. et al. (2001): Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5538), S. 2260–2263. DOI: 10.1126/science.1063397.
- 59 Grogan, Jane L.; Mohrs, Markus; Harmon, Brian; Lacy, Dee A.; Sedat, John W.; Locksley, Richard M. (2001): Early Transcription and Silencing of Cytokine Genes Underlie Polarization of T Helper Cell Subsets. In: *Immunity* 14 (3), S. 205–215. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00103-0.
- 60 Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6 (11), S. 1045–1056. DOI: 10.1631/jzus.2005.B1045.
- 61 Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- 62 Harris, N. L.; Ronchese, F. (1999): The role of B7 costimulation in T-cell immunity. In: *Immunology and cell biology* 77 (4), S. 304–311. DOI: 10.1046/j.1440-1711.1999.00835.x.
- 63 Heath, W. R.; Carbone, F. R. (2001): Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. In: *Annual review of immunology* 19, S. 47–64. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.47.
- 64 Herndon, T. M.; Shan, X. C.; Tsokos, G. C.; Wange, R. L. (2001): ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C- θ and NF- κ B activation in response to engagement of CD3 and CD28. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (9), S. 5654–5664. DOI: 10.4049/jimmunol.166.9.5654.
- 65 Hogg, N.; Clive Landis, R.; Bates, P. A.; Stanley, P.; Randi, A. M. (1994): The sticking point: How integrins bind to their ligands. In: *Trends in cell biology* 4 (11), S. 379–382.
- 66 Hogg, Nancy; Laschinger, Melanie; Giles, Katherine; McDowall, Alison (2003): T-cell integrins: more than just sticking points. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 23), S. 4695–4705. DOI: 10.1242/jcs.00876.
- 67 Horn, Jessica; Wang, Xiaoqian; Reichardt, Peter; Stradal, Theresia E.; Warnecke, Nicole; Simeoni, Luca et al. (2009): Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (9), S. 5756–5767. DOI: 10.4049/jimmunol.0900649.
- 68 Huang, Yanping; Burkhardt, Janis K. (2007): T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 5), S. 723–730. DOI: 10.1242/jcs.000786.
- 69 Huang, Yanping; Norton, Darrell D.; Precht, Patricia; Martindale, Jennifer L.; Burkhardt, Janis K.; Wange, Ronald L. (2005): Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (25), S. 23576–23583. DOI: 10.1074/jbc.M413201200.
- 70 Jackman, J. K.; Motto, D. G.; Sun, Q.; Tanemoto, M.; Turck, C. W.; Peltz, G. A. et al. (1995): Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (13), S. 7029–7032.

- 71 Jones, David R.; Sanjuán, Miguel Angel; Stone, James C.; Mérida, Isabel (2002): Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (6), S. 595–597.
- 72 Jordan, Martha S.; Maltzman, Jonathan S.; Kliche, Stefanie; Shabason, Jacob; Smith, Jennifer E.; Obstfeld, Amrom et al. (2007): In vivo disruption of T cell development by expression of a dominant-negative polypeptide designed to abolish the SLP-76/Gads interaction. In: *European journal of immunology* 37 (10), S. 2961–2972. DOI: 10.1002/eji.200636855.
- 73 Jordan, Martha S.; Singer, Andrew L.; Koretzky, Gary A. (2003): Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. In: *Nature immunology* 4 (2), S. 110–116. DOI: 10.1038/ni0203-110.
- 74 Jung, Seung Hee; Yoo, Eun Hye; Yu, Mi Jin; Song, Hyeon Myeong; Kang, Hee Yoon; Cho, Je-Yoel; Lee, Jong Ran (2016): ARAP, a Novel Adaptor Protein, Is Required for TCR Signaling and Integrin-Mediated Adhesion. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197 (3), S. 942–952. DOI: 10.4049/jimmunol.1501913.
- 75 Katagiri, Koko; Imamura, Masashi; Kinashi, Tatsuo (2006): Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. In: *Nature immunology* 7 (9), S. 919–928. DOI: 10.1038/ni1374.
- 76 Katagiri, Koko; Maeda, Akito; Shimonaka, Mika; Kinashi, Tatsuo (2003): RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. In: *Nature immunology* 4 (8), S. 741–748. DOI: 10.1038/ni950.
- 77 Katagiri, Koko; Ohnishi, Noriko; Kabashima, Kenji; Iyoda, Tomonori; Takeda, Naoki; Shinkai, Yoichi et al. (2004a): Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 1045–1051. DOI: 10.1038/ni1111.
- 78 Katagiri, Koko; Shimonaka, Mika; Kinashi, Tatsuo (2004b): Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (12), S. 11875–11881. DOI: 10.1074/jbc.M310717200.
- 79 Kawasaki, Hiroaki; Springett, Gregory M.; Toki, Shinichiro; Canales, Juan J.; Harlan, Patricia; Blumenstiel, Justin P. et al. (1998): A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22), S. 13278–13283.
- 80 Kim, H. K.; Kim, J. W.; Zilberstein, A.; Margolis, B.; Kim, J. G.; Schlessinger, J.; Rhee, S. G. (1991): PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. In: *Cell* 65 (3), S. 435–441.
- 81 Kim, M. J.; Kim, E.; Ryu, S. H.; Suh, P. G. (2000): The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. In: *Experimental & molecular medicine* 32 (3), S. 101–109. DOI: 10.1038/emm.2000.18.
- 82 Kimura, Akihiro; Kishimoto, Tadimitsu (2011): Th17 cells in inflammation. In: *International immunopharmacology* 11 (3), S. 319–322. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.10.004.
- 83 Kinashi, Tatsuo (2005): Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (7), S. 546–559. DOI: 10.1038/nri1646.
- 84 Kliche, Stefanie; Breitling, Dennis; Togni, Mauro; Pusch, Rico; Heuer, Katja; Wang, Xiaoqian et al. (2006): The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin

