TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Die Aktivitätsregulation von ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) – Proteinen und ihre Bedeutung für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration

Karin Fehlner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
	2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 01.10.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.12.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

1.1 Die Migration von T-Zellen ... 1

1.1.1 Die „Multi-Step“-Kaskade der T-Zellrekrutierung ... 1

1.1.2 Die Familie der Integrine ... 5

1.2 Das Leukozytenintegrin LFA-1 ... 7

1.2.1 Strukturelle Charakteristika des Integrins LFA-1 ... 7

1.2.2 Die Regulation der LFA-1 Aktivität ... 9

1.2.3 Die bidirektionale Signalweiterleitung von LFA-1 ... 11

1.3 Die Dynamik der T-Zellmigration ... 14

1.3.1 Morphologie einer wandernden T-Zelle ... 14

1.3.2 Die Bedeutung der Zytoskelett-Reorganisation für die T-Zellmigration ... 15

1.4 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) - Proteine ... 17

1.4.1 Ezrin/Radixin/Moesin als Mitglieder der Band 4.1 Protein-Familie ... 17

1.4.2 Die Konformationsänderungen der ERM-Proteine ... 19

1.4.3 Mechanismen der ERM-Aktivitätsregulation ... 21

1.5 Zielsetzung ... 23

2 Material und Methoden ... 24

2.1 Material ... 24

2.1.1 Geräte und technisches Zubehör ... 24

2.1.2 Chemikalien ... 25

2.1.3 Verbauchsmaterial ... 27

2.1.4 Stammlösungen und Puffer ... 27

2.1.5 Medien für die Zellkultur ... 29

2.1.6 Zellen und Zelllinien ... 29

2.1.7 Antikörper ... 30

2.1.7.1 Erstantikörper ... 30

2.1.7.2 Zweitantikörper ... 31

2.1.7.3 Isotyp-Kontrollantikörper ... 32

2.1.7.4 Weitere Färbereagenzien ... 33

2.1.8 Reagenzienkits ... 33

2.1.9 Expressionskonstrukte ... 33

2.2 Zellbiologische Methoden ... 34

2.2.1 Zellkultur ... 34

2.2.2 Generierung primärer, muriner T-Zellen ... 35

2.2.2.1 Isolation von Milzzellen ... 35

2.2.2.2 Selektion naiver T-Zellen ... 35

2.2.2.3 Gewinnung aktivierter T-Lymphoblasten ... 35

2.2.2.3.1 Aktivierung von T-Lymphozyten durch Concanavalin A ... 35

2.2.2.3.2 Kultivierung der aktivierten T-Zellen in IL-2-haltigem Medium ... 36

2.2.2.3.3 Anreicherung der T-Lymphoblasten ... 36

2.2.3 Generierung primärer, humaner T-Lymphoblasten ... 36

2.2.3.1 Isolation von PBMCs ... 36

2.2.3.2 Aktivierung von T-Lymphozyten durch PHA ... 37

2.2.3.3 Kultivierung aktivierter T-Lymphoblasten in IL-2-haltigem Medium ... 37

2.2.4 Induktion eines Liganden-spezifischen Signals in T-Zellen ... 37
2.2.5 Transiente Zelltransfektion mittels Amaxa ... 38
2.2.6 Zeitraffer-Videomikroskopie ... 39
2.3 Proteinbiochemische Methoden ... 40
2.3.1 Herstellung von Zelllysaten ... 40
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 40
2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot) ... 41
2.3.4 Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot) ... 42
2.3.5 Untersuchung der ERM-Dephosphorylierung *in vitro* ... 42
2.3.6 Kovalente Kopplung von ICAM-1 an Polystyren-„Beads“ ... 43
2.4 Immunologische Methoden ... 44
2.4.1 Immunpräzipitation ... 44
2.4.2 Immunzytochemie ... 45
2.4.2.1 Immobilisierung von Zellen ... 45
2.4.2.2 Einbetten von Organen und Anfertigen von Gefrierschnitten ... 45
2.4.2.3 Immunfluoreszenz ... 45
2.4.3 Statischer Adhäsionstest ... 46
2.4.4 Transmigrationstest ... 47
2.4.5 „Homing“-Test für die *in vivo* T-Zell-Rekrutierung in sekundäre lymphatische Organe 48
2.4.6 Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie (FACS) ... 48
2.4.7 Apoptosetest mittels Annexin V / PI – Färbung ... 50
2.4.8 Kreuzvernetzung von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen ... 50
2.4.9 LFA-1-Aktivitätstest ... 51
2.5 Mikroskopie ... 51
2.6 Tierexperimentelle Methoden ... 52
2.6.1 Versuchstiere ... 52
2.6.2 Organentnahme ... 52
2.6.3 Intravenöse Injektion von T-Zellen in die Schwanzvene ... 52
2.7 Statistische Auswertungsverfahren ... 52

3 Ergebnisse ... 53
3.1 ERM-Proteine als Bindeglied zwischen LFA-1 und Zytoskelett ... 53
3.1.1 Lokalisation von ERM-Proteinen im Uropod wandernder T-Zellen ... 53
3.1.2 Keine direkte Interaktion von LFA-1 mit ERM-Proteinen ... 55
3.1.3 Einfluss von konstitutiv aktivem Ezrin auf die T-Zellmigration ... 56
3.1.3.1 Konstitutiv aktives Ezrin im Uropod wandernder T-Zellen ... 57
3.1.3.2 Der Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die T-Zellmigration ... 59
3.1.3.3 Keine Beeinflussung der LFA-1 Affinität durch konstitutiv aktives Ezrin ... 62
3.2 PP1/PP2A als spezifische ERM-Phosphatasen ... 64
3.2.1 Inhibierung der ERM-Dephosphorylierung durch Calyculin A und Okadainsäure ... 64
3.2.2 Direkte ERM-Dephosphorylierung durch PP1 und PP2A ... 66
3.2.3 PP1 und PP2A als Holoenzyme verschiedener Untereinheiten in T-Zellen ... 67
3.2.4 Lokalisation von PP1 und PP2A in wandernden T-Zellen ... 69
3.2.5 Regulation der PP1-Aktivität durch ROCK ... 71
3.3 Signaltransduktion von LFA-1 zu ERM-Proteinen ... 72
3.3.1 Interaktion von LFA-1 mit PP1 und PP2A ... 73

3.3.2 Induktion einer LFA-1 vermittelten Signalkaskade durch ICAM-1 Bindung 74
3.3.3 Kein Effekt einer LFA-1 Konformationsänderung auf die ERM-Phoshorylierung 76
3.3.4 Keine Beeinflussung der ERM-Aktivität durch ein T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal 76
3.4 Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration 78
3.4.1 Auswirkungen der Inhibierung von PP1/PP2A in T-Zellen *in vitro* 78
3.4.1.1 Langzeiteffekt auf den Phosphorylierungsstatus der ERM-Proteine 79
3.4.1.2 Auswirkung auf die Viabilität der T-Zellen 80
3.4.2 Kein Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 Aktivität in T-Zellen 83
3.4.3 Verminderte Adhäsion von T-Zellen mit inaktiver PP1/PP2A an ICAM-1 86
3.4.4 Reduktion der chemotaktischen und transendothelialen T-Zellmigration durch inaktive PP1/PP2A 87
3.4.5 Beeinträchtigung der T-Zell-Rekrutierung in lymphatische Organe durch inaktive PP1/PP2A *in vivo* 90

4 Diskussion 95
4.1 Die Regulation der ERM-Aktivität durch PP1/PP2A als Basis für die T-Zellmigration....95
4.2 Die Signaltransduktion von LFA-1 über PP1/PP2A zu ERM-Proteinen 103
4.3 Kinasen als Antagonisten der ERM-Phosphatasen 111
4.4 Pathophysiologische Funktionen der ERM-Proteine.....114
4.5 Ausblick 115

5 Zusammenfassung..... 117

6 Summary 118

7 Literatur..... 119

8 Anhang 134
8.1 Abkürzungsverzeichnis 134
8.2 Abbildungsverzeichnis 138
8.3 Tabellenverzeichnis 139

Danksagung 140

Publikationen 141

1 Einleitung

1.1 Die Migration von T-Zellen

Die Migration von T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von Immunantworten. Auch während der Homöostase und der Überwachung des Immunsystems ist eine dynamische Wanderung der T-Zellen essentiell. Naive T-Zellen rezirkulieren zwischen dem Blut und hochorganisierten, sekundären, lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques), bis sie durch Bindung ihres spezifischen Antigens aktiviert werden und eine adaptive Immunantwort ausgelöst wird.

Antigene werden in verschiedenen Körperregionen von Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen, Makrophagen) erkannt, internalisiert und von diesen in nahegelegene Lymphknoten transportiert. Dort präsentieren die dendritischen Zellen und Makrophagen die aufgenommenen Antigene (als spezifische Peptide) über MHC-Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Lösliche Antigene gelangen mit der Lymphe in den Lymphknoten und werden dort von sessilen dendritischen Zellen, Makrophagen oder naiven B-Zellen gebunden, prozessiert und über MHC-Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert. Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen werden als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) zusammengefasst.

Naive T-Zellen wandern aus dem Blut über hochendotheliale Venolen (HEV) in die Lymphknoten und tasten dort die antigenpräsentierenden Zellen nach ihrem spezifischen Peptid ab. Bei erfolgreicher Interaktion mit ihrem spezifischen Antigen auf den APC über ihren T-Zell-Rezeptor, werden die T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen (zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen) angeregt. Als solche verlassen sie den Lymphknoten und gelangen wieder in den Blutkreislauf.

Endothelzellen und Zellen des angeborenen Immunsystems markieren lokale Infektionen durch die Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Stoffen. Effektor T-Zellen werden von diesen angelockt und wandern in entsprechenden Regionen vom Blut ins Gewebe, um die Infektion zu beseitigen. Zytotoxische T-Zellen zerstören virusinfizierte Zellen. T-Helferzellen regen Makrophagen zum Abbau endozytierter Bakterien an und aktivieren B-Zellen, Antikörper zu produzieren. Nach der Eliminierung des Pathogens differenziert ein kleiner Teil der T-Zellen zu Gedächtniszellen, die eine Reinfektion schnell und effektiv bekämpfen können.

1.1.1 Die „Multi-Step“-Kaskade der T-Zellrekrutierung

Die Wanderung von Leukozyten über das Endothel der Blutgefäße wird durch die sogenannte „Multi-Step“-Kaskade beschrieben. Dabei beruht die Rekrutierung von naiven T-Zellen in lymphatische Organe („Homing“) auf denselben Mechanismen wie die

Einwanderung von Effektor T-Zellen in entzündetes Gewebe. Eine funktions- und gewebespezifische Rekrutierung der T-Zellen wird zum einen durch chemotaktisch wirksame Stoffe (Chemokine) und ihre entsprechenden Rezeptoren, und zum anderen durch Zelladhäsionsmoleküle und ihre Liganden reguliert.

Endothelzellen setzen Chemokine frei, die charakteristisch für lymphatische oder entzündete (nicht-lymphatische) Gewebe sind. Durch zelltyp-spezifische Expression der dazugehörigen, spezifischen Chemokinrezeptoren auf den verschiedenen T-Zell-Subtypen, werden naive T-Zellen exklusiv in lymphatische Organe, Effektor T-Zellen dagegen in entzündete Gewebe rekrutiert. Daneben ist die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und deren Liganden sowohl auf Endothel- als auch auf T-Zellen entscheidend für die T-Zell-Rekrutierung. Zelladhäsionsmoleküle vermitteln durch Bindung an ihre Liganden den Kontakt zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix.

Der Prozess der Auswanderung von T-Zellen aus dem Blutgefäß wird als Extravasation bezeichnet. Naive T-Zellen müssen das Endothel von HEV passieren, um in den Lymphknoten zu gelangen. Effektor T-Zellen müssen analog dazu das Endothel peripherer Blutgefäße durchdringen, um Entzündungen im Gewebe zu erreichen. Durch die Expression unterschiedlicher Chemokine und deren Rezeptoren, sowie verschiedener Zelladhäsionsmoleküle auf den einzelnen T-Zell-Subtypen und dem Endothel, wird eine gewebe- und zelltypspezifische Rekrutierung der T-Zellen ermöglicht. Die „Multi-Step“-Kaskade beschreibt, wie dabei in mehreren Schritten eine frei-zirkulierende Zelle an das Endothel adhäriert, daran entlangwandert und schließlich die Barriere der Endothelzellen durchdringt (Abb. 1.1). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte im Detail erklärt.

(1) Rollen: T-Zellen gehen transiente Interaktionen mit dem Endothel ein (Ley et al., 2007). Diese werden vor allem durch Bindung von L(Leukozyten)-, E(Endothel)- und P(„Platelets“ = Blutplättchen)-Selektinen an ihre glykosylierten Liganden vermittelt. Während der Rekrutierung in den Lymphknoten binden naive T-Zellen über L-Selektin an PNAd („peripheral lymph node addressin“) (Lawrence et al., 1995), das konstitutiv auf dem Endothel von HEV exprimiert wird. Dagegen interagieren Effektor T-Zellen über PSGL-1 („P-selectin glyoprotein ligand 1“) mit E- und P-Selektin (Carlow et al., 2009), welche als Antwort auf pro-inflammatorische Stimuli von Endothelzellen in entzündetem Gewebe exprimiert werden (Kansas, 1996). Aktives PSGL-1 ist charakteristisch für Effektor T-Zellen, da es nur in aktivierten T-Zellen glykosyliert wird (Vachino et al., 1995). Außerdem binden Effektor T-Zellen über L-Selektin an endotheliales PSGL-1 (Sperandio et al., 2003), das nur im Falle einer Entzündung auf dem Endothel exprimiert wird (Carlow et al., 2009).

Auch transiente Interaktionen zwischen Integrinen und ihren Liganden sind am Rollen der T-Zellen beteiligt: $\alpha 4\beta 1$ interagiert mit VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule“), $\alpha 4\beta 7$ bindet an MAdCAM-1 („mucosal addressin cell adhesion molecule 1“) (Singbartl et al., 2001).

Die hohen Assoziations- und Dissoziationsraten der Interaktionen ermöglichen es T-Zellen im Blutstrom mit geringer Geschwindigkeit am Endothel entlang zu rollen. Dadurch können auf dem Endothel präsentierte Chemokine erkannt und gegebenenfalls gebunden werden.

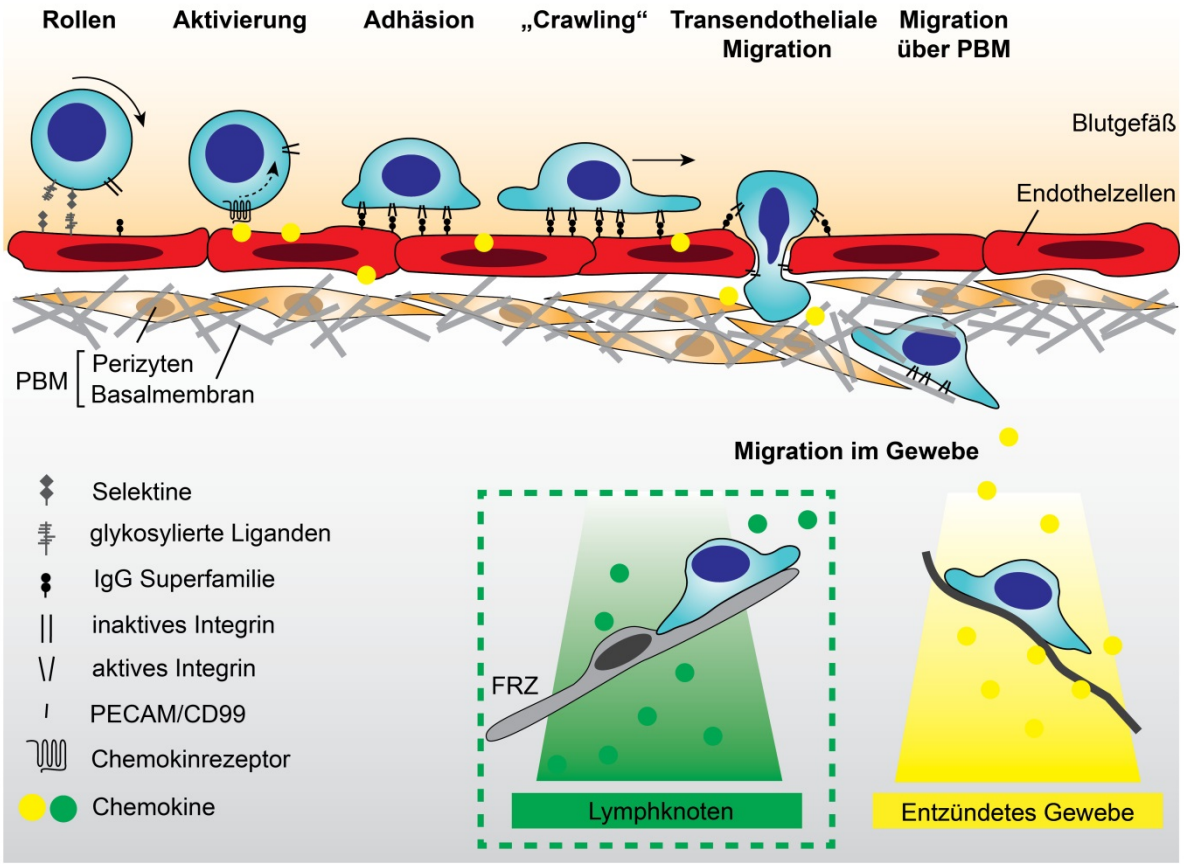

Abb. 1.1: Die „Multi-Step“-Kaskade der T-Zellrekrutierung.
T-Zellen wandern über das Endothel von HEV in den Lymphknoten bzw. über das Endothel peripherer Blutgefäße in entzündetes Gewebe ein. Dazu müssen sie die Barriere der Endothelzellen und der perivaskulären Basalmembran (PBM) überwinden. Die PBM wird aus Perizyten und der Basalmembran gebildet. FRZ = fibroblastische Retikulumzellen. Modifiziert nach Hogg et al., 2003.

(2) Aktivierung: T-Zellen binden über ihre spezifischen G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren Chemokine auf dem Endothel. Naive T-Zellen binden über ihren CCR7-Rezeptor die auf HEV exprimierten Chemokine CCL19 und CCL21. Effektor T-Zellen erkennen gewebespezifische Chemokine wie CCL25 (Darm) und CCL17 / CCL27 (Haut) (Hogg et al., 2003). Innerhalb weniger Millisekunden wird daraufhin ein intrazelluläres Signal ausgelöst, das die Integrin-Aktivität erhöht (Constantin et al., 2000). Aus inaktiven werden aktive Integrine mit hoher Affinität für ihre Liganden.

(3) Adhäsion: Im aktiven Zustand binden Integrine an Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie: $\alpha 4\beta 1$ interagiert mit VCAM-1, $\alpha 4\beta 7$ mit MAdCAM-1. Jedoch ist vor allem die

Interaktion zwischen αLβ2 (= LFA-1 für „lymphocyte function-associated antigen 1“) und ICAM-1/2 („intercellular adhesion molecule 1/2“) essentiell für die feste Adhäsion der T-Zelle an das Endothel (Dunne et al., 2002). Aufgrund ihrer leicht unterschiedlichen Funktionen sind α4-Integrine auf Mikrovilli und αLβ2 am Zellkörper der T-Zellen lokalisiert (Berlin et al., 1995) und vermitteln entsprechend das Rollen bzw. die Adhäsion der T-Zellen.

(4) „Crawling“: Mit der Adhäsion verändert sich die Zellform. Aus einer runden wird eine polarisierte T-Zelle. Diese wandert, vermittelt durch LFA-1/ICAM-1 Interaktionen, entgegen dem Blutstrom am Endothel entlang. Dabei tastet sie dieses mit Hilfe ventraler Membranausstülpungen nach einer geeigneten Stelle für die Auswanderung ab (Carman et al., 2007).

(5) Transendotheliale Migration: T-Zellen wandern meist „parazellulär“ zwischen zwei Endothelzellen hindurch. Vermittelt wird dies durch Interaktionen zwischen αLβ2 und seinen Liganden ICAM-1/2, und zwischen αLβ2 und JAMs („junctional adhesion molecules“). Auch homophile Interaktionen zwischen PECAM-1 („platelet endothelial cell adhesion molecule 1“) und CD99-Molekülen sind daran beteiligt (Ley et al., 2007). Eine „transzelluläre“ Migration von T-Zellen durch eine Endothelzelle hindurch, findet innerhalb der Zelle meist in der Nähe der Zell-Zell-Verbindung zweier benachbarter Endothelzellen statt (Carman, 2009). Denn die „transzelluläre“ T-Zellmigration erfolgt meist in schmalen Regionen von Endothelzellen, an denen aufgrund fehlender Organelle der Widerstand gering ist und die T-Zelle leicht in die Endothelzelle eindringen kann (Carman et al., 2007). V.T. Marchesi und J.L. Gowans zeigten bereits vor 50 Jahren, dass Lymphozyten jedoch auch durch das breite Endothel von HEV auf der „transzellulären“ Route hindurchwandern können (Marchesi & Gowans, 1964).

(6) Migration über die perivaskuläre Basalmembran (PBM): Die Basalmembran besteht aus einem dichten Netz aus Laminin und Kollagen Typ IV und wird von Endothelzellen wie von Perizyten gebildet, die lose in die Basalmembran eingebettet sind (Rowe & Weiss, 2008; Nourshargh et al., 2010). Wie Zellen durch die PBM wandern, wurde überwiegend an Neutrophilen aufgeklärt. Die zugrundeliegenden Mechanismen treffen vermutlich auch auf T-Zellen zu. Neutrophile wandern abluminal an den Endothelzellen entlang und durchdringen die PBM in Regionen, wo Lücken zwischen benachbarten Perizyten und geringe Mengen an Laminin und Kollagen zu finden sind (sogenannte LERs = „low expression regions“) (Wang et al., 2006; Voisin et al., 2010). Die homophile Interaktion von PECAM-1 während der transendothelialen Migration induziert den Transport von α6β1 aus intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche. Als Lamininrezeptor vermittelt α6β1 dort die Migration durch die lamininreiche PBM (Dangerfield et al., 2002). Von Leukozyten oder Endothelzellen freigesetzte Proteasen (Metalloproteinasen, Elastasen) induzieren möglicherweise weitere LER und ermöglichen so die Migration durch die PBM (Nourshargh et al., 2010).

(7) Migration im Gewebe: Sobald die T-Zellen die PBM durchdrungen haben, wandern sie durch den dreidimensionalen interstitiellen Raum der lymphatischen Organe oder des

entzündeten Gewebes. Die Parameter dieser speziellen Migration sind noch nicht vollständig geklärt. Man geht aber davon aus, dass sich die interstitielle Wanderung wesentlich von der zweidimensionalen Migration entlang des Endothels unterscheidet (Nourshargh et al., 2010). Aufgrund des fehlenden Blutstroms herrschen im Gewebe keine Scherkräfte auf die T-Zellen, wodurch alternative Mechanismen der Migration möglich sind. *In vivo* und *in vitro* Daten von T. Lämmermann zeigen, dass Leukozyten möglicherweise Integrin-unabhängig durch das Parenchym lymphatischer Organe sowie durch das Interstitium von Geweben wandern (Lämmermann et al., 2008). M. Bajénoff und Kollegen konnten *in vivo* beobachten, dass T-Zellen innerhalb des Lymphknotenparenchyms entlang von fibroblastischen Retikulumzellen (FRZ) von den HEV in die T-Zell-Zone wandern (Bajenoff et al., 2006). Diese FRZ umkleiden (gemeinsam mit dendritischen Zellen) das „Conduit“ Netzwerk, in dem niedrigmolekulare Antigene aus der Lymphe von der Kapsel zum Cortex des Lymphknotens transportiert werden (Sixt et al., 2005). Die FRZ exprimieren die Integrin-Liganden ICAM-1 und VCAM-1 auf ihrer Oberfläche (laboreigene, unveröffentlichte Daten; Katakai et al., 2004). Da T-Zellen die entsprechenden Integrine $\alpha L\beta 2$ und $\alpha 4\beta 1$ exprimieren, müssten diese für eine Integrin-unabhängige Wanderung entlang der FRZ inaktiviert werden.
FRZ exprimieren die Chemokine CCL19 und CCL21 in immobilisierter Form (Luther et al., 2000; Tomei et al., 2009). Sie sezernieren aber auch CCL21, CCL19 und CXCL12 (Katakai et al., 2004; Link et al., 2007). Aufgrund des fehlenden Blutstroms können lokale Gradienten aus löslichen Chemokinen aufgebaut werden. T-Zellen exprimieren die entsprechenden Rezeptoren CCR7 / CXCR4 und werden chemotaktisch entlang der FRZ durch das Parenchym in die T-Zellzone geleitet. Die interstitielle Migration von Effektor T-Zellen innerhalb entzündeter Gewebe erfolgt möglicherweise ebenfalls entlang spezifischer Leitsysteme.

1.1.2 Die Familie der Integrine

Die T-Zellmigration entlang des Endothels und zwischen zwei benachbarten Endothelzellen hindurch wird wesentlich durch Integrine reguliert. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine aus einer α– und einer β–Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. In Säugetieren existieren 18 α- und acht β-Untereinheiten, die insgesamt 24 verschiedene Integrine ausbilden (Abb. 1.2) (Hynes, 2002). α- und β-Untereinheiten weisen keine Sequenzhomologie auf. Die α-Untereinheiten sind untereinander zu etwa 30 % identisch, die β-Untereinheiten zu etwa 45 %. Die kodierenden Gene der verschiedenen Untereinheiten sind möglicherweise durch Genduplikation entstanden (Takada et al., 2007).
Man unterteilt die Integrine in vier Unterfamilien (Abb. 1.2). RGD-bindende Rezeptoren binden an Komponenten der extrazellulären Matrix, die eine RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenz enthalten (z.B. Fibronektin, Vitronektin und Fibrinogen). Laminin-Rezeptoren erkennen die

15 verschiedenen Laminin-Isoformen. Kollagen-Rezeptoren binden Kollagene, die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix. Leukozyten-spezifische Rezeptoren gehen Interaktionen mit Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie ein (Hynes, 2002).

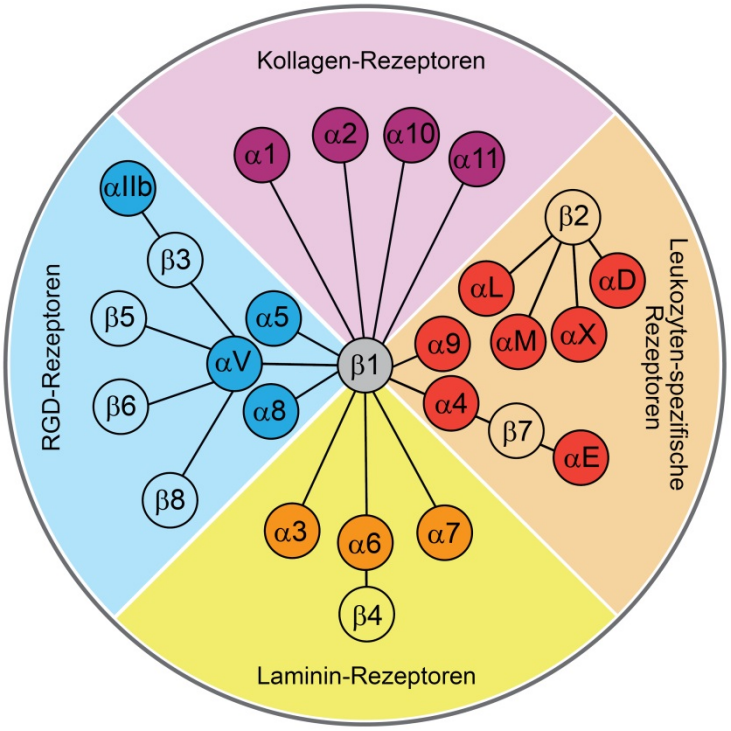

Abb. 1.2: Die vier Unterfamilien der Integrine.
Man unterteilt die Familie der Integrine je nach Liganden in Kollagen-, RGD-, Laminin- und Leukozyten-spezifische Rezeptoren. Modifiziert nach Barczyk et al., 2010.

Jedes der Integrine hat eine spezifische, nicht-redundante Funktion. Seit ihrer Entdeckung vor 26 Jahren (Hynes, 1987) wurden sie als wichtige Zelladhäsionsmoleküle intensiv untersucht. Integrine vermitteln Zell-Zell-Kontakte und die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix. Neben ihrer Funktion im Immunsystem spielen sie auch eine Rolle bei der Entwicklung, der Homöostase und der Krebsentstehung und sind somit auch Ursache für viele Erkrankungen im Menschen (Hynes, 2002). Speziell in T-Zellen vermitteln Integrine die Migration, aber auch die Adhäsion an diverse Zielzellen. Man findet auf T-Zellen die vier Leukozyten-spezifischen β2-Integrine (αLβ2, αMβ2, αXβ2, αDβ2), die beiden β7-Integrine (α4β7, αEβ7) sowie die β1-Integrine α1β1 – α6β1 (Hogg et al., 2003). αLβ2 (im folgenden LFA-1 genannt) ist das am stärksten exprimierte Integrin auf T-Zellen und ist wesentlich an deren physiologischen Funktionen beteiligt.

1.2 Das Leukozytenintegrin LFA-1

Die Adhäsion von T-Lymphozyten muss nicht nur während der Migration entlang von Blutgefäßwänden genau kontrolliert werden, sondern auch in vielen anderen Stadien der Immunüberwachung sowie der Immunantwort. T-Zellen adhärieren an verschiedenste Zielzellen. Sie binden bei der Ausbildung der immunologischen Synapse an antigenpräsentierende Zellen und interagieren beim Abtasten nach spezifischen Antigenen im entzündeten Gewebe mit diversen anderen Zellen. LFA-1 ist das dominante Adhäsionsmolekül während all dieser Phasen (Evans et al., 2009). Es vermittelt die T-Zell-Adhäsion durch kontrollierte Interaktion mit seinen Liganden ICAM-1/2. Dabei ist LFA-1 nicht konstitutiv aktiv. Vielmehr wird dessen Aktivität durch Signale von anderen Membranrezeptoren kontrolliert, die während einer Immunantwort aktiv sind (z.B. Chemokin- und T-Zell-Rezeptoren). Das Resultat ist eine zeit- und ortsspezifische Aktivierung von LFA-1.

Die Bedeutung von LFA-1 für das Immunsystem wird durch die autosomal-rezessiv vererbte Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (LAD) deutlich. Der Subtyp I dieser Erkrankung beruht auf einer Mutation im β2-kodierenden Gen, die zur Expression einer trunkierten Form des Proteins oder zu gar keiner Expression führt (Kishimoto et al., 1987). Die Patienten leiden folglich unter immer wiederkehrenden, lebensbedrohlichen Bakterieninfektionen, meist an Haut und Schleimhäuten, sowie einer defekten Wundheilung (Schmidt et al., 2013).

Patienten, die am Subtyp III der LAD erkranken, zeigen die gleichen Symptome in etwas milderer Form. Zusätzlich leiden sie an einer stark erhöhten Blutungsneigung (Alon & Etzioni, 2003). Ursache ist eine Mutation in Kindlin-3, die dazu führt, dass Kindlin-3 nicht mehr an β1-, β2-, und β3-Integrine binden kann (Hanna & Etzioni, 2012; Schmidt et al., 2013). Die Aktivierung von allen β2-Integrinen, und damit auch von LFA-1, ist dadurch gestört.

Alle Integrine weisen eine charakteristische Struktur auf, die eine reversible Aktivitätsregulation ermöglicht. Diese soll im Folgenden am Beispiel von LFA-1 im Detail erläutert werden.

1.2.1 Strukturelle Charakteristika des Integrins LFA-1

Die αL (CD11a) und β2 (CD18)-Ketten von LFA-1 weisen jeweils eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne auf. Im Heterodimer bilden die extrazellulären Domänen eine globuläre Kopfregion sowie eine stielförmige Region aus, die oftmals mit der Anatomie eines Beines verglichen wird (siehe unten). Die extrazelluläre Domäne der αL-Kette besteht aus fünf Untereinheiten (Abb. 1.3). N-terminal bilden sieben repetitive Motive eine propellerähnliche Struktur mit sieben Faltblättern aus („β-Propeller“ 1-7) (Springer, 1997). Diese wird unterbrochen durch eine 200 Aminosäuren große I-Domäne („inserted“ Domäne) zwischen den β-Faltblättern 2 und 3 (Lee et al., 1995; Springer, 1997). Bei einigen Integrinen fehlt diese Domäne. Des Weiteren findet

man membran-proximal eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, die als „Thigh“ (Schenkel) bezeichnet wird. Dieser folgen zwei β-„Sandwich“ Domänen, „Calf1“ und „Calf2“ (Wade) (Xiong et al., 2001). Die extrazelluläre Domäne der β2-Kette besteht aus acht Untereinheiten (Abb. 1.3). N-terminal befindet sich eine PSI („Plexin-Semaphorin-Integrin“)-Domäne (Bork et al., 1999). Dieser folgt eine „Hybrid“-Domäne mit β-„Sandwich“-Struktur. In diese ist die sogenannte „I-like“-Domäne eingebettet, die der I-Domäne der α-Kette ähnlich ist (Lee et al., 1995). Hybrid- und „I-like“-Domäne bilden eine Schlaufe aus, so dass die PSI-Domäne in direkte Nähe zu den nachfolgenden „EGF-like“-Domänen 1-4 (Takagi et al., 2001) gelangt. Membran-proximal befindet sich noch eine „β-tail“-Domäne (Xiong et al., 2001). Bei Ausbildung des Heterodimers geraten αL- und β2-Kette im Bereich der β-Propeller-Domäne und der „I-like“-Domäne in Kontakt (Huang et al., 1997; Zang et al., 2000; Xiong et al., 2001).

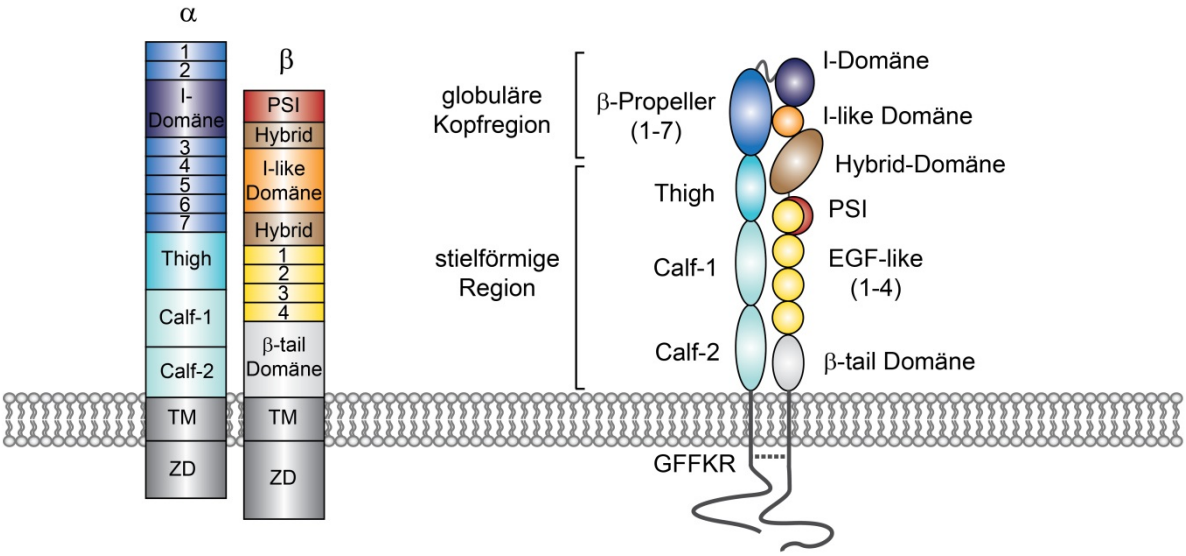

Abb. 1.3: Struktur des LFA-1-Heterodimers.
Das Heterodimer LFA-1 besteht aus einer α- und einer β-Kette. Beide weisen eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne (TM) und eine kurze zytoplasmatische Domäne (ZD) auf. ICAM-1/2 bindet an die MIDAS-Region in der I-Domäne der aL-Kette. Modifiziert nach Hogg et al., 2011.

Die Bindestelle für die Liganden ICAM-1 und ICAM-2 befindet sich innerhalb der I-Domäne der αL-Kette: negativ-geladene Aminosäuren der Liganden binden in der sogenannten MIDAS („metal ion-dependent adhesion site“)-Region, wenn ein divalentes Magnesium-Ion gebunden hat (Huang & Springer, 1995; Lee et al., 1995). In Integrinen ohne I-Domäne binden Liganden an die MIDAS-Region in der „I-like“-Domäne (Xiong et al., 2001; Zhang & Chen, 2012).

Auf die extrazellulären Domänen der αL- und β2-Kette von LFA-1 folgt jeweils eine Transmembrandomäne von etwa 20 Aminosäuren. Diese bilden eine α-helikale Struktur aus und können sich zu einer „Coiled-Coil“ zwischen den beiden Ketten von LFA-1 zusammenlagern (Adair & Yeager, 2002). Ein GxxxG-Motiv stabilisiert die Interaktion der Transmembrandomänen der Integrin-Ketten von Heterodimeren, aber auch von Homodimeren (Gottschalk et al., 2002; Li et al., 2004; Schneider & Engelman, 2004).
Die zytoplasmatischen Domänen des LFA-1 Dimers sind mit weniger als 60 Aminosäuren relativ kurz und weisen membran-proximal weiter α-helikale Strukturen auf (Arnaout et al., 2005). In der αL-Kette findet man in direkter Nähe zur Transmembranregion ein zwischen den Integrin-α-Ketten hoch-konserviertes GFFKR-Motiv. Dieses ist essentiell für die Assoziation von αL- und β2-Kette: das enthaltene Arginin kann mit einem korrespondierenden Asparaginsäure-Rest der β-Kette eine Salzbrücke ausbilden. Die zytoplasmatische Region der β-Kette ist im Gegensatz zur α-Kette zwischen den verschiedenen Integrinen sehr homolog und weist weitere Motive für Interaktionen mit intrazellulären Signalmolekülen auf.
LFA-1 bindet ICAM-1 mit einer fünffach höheren Affinität als ICAM-2 (Shimaoka et al., 2001). *In vitro* und im allgemeinen Sprachgebrauch wird deshalb ICAM-1 als Ligand für LFA-1 verwendet. *In vivo* ist ICAM-1 auf Endothelzellen nur schwach exprimiert. Erst durch Stimulation der Endothelzellen mit Entzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharid und pro-inflammatorischen Zytokinen steigt die ICAM-1 Expression stark an (Dustin et al., 1986; Dustin et al., 1988). ICAM-2 ist dagegen konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert (Xu et al., 1996) und spielt damit vor allem für die T-Zell vermittelte Immunüberwachung eine wichtige Rolle. ICAM-1 und ICAM-2 weisen extrazellulär fünf bzw. zwei „Ig-like“-Domänen auf (Simmons et al., 1988; Staunton et al., 1988; Staunton et al., 1989). LFA-1 bindet an die membran-distale D1-Domäne von ICAM-1/2 (Staunton et al., 1990; Casasnovas et al., 1999). Ein weiterer Ligand von LFA-1 ist ICAM-3, an das LFA-1 mit geringerer Affinität als an ICAM-1 und ICAM-2 bindet (Shimaoka et al., 2001). ICAM-3 wird vor allem auf humanen, ruhenden Leukozyten, nicht aber auf Endothelzellen exprimiert (de Fougerolles & Springer, 1992). Ein murines Homolog zu ICAM-3 wurde bislang nicht identifiziert (Xu et al., 1996; Hayflick et al., 1998). ICAM-3 wird deshalb als LFA-1 Ligand in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt.

1.2.2 Die Regulation der LFA-1 Aktivität

Die Aktivität von LFA-1 wird durch Regulation seiner Avidität bestimmt. Unter Avidität versteht man die gesamte Stärke der Adhäsion an den Liganden (Carman & Springer, 2003; Kinashi, 2005). Diese umfasst die intrinsische Affinität einzelner LFA-1 Moleküle, aber auch die Anzahl der Rezeptor-Ligandenbindungen, die als Valenz bezeichnet wird. Beide Parameter, Affinität und Valenz, beeinflussen die Aktivität von LFA-1.

Die Affinität von LFA-1 wird durch reversible Veränderung der Konformation einzelner LFA-1 Moleküle reguliert. Drei verschiedene Konformationszustände von LFA-1 sind bislang bekannt (Abb. 1.4). Womöglich existieren noch weitere Zwischenformen.

In der abgewinkelten (inaktiven) Konformation sind die extrazellulären Domänen beider Ketten abgeknickt. Dies geschieht zwischen den „EGF-like"-Domänen 1 und 2 der β-Kette sowie zwischen der „Thigh"- und der „Calf-1"-Domäne der αL-Kette (Arnaout et al., 2005). Diese Knick-Region wird oft als „Genu" (Knie) bezeichnet. In dieser abgewinkelten Konformation befindet sich die globuläre Kopfregion mit der Ligandenbindestelle in unmittelbarer Nähe zur stielförmigen Region sowie zur Plasmamembran. Der Abstand von I-Domäne zur Membran beträgt weniger als 5 nm (Dustin et al., 2004). Die Bindung eines Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen ist nur schwer möglich. LFA-1 hat in dieser Konformation eine sehr geringe Affinität für ICAM-1.

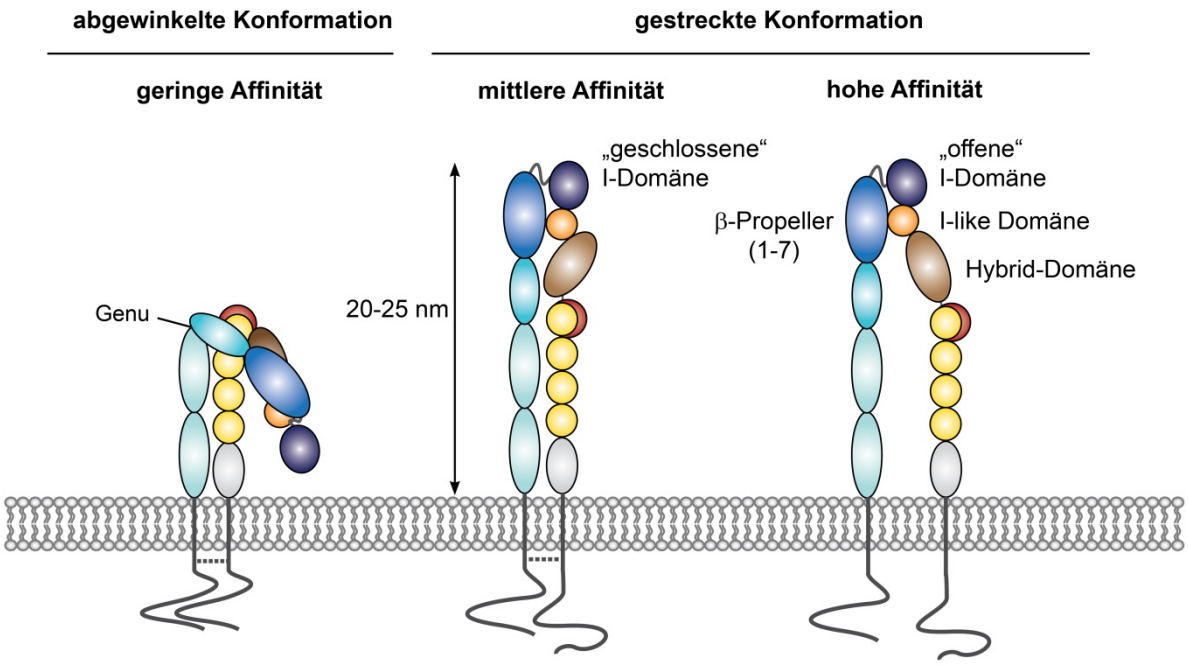

Abb. 1.4: Die drei Konformationen von LFA-1.
LFA-1 hat in der abgewinkelten (inaktiven) Konformation nur eine geringe Affinität für seinen Liganden. Diese steigt mit dem Übergang in die gestreckte Konformation (aktiv). Bei der Trennung von αL- und β2-Kette ändert sich die Konformation der MIDAS-Region in der I-Domäne. Daraus resultiert hoch-affines LFA-1. Modifiziert nach Hogg et al., 2011.

In der gestreckten (aktiven) Konformation klappt das Molekül auf und die globuläre Kopfregion gelangt an das distale Ende von LFA-1 (Abb. 1.4). Der Abstand zur Membran beträgt nun 20-25 nm (Dustin et al., 2004); die Ligandenbindestelle ist gut erreichbar. In dieser Konformation hat LFA-1 eine mittlere Affinität für ICAM-1. Die MIDAS-Region der I-Domäne der αL-Kette wird in dieser Konformation als „geschlossen" bezeichnet.

In der „offenen“ Form weisen die „Loops“ und das gebundene divalente Kation (Mg^{2+}) der MIDAS-Region eine veränderte Anordnung auf, welche es dem Liganden ICAM-1 ermöglicht, mit hoher Affinität an LFA-1 zu binden (Arnaout et al., 2005). Diese Konformationsänderung wird durch eine Abwärtsbewegung der α7-Helix der I-Domäne verursacht. Gleichzeitig schwingt die Hybrid-Domäne um 60° nach außen und die membran-proximalen sowie Transmembran-Domänen bewegen sich um 70 Å voneinander weg (Luo & Springer, 2006). Man spricht von der gestreckten Konformation mit „offener“ I-Domäne (Abb. 1.4).
Erst kürzlich identifizierte die Arbeitsgruppe um T. Springer weitere sechs Konformationen der I-Domäne im αIIbβ3 Integrin (Zhu et al., 2013). Die I-Domäne von LFA-1 kann vermutlich ebenfalls diese weiteren Konformationszustände einnehmen. Der Übergang von der abgewinkelten in die gestreckte LFA-1 Konformation kann unter anderem durch Stimulation von T-Zellen mit Mg^{2+} / Mn^{2+} (Dransfield et al., 1992) induziert werden. Die Deletion des GFFKR-Motivs der αL-Kette führt zu konstitutiv aktivem LFA-1 (Semmrich et al., 2005).
Die Valenz von LFA-1 wird durch die laterale Mobilität der LFA-1 Moleküle in der Plasmamembran und ihre lokale Dichte bestimmt. Die Valenz ist ein Maß für die Anzahl adhäsiver Kontakte, die, bezogen auf eine definierte Fläche der Plasmamembran, von einer Zelle ausgebildet werden können (Carman & Springer, 2003). Parameter der Valenzregulation sind der Vesikeltransport von Integrinen an die Plasmamembran (Valdembri et al., 2011), die Rekrutierung von Integrinen in „Lipid Rafts“ (Leitinger & Hogg, 2002), sowie die homotypische Assoziation der Transmembrandomänen verschiedener Moleküle in der gestreckten Konformation (Li et al., 2003). Während vor allem letzter Parameter in der Literatur noch kontrovers diskutiert wird, ist die Adhäsionsverstärkung durch Akkumulation von Rezeptor-Ligandenbindungen unumstritten („Clustering“). Nach Integrin-vermittelter Adhäsion werden Signale ausgelöst, die die Diffusion der Integrine in der Plasmamembran erhöhen und zur Akkumulation an der Kontaktzone führen (Carman & Springer, 2003). Experimentell kann das „Clustering“ durch den Phorbolester PMA (Kucik et al., 1996) oder durch Inkubation mit bivalenten Antikörpern induziert werden (Buensuceso et al., 2003).

1.2.3 Die bidirektionale Signalweiterleitung von LFA-1

Integrine vermitteln nicht nur die Zelladhäsion, sondern übertragen auch Signale bidirektional über die Plasmamembran (Hu & Luo, 2013). Man unterscheidet zwischen der „Inside-Out“- und „Outside-In“-Signaltransduktion. Bei der „Inside-Out“-Signalweiterleitung werden aus Sicht der LFA-1 Moleküle Signale aus dem Zellinneren nach außen in den extrazellulären Raum übertragen. Die Tendenz zur Ligandenbindung wird hinsichtlich Affinität und / oder Valenz der LFA-1 Moleküle erhöht, d.h. LFA-1 wird aktiviert. Bei der „Outside-In“-Signalweiterleitung werden Signale von LFA-1 nach der Ligandenbindung im extrazellulären Raum

über die Plasmamembran ins Zellinnere übertragen. Ausgelöst wird dies durch eine Änderung der Integrinkonformation oder der Valenz oder einer Kombination aus beiden (Carman & Springer, 2003; Dustin et al., 2004).

Die „Inside-Out"-Signaltransduktion wird durch die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren oder die Bindung von Peptid-MHC-Komplexen an den T-Zell-Rezeptor initiiert. Beide Ereignisse führen über unterschiedliche Signalwege im Zellinneren zur Aktivierung der GTPase Rap1 (Abb. 1.5) (Kinashi, 2005; Abram & Lowell, 2009). Rap1 wird anschließend zu LFA-1 an der Plasmamembran rekrutiert: Rap1 bindet an RAPL („regulator of cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissue") im Komplex mit Mst1 („mammalian sterile-20-like kinase"). RAPL bindet an zwei Lysin-Reste C-terminal des GFFKR-Motivs in der αL-Kette (Tohyama et al., 2003) und reguliert die Kinaseaktivität von Mst1 (Katagiri et al., 2006). Der Rap1-RAPL-Mst1-Komplex aktiviert LFA-1 (Katagiri et al., 2003; Katagiri et al., 2006), möglicherweise durch zytoplasmatische Phosphorylierung von LFA-1 (Fagerholm et al., 2005). Alternativ könnte RAPL durch eine sterische Modifikation die Dissoziation der αL- und β2-Kette und damit hoch-affines LFA-1 induzieren (Hogg et al., 2011). Zudem wurde gezeigt, dass der Komplex am Vesikeltransport von LFA-1 beteiligt ist (Katagiri et al., 2006).

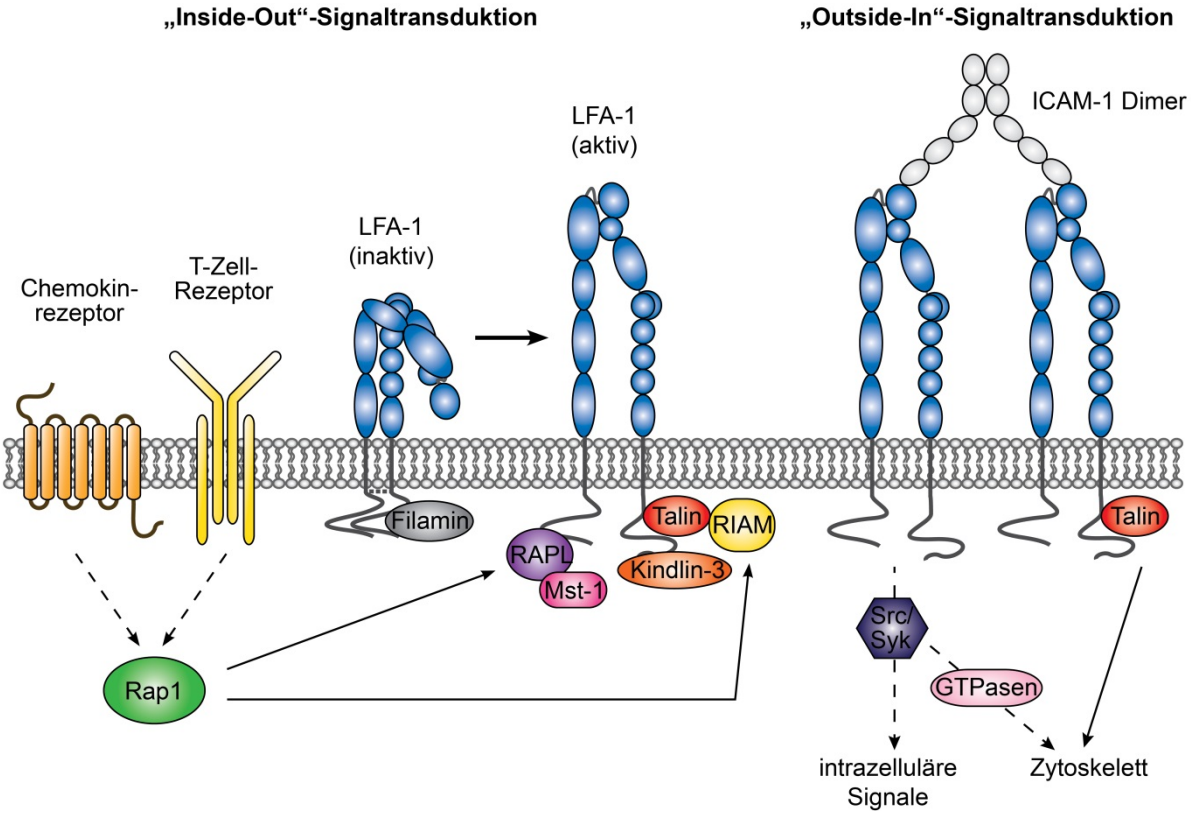

Abb. 1.5: Die bidirektionale Signalweiterleitung von LFA-1.
Die „Inside-Out"-Signaltransduktion wird durch Signale von Chemokin- oder T-Zell-Rezeptoren ausgelöst und führt zu hochaffinem LFA-1. Die „Outside-In"-Signaltransduktion erfolgt nach Bindung von multivalentem ICAM-1 und führt zur Reorganisation des Zytoskeletts und Auslösung diverser intrazellulärer Signale.

Aktives Rap1 bindet an einen weiteren Effektor, RIAM („Rap1 GTP-interacting adaptor molecule"), welches wiederum mit Talin interagiert (Abb. 1.5). Talin besitzt eine N-terminale, globuläre FERM-Domäne (vgl. Kapitel 1.4.1), über die es an ein membran-proximales NPxY-Motiv in der β2-Kette von LFA-1 bindet (Calderwood et al., 2002). Diese Bindung induziert den Übergang von LFA-1 in die gestreckte Konformation mit mittlerer Affinität für ICAM-1 (Tadokoro et al., 2003). Erst die Bindung eines weiteren Aktivators, Kindlin-3, führt zu hochaffinem LFA-1 (Lefort et al., 2012). Kindlin-3 bindet an ein NxxY-Motiv ebenfalls in der β2-Kette von LFA-1, welches jedoch membran-distal liegt (Moser et al., 2009b). Ein Negativregulator der LFA-1 Aktivität könnte Filamin sein (Abb. 1.5). Dieses bindet an eine Region in der β2-Kette, die mit der Bindestelle von Talin und Kindlin-3 überlappt (Legate & Fässler, 2009; Margadant et al., 2011). Dadurch könnte es die Talin / Kindlin-3 induzierte Aktivierung von LFA-1 blockieren (Kiema et al., 2006).

Die „Outside-In"-Signaltransduktion wird ausgelöst durch Bindung von ICAM-1 an LFA-1 (Abb. 1.5). Dadurch wird der hochaffine Zustand von LFA-1 stabilisiert. Daten aus der Literatur zeigen, dass ICAM-1 Moleküle miteinander über ihre D4-Domänen (Miller et al., 1995; Reilly et al., 1995; Yang et al., 2004) sowie über ihre D1-Domänen (Casasnovas et al., 1998; Jun et al., 2001) Homo- und Oligomere ausbilden können (Lebedeva et al., 2005). Durch Bindung des multivalenten Liganden ICAM-1 an LFA-1 wird so die Ausbildung von „Cluster" induziert. Damit werden Affinität und Valenz von LFA-1 durch die Bindung von ICAM-1 erhöht.

Intrazellulär kommt es durch die „Outside-In"-Signaltransduktion zur Ausbildung eines Multi-Protein-Komplexes, auch „Adhäsom" genannt (Zaidel-Bar & Geiger, 2010). Die Integrin vermittelte Signalweiterleitung über Src/Syk-Protein-Tyrosin-Kinasen wird dabei oft mit der von Immunrezeptoren (B- und T-Zell-Rezeptor) verglichen (Abram & Lowell, 2007). Einer der wichtigsten Parameter der „Outside-In"-Signaltransduktion ist die Weiterleitung von Integrin-Signalen zum Aktomyosin-Zytoskelett. „Downstream" von LFA-1 wird durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren die Aktivität von GTPasen wie Rho, Rac und Cdc42 reguliert (Abb. 1.5) (Abram & Lowell, 2009). Diese GTPasen aktivieren wiederum Zielproteine, die die Polymerisation, die Kreuzvernetzung und das „Treadmilling" von F-Aktin sowie die Aktivität von Myosin regulieren. Des Weiteren werden LFA-1 vermittelte Signale durch Aktin-bindende Proteine an das Zytoskelett weitergeleitet (Abb. 1.5). Talin, Filamin und α-Actinin binden an die β2-Kette von LFA-1 sowie direkt (und indirekt über Vinculin) an F-Aktin (Wiesner et al., 2005). Auf diese Weise kann LFA-1 Einfluss auf die Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts während der T-Zellmigration und -adhäsion nehmen.

Für T-Zellen ist die bidirektionale Signalweiterleitung essentiell, um extrazelluläre Signale zu erhalten und angemessene Zellantworten auszulösen. Die Integrin-Signalweiterleitung ist damit maßgeblich an Zellmigration, Differenzierung, Proliferation und Viabilität beteiligt.

1.3 Die Dynamik der T-Zellmigration

Um in sekundäre lymphatische Organe oder in entzündetes Gewebe zu gelangen, adhärieren T-Zellen an das Endothel von Blutgefäßen und wandern an diesem entlang, bis sie eine für die Extravasation geeignete Stelle erreichen. Für dieses „Crawling“ entlang der Endothelzellen muss die bis dahin runde Zelle polarisieren, d.h. ein vorderes („Leading Edge“) und ein hinteres Ende („Trailing Edge“) werden ausgebildet. Auch bei der darauffolgenden Fortbewegung verändert sich die Form der Zelle kontinuierlich. Am vorderen Ende werden Membranausstülpungen ausgebildet, während sich das hintere Ende einzieht. Dieser immerwiederkehrende Zyklus wird durch die ständige Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts ermöglicht. Aktin-Polymerisation und Myosin abhängige Kontraktionen vermitteln die Vorwärtsbewegung der Zelle. Integrine dienen dabei der Verankerung der Zelle am Endothel.

1.3.1 Morphologie einer wandernden T-Zelle

Die LFA-1 vermittelte Migration entlang von Endothelzellen wird als zweidimensionale (2D) Migration definiert. Im Gegensatz dazu wird die interstitielle Wanderung im Gewebe als dreidimensionale (3D) Migration betrachtet. Die zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden sich erheblich voneinander. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die LFA-1 vermittelte 2D-Migration gelegt. *In vitro* kann diese Migration auf einer mit dem Liganden ICAM-1 beschichteten Oberfläche untersucht werden. Gibt man T-Zellen auf dieses Substrat, polarisieren sie und wandern nach 2-3 Minuten spontan und ungerichtet, mit einer Geschwindigkeit von ~15 µm/min (Abb. 1.6 A) (Hogg et al., 2003).

Die Polarisierung der T-Zelle resultiert aus der „Outside-In“-Signalübertragung von LFA-1 nach dem initialen Kontakt mit ICAM-1. Eine breite Membranausstülpung, das Lamellipodium, wird am vorderen Ende ausgebildet. In dieser Zone hat LFA-1 eine mittlere Affinität für seinen Liganden (Abb. 1.6 B). Da die Aktivierung von LFA-1 reversibel ist, können Interaktionen von transient aktivem LFA-1 mit ICAM-1 eingegangen, aber nach dessen Inaktivierung auch wieder gelöst werden. *In vivo* tastet die Zelle auf diese Weise das Endothel nach Chemokinen ab, und prüft mit Hilfe invasiver, ventraler Membranausstülpungen mögliche Regionen für die Extravasation (Carman, 2009). Dieser Vorgang induziert in den Endothelzellen die Rekrutierung von Vesikel, deren Fusion mit der Plasmamembran zur Ausbildung einer Pore für die transzelluläre Migration von T-Zellen beiträgt (Carman et al., 2007).

In der mittleren Zellregion (Fokalzone) werden die LFA-1/ICAM-1 Kontakte in Bezug auf Affinität und Valenz verstärkt. Man findet dort eine hohe Anzahl von LFA-1 Molekülen im hoch-affinen Zustand (Smith et al., 2005). Diese feste Adhäsion der T-Zelle ans Endothel in dieser Region verleiht der Zelle Stabilität, welche *in vivo* für die Migration unter Scherkräften (aufgrund des Blutstroms im Gefäß) notwendig ist (Abb. 1.6 B).

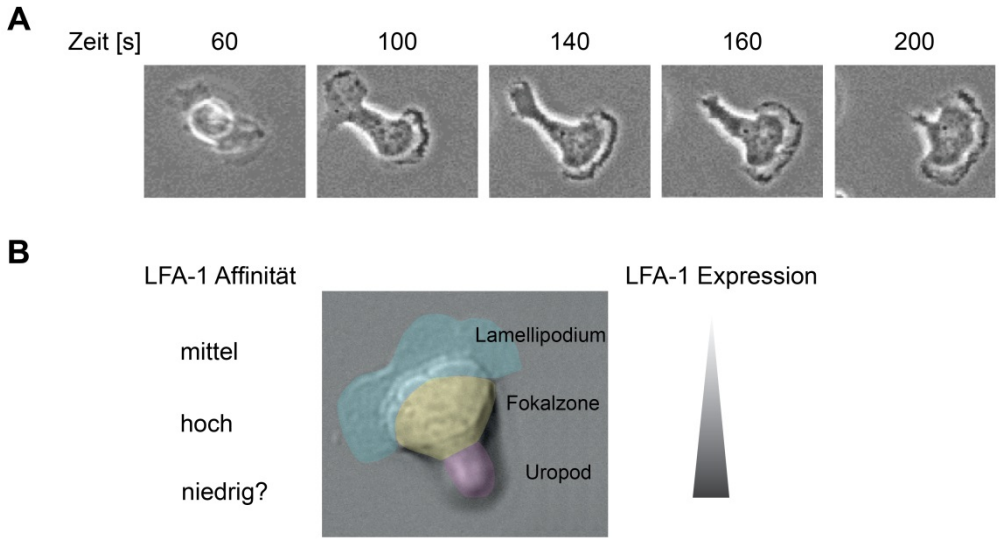

Abb. 1.6: Morphologie einer T-Zelle während der LFA-1 vermittelten Migration.
(A) 2D-Migration einer T-Zelle auf ICAM-1: die Zelle polarisiert (60-140 s) und beginnt zu wandern (>160 s). Dazu muss die Zelle am „Leading Edge“ adhärieren, und am „Trailing Edge“ deadhärieren. Modifiziert nach Hogg et al., 2003. **(B)** Morphologisch wird eine wandernde T-Zelle in folgende Regionen unterteilt: Lamellipodium – Fokalzone – Uropod. Die Expression und Affinität von LFA-1 ist in diesen Regionen unterschiedlich. Modifiziert nach Smith et al., 2007.

Das hintere Ende der Zelle bezeichnet man als Uropod (Abb. 1.6 B). LFA-1 kommt dort in großen Mengen vor (Smith et al., 2005). Welche Affinität LFA-1 in Bezug auf ICAM-1 in dieser Region hat, ist unbekannt. Da der Uropod hochgestellt ist und keinen Kontakt zu dem Substrat hat, wird vermutet, dass es sich um LFA-1 mit geringer Ligandenaffinität handelt (Smith et al., 2007). Für die Deadhäsion der Zelle muss die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 im Uropod gelöst werden. Daten aus der Literatur zeigen, dass LFA-1 Moleküle am Uropod endozytiert, in Vesikel an den „Leading Edge“ transportiert und dort wieder freigesetzt werden (LFA-1 Recycling) (Pellinen & Ivaska, 2006). Eine andere Möglichkeit für das Ablösen von ICAM-1 ist die Inaktivierung von LFA-1 in dieser Region durch „Inside-Out“-Signaltransduktion. Dafür spricht, dass die Deadhäsion am Uropod von T-Zellen, die LFA-1 in einem konstitutiv aktiven Zustand exprimieren, gestört ist (Semmrich et al., 2005).

1.3.2 Die Bedeutung der Zytoskelett-Reorganisation für die T-Zellmigration

Für die Deadhäsion während der LFA-1 vermittelten Wanderung von T-Zellen ist neben der LFA-1 Aktivitätsregulation die Reorganisation des Zytoskeletts essentiell. Die Fortbewegung während der Zellmigration erfolgt in einem Zyklus aus drei Schritten: Ausbildung eines Lamellipodiums am vorderen Ende; Stabilisierung durch adhäsive Kontakte in der Zellmitte; Auflösung der Adhäsion am hinteren Ende und Einziehen der Zelle (Mitchison & Cramer, 1996). Diese Form der Fortbewegung wird durch die Wechselwirkung von Aktomyosin-

Zytoskelett und adhäsiven Kontakten vermittelt. Es gibt zwei Prinzipien, wie die für die Migration notwendigen Kräfte in der Zelle durch das Zytoskelett erzeugt werden können: Expansion des Aktin-Netzwerks durch Polymerisation, und Verkürzung desselben durch Kontraktion. Während das Einziehen der Zelle am Uropod nur durch Kontraktion vermittelt wird, wird das Vorstoßen durch Membranausstülpungen am vorderen Ende durch beide Prinzipien induziert (Lämmermann & Sixt, 2009).

Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 löst durch „Outside-In"-Signale die Neubildung von F-Aktin aus (vgl. Kapitel 1.2.3). Die Menge an F-Aktin steigt in der Zelle um circa 30 % an (Porter et al., 2002). Dieses ist überwiegend im Lamellipodium lokalisiert. Dort wird durch die Polymerisation von Aktin-Filamenten so viel Kraft auf die Plasmamembran ausgeübt, dass diese in Form eines Lamellipodiums nach vorne rausgedrückt wird (Abb. 1.7, Kraftvektor 1) (Lämmermann & Sixt, 2009). Dabei entsteht ein retrograder Fluss von Aktin (Abb. 1.7, Kraftvektor 2). Dieser basiert einerseits auf dem Widerstand der Membran, andererseits auf der Myosin II-vermittelten Kontraktion der Aktin-Filamente (Parsons et al., 2010). Denn „Outside-In"-Signale führen downstream von LFA-1 zur Aktivierung der MLC-Kinase („Myosin-light-chain"-Kinase) im „Leading Edge" (Smith et al., 2003). Diese phosphoryliert und aktiviert die leichte Myosin-Kette (am Thr18 / Ser19) und induziert damit das Verkürzen der Aktomyosin-Filamente (Ikebe & Hartshorne, 1985). Diese Kontraktion erzeugt einen hydrostatischen Druck, der das Zytosol zum vorderen Pol der Zelle drückt.

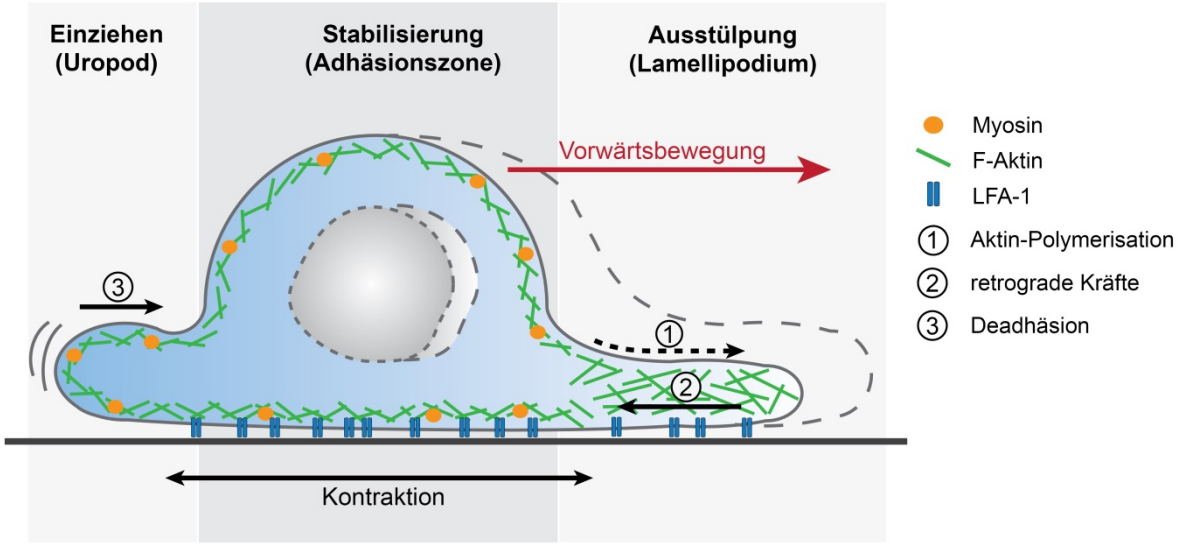

Abb. 1.7: Der Modus der Fortbewegung und die Beteiligung des Aktomyosin-Zytoskeletts während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration.
Die Migration von T-Zellen umfasst die Ausbildung eines Lamellipodiums vorne, die Stabilisierung durch adhäsive Kontakte in der Mitte, und das Einziehen des Uropods hinten. Auf die Zelle wirken dabei vorantreibende (anterograde) wie rückläufige (retrograde) Kräfte. Diese beruhen auf der Aktin-Polymerisation im Lamellipodium und auf Kontraktionen der kortikalen Aktomyosin-Filamente.

Die Zelle wird ventral durch die adhäsiven Kontakte zwischen LFA-1 und ICAM-1 am Substrat verankert. Dies erzeugt eine Zugkraft, die notwendig ist, um den retrograden Kräften zu widerstehen (Lämmermann & Sixt, 2009). Die Adhäsion am Substrat muss am hinteren Ende der Zelle wieder gelöst werden. Dies wird durch Deaktivierung oder Endozytose von LFA-1 vermittelt. Zusätzlich entstehen mechanische Kräfte durch Kontraktion der Aktomyosin-Filamente im Uropod (Abb. 1.7, Kraftvektor 3). Durch die Bindung an ICAM-1 werden downstream von LFA-1 Signale ausgelöst, die zur lokalen Aktivierung von ROCK („Rho-associated protein kinase“) führen (Smith et al., 2003). ROCK aktiviert durch Phosphorylierung am Ser19 die leichte Myosin-Kette. Die dadurch induzierte Kontraktion führt zur Deadhäsion vom Substrat und Einziehen des Uropods. Zellen, in denen ROCK und damit die Kontraktion inhibiert werden, können am „Trailing Edge“ nicht loslassen. Sie weisen verlängerte Uropoden und daraus folgend eine defekte Migration auf (Smith et al., 2003).

1.4 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) - Proteine

Die Familie der ERM-Proteine besteht aus drei hoch-konservierten Proteinen: Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) (Sato et al., 1992). Sie verknüpfen integrale Membranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett und leiten Signale ins Zellinnere weiter. ERM-Proteine regulieren die Plastizität der Plasmamembran und sind für die Ausbildung spezifischer Membranstrukturen verantwortlich. Dadurch vermitteln sie die Entstehung von Mikrovilli, Zellkontakten, Membranausstülpungen und Teilungsfurchen (Tsukita & Yonemura, 1999; Bretscher et al., 2000).

1.4.1 Ezrin/Radixin/Moesin als Mitglieder der Band 4.1 Protein-Familie

ERM-Proteine sind durch Genduplikation entstanden und weisen starke Homologien zueinander auf. Die DNA-Sequenz von murinem Ezrin ist zu 75 % mit der von Radixin, und zu 72 % mit der von Moesin identisch. Die DNA-Sequenzen von Radixin und Moesin sind zu 80 % identisch (Tsukita et al., 1997). Dies weist darauf hin, dass ERM-Proteine ähnliche, teilweise sogar redundante Funktionen haben.

ERM-Proteine werden organ- und zelltypspezifisch exprimiert. Ezrin ist vor allem in Darm, Magen, Lunge und Nieren zu finden, wohingegen Moesin hauptsächlich in Lunge und Milz, Radixin in Leber und Darm vorkommt (Louvet-Vallee, 2000). Ezrin wird in erster Linie in Epithelzellen exprimiert, Moesin in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen. In humanen Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen werden Ezrin und Moesin, nicht aber Radixin exprimiert. In Blutplättchen wird überwiegend Moesin detektiert (Charrin & Alcover, 2006).

Mäuse, in denen mittels gezielter Genmodifikation eines der drei ERM-Proteine deaktiviert wurde, zeigen oftmals nur in den Geweben und Zellpopulationen Anomalien, in denen das entsprechende ERM-Protein alleinig exprimiert wird. Der Knockout von Ezrin (7-10 Tage

nach Geburt letal) stört die embryonale Entwicklung des Dünndarms (Saotome et al., 2004), in Korrelation mit der spezifischen Expression von Ezrin im intestinalen Epithel (Berryman et al., 1993). In Moesin-defizienten Mäusen (Doi et al., 1999) ist die Alveolarstruktur der Lunge verändert (Hashimoto et al., 2008) und die Migration von Leber-Sternzellen defekt, welche Moesin als einziges ERM-Protein exprimieren (Okayama et al., 2008). Zusätzlich ist die Homöostase der Lymphozyten in Bezug auf die Auswanderung aus lymphatischen Organen beeinträchtigt (Hirata et al., 2012). Die Nullmutation von Radixin (dominantes ERM-Protein in der Leber) führt zu einem Defekt bei der Ausscheidung von Bilirubin in die Gallenflüssigkeit durch Hepatozyten und so zur Schädigung der Leber (Kikuchi et al., 2002).

ERM-Proteine weisen nicht nur untereinander hohe Sequenzhomologien auf, sondern sind auch zu 48 % mit einem weiteren Protein, Merlin („Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein“), identisch (Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993). Merlin ist ein Tumorsuppressor, der in der Maus genetisch mit dem p53-Lokus auf Chromosom 11 verknüpft ist (Bretscher et al., 2000). Im Menschen führt ein Defekt des Merlin-kodierenden Gens *nf2* zur dominant vererbten Neurofibromatose 2. Es kommt zur Ausbildung von Schwannomen (= gutartige Tumore des zentralen Nervensystems) und von Mesotheliomen (= Bindegewebstumore) im Bereich der Pleura, des Herzbeutels und des Peritoneums (Martuza & Eldridge, 1988; Bianchi et al., 1995). In Mäusen ist die Nullmutation von Merlin embryonal letal, da es früh in der Embryonalentwicklung an der Ausbildung extraembryonaler Strukturen beteiligt ist (McClatchey et al., 1997). Heterozygote Mäuse bilden eine Vielzahl maligner, stark-metastasierender Tumore aus (McClatchey et al., 1998).

Gemeinsam gehören ERM-Proteine und Merlin zu der Band 4.1 Protein Superfamilie. Namensgebend für diese Familie ist ein Erythrozyten-Membranprotein, das sogenannte Band 4.1 Protein. Dieses verbindet die Plasmamembran mit dem Zytoskelett und reguliert die Deformation und Stabilität der Erythrozyten (Diakowski et al., 2006). Insgesamt umfasst die Band 4.1 Superfamilie 40 verschiedene Mitglieder, die in fünf Subfamilien eingeteilt werden: Band 4.1 Proteine, ERM-Proteine, Talin-verwandte Proteine, PTPH (Protein Tyrosin Phosphatasen)-Proteine und NBL4 („novel band 4.1-like“)-Proteine (Louvet-Vallee, 2000; Diakowski et al., 2006).

Das gemeinsame, maßgebliche Merkmal der Proteine der Band 4.1 Superfamilie ist die sogenannte FERM („four.1-ezrin-radixin-moesin“)–Domäne (Abb. 1.8). Dabei handelt es sich um eine zwischen den Mitgliedern hoch-konservierte, circa 300 Aminosäuren umfassende Sequenz am N-Terminus der Proteine. Die FERM-Domäne ist für die Verankerung der Proteine in der Plasmamembran verantwortlich. C-terminal folgt auf die FERM-Domäne in ERM-Proteinen und Merlin eine zentrale, α–helikale Domäne, die eine „Coiled-Coil“-Struktur ausbildet (Abb. 1.8, gelb). Ezrin, Radixin und Merlin besitzen im Anschluss an diese Domäne eine Prolin-reiche Region (PP) (Abb. 1.8, grau).

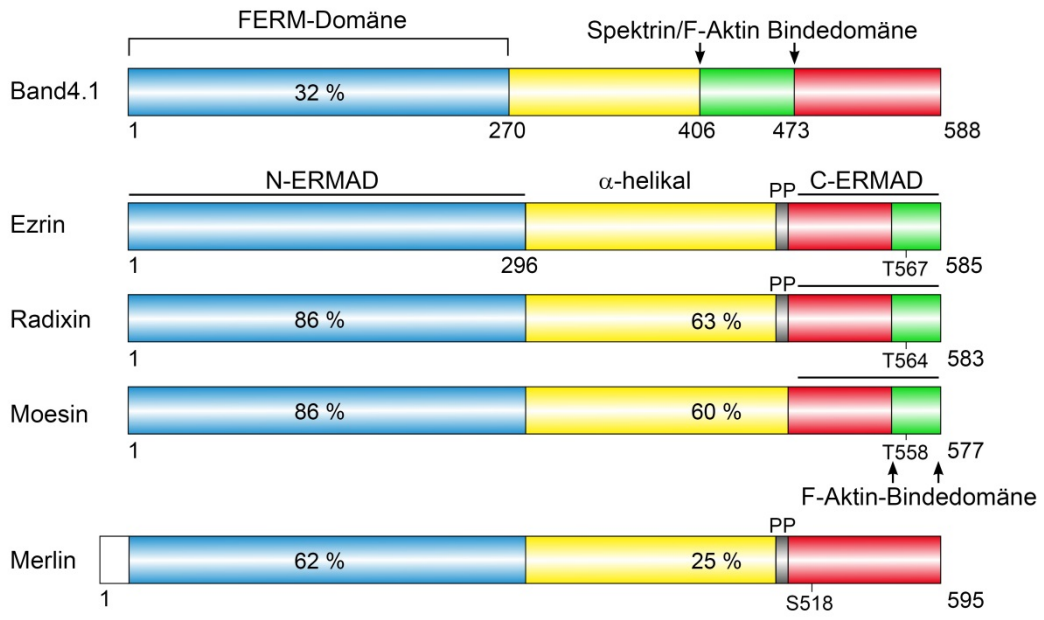

Abb. 1.8: Schematische Darstellung der ERM-Proteine als Mitglieder der Band 4.1 Superfamilie. Die N-terminale FERM-Domäne (blau) wird in ERM-Proteinen als N-ERMAD bezeichnet. Auf diese folgt eine α-helikale Domäne (gelb) sowie (in Ezrin, Radixin und Merlin) eine Prolin-reiche Region, PP. Die C-terminale Domäne (rot) wird in ERM-Proteinen als C-ERMAD bezeichnet und beinhaltet eine hoch-konservierte F-Aktin-Bindedomäne (grün). Das Band 4.1 Protein besitzt zentral eine Spektrin/F-Aktin-Bindedomäne (grün). Es sind die C-terminalen Threonin (T)- bzw. Serin (S)-Phosphorylierungsstellen eingezeichnet. Die Prozentzahlen geben die Homologie der FERM-Domäne und der übrigen Aminosäuresequenz zwischen jeweiligem Protein und Ezrin wieder. Modifiziert nach Bretscher et al., 2002.