- activation through plasma membrane targeting of Rap1. In: *Molecular and cellular biology* 26 (19), S. 7130–7144. DOI: 10.1128/MCB.00331-06.
- 85 Kliche, Stefanie; Lindquist, Jonathan A.; Schraven, Burkhard (2004): Transmembrane adapters: structure, biochemistry and biology. In: *Seminars in immunology* 16 (6), S. 367–377. DOI: 10.1016/j.smim.2004.08.017.
- 86 Kliche, Stefanie; Worbs, Tim; Wang, Xiaoqian; Degen, Janine; Patzak, Irene; Meineke, Bernhard et al. (2012): CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. In: *Blood* 119 (3), S. 777–785. DOI: 10.1182/blood-2011-06-362269.
- 87 Knorr, Ruth; Dustin, Michael L. (1997): The Lymphocyte Function–associated Antigen 1 I Domain Is a Transient Binding Module for Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in Hydrodynamic Flow. In: *The Journal of experimental medicine* 186 (5), S. 719–730.
- 88 Knyazhitsky, Mira; Moas, Etay; Shaginov, Ekaterina; Luria, Anna; Braiman, Alex (2012): Vav1 Oncogenic Mutation Inhibits T Cell Receptor-induced Calcium Mobilization through Inhibition of Phospholipase C γ 1 Activation*. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (23), S. 19725–19735. DOI: 10.1074/jbc.M111.309799.
- 89 Koch, Ute; Radtke, Freddy (2011): Mechanisms of T cell development and transformation. In: *Annual review of cell and developmental biology* 27, S. 539–562. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154008.
- 90 Kolanus, W.; Seed, B. (1997): Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. In: *Current opinion in cell biology* 9 (5), S. 725–731.
- 91 Koretzky, Gary A.; Abtahian, Farhad; Silverman, Michael A. (2006): SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (1), S. 67–78. DOI: 10.1038/nri1750.
- 92 Krawczyk, Connie; Oliveira-dos-Santos, Antonio; Sasaki, Takehiko; Griffiths, Emily; Ohashi, Pamela S.; Snapper, Scott et al. (2002): Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. In: *Immunity* 16 (3), S. 331–343.
- 93 Ku, G. M.; Yablonski, D.; Manser, E.; Lim, L.; Weiss, A. (2001): A PAK1-PIX-PKL complex is activated by the T-cell receptor independent of Nck, Slp-76 and LAT. In: *The EMBO journal* 20 (3), S. 457–465. DOI: 10.1093/emboj/20.3.457.
- 94 Kuropka, Benno; Witte, Amelie; Sticht, Jana; Waldt, Natalie; Majkut, Paul; Hackenberger, Christian P. R. et al. (2015): Analysis of Phosphorylation-dependent Protein Interactions of Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein (ADAP) Reveals Novel Interaction Partners Required for Chemokine-directed T cell Migration*. In: *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 14 (11), S. 2961–2972. DOI: 10.1074/mcp.M115.048249.
- 95 Kurreck, Jens (2009): RNA interference: from basic research to therapeutic applications. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (8), S. 1378–1398. DOI: 10.1002/anie.200802092.
- 96 Labno, Christine M.; Lewis, Carol M.; You, Daoqi; Leung, Daisy W.; Takesono, Ana; Kamberos, Natalie et al. (2003): Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. In: *Current biology : CB* 13 (18), S. 1619–1624.
- 97 Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

- 98 Lafuente, Esther M.; van Puijenbroek, André A. F. L.; Krause, Matthias; Carman, Christopher V.; Freeman, Gordon J.; Berezovskaya, Alla et al. (2004): RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. In: *Developmental cell* 7 (4), S. 585–595. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.07.021.
- 99 Le, N. T.; Chao, N. (2007): Regulating regulatory T cells. In: *Bone marrow transplantation* 39 (1), S. 1–9. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705529.
- 100 Lecoanet-Henchoz, S.; Gauchat, J. F.; Aubry, J. P.; Graber, P.; Life, P.; Paul-Eugene, N. et al. (1995): CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. In: *Immunity* 3 (1), S. 119–125.
- 101 Lee, J. O.; Rieu, P.; Arnaout, M. A.; Liddington, R. (1995): Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). In: *Cell* 80 (4), S. 631–638.
- 102 Leitinger, Birgit; Hogg, Nancy (2000): Effects of I Domain Deletion on the Function of the β 2 Integrin Lymphocyte Function-associated Antigen-1. In: *Molecular biology of the cell* 11 (2), S. 677–690.
- 103 Letschka, Thomas; Kollmann, Veronika; Pfeifhofer-Obermair, Christa; Lutz-Nicoladoni, Christina; Obermair, Gerald J.; Fresser, Friedrich et al. (2008): PKC-theta selectively controls the adhesion-stimulating molecule Rap1. In: *Blood* 112 (12), S. 4617–4627. DOI: 10.1182/blood-2007-11-121111.
- 104 Lettau, Marcus; Kliche, Stefanie; Kabelitz, Dieter; Janssen, Ottmar (2014): The adapter proteins ADAP and Nck cooperate in T cell adhesion. In: *Molecular immunology* 60 (1), S. 72–79. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.03.017.
- 105 Li, H.; Llera, A.; Malchiodi, E. L.; Mariuzza, R. A. (1999): The structural basis of T cell activation by superantigens. In: *Annual review of immunology* 17, S. 435–466. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.435.
- 106 Li, Yan-Feng; Tang, Ren-Hong; Puan, Kia-Joo; Law, S. K. Alex; Tan, Suet-Mien (2007): The cytosolic protein talin induces an intermediate affinity integrin α L β 2. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (33), S. 24310–24319. DOI: 10.1074/jbc.M701860200.
- 107 Liu, C.; Hermann, T. E. (1978): Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. In: *The Journal of biological chemistry* 253 (17), S. 5892–5894.
- 108 Liu, Junke; Kang, Hyun; Raab, Monika; da Silva, Antonio J.; Kraeft, Stine-Kathrein; Rudd, Christopher E. (1998a): FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15), S. 8779–8784.
- 109 Liu, Karen-Qianye; Bunnell, Stephen C.; Gurniak, Christine B.; Berg, Leslie J. (1998b): T Cell Receptor–initiated Calcium Release Is Uncoupled from Capacitative Calcium Entry in Itk-deficient T Cells. In: *The Journal of experimental medicine* 187 (10), S. 1721–1727.
- 110 Liu, Li; Schwartz, Barbara R.; Tupper, Joan; Lin, Nancy; Winn, Robert K.; Harlan, John M. (2002): The GTPase Rap1 regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated but not ligand-induced β 1 integrin-dependent leukocyte adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (43), S. 40893–40900. DOI: 10.1074/jbc.M206208200.
- 111 Liu, Qin; Berry, Donna; Nash, Piers; Pawson, Tony; McGlade, C. Jane; Li, Shawn Shun-Cheng (2003): Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. In: *Molecular cell* 11 (2), S. 471–481.