Am äußersten C-Terminus findet man bei ERM-Proteinen eine circa 90 Aminosäuren umfassende, stark konservierte Region, die als C-ERMAD (C-terminale ERM-Assoziationsdomäne) bezeichnet wird (Abb. 1.8, rot). Diese C-ERMAD interagiert mit der N-terminal gelegenen FERM-Domäne, die deshalb auch als N-ERMAD (N-terminale ERM-Assoziationsdomäne) bezeichnet wird (Abb. 1.8, blau) (Gary & Bretscher, 1995). Die äußersten 34 Aminosäuren der C-ERMAD Region stellen eine F-Aktin-Bindestelle in ERM-Proteinen dar (Abb. 1.8, grün) (Turunen et al., 1994). Band 4.1 Proteine weisen zentral eine Bindestelle für die Zytoskelettproteine Spektrin und F-Aktin auf (Abb. 1.8). Merlin besitzt C-terminal keine F-Aktin Bindestelle, sondern assoziiert N-terminal mit Aktin (Xu & Gutmann, 1998; Brault et al., 2001).

1.4.2 Die Konformationsänderungen der ERM-Proteine

ERM-Proteine kommen in zwei Konformationen vor. Im „geschlossenen“ (inaktiven) Zustand bindet die C-terminale ERMAD an die N-terminale FERM-Domäne (Abb. 1.9 A). Man spricht von einer „head-to-tail“ Faltung (Gary & Bretscher, 1995). Im „offenen“ (aktiven) Zustand entfalten sich die Proteine. Die Bindestellen an der N-ERMAD für die Verankerung in der

Plasmamembran sowie die Bindestellen an der C-ERMAD für die Bindung an F-Aktin werden dadurch frei zugänglich. In der Literatur wird angenommen, dass die α-helikale Domäne als Sprungfeder fungiert, so dass die Proteine ausklappen, sobald die Affinität zwischen FERM-Domäne und C-ERMAD vermindert ist (Fehon et al., 2010).

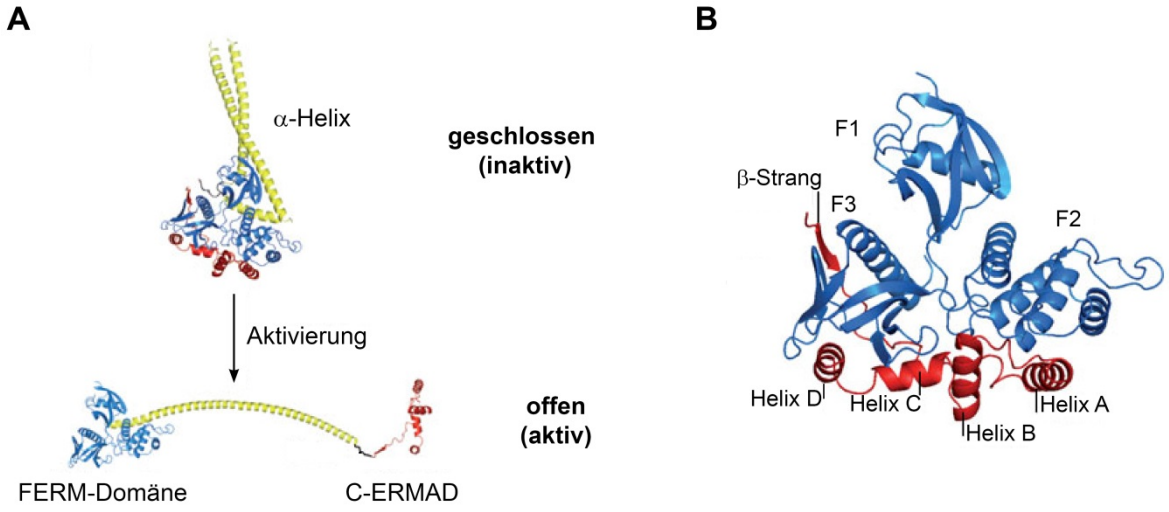

Abb. 1.9: Konformationsänderung der ERM-Proteine und Modell der FERM-C-ERMAD-Interaktion. **(A)** Dargestellt ist die Konformationsänderung der ERM-Proteine am Beispiel von Moesin aus dem Insekt *Spodoptera frugiperda*. Nach Aktivierung dissoziiert die FERM-Domäne (blau) von der C-ERMAD (rot). **(B)** Schematisches Modell der Assoziation der Moesin FERM-Domäne mit der C-ERMAD: die Interaktion findet zwischen dem β-Strang und den α-Helices A-D der C-ERMAD und den F2 und F3-Untereinheiten der FERM-Domäne statt. Modifziert nach Fehon et al., 2010.

Die globuläre FERM-Domäne besteht aus den drei strukturellen Untereinheiten F1, F2 und F3 (Hamada et al., 2000; Pearson et al., 2000), die eine kleeblattförmige Struktur ausbilden (Abb. 1.9 B). Die C-ERMAD nimmt eine gestreckte Form an, bestehend aus einem β-Strang und mehreren α-Helices (Abb. 1.9 B). Sie interagiert mit den F2- und F3-Untereinheiten der FERM-Domäne (Pearson et al., 2000). Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrücken führen zu einer festen Interaktion zwischen N- und C-ERMAD, wodurch die F-Aktin-Bindedomäne blockiert ist. Konformationsänderungen in der F3-Untereinheit bewirken, dass sich die C-ERMAD von der FERM-Domäne löst. Es kommt zur Entfaltung des Proteins und zum Übergang in die gestreckte, aktive Form.
Inaktive ERM-Proteine liegen als globuläre Monomere vor, wenn N-ERMAD und C-ERMAD innerhalb eines Moleküls (intramolekular) assoziieren. Durch antiparallele Assoziation zwischen zwei ERM-Molekülen (intermolekular), entstehen asymmetrische Dimere und Oligomere, stabilisiert durch die zentralen, α-helikalen Regionen (Bretscher et al., 2000). ERM-Proteine bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere aus (Gary & Bretscher, 1993).

1.4.3 Mechanismen der ERM-Aktivitätsregulation

Inaktive ERM-Proteine können aufgrund der Maskierung der Bindestellen weder an die Plasmamembran noch an das Zytoskelett binden und liegen deshalb frei im Zytoplasma vor. Die Aktivierung der ERM-Proteine erfolgt sequentiell in zwei Schritten (Abb. 1.10). Im ersten Schritt bindet PIP_2 (Phosphatidyl-4,5-bisphosphat) an die N-terminale FERM-Domäne. Im zweiten Schritt wird ein regulatorischer Threoninrest in der C-ERMAD phosphoryliert (Fievet et al., 2004). Beides zusammen führt dazu, dass sich ERM-Proteine entfalten und mit ihrem N-Terminus an Proteine der Plasmamembran und mit ihrem C-Terminus an F-Aktin binden.

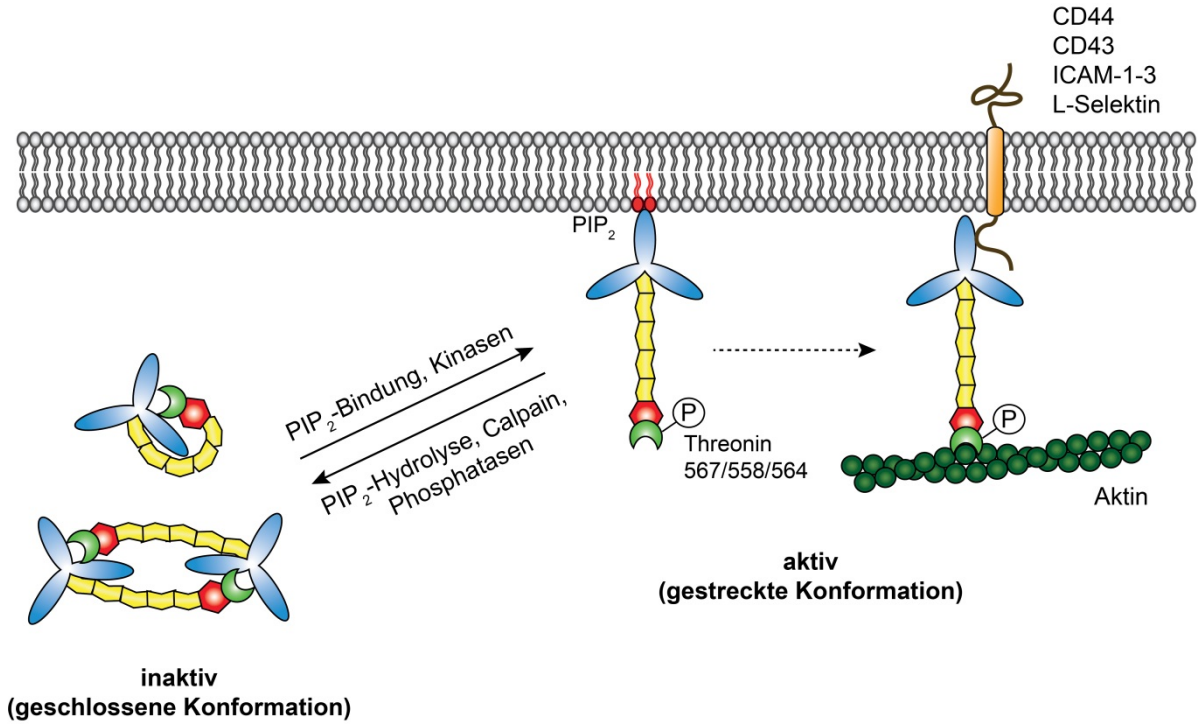

Abb. 1.10: Schematische Darstellung der ERM-Aktivitätsregulation.
ERM-Proteine bilden durch intra- oder intermolekulare Interaktion Homo- und Dimere aus. In dieser geschlossenen Konformation befinden sie sich als inaktive Proteine im Zytosol der Zelle. Sie werden durch Bindung an PIP_2 und Phosphorylierung durch Kinasen aktiviert. In der gestreckten Konformation binden ERM-Proteine N-terminal an die zytoplasmatische Region von Transmembranproteinen, C-terminal an F-Aktin.

Es sind zwei PIP_2-Bindestellen in der FERM-Domäne bekannt (Barret et al., 2000; Hamada et al., 2000). Es wird vermutet, dass PIP_2 nacheinander an beide Stellen bindet (Ben-Aissa et al., 2012). Dadurch werden ERM-Proteine an die Plasmamembran rekrutiert. Des Weiteren induziert die PIP_2-Bindung eine Konformationsänderung innerhalb der FERM-Domäne (Hamada et al., 2000). Die Affinität der C-ERMAD in Bezug auf die N-ERMAD wird vermindert und der regulatorische Threoninrest (Ezrin 567, Moesin 558, Radixin 564) in der C-ERMAD für Kinasen zugänglich (Fievet et al., 2004). Die Phosphorylierung dieses

Threoninrestes trägt weiter zur Dissoziation der C-ERMAD und FERM-Domäne bei: eine negativ geladene Phosphatgruppe in der C-ERMAD führt zu einer elektrostatischen Abstoßung der ebenfalls negativ geladenen FERM-Domäne und induziert aus sterischen Gründen die strukturelle Reorganisation der Domänen (Pearson et al., 2000).

Aktive ERM-Proteine interagieren direkt mit der zytoplasmatischen Region von integralen Proteinen, meist Typ I „Singlepass"-Transmembranproteine. Aus der Literatur sind mehrere Adhäsionsrezeptoren als direkte ERM-Interaktionspartner in Lymphozyten bekannt (Abb. 1.10). ERM-Proteine binden an die zytoplasmatische Region von CD44 (Tsukita et al., 1994), ein Rezeptor für Komponenten der extrazellulären Matrix (Hyaluronsäure, Kollagen, Laminin und Fibronektin) (Naor et al., 1997; Ponta et al., 2003). ERM-Proteine binden außerdem an die zytoplasmatische Domäne von CD43 und werden dadurch an den Uropod von Lymphozyten rekrutiert (Serrador et al., 1998). Moesin interagiert mit ICAM-3 (Serrador et al., 1997) und Ezrin mit ICAM-1 und ICAM-2 (Helander et al., 1996; Heiska et al., 1998). Zudem assoziieren Ezrin und Moesin mit der zytoplasmatischen Region von L-Selektin (Ivetic et al., 2002).

Daneben binden ERM-Proteine indirekt über Adaptorproteine an die zytoplasmatische Domäne von „Multipass"-Transmembranproteinen und sind an deren Signalweiterleitung beteiligt (Bretscher et al., 2000; Louvet-Vallee, 2000; Bretscher et al., 2002). ERM-Proteine interagieren mit GEFs („Guanin Nukleotid Exchange Factor") und GDIs („GDP dissociation inhibitor") als zytosolische Signalproteine und beeinflussen dadurch die GTPase-Aktivität von RhoA (Ivetic & Ridley, 2004). RhoA induziert seinerseits die Bildung von PIP_2 und führt damit zur Aktivierung von ERM-Proteinen (Louvet-Vallee, 2000). ERM-Proteine liegen damit in der Signalweiterleitung sowohl „upstream" als auch „downstream" von RhoA.

Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERM-Proteinen wird durch mehrere Kinasen vermittelt. Die Arbeitsgruppe von S. Tsukita zeigte, dass ROCK ERM-Proteine *in vitro* phosphoryliert (Matsui et al., 1998). In Fibroblasten stellt ROCK jedoch keine physiologisch relevante ERM-Kinase dar (Matsui et al., 1999). PKCα und θ (Protein Kinase C α/θ) konnten in Tumorzelllinien bzw. *in vitro* als ERM-Kinasen identifiziert werden (Pietromonaco et al., 1998; Ng et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um S. Shaw zeigte *in vitro* und *in vivo*, dass LOK („lymphocyte-oriented kinase") ERM-Proteine in Lymphozyten phosphoryliert (Belkina et al., 2009). Auch Mst1, 2 und 4 („Mammalian Sterile20-like Kinase") vermitteln die Phosphorylierung von ERM-Proteinen (ten Klooster et al., 2009). Aus derselben Familie wurde in *Drosophila melanogaster*, in der Moesin als einziges ERM-Protein existiert, eine weitere Kinase namens SLIK („Sterile20-like kinase"), identifiziert (Carreno et al., 2008).

Die Mechanismen zur Inaktivierung von ERM-Proteinen sind nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit der Deaktivierung ist die Dephosphorylierung des regulatorischen Threoninrestes. Y. Fukata und Kollegen konnten eine Interaktion der Myosinphosphatase mit Moesin

nachweisen (Fukata et al., 1998). Protein Phosphatase 2 C (aus Blutplättchen) dephosphoryliert aufgereinigtes phospho-Moesin (Hishiya et al., 1999). Weitere ERM-Phosphatasen wurden bisher nicht identifiziert. Die Inaktivierung von ERM-Proteinen wird möglicherweise durch Hydrolyse von PIP_2 vermittelt. In Lymphozyten kommt es nach Aktivierung der Phospholipase C, die PIP_2 spaltet, zur Ablösung der ERM-Proteine von der Plasmamembran (Hao et al., 2009). Auch die proteolytische Spaltung durch Calpain wird als Möglichkeit der ERM-Deaktivierung diskutiert. A. Shcherbina und Kollegen zeigten, dass Ezrin, aber nicht Moesin, *in vitro* von Calpain proteolytisch gespalten wird (Shcherbina et al., 1999).

1.5 Zielsetzung

Für die Homöostase des Immunsystems sowie für die Auslösung einer angemessenen Immunantwort müssen T-Zellen aus Blutgefäßen kontrolliert und effektiv in Lymphorgane oder periphere Gewebe einwandern. Die Interaktion des Integrins LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 reguliert dabei wesentlich diese Migration. Als Antwort auf extra- und intrazelluläre Stimuli wird LFA-1 auf der T-Zelloberfläche aktiviert, um eine feste Bindung mit ICAM-1 auf dem Endothel einzugehen. Während der darauffolgenden Migration entlang des Endothels muss die T-Zelle am vorderen Ende adhärieren. Doch genauso wichtig ist es, dass die Zelle am hinteren Ende wieder loslässt. Die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 muss dazu wieder gelöst werden. Während die Mechanismen der LFA-1 Aktivierung und T-Zell-Adhäsion bereits gut untersucht sind, sind die der Deaktivierung und Deadhäsion überwiegend ungeklärt. Adhäsion und Deadhäsion sind jedoch beide essentiell für eine erfolgreiche Fortbewegung der T-Zelle. Gerät der Migrationszyklus aus dem Gleichgewicht, sind die Folgen *in vivo* schwerwiegend. T-Zellen können nicht mehr zum Entzündungsort oder in lymphatische Organe rekrutiert werden. Eine adäquate Immunantwort kann nicht mehr erfolgen, Immundefizienzen entstehen. Es ist deshalb essentiell, die Zellmigration mechanistisch zu verstehen. Dieses Wissen bietet das Potential, Immunantworten in pathophysiologischen Situationen, wie der Transplantatabstoßung oder Autoimmunerkrankungen, zu modulieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zugrundeliegenden Mechanismen der Deadhäsion während der T-Zellmigration zu untersuchen. Die Signalweiterleitung von LFA-1 als Membranprotein ins Innere der Zelle für die Vermittlung der Deadhäsion soll analysiert werden. Neben der Deaktivierung von LFA-1 spielt dabei vor allem die Reorganisation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle. ERM-Proteine fungieren als Signaltransduktoren zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett. Sie induzieren dessen Umgestaltung und sind dadurch an der Ausbildung verschiedenster Zellstrukturen beteiligt. Ihr Beitrag an der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration und insbesondere an der Deadhäsion soll aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und technisches Zubehör

Autoklav (Systec D-65)	Systec, Wettenberg
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer FACSCalibur™	BD, Heidelberg
Entwicklermaschine (TYPON Optimax)	Protec, Oberstenfeld
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
Glashomogenisator	Kimble-Kontes über Gerresheimer, Düsseldorf
Heizblock (Blockthermostat BT200)	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Mikroskop Axiovert 200 mit motorischem Heiztisch und Inkubationskammer	Zeiss, Jena
Mikroskop Observer.Z1 mit ApoTome	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Brand, Berlin
pH-Meter (InoLab pH Level1)	WTW, Weilheim
Plattformschüttler rotierend (Rotamax 120)	Heidolph Instruments, Schwalbach
Plattformschüttler taumelnd (Polymax 1040)	Heidolph Instruments, Schwalbach
Proteintransfer Transblot SD (Semi-dry Transfer cell)	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage (Purelab Ultra)	Elga LabWater, Celle
RoboSep™	StemCell Technologies, Köln
Rotationsrad (Mixing Rotor)	Renner, Dannstadt
Rührer (IKAMAG RH)	Ika Labortechnik, Staufen
Sterilbank (Herasafe HSP 18)	Heraeus, Hanau
Stromquellen (Power Pack P25 / P25T)	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge (Biofuge Pico)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D, 5415R, 5424R)	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (VF2)	Ika Labortechnik, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder (Julabo UC)	Julabo, Seelbach
Zellkulturmikroskop (Invertoskop ID03)	Zeiss, Jena
Zentrifuge (Megafuge 2.0R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Rotanta460R)	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien

1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid/Bis Solution)	Bio-Rad, München
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin
Borsäure (H_3BO_3)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid ($CaCl_2$) (Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calyculin A	Merck Millipore, Schwalbach
Coomassie Brilliant BlueR-250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei)	Roche, Mannheim
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
ECL Reagenz	Perbio Science, Bonn
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37 %ige Lösung)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) +$CaCl_2$ +$MgCl_2$	Gibco über Life Technologies, Darmstadt
HEPES Puffer Lösung	Gibco über Life Technologies, Darmstadt
ICAM-1/Fc, rekombinant, murin	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (Proleukin® S) (IL-2)	Novartis, Basel, Schweiz
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl-α-D-Mannopyranosid (MαDM)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad, München
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet-P40 (NP-40)	US Biological über Biomol, Hamburg
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo
Okadainsäure	Merck Millipore, Schwalbach
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) w/o Mg^{2+}, Ca^{2+}	Biochrom, Berlin
Phosphatase-Inhibitor	Active Motif, Rixensart, Belgien
Phytohämagglutinin (PHA)	Remel über Oxoid, Wesel
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ratten T-STIM mit ConA	BD, Heidelberg
ReBlot™ Plus Mild	Merck Millipore, Schwalbach
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) VLE, 1640	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	Calbiochem, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin)	Bio-Rad, München
Tetranatrium-EDTA (Na_4EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tricine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Bio-Rad, München
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20 Detergens	Calbiochem, Darmstadt
Y27632 (ROCK-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
Zinkchlorid ($ZnCl_2$)	AppliChem, Darmstadt

2.1.3 Verbauchsmaterial

1 ml Sub-Q 26G Spritzen	BD, Heidelberg
Cryomold® Einbettschälchen	Sakura Finetek, Staufen
Deckgläser	MediWare, Wesel
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Nitrozellulose Transfer Membran (Protran)	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Parafilm M	Brand, Berlin
Plastikwaren	BD, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Nunc Nalgene, Penfield, USA Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare, Freiburg
Sterilfilter	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz
SuperFrost® Objektträger	Menzel, Braunschweig
Whatman-Filterpapier	Whatman über Roth, Karlsruhe
Zellsieb (100 µm)	BD, Heidelberg

2.1.4 Stammlösungen und Puffer

3 % Paraformaldeyd in PBS (PFA), pH 7,4	3 % (w/v)	Paraformaldehyd
	→ auf 80 °C erhitzen	
	→ 0,1 mM $CaCl_2$, 0,1 mM $MgCl_2$ zugeben	
	→ auf RT abkühlen lassen	
	→ pH überprüfen	
	→ sterilfiltrieren	
Annexin V – Bindepuffer (10X)	0,1 M	HEPES pH 7,4 (NaOH)
	1,4 M	NaCl
	25 mM	$CaCl_2$
Boratpuffer	0,2 M	Borsäure
	pH 8,5 mit 1 M NaOH einstellen	
Carbonatpuffer	0,1 M	$NaHCO_3$
	pH 9,6 mit 0,1 M Na_2CO_3 einstellen	
Erythrozyten-Lysepuffer (10X)	1,68 M	NH_4Cl
	100 mM	$KHCO_3$
	1,26 mM	Tetranatrium-EDTA
	pH 7,3	

IP-Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	2 mM	$MgCl_2$
	2 % (v/v)	NP-40
	1 Tablette	Complete Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)
	20 µg/ml	PMSF
Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 9,0
	150 mM	NaCl
	2 mM	$MgCl_2$
	100 µM	$ZnCl_2$
	2 % (v/v)	NP-40
	1 Tablette	Complete Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)
	20 µg/ml	PMSF
MES-Puffer	0,1 M	MES
	pH 5,6 mit 1 N NaOH einstellen	
NycoPrep-Lösung1	60 ml ddH_2O auf 45 °C erwärmen	
	28,2 g Nycodenz langsam zugeben	
	40 ml ddH_2O zugeben, abkühlen lassen	
	sterilfiltrieren, Lagerung 4 °C, dunkel	
NycoPrep-Lösung2	10 mM Tricine-Lösung herstellen	
	0,6 % (v/v) NaCl zugeben	
	pH 7,0 mit NaOH einstellen	
	sterilfiltrieren, Lagerung 4 °C, dunkel	
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	5 % (v/v)	Essigsäure
SDS-Laufpuffer (5x)	248 mM	Tris
	1,9 M	Glycin
	0,5 % (w/v)	SDS
SDS-Probenpuffer (3x)	0,24 M	Tris-HCl, pH 6,8
	6 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	Glycerin
	16 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	1 mM	Bromphenolblau
TBST (10x)	200 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	1,4 M	NaCl
	1 % (v/v)	Tween 20 Detergens
Transblot-Puffer (10x)	450 mM	Tris
	390 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Tab. 2.1: Verwendete Stammlösungen und Puffer.

2.1.5 Medien für die Zellkultur

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde FBS vor Gebrauch für 30 min auf 56 °C erwärmt. In nachfolgender Tabelle sind die jeweiligen Medien für die Kultivierung der verschiedenen Zellen sowie ihre Zusammensetzung aufgeführt.

	TK-1	**Milzzellen / primäre mu T-Zellen**	**HSB-2 / PBMCs**	**primäre hu T-Zellen**	**bEnd5**
Basismedium	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640
FBS, inaktiviert	7 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicillin / Streptomycin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
β-ME	55 nM	55 nM	55 nM	55 nM	55 nM
rekombinantes IL-2				20 ng/ml	

Tab. 2.2: Verwendete Zellkulturmedien.

Zum Waschen von Zellen wurde das entsprechende Basismedium mit 10 % (v/v) FBS und 25 mM HEPES (Waschpuffer) verwendet. Als Migrationsmedium wurde HBSS (+$CaCl_2$, +$MgCl_2$, ohne Phenolrot) mit 25 mM HEPES eingesetzt. Um Zellen einzufrieren, wurde dem jeweiligen Basismedium 40 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO zugesetzt (Einfriermedium).

2.1.6 Zellen und Zelllinien

Zellen	**Eigenschaft / Gewinnung**	**Referenz**
bEnd5	Endotheliom-Zelllinie, etabliert aus primären Gehirnkapillaren von BALB/c Mäusen durch Expression des mittleren T-Onkogens des Polyomavirus (PymT)	Kiefer et al., 1994 Wagner und Risau, 1994
HSB-2	humane T-Zell-Leukämie Zelllinie	DMSZ-Nummer: ACC435
Humane T-Lymphoblasten	aktivierte T-Zellen, Kultivierung aus PBMCs mit PHA	Primärkultur (human)
TK1	murine T-Zell-Lymphom Zelllinie	ATCC-Nummer: CRL-2396
Naive T-Zellen	aus der Milz negativ selektierte CD3/CD4- und CD3/CD8-positive T-Zellen	Primärkultur (murin)
Milzzellen	primäre murine Milzzellen	Primärkultur (murin)
Murine T-Lymphoblasten	aktivierte T-Zellen, Kultivierung aus murinen Milzzellen mit ConA	Primärkultur (murin)
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen, aus humanem Blut über Gradient gewonnen	Primärkultur (human)

Tab. 2.3: Verwendete Zellen und Zelllinien.

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Erstantikörper

Antikörper [Klon] gegen	Isotyp	Konzen-tration	Anwen-dung	Bezugsquelle
α-Tubulin [DM1a]	Maus IgG1	1:2000	WB	Calbiochem, Darmstadt
CD3e [145-2C11]	Armenischer Hamster IgG1	1:50	IF	BD, Heidelberg
CD3e [OKT3]	Maus IgG2a	10 µg/ml	funkt. Assay	BD, Heidelberg
CD11a [FD441.8]	Ratte IgG2b	1:100	IF	Leinco Technologies, über Biotrend, Köln
CD11a [M17/4]	Ratte IgG2a	10 µg/ml	IP	BD, Heidelberg
CD11a [mAb38]	Maus IgG2a	1:200	FACS	AbDSerotec, Düsseldorf
CD11a Antiserum „tkdmgcleplresdkd“	Kaninchen IgG	1:5000	WB	Davids Biotechnologie, Regensburg
CD18 [mAb24]	Maus IgG1	1:100	FACS	Abcam, Cambridge, UK
CD18 Antiserum „atttvmnpkfaes“	Kaninchen IgG	1:100	WB	Eurogentec, Köln
CD31/PECAM [SZ31]	Ratte IgG2a	1:20	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
CD44 [IM7] - AlexaFluor488	Ratte IgG2b	1:100	IF	BioLegend, Fell
CD45R/B220 [RA3-6B2] - Biotin	Ratte IgG2a	1:100	IF	eBioscience, Frankfurt
CD169/SIGLEC [MOMA] - Biotin	Ratte IgG2a	1:200	IF	Acris, Herford
CD169/SIGLEC [MOMA] - FITC	Ratte IgG2a	1:50	IF	Acris, Herford
Ezrin [3C12]	Maus IgG1	1:1000 1:50	WB IF	Abcam, Cambridge, UK
Ezrin	Kaninchen IgG	20 µl	IP	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
gespaltene Caspase 3 (Asp175) [5A1E]	Kaninchen IgG	1:500 1:200	WB IF	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
GFP	Kaninchen IgG	1:2000	WB	Clontech, Sant-Germain-en-Laye, Frankreich
Moesin [38/87]	Maus IgG1	1:1000 1:50	WB IF	AbDSerotec, Puchheim
MYPT1	Kaninchen IgG	1:750 1:50	WB IF	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
phospho-MYPT1 (Thr696)	Kaninchen IgG	1:750	WB	Merck Millipore, Schwalbach

phospho-MYPT1 (Thr853)	Kaninchen IgG	1:750	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
p38 MAP Kinase	Kaninchen IgG	1:1000	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
phospho-ERM p-Ezrin(Thr567)/ p-Radixin(Thr564)/ p-Moesin(Thr558)	Kaninchen IgG	1:1000 1:50	WB IF (*)	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
phospho-IκB(Ser32)	Kaninchen IgG	1:1000	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
PNAd [Meca79]	Ratte IgM	1:500	IF	BD, Heidelberg
PP1δ	Kaninchen IgG	1:750 1:100 2 µl	WB IF IP	Upstate über Merck Millipore, Schwalbach
PP1δ [EP1804Y]	Kaninchen IgG	1:10.000 1:100 10 µl	WB IF IP	Abcam, Cambridge, UK
PP2A, A-Untereinheit [81G5]	Kaninchen IgG	1:500	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
PP2A, C-Untereinheit [1D6]	Maus IgG2b	1:750 1:50 4 µg/ml	WB IF IP	Merck Millipore, Schwalbach
PP2A, C-Untereinheit	Kaninchen IgG	1:50	IF	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
PP2A, C-Untereinheit [52F8]	Kaninchen IgG	1:500	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
Phospho-ZAP70 (Tyr319)/Syk(Tyr352)	Kaninchen IgG	1:250	WB	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt
VSV-G	Kaninchen IgG	1:500 1:100	WB IF (*)	AbDSerotec, Puchheim

Tab. 2.4: Verwendete Erstantikörper.
Grau hinterlegte Antikörper detektierten humane, alle übrigen murine Antigene. Für die Anwendung im Immunoblot wurden Antikörper von Cell Signaling in 5 % BSA / TBST inkubiert, alle übrigen in 5 % Milch / TBST. Für die Anwendung in der Immunfluoreszenz wurden Zellen und Organschnitte mit 3 %igem PFA fixiert. Bei markierten Antikörpern (*) war eine Fixierung mit 10 %iger TCA notwendig. Funkt. Assay = Funktionaler Assay (T-Zell-Rezeptor-Kreuzvernetzung).

2.1.7.2 Zweitantikörper

Antikörper	Konjugat	Konzen-tration	Anwen-dung	Bezugsquelle
Ziege anti-armenischer Hamster IgG	Cy3	1:125	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor488	1:300	IF	Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt
Ziege anti-Kaninchen IgG	Cy3	1:300	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg

Ziege anti-Kaninchen IgG	HRP	1:5000	WB	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG	TexasRed	1:300	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG	APC	1:100	FACS	BioLegend, Fell
Ziege anti-Maus IgG	Alexa Fluor488	1:150	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG	Cy3	1:1000	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG	HRP	1:5000	WB	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgM	AMCA	1:15	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgG	Alexa Fluor488	1:100	IF	Molecular Probes über Life Technologies, Darmstadt
Ziege anti-Ratte IgG	Cy3	1:200	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Esel anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor350	1:100	IF	Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt
Esel anti-Ratte IgG	DyLight 594	1:400	IF	Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg

Tab. 2.5: Verwendete Zweitantikörper.
Alle gegen IgG gerichteten Antikörper binden an die leichte sowie schwere Kette des Immunglobulins.

2.1.7.3 Isotyp-Kontrollantikörper

Isotyp [Klon]	Anwendung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	IP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maus IgG	IP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maus IgG2a [G155-178]	funktionaler Assay	BD, Heidelberg
Maus IgG1 [MOPC-21]	FACS	Biozol, Eching
Ratte IgG	IP	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 2.6: Verwendete Isotyp-Kontrollantikörper.
Die Art der verwendeten Isotyp-Kontrollantikörper sowie deren Konzentration richteten sich nach dem Isotyp und der eingesetzten Menge des Erstantikörpers.

2.1.7.4 Weitere Färbereagenzien

Reagenz	Konz.	Anwendung	Bezugsquelle
Annexin V-FITC	5 µl/test	Apoptosetest	BD, Heidelberg
4‘,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	2 µg/ml	IF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	2,5 µg/ml	Apoptosetest	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-AlexaFluor350	1:100	IF	Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin-AlexaFluor488	1:100	IF	Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin-DyLight594	1:200	IF	BioLegend, Fell

Tab. 2.7: Weitere verwendete Färbereagenzien.
DAPI und PI sind DNA-interkalierende Farbstoffe. Annexin V-FITC bindet an Phosphatidylserin in Membranen. Das Bakterienprotein Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin.

2.1.8 Reagenzienkits

Cell Line Nucleofector Kit L (#VCA-1005)	Amaxa / Lonza, Köln
Mouse T Cell Enrichment Kit (#19751)	StemCell Technologies, Köln
Mouse T Cell Nucleofector Kit (#VPA-1006)	Amaxa / Lonza, Köln
Human T Cell Nucleofector Kit (#VPA-1002)	Amaxa / Lonza, Köln

Tab. 2.8: Verwendete Reagenzienkits.

2.1.9 Expressionskonstrukte

Name	Ausgangs-plasmid	Insert	Eigenschaften, Bezugs-quelle, Referenz
Ezrin-wt-GFP	pEGFP-N1	humanes Ezrin	Kanamyzin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Lamb et al., 1997
Ezrin-T567/A-GFP	pEGFP-N1	humanes Ezrin mit Aminosäurensubstitution T(Threonin) → A(Alanin) an Position 567	konstitutiv inaktive Form Kanamyzin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Coscoy et al., 2002
Ezrin-T567/D-GFP	pEGFP-N1	humanes Ezrin mit Aminosäurensubstitution T(Threonin) → D(Asparaginsäure) an Position 567	konstitutiv aktive Form Kanamyzin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Coscoy et al., 2002

Ezrin-wt-VSV-G	pcB6	humanes Ezrin	Ampicillin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Algrain et al., 1993
Ezrin-T567/A-VSV-G	pcB6	humanes Ezrin mit Aminosäurensubstitution T(Threonin) → A(Alanin) an Position 567	konstitutiv inaktive Form Ampicillin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Gautreau et al., 2000
Ezrin-T567/D-VSV-G	pcB6	humanes Ezrin mit Aminosäurensubstitution T(Threonin) → D(Asparaginsäure) an Position 567	konstitutiv aktive Form Ampicillin^R Monique Arpin (Institut Curie, Paris) Gautreau et al., 2000

Tab. 2.9: Verwendete Expressionskonstrukte.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Umluft-Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im jeweils benötigten Medium in Brutschränken bei 37 °C, 7 % CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Zellkulturschalen oder –flaschen. Suspensionszellen wurden regelmäßig in angemessener Zelldichte subkultiviert. Adhärente Zellen wurden in gleichmäßigen Abständen mit frischem Medium versorgt und bei einer Konfluenz von etwa 70-80 % passagiert. Die Zellablösung von den Zellkulturplatten erfolgte durch eine ca. 5-minütige Inkubation mit Trypsin bei 37 °C im Brutschrank. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frischem, serum-haltigem Zellkulturmedium abgestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt (472 x g, 3 min, RT) wurden die Zellen anschließend in der gewünschten Verdünnung in frischem Medium neu ausgesät.

Für die längerfristige Lagerung wurden pelletierte Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in einem Einfrierröhrchen (Alpha Laboratories, Eastleigh, UK) in einem „Cryo Freezing Container“ (Nunc Nalgene, Penfield, USA) mit einer Geschwindigkeit von -1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Nach zwei Tagen bei -80 °C wurden sie zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese schnell auf 37 °C im Wasserbad erwärmt, mit Waschpuffer gewaschen und in Kulturmedium ausgebracht.

2.2.2 Generierung primärer, muriner T-Zellen

2.2.2.1 Isolation von Milzzellen

Nach Explantation der Milz aus Wildtyp-Mäusen (C57BL/6N) wurde diese in kleine Stücke geschnitten und mit Hilfe eines Glashomogenisators in Waschpuffer homogenisiert. Die Zellsuspension wurde über ein 100 µm Zellsieb filtriert, mit 472 x g 5 min bei RT zentrifugiert und die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Milzzellen wurden als Ausgangsmaterial für die Generierung von murinen naiven T-Zellen und aktivierten T-Lymphoblasten eingesetzt.

2.2.2.2 Selektion naiver T-Zellen

Um primäre naive T-Zellen zu erhalten, wurden Milzzellen gewonnen und darin enthaltene Erythrozyten hypotonisch lysiert. Dazu wurde das Zellpellet nach Zentrifugation (472 x g, 3 min, RT) in 37 °C warmen 1x Erythrozythen-Lysepuffer (1 ml pro Milz) aufgenommen und für 1 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch nochmaliges Sieben und erneute Zentrifugation von Zelltrümmern abgetrennt. Nach einmaligem Waschen in RoboSep® Puffer (StemCell Technologies, Köln) wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^8 / ml in RoboSep® Puffer + 5 % (v/v) Rattenserum (aus Kit) aufgenommen. Eine immuno-magnetische negative Selektion der naiven T-Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels RoboSep®-Gerät und „Mouse T Cell Enrichment Kit“ (StemCell Technologies, Köln) vollautomatisch. Nach der Aufreinigung ruhten die Zellen für 2 h bei 37 °C, 7 % CO_2 in Kulturmedium, bevor sie in den Versuch geführt wurden.

2.2.2.3 Gewinnung aktivierter T-Lymphoblasten

2.2.2.3.1 Aktivierung von T-Lymphozyten durch Concanavalin A

Zur Gewinnung aktivierter T-Lymphoblasten wurden Milzzellen in einer Dichte von 5×10^7 Zellen / 5 ml ausgebracht und mit 5 µg/ml ConA für 16 h im Brutschrank stimuliert. ConA ist ein mitogener Aktivator von T-Lymphozyten und regt diese zur Zellteilung an. Der Effekt wurde nach der Stimulation unter dem Mikroskop überprüft: aktivierte T-Zellen bilden miteinander Zellaggregate aus; nicht-aktivierte T-Zellen und alle übrigen Zellen erscheinen als einzelne, ruhende und daher abgerundete Zellen.

2.2.2.3.2 Kultivierung der aktivierten T-Zellen in IL-2-haltigem Medium

Die aktivierten T-Zellen wurden nach 16 h zur Entfernung von ConA einmal in Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min, RT). Für die weitere Stimulation der polyklonalen Proliferation der T-Lymphoblasten wurden die Zellen in einer Dichte von 5 x 10^7 Zellen / 10 ml in Kulturmedium ausgebracht, mit 5 % (v/v) Ratten T-STIM mit ConA versetzt und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Bei diesem Zusatz handelte es sich um den Überstand ConA-stimulierter Splenozyten aus der Ratte, in dem alle für die aktivierten T-Zellen notwendigen Wachstumsfaktoren, v.a. IL-2, enthalten sind. Außerdem wurde 5 % (v/v) 1 M Methyl-α-D-Mannopyranosid zugegeben, um ConA abzufangen und damit eine Überaktivierung zu verhindern. Nach erfolgreicher Stimulation konnte am nächsten Tag unter dem Mikroskop zwischen ruhenden T-Zellen und aktivierten T-Zellen, den sogenannten T-Lymphoblasten, differenziert werden. Ruhende T-Zellen erscheinen klein und abgerundet gegenüber den größeren, „Tennisschläger-förmigen“ T-Lymphoblasten.

2.2.2.3.3 Anreicherung der T-Lymphoblasten

Aktivierte T-Lymphoblasten wurden durch einen Dichtegradienten von den übrigen Leukozyten der Milzzellsuspension und eventuell vorhandenen Zelltrümmern getrennt. Dazu wurden die Zellen einmal in serumfreien RPMI / 25 mM HEPES gewaschen, um ein Verkleben der Zellen im Gradienten zu verhindern. Anschließend wurden ca. 1 x 10^8 Zellen in einem 15 ml Falconröhrchen über 5 ml NycoPrep-Gradient (bestehend aus 2,5 ml NycoPrep-Lösung1 und 2,5 ml NycoPrep-Lösung2) vorsichtig geschichtet und ohne Bremse mit 538 x g 20 min bei RT zentrifugiert. Die sich in der Interphase ansammelnden T-Lymphoblasten wurden abgenommen und nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min, RT) in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.3 Generierung primärer, humaner T-Lymphoblasten

2.2.3.1 Isolation von PBMCs

Um periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zu erhalten, wurden gesunden, freiwilligen Spendern 30 ml Vollblut abgenommen und in Heparin-beschichteten Röhrchen gesammelt. Nach einer 1:2-Verdünnung des Blutes mit PBS wurden je 30 ml Blut / PBS in einem 50 ml Falconröhrchen über 15 ml Biocoll-Gradient (Biocoll-Separating Solution, 1,077 g/ml) vorsichtig geschichtet und ohne Bremse mit 1.017 x g 25 min bei RT zentrifugiert. Die sich zwischen Plasmaschicht und Trennmedium angesammelten PBMCs wurden abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 607 x g, 7 min, RT).

2.2.3.2 Aktivierung von T-Lymphozyten durch PHA

Für die Aktivierung von T-Lymphozyten wurden ca. 4 x 10^7 PBMCs in 10 ml Kulturmedium mit 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. PHA diente dazu, ruhende Lymphozyten aus dem Vollblut aus der G_0-Phase in den Zellzyklus zu überführen und sie damit zur Zellteilung anzuregen. Die Kultivierung in diesem Medium erfolgte für 4 Tage. Nach dieser Aktivierungsphase kann mikroskopisch bereits eine Anreicherung aktivierter Lymphozyten gegenüber den Monozyten beobachtet werden.

2.2.3.3 Kultivierung aktivierter T-Lymphoblasten in IL-2-haltigem Medium

Nach Aktivierung der T-Zellen wurde PHA durch dreimaliges Waschen der Zellen in Waschpuffer (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min, 20 °C) entfernt. Anschließend wurden die T-Lymphoblasten in einer Konzentration von ca. 3 x 10^5 Zellen pro ml in Kulturmedium mit 20 ng/ml rekombinantem IL-2 in Zellkulturflaschen ausgebracht. Die aktivierten, humanen T-Lymphoblasten wurden in diesem Medium für 2 Wochen kultiviert und ab Tag 10 in die entsprechenden Versuche eingesetzt. Durch regelmäßige, mikroskopische Beurteilung der Zellen wurde sichergestellt, dass die T-Lymphoblasten im aktivierten Zustand (d.h. Tennisschläger-förmig und groß) blieben. Kehrten die T-Zellen in die Ruhephase zurück und sahen klein und abgerundet aus, wurden sie in geringeren Zelldichten subkultiviert, um sie erneut zur Proliferation anzuregen.

2.2.4 Induktion eines Liganden-spezifischen Signals in T-Zellen

Es sollten intrazelluläre Signale, ausgelöst durch Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1, in T-Zellen biochemisch untersucht werden.

Das dafür (und allgemein *in vitro*) verwendete rekombinante ICAM-1 (R&D Systems, Wiesbaden) ist ein Proteinkonstrukt, dessen N-Terminus die extrazellulären „Ig-like“ Domänen 1-5 von murinem ICAM-1 darstellt. C-terminal sind diese ICAM-1 Domänen über ein „Linker“-Peptid (IEGRMD) mit dem Fc-Fragment von humanem IgG1-Antikörper verknüpft. Daraus ergibt sich die Nomenklatur ICAM-1/Fc. Da Fc-Fragmente von Antikörpern natürlicherweise dimerisieren, werden biologisch aktive ICAM-1 Homodimere mit hoher Affinität für LFA-1 gebildet. Des Weiteren binden derartige Konstrukte mit dem Fc-Fragment an Plastikoberflächen, wodurch die Bindestellen von ICAM-1 für die Interaktion mit LFA-1 frei zugänglich sind. Als Kontrolle wurde ein Proteinkonstrukt verwendet, das lediglich aus dem „Linker“-Peptid und dem Fc-Fragment von humanem IgG1-Antikörper besteht und im Folgenden als rekombinantes IgG1/Fc bezeichnet wird (R&D Systems, Wiesbaden).

Um eine ICAM-1 beschichtete Oberfläche zu erhalten, wurden Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen mit je 18 µg rekombinantem ICAM-1/Fc pro Vertiefung in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen, unspezifische Bindestellen mit 1 % BSA / PBS für 1 h bei RT abgesättigt und erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Um ein Liganden-spezifisches Signal in T-Zellen auszulösen, wurden jeweils 5 x 10^6 murine T-Lymphoblasten in 2 ml Migrationsmedium + 5 mM $MgCl_2$ + 2 mM EGTA in jede ICAM-1 beschichtete Vertiefung gegeben. Durch kurzes Zentrifugieren der Mikrotiterplatten kamen die Zellen sofort mit dem Liganden in Kontakt. Während einer 20 – 60 minütigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Adhäsion und eventuelle Migration der Zellen. Nicht-adhärente und nicht-wandernde Zellen wurden sehr vorsichtig mit 37 °C warmen PBS abgespült. Die adhärenten, wandernden Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben für biochemische Analysen lysiert.

2.2.5 Transiente Zelltransfektion mittels Amaxa

Die Transfektion von T-Zellen wurde mit Hilfe verschiedener „Amaxa Nucleofector Kits“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese „Nucleofection“-Methode beruht auf der Elektroporation von Zellen: durch elektrische Pulse werden kleine Poren in der Zellmembran geschaffen, durch die niedermolekulare Substanzen wie DNA ins Zytoplasma der Zelle gelangen. Die Art des Kits, die Transfektionslösung, das Medium nach der Transfektion sowie das Programm waren dabei abhängig von der jeweiligen T-Zell-Art und sind in Tab. 2.10 aufgeführt. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion derart subkultiviert, dass die T-Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

In einer Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen wurden entsprechende Mengen Medium im Brutschrank auf 37 °C, 7 % CO_2 für 30 min prä-äquilibriert. Nach einmaligem Waschen in PBS (90 x g, 10 min bei RT) wurden pro Transfektionsansatz 3 x 10^6 Zellen in jeweils 100 µl Nucleofector® Lösung (bestehend aus Nucleofector® Lösung und Supplement im Verhältnis 4,5:1) eingesetzt. Pro Ansatz wurden 6 µg DNA zugegeben. Die Transfektion erfolgte in mitgelieferten Küvetten mittels Amaxa-Nucleofector® II (Version B2.81, R3.3, S3-8) mit den entsprechenden Programmen. Im Anschluss wurden sofort 500 µl prä-äquilibriertes Medium zu den Zellen gegeben und die Proben mit den mitgelieferten Einmal-Pipetten vorsichtig in die vorbereitete Mikrotiterplatte überführt. Die Zellen (final 3 x 10^6 / 1,5 ml) wurden für 24 h darin weiterkultiviert.

Zellen	TK1	HSB-2	Murine T-Lymphoblasten	Humane T-Lymphoblasten (Tag 6)
Amaxa-Kit	Cell Line Nucleofector Kit L	Cell Line Nucleofector Kit L	Mouse T Cell Nucleofector Kit	Human T Cell Nucleofector Kit
Nucleofector® Lösung	Nucleofector Lösung L	Nucleofector Lösung L	Mouse T Cell Nucleofector Lösung	Human T Cell Nucleofector Lösung
Medium [ml/Vertiefung]	1,5 ml TK1-Medium	1,5 ml HSB-2-Medium	1,5 ml Mouse T Cell Nucleofector Medium + 5 % (v/v) FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 % (v/v) Medium Komponente A	2 ml Kulturmedium
Programm	A-030	X-001	X-001	X-001

Tab. 2.10: Parameter der Amaxa-Transfektionen.
Für die verschiedenen T-Zell-Arten wurden spezifische Medien, Lösungen und Programme für die transiente Transfektion verwendet.

2.2.6 Zeitraffer-Videomikroskopie

Um die zweidimensionale, LFA-1 vermittelte Migration von T-Zellen *in vitro* zu untersuchen, wurde die spontane Wanderung von T-Lymphoblasten auf einer ICAM-1-beschichteten Oberfläche mit Hilfe einer Zeitraffer-Videomikroskopie aufgenommen.

Dazu wurden µ-Slides der Firma Ibidi (München) mit je 0,6 µg rekombinantem ICAM-1/Fc pro Kanal in 50 µl PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet (siehe Kapitel 2.2.4). Aktivierte T-Lymphoblasten wurden zweimal in Migrationsmedium gewaschen (472 x g, 3 min, RT) und in einer Konzentration von 5×10^4 in 50 µl Migrationsmedium in die beschichteten Kanäle gegeben. Anschließend wurden bei 37 °C und 7 % CO_2 mit einem EC Plan-Neofluar 40x/1,3 Immersionsöl-Objektiv (Zeiss, Jena) alle 8 s für 1 h am Mikroskop Axiovert 200 Aufnahmen gemacht und zu einem Video zusammengefügt (siehe dazu auch Kapitel 2.5). Um die Migration zu quantifizieren, wurde anschließend die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen mit Hilfe des „Cell Tracking“ Moduls von AxioVision (Zeiss, Jena) bestimmt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung von Zelllysaten wurden auf Eis bzw. in vorgekühlten Geräten (4°C) durchgeführt.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Zelllysate von 1 x 10^6 Zellen / Spur eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal in Phosphatase-Inhibitor PI / PBS (1:20-Verdünnung) gewaschen (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min), um die Abspaltung von Phosphatgruppen zu verhindern. Bei der Analyse von nicht-phosphorylierten Proteinen wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand komplett abgesaugt und die pelletierten Zellen bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Zellen wurden dann aufgetaut, mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C aufgekocht und direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, oder bei -20 °C aufbewahrt. Generell wurden Zelllysate maximal drei Mal aufgekocht und auf ein Gel aufgetragen.

Für die Immunpräzipitation wurden 5 x 10^7 Zellen einmal in PBS gewaschen und anschließend in 1 ml IP-Lysepuffer für 20 min auf dem Rotationsrad lysiert. Nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne wurden abzentrifugiert (21.130 x g, 15 min, 4 °C) und der proteinhaltige Überstand (= Lysat) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde ein Lysat-Aliquot von 20 µl sofort mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgekocht, um dieses zur Kontrolle der Zelllyse später auf ein Polyacrylamid-Gel aufzutragen (weitere Durchführung IP siehe Kapitel 2.4.1).

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. SDS ist ein anionisches Detergens, das hydrophobe Wechselwirkungen in nativen Proteinen und somit deren Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen zerstört. β-Mercaptoethanol reduziert zusätzlich Disulfidbrückenbindungen. Proteine gehen somit in SDS-Probenpuffer in eine linearisierte Form über. Ihre Eigenladung wird durch das stark negativ geladene SDS überdeckt, welches sich an die Hauptkette der Proteine anlagert. Dadurch wandern die Proteine in Richtung des Pluspols und werden im Gel nach ihrer Molekularmasse mit einer hohen Auflösung aufgetrennt. Um diese Auftrennung zu optimieren, wird die Porengröße des Gels durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid bei der Polymerisation variiert. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli, 1970 werden die Proteine im großporigen Sammelgel fokussiert, sodass sie zum gleichen Zeitpunkt in das wesentlich kleinporigere Trenngel einwandern können.

Die Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Gelapparatur von Biometra (Göttingen) hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit ddH_2O überschichtet, um eine glatte Übergangsfläche zum Sammelgel zu schaffen. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das ddH_2O entfernt, das 5 %ige Sammelgel gegossen und sofort der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt.

	Trenngel			**Sammelgel**
Gel-Menge	5 ml / Gel			2 ml / Gel
Gel-Konzentration	8 %	10 %	12 %	5 %
Proteingröße [kDa]	100 - 200	50 – 150	40 - 70	
ddH_2O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,4 ml
30 % Acrylamid / Bisacrylamid	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	
1,0 M Tris-HCl pH 6,8				250 µl
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	3 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Tab. 2.11: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele
Die angegebenen Gel-Konzentrationen beziehen sich auf die Acrylamid-Konzentration im Gel und definieren die Porengröße der Gelmatrix. Sie werden nach dem Größenbereich der aufzutrennenden Proteine ausgewählt. Der Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) werden zum Schluss dazugegeben.

Die Proteinproben wurden in 1x SDS-Probenpuffer für 5 min auf 95 °C erhitzt und in die Geltaschen aufgetragen. Parallel wurde der Molekulargewichtsmarker „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel, bis das Bromphenolblau des SDS-Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach der modifizierten Methode von Towbin et al., 1979 auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dies erfolgte in einer „Semi-Dry“ Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München). Nach Äquilibrierung aller Komponenten in 1x Transblot-Puffer wurde das SDS-Gel auf die Membran zwischen jeweils zwei Whatman-Filterpapieren geschichtet. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt

und der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 2 mA / cm^2 Membranfläche für 60 min. Zur Überprüfung der Blot-Effizienz wurde die Membran reversibel mit Ponceau S Lösung gefärbt.

2.3.4 Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot)

Mit der immunochemischen Detektion können relevante Proteine nach dem Transfer auf die Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte über eine indirekte Markierung. Nach Bindung eines antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörpers erfolgte die Detektion mit einem spezies-spezifischen, Meerrettich-peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Alle Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schwenken durchgeführt.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 5 % (w/v) Milchpulver / TBST für 1 h abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper in einer zuvor optimierten Verdünnung (in 5 % (w/v) Milchpulver bzw. BSA / TBST) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBST für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundär-antikörper in 5 % (w/v) Milchpulver / TBST für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen in 1x TBST erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbande mit Hilfe des ECL-Detektionsreagenz („enhanced chemiluminescence“) (Perbio Science, Bonn). In diesem ist das Substrat für die Meerrettichperoxidase enthalten, welche die Oxidation von Luminol katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Chemilumineszenz frei, die auf Röntgenfilmen detektiert werden kann. Die ECL Detektionslösungen 1 und 2 wurden dazu in einem 1:1 Verhältnis gemischt und für 1 min bei RT auf die Membran gegeben. Die Membran wurde zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und die spezifischen Signale durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

Um eine Beladungskontrolle durchführen zu können oder ein weiteres Protein auf demselben Blot nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper sowie die Chemilumineszenzlösung durch Inkubation in 1x ReBlot™ Plus Mild für 20 min bei RT entfernt. Eine Membran konnte dadurch bis zu zwei weiteren Immundetektionen unterzogen werden.

2.3.5 Untersuchung der ERM-Dephosphorylierung *in vitro*

Um die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen durch die Phosphatasen PP1 und PP2A *in vitro* zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Enzyme direkt auf T-Zell-Lysate gegeben.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C und in vorgekühlten Geräten. 5 x 10^6 T-Zellen wurden in 100 µl Lysepuffer für 20 min auf dem Rotationsrad lysiert. Nach Zentrifugation bei 21.130 x g für 15 min wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es

wurden 0,5 U PP1 bzw. 0,25 U PP2A (beide von Merck-Millipore, Schwalbach) zugegeben. Um die Aktivität der Enzyme zu hemmen, wurden zusätzlich 50 nM Calyculin A bzw. 2 µM Okadainsäure zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Als Positiv-Kontrolle für unspezifische Dephosphorylierung wurde alkaline Phosphatase aus Rinderdarm („bovine intestine alkaline phosphatase“ = BIAP) (Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer 1:100 Verdünnung zum Lysat gegeben. Nach Inkubation für 5 min bei 30 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 3x SDS-Probenpuffer sofort gestoppt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C aufgekocht und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.6 Kovalente Kopplung von ICAM-1 an Polystyren-„Beads“

Um die Aktivität von LFA-1 auf der Oberfläche von murinen T-Zellen zu untersuchen, wurden Polystyren-„Beads“ kovalent mit rekombinantem ICAM-1/Fc sowie IgG1/Fc als Kontrolle (vgl. Kapitel 2.2.4) gekoppelt. Als „Beads“ wurden Fluoresbrite® YG carboxylierte Mikro-„Beads“ (Polysciences, Eppelheim) mit einer Größe von 3 µm verwendet. Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers nach der Carbodiimid-Methode. Dabei aktiviert Carbodiimid die Carboxylgruppen der Mikro-„Beads“ für eine Reaktion mit den Aminogruppen der zu koppelnden Proteine. Da diese Aktivierung nur im sauren Milieu unter Ausschluss weiterer Carboxyl- und Aminogruppen erfolgreich ist, wird MES-Puffer verwendet. Die Kopplungsreaktion selbst findet unter neutralen Bedingungen in Boratpuffer statt. Dabei werden Amid-Bindungen zwischen den aktivierten Carboxyl-Gruppen der „Beads“ und den Aminogruppen der rekombinanten Proteine ausgebildet.

500 µl „Beads“ wurden zweimal in Carbonatpuffer und danach dreimal in MES-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 21.130 x g, 5 min, RT). Anschließend wurden die „Beads“ in 625 µl MES-Puffer aufgenommen und 625 µl frisch-hergestelltes 2 %iges (w/v) Carbodiimid (= EDC-HCl) / MES-Puffer tröpfchenweise zugegeben. Nach 4-stündiger Inkubation des Gemisches auf dem Rotationsrad bei RT wurde dreimal in MES-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 21.130 x g, 5 min, RT), um überschüssiges Carbodiimid zu entfernen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die „Beads“ in 1,2 ml Boratpuffer aufgenommen und mit 100 µg rekombinantem ICAM-1/Fc bzw. IgG1/Fc (R&D Systems, Wiesbaden) über Nacht bei RT gekoppelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Aufnahme der pelletierten „Beads“ (21.130 x g, 10 min, RT) in 1,2 ml Boratpuffer. 50 µl 0,25 M Ethanolamin / Boratpuffer wurden zugegeben um freie reaktive Carboxylgruppen auf den Mikro-„Beads“ zu blockieren. Nach 30 min auf dem Rotationsrad wurden die „Beads“ zentrifugiert (21.130 x g, 10 min, RT) und in 1 ml einer 10 mg/ml BSA -Lösung / Boratpuffer aufgenommen. Es folgte eine

Inkubation für 30 min bei RT auf dem Rotationsrad, um weitere unspezifische Protein-Bindestellen abzusättigen. Nach zweimaligem Waschen (wie oben) in der 10 mg/ml BSA-Lösung / Boratpuffer wurden die „Beads“ in 500 µl Aufbewahrungspuffer (0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4, 1 % BSA, 0,1 % Natriumazid, 5 % Glyzerin) aufgenommen und bei 4 °C dunkel gelagert.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation wird die Fällung (= Präzipitation) von Antigen-Antikörper-Komplexen (= Immunkomplexe) bezeichnet. Der Fc-Teil von IgG-Antikörpern bindet dabei gerichtet an die bakteriellen Proteine A (42 kDa) und G (30-35 kDa), die an Sepharose gekoppelt sind. Die Bindungsaffinität wird durch Spezies und IgG-Unterklasse des Antikörpers bestimmt. Durch die Orientierung des IgG-Antikörpers sind die beiden Antigenbindestellen frei zugänglich für das jeweilige spezifische Antigen. Die Immunkomplexe können durch einfache Zentrifugation der Sepharose pelletiert werden.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. 50 µl Sepharose® 4B mit rekombinantem Protein G (Zymed über Life Technologies, Darmstadt) wurde mit 10 µg Antikörper in 1 ml IP-Lysepuffer für 2-3 h auf dem Rotationsrad gekoppelt. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen (Zentrifugation bei 2.348 x g, 1 min) in PBS aus dem Ansatz entfernt. Anschließend wurde zur pelletierten Sepharose, gekoppelt mit dem Antikörper, 1 ml Proteinlysat (siehe Kapitel 2.3.1) gegeben und für 2-3 h auf dem Rotationsrad inkubiert. Um das Immunpräzipitat aufzureinigen, wurde die Sepharose viermal in IP-Lysepuffer (Zentrifugation bei 2.348 x g, 1min) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer und Aufkochen bei 95 °C von der Sepharose gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (21.130 x g, 1 min) wurde der Überstand mit den gelösten, präzipitierten Proteinen mittels SDS-PAGE analysiert.

Bei stark limitiertem Zellmaterial wurde die Präzipitation mit dem Isotyp-Kontrollantikörper nicht parallel, sondern sequentiell zur Präzipitation mit dem spezifischen Antikörper durchgeführt. Dazu wurde das Zelllysat zunächst für 2-3 h zu Sepharose, gekoppelt mit dem Isotyp-Kontrollantikörper, und danach für weitere 2-3 h zu Sepharose, gekoppelt mit dem spezifischen Antikörper, gegeben. Dadurch konnten sowohl unspezifisch-präzipitierte als auch spezifische Interaktionspartner mit nur einem Zelllysat analysiert werden. Außerdem wurde dadurch die „Verunreinigung“ des Präzipitats mit unspezifischen Interaktionspartnern durch die „Vorreinigung“ mit Hilfe des Isotyp-Kontrollantikörpers minimiert.

2.4.2 Immunzytochemie

2.4.2.1 Immobilisierung von Zellen

Um die Lokalisation ausgesuchter Proteine in gewanderten T-Zellen untersuchen zu können, wurden 2 x 10^5 Zellen in HBSS / 25 mM HEPES auf Deckgläschen gegeben, die mit 1 µg rekombinantem ICAM-1/Fc beschichtet waren (siehe 2.2.4). Es folgte eine Inkubation von 1 h im Brutschrank, während der die Zellen sich polarisierten und spontan ungerichtet wanderten. Nicht-adhärente und nicht-wandernde Zellen wurden vorsichtig abgenommen, so dass nur adhärente, wandernde Zellen anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen wurden.
Um die Lokalisation spezifischer Proteine in Suspensionszellen untersuchen zu können, wurden die Zellen nach der Immunfluoreszenzfärbung auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen für 20 min bei RT immobilisiert. Für die Beschichtung wurden 50 µl einer Poly-L-Lysin-Lösung (1:10 in ddH_2O verdünnt) auf die Deckgläschen gegeben und nach 5 min bei RT wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Deckgläschen für 1 h bei RT getrocknet.

2.4.2.2 Einbetten von Organen und Anfertigen von Gefrierschnitten

Organe, die Mäusen entnommen wurden, wurden in TissueTek (Sakura Finetek, Staufen) eingebettet, sofort bei -80 °C eingefroren und gelagert. Organschnitte (8 µm) wurden mit einem Kryostaten (Leica, Wetzler) angefertigt und auf SuperFrost® Objektträger übertragen. Die Gefrierschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und dann ebenfalls bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte aufgetaut und mit einem hydrophoben Markerstift (Pap Pen, Kisker Biotech, Steinfurt) als Flüssigkeitsbarriere umkreist.

2.4.2.3 Immunfluoreszenz

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen in Zellen oder auf Organschnitten wurden diese fixiert, permeabilisiert und relevante Proteine durch fluoreszenzmarkierte Antikörper visualisiert. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird der unmarkierte Primärantikörper erst durch einen fluoreszenzmarkierten, spezies-spezifischen Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgte im Dunkeln.
Zellen und Organschnitte wurden durch Inkubation mit vorgewärmtem 3 %igen PFA für 20 min bei RT fixiert. Für manche Primärantikörper (siehe Tab. 2.4) war eine Fixierung mit 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) für 15 min bei 4 °C notwendig. Nach einigen Wasch-schritten (3x in PBS) wurden die Zellmembranen durch eine 0,1 %ige (v/v) TritonX-100-Lösung (in PBS) permeabilisiert. Sollten Oberflächenproteine detektiert werden, entfiel dieser

Permeabilisierungsschritt. Auf erneutes Waschen (3x in PBS) folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Hilfe von 10 % Serum / PBS für 20 min bei RT (Serum-Art abhängig von der Spezies des Sekundärantikörpers). Der Primärantikörper wurde in einer zuvor ausgetesteten Konzentration in 1 % BSA / PBS für 1 h bei RT in einer „feuchten" Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers für 30 min bei RT. Zellkerne wurden parallel mit DAPI angefärbt. Die Proben wurden mit ProLong® Gold Antifade Reagenz (Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt) eingedeckelt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.
Um Proteine in Suspensionszellen zu detektieren, wurde die Immunfluoreszenzfärbung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen wie beschrieben durchgeführt.
Die spezifische Färbung von Proteinen wurde immer durch Färbungen derselben Zellen oder Organschnitte mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörpern gefolgt von den Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern, und durch Färbung mit den Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern alleine, bestätigt.

2.4.3 Statischer Adhäsionstest

Beim statischen Adhäsionstest wurde die LFA-1 vermittelte Adhäsion von T-Zellen an den Liganden ICAM-1 unter statischen Bedingungen untersucht.
Glasobjektträger mit 16 Kammern (Nunc Nalgene, Penfield, USA) wurden mit 0,7 µg rekombinantem ICAM-1/Fc pro Kammer beschichtet (siehe 2.2.4). 1 x 10^6 TK1-Zellen pro ml wurden in RPMI + 5 % (v/v) FBS + 25 mM HEPES mit jeweils entweder 50 nM Calyculin A, 2 µM Okadainsäure oder DMSO für 10 min bei 37 °C, 7 % CO_2 vorbehandelt. Aus diesem Ansatz wurden anschließend 1 x 10^5 Zellen / 100 µl in jede ICAM-1-beschichtete Kammer für 30 min gegeben. In dieser Zeit adhärierten die Zellen. Der Kammeraufsatz wurde von dem Glasobjektträger abgebrochen und dieser zweimal kopfüber in einer Schale mit PBS gewaschen, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Adhärente Zellen wurden durch Inkubation des Objektträgers in eiskaltem 5 %igem (v/v) Glutaraldehyd für 2 h auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit ProLong® Gold Antifade Reagenz eingedeckelt. Es wurden alle adhärenten Zellen in fünf definierten Feldern mit Hilfe des Mikroskops Axiovert200 und des AxioVision Cell Count Moduls (Zeiss, Jena) ausgezählt. Alle Ansätze erfolgten in Duplikaten.

2.4.4 Transmigrationstest

Für den Transmigrationstest wurde ein Zweikammersystem benutzt, in dem ein Filtereinsatz mit einer Porengröße von 5 µm in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen eingesetzt wurde (6,5 mm Transwell mit 5 µm Poreneinsatz, Corning Costar, Amsterdam, Niederlande). Es wurden zwei Varianten des Transmigrationstests angewandt. Bei der chemotaktischen Migration wird die Wanderung der Zellen aus dem oberen in das untere Kompartiment in Richtung eines chemotaktisch wirksamen Stoffes untersucht. Bei der transendothelialen Migration werden auf dem Filtereinsatz Endothelzellen ausgebracht und die Transmigration der Zellen durch dieses Endothel in das untere Kompartiment untersucht.
Für das Ausbringen von Endothelzellen auf dem Filtereinsatz wurden die Filter zunächst 30 min mit 50 µg/ml Laminin (Roche, Mannheim) bei RT beschichtet. Anschließend wurde nicht gebundenes Laminin aus den Filtereinsätzen über Kopf mit der Pasteurpipette abgesaugt. Die Filtereinsätze wurden für 1 h bei RT getrocknet. Danach wurden 5×10^4 bEnd5-(Endotheliom)zellen pro Filtereinsatz ausgebracht und für zwei Tage kultiviert, bis sie einen konfluenten Zellrasen ausbildeten. 16 Stunden vor dem Transmigrationstest wurden die Endotheliomzellen mit 5 nM TNF-α (Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt) stimuliert. Dadurch wurden die Endothelzellen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 auf ihrer Oberfläche angeregt.
Murine T-Lymphoblasten wurden vor dem Transmigrationstest in einer Konzentration von $1{,}5 \times 10^6$ / ml in HBSS / 25 mM HEPES mit Calyculin A bzw. DMSO für 30 min im Brutschrank vorinkubiert. Nach einem Waschschritt (472 x g, 3 min, RT) wurden 5×10^5 vorbehandelte T-Lymphoblasten in einem Volumen von 100 µl Transmigrationsmedium (RPMI, 5 % (v/v) FBS, 25 mM HEPES) in das obere Kompartiment gegeben. In das untere Kompartiment des Zweikammersystems wurden 600 µl Transmigrationsmedium mit 100 ng/ml SDF1α (R&D Systems, Wiesbaden) gegeben. Es folgte eine chemotaktische Migration der T-Zellen aus dem oberen in das untere Kompartiment für 1,5 h bzw. eine transendotheliale Migration über den bEnd5-Zellrasen für 3 h im Brutschrank. Anschließend wurden die Filtereinsätze aus dem unteren Kompartiment entnommen und 300 µl der Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Die Anzahl der gewanderten Zellen wurde mit Hilfe von „CountBright Absolute Counting Beads“ (Molecular Probes über Life Technologies, Darmstadt) in der Durchflußzytometrie bestimmt.
Um die Konfluenz der bEnd5-Zellen zu überprüfen, wurden die Filtereinsätze in einer Schale mit PBS gewaschen, für 2 h mit 90 µl Formaldehyd dampffixiert und mit Giemsa (Millipore, Schwalbach) 20 min bei RT gefärbt. Eine lichtmikroskopische Untersuchung der Filter bestätigte die Konfluenz der Einzelzellschicht.
Innerhalb eines Transmigrationstests wurden für die verschiedenen Ansätze Duplikate (chemotaktische Migration) bzw. Triplikate (transendotheliale Migration) angesetzt.

2.4.5 „Homing“-Test für die *in vivo* T-Zell-Rekrutierung in sekundäre lymphatische Organe

Mit Hilfe eines „Homing“-Tests kann die Rekrutierung naiver T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten und Milz *in vivo* untersucht werden.
Naive T-Zellen (1 x 10^7 Zellen / ml) wurden mit 1,5 µM CellTracker™ Green CMFDA, 3 µM CellTracker™ Orange CMRA oder 10 µM CellTracker™ Violet BMQC (Invitrogen über Life Technologies, Darmstadt) 30 min im Brutschrank fluoreszenzmarkiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (472 x g, 3 min, RT) wurden die Zellen in einer Dichte von 1,5 x 10^6 Zellen / ml mit 50 nM Calyculin A für 30 min im Brutschrank behandelt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen (472 x g, 3 min, RT). Anschließend wurden unbehandelte und Calyculin A-behandelte Zellen in einem Verhältnis von 1:1 (minimum jeweils 1,5 x 10^7 Zellen) intravenös in eine WT (C57BL/6N)-Maus injiziert (siehe 2.6.3). 2 h nach diesem adoptiven Transfer der Zellen wurden die inguinalen und mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Es wurden Gefrierschnitte dieser Organe angefertigt und hochendotheliale Venolen (HEV) im Lymphknoten sowie die weiße Pulpa in der Milz mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Lokalisation der gespritzten Zellen wurde in der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.4.6 Analyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie dient der Analyse einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Expression von Antigenen, die mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper angefärbt werden. Da sich an die Analyse oftmals eine Zellseparation anschließt, wird die Durchflußzytometrie im allgemeinen Sprachgebrauch auch als Fluoreszenz-aktiviertes-Zell-Sorting (kurz FACS) bezeichnet.
Die zu analysierenden Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das monochromatische Laserlicht wird durch die Zellen gestreut und reflektiert. Außerdem emittieren die über Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer bestimmten Wellenlänge. Ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern trennt die abgehende Strahlung einer jeden einzelnen Zelle nach Wellenlängenbereichen auf und Detektoren messen diese. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) gibt Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) über die Zellgranularität. Die Fluoreszenz-Emissionen charakterisieren die Menge der gebundenen Antikörper und erlauben so eine Aussage über die Expressionsdichte markierter Antigene in und auf den Zellen.
Die Antigen-Markierung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Die Analyse der Färbung erfolgte an einem FACSCalibur

(BD, Heidelberg) mit Hilfe des Programmes CellQuest Pro (BD, Heidelberg). Für die Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon) verwendet.
Die T-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (472 x g, 3 min, RT) und 5 – 10 x 10^5 Zellen in 100 µl FACS-Puffer (PBS, 0,5 % (v/v) BSA, 0,01 % (w/v) NaN_3) pro Vertiefung ausgebracht. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Zellen mit 10 % (v/v) Serum / FACS-Puffer für 20 min inkubiert (Serum-Art abhängig von der Spezies des Sekundärantikörpers). Nach einem Zentrifugationsschritt (472 x g, 3 min) erfolgte die Markierung der Oberflächenmoleküle durch Inkubation mit dem primären Antikörper für 30 min in FACS-Puffer. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in FACS-Puffer (472 x g, 3 min) entfernt. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper für 20 min. Nach erneutem Waschen (wie oben) wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und zeitnah gemessen oder für eine spätere Messung in 200 µl 1 %igem (v/v) PFA / PBS für 20 min fixiert und im Kühlschrank gelagert.
Um den Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die Konformation von LFA-1 Molekülen mittels konformationsspezifischer Antikörper zu untersuchen, wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll der FACS-Färbung angewandt. Es wurden humane T-Zellen mit 50 nM Calyculin A bzw. 2 µM Okadainsäure in Bindepuffer (HBSS, 1 % BSA, 25 mM HEPES) für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um den Übergang der LFA-1 Moleküle in die hochaffine Konformation zu induzieren, wurden die Zellen während dieser Vorinkubation zusätzlich mit 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA stimuliert. Danach wurden 10 µg/ml Primärantikörper für weitere 20 min bei 37 °C zugegeben. Die Zellen wurden zweimal in FACS-Puffer gewaschen (472 x g, 3 min, RT) und mit dem spezies-spezifischen Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG-APC in FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min, 4 °C) in FACS-Puffer wurden die Proben sofort gemessen.
Neben der Analyse von Oberflächenantigenen wurde die Durchflußzytometrie auch für den Apoptose-Test eingesetzt (siehe Kapitel 2.4.7). Bei diesem war das zu detektierende Fluorochrom nicht an einem Antikörper, sondern an Annexin V gebunden oder in Lösung (Propidiumiodid). Des Weiteren wurden Absolut-Zellzahlbestimmungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.4). Durch Relation auf eine definierte Anzahl von fluoreszenten Mikropartikeln (CountBright Absolute Counting Beads, Molecular Probes über Life Technologies, Darmstadt) konnte die absolute Zellzahl in einer Probe bestimmt werden.

2.4.7 Apoptosetest mittels Annexin V / PI – Färbung

Phosphatidylserin wird im frühen Stadium der Apoptose von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an die Außenseite transloziert. Annexin V bindet calciumabhängig spezifisch an Phosphatidylserin und markiert dadurch frühapoptotische Zellen. Da bei nekrotischen Zellen die Plasmamembran permeabel ist, kann Annexin V dort ebenfalls eindringen und binden. Deshalb wird gleichzeitig eine Viabilitätsfärbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Dieses wird durch die intakte Membran lebender / frühapoptotischer Zellen abgehalten, kann aber die poröse Membran nekrotischer / spätapoptotischer Zellen durchdringen und dort in die DNA interkalieren. Dadurch kann zwischen frühapoptotischen Zellen (Annexin V positiv, PI negativ) und nekrotischen / spätapoptotischen Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) unterschieden werden.
Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS (472 x g, 3 min, 4 °C) wurden 1 x 10^5 Zellen in 100 µl 1x Annexin V-Bindepuffer mit 5 µl Annexin V-FITC und 2,5 µg/ml Propidiumiodid für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. 200 µl 1x Annexin V-Bindepuffer wurden zugegeben und der Prozentsatz an apoptotischen Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt.

2.4.8 Kreuzvernetzung von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen

Eine Kreuzvernetzung von T-Zell-Rezeptoren wurde mit Hilfe eines CD3-Antikörpers sowie eines spezifischen $F(ab`)_2$ -Fragmentes auf humanen T-Zellen durchgeführt.
Humane T-Lymphoblasten wurden 16 h vor dem Experiment einmal in Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 472 x g, 3 min, RT) und in Kulturmedium ohne IL-2 im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt (472 x g, 3 min, 4 °C) in RPMI / 25 mM HEPES aufgenommen. Für die Bindung des primären Antikörpers an den T-Zell-Korezeptor wurden 5 x 10^6 Zellen / 100 µl RPMI / 25 mM HEPES mit 10 µg/ml anti-CD3e [OKT3]-Antikörper für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte (700 x g, 5 min, 4 °C) in RPMI / 25 mM HEPES. Um eine Kreuzvernetzung des primären Antikörpers zu induzieren, wurden die Zellen mit 10 µg/ml eines bivalenten $F(ab')_2$ –Fragmentes eines Kaninchen-Anti-Maus IgGs (Jackson ImmunoResearch über Dianova, Hamburg) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde dem Ansatz ein Zell-Aliquot (1 x 10^6) entnommen und sofort für 5 min bei 95 °C in 2x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.9 LFA-1-Aktivitätstest

Um den Aktivitätsstatus von LFA-1 auf der T-Zell-Oberfläche zu analysieren, wurden murine T-Zellen mit „Beads“ inkubiert, an denen ICAM-1 kovalent gebunden war. Nur wenn LFA-1 in der hoch-affinen Konformation und / oder in „Cluster“ vorliegt, kann es eine stabile Interaktion mit ICAM-1 auf den „Beads“ eingehen. Der Prozentsatz an Zellen, die an die „Beads“ binden, korreliert so mit der Anzahl an Zellen mit aktivem LFA-1 und ist ein Maß für die LFA-1 Avidität auf den Zellen.

Naive T-Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und in Bindepuffer (HBSS, 1 % (w/v) BSA, 25 mM HEPES) aufgenommen. Um den Effekt von Calyculin A bzw. Okadainsäure auf die LFA-1 Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen mit 25 nM oder 50 nM Calyculin A bzw. 2 µM Okadainsäure für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Eine gleichzeitige Stimulation mit 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA ermöglichte die Induktion von hoch-affinem LFA-1 als Kontrolle. In einem FACS-Röhrchen wurden 1 x 10^5 vorinkubierte Zellen mit „Beads", an denen rekombinantes ICAM-1/Fc bzw. IgG1/Fc gekoppelt war (siehe Kapitel 2.3.6), im Verhältnis 1:10 gemischt. Nach einer Inkubation für 15 min im Brutschrank wurden die Proben mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Die Bindung der Zellen an die „Beads“ führte zu einer Verschiebung der Population im Forward / Sidescatter sowie im FITC-Kanal. Der Prozentsatz an Zellen, die an „Beads“ gebunden haben, konnte somit bestimmt werden.