- 112 Lollo, B. A.; Chan, K. W.; Hanson, E. M.; Moy, V. T.; Brian, A. A. (1993): Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (29), S. 21693–21700.
- 113 Macian, Fernando (2005): NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (6), S. 472–484. DOI: 10.1038/nri1632.
- 114 Mackay, C. R. (2001): Chemokines: immunology's high impact factors. In: *Nature immunology* 2 (2), S. 95–101. DOI: 10.1038/84298.
- 115 Mackay, C. R.; Andrian, U. H. von (2001): Immunology. Memory T cells--local heroes in the struggle for immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512), S. 2323–2324. DOI: 10.1126/science.1059984.
- 116 Makepeace, B. L.; Martin, C.; Turner, J. D.; Specht, S. (2012): Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots? In: *Current medicinal chemistry* 19 (10), S. 1567–1586. DOI: 10.2174/092986712799828337.
- 117 Malinin, Nikolay L.; Plow, Edward F.; Byzova, Tatiana V. (2010): Kindlins in FERM adhesion. In: *Blood* 115 (20), S. 4011–4017. DOI: 10.1182/blood-2009-10-239269.
- 118 Manevich-Mendelson, Eugenia; Feigelson, Sara W.; Pasvolsky, Ronit; Aker, Memet; Grabovsky, Valentin; Shulman, Ziv et al. (2009): Loss of Kindlin-3 in LAD-III eliminates LFA-1 but not VLA-4 adhesiveness developed under shear flow conditions. In: *Blood* 114 (11), S. 2344–2353. DOI: 10.1182/blood-2009-04-218636.
- 119 Marie-Cardine, A.; Bruyns, E.; Eckerskorn, C.; Kirchgessner, H.; Meuer, S. C.; Schraven, B. (1997): Molecular cloning of SKAP55, a novel protein that associates with the protein tyrosine kinase p59fyn in human T-lymphocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (26), S. 16077–16080.
- 120 Marie-Cardine, A.; Hendricks-Taylor, L. R.; Boerth, N. J.; Zhao, H.; Schraven, B.; Koretzky, G. A. (1998a): Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (40), S. 25789–25795.
- 121 Marie-Cardine, A.; Verhagen, A. M.; Eckerskorn, C.; Schraven, B. (1998b): SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55. In: *FEBS letters* 435 (1), S. 55–60.
- 122 McDowall, A.; Leitinger, B.; Stanley, P.; Bates, P. A.; Randi, A. M.; Hogg, N. (1998): The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). In: *The Journal of biological chemistry* 273 (42), S. 27396–27403. DOI: 10.1074/jbc.273.42.27396.
- 123 Medeiros, Ricardo B.; Burbach, Brandon J.; Mueller, Kristen L.; Srivastava, Rupa; Moon, James J.; Highfill, Sarah et al. (2007): Regulation of NF-kappaB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5825), S. 754–758. DOI: 10.1126/science.1137895.
- 124 Ménasché, Gaël; Kliche, Stefanie; Bezman, Natalie; Schraven, Burkhardt (2007a): Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. In: *Immunological reviews* 218, S. 82–91. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00543.x.
- 125 Ménasché, Gaël; Kliche, Stefanie; Chen, Emily J. H.; Stradal, Theresia E. B.; Schraven, Burkhardt; Koretzky, Gary (2007b): RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1,

- facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. In: *Molecular and cellular biology* 27 (11), S. 4070–4081. DOI: 10.1128/MCB.02011-06.
- 126 Mor, Adam; Dustin, Michael L.; Philips, Mark R. (2007): Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. In: *Immunological reviews* 218, S. 114–125. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00538.x.
- 127 Motto, D. G.; Musci, M. A.; Ross, S. E.; Koretzky, G. A. (1996): Tyrosine phosphorylation of Grb2-associated proteins correlates with phospholipase C gamma 1 activation in T cells. In: *Molecular and cellular biology* 16 (6), S. 2823–2829.
- 128 Motto DG, Ross SE, Wu J, Hendricks-Taylor LR, Koretzky GA. (1996): Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production. In: *The Journal of experimental medicine* 183 (4), S. 1937–1943.
- 129 Mould, A. P. (1996): Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. In: *Journal of cell science* 109 (Pt 11), S. 2613–2618.
- 130 Musci, M. A.; Hendricks-Taylor, L. R.; Motto, D. G.; Paskind, M.; Kamens, J.; Turck, C. W.; Koretzky, G. A. (1997): Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (18), S. 11674–11677.
- 131 Neefjes, Jacques; Jongsma, Marlieke L. M.; Paul, Petra; Bakke, Oddmund (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.
- 132 Nguyen, Ken; Sylvain, Nicholas R.; Bunnell, Stephen C. (2008): T cell costimulation via the integrin VLA-4 inhibits the actin-dependent centralization of signaling microclusters containing the adaptor SLP-76. In: *Immunity* 28 (6), S. 810–821. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.019.
- 133 Nolz, Jeffrey C.; Gomez, Timothy S.; Zhu, Peimin; Li, Shuixing; Medeiros, Ricardo B.; Shimizu, Yoji et al. (2006): The WAVE2 Complex Regulates Actin Cytoskeletal Reorganization and CRAC-Mediated Calcium Entry during T Cell Activation. In: *Current biology : CB* 16 (1), S. 24–34. DOI: 10.1016/j.cub.2005.11.036.
- 134 Nolz, Jeffrey C.; Medeiros, Ricardo B.; Mitchell, Jason S.; Zhu, Peimin; Freedman, Bruce D.; Shimizu, Yoji; Billadeau, Daniel D. (2007): WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. In: *Molecular and cellular biology* 27 (17), S. 5986–6000. DOI: 10.1128/MCB.00136-07.
- 135 Nolz, Jeffrey C.; Nacusi, Lucas P.; Segovis, Colin M.; Medeiros, Ricardo B.; Mitchell, Jason S.; Shimizu, Yoji; Billadeau, Daniel D. (2008): The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL–C3G-mediated activation of Rap1. In: *The Journal of cell biology* 182 (6), S. 1231–1244. DOI: 10.1083/jcb.200801121.
- 136 Ophir, Michael J.; Liu, Beiyun C.; Bunnell, Stephen C. (2013): The N terminus of SKAP55 enables T cell adhesion to TCR and integrin ligands via distinct mechanisms. In: *The Journal of cell biology* 203 (6), S. 1021–1041. DOI: 10.1083/jcb.201305088.
- 137 Palucka, K.; Banchereau, J. (1999): Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. In: *Journal of clinical immunology* 19 (1), S. 12–25. DOI: 10.1023/a:1020558317162.
- 138 Parkin, Jacqueline; Cohen, Bryony (2001): An overview of the immune system. In: *The Lancet* 357 (9270), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.