2.5 Mikroskopie

Mikroskopische Analysen erfolgten an den inversen Mikroskopen Axiovert 200 und Observer.Z1 (Zeiss, Jena) mit folgenden Objektiven: EC Plan-Neofluar 20x/0,50, 40x/0,75, 40x Öl/1,30, 100x Öl/1,30, Plan-Apochromat 100x Öl/1,40, LD A Plan 20x/0,30. Durchlicht-aufnahmen wurden mit Hilfe von differentiellem Interferenzkontrast (DIC) durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde eine monochrome CCD-Kamera AxioCam MRm (Zeiss, Jena) verwendet. Aufnahme und Bearbeitung erfolgten mit Hilfe der AxioVision 4.8 Software (Zeiss, Jena). Ein ApoTome (Zeiss, Jena) wurde zur Erstellung konfokaler optischer Schnitte und von 3D-Darstellungen eingesetzt. Ein motorischer Tisch ermöglichte das Abrastern großer Bereiche. Während der Zeitraffer-Videomikroskopie wurde die Umgebung mittels TempController, Heizeinsatz und Objektivheizer S1, CO_2-Controller und Feuchtemodul konstant auf 37 °C, 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

Alle durchgeführten Versuche wurden im Einklang tierschutzrechtlicher Bedingungen durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2.1.54-2532-123-11).

2.6.1 Versuchstiere

Alle C57BL/6N Mäuse wurden von Charles-River (Wilmington, USA) bezogen und im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München konform der Richtlinien des aktuellen Tierschutzgesetzes unter Barrierebedingungen verpaart und gehalten.

2.6.2 Organentnahme

Für die Organentnahme aus Mäusen wurden diese durch zervikale Dislokation getötet und die jeweiligen Organe unter möglichst keimarmen Bedingungen (Desinfektion des Operationsbesteckes mit 70 % EtOH) entnommen.

2.6.3 Intravenöse Injektion von T-Zellen in die Schwanzvene

Die zu injizierenden naiven T-Zellen wurden in sterilem PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden unter ein Becherglas gesetzt und ihr Schwanz locker daraus hervorgeführt, so dass dieser gut zugänglich war. Der Schwanz wurde für ca. 30 s in warmes ddH_2O getaucht, um die Durchblutung der lateralen Schwanzvenen zu verstärken. Mindestens 3×10^7 Zellen in 300 µl PBS wurden mit einer 1 ml Sub-Q 26G Spritze luftblasenfrei in die Schwanzvene injiziert.

2.7 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des studentschen t-Test für ungepaarte Daten (GraphPad PRISM®, Version 5.00). Alle Daten sind als Mittelwerte ± SD (Standard Deviation = Standardabweichung) aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5 % liegt. Sie werden als hochsignifikant bezeichnet, sobald $p < 0,001$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 ERM-Proteine als Bindeglied zwischen LFA-1 und Zytoskelett

Für die LFA-1 vermittelte Migration von T-Zellen sind kontinuierlich morphologische Veränderungen notwendig. Das Aktomyosin-Zytoskelett verleiht der Zelle dabei Stabilität wie auch Flexibilität. Eine ständige Reorganisation von Aktin und Myosin sowie deren Kontraktion und Relaxation ermöglichen die Ausbildung von Lamellipodien am vorderen Ende und das Einziehen des Uropods am hinteren Ende der Zelle (Horwitz & Parsons, 1999). Bei der Deadhäsion einer wandernden Zelle am Uropod muss neben dem Zytoskelett auch die Interaktion von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 moduliert werden. Für beide Regulationen ist LFA-1 sowohl durch die „Outside-In"- als auch die „Inside-Out" Signaltransduktion über Aktin-bindende Proteine mit dem Zytoskelett verknüpft (vgl. Kapitel 1.2.3). Die Verbindung von LFA-1 an der Plasmamembran mit dem Aktomyosin-Zytoskelett ist somit essentiell für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration. ERM-Proteine binden im aktiven Zustand N-terminal an die Plasmamembran und C-terminal an Aktin (vgl. Kapitel 1.4.3). Diese Verknüpfung der Plasmamembran mit Aktin kann durch Inaktivierung der ERM-Proteine (durch Dephosphorylierung) wieder gelöst werden. Dadurch wird die Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts gewährleistet. Um eine mögliche Beteiligung von ERM-Proteinen an der Deadhäsion im Uropod zu überprüfen, wurde ihre Lokalisation in der wandernden T-Zelle untersucht. Des Weiteren wurde analysiert, ob ERM-Proteine als Interaktionspartner von LFA-1 ein Bindeglied zum Aktomyosin-Zytoskelett darstellen. Zusätzlich wurde der Einfluss der ERM-Aktivität auf die T-Zellmigration mit Hilfe verschiedener Ezrin-Expressionskonstrukte untersucht.

3.1.1 Lokalisation von ERM-Proteinen im Uropod wandernder T-Zellen

ERM-Proteine verbinden im aktiven (phosphorylierten) Zustand integrale Proteine der Plasmamembran mit dem Aktomyosin-Zytoskelett. Im inaktiven (dephosphorylierten) Zustand bilden sie durch intra- oder intermolekulare Interaktionen Homo-, Di- oder Oligomere aus und sind im Zytosol der Zelle lokalisiert (Tsukita & Yonemura, 1999). Ein ständiger Wechsel zwischen beiden Zuständen ermöglicht die für die Zellmigration essentielle Reorganisation des Zytoskeletts. ERM-Proteine könnten somit an der Vermittlung der Deadhäsion während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation der ERM-Proteine in wandernden T-Zellen untersucht. Dazu wurden murine, primäre T-Lymphoblasten auf eine mit ICAM-1 beschichtete Oberfläche gegeben. Innerhalb weniger Minuten erfolgte eine spontane, ungerichtete, LFA-1 vermittelte Migration der Zellen. Nach der Zellfixierung wurde die Lokalisation von Ezrin,

Moesin, CD44, phosphorylierten ERM-Proteinen (pERM) und LFA-1 in polarisierten T-Lymphoblasten durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Da Radixin in T-Zellen nicht exprimiert wird (vgl. Kapitel 1.4.1), wurde dieses hier und auch im Folgenden außer Acht gelassen.

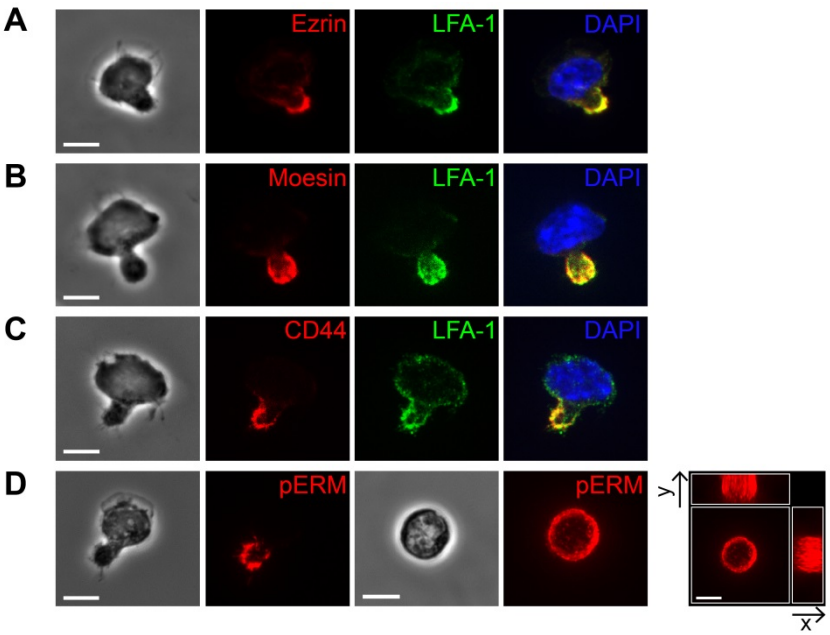

Abb. 3.1: Lokalisation von ERM-Proteinen im T-Zell-Uropod bei der LFA-1 vermittelten Migration. Immunfluoreszenzfärbung von **(A)** Ezrin, **(B)** Moesin, **(C)** CD44 und **(D)** pERM in T-Zellen, die auf ICAM-1 wanderten. pERM wurde zusätzlich in runden, nicht-polarisierten Zellen angefärbt **(D, rechts)**. Eine gelbe Färbung weist auf Kolokalisation der Proteine mit LFA-1 hin. Der Zellkern wurde durch DAPI sichtbar gemacht. Maßstabsbalken = 5 µm. Es ist jeweils eine repräsentative Zelle dargestellt (Färbungen n≥3). (A, B entnommen aus eigener Diplomarbeit: Fütterer, 2008)

Die in T-Zellen exprimierten ERM-Proteine Ezrin und Moesin waren ausschließlich im Uropod wandernder T-Zellen lokalisiert (Abb. 3.1 A, B). Sie kamen dort hauptsächlich membranassoziiert, aber auch zytosolisch vor. Ihre Lokalisation ist abhängig von ihrem Aktivitätszustand. Im aktiven, phosphorylierten Zustand binden sie an die Plasmamembran. Im inaktiven, dephosphorylierten Zustand befinden sie sich im Zytosol der Zelle. Beide ERM-Proteine kolokalisierten mit LFA-1, welches ebenfalls überwiegend im Uropod wandernder T-Zellen zu finden war (Abb. 3.1 A, B). Eine Verknüpfung von LFA-1 an der Plasmamembran mit dem Zytoskelett über ERM-Proteine war somit in Erwägung zu ziehen.

CD44 akkumuliert neben weiteren Adhäsionsmolekülen am Uropod von Leukozyten während deren Migration (Sanchez-Madrid & del Pozo, 1999). In polarisierten T-Zellen befand sich CD44 ausschließlich im Uropod und markierte dort die Deadhäsionsregion (Abb. 3.1 C). Wie bereits beschrieben, binden ERM-Proteine an die zytoplasmatische Region von CD44. ERM-

Proteine könnten also durch ihre Interaktion mit CD44 an das hintere Ende der Zelle rekrutiert werden.

In ihrer phosphorylierten, aktiven Form waren ERM-Proteine ebenfalls im Uropod wandernder T-Zellen zu finden (Abb. 3.1 D). Ihre Lokalisation dort deutete darauf hin, dass sie exklusiv mit der Plasmamembran assoziiert waren und nicht im Zytosol der Zelle vorlagen. Integrale Membranproteine wie LFA-1 (neben CD44) könnten in der Deadhäsionsregion über aktive ERM-Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft werden. Für dessen Reorganisation wäre damit die Regulation der ERM-Aktivität von entscheidender Bedeutung. Durch Inaktivierung der ERM-Proteine könnte die Verbindung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett wieder gelöst werden.

Im Gegensatz zur polarisierten Lokalisation in wandernden T-Zellen waren phosphorylierte ERM-Proteine in runden Zellen gleichmäßig über den gesamten Zellkortex verteilt (Abb. 3.1 D, rechts). Während der Polarisierung der Zellen und ihrer Wanderung auf ICAM-1 wurde pERM damit in den Uropod relokalisiert. Diese Relokalisation könnte durch ein LFA-1 vermitteltes Signal nach Bindung an ICAM-1 während der Migration ausgelöst werden. Alternativ induzieren intrazelluläre Signale, die durch die Morphologieänderung ausgelöst wurden, die Rekrutierung von pERM in die Deadhäsionsregion der T-Zelle.

Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ERM-Proteine intrazelluläre Signale ans Zytoskelett weiterleiten und so die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration kontrollieren.

3.1.2 Keine direkte Interaktion von LFA-1 mit ERM-Proteinen

Talin und Kindlin-3 besitzen wie ERM-Proteine eine FERM-Domäne (Rees et al., 1990; Kloeker et al., 2004), über die sie an die zytoplasmatische Region von β2-Integrinen binden (Calderwood et al., 1999; Moser et al., 2009a). Eine direkte Interaktion von ERM-Proteinen über ihre FERM-Domäne mit LFA-1 wäre demnach möglich. Insbesondere, da ERM-Proteine mit LFA-1 im Uropod wandernder T-Zellen kolokalisiert waren.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Immunpräzipitation von endogenem LFA-1 in Zelllysaten muriner, primärer T-Lymphoblasten mit einem αL-spezifischen Antikörper durchgeführt. Bei Präzipitation der αL-Kette wurde auch immer die β2-Kette und damit das gesamte LFA-1 Molekül präzipitiert (Daten nicht gezeigt). Im Immunoblot wurde anschließend mit spezifischen Antikörpern überprüft, ob Ezrin und Moesin mit LFA-1 kopräzipitiert wurden.

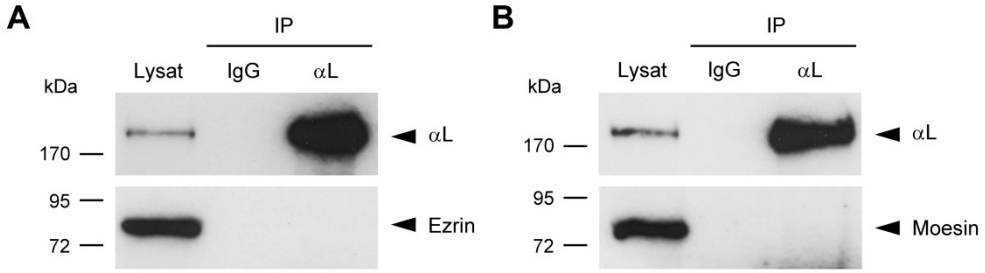

Abb. 3.2: Keine direkte Interaktion von LFA-1 mit Ezrin oder Moesin.
Es wurde eine Immunpräzipitation von endogenem LFA-1 mit einem αL-spezifischen Antikörper [M17/4] und Ratten IgG als Isotyp-Kontrollantikörper in Lysaten muriner, primärer T-Lymphoblasten durchgeführt. Präzipitiertes αL (180 kDa) wurde im Immunoblot durch ein αL spezifisches Antiserum nachgewiesen und eine Kopräzipitation von **(A)** Ezrin (81 kDa) und **(B)** Moesin (78 kDa) mit Hilfe entsprechender Antikörper getestet. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (n=3).

Weder Ezrin noch Moesin konnte mit LFA-1 kopräzipitiert werden (Abb. 3.2). Beide scheinen in murinen T-Lymphoblasten weder an die β2- noch an die αL-Kette von LFA-1 zu binden. Eine direkte Interaktion von ERM-Proteinen mit LFA-1 über ihre FERM-Domäne konnte damit ausgeschlossen werden. Für eine Signalweiterleitung von LFA-1 hin zum Zytoskelett müssen weitere Signalmoleküle zwischen LFA-1 und ERM-Proteine geschaltet sein.

3.1.3 Einfluss von konstitutiv aktivem Ezrin auf die T-Zellmigration

ERM-Proteine befinden sich während der LFA-1 vermittelten Migration auf ICAM-1 exklusiv im Uropod wandernder T-Zellen. Sie liegen dort größtenteils membranassoziiert (aktiv), aber auch zytosolisch (inaktiv) vor. Es wird hier die Hypothese aufgestellt, dass durch den ständigen Wechsel vom aktiven in den inaktiven Zustand und umgekehrt ERM-Proteine wesentlich zur Flexibilität des Zytoskeletts bei der Deadhäsion beitragen. Des Weiteren wird postuliert, dass wenn der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität von ERM-Proteinen nicht exakt reguliert werden, das Zytoskelett dauerhaft kontrahiert oder relaxiert. Eine defekte Migration wäre die Folge. Mit Hilfe verschiedener Expressionskonstrukte von Ezrin sollte der Effekt von konstitutiv aktivem und inaktivem Ezrin auf die T-Zellmigration untersucht werden.

3.1.3.1 Konstitutiv aktives Ezrin im Uropod wandernder T-Zellen

Um die Bedeutung der flexiblen ERM-Aktivitätsregulation für die T-Zellmigration zu untersuchen, sollten T-Zellen mit verschiedenen Ezrin-Expressionskonstrukten transfiziert und ihre Migration auf ICAM-1 analysiert werden. Zunächst wurde die Lokalisation der von den Konstrukten kodierten Proteine in wandernden T-Zellen ermittelt. Zu den Expressionskonstrukten zählten Ezrin-wt, Ezrin-T567/A und Ezrin-T567/D (Abb. 3.3 A). Das Ezrin-wt-Konstrukt kodierte humanes, wildtypisches Ezrin: abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus liegt es im inaktiven oder aktiven Zustand vor. Des Weiteren wurde eine Ezrin-T567/A-Mutante verwendet. Bei dieser wurde der Threoninrest (T) an Position 567 durch Alanin (A) ersetzt. Dadurch kann Ezrin nicht mehr am Threonin 567 phosphoryliert werden. Die Mutante rekapituliert damit dephosphoryliertes, konstitutiv inaktives Ezrin. Bei der Ezrin-T567/D-Mutante wurde der Threoninrest (T) durch Asparaginsäure (D) ersetzt. Diese ahmt durch ihre negative Ladung eine Phosphorylierung an dieser Position nach. Das kodierte Ezrin-T567/D-Protein imitiert damit phosphoryliertes, konstitutiv aktives Ezrin. Eine Inaktivierung durch „Dephosphorylierung“ dieses Ezrins ist nicht möglich. An ihrem N-Terminus waren alle drei Konstrukte mit GFP oder VSV-G als Fusionsprotein markiert.

Die Sequenzen von humanem und murinem Ezrin weisen eine Homologie von 96,6 % auf (UniProt Alignment humanes Ezrin P15311 – murines Ezrin P26040). Antikörper, die gegen humanes Ezrin gerichtet sind, binden daher auch murines Ezrin. Des Weiteren war bei einer Transfektion der humanen Ezrin-Konstrukte in murine T-Zellen davon auszugehen, dass die Konstrukte funktionell exprimiert werden würden. Die Expression und Lokalisation der Konstrukte wurden durch eine Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Murine T-Lymphomzellen (TK1-Zellen) wurden mit den GFP-markierten Expressionskonstrukten transfiziert; T-Lymphoblasten mit den VSV-G-markierten Konstrukten. Am darauffolgenden Tag wurden die transfizierten Zellen auf eine ICAM-1 beschichtete Oberfläche gegeben, auf der sie polarisierten und schließlich wanderten. Die transfizierten Konstrukte wurden durch ihr Fusionsprotein GFP oder durch einen VSV-G-spezifischen Antikörper in der polarisierten Zelle sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Ezrin-spezifischen Antikörpers transfiziertes wie auch endogenes Ezrin angefärbt.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.3 B zeigen, dass das pEGFP-N1 Kontrollplasmid im Zytosol der Zelle zu finden war. Endogenes Ezrin war wie zuvor zytosolisch und membranassoziiert im Uropod der Zelle lokalisiert, repräsentativ für die inaktive wie aktive Form von Ezrin. Es kam wie erwartet zu keiner spezifischen Überlagerung des exprimierten pEGFP-N1 mit endogenem Ezrin.

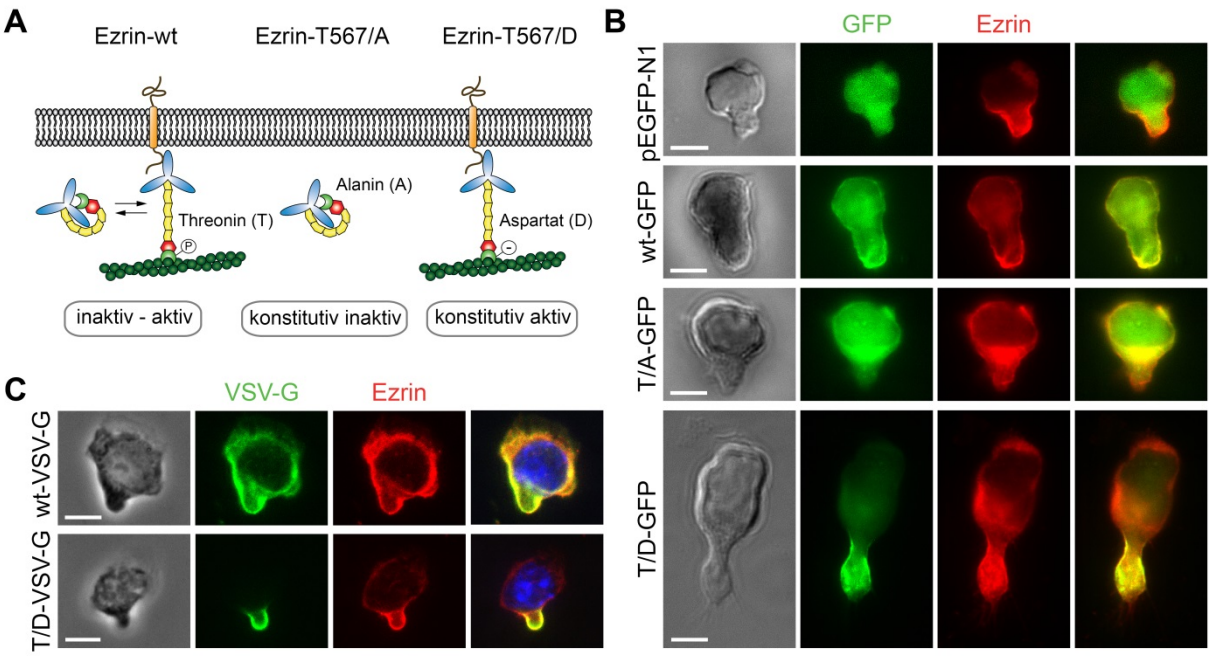

Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Ezrin-Konstrukte und ihre Lokalisation während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration.
(A) Die Expressionskonstrukte von Ezrin repräsentierten Wildtyp-Ezrin (Ezrin-wt), konstitutiv inaktives Ezrin (EzrinT567/A) und konstitutiv aktives Ezrin (EzrinT567/D). N-terminal waren die Konstrukte entweder mit GFP oder VSV-G markiert. **(B)** TK1-Zellen wurden mit den GFP-markierten Ezrinkonstrukten oder dem pEGFP-N1 Plasmid (als Kontrolle) transfiziert**. (C)** T-Lymphoblasten wurden mit den VSV-G-markierten Konstrukten transfiziert. Mit Hilfe von Ezrin- und VSV-G-spezifischen Antikörpern wurden transfiziertes wie auch endogenes Ezrin und das VSV-G-Fusionsprotein in den auf ICAM-1 wandernden, transfizierten Zellen detektiert. Eine Überlagerung des jeweiligen Fusionsproteins mit Ezrin ist an einer Gelb-Färbung zu erkennen. Der Zellkern wurde durch DAPI sichtbar gemacht. Maßstabsbalken = 5 µm. Es ist jeweils eine repräsentative Zelle dargestellt (Färbungen n≥3).

Das Ezrin-wt-Konstrukt war unabhängig von seinem Fusionsprotein (GFP oder VSV-G) sowohl zytosolisch als auch in Membrannähe lokalisiert (Abb. 3.3 B, C). In seiner aktiven Form, d.h. assoziiert mit der Plasmamembran, findet man es überwiegend im Uropod der Zelle. In seiner inaktiven Form dagegen findet man es im Zytoplasma der gesamten Zelle, nicht mehr nur im Uropod. Betrachtet man die Lokalisation von Ezrin, unabhängig davon, ob endogenes oder transfiziertes, findet man dieses in TK1-Zellen verstärkt im Uropod. In T-Lymphoblasten findet man auch viel Ezrin in den Lamellipodien der wandernden Zelle. Ursache hierfür könnten die durch die Transfektion stark erhöhten Ezrin-Mengen in der Zelle sein.
Konstitutiv inaktives Ezrin, welches durch das Ezrin-T567/A-GFP-Konstrukt kodiert wird, sammelte sich wie erwartet ausschließlich im Zytosol an (Abb. 3.3 B). Bei Überlagerung des GFP-Signals mit der Ezrin-Färbung konnte lediglich membranassoziiertes, endogenes Ezrin am Uropod identifiziert werden. Konstitutiv aktives Ezrin (= Ezrin-T567/D) akkumulierte dagegen ausnahmslos in Membrannähe im Uropod der Zelle (Abb. 3.3 B, C). Die Färbung

mit einem anti-Ezrin-Antikörper lieferte eine partielle Kolokalisation mit GFP bzw. VSV-G. Zusätzlich erschien endogenes Ezrin zytosolisch vorne in der Zelle, wo es vermutlich inaktivem Ezrin entsprach. Zellen, die große Mengen an konstitutiv aktivem Ezrin in ihrem Uropod aufwiesen, zeigten teilweise eine veränderte Morphologie (Abb. 3.3 B). Sie waren am hinteren Ende der Zelle stark elongiert. Ein derartiger Phänotyp weist darauf hin, dass die Deadhäsion von der ICAM-1 beschichteten Oberfläche defekt oder stark vermindert war.
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ezrin-Konstrukte bei Transfektion in murine T-Zellen funktional waren. Die Lokalisation von konstitutiv aktivem Ezrin (T567/D) stimmte mit der Lokalisation von aktivem, phosphorylierten Ezrin überein (vgl. Abb. 3.1 D): beide sammelten sich membranassoziiert im Uropod wandernder T-Zellen an. Diese Akkumulation aktiven Ezrins könnte darauf hinweisen, dass der ERM-Aktivitätsstatus eine Rolle während der Deadhäsion spielt. Besonders da die starke Expression von konstitutiv aktivem Ezrin zu einer elongierten Morphologie führte. Um dies genauer zu analysieren, sollte im Folgenden der Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die LFA-1 abhängige T-Zellmigration untersucht werden.

3.1.3.2 Der Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die T-Zellmigration

Eine kontinuierliche Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts ist eine Grundvoraussetzung für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration. ERM-Proteine fungieren als Verbindungsglied zwischen integralen Membranproteinen und dem Zytoskelett (Mangeat et al., 1999). Die veränderte Morphologie bei Expression von konstitutiv aktivem Ezrin (T567/D) in T-Zellen (vgl. Abb. 3.3 B) weist darauf hin, dass insbesondere der Aktivitätszustand der ERM-Proteine für die T-Zellmigration von Bedeutung ist. Daher sollte untersucht werden, inwiefern die Regulation der ERM-Aktivität für eine funktionale T-Zellmigration relevant ist.
Murine, primäre T-Lymphoblasten wurden mit den bereits zuvor verwendeten Ezrin-Expressionskonstrukten transfiziert (vgl. Abb. 3.3 A). Es wurden die VSV-G-fusionierten Konstrukte verwendet. Denn die Migration von T-Zellen auf ICAM-1 war nach Transfektion mit GFP stark beeinträchtigt, so dass ein Effekt der Ezrin-Konstrukte nicht untersucht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Beeinträchtigung der Migration konnte sowohl mit den GFP-fusionierten Ezrin-Konstrukten, als auch mit dem pEGFP-N1 Kontrollplasmid beobachtet werden. Des Weiteren war die Störung der Migration durch GFP unabhängig von Zellart und Transfektionsmethode. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Masse von 26,9 kDa (Prasher et al., 1992). VSV-G besteht dagegen lediglich aus den elf C-terminalen Aminosäuren des VSV-Glykoproteins (Algrain et al., 1993), welche einer Masse von etwa 1,3 kDa entsprechen (1 Aminosäure ≈ 120 Da). Bereits geringe Mengen an GFP (bei Transfektion von 0,5 µg pEGFP-N1) störten die T-Zellmigration erheblich (Daten nicht gezeigt). Demnach könnten die Moleküle an sich und / oder phototoxische Effekte des GFP-

Proteins die Migration verhindern. Die T-Zellmigration war bei Transfektion mit VSV-G als Fusionsprotein nicht beeinträchtigt. Der Effekt der Ezrin-Konstrukte auf die T-Zellmigration konnte deshalb nur mit den VSV-G-fusionierten Konstrukten analysiert werden. Damit konnte allerdings in der Videomikroskopie nicht zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen differenziert werden. In die Analyse sind demnach auch Daten untransfizierter Zellen mit eingeflossen.

Der Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die T-Zellmigration sollte im Vergleich zu wildtypischem Ezrin untersucht werden. Dazu wurde mittels Zeitraffer-Videomikroskopie die LFA-1 vermittelte Migration von Zellen aufgenommen, die mit Ezrin-wt-VSV-G bzw. Ezrin-T567/D-VSV-G transfiziert waren. Die Expression der Ezrin-Konstrukte in den transfizierten T-Lymphoblasten konnte im Immunoblot durch Detektion von VSV-G auf Höhe des Ezrin-Molekulargewichts von 81 kDa bestätigt werden (Abb. 3.4 A). Als Kontrolle dienten mock-transfizierte und untransfizierte Zellen. In diesen wurde wie erwartet kein VSV-G detektiert. Nach Transfektion der Zellen mit den jeweiligen Ezrin-Konstrukten blieb die Gesamtmenge an Ezrin gleich (verglichen mit „mock“-transfizierten Zellen) oder nahm sogar geringfügig ab (verglichen mit untransfizierten Zellen). Die Expression von endogenem Ezrin scheint also bei Transfektion mit zusätzlichem Ezrin herabreguliert zu werden. Die Gesamtmenge an Ezrin bleibt in etwa unverändert.

Die Quantifizierung der Zellmigration erfolgte durch Bestimmung der mittleren Wanderungsgeschwindigkeit einzelner Zellen mit Hilfe des „Cell Tracking“ Moduls von AxioVision. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den durchschnittlichen Geschwindigkeiten der verschiedenen Zellen zu erkennen (Abb. 3.4 B). „Mock“-transfizierte Zellen wanderten im Durchschnitt mit einer Einzelzellgeschwindigkeit von 15,7 µm/min (± 3,7). Die mittlere Geschwindigkeit der Ezrin-wt-transfizierten Zellen lag durchschnittlich bei 17,1 µm/min (± 3,9), die der Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen bei 17,0 µm/min (± 5,2). Allerdings zeigten die Messwerte der Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen eine größere Streubreite als die der mock- und Ezrin-wt-transfizierten Zellen. Mit einer Geschwindigkeit von über 25 µm/min wanderten anteilig in allen Ansätzen gleich viele Zellen (4-7 %). Jedoch wiesen 15 % der Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin eine deutlich verringerte Wanderungsgeschwindigkeit von unter 10 µm/min auf. In mock- und Ezrin-wt-transfizierten Zellen fand man keine derartigen Zellen. Diese langsam-wandernden Zellen im Ezrin-T567/D-Ansatz repräsentierten eine kleine Population von Zellen, die mengenmäßig der erwarteten Transfektionseffizienz entsprachen. Bei diesen Zellen könnte es sich also um transfizierte Zellen handeln, die aufgrund des konstitutiv aktiven Ezrin sehr niedrige Wanderungsgeschwindigkeiten aufwiesen.

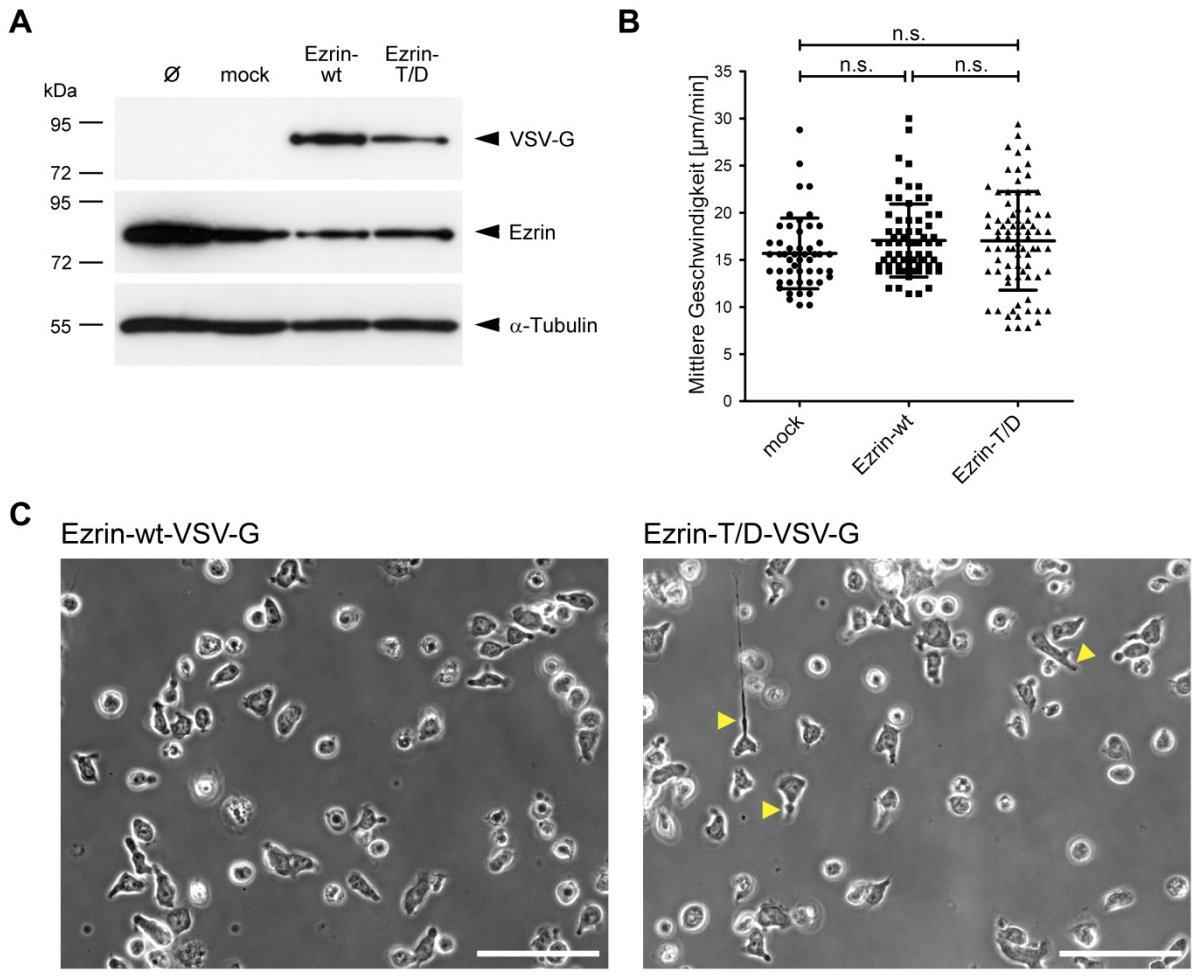

Abb. 3.4: Defekte Deadhäsion von Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin.
Murine, primäre T-Lymphoblasten wurden mit Ezrin-wt-VSV-G bzw. Ezrin-T567/D-VSV-G transfiziert. **(A)** Die Transfektion wurde im Immunoblot durch Detektion von VSV-G bestätigt. Als Kontrollen dienten mock-transfizierte (mock) sowie untransfizierte Zellen (ø). Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa). Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (n=2). **(B)** In einer Zeitraffer-Videomikroskopie wurde die Migration der transfizierten Zellen auf ICAM-1 analysiert: es sind die mittleren Geschwindigkeiten von mock- (n=50), Ezrin-wt- (n=70) und Ezrin-T567/D- (n=80) transfizierten Zellen dargestellt. **(C)** Einzelbildaufnahmen der Videos. Gelbe Pfeilspitzen markieren Zellen mit stark elongiertem Uropod. Maßstabsbalken = 50 µm.

Tatsächlich zeigten einige der Zellen des Ezrin-T567/D-Ansatzes stark verlängerte Uropoden (Abb. 3.4 C). Die Deadhäsion von ICAM-1 war in diesen Zellen offensichtlich gestört, was eine stark verminderte Geschwindigkeit zur Folge hatte. Derartige Phänomene waren in den Videos der mock- oder Ezrin-wt-transfizierten Zellen zu keiner Zeit zu beobachten. Bei diesen elongierten, langsam-wandernden Zellen könnte es sich demnach um Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin handeln. Eine eindeutige Quantifizierung des Effekts war aufgrund der Vermischung mit zahlreichen untransfizierten, normal-wandernden Zellen nicht möglich.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Regulation der ERM-Aktivität essentiell für eine LFA-1 vermittelte T-Zellmigration ist. Die Resultate unterstützen somit die Hypothese, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiven, phosphorylierten und inaktiven, dephosphorylierten ERM-Proteinen zu einer defekten Deadhäsion und damit gestörten Migration von T-Zellen führt.

3.1.3.3 Keine Beeinflussung der LFA-1 Affinität durch konstitutiv aktives Ezrin

T-Zellen, die mutantes Ezrin-T567/D exprimierten, schienen während der LFA-1 vermittelten Migration verlängerte Uropoden sowie verminderte Wanderungsgeschwindigkeiten aufzuweisen (vgl. Kapitel 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Beide Beobachtungen lassen vermuten, dass die Deadhäsion der Zellen von ICAM-1 aufgrund des konstitutiv aktiven Ezrins beeinträchtigt war. Eine defekte Deadhäsion könnte auf eine gestörte Reorganisation des Zytoskeletts oder aber auf eine erhöhte Adhäsion der T-Zellen an ICAM-1 zurückgeführt werden. Um Letzteres zu überprüfen, sollte der Einfluss der ERM-Aktivität auf die LFA-1 Avidität hinsichtlich dessen Konformation untersucht werden.

Dazu wurden HSB-2 Zellen (humane T-Zell-Leukämie Zelllinie) mit Ezrin-wt-GFP bzw. Ezrin-T567/D-GFP transfiziert. Die Verwendung der GFP-fusionierten Konstrukte war notwendig, um transfizierte Zellen in der Durchflußzytometrie von untransfizierten Zellen unterscheiden zu können. Mit Hilfe des konformationsspezifischen anti-CD18 Antikörpers „mAb24“ (monoklonaler Antikörper 24) konnte hoch-affines LFA-1 auf den transfizierten Zellen detektiert werden. Um die Gesamtmenge an LFA-1 unabhängig von seiner Konformation anzufärben, wurde der spezifische anti-CD11a Antikörper „mAb38“ (monoklonaler Antikörper 38) verwendet. Da beide Antikörper spezifisch nur humanes LFA-1 erkennen, wurden humane T-Zellen benutzt. Die Versuchsbedingungen wurden hierbei so gewählt, dass ausschließlich LFA-1 Moleküle auf der Zelloberfläche detektiert wurden.

Durch Stimulation der Zellen mit $MgCl_2$ und EGTA wurde eine Konformationsänderung von LFA-1 induziert (vgl. Kapitel 1.2.2). Die Affinität von LFA-1 für seinen Liganden ICAM-1 stieg, und damit auch die Menge an hoch-affinem LFA-1 auf der Zelloberfläche (Abb. 3.5 A). Im Vergleich zwischen Ezrin-wt-transfizierten und Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen war die Expression von hoch-affinem LFA-1 auf unstimulierten Zellen nahezu identisch (Abb. 3.5 A, Überlagerung). Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) der mAb24-Färbung betrug bei Ezrin-wt-transfizierten Zellen 21,7, bei Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen 19,9. Auch nach $MgCl_2$/EGTA-Stimulation war die Menge an hoch-affinem LFA-1 zwischen Zellen mit Ezrin-wt und Zellen mit Ezrin-T567/D vergleichbar (Abb. 3.5 A, Überlagerung). Der MFI lag bei 598 in Ezrin-wt-transfizierten Zellen und bei 486 in Erzin-T567/D-transfizierten Zellen.

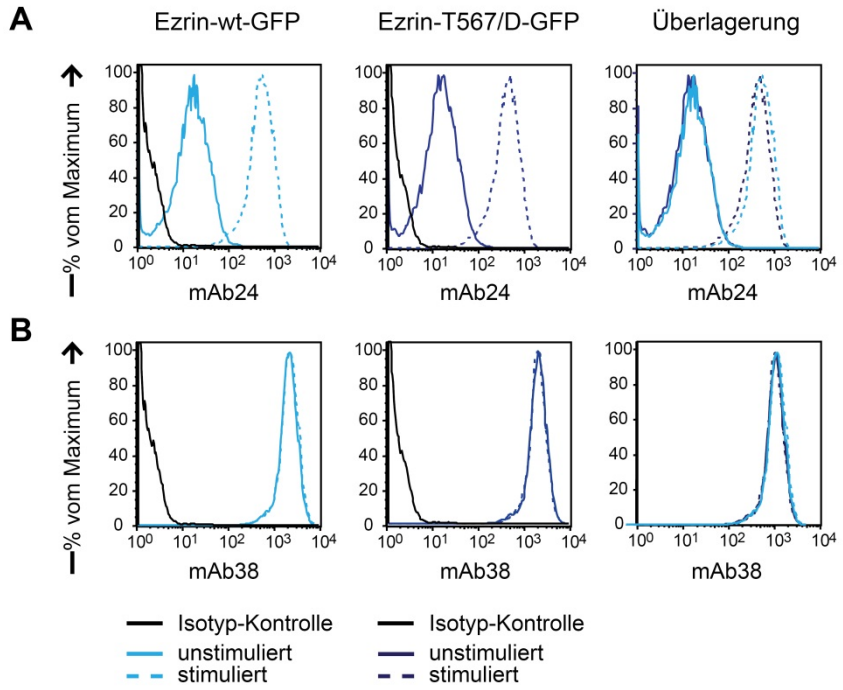

Abb. 3.5: Kein Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die LFA-1 Konformation.
HSB-2 Zellen wurden mit Ezrin-wt-GFP bzw. Ezrin-T567/D-GFP transfiziert. Mittels Durchfluß-zytometrie wurde die Expression von **(A)** hoch-affinem LFA-1 (durch mAb24) und **(B)** gesamten LFA-1 (durch mAb38) auf GFP-positiven Zellen bestimmt (Transfektionsrate Ezrin-wt-GFP = 58 %; Ezrin-T567/D-GFP = 50 %). Als Isotyp-Kontrollantikörper diente Maus IgG1. Durch Stimulation der Zellen mit 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA wurde hoch-affines LFA-1 induziert („stimuliert"). Es sind repräsentative FACS-Histogramme dargestellt (n=3).

Die Menge der gesamten LFA-1 Moleküle auf der Oberfläche, unabhängig von deren Affinitätsstatus, blieb nach Stimulation mit $MgCl_2$ und EGTA wie erwartet unverändert (Abb. 3.5 B). Auch im Vergleich zwischen Ezrin-wt- und Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen war kein Unterschied erkennbar (Abb. 3.5 B, Überlagerung). Der MFI-Wert der mAb38-Färbung war mit 2277 bei Ezrin-wt-transfizierten Zellen im unstimulierten Zustand (stimuliert = 2395) vergleichbar mit dem MFI-Wert von 2129 bei Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen (stimuliert = 2164).

Die Expression von konstitutiv aktivem Ezrin in T-Zellen hatte demnach keinen messbaren Einfluss auf die Menge an LFA-1 Molekülen auf der Zelloberfläche. Auch die Induktion von hoch-affinem LFA-1 durch $MgCl_2$-Stimulation war nicht beeinträchtigt. Ein Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die Konformation von LFA-1 und damit auf dessen Aktivität konnte ausgeschlossen werden. Die defekte Deadhäsion in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin beruhte damit nicht auf einer veränderten LFA-1 Aktivität. Die beobachtete Beeinträchtigung der Migration könnte durch die fehlerhafte Reorganisation des Zytoskeletts aufgrund einer kontinuierlichen Assoziation von Plasmamembran und Zytoskelett über konstitutiv aktives Ezrin erklärt werden.

3.2 PP1/PP2A als spezifische ERM-Phosphatasen

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation der Phosphorylierung am Threoninrest 567/558 und damit die Aktivität von Ezrin/Moesin bei der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration eine wichtige Rolle spielen. Ist das Gleichgewicht zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter Form von ERM-Proteinen gestört, scheinen eine defekte Deadhäsion und damit gestörte Migration die Folgen zu sein. Phosphatasen und Kinasen regulieren den Phosphorylierungsstatus am konservierten Threoninrest der ERM-Proteine. Wie in Kapitel 1.4.3 ausgeführt, sind bereits einige ERM-Kinasen aus der Literatur bekannt. Spezifische Phosphatasen von ERM-Proteinen sind dagegen bislang weitestgehend unbekannt. Eine Calyculin A-sensitive Phosphatase gilt als möglicher Kandidat für die Dephosphorylierung des konservierten Threoninrestes in ERM-Proteinen (Brown et al., 2003). Calyculin A ist ein zytotoxisches Polyketid, ursprünglich isoliert aus dem marinen Schwamm *Discodermia calyx* (Kato et al., 1986). Es bindet kompetitiv an die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 (Protein Phosphatase 1) und PP2A (Protein Phosphatase 2A) und blockiert deren Aktivität (Fagerholm et al., 2010). Es sollte hier überprüft werden, ob die Kandidaten PP1 und PP2A ERM-Proteine dephosphorylieren können. Als Regulatoren der ERM-Aktivität könnten sie Signale von LFA-1 an der Plasmamembran zu ERM-Proteinen und damit zum Zytoskelett weiterleiten. Die Reorganisation des Zytoskeletts als essentieller Schritt der Deadhäsion könnte so während der LFA-1 abhängigen T-Zellmigration vermittelt werden.

3.2.1 Inhibierung der ERM-Dephosphorylierung durch Calyculin A und Okadainsäure

Wie bereits erwähnt, gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass Calyculin A-sensitive Phosphatasen ERM-Proteine dephosphorylieren. Es konnte gezeigt werden, dass Calyculin A die SDF1α induzierte Dephosphorylierung von ERM blockiert (Brown et al., 2003). Des Weiteren konnten Fukata und Kollegen eine Interaktion der Myosinphosphatase (bestehend aus PP1 und der Myosin-bindenden Untereinheit MBS) mit Moesin nachweisen (Fukata et al., 1998). Deshalb wurde im Immunoblot überprüft, ob die Behandlung von T-Zellen mit den PP1/PP2A Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure einen Einfluss auf den ERM-Phosphorylierungsstatus hat. Okadainsäure ist wie Calyculin A ein zytotoxisches Polyketid, das ursprünglich aus dem marinen Schwämmen *Halicondria okadai* und *Halicondria melanodocia* isoliert wurde (Tachibana et al., 1981). Okadainsäure soll eine stärkere Selektivität gegenüber PP2A zeigen, wohingegen Calyculin A selektiv eher PP1 hemmt (Gupta et al., 1997). Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit Staurosporin behandelt. Staurosporin ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporius,* das vor allem die Protein Kinase C (PKC) hemmt (Tamaoki et

al., 1986). Weitere Kinasen, die von Staurosporin inhibiert werden, sind: cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA), Phosphorylase Kinase, ribosomale Protein S6 Kinase und Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (Ca/CaM PKII) (Meggio et al., 1995).

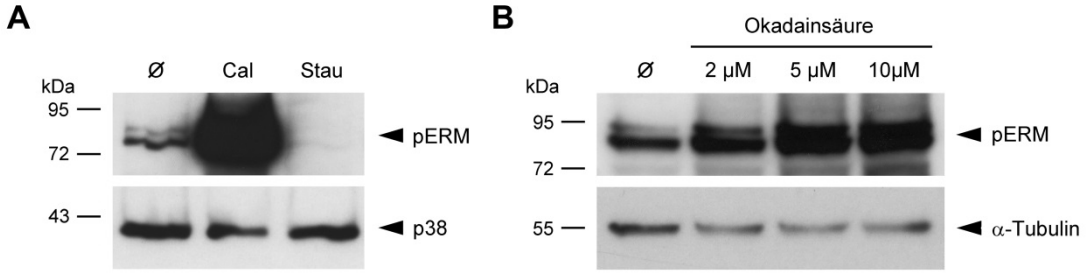

Abb. 3.6: Calyculin A und Okadainsäure inhibieren die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen. Primäre, murine T-Lymphoblasten wurden **(A)** mit 50 nM Calyculin A (Cal) und 500 nM Staurosporin (Stau) für 5 min sowie **(B)** mit Okadainsäure für 30 min behandelt. Anschließend wurden phosphorylierte ERM-Proteine (pEzrin/pMoesin, 78/81 kDa) im Zelllysat mittels Immunoblot detektiert. Ladekontrolle = p38 (38 kDa) bzw. α-Tubulin (55 kDa). ø = unbehandelte Zellen. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=2).

Durch Behandlung mit Calyculin A stieg die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen in T-Lymphoblasten sehr stark an (Abb. 3.6 A). Ebenso nahm das Phosphorylierungsniveau nach Behandlung der Zellen mit Okadainsäure konzentrationsabhängig stark zu (Abb. 3.6 B). Wurden PP1 und PP2A demnach in ihrer Aktivität blockiert, war die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen gehemmt. Da die Phosphorylierung durch die Kinase nicht beeinträchtigt war, stieg der Spiegel an phosphorylierten ERM-Proteinen. Wurde dagegen die Aktivität der Kinasen und damit die Phosphorylierung durch PKC mit Hilfe von Staurosporin blockiert, nahm das ERM-Phosphorylierungsniveau stark ab (Abb. 3.6 A). Der Grund dafür war vermutlich die anhaltende Dephosphorylierung durch ERM-Phosphatasen.

Diese Resultate lassen vermuten, dass die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und / oder PP2A als Antagonisten der ERM-Kinasen fungieren könnten. Da die verwendeten Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure beide Phosphatasen in ihrer Aktivität blockieren, könnten beide Phosphatasen, oder nur eine von beiden, ERM-Proteine direkt oder indirekt dephosphorylieren. Der Phosphorylierungsstatus und damit die ERM-Aktivität könnten so gezielt reguliert werden.

3.2.2 Direkte ERM-Dephosphorylierung durch PP1 und PP2A

Die Inhibierung der Phosphatasen PP1 und PP2A durch Calyculin A und Okadainsäure hatte einen starken Effekt auf den Phosphorylierungsstatus der ERM-Proteine. Dies gibt einen indirekten Hinweis darauf, dass PP1 und / oder PP2A ERM-Proteine dephosphorylieren. Um deshalb zu überprüfen, ob PP1 oder PP2A als direkte Phosphatasen von ERM-Proteinen in T-Zellen fungieren, wurden aktive, rekombinante PP1- und PP2A-Enzyme auf T-Zelllysate gegeben und ihr Einfluss auf die ERM-Phosphorylierung im Immunoblot durch spezifische Detektion von pERM analysiert.

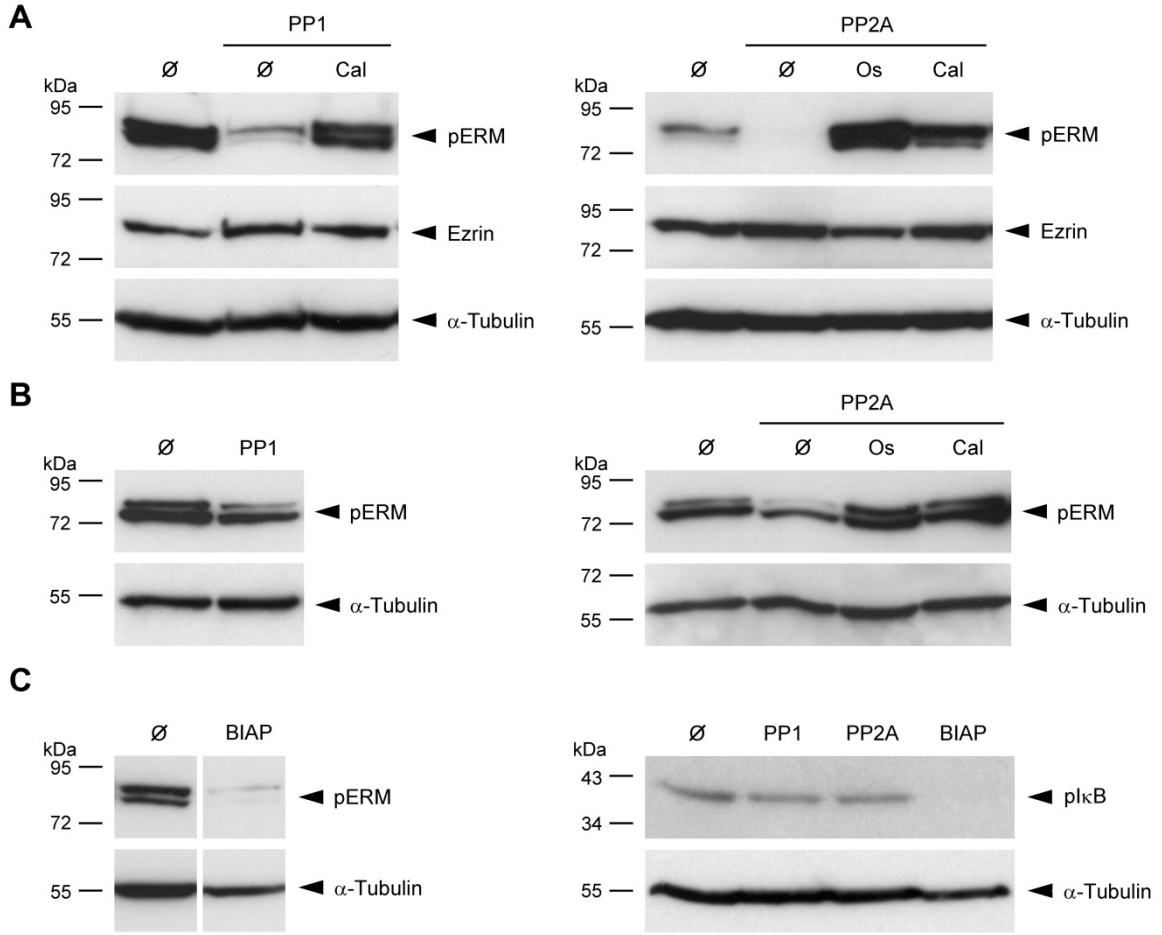

Abb. 3.7: PP1 und PP2A dephosphorylieren ERM-Proteine spezifisch.
Aufgereinigte PP1 bzw. PP2A wurden zu Zelllysaten von **(A)** TK1-Zellen bzw. **(B)** murinen, naiven T-Zellen gegeben und der Effekt auf pEzrin/pMoesin (78/81 kDa) im Immunoblot analysiert. Durch Zugabe von 50 nM Calyculin A (Cal) bzw. 2 µM Okadainsäure (Os) wurde die Aktivität der Phosphatasen geblockt. **(C)** Die Spezifität der Dephosphorylierung wurde durch Verwendung der unspezifischen Phosphatase BIAP („bovine intestine alkaline phosphatase“) und durch Detektion von phospho-IκB (Ser32) (40 kDa) kontrolliert. Ladekontrolle = Ezrin (81 kDa) bzw. α-Tubulin (55 kDa). ø = unbehandelte Zellen. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (n≥3).

Nach Zugabe der Phosphatasen PP1 oder PP2A war die Menge an pERM in TK1-Zellen sehr stark, in naiven T-Zellen deutlich verringert (Abb. 3.7 A, B). Dies war ein eindeutiger Nachweis dafür, dass PP1 und PP2A ERM-Proteine direkt dephosphorylieren. Wurden zusätzlich zu den aufgereinigten Enzymen die Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure hinzugefügt, konnte der Effekt aufgehoben werden (Abb. 3.7 A, B). Die pERM-Menge stieg wieder auf Normalniveau an, teilweise sogar über dieses hinaus. Die Ursache hierfür war vermutlich, dass durch Calyculin A und Okadainsäure neben den zugegebenen rekombinanten Phosphatasen auch endogene PP1 und PP2A blockiert wurden. Dadurch konnten auch diese ERM-Proteine nicht mehr dephosphorylieren. Die Spezifität der ERM-Dephosphorylierung durch PP1 und PP2A wurde dadurch bestätigt, dass die Serin/Threonin Phosphatasen keinen Effekt auf ein weiteres phosphoryliertes Protein hatten, nämlich phospho-IκB (Abb. 3.7 C). Eine unspezifische Dephosphorylierung sowohl von pERM als auch von pIκB wurde bei Zugabe von Alkaliner Phosphatase aus dem Rinderdarm (BIAP) beobachtet (Abb. 3.7 C).

Damit wurden die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2A zum ersten Mal als Phosphatasen von ERM-Proteinen in T-Zellen identifiziert. Gemeinsam mit Kinasen regulieren sie den Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität der ERM-Proteine. Aufgrund bisheriger Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass diese Regulation eine wichtige Rolle bei der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration spielt. PP1 und PP2A als Regulatoren der ERM-Aktivität bilden damit ein potentielles Verbindungsglied zwischen LFA-1 und ERM-Proteinen. Sie könnten so wesentlich an der Vermittlung der Zytoskelett-Reorganisation während der T-Zellmigration beteiligt sein.

3.2.3 PP1 und PP2A als Holoenzyme verschiedener Untereinheiten in T-Zellen

Serin/Threonin Protein Phosphatasen bestehen als Holoenzyme aus einer katalytischen und einer oder zwei regulatorischen Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten sind hoch konserviert. Sie besitzen ähnliche dreidimensionale Strukturen und katalysieren analoge chemischen Reaktionen (Larsen et al., 2003; Shi, 2009). In Säugetieren existieren drei *PP1c* Gene, die vier verschiedene katalytische Untereinheiten von PP1 (PP1 C) kodieren: PP1α, PP1β/δ und die beiden Spleißvarianten PP1γ1 und PP1γ2. Diese bilden mit mehr als 50 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten Holoenzyme aus (Cohen, 2002). Die regulatorischen Untereinheiten können sowohl inhibitorisch als auch aktivierend wirken; oder die Spezifität der Reaktion definieren, indem sie die subzelluläre Lokalisation der katalytischen Untereinheit und deren Zielproteine festlegen (Cohen, 2002). Von der katalytischen Untereinheit von PP2A (PP2A C) existieren zwei Isoformen, α und β (Stone et al., 1987). PP2A C bildet mit einer strukturellen Untereinheit PP2A A ein hufeisenförmiges

Gerüst, an das eine von 22 regulatorischen Untereinheiten (PP2A B / B‘ / B‘‘ / B‘‘‘) bindet (Janssens & Goris, 2001; Eichhorn et al., 2009). Diese werden von 15 verschiedenen Genen kodiert: PP2A B: *PR55*$\alpha, \beta, \gamma, \delta$; PP2A B‘: *PR61*$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon$; PP2A B‘‘: *PR48/70, PR59, PR72/PR130, G5PR*; PP2A B‘‘‘: *PR93, PR110*.

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass PP1 in Fibroblasten als spezifischer Komplex aus MYPT1 („Myosin phosphatase targeting“) als regulatorischer Untereinheit und PP1δ als katalytischer Untereinheit existiert (Eto et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um K. Kaibuchi zeigte, dass rekombinantes MYPT1 *in vitro* mit den N-terminalen Domänen von Ezrin und Moesin interagiert. Des Weiteren zeigte PP1 Phosphatase-Aktivität gegenüber Moesin (Fukata et al., 1998). PP1 wurde in der vorliegenden Arbeit als ERM-Phosphatase identifiziert. Es sollte nun untersucht werden, ob dieses als Holoenzym aus MYPT1 und PP1δ in T-Zellen exprimiert ist. Dazu wurde endogenes PP1δ aus TK1-Zelllysaten präzipitiert und die Kopräzipitation von MYPT1 im Immunoblot durch einen spezifischen Antikörper untersucht.

Eine Interaktion von MYPT1 mit PP1δ konnte bestätigt werden (Abb. 3.8 A). Die ERM-Phosphatase PP1 besteht in T-Zellen aus der regulatorischen Untereinheit MYPT1 und der katalytischen Untereinheit PP1δ. Mit PP1 als ERM-Phosphatase sollte die Interaktion von PP1 mit ERM-Proteinen getestet werden. Dazu wurde endogenes Ezrin aus TK1-Zelllysaten präzipitiert und die Interaktion mit PP1δ im Immunoblot untersucht. Eine Kopräzipitation von Ezrin und PP1δ konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.8 C). Jedoch scheint es sich bei der Interaktion von PP1 mit seinem Zielprotein Ezrin um eine sogenannte „On-Off“-Interaktion zu handeln. Die Dephosphorylierung erfolgt sehr schnell. Die Interaktion zwischen Phosphatase und Substrat ist auf eine sehr kurze Zeitspanne begrenzt. Dies könnte die Ursache darstellen, warum sie nicht in allen Experimenten nachweisbar war (Abb. 3.8 C).

PP2A konnte ebenfalls als ERM-Phosphatase identifiziert werden. Diese Phosphatase besteht als Holoenzym nicht nur aus einer katalytischen (PP2A C) und regulatorischen (PP2A B) Untereinheit, sondern einer zusätzlichen strukturellen Untereinheit PP2A A. Die Bildung des Gesamtkomplexes sollte mittels Immunpräzipitation und Immunoblot Analyse ermittelt werden. Dazu wurde endogenes PP2A C aus TK1-Zelllysaten präzipitiert. Eine Interaktion mit PP2A A konnte im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B). Eine regulatorische Untereinheit PP2A B konnte aufgrund deren Vielzahl und Diversität bislang nicht identifiziert werden. Eine Analyse der Kopräzipitate von PP2A C mittels zweidimensionaler (2D-) Gelelektrophorese und Massenspektrometrie könnte Aufschluss über diese Untereinheit geben.

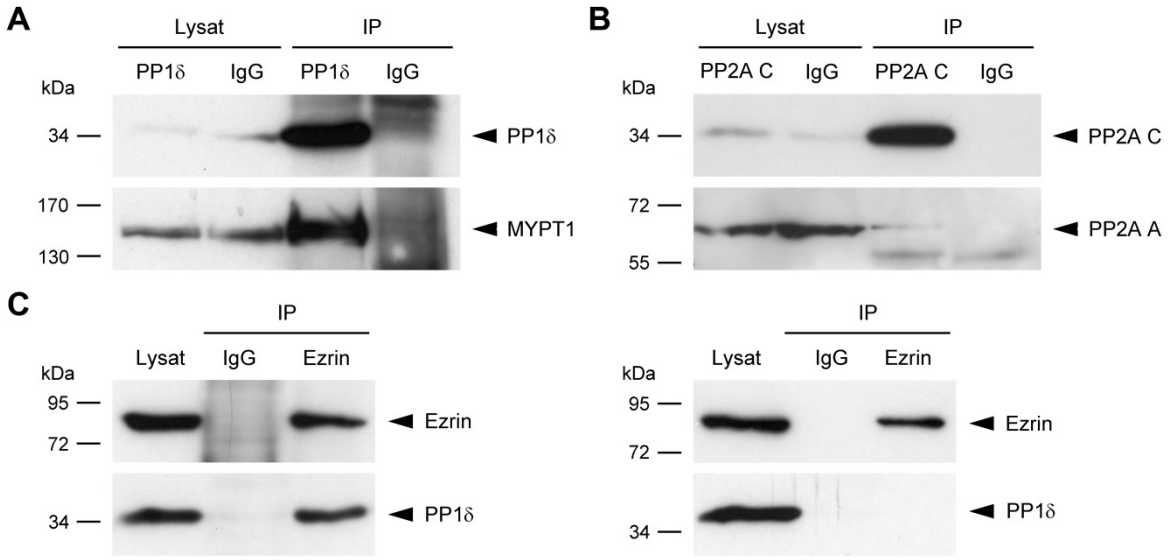

Abb. 3.8: Identifizierung der PP1/PP2A-Untereinheiten und „On-Off"-Interaktion von PP1 mit Ezrin. **(A)** Endogenes PP1δ (36 kDa) und **(B)** endogenes PP2A C (36 kDa) wurden aus TK1-Zelllysaten durch entsprechende Antikörper (anti-PP1δ [EP1804Y], anti-PP2A C [1D6]) präzipitiert. Kaninchen IgG und Maus IgG fungierten jeweils als Isotyp-Kontrollantikörper. Die jeweilige Präzipitation wurde durch spezifische Antikörper gerichtet gegen PP1δ / PP2A C [52F8] überprüft. Eine Kopräzipitation von MYPT1 (140 kDa) bzw. PP2A A (62kDa) wurde durch spezifische Antikörper (anti-MYPT1, anti PP2A A [81G5]) getestet. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=2). **(C)** Endogenes Ezrin (81 kDa) wurde aus TK1-Zelllysaten durch einen Ezrin-spezifischen Antikörper (Isotyp-Kontrollantikörper = Kaninchen IgG) präzipitiert und im Immunoblot durch Anti-Ezrin [3C12] nachgewiesen. Eine Kopräzipitation von PP1δ (36 kDa) wurde durch einen PP1δ-spezifischen Antikörper getestet. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis für eine positive / negative Kopräzipitation gezeigt (n=3).

Zusammengefasst konnten die katalytischen Untereinheiten der ERM-Phosphatasen PP1 und PP2A in T-Zellen identifiziert werden. PP1δ fungiert als katalytische Untereinheit von PP1. PP2A C katalysiert die ERM-Dephosphorylierung durch PP2A. Für PP1 konnte MYPT1 als regulatorische Untereinheit identifiziert werden. Welche Untereinheit im Falle von PP2A die regulatorische Funktion übernimmt, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht aufgeklärt werden. Jedoch konnte PP2A A als strukturelle Untereinheit des Holoenzyms bestimmt werden.

3.2.4 Lokalisation von PP1 und PP2A in wandernden T-Zellen

In Kapitel 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass ERM-Proteine durch die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A direkt dephosphoryliert werden. Die Regulation der ERM-Aktivität scheint eine wichtige Rolle für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration zu spielen (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Durch kontinuierlichen Übergang zwischen der aktiven und inaktiven Form von ERM-Proteinen wird die Reorganisation des Zytoskeletts ermöglicht. Eine Signaltransduktion von LFA-1 an der Plasmamembran zu ERM-Proteinen und damit zum

Aktomyosin-Zytoskelett könnte über PP1 und PP2A erfolgen. Für eine gesicherte Signalweiterleitung müssten die beteiligten Signalproteine während der T-Zellmigration in denselben Regionen akkumuliert sein. Es sollte deshalb getestet werden, ob in wandernden T-Zellen die Phosphatasen bzw. ihre Untereinheiten ebenfalls in der Deadhäsionsregion (Uropod) lokalisiert sind, wie es LFA-1 und ERM-Proteine waren (vgl. Abb. 3.1). Deshalb wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation der PP1- und PP2A-Untereinheiten in, auf ICAM-1 wandernden, und deshalb polarisierten T-Zellen untersucht.

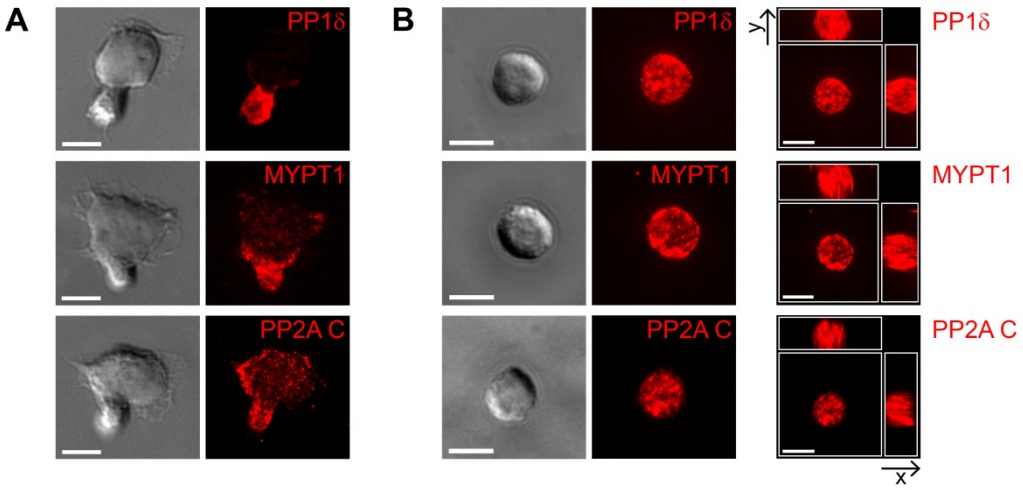

Abb. 3.9: Lokalisation der PP1- und PP2A-Untereinheiten im Uropod wandernder T-Zellen.
PP1δ, MYPT1 und PP2A C wurden in murinen, primären T-Lymphoblasten angefärbt. Untersucht wurde deren Lokalisation **(A)** in Zellen, die LFA-1 vermittelt auf ICAM-1 wanderten, sowie **(B)** in abgerundeten, nicht-polarisierten Suspensionszellen. Maßstabsbalken = 5 µm. Es ist jeweils eine repräsentative Zelle gezeigt (n=3).

Die katalytische Untereinheit PP1δ wie auch die regulatorische Untereinheit MYPT1 des PP1-Holoenzyms waren in der wandernden Zelle im Uropod zu finden (Abb. 3.9 A). PP2A C war ebenfalls vor allem im Uropod lokalisiert, konnte aber auch am Übergang von den Lamellipodien zum Zellkörper detektiert werden (Abb. 3.9 A). Beide Phosphatasen (PP1 und PP2A) waren demnach während der LFA-1 vermittelten Migration in der Deadhäsionsregion zu finden. Sie kolokalisierten dort nicht nur mit ihren Zielproteinen Ezrin und Moesin, sondern auch mit LFA-1 (vgl. Abb. 3.1). Eine Signalweiterleitung von LFA-1 zum Zytoskelett könnte über PP1 und PP2A hin zu ERM-Proteinen erfolgen. Die für die Deadhäsion der T-Zelle notwendige Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts könnte auf diese Weise vermittelt werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Interaktion von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 und die damit verbundene Zellpolarisation ein Signal zur Rekrutierung von PP1 und PP2A in den T-Zell-Uropod induzieren. Deshalb wurde die Lokalisation der Phosphatasen-Untereinheiten in abgerundeten Suspensionszellen analysiert. Derartige Zellen waren nicht

mit ICAM-1 in Kontakt, und haben deshalb kein LFA-1 vermitteltes Signal erhalten. PP1δ und MYPT1 waren in abgerundeten Zellen gleichmäßig über den gesamten Zellkortex verteilt (Abb. 3.9 B). Auch PP2A C war in der nicht polarisierten Zelle zytoplasmatisch in der gesamten Zelle zu finden (Abb. 3.9 B). Erhalten die Zellen kein Signal durch Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1, sind die Phosphatasen unspezifisch im gesamten Zytoplasma lokalisiert.

Die polarisierte Anreicherung beider Phosphatasen im Uropod wandernder T-Zellen scheint damit auf ein LFA-1 vermitteltes Signal hin zu erfolgen. Durch Interaktion der Phosphatasen mit LFA-1 könnten diese an die Plasmamembran und damit in die Nähe aktiver ERM-Proteine rekrutiert werden.

3.2.5 Regulation der PP1-Aktivität durch ROCK

Die Aktivität der Phosphatase PP1 kann durch Phosphorylierung ihrer regulatorischen Untereinheit MYPT1 inhibiert werden. MYPT1 wird an zwei Threoninresten, homolog zu humanem/murinem Threonin 696/694 und humanem/murinem Threonin 853/852, von ROCK (RhoA Kinase) phosphoryliert (Feng et al., 1999). Letztere Phosphorylierungsstelle ist innerhalb der Myosin-Binderegion von MYPT1 lokalisiert (Johnson et al., 1997). Die Bindung von MYPT1 und damit PP1 an die leichte Myosin-Kette (MLC, „Myosin-light-chain“) wird über diesen Threoninrest 853/852 reguliert (Velasco et al., 2002). Die zweite Phosphorylierungsstelle am Threoninrest 696/694 wirkt inhibitorisch in Bezug auf PP1 (Feng et al., 1999). Eine Inhibierung könnte durch Interaktion der C-terminal gelegenen Phosphorylierungsstelle Threonin 696/694 mit der aktiven Region von N-terminal gebundenem PP1δ erfolgen (kompetitive Hemmung) (Ito et al., 2004). Ob dies durch intramolekulare Interaktion oder durch Ausbildung von antiparallelen Dimeren erfolgt, ist bisher unbekannt (Ito et al., 2004). Neben der kompetitiven Hemmung könnte die Auslösung einer Konformationsänderung in PP1δ die Interaktion der Phosphatase mit dem jeweiligen Substrat zerstören (Ito et al., 2004).

Es sollte überprüft werden, ob ROCK in T-Zellen MYPT1 phosphoryliert und somit den Aktivitätsstatus von PP1 reguliert. Dazu wurden murine TK1-Zellen sowie humane HSB-2-Zellen mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 inkubiert und der Effekt auf phospho-MYPT1 (pMYPT1) im Immunoblot analysiert.

Bei Inhibition von ROCK durch Y27632 war die Menge an pMYPT1 Threonin 696/694 sowohl in TK1- als auch in HSB-2-Zellen stark reduziert (Abb. 3.10 A). Die Phosphorylierung von MYPT1 am Threoninrest 853/852 war in unbehandelten Zellen sehr schwach. Durch Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor Y27632 sank die Menge an pMYPT1 Threonin 852 noch weiter ab (Abb. 3.10 B).

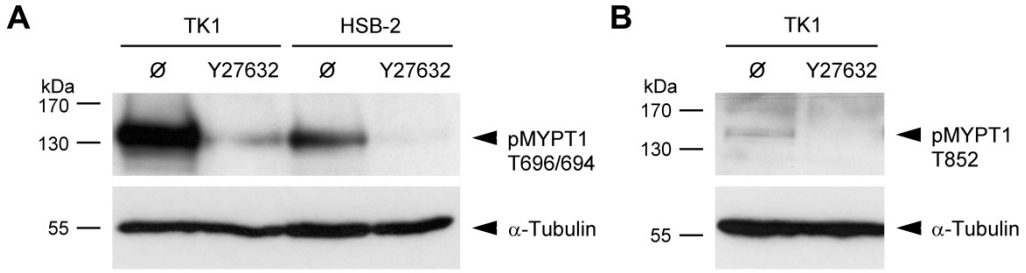

Abb. 3.10: Phosphorylierung von MYPT1 am Threonin 696/694 und Threonin 852 durch ROCK. TK1- und HSB-2-Zellen wurden für 20 min mit 20 µM Y27632 inkubiert und die Menge an **(A)** pMYPT1 Thr696/694 bzw. **(B)** pMYPT1 Thr852 (beide 140 kDa) im Immunoblot detektiert. ø = unbehandelte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55kDa).

MYPT1 wird demnach in T-Zellen an beiden Threoninresten von ROCK phosphoryliert. Die Phosphorylierung am Threonin 696/694 und damit die Aktivität von PP1 werden wesentlich von ROCK beeinflusst. Die Phosphorylierung am Threonin 853/852 und damit die Regulation der Bindung von MYPT1 an Myosin scheint dagegen in T-Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.3 Signaltransduktion von LFA-1 zu ERM-Proteinen

Die Regulation der ERM-Aktivität scheint eine wichtige Rolle während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration zu spielen. PP1 und PP2A konnten als spezifische ERM-Phosphatasen identifiziert werden. Ihre Untereinheiten kolokalisieren mit LFA-1 und ERM-Proteinen im Uropod wandernder T-Zellen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch Bindung von LFA-1 an ICAM-1 ein Signal ausgelöst wird, welches durch PP1 und PP2A als Regulatoren der ERM-Phosphorylierung weitergeleitet wird. Auf diese Weise könnte die Reorganisation des Zytoskeletts als essentieller Schritt der Deadhäsion am Uropod vermittelt werden. Für einen Einfluss von LFA-1 auf die ERM-Aktivität, müsste LFA-1 demnach mit den Phosphatasen PP1 und PP2A direkt, oder aber indirekt über weitere Signalmoleküle interagieren. Um mögliche Wege dieser Signalweiterleitung zu identifizieren, wurden folgende Fragestellungen untersucht: Kann LFA-1 direkt mit den Phosphatasen PP1/PP2A interagieren? Löst die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 eine Signalweiterleitung von der Plasmamembran hin zu ERM-Proteinen aus und beeinflusst deren Phosphorylierungsstatus? Wird bereits durch eine Konformationsänderung von LFA-1 (Aktivierung) ein derartiges intrazelluläres Signal ausgelöst?

3.3.1 Interaktion von LFA-1 mit PP1 und PP2A

Für eine Signalweiterleitung von LFA-1 über PP1 und PP2A zu ERM-Proteinen müsste LFA-1 direkt oder indirekt mit den Phosphatasen interagieren. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass PP1 an die zytoplasmatische Region der α3A-Kette von α3β1 Integrinen binden kann (Mutz et al., 2006). Die Analyse der Bindung mittels synthetischer Peptide in neuronalen Zellen (PC12) zeigte, dass die katalytische Untereinheit von PP1 mit dem membran-proximalen Bereich der α3A-Kette nahe dem hoch konservierten GFFKR-Motiv interagiert (Mutz et al., 2006). Auch eine direkte Interaktion von PP1 C mit der KVGF-Sequenz (als Teil des KVGFFKR-Motivs) in der αIIb-Kette von αIIbβ3-Integrinen konnte in humanen Blutplättchen und mit aufgereinigten Peptiden nachgewiesen werden (Vijayan et al., 2004). Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass die katalytische Untereinheit von PP2A ebenfalls mit der αIIb-Kette in humanen Blutplättchen interagiert; die Bindung erfolgt über die membran-proximale Region, die die KVGFFKR-Sequenz beinhaltet (Gushiken et al., 2008). Beide Phosphatasen scheinen somit an die zytoplasmatische Region der α-Ketten von Integrinen nahe der hoch konservierten GFFKR-Sequenz zu binden. Mittels Immunpräzipitation sollte deshalb untersucht werden, ob die αL-Kette von LFA-1, die ebenfalls ein GFFKR-Motiv enthält, mit den Phosphatasen PP1 und PP2A interagiert.

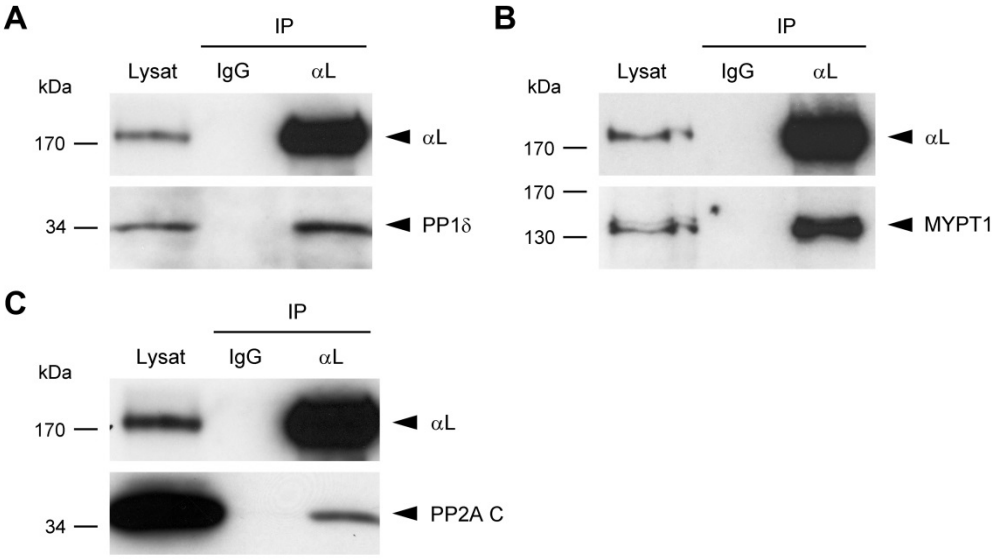

Abb. 3.11: Interaktion von LFA-1 mit PP1 (PP1δ / MYPT1) und PP2A C.
Endogenes LFA-1 wurde durch einen αL-spezifischen Antikörper [M17/4] (Isotyp-Kontrollantikörper = Ratten IgG) in Lysaten muriner, primärer T-Lymphoblasten präzipitiert und im Immunoblot durch ein αL-Antiserum nachgewiesen (180 kDa). Eine Kopräzipitation der PP1-Untereinheiten **(A)** PP1δ (36 kDa) und **(B)** MYPT1 (140 kDa) wurde durch spezifische polyklonale Antikörper getestet. Es ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=3). **(C)** Eine Kopräzipitation der PP2A-Untereinheit PP2A C (36 kDa) wurde durch einen PP2A C-spezifischen Antikörper [1D6] im Immunoblot getestet.