- 139 Patsoukis, Nikolaos; Bardhan, Kankana; Weaver, Jessica D.; Sari, Duygu; Torres-Gomez, Alvaro; Li, Lequn et al. (2017): The adaptor molecule RIAM integrates signaling events critical for integrin-mediated control of immune function and cancer progression. In: *Science signaling* 10 (493). DOI: 10.1126/scisignal.aam8298.
- 140 Peak, J. C.; Jones, N. P.; Hobbs, S.; Katan, M.; Eccles, S. A. (2008): Phospholipase C gamma 1 regulates the Rap GEF1-Rap1 signalling axis in the control of human prostate carcinoma cell adhesion. In: *Oncogene* 27 (20), S. 2823–2832. DOI: 10.1038/sj.onc.1210954.
- 141 Pelletier, Martin; Maggi, Laura; Micheletti, Alessandra; Lazzeri, Elena; Tamassia, Nicola; Costantini, Claudio et al. (2010): Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. In: *Blood* 115 (2), S. 335–343. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216085.
- 142 Peterson, E. J.; Woods, M. L.; Dmowski, S. A.; Derimanov, G.; Jordan, M. S.; Wu, J. N. et al. (2001): Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5538), S. 2263–2265. DOI: 10.1126/science.1063486.
- 143 Pivniouk, V.; Tsitsikov, E.; Swinton, P.; Rathbun, G.; Alt, F. W.; Geha, R. S. (1998): Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. In: *Cell* 94 (2), S. 229–238.
- 144 Plow, Edward F.; Qin, Jun; Byzova, Tatiana (2009): Kindling the flame of integrin activation and function with kindlins. In: *Current opinion in hematology* 16 (5), S. 323–328. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32832ea389.
- 145 Raab, M.; Kang, H.; da Silva, A.; Zhu, X.; Rudd, C. E. (1999): FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor zeta/CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that up-regulates interleukin 2 transcription in T-cells. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (30), S. 21170–21179. DOI: 10.1074/jbc.274.30.21170.
- 146 Raab, Monika; Wang, Hongyan; Lu, Yuning; Smith, Xin; Wu, Zhonglin; Strebhardt, Klaus et al. (2010): T Cell Receptor “Inside-Out” Pathway via Signaling Module SKAP1-RapL Regulates T Cell Motility and Interactions in Lymph Nodes. In: *Immunity* 32 (4). DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.007.
- 147 Rabb, H.; Michishita, M.; Sharma, C. P.; Brown, D.; Arnaout, M. A. (1993): Cytoplasmic tails of human complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18) regulate ligand avidity and the internalization of occupied receptors. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (2), S. 990–1002.
- 148 Reichardt, Peter; Dornbach, Bastian; Gunzer, Matthias (2010): APC, T cells, and the immune synapse. In: *Current topics in microbiology and immunology* 340, S. 229–249. DOI: 10.1007/978-3-642-03858-7_12.
- 149 Reynolds, J. A.; Tanford, C. (1970): Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (3), S. 1002–1007. DOI: 10.1073/pnas.66.3.1002.
- 150 Reynolds, Lucinda F.; Smyth, Lesley A.; Norton, Trisha; Freshney, Norman; Downward, Julian; Kioussis, Dimitris; Tybulewicz, Victor L.J. (2002): Vav1 Transduces T Cell Receptor Signals to the Activation of Phospholipase C- γ 1 via Phosphoinositide 3-Kinase-dependent and -independent Pathways. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (9), S. 1103–1114. DOI: 10.1084/jem.20011663.

- 151 Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. (1982): The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 128 (5), S. 2300–2305.
- 152 Rosebeck, Shaun; Rehman, Aasia O.; Lucas, Peter C.; McAllister-Lucas, Linda M. (2011): From MALT lymphoma to the CBM signalosome: Three decades of discovery. In: *Cell Cycle* 10 (15), S. 2485–2496. DOI: 10.4161/cc.10.15.16923.
- 153 Rossetti, Grazisa; Collinge, Mark; Bender, Jeffrey R.; Molteni, Raffaella; Pardi, Ruggero (2002): Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes. In: *Immunological reviews* 186, S. 189–207.
- 154 Sakaguchi, Shimon; Ono, Masahiro; Setoguchi, Ruka; Yagi, Haruhiko; Hori, Shohei; Fehervari, Zoltan et al. (2006): Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. In: *Immunological reviews* 212, S. 8–27. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
- 155 Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712. DOI: 10.1038/44385.
- 156 Sarma, J. Vidya; Ward, Peter A. (2011): The complement system. In: *Cell and tissue research* 343 (1), S. 227–235. DOI: 10.1007/s00441-010-1034-0.
- 157 Sauer, K.; Liou, J.; Singh, S. B.; Yablonski, D.; Weiss, A.; Perlmutter, R. M. (2001): Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (48), S. 45207–45216. DOI: 10.1074/jbc.M106811200.
- 158 Schaeffer, E. M.; Debnath, J.; Yap, G.; McVicar, D.; Liao, X. C.; Littman, D. R. et al. (1999): Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5414), S. 638–641.
- 159 Schneider, H.; Guerette, B.; Guntermann, C.; Rudd, C. E. (2000): Resting lymphocyte kinase (Rlk/Txk) targets lymphoid adaptor SLP-76 in the cooperative activation of interleukin-2 transcription in T-cells. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (6), S. 3835–3840.
- 160 Schroder, Kate; Hertzog, Paul J.; Ravasi, Timothy; Hume, David A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In: *Journal of leukocyte biology* 75 (2), S. 163–189. DOI: 10.1189/jlb.0603252.
- 161 Schroeder, Harry W.; Cavacini, Lisa (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- 162 Sebzda, Eric; Bracke, Madelon; Tugal, Tamara; Hogg, Nancy; Cantrell, Doreen Ann (2002): Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. In: *Nature immunology* 3 (3), S. 251–258. DOI: 10.1038/ni765.
- 163 Simonson, William T. N.; Franco, Santos J.; Huttenlocher, Anna (2006): Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (11), S. 7707–7714.
- 164 Singer, Andrew L.; Bunnell, Stephen C.; Obstfeld, Amrom E.; Jordan, Martha S.; Wu, Jennifer N.; Myung, Peggy S. et al. (2004): Roles of the proline-rich domain in SLP-76 subcellular localization and T cell function. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (15), S. 15481–15490. DOI: 10.1074/jbc.M313339200.

- 165 Smith-Garvin, Jennifer E.; Koretzky, Gary A.; Jordan, Martha S. (2009): T cell activation. In: *Annual review of immunology* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- 166 Steffen, Anika; Rottner, Klemens; Ehinger, Julia; Innocenti, Metello; Scita, Giorgio; Wehland, Jürgen; Stradal, Theresia E. B. (2004): Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. In: *The EMBO journal* 23 (4), S. 749–759. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600084.
- 167 Steinberg, Susann F. (2008): Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. In: *Physiological reviews* 88 (4), S. 1341–1378. DOI: 10.1152/physrev.00034.2007.
- 168 Stone, J. C. (2006): Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP. In: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 5), S. 858–861. DOI: 10.1042/BST0340858.
- 169 Su, Wenjuan; Wynne, Joseph; Pinheiro, Elaine M.; Strazza, Marianne; Mor, Adam; Montenont, Emilie et al. (2015): Rap1 and its effector RIAM are required for lymphocyte trafficking. In: *Blood* 126 (25), S. 2695–2703. DOI: 10.1182/blood-2015-05-644104.
- 170 Suetsugu, S.; Miki, H.; Takenawa, T. (1999): Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. In: *Biochemical and biophysical research communications* 260 (1), S. 296–302. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0894.
- 171 Swain, S. L.; Bradley, L. M.; Croft, M.; Tonkonogy, S.; Atkins, G.; Weinberg, A. D. et al. (1991): Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. In: *Immunological reviews* 123, S. 115–144. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1991.tb00608.x.
- 172 Sylvester, Marc; Kliche, Stefanie; Lange, Sabine; Geithner, Sabine; Klemm, Clementine; Schlosser, Andreas et al. (2010): Adhesion and Degranulation Promoting Adapter Protein (ADAP) Is a Central Hub for Phosphotyrosine-Mediated Interactions in T Cells. In: *PLoS ONE* 5 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0011708.
- 173 Takenawa, T.; Miki, H. (2001): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 10), S. 1801–1809.
- 174 Togni, M.; Swanson, K. D.; Reimann, S.; Kliche, S.; Pearce, A. C.; Simeoni, L. et al. (2005): Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. In: *Molecular and cellular biology* 25 (18), S. 8052–8063. DOI: 10.1128/MCB.25.18.8052-8063.2005.
- 175 Tovey, E.; Baldo, B. (1987): Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture*. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 79 (1), S. 93–102. DOI: 10.1016/s0091-6749(87)80022-2.
- 176 Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- 177 Turvey, Stuart E.; Broide, David H. (2010): Innate immunity. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S24-32. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- 178 Tybulewicz, Victor L. J. (2005): Vav-family proteins in T-cell signalling. In: *Current opinion in immunology* 17 (3), S. 267–274. DOI: 10.1016/j.coi.2005.04.003.

- 179 Vallabhapurapu, Sivakumar; Karin, Michael (2009): Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. In: *Annual review of immunology* 27, S. 693–733. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- 180 van der Vieren, M.; Le Trong, H.; Wood, C. L.; Moore, P. F.; St John, T.; Staunton, D. E.; Gallatin, W. M. (1995): A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. In: *Immunity* 3 (6), S. 683–690.
- 181 van Kooyk, Y.; Figdor, C. G. (2000): Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. In: *Current opinion in cell biology* 12 (5), S. 542–547.
- 182 Veale, M.; Raab, M.; Li, Z.; da Silva, A. J.; Kraeft, S. K.; Weremowicz, S. et al. (1999): Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (40), S. 28427–28435. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28427.
- 183 Villalba, M.; Bi, K.; Rodriguez, F.; Tanaka, Y.; Schoenberger, S.; Altman, A. (2001): Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. In: *The Journal of cell biology* 155 (3), S. 331–338. DOI: 10.1083/jcb.200107080.
- 184 Waldt, Natalie; Seifert, Anke; Demiray, Yunus Emre; Devroe, Eric; Turk, Benjamin E.; Reichardt, Peter et al. (2018): Filamin A Phosphorylation at Serine 2152 by the Serine/Threonine Kinase Ndr2 Controls TCR-Induced LFA-1 Activation in T Cells. In: *Frontiers in immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02852.
- 185 Wang, Hongyan; Lim, Daina; Rudd, Christopher E. (2010): Immunopathologies linked to integrin signalling. In: *Seminars in immunopathology* 32 (2), S. 173–182. DOI: 10.1007/s00281-010-0202-3.
- 186 Wang, Hongyan; Liu, Hebin; Lu, Yuning; Lovatt, Matt; Wei, Bin; Rudd, Christopher E. (2007): Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. In: *Molecular and cellular biology* 27 (19), S. 6863–6875. DOI: 10.1128/MCB.00556-07.
- 187 Wang, Hongyan; McCann, Fiona E.; Gordan, John D.; Wu, Xiang; Raab, Monika; Malik, Talat H. et al. (2004): ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (8), S. 1063–1074. DOI: 10.1084/jem.20040780.
- 188 Wang, Hongyan; Moon, Eun-Yi; Azouz, Abdallah; Wu, Xiang; Smith, Andrew; Schneider, Helga et al. (2003): SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. In: *Nature immunology* 4 (4), S. 366–374. DOI: 10.1038/ni913.
- 189 Weiss, A.; Stobo, J. D. (1984): Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. In: *The Journal of experimental medicine* 160 (5), S. 1284–1299. DOI: 10.1084/jem.160.5.1284.
- 190 Williams, B. L.; Irvin, B. J.; Sutor, S. L.; Chini, C. C.; Yacyshyn, E.; Bubeck Wardenburg, J. et al. (1999): Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. In: *The EMBO journal* 18 (7), S. 1832–1844. DOI: 10.1093/emboj/18.7.1832.
- 191 Witte, Amelie; Meineke, Bernhard; Sticht, Jana; Philipsen, Lars; Kuroepka, Benno; Müller, Andreas J. et al. (2017): D120 and K152 within the PH Domain of T Cell Adapter SKAP55 Regulate Plasma Membrane Targeting of SKAP55 and LFA-1 Affinity Modulation in Human T Lymphocytes. In: *Molecular and cellular biology* 37 (7). DOI: 10.1128/MCB.00509-16.