Sowohl die katalytische Untereinheit PP1δ, als auch die regulatorische Untereinheit MYPT1 konnten mit der αL-Kette von LFA-1 kopräzipitiert werden (Abb. 3.11 A, B). Es ist anzumerken, dass die Präzipitation von PP1δ nicht in jedem Experiment nachzuweisen war; die Präzipitation von MYPT1 mit LFA-1 gelang dagegen stets. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Bindung von PP1 an LFA-1 über die regulatorische Untereinheit MYPT1 erfolgt. Die Interaktion zwischen PP1δ und LFA-1 wäre damit eine indirekte Interaktion, bei der MYPT1 zwischengeschaltet ist. Direkte Interaktionspartner können durch Immunpräzipitationen meist gut nachgewiesen werden. Inwiefern weitere indirekte Interaktionspartner detektiert werden können, hängt von der Bindungsaffinität der interagierenden Proteine ab.

Im Falle der Phosphatase PP2A konnte deren katalytische Untereinheit PP2A C mit der αL-Kette von LFA-1 kopräzipitiert werden (Abb. 3.11 C). Auch bei dieser Interaktion könnte es sich um eine indirekte Bindung oder kurzzeitige „On-Off"-Interaktion handeln, da die Präzipitation nicht in jedem Experiment nachzuweisen war. Als intermediäres Protein könnte analog der PP1-LFA-1 Interaktion die regulatorische Untereinheit von PP2A fungieren.

Beide Phosphatasen, PP1 und PP2A, interagieren demnach mit LFA-1. Die Interaktion findet möglicherweise über ihre jeweiligen regulatorischen Untereinheiten statt. Bei der Bindung an LFA-1 könnte es sich um einen Rekrutierungsmechanismus der Phosphatasen zur Plasmamembran handeln. Sie würden dadurch in direkte Nähe zu ihren Zielproteinen, phosphoryliertes Ezrin und Moesin, gelangen. Die LFA-1-Signaltransduktion während der T-Zellmigration würde auf diese Weise mit dem Zytoskelett verknüpft werden.

3.3.2 Induktion einer LFA-1 vermittelten Signalkaskade durch ICAM-1 Bindung

Eigene Daten lassen vermuten, dass während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration ein Signal in der Zelle ausgelöst wird, welches die Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts induziert und eine Deadhäsion am Uropod ermöglicht. Die Bindung von LFA-1 auf der Oberfläche der T-Zellen an ICAM-1 auf Endothelzellen muss dazu in ein intrazelluläres Signal umgewandelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde folgende Hypothese aufgestellt: nach Bindung von ICAM-1 an LFA-1 interagieren die Phosphatasen PP1 und PP2A mit der zytoplasmatischen Region von LFA-1. Daraufhin dephosphorylieren PP1/PP2A die an der Plasmamembran lokalisierten ERM-Proteine und inaktivieren diese.

Um zu testen, ob die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 ein intrazelluläres Signal zur Regulation der ERM-Aktivität auslöst, wurde der ERM-Phosphorylierungsstatus von Zellen, die an ICAM-1 gebunden hatten, mit Zellen in Suspension verglichen.

Nach Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 war die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen stark reduziert (Abb. 3.12 A). Dieser Effekt konnte nur in Zellen beobachtet werden, die an ICAM-1 adhäriert hatten. Suspensionszellen oder Zellen, die mit dem unspezifischen Liganden BSA oder mit IgG1/Fc in Kontakt waren, erhielten kein Signal durch LFA-1/ICAM-1 Bindung und zeigten unveränderte Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen (Abb. 3.12 B).

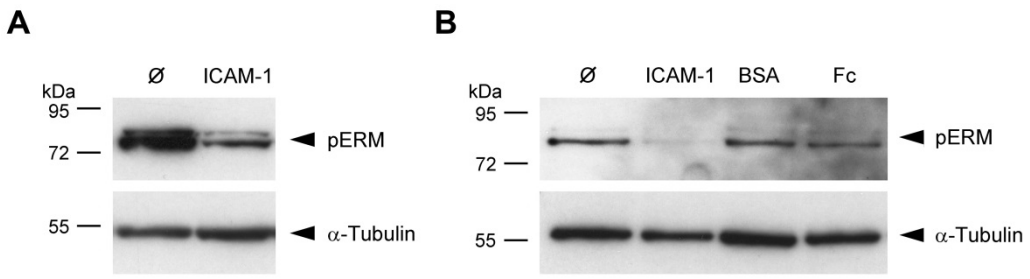

Abb. 3.12: Dephosphorylierung von ERM-Proteinen nach Bindung von LFA-1 an ICAM-1.
(A) Es wurden Zelllysate hergestellt von murinen, primären T-Lymphoblasten in Suspension (ø) und solchen, die auf einer mit ICAM-1 beschichteten Oberfläche adhärieren konnten (ICAM-1). Die Phosphorylierung der ERM-Proteine wurde anschließend im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper untersucht (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa). Es ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=3). **(B)** Um die Spezifität des Signals zu verifizieren, wurden T-Lymphoblasten zusätzlich auf eine mit BSA oder IgG1/Fc (Fc) beschichtete Oberfläche gegeben und analog der Effekt auf pERM im Immunoblot untersucht. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa).

Daraus kann gefolgert werden, dass nur nach Bindung von LFA-1 an ICAM-1 eine spezifische Signaltransduktion über PP1 und PP2A hin zu ERM-Proteinen erfolgt. PP1 und PP2A scheinen infolge ERM-Proteine verstärkt zu dephosphorylieren. Eine Erklärung könnte die Rekrutierung von PP1 und PP2A zur Plasmamembran durch Bindung an LFA-1 sein. Dadurch gelangen die Phosphatasen in direkte Nähe zu ERM-Proteinen und können diese dephosphorylieren. Alternativ dazu könnte die Interaktion mit LFA-1 die Aktivität der Phosphatasen in Hinsicht auf ihre Zielproteine beeinflussen.

Eine Veränderung des ERM-Phosphorylierungsniveaus bei ICAM-1 Bindung in T-Zellen könnte auch auf die morphologische Veränderung der Zelle bei der Adhäsion zurückgeführt werden. Mikroskopische Untersuchungen der T-Lymphoblasten ergaben jedoch, dass diese bereits in Suspension eine polarisierte Form aufweisen (Daten nicht gezeigt). Der Effekt der T-Zell-Adhäsion an ICAM-1 auf pERM scheint damit nicht auf die Veränderung der Morphologie, sondern primär auf ein durch LFA-1 ausgelöstes Signal zurückzuführen zu sein.

Die Interaktion von LFA-1 auf den T-Zellen mit ICAM-1 als Ligand erfordert aktives LFA-1. Es ist zu prüfen, ob bereits eine Konformationsänderung von LFA-1 (durch „Inside-Out“-Signale) zur Dephosphorylierung von ERM-Proteinen führt, oder ob erst „Outside-In“-Signale nach ICAM-1 Bindung den ERM-Phosphorylierungsstatus „downstream“ von LFA-1 regulieren.

3.3.3 Kein Effekt einer LFA-1 Konformationsänderung auf die ERM-Phoshorylierung

Der Effekt der LFA-1/ICAM-1 Interaktion auf die ERM-Phosphorylierung könnte durch die Bindung von ICAM-1, oder aber lediglich durch eine Konformationsänderung von LFA-1 bedingt sein. Um ICAM-1 binden zu können, muss LFA-1 im hoch-affinen Zustand vorliegen. Deshalb sollte untersucht werden, ob der Übergang von niedrig-affinem zu hoch-affinem LFA-1 bereits ein intrazelluläres Signal in Bezug auf die ERM-Aktivität auslösen kann. Dazu wurden humane, primäre T-Zellen mit hohen Konzentrationen an $MgCl_2$ und EGTA stimuliert, um hoch-affines LFA-1 zu induzieren. Anschließend wurde der Effekt auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine im Immunoblot untersucht.

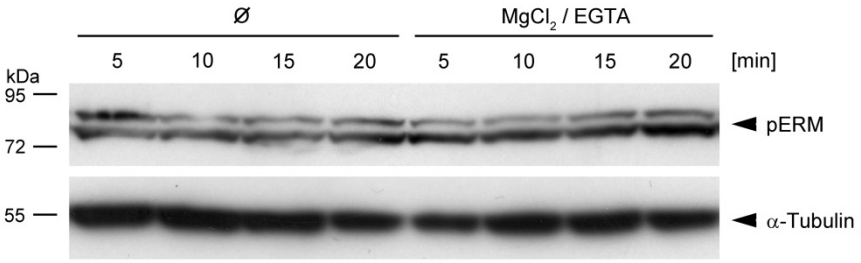

Abb. 3.13: Kein Effekt einer LFA-1 Konformationsänderung auf den ERM-Phosphorylierungsstatus. Primäre, humane T-Lymphoblasten wurden mit 30 mM $MgCl_2$ und 5 mM EGTA für die angegebenen Zeitintervalle stimuliert. Die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa) wurde anschließend im Immunoblot detektiert. ø = unstimulierte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa).

Wie in Abb. 3.5 bereits gezeigt, ist die Menge an hoch-affinem LFA-1 auf der T-Zell-Oberfläche nach Stimulation humaner T-Zellen mit $MgCl_2$ und EGTA stark erhöht. Eine Konformationsänderung von LFA-1 hin zum hoch-affinen Zustand hatte jedoch keinen Effekt auf die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (Abb. 3.13). Somit scheint erst eine Bindung von ICAM-1 an hoch-affines LFA-1 („Outside-In"-Signal), nicht aber die Änderung der LFA-1 Konformation an sich, ein Signal zur ERM-Dephosphorylierung auszulösen.

3.3.4 Keine Beeinflussung der ERM-Aktivität durch ein T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal

Die extrazelluläre Bindung von LFA-1 an der T-Zell-Oberfläche an seinen Liganden ICAM-1 scheint über die Phosphatasen PP1 und PP2A zur Auslösung eines intrazellulären Signals, der Dephosphorylierung von ERM-Proteinen, zu führen. Eine Konformationsänderung von LFA-1 *per se* konnte kein Signal zur Regulation des ERM-Phosphorylierungsstatus auslösen.

Es sollte getestet werden, ob „Inside-Out“-Signale die LFA-1 vermittelte Signalkaskade initiieren können.

Dazu wurde eine intrazelluläre Signalkaskade ausgehend vom T-Zell-Rezeptor ausgelöst: mit Hilfe von anti-CD3-Antikörpern, gefolgt von der bivalenten Bindung spezifischer $F(ab`)_2$-Fragmente an diese Antikörper, kann eine Kreuzvernetzung der T-Zell-Rezeptor-Komplexe (bestehend aus T-Zell-Rezeptor, CD3-Rezeptor, ζ-Kette) auf der Zelloberfläche induziert werden. Diese Kreuzvernetzung durch Antikörper imitiert das „Clustering“ von T-Zell-Rezeptor-Komplexen *in vivo* durch die Bindung von spezifischen Peptid/MHC Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Dadurch kommt es intrazellulär unter anderem zur Rekrutierung der Src-Kinasen Fyn und Lck (Janeway et al., 2005). Lck phosphoryliert die Kinase ZAP70 (Zeta-Kette-assoziiertes Protein mit 70kDa). Aktive phospho-ZAP70 und Src-Kinasen leiten das Signal über weitere Signalmoleküle an RAP1 und damit LFA-1 weiter (Menasche et al., 2007). Daten aus der Literatur sowie laboreigene Daten zeigen, dass auf diese Weise die Kreuzvernetzung der T-Zell-Rezeptor-Komplexe *in vitro* eine „Inside-Out“-Signaltransduktion zur Aktivierung von LFA-1 induziert. Der Effekt eines derartig ausgelösten Signals auf die Phosphorylierung der ERM-Proteine wurde im Immunoblot untersucht.

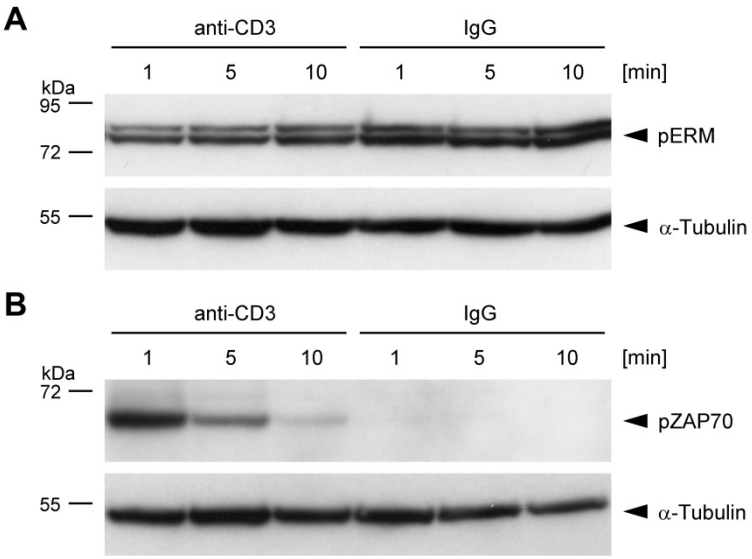

Abb. 3.14: Kein Effekt eines T-Zell-Rezeptor-Signals auf den ERM-Phosphorylierungsstatus.
Primäre, humane T-Lymphoblasten wurden mit einem anti-CD3 Antikörper [OKT3] sowie IgG als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde durch ein spezifisches $F(ab`)_2$ Fragment die Kreuzvernetzung der CD3-Rezeptoren induziert. **(A)** Phosphorylierte ERM-Proteine (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa) wurden im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper detektiert. **(B)** Als Positivkontrolle für die Auslösung eines T-Zell-Rezeptor vermittelten Signals diente phosphoryliertes ZAP70 (pZAP70 = 70/72 kDa). Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa). Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (n=3).

Die Kreuzvernetzung von T-Zell-Rezeptoren hatte keinen Einfluss auf die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (Abb. 3.14 A). Bei dem durch die Kreuzvernetzung ausge-

lösten Signal handelte es sich um ein sehr schnelles Signal. Die Menge an phosphoryliertem ZAP70 (pZAP70) ist nach einer Minute Inkubation stark erhöht. Bereits nach zehn Minuten jedoch erreichte der pZAP70-Level fast wieder Normalniveau (Abb. 3.14 B).
Ein T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal scheint damit keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität von ERM-Proteinen zu haben. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine LFA-1 vermittelte Signalkaskade zur Regulation der ERM-Aktivität spezifisch durch „Outside-In"-Signalweiterleitung von LFA-1 nach Interaktion mit ICAM-1 ausgelöst wird.

3.4 Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration

Für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration ist eine Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts essentiell. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 eine spezifische Signalweiterleitung hin zu ERM-Proteinen und damit zum Zytoskelett auslöst (vgl. Kapitel 3.3). Der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität der ERM-Proteine wird einerseits durch Proteinkinasen, andererseits durch die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2A reguliert (Kapitel 3.2). Durch diese wird das Gleichgewicht zwischen aktiven, phosphorylierten und inaktiven, dephosphorylierten ERM-Proteinen kontrolliert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts die kontinuierliche Reorganisation des Zytoskeletts stört. Verstärkt inaktive ERM-Proteine könnten die für die Zellmigration notwendige Stabilität nicht gewährleisten. Dagegen würde eine ständige Interaktion aktiver ERM-Proteine mit dem Zytoskelett die Zellflexibilität so stark einschränken, dass die Zelle versteift. In beiden Fällen wäre die Zellmigration stark beeinträchtigt. Einen ersten Hinweis dafür lieferten T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin, deren LFA-1 vermittelte Deadhäsion von ICAM-1 defekt zu sein schien (Kapitel 3.1.3). Durch Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A durch Calyculin A oder Okadainsäure wird die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen blockiert (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Daraus resultieren stark erhöhte Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen. Der Effekt eines Ungleichgewichts zwischen aktiven und inaktiven ERM-Proteinen auf die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration durch PP1/PP2A Inhibition sollte *in vitro* wie *in vivo* untersucht werden.

3.4.1 Auswirkungen der Inhibierung von PP1/PP2A in T-Zellen *in vitro*

Die Inhibierung von PP1 und PP2A durch Calyculin A und Okadainsäure beruht auf der kompetitiven Hemmung der aktiven Region der Phosphatasen. Eine Dephosphorylierung der ERM-Proteine als Substrate von PP1 und PP2A wird blockiert. Die beiden Inhibitoren unterscheiden sich in ihrer Spezifität (Gupta et al., 1997): Calyculin A soll mit einem IC_{50}-Wert von 0,4–2,0 nM eine leicht höhere Selektivität gegenüber PP1 zeigen. Im Vergleich

liegt der IC_{50}-Wert gegenüber PP2A bei 0,25-3 nM. Okadainsäure inhibiert mit einem IC_{50}-Wert von nur 0,02-1,0 nM PP2A selektiver als PP1 (IC_{50}-Wert = 10-1300 nM) (Fagerholm et al., 2010). Ein derartiger Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde fortan hauptsächlich Calyculin A für die Blockierung der PP1/PP2A-Aktivität verwendet.

Da in den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Zellmigration und –adhäsion, T-Zellen mit dem Inhibitor Calyculin A vorbehandelt wurden, sollte untersucht werden, wie lange der inhibitorische Effekt von Calyculin A andauert. Des Weiteren sollte ein negativer Effekt auf die Viabilität der Zellen durch Induktion der Apoptose ausgeschlossen werden.

3.4.1.1 Langzeiteffekt auf den Phosphorylierungsstatus der ERM-Proteine

Der inhibitorische Effekt von Calyculin A in Bezug auf die Phosphatasen PP1 und PP2A und damit die ERM-Dephosphorylierung sollte über die Zeit untersucht werden. Dazu wurden TK1-Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Calyculin A vorinkubiert und der Effekt auf die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen über definierte Zeitintervalle im Immunoblot analysiert.

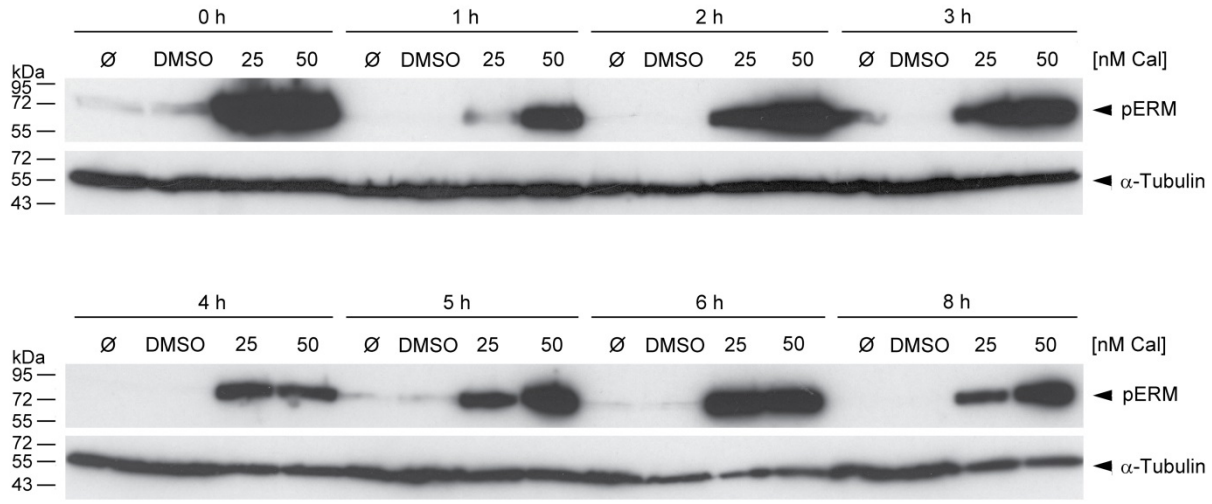

Abb. 3.15: Langzeitige Erhöhung des pERM-Levels nach Inhibition von PP1/PP2A.
TK1-Zellen wurden für 30 min mit 25 nM bzw. 50 nM Calyculin A (Cal) behandelt. Nach dem Rauswaschen von Calyculin A wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle weiterkultiviert und schließlich Zelllysate hergestellt. Phosphorylierte ERM-Proteine (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa) wurden im Immunoblot detektiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte (ø) und DMSO-behandelte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa).

Die Behandlung der T-Zellen mit Calyculin A führt zu einer stark erhöhten Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen, verglichen mit unbehandelten oder DMSO-behandelten Zellen (Abb. 3.15). Der Effekt scheint lange anzuhalten: acht Stunden nach der Calyculin A-Behandlung war die pERM-Menge in den Zellen immer noch stark erhöht. Die kompetitive Hemmung der Phosphatasen PP1 und PP2A durch Calyculin A inhibiert damit die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen über einen langen Zeitraum. Damit kann auch der langfristige Effekt der PP1/PP2A Inhibition und den daraus resultierenden hohen pERM-Mengen auf die T-Zellmigration untersucht werden.

3.4.1.2 Auswirkung auf die Viabilität der T-Zellen

Calyculin A ist wasserunlöslich und wird in DMSO als organischem Solvens gelöst. DMSO durchdringt sehr effektiv und schnell Zellmembranen, in geringen Konzentrationen hat es keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Bei hohen Konzentrationen dagegen wirkt es zytotoxisch (Penninckx et al., 1983; Da Violante et al., 2002). Neben der Solvens-Konzentration beeinflussen die Art, Menge und Spezifität des Inhibitors die Viabilität der Zellen. So kann es durch Einsatz von Inhibitoren unter nicht-optimierten Bedingungen zur Induktion des programmierten Zelltods kommen. Apoptotische Zellen verhalten sich naturgemäß anders als vitale Zellen. Es sollte untersucht werden, ob die Behandlung von T-Zellen mit dem Inhibitor Calyculin A neben der Hemmung der PP1/PP2A Aktivität einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Dazu wurde der Anteil lebender Zellen in einer Population naiver T-Zellen nach Calyculin A - Behandlung mittels Annexin V / Propidiumiodid-Färbung in einem Apoptosetest bestimmt.

Abb. 3.16 A zeigt, dass der Prozentsatz an lebenden Zellen (= Annexin V / Propidiumiodid negativ) nach Calyculin A Behandlung vergleichbar mit dem unbehandelter Zellen war. Auch eine zeitverzögerte Induktion der Apoptose konnte ausgeschlossen werden: bis 2 h nach Inkubation mit Calyculin A wurden gleiche Mengen an lebenden Zellen detektiert (Abb. 3.16 A). Der Inhibitor hatte demnach (auch längerfristig) keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Zeitgleich konnte die Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A durch den Inhibitor bestätigt werden: wie erwartet war die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen stark erhöht (Abb. 3.16 B).

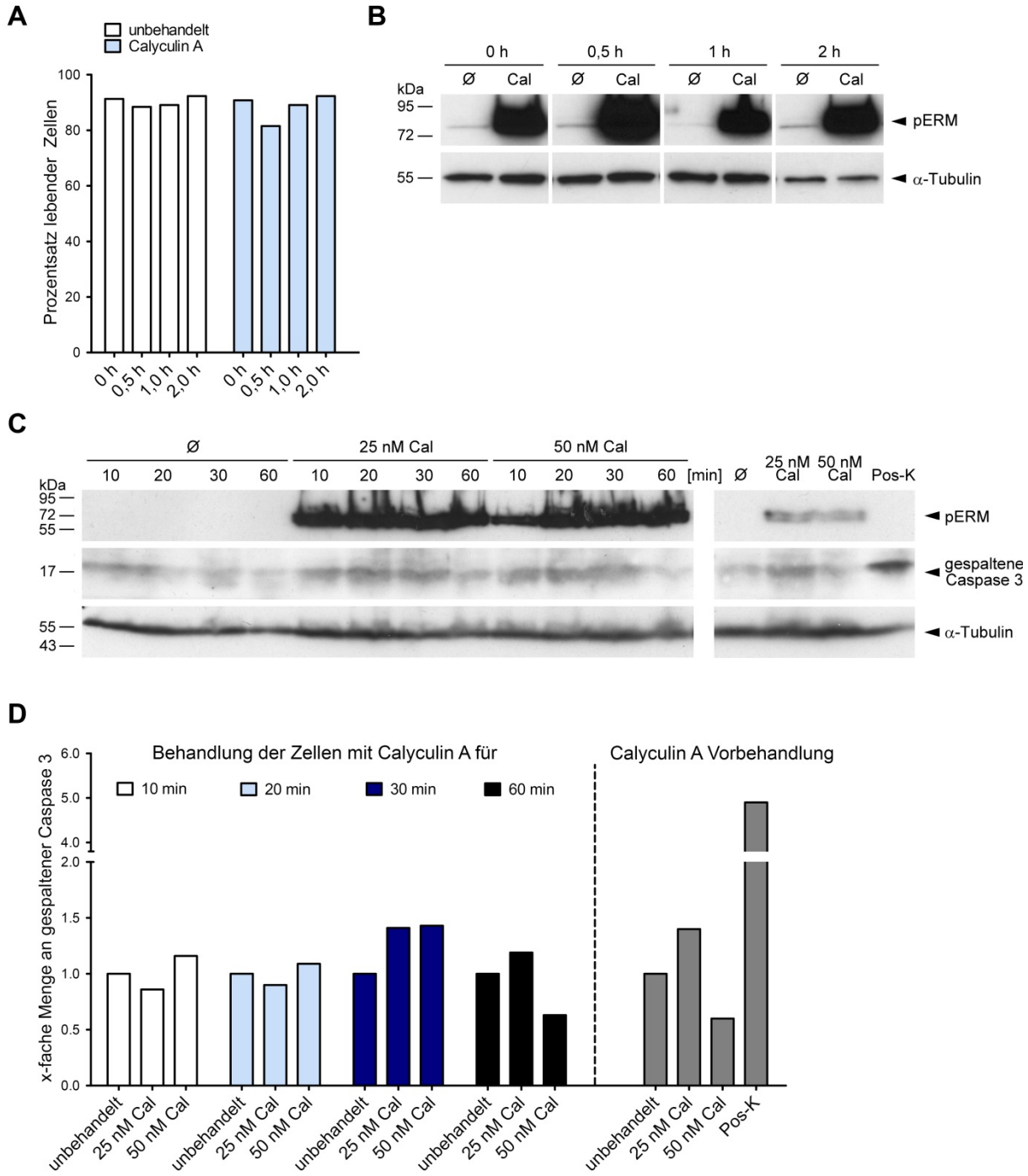

Abb. 3.16: Kein Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die Zellviabilität.
(A) Naive, murine T-Zellen wurden 30 min mit 50 nM Calyculin A vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle weiterkultiviert. Der Prozentsatz der lebenden Zellen wurde mittels Annexin V / Propidiumiodid-Färbung in der Durchflußzytometrie bestimmt. **(B)** Parallel wurde der Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die pEzrin/pMoesin (78/81 kDa)-Menge im Immunoblot untersucht. **(C)** TK1-Zellen wurden mit 25 bzw. 50 nM Calyculin A für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert (links); oder 20 min mit Calyculin A vorbehandelt und für zwei Stunden weiterkultiviert (rechts). Gespaltene Caspase 3 (17 kDa) wurde im Immunoblot detektiert. Positiv-Kontrolle = 1 µM Staurosporin-Behandlung für 3 h. ø = unbehandelte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa). **(D)** Die Bandenintensität der gespaltenen Caspase 3 wurde in Relation zur Ladekontrolle mit Hilfe der ImageJ-Software (National Institute of Health, Bethesda, USA) quantifiziert. Es erfolgte eine Normierung der Expressionswerte auf den jeweiligen Ansatz unbehandelter Zellen.

Als zusätzliche Prüfung der Zellviabilität wurde die Menge an gespaltener Caspase 3 in Calyculin A-behandelten T-Zellen im Immunoblot ermittelt. Die Effektor-Caspase 3 wird während der Apoptose durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert (Boatright & Salvesen, 2003). Dabei wird die *pro*-(Vorläufer)-Form von Caspase 3 proteolytisch in die aktiven Fragmente p17 und p12 gespalten (Nicholson et al., 1995). In ihrer aktiven Form spaltet Caspase 3 weitere zelleigene Proteine und aktiviert die DNase CAD („caspase-activatable DNase") (Enari et al., 1998). Diese zerschneidet die nukleäre DNA in circa 200 Basenpaar große Fragmente, die charakteristisch für den programmierten Zelltod sind. Die Detektion des aktiven p17-Fragmentes durch einen spezifischen Antikörper gegen „gespaltene Caspase 3" dient damit als Nachweis früh-apoptotischer Zellen. Auf diese Weise wurde die Viabilität von T-Lymphomzellen (TK1) nach Calyculin A-Behandlung durch Detektion gespaltener Caspase 3 im Immunoblot (u.a. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer) analysiert.

In der Regel ist ein kleiner Teil der Zellen in Kultur apoptotisch. Deshalb konnte in allen Ansätzen eine geringe Menge des p17-Fragments der Caspase 3 detektiert werden. Abb. 3.16 C und die Quantifizierung des Immunoblots (Abb. 3.16 D) zeigen, dass die Menge an gespaltener Caspase 3 nach 10 und 20 Minuten Calyculin A-Inkubation in den T-Lymphomzellen nur unwesentlich verändert war. Lediglich nach einer 30-minütigen Inkubation der Zellen mit Calyculin A war eine geringe, 1,4-fache Erhöhung der Menge an gespaltener Caspase 3 zu beobachten. Da diese jedoch bei einer 60-minütigen Inkubation mit dem Inhibitor nur geringfügig erhöht war (25 nM Calyculin A) bzw. sogar abnahm (50 nM Calyculin A), scheint es sich um geringe Schwankungen und weniger um einen negativen Effekt zu handeln.

Die Vorbehandlung der T-Lymphomzellen mit dem Inhibitor hatte ebenfalls nur einen geringen Effekt auf die Zellviabilität (Abb. 3.16 D, rechts): die Menge an gespaltener Caspase 3 stieg auf das 1,4-fache bei einer Calyculin A-Konzentration von 25 nM, und fiel auf das 0,6-fache bei einer Konzentration von 50 nM. Im Vergleich wies die Positiv-Kontrolle eine 5-fach erhöhte Menge des p17-Fragments der Caspase 3 auf. Eine tatsächliche Induktion der Apoptose ging demnach mit einer stark erhöhten Menge an gespaltener Caspase 3 einher.

Eine Behandlung der T-Lymphomzellen mit Calyculin A scheint demnach keinen oder nur einen geringfügigen Effekt auf deren Viabilität zu haben. Die Funktionalität des Inhibitors wurde durch Detektion von pEzrin und pMoesin bestätigt: die Menge an pERM stieg im Immunoblot nach Calyculin A-Behandlung deutlich an (Abb. 3.16 C).

Die Inhibition von PP1 und PP2A durch Calyculin A hatte, gemessen an dem früh-apoptotischen Marker Annexin V, keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität. Die Menge des p17-Fragmentes von Caspase 3, welche mit einer Induktion der Apoptose korreliert, blieb nach PP1/PP2A-Inhibition ebenfalls weitestgehend unverändert.

3.4.2 Kein Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 Aktivität in T-Zellen

Es wurde postuliert, dass die Inhibition der Phosphatasen PP1/PP2A in T-Zellen zur verstärkten Phosphorylierung von ERM-Proteinen und damit zu einer Erstarrung des Zytoskeletts führen. Neben einem flexiblen Aktomyosin-Zytoskelett ist das Lösen der LFA-1/ICAM-1 Interaktion essentiell für die Deadhäsion während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration. Die Aktivität von LFA-1 muss exakt reguliert werden. In Kapitel 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass PP1 und PP2A direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von LFA-1 interagieren. Die Phosphatasen könnten dabei die Aktivität von LFA-1 beeinflussen. Eine Inhibierung von PP1/PP2A könnte also die Regulation der LFA-1 Konformation oder seiner Valenz stören. Dies hätte während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration neben der Blockade der ERM-Dephosphorylierung einen starken Effekt auf die Deadhäsion der Zellen von ICAM-1. Deshalb war es von Bedeutung, den Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 Avidität zu untersuchen.

In primären, humanen T-Lymphoblasten wurde die Expression von hoch-affinem LFA-1 (HA-LFA-1) nach PP1/PP2A Inhibition mittels Durchflußzytometrie analysiert. Zusätzlich wurde die LFA-1 Aktivität (Affinität + Valenz) auf naiven, murinen T-Zellen nach PP1/PP2A Inhibition mit Hilfe eines LFA-1-Aktivitätstests gemessen.

Die obere Reihe an FACS-Histogrammen in Abb. 3.17 A zeigt die Menge an hoch-affinem LFA-1 (mAb24) in T-Zellen, die mit DMSO oder einem der beiden PP1/PP2A-Inhibitoren (Calyculin A / Okadainsäure) behandelt wurden. Dabei stellen jeweils die durchgezogenen Kurven die Expression von hoch-affinem LFA-1 in unstimulierten Zellen dar. Gestrichelte Kurven repräsentieren Zellen, die mit $MgCl_2$ / EGTA stimuliert wurden. In dem jeweiligen Histogramm ist zu erkennen, dass die Menge an hoch-affinem LFA-1 (mAb24) nach Stimulation mit $MgCl_2$ und EGTA in jedem Ansatz stark erhöht war (Abb. 3.17 A). Bei Vergleich der mAb24-Färbung in unstimulierten T-Zellen (durchgezogene Kurven) war zu erkennen, dass die Expression von LFA-1 im hoch-affinen Zustand durch Vorbehandlung der Zellen mit Calyculin A oder Okadainsäure nicht wesentlich verändert war (im Vergleich zur DMSO-Kontrolle) (Abb. 3.17 A, Überlagerung). Auch in stimulierten Zellen (gestrichelte Kurven) war die Menge an hoch-affinem LFA-1 nach Behandlung mit Calyculin A oder Okadainsäure mit der in DMSO-behandelten Zellen vergleichbar (Abb. 3.17, Überlagerung).

Die untere Reihe an FACS-Histogrammen in Abb. 3.17 A zeigt die Expression von gesamtem LFA-1 auf der Zelloberfläche durch Färbung mit Hilfe des spezifischen Antikörpers mAb38. In diesen Histogrammen sind lediglich Färbungen unstimulierter Zellen dargestellt (durchgezogene Kurven), da eine Stimulation mit $MgCl_2$ / EGTA keinen Einfluss auf die Expression von gesamtem LFA-1 hat (vgl. Abb. 3.5). Es wurden wiederum Zellen, die mit DMSO als Kontrolle oder den Inhibitoren Calyculin A / Okadainsäure behandelt wurden, miteinander verglichen. Die Menge von gesamtem LFA-1 auf der Zelloberfläche war in allen

Ansätzen sehr hoch (Abb. 3.17, untere Reihe). Bei Überlagerung der Kurven war zu erkennen, dass die Expression von gesamtem LFA-1 nach Behandlung der Zellen mit Calyculin A oder Okadainsäure vergleichbar mit der LFA-1-Expression der DMSO-Kontrolle war (Abb. 3.17 A, Überlagerung).

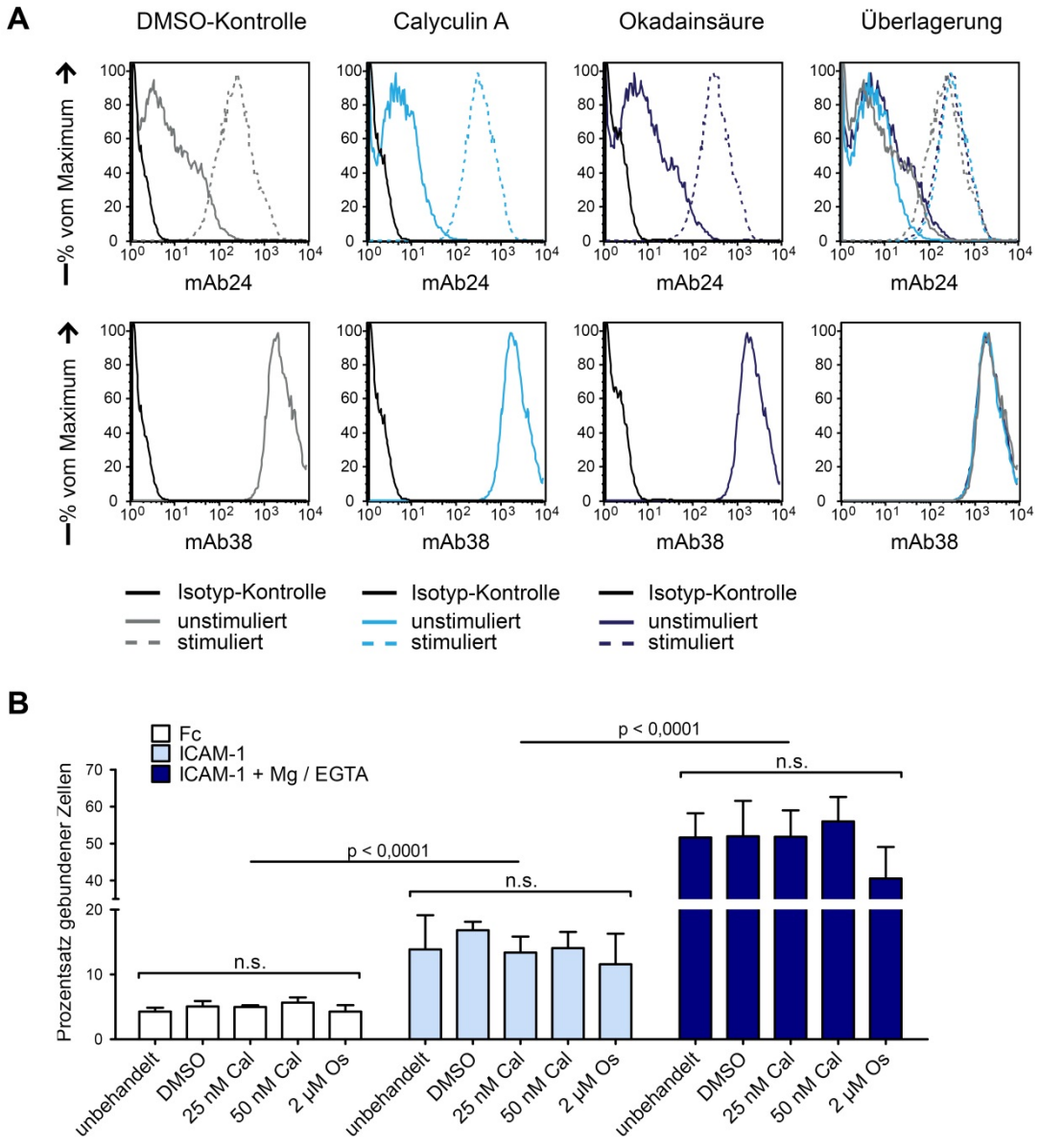

Abb. 3.17: Kein Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 Aktivität.
(A) Primäre, humane T-Zell-Lymphoblaten wurden mit 50 nM Calyculin A, 2 µM Okadainsäure oder DMSO als Kontrolle vorinkubiert und die Expression von hoch-affinem LFA-1 (durch mAb24) sowie Gesamt-LFA-1 (durch mAb38) mittels Durchflußzytometrie analysiert. Stimulation = 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA. Dargestellt sind repräsentative FACS-Histogramme (n=3). **(B)** Naive, murine T-Zellen wurden mit Calyculin A (Cal), Okadainsäure (Os) oder DMSO als Kontrolle inkubiert und ein LFA-1-Aktivitätstest mittels ICAM-1-gekoppelter „Beads“ (ICAM-1) durchgeführt**.** Die Zellen wurden zusätzlich mit 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA stimuliert (ICAM-1 + Mg / EGTA). Als Kontrolle dienten IgG1/Fc-gekoppelte „Beads“ (Fc). Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in einem Säulendiagramm dargestellt.