- 192 Wu, J.; Motto, D. G.; Koretzky, G. A.; Weiss, A. (1996): Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. In: *Immunity* 4 (6), S. 593–602.
- 193 Wu, Jennifer N.; Koretzky, Gary A. (2004): The SLP-76 family of adapter proteins. In: *Seminars in immunology* 16 (6), S. 379–393. DOI: 10.1016/j.smim.2004.08.018.
- 194 Wunderlich, Livius; Faragó, Anna; Downward, Julian; Buday, László (1999): Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. In: *European journal of immunology* 29 (4), S. 1068–1075. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1068::AID-IMMU1068>3.0.CO;2-P.
- 195 Yablonski, D.; Kadlecsek, T.; Weiss, A. (2001): Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. In: *Molecular and cellular biology* 21 (13), S. 4208–4218. DOI: 10.1128/MCB.21.13.4208-4218.2001.
- 196 Yablonski, D.; Kuhne, M. R.; Kadlecsek, T.; Weiss, A. (1998): Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5375), S. 413–416.
- 197 Yakubenia, Sviatlana; Wild, Martin K. (2006): Leukocyte adhesion deficiency II. Advances and open questions. In: *The FEBS journal* 273 (19), S. 4390–4398. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05438.x.
- 198 Yakubenko, Valentin P.; Belevych, Nataly; Mishchuk, Daria; Schurin, Aleksey; Lam, Stephen C.-T.; Ugarova, Tatiana P. (2008): The Role of Integrin $\alpha\text{D}\beta\text{2}$ (CD11d/CD18) in Monocyte/Macrophage Migration. In: *Experimental cell research* 314 (14), S. 2569–2578. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.05.016.
- 199 Yokosuka, Tadashi; Saito, Takashi (2010): The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. In: *Current topics in microbiology and immunology* 340, S. 81–107. DOI: 10.1007/978-3-642-03858-7_5.
- 200 Zamoyska, Rose; Basson, Albert; Filby, Andrew; Legname, Giuseppe; Lovatt, Matthew; Seddon, Benedict (2003): The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. In: *Immunological reviews* 191, S. 107–118.
- 201 Zhang, Nu; Bevan, Michael J. (2011): CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. In: *Immunity* 35 (2), S. 161–168. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.
- 202 Zhang, W.; Sloan-Lancaster, J.; Kitchen, J.; Tribble, R. P.; Samelson, L. E. (1998): LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. In: *Cell* 92 (1), S. 83–92.
- 203 Zúñiga-Pflücker, Juan Carlos (2004): T-cell development made simple. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (1), S. 67–72. DOI: 10.1038/nri1257.

Publikationen

Horn J., Wang X., Reichardt P., Stradal T.E., Warnecke N., Simeoni L. et al. Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells.

J Immunol 2009; 183(9):5756–67. doi: 10.4049/jimmunol.0900649.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Schraven bedanken, dem Leiter des Institutes für Molekulare und Klinische Immunologie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, für die Möglichkeit eine medizinische Promotion mit diesem interessanten Forschungsthema dort anfertigen zu können. Ich danke Ihnen für die Freiheit, die Sie mir gaben, diese Arbeit zu gestalten und innerhalb Ihres Institutes mitzuarbeiten. Während der Seminare, bei Ihren Vorträgen und im Gespräch mit Ihnen und Ihren Kollegen konnte ich viel über die Immunologie lernen und habe sehr viel Interessantes über Ihre Forschungsarbeit erfahren. Dies war ein großer Anreiz für mich, auch ein eigenes Thema zu bearbeiten. Für ihre Unterstützung und Ihre Geduld dabei bin ich Ihnen sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Stefanie Kliche bedanken, die mich mit der Thematik und der Immunologie vertraut gemacht hat und für mich das Thema dieser Arbeit ausgewählt hat. Vielen Dank, dass du mir mit Ausdauer und unendlicher Geduld beiseite gestanden und mit mir gemeinsam diesen Weg bestritten hast. Deine Zeit und deine Unterstützung im experimentellen Teil sowie die Korrekturvorschläge beim Schreiben dieser Arbeit waren für mich unendlich wertvoll. Für die Möglichkeit, gemeinsam mit dir die Experimente und weiterführende Gedanken zu besprechen, bin ich sehr dankbar. Ich bin sehr froh, dass ich dich dabei an meiner Seite hatte.

Bei der gesamten AG Kliche, vor allem Anke Ramonat, Janine Degen und Xiaoqian Wang möchte ich mich von ganzen Herzen bedanken, für eure Geduld und Unterstützung bei der Umsetzung der immunologischen und molekularbiologischen Methoden und Techniken. Vor allem danke ich Anke Ramonat für deine Zeit und deine aufmunternden Worte, die vielen Gespräche und dafür, dass ich in dir eine Freundin fürs Leben gefunden habe.

Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums nicht nur finanziell unterstützt und mein Studium somit überhaupt ermöglicht haben, sondern auch immer für mich da waren. Ebenso danke ich meinem Ehemann Thomas und meinem Sohn Willy für die vielen Stunden ihrer kostbaren Zeit und ihren Nerven, die sie dafür opfern mussten. Vielen Dank für all die aufmunternden Worte, die vielen Ratschläge und auch nur für das Zuhören. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und für mich da seid.

Meinen Freundinnen Anne Michaelis und Johanna Salomon herzlichen Dank für das mehrfache Korrekturlesen und die zahlreichen Tipps, ohne die ich manchmal nicht weitergekommen wäre.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle von SLP-76 bei der T-Zellrezeptor-vermittelten Aktivierung des Integrins LFA-1 in T-Zellen

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät mit Unterstützung durch Frau PD Dr. rer. nat. Annegret Reinhold und Frau Dr. rer. nat. Stefanie Kliche ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 12.02.2020

Jessica Birkigt

Darstellung des Bildungsweges

- 1990 – 1994 Grundschule Eickendorf
- 1994 – 2003 Gymnasium „Dr. Tolberg“ Schönebeck
- 2003 – 2004 Tätigkeit als Pflegehilfskraft in der Dialysepraxis Dr. Hofmann/Deicke
- 2004 – 2006 Studium der Humanmedizin Charité Universitätsmedizin Berlin
- 2006 – 2010 Studium der Humanmedizin Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 2009 – 2010 Praktisches Jahr:
1. Tertian: Wexford General Hospital Anesthesia Department
 2. Tertian: Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie Krankenhaus Aschersleben
 3. Tertian: Klinik für Innere Medizin Krankenhaus Staßfurt/Aschersleben
- 2010 – 2015 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin AMEOS Klinik
Schönebeck
- 2012 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
- 2015 – 2016 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Medizinische
Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 2017 Assistenzärztin in der HELIOS Fachklinik Vogelsang Abteilung für Anästhesie
- 10/2017 Fachärztin für Anästhesiologie
- 12/2017 Zusatzbezeichnung Palliativmedizin
- Seit 01/2019 Oberärztin in der HELIOS Fachklinik Vogelsang Abteilung für Anästhesie

AnhangAnhang 1:

Tab. 2.1: Aufgeführt sind in dieser Tabelle alle Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers.

| <u>Laborgeräte</u> | <u>Hersteller</u> |
|---|---------------------------|
| Agarosegelkammern | Bio-Rad |
| Autoklav | Thermo Fischer Scientific |
| Bakterienschüttler | EB Edmund Bühler |
| Durchflusszytometer BD FACS Calibur | BD Biosciences |
| Durchflusszytometer BD LSR | BD Biosciences |
| Eismaschine | Thermo Fischer Scientific |
| Elektroporationsapparatur, Gene Pulser II | Bio-Rad |
| ELISA Reader Dynatech MR5000 | DPC Biermann GmbH |
| Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR | Cawo |
| Filmkassette ortho fine, curix screens | AGFA |
| Fluoreszenzmikroskop DMIL | Leica |
| Gefrierschrank (- 20 °C) | Liebherr |
| Gefrierschrank Mini Freeze (- 80°C) | Heto |
| Geldokumentation und UV-Transilluminator | Herolab |
| Inkubator für Bakterien | Heraeus |
| Inkubator für die Zellkultur Steri-CULT 200 | Labotec |
| Konfokales Laser-Scanning Mikroskop TCS SP2 | Leica |
| Kühlschränke (4 °C) | AEG, Liebherr |
| Magnetrührer MR 3001 | Heidolph |
| Mikrowelle | Severin |
| Mini-PROTEAN® System (für SDS-PAGE) | Bio-Rad |
| Neubauer-Zählkammer | Marienfeld |
| Nova Blot (für Semi-Dry-Blot) | GE Healthcare |

| | |
|---|-------------------|
| Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 | Zeiss |
| pH-Meter | ino-Lab |
| Pipettierhilfe accu-jet® pro | Brand |
| Quarzküvette | VWR |
| UV/Vis Spektrophotometer Ultraspec 3000 | Pharmacia Biotech |
| Reinstwasseranlage Typ HP5UF | TAK-LAB |
| Schüttler Duomax 1030 (für Western-Blots) | Heidolph |
| Spülmaschine G7783 CD | Miele |
| Sterilwerkbank für Bakterien | ANTARES |
| Sterilwerkbank für Zellkultur, Safe 2020 | Thermo Fischer |
| Stromversorgungsgeräte Power Pac 200/3000 | Bio-Rad |
| Thermomixer Compact | Eppendorf |
| Vortexer VF2 | IKA-Labortechnik |
| Waage Scout | Ohaus |
| Waage BA 310S (Feinwaage) | Sartorius |
| Wasserbad W6 | Medingen |
| Zentrifugen Multifuge 1S-R | Heraeus |
| Zentrifugen 5415R (4 °C) | Eppendorf |
| Zentrifugen 5415D | Eppendorf |

Anhang 2:

Tab. 2.2: Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers.

Verbrauchsmaterialien**Hersteller**

| | |
|--|------------|
| Adhäsionsobjektträger | Marienfeld |
| Deckgläser für die Zählkammer (20 x 26 mm) | Carl Roth |
| Deckgläser (24 x 50 mm) | Carl Roth |
| FACS-Röhrchen | BD Falcon |

| | |
|---|-----------------------|
| Falkonröhrchen (15 ml, 50 ml) | BD Falcon/Greiner |
| Filterpapier | Munktell |
| Glaskugeln (5mm Durchmesser) | VWR |
| Handschuhe (Latex) | Ansell |
| Handschuhe (Nitril) | Kimberly-Clark |
| Kanüle 27 G (0,4 x 25 mm) | BD Microlance™ 3 |
| Küvetten (für die Elektroporation) | BTX Harvard Apparatus |
| Nitrozellulosemembran (0,45 µm) | GE Healthcare |
| Parafilm | Bemis |
| Pipettenspitzen (0,1 - 10 µl, 2 - 200 µl, 100 - 1000 µl) | Eppendorf |
| Petrischalen (35 x 10 mm) für Bakterien)) | BD Falcon |
| Skalpelle | B. Braun Melsungen |
| Spritzen (2 ml) | B. Braun Melsungen |
| Sterilfilter (0,45 und 0,22 µm) | TPP |
| Pasteurpipetten | Carl Roth |
| Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) | Costar |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf |
| Röntgenfilme Amersham Hyperfilm™ MP | GE Healthcare |
| Mikrotiterplatten (96, 48, 24 und 6-Loch) | Costar/TTP |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²) | Corning |

Anhang 3:

Tab. 2.3: Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge und mit Angabe des Herstellers.

Reagenzien**Hersteller**

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| 2-Propanol | Carl Roth |
| 30 % Acrylamid/BIS-Acrylamid (29:1) | Serva |

| | |
|---|---------------------------|
| Agar-Agar | Carl Roth |
| Agarose (Peqgold Universalagarose) | PeqLab |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Carl Roth |
| Ampicillin | Carl Roth |
| BD FACS™ Reinigungslösung | BD Bioscience |
| BD FACS™ Spüllösung | BD Bioscience |
| BD FACS™ Trägerflüssigkeit | BD Bioscience |
| Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V | PAA |
| Bromophenolblau | Carl Roth |
| Calciumchloride (CaCl ₂) | Carl Roth |
| CellTrace™ Far Red DDAO-SE | Thermo Fischer Scientific |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth |
| Essigsäure (96 % v/v) | Carl Roth |
| Ethanol (99 % v/v) | Carl Roth |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml) | Carl Roth |
| Ethylenediamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Pan Biotech GmbH |
| Glutathion–Sepharose | GE-Healthcare |
| Glycerol | Carl Roth |
| Glycin | Carl Roth |
| Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS) (ohne Calcium und Magnesium) | Biochrom AG |
| Hefeextrakt | Carl Roth |
| Hydroxyethylpiperazinethansulfonat (HEPES) | Carl Roth |
| Immersionsöl, Type F | Leica |
| Indo-1 AM | Calbiochem |
| Ionomycin | Calbiochem |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth |

| | |
|--|---------------|
| Lauryl maltoside/N-dodecyl- β -D-maltoside (LM) | Calbiochem |
| L-Glutamin (200 mM) | Biochrom AG |
| Magnesiumsulfat (MgSO_4) | Carl Roth |
| Manganchlorid (MnCl_2) | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Carl Roth |
| Milchpulver (Blotting grade) | Carl Roth |
| Mowiol 4-88 | Calbiochem |
| Natriumazid (NaN_3) | Carl Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth |
| Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)) | Carl Roth |
| Natriumfluorid (NaF) | Sigma-Aldrich |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth |
| Natriumorthovanadate (Na_4VO_3) | Sigma-Aldrich |
| Nonidet P40 (NP-40; Ipegal CA-630) | Sigma-Aldrich |
| Paraformaldehyde (PFA) | Merck |
| Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) | Sigma-Aldrich |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | |
| mit Ca^{2+} und Mg^{2+} | Biochrom AG |
| ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} | Biochrom AG |
| PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}), Pulver | Biochrom AG |
| Pefabloc [®] Sc (PEFA-Block) | Carl Roth |
| Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | Biochrom AG |
| Pferdeserum | Biochrom AG |
| Phalloidin-Alexa Fluor 633 | Invitrogen |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) | Carl Roth |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich |
| Protein A-Agarose | Santa Cruz |
| Protein G PLUS-Agarose | Santa Cruz |

| | |
|--|---------------------------|
| RPMI 1640 (mit L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO ₃) | Biochrom AG |
| RPMI 1640 (ohne Phenolrot) | Thermo Fischer Scientific |
| Salzsäure (HCl, 37 % v/v) | Carl Roth |
| Saponin | Carl Roth |
| Staphylococcal Enterotoxin E (SEE) | Toxin Technology, Inc. |
| Streptavidin | Dianova |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth |
| Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) | Carl Roth |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |
| Trypanblau Lösung, 0,4 % in PBS | Sigma-Aldrich |
| Trypsine/EDTA (0,05 % v/v, 0,02 % v/v) | Biochrom AG |
| Tryptone/Peptone | Carl Roth |
| Tween 20 | Carl Roth |
| Xylen-Cyanol | Carl Roth |

Anhang 4:

Tab. 2.12: Übersicht über alle in dieser Arbeit eingesetzten primären Antikörper und ihre jeweilige Verwendung.

| Antikörper (Ak) | Verwendung (Verdünnung) | Quelle/Referenz |
|--|-------------------------|--|
| Maus-anti-ADAP-monoklonaler-Ak (mAk) (Klon: 5/FYB) | WB (1:1000) | BD Bioscience |
| Schaf-anti-ADAP Serum | DZ (1:1000) | Zur Verfügung gestellt von Dr. G. Koretzki (Musci et al. 1997) |
| Maus-anti-β-Aktin mAk (Klon: AC-15) | WB (1:5000) | Sigma Aldrich |
| Maus-anti-CD3 mAk (Klon: OKT3) | S (1-10 µl/ml) | eBioscience |
| Biotin-konjugierter Maus-anti-CD3 mAk (Klon: UCHT) | S (5-10 µl/ml) | eBioscience |

| | | |
|--|---|---|
| Maus-anti-CD3 mAk (Klon: C305 IgM) | S (unverdünnter Hybridoma-Überstand) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Weiss (Weiss und Stobo 1984) |
| Maus-anti-CD18 mAk (Klon: MEM-48) | DZ (1 :100) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Horejsi (Bazil et al. 1990) |
| FITC-konjugierter Maus-anti CD18 mAk (Klon: MEM-48) | IF (1 : 50) | Immunotools |
| Maus-anti-CD29 mAk (Klon : MEM-101a) | | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Horejsi (Bazil et al. 1990) |
| APC-konjugierter Maus-anti-CD69 (Klon: FN50) mAk | DZ (1:100) | BD Bioscience |
| Kaninchen-anti-ERK1/2 Ak | WB (1:1000) | Cell signaling |
| Maus-anti-phospho-ERK1/2 (pT202, pY204) -Alexa Fluor 647 | DZ (1:100) | BD Bioscience |
| Ratte-anti-GST mAk | DZ (1:50 als Hybridoma-Überstand) | Zur Verfügung gestellt von Dr. C. Erck, HZI Braunschweig |
| Maus-anti LAT mAk (Klon: 05F) | WB (1:1000) | BD Bioscience |
| Maus-anti-phospho-PLCy1(pY783) -Alexa Fluor 647 | DZ (1:100) | BD Bioscience |
| Schaf-anti Präimmenserum | DZ (1:1000) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Koretzki (Motto et al. 1996) |
| Maus-anti Rap1 mAk (Klon:3/Rap1) | WB (1:1000) | BD Bioscience |
| Maus-anti-Rac mAk (Klon:102/Rac) | WB (1:1000) | BD Bioscience |
| Ratte-anti RIAM mAk (Klon: 15B7E8) | WB (1:5 als Hybridoma-Überstand) DZ (1:50 als Hybridoma-Überstand) | Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kliche (Ménasché et al. 2007b) |
| Ratte-anti-SKAP55 (SK13B6) mAk | WB (1:5 als Hybridoma-Überstand) DZ (1:50 als Hybridoma-Überstand) | Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Kliche (Ménasché et al. 2007b) |
| Kaninchen-anti-SKAP55 Serum | IP (10 µl/ml) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Schraven (Marie-Cardine et al. 1998b) |
| Maus-anti-SLP-76 mAk | WB (1:1000) | Santa Cruz Biotechnology |
| Schaf-anti-SLP-76 Serum | IP (10 µl/ml) DZ (1:1000) | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Koretzki (Motto et al. 1996) |

| | | |
|--|-------------|---------------|
| Maus-anti- α -Tubulin mAk (Klon: DM1A) | WB (1:5000) | Sigma Aldrich |
| anti-phospho-ZAP-70(pY319) - Alexa-Fluor 647 | DZ (1:100) | BD Bioscience |

DZ: Durchflusszytometrie, S: Stimulation, WB Western Blot, IP: Immunpräzipitation, IF: Immunfluoreszenz, FITC: Fluorescein Isothiocyanat, APC: Allophycocyanin, mAk: monoklonaler Antikörper

Anhang 5:

Tab. 2.13: Übersicht über alle in dieser Arbeit eingesetzten sekundären Antikörper und deren Verwendung.

| Antikörper (Ak) | Verwendung (Verdünnung) | Quelle |
|---|----------------------------|---------|
| Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG (H+L) | WB (1:10000) | Dianova |
| Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L) | WB (1:10000) | Dianova |
| Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Ratte-IgG (H+L) | WB (1:10000) | Dianova |
| Peroxidase-konjugierte Kaninchen-anti-Schaf-IgG (H+L) | WB (1:10000) | Dianova |
| FITC- konjugierte Ziege -Maus-IgG (H+L) | DZ (1:100) | Dianova |
| APC- konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG (H+L) | DZ (1:100) | Dianova |
| APC- konjugierte Kaninchen-anti-Schaf-IgG (H+L) | DZ (1:100) | Dianova |
| APC- konjugierte Ziege-anti-Ratte IgG-(H+L) | DZ (1:100) | Dianova |
| FITC-konjugierte Ziege-anti-Human-IgG (Fc γ -spezifisch) | DZ (1:100) | Dianova |
| APC-konjugierte Ziege-anti-Human-IgG (Fc γ -spezifisch) | DZ (1:100) | Dianova |

DZ: Durchflusszytometrie, WB: Western Blot, FITC: Fluorescein Isothiocyanat, APC: Allophycocyanin, H+L: *Heavy and light chain*