Abb. 3.17 B zeigt die Resultate des LFA-1-Aktivitätstests, der mit unbehandelten, DMSO-, Calyculin A und Okadainsäure-behandelten murinen, naiven T-Zellen durchgeführt wurde. Im Diagramm ist der Prozentsatz der Zellen dargestellt, die an Kontroll-„Beads“ („Fc“, ungefüllte Säulen) bzw. spezifisch an ICAM-1-gekoppelte „Beads“ („ICAM-1“, hellblaue Säulen) gebunden haben. Zusätzlich wurde die spezifische Bindung von T-Zellen, die mit $MgCl_2$ / EGTA stimuliert waren, an ICAM-1-gekoppelte „Beads“ untersucht („ICAM-1 + Mg / EGTA“, dunkelblaue Säulen).

Es war zu beobachten, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen unspezifisch an die Kontroll-„Beads“ banden (durchschnittlich 4,9 % ± 0,8) (Abb. 3.17 B, ungefüllte Säulen). Dagegen gingen die T-Zellen eine spezifische Interaktion mit ICAM-1-gekoppelten „Beads“ ein: der Prozentsatz gebundener Zellen stieg hochsignifikant auf einen durchschnittlichen Wert von 14,0 % ± 3,5 (Abb. 3.17 B, hellblaue Säulen). Eine Stimulation der Zellen mit $MgCl_2$ / EGTA induzierte wie in Abb. 3.17 A gezeigt, den Übergang zu hoch-affinem LFA-1. Der Prozentsatz an Zellen, die im stimulierten Zustand spezifisch an ICAM-1-gekoppelte „Beads“ banden, stieg deshalb hochsignifikant auf einen durchschnittlichen Wert von 50,4 % ± 8,5 (Abb. 3.17 B, dunkelblaue Säulen). Dies entspricht einer Erhöhung des Prozentsatzes der gebundenen Zellen um den Faktor 3,6. Die Funktionalität des Tests war damit nachgewiesen.

Um den Effekt der PP1/PP2A Inhibitoren auf die LFA-1 Avidität zu quantifizieren, wurde die spezifische Bindung der unterschiedlich behandelten Zellen an ICAM-1-gekoppelte „Beads“ untereinander verglichen. Der Prozentsatz an Zellen, die spezifisch an ICAM-1 auf den „Beads“ banden, war zwischen unbehandelten, DSMO-, Calyculin A und Okadainsäure-behandelten Zellen nicht signifikant verändert (Abb. 3.17 B, hellblaue Säulen). Auch im stimulierten Zustand war kein Einfluss der Inhibitoren auf die spezifische Bindung an ICAM-1 zu beobachten (Abb. 3.17 B, dunkelblaue Säulen).

Ein Einfluss der PP1/PP2A Inhibitoren auf die LFA-1 Aktivität konnte damit ausgeschlossen werden. Die Analyse der LFA-1-Expression mittels Durchflußzytometrie erlaubte die Untersuchung des Effekts auf die Konformation einzelner LFA-1 Moleküle. Der Aktivitätstest beinhaltete zusätzlich einen zweiten Parameter der LFA-1 Aktivität, die Valenz. Beide wurden weder durch Calyculin A noch durch Okadainsäure merklich beeinflusst. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass PP1 und PP2A keinen Einfluss auf die LFA-1 Avidität haben. *In vitro*-Effekte der PP1/PP2A Inhibition auf die T-Zellfunktion sollten demnach nicht auf einer veränderten Aktivität von LFA-1 basieren.

3.4.3 Verminderte Adhäsion von T-Zellen mit inaktiver PP1/PP2A an ICAM-1

Ein wesentlicher Schritt der T-Zellmigration *in vivo* ist die Adhäsion der Zelle über LFA-1 an das ICAM-1 exprimierende Endothel. Die Abhängigkeit dieser Interaktion von aktivem PP1 und PP2A sollte *in vitro* mit Hilfe des statischen Adhäsionstests untersucht werden. Dazu wurden mit Calyculin A bzw. Okadainsäure behandelte Zellen auf eine mit rekombinantem ICAM-1 beschichtete Oberfläche gegeben und ihre Adhäsion an diese analysiert.

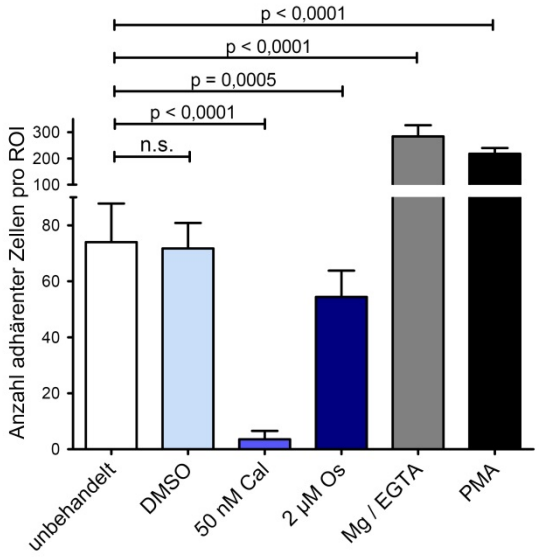

Abb. 3.18: Verminderte Adhäsion an ICAM-1 nach PP1/PP2A Inhibition.
TK1-Zellen wurden mit Calyculin A (Cal) und Okadainsäure (Os) vorinkubiert und für 20 min auf eine mit ICAM-1 beschichtete Oberfläche gegeben. Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen mit 5 mM $MgCl_2$ und 2 mM EGTA bzw. 20 ng/ml PMA stimuliert. Nicht-adhärente Zellen wurden abgewaschen; adhärente Zellen mit Hilfe des AxioVision CellCount Moduls in fünf verschiedenen ROIs („region of interest“) ausgezählt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt (n=5).

Die Stimulation der Zellen mit $MgCl_2$ und EGTA versetzte LFA-1, wie bereits gezeigt, in den hoch-affinen Zustand. Die Anzahl der Zellen, die pro definierter Fläche an ICAM-1 adhärierten, stieg dadurch um den Faktor 3,84 (unbehandelt = 74,0 ± 13,8; $MgCl_2$/EGTA = 284,2 ± 42,7) (Abb. 3.18). Eine Stimulation mit PMA erhöht die Mobilität von LFA-1 Molekülen in der fluiden Plasmamembran und ermöglicht dadurch die Bildung von „Cluster“ (LFA-1 Valenz) (Kucik et al., 1996). Die Anzahl der Zellen, die an ICAM-1 adhärierten, stieg dadurch hochsignifikant auf 217,8 ± 21,9 an (Abb. 3.18).

Nach Behandlung der Zellen mit Calyculin A war die LFA-1 vermittelte Adhäsion an ICAM-1 stark reduziert. Die Anzahl adhärenter Zellen sank hochsignifikant um den Faktor 20,56 auf 3,6 ± 3,0, verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 3.18). Auch bei Inkubation der Zellen

mit Okadainsäure war die Adhäsion an ICAM-1 wesentlich beeinträchtigt: es adhärierten nur noch 54,4 ± 9,4 Zellen.

Nach Inhibierung von PP1 und PP2A war die LFA-1 vermittelte Adhäsion an ICAM-1 *in vitro* sehr stark reduziert. Aktive Phosphatasen scheinen demnach essentiell für die LFA-1 vermittelte T-Zell-Adhäsion zu sein. Ein direkter Einfluss der Inhibitoren auf die LFA-1 Aktivität konnte ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 3.4.2). Eine defiziente Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 konnte somit nicht die Ursache für die verminderte Adhäsion sein.

Es konnte bereits in Kapitel 3.2.2 gezeigt werden, dass PP1 und PP2A ERM-Proteine dephosphorylieren. Eine Inhibition der Phosphatasen führt zur verstärkten Phosphorylierung der ERM-Proteine (vgl. Abb. 3.6). Dies hat eine kontinuierliche Assoziation der Plasmamembran mit dem Zytoskelett zur Folge. Während der Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 muss das Zytoskelett jedoch flexibel sein, um eine Polarisation der Zelle zu ermöglichen. Die T-Zell-Polarisation beinhaltet die Ausbildung eines vorderen und hinteren Endes durch Reorganisation von Aktin und Myosin (vgl. Kapitel 1.3.1). Ist ein kontinuierlicher Wechsel von Assoziation und Dissoziation der Membran mit dem Zytoskelett durch hohe pERM-Mengen aufgrund inaktiver PP1/PP2A nicht gewährleistet, ist die Reorganisation gestört. Die Zelle kann nicht adhärieren. PP1 und PP2A scheinen damit essentiell für die Regulation der ERM-Aktivität während der LFA-1 vermittelten T-Zell-Adhäsion an ICAM-1 zu sein.

3.4.4 Reduktion der chemotaktischen und transendothelialen T-Zellmigration durch inaktive PP1/PP2A

Die Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation durch PP1 und PP2A für die T-Zellmigration sollte genauer untersucht werden. Dazu wurde die Aktivität von PP1 und PP2A durch den Inhibitor Calyculin A in T-Zellen blockiert und anschließend zwei Arten von Transmigrationstests durchgeführt. Bei der ersten Variante wurde die Migration von primären, murinen T-Lymphoblasten durch 5 µm große Poren in Richtung des chemotaktisch wirksamen Stoffes SDF1α in einem Zweikammersystem untersucht (chemotaktische Migration). Die durchschnittliche Größe einer T-Zelle beträgt 8-10 µm (eigene Messwerte). Um durch eine nur 5 µm große Pore wandern zu können, muss sich die T-Zelle aktiv verformen. Die dafür notwendige starke Veränderung der Morphologie ist nur durch ein flexibles Zytoskelett möglich. Neben der Chemotaxis gibt der Test so auch Aufschluss über die Flexibilität oder Steifigkeit der Zelle.

Bei einer zweiten Variante wurde die Transmigration von primären, murinen T-Lymphoblasten über ein Endothel, bestehend aus einem konfluenten bEnd5-Zellrasen, ebenfalls in Richtung eines SDF1α-Gradienten im Zweikammersystem analysiert (transendotheliale

Migration). Hierbei werden die Endothelzellen mit TNF-α stimuliert, um die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 zu induzieren (nicht gezeigt). T-Zellen können damit LFA-1 abhängig aus dem oberen Kompartiment durch die Endothelzellen in das untere Kompartiment des Zweikammersystems wandern.

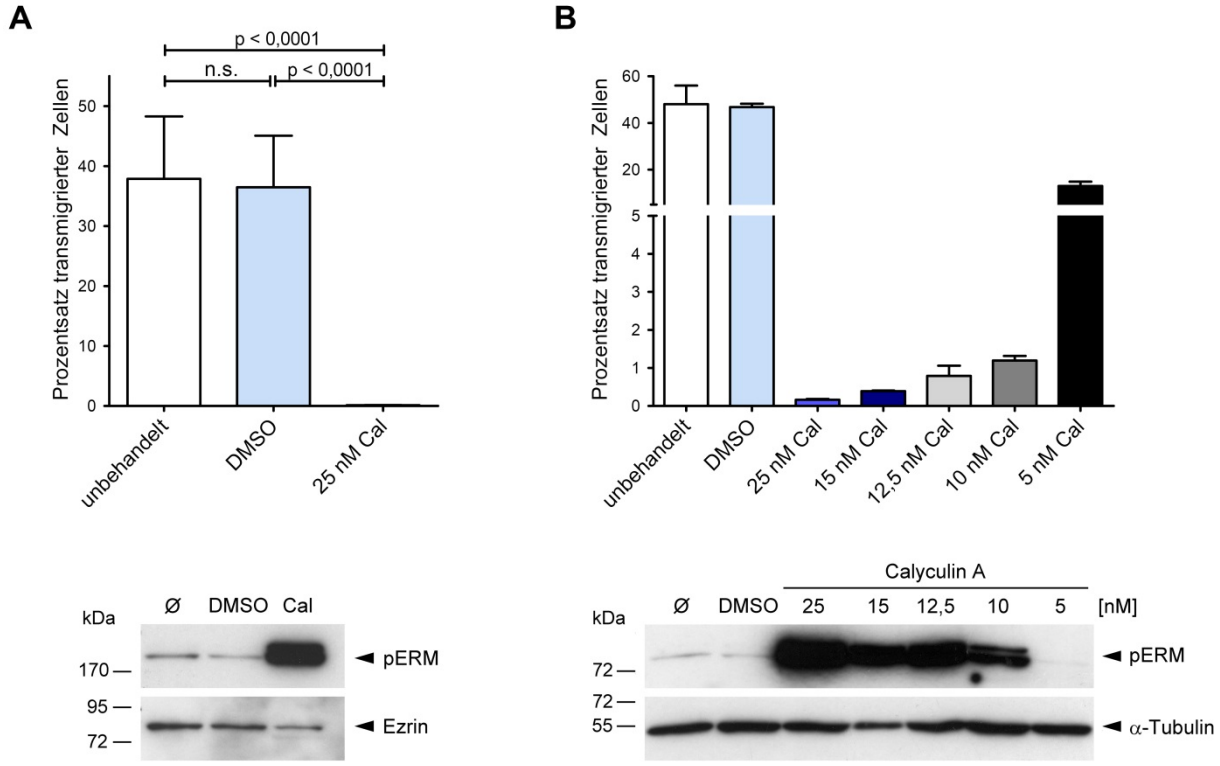

Abb. 3.19: Verminderte chemotaktische Migration nach PP1/PP2A Inhibition.
(A) Primäre, murine T-Lymphoblasten wurden mit 25 nM Calyculin A (Cal) vorinkubiert. Die chemotaktische Migration in Richtung SDF1α über 5 µm Poren wurde für 1,5 h im Zweikammersystem analysiert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind im Säulendiagramm dargestellt. **(B)** Der Effekt wurde auch in Abhängigkeit von der Calyculin A-Konzentration untersucht. Zu Kontrollzwecken wurde in jedem Experiment die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa) nach Calyculin A Behandlung (Cal) im Immunoblot analysiert. ø = unbehandelte Zellen, DMSO = DMSO-behandelte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa).

Nach PP1/PP2A Inhibition nahm die chemotaktische Migration der Zellen in Richtung SDF1α hochsignifikant ab (Abb. 3.19 A). Fast 40 % der unbehandelten Zellen (37,9 % ± 10,4) bzw. DMSO-behandelten Zellen (36,5 % ± 8,6) wanderten durch die 5 µm großen Poren, während nahezu keine Calyculin A-behandelten Zellen transmigrierten (0,12 % ± 0,04).

Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration des Inhibitors (Abb. 3.19 B): je niedriger die Calyculin A-Konzentration war, desto mehr Zellen erreichten das untere Kompartiment des Zweikammersystems. Bei einer Konzentration von 5 nM Calyculin A konnten 13,0 % (± 1,8) der Zellen durch die Poren wandern. Die Transmigrationsrate war jedoch immer noch

stark reduziert, verglichen mit unbehandelten (48,1 % ± 8,0) oder DMSO-behandelten (46,8 % ± 1,8) Zellen (Abb. 3.19 B). Bei Konzentrationen über 12,5 nM Calyculin A wanderten weniger als 1 % der Zellen ins untere Kompartiment. Diese stark reduzierte chemotaktische Migration korrelierte mit erhöhten Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen nach PP1/PP2A Inhibition (Abb. 3.19 A, B). Der Effekt auf den pERM-Level war ebenfalls von der Konzentration des Inhibitors abhängig.

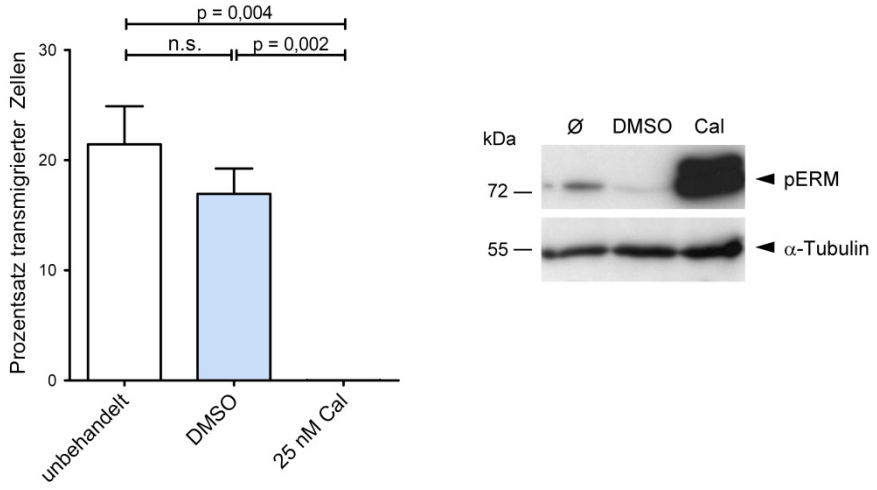

Abb. 3.20: Verminderte transendotheliale Migration nach PP1/PP2A Inhibition.
Primäre, murine T-Lymphoblasten wurden mit 25 nM Calyculin A vorinkubiert. Die transendotheliale Migration über Endotheliomzellen (bEnd5) in Richtung SDF1α wurde für 3 h im Zweikammersystem analysiert. Es ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (n=3). Zu Kontrollzwecken wurde die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (pEzrin/pMoesin = 78/81 kDa) nach Calyculin A Behandlung (Cal) im Immunoblot analysiert. ø = unbehandelte Zellen, DMSO = DMSO-behandelte Zellen. Ladekontrolle = α-Tubulin (55 kDa).

Die transendotheliale Migration der T-Zellen durch bEnd5-(Endotheliom)zellen war nach Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A signifikant reduziert (Abb. 3.20). Etwa 20 % der unbehandelten (21,4 % ± 3,5) bzw. DSMO-behandelten Zellen (16,9 % ± 2,3) erreichten das untere Kompartiment. Dagegen sind nur einzelne Calyculin A-behandelte Zellen (0,02 % ± 0,01) durch das Endothel gewandert. Der negative Effekt auf die transendotheliale Migration korrelierte mit einer stark erhöhten Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen (Abb. 3.20).
Die Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A führte damit zu einer starken Beeinträchtigung der chemotaktischen wie auch transendothelialen Migration.
Ursache für die verminderte Chemotaxis von T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A könnten die resultierenden, erhöhten Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen sein. Diese führen zu einer kontinuierlichen Assoziation von Membranproteinen und Zytoskelett. Die Zelle versteift und ist nicht mehr flexibel genug, um eine 5 µm enge Pore zu überqueren. Eine Migration in

Richtung eines chemotaktisch wirksamen Stoffes in das untere Kompartiment des Zweikammersystems ist nicht mehr möglich.

Die Beeinträchtigung der transendothelialen Migration von T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A könnte ebenfalls auf der Steifigkeit des Aktomyosin-Zytoskeletts beruhen. Eine T-Zelle muss flexibel sein, um zwischen zwei benachbarten Endothelzellen passieren zu können. Nur wenn PP1 und PP2A aktiv sind, kann die ERM-Aktivität kontrolliert und die notwendige Flexibilität des Zytoskeletts vermittelt werden. Zusätzlich könnte die reduzierte transendotheliale Migration nach Inhibierung von PP1/PP2A durch eine verminderte Adhäsion der T-Zellen an das Endothel bedingt sein. *In vitro* konnten T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A nicht mehr über LFA-1 an ICAM-1 binden (vgl. Kapitel 3.4.3). Möglicherweise trifft dies auch auf die Interaktion mit dem ICAM-1 exprimierenden Endothel zu. Eine Adhäsion der T-Zelle an das Endothel ist jedoch für die darauffolgende Transmigration durch das Endothel essentiell.

Die Resultate lassen vermuten, dass PP1 und PP2A wesentlich an der Signaltransduktion von LFA-1 zum Zytoskelett zur Vermittlung der Transmigration beteiligt sind. Die Phosphatasen regulieren dabei die Aktivität von Ezrin und Moesin über deren Phosphorylierungsstatus. Diese Regulation ist essentiell für die Flexibilität der T-Zelle und ermöglicht die LFA-1 vermittelte Transmigration in Richtung eines chemotaktischen Stoffes durch benachbarte Endothelzellen hindurch.

3.4.5 Beeinträchtigung der T-Zell-Rekrutierung in lymphatische Organe durch inaktive PP1/PP2A *in vivo*

Die Regulation der ERM-Aktivität durch die Phosphatasen PP1 und PP2A ist für die LFA-1 vermittelte Adhäsion an ICAM-1 sowie für die transendotheliale Migration *in vitro* wichtig (Kapitel 3.4.3, 3.4.4). Nach Blockierung der PP1/PP2A Aktivität durch spezifische Inhibitoren werden ERM-Proteine nicht mehr dephosphoryliert. Die Menge an phosphorylierten, aktiven ERM-Proteine erhöht sich um ein Vielfaches. Es kommt zur Versteifung der Zelle, da das Zytoskelett nicht mehr reorganisiert werden kann.

Um die physiologische Relevanz der ERM-Aktivitätsregulation zu prüfen, sollte der Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die T-Zellmigration *in vivo* untersucht werden. Unbehandelte sowie Calyculin A-behandelte, naive T-Zellen wurden fluoreszenzmarkiert und im Verhältnis 1:1 einer syngenen Empfänger-Maus intravenös gespritzt. Zwei Stunden nach dem adoptiven Transfer der Zellen wurde deren Rekrutierung in sekundäre lymphatische Organe (Lymphknoten und Milz) mikroskopisch analysiert.

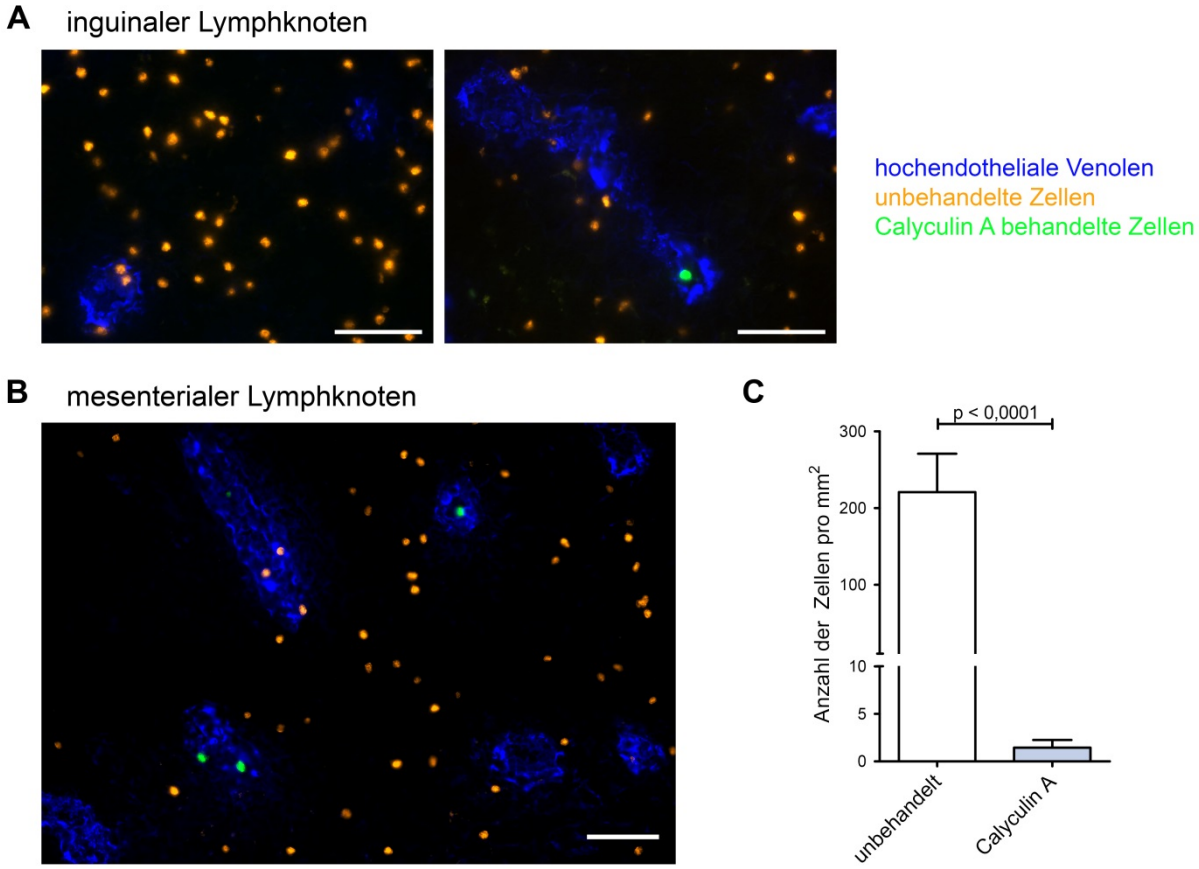

Abb. 3.21: Keine Rekrutierung naiver T-Zellen in den Lymphknoten nach PP1/PP2A Inhibition. Fluoreszenzmarkierte unbehandelte und Calyculin A-behandelte, naive T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 einer WT-Maus i.v. gespritzt. 2 h nach dem adoptiven Transfer wurden die Lymphknoten entnommen. Hochendotheliale Venolen wurden in Gefrierschnitten der **(A)** inguinalen und **(B)** mesenterialen Lymphknoten mit spezifischen Antikörpern gegen CD31/PECAM angefärbt. Maßstabsbalken = 50µm. **(C)** Die Anzahl unbehandelter und Calyculin A-behandelter Zellen in Gefrierschnitten der inguinalen Lymphknoten wurde mikroskopisch ausgezählt. Im Säulendiagramm ist die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro mm^2 dargestellt (n=3).

Für die Rekrutierung naiver T-Zellen in den Lymphknoten müssen diese aus dem Blut über hochendotheliale Venolen in die T-Zellzone im Parakortex des Lymphknotens einwandern (Miyasaka & Tanaka, 2004). Diese Migration wird vor allem durch Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 vermittelt. Zwei Stunden nach dem adoptiven Transfer konnten fluoreszenzmarkierte, unbehandelte Zellen im Parenchym sowohl der inguinalen als auch der mesenterialen Lymphknoten gefunden werden (Abb. 3.21 A, B). Calyculin A-behandelte Zellen dagegen erreichten das Parenchym des Lymphknotens nicht, oder nur in verschwindend geringer Anzahl. Sie verblieben innerhalb der hochendothelialen Venolen im Blut (Abb. 3.21 A, B). Offensichtlich konnten T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A nicht mehr aus dem Blut über das Endothel von hochendothelialen Venolen in das Parenchym des Lymphknotens einwandern. Die Quantifizierung der Zellzahlen in Gefrierschnitten des inguinalen Lymphknotens zeigte, dass die Anzahl Calyculin A-behandelter Zellen signifikant

reduziert war gegenüber der Anzahl unbehandelter Zellen. Unabhängig von ihrer Lokalisation innerhalb des Lymphknotens konnten durchschnittlich 221 ± 50 unbehandelte Zellen pro mm^2 gefunden werden. Dagegen wurden lediglich 1,4 ± 0,8 Calyculin A-behandelte Zellen pro mm^2 gezählt.

Die Rekrutierung naiver T-Zellen in das lymphatische Kompartiment der Milz (= weiße Pulpa) unterscheidet sich wesentlich von der Rekrutierung in den Lymphknoten. Deswegen soll diese näher erläutert werden.

Entgegen dem Lymphknoten sind in der Milz keine hochendothelialen Venolen zu finden. Lymphozyten gelangen mit dem Blutstrom über afferente Milzarterien in das Organ. Diese Arterien verzweigen sich zu zentralen Arteriolen, die inmitten der weißen Pulpa liegen (Abb. 3.22 A). Sie enden in den terminalen Arteriolen, die sich schließlich in den Marginalsinus der Marginalzone eröffnen (Mebius & Kraal, 2005). Die Marginalzone trennt die weiße von der roten Pulpa ab (Abb. 3.22 A). Der Fluss ist im Marginalsinus sehr langsam und damit die Scherkräfte gering. Dies ermöglicht den Übertritt der T-Zelle in die weiße Pulpa und die Rekrutierung in die T-Zellzone. Zellen, die nicht in die weiße Pulpa eingewandert sind, gelangen aus der Marginalzone in die rote Pulpa und von dort aus über venöse Sinusse zurück in die Rezirkulation. In der roten Pulpa werden apoptotische Zellen und gealterte Erythrozyten durch Makrophagen phagozytiert und dadurch aus der Zirkulation entfernt (Mebius & Kraal, 2005).

Mit dem Blut gelangen nicht nur Zellen, sondern auch Antigene in die Marginalzone. Diese können von spezialisierten B-Zellen und dendritischen Zellen gebunden und in die B-Zell-Follikel zur Auslösung einer Immunantwort transportiert werden (Yu et al., 2002). Auch Pathogene gelangen mit dem Blut in die Marginalzone. Diese werden durch „Pattern-Recognition“-Rezeptoren auf Makrophagen erkannt und von diesen phagozytiert (den Haan & Kraal, 2012). Es handelt sich dabei um zwei spezifische Unterarten von Makrophagen: Marginalzone-Makrophagen (MZM) und metallophile Makrophagen der Marginalzone (MMM). Letztere bilden einen inneren Ring in direkter Nähe zur weißen Pulpa aus (Abb. 3.22 A). Die MZM exprimieren spezifisch SIGLEC („sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin1“ = CD169) als „Pattern-Recognition“-Rezeptor an ihrer Oberfläche (O'Neill et al., 2013). Um in Gefrierschnitten der Milz zwischen roter und weißer Pulpa unterscheiden zu können, wurden metallophile Makrophagen als Grenze zwischen den Regionen mit Hilfe eines CD169-spezifischen Antikörpers angefärbt.

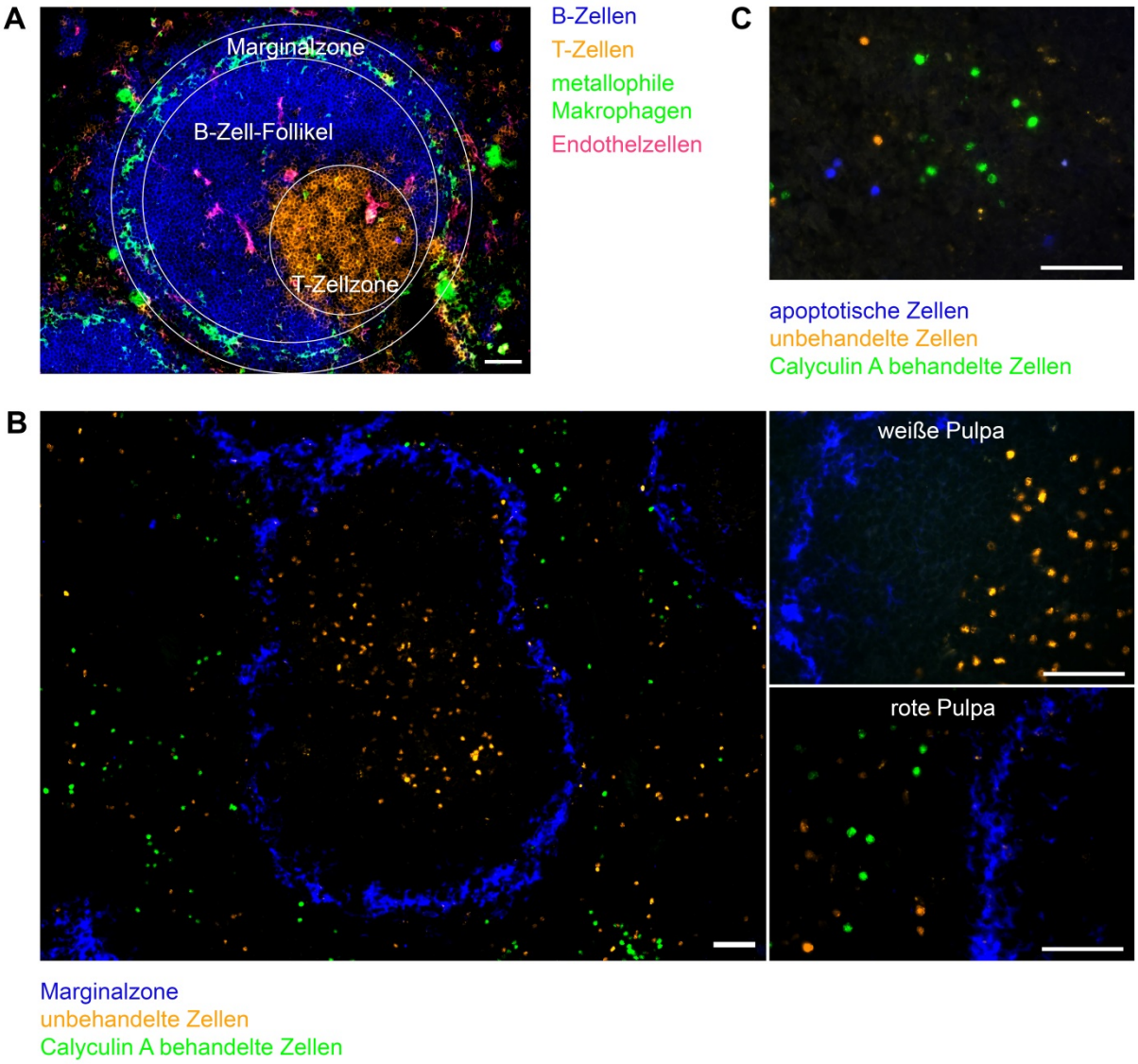

Abb. 3.22: Keine Rekrutierung naiver T-Zellen in die weiße Pulpa nach PP1/PP2A Inhibition.
(A) In einem Übersichtsbild der Milz sind die Marginalzone, die B-Zell-Follikel und die T-Zellzone der weißen Pulpa dargestellt durch Färbung von T-Zellen (CD3-positiv), B-Zellen (CD45R/B220-positiv), metallophilen Makrophagen (CD169-positiv) und Endothelzellen (CD31-positiv). **(B)** Fluoreszenz-markierte unbehandelte wie Calyculin A-behandelte, naive T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 einer WT-Maus i.v. gespritzt. 2 h nach dem adoptiven Transfer wurde die Milz entnommen. Die Marginalzone der weißen Pulpa wurde durch Färbung der metallophilen Makrophagen sichtbar gemacht. **(C)** Zu Kontrollzwecken wurde gespaltene Caspase 3 als Marker für apoptotische Zellen blau angefärbt. Maßstabsbalken = 50µm.

Viele unbehandelte Zellen erreichten die T-Zellzone der weißen Pulpa. Calyculin A-behandelte Zellen mit inaktiven PP1/PP2A konnten dagegen nicht in die T-Zellzone einwandern (Abb. 3.22 B). Die Aktivität von PP1/PP2A scheint damit wichtig dafür zu sein, dass naive T-Zellen aktiv aus dem Marginalsinus in die weiße Pulpa und dort in die T-Zellzone wandern können. Zellen mit inaktivem PP1/PP2A (Calyculin A-behandelte Zellen) konnten nur in der roten Pulpa in großen Mengen gefunden werden (Abb. 3.22 B). Wie

bereits erwähnt, werden Lymphozyten, die nicht aktiv in die weiße Pulpa transmigrieren, passiv von der Marginalzone in die rote Pulpa gespült. Eine aktive Einwanderung durch transendotheliale Migration ist dazu nicht notwendig.

Es sollte überprüft werden, ob die Calyculin A-behandelten Zellen apoptotisch sind und deshalb in der roten Pulpa akkumulieren. Dazu wurde gespaltene Caspase 3 als Marker des programmierten Zelltods (Apoptose) (vgl. Kapitel 3.4.1.2) in Gefrierschnitten der Milz angefärbt. Es konnten apoptotische Zellen in der roten Pulpa identifiziert werden, die positiv für gespaltene Caspase 3 waren (Abb. 3.22 C). Bei den entsprechenden Zellen handelte es sich jedoch nicht um die fluoreszenzmarkierten Zellen, die im adoptiven Transfer injiziert wurden. Weder unbehandelte, noch Calyculin A-behandelte Zellen zeigten eine spezifische Färbung der gespaltenen Caspase 3 (Abb. 3.22 C). Zellen mit inaktivem PP1/PP2A waren somit vital und sammelten sich nicht aufgrund von Apoptose in der roten Pulpa an.

Diese Resultate bestätigen die Daten vorheriger *in vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen *in vivo*. Eine LFA-1 vermittelte Transmigration über Endothelzellen war *in vitro* abhängig von der Aktivität der Phosphatasen PP1 und PP2A (vgl. Kapitel 3.4.4). Aktive PP1 und PP2A scheinen auch *in vivo* als Regulatoren der ERM-Aktivität für die Transmigration über das Endothel essentiell zu sein. Wurden PP1 und PP2A in ihrer Funktion als ERM-Phosphatasen inhibiert, konnten T-Zellen weder über hochendotheliale Venolen in die T-Zellzone des Lymphknotens noch über den Marginalsinus in die T-Zellzone der Milz einwandern. Durch die Hemmung der PP1- und PP2A-Aktivität können ERM-Proteine nicht mehr dephosphoryliert werden. Ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven ERM-Proteinen scheint jedoch essentiell für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration zu sein. Durch inaktive PP1/PP2A kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten phosphorylierter ERM-Proteine, was ein starres Zytoskelett verursacht. Die flexible Re-organisation des Zytoskeletts ist eine Voraussetzung für die LFA-1 vermittelte Adhäsion an und Transmigration durch Endothelzellen. PP1 und PP2A sind damit wesentlich an der Signaltransduktion während der spezifischen Rekrutierung von naiven T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe *in vivo* beteiligt.

4 Diskussion

4.1 Die Regulation der ERM-Aktivität durch PP1/PP2A als Basis für die T-Zellmigration

Eine effiziente T-Zellmigration beruht auf einem flexiblen Zytoskelett, welches durch Aktin-Polymerisation und Myosin-Kontraktion kontinuierlich umgestaltet wird. Im aktiven Zustand verknüpfen ERM-Proteine integrale Membranproteine mit kortikalem Aktin. Im inaktiven Zustand liegen sie als Mono- oder Dimere zytoplasmatisch vor. Sie sind wesentlich an der Signalweiterleitung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche ins Zellinnere beteiligt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern ERM-Proteine eine Rolle während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration spielen.
Erste, eigene Daten sprachen dafür, dass speziell die Aktivitätsregulation der ERM-Proteine während der T-Zellmigration wichtig für die Deadhäsion von ICAM-1 am Uropod ist. Eine defekte Deadhäsion in T-Zellen, die konstitutiv aktives LFA-1 exprimierten, korrelierte mit einer erhöhten ERM-Phosphorylierung (eigene Diplomarbeit: Fütterer, 2008). Aktive und inaktive ERM-Proteine kolokalisieren mit LFA-1 in der Deadhäsionsregion von auf ICAM-1 wandernden T-Zellen (Abb. 3.1). Signalproteine „downstream“ von LFA-1 scheinen die Regulation des Gleichgewichts zwischen aktiven (phosphorylierten) und inaktiven (dephosphorylierten) ERM-Proteinen zu vermitteln.

Um die Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation für die LFA-1 abhängige T-Zellmigration zu analysieren, wurde *in vitro* die Wanderung von T-Zellen, die konstitutiv aktives Ezrin (Ezrin-T567/D) transient exprimierten, auf ICAM-1 untersucht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der T-Zellen war durch Expression von konstitutiv aktivem Ezrin zunächst nicht signifikant verändert (Abb. 3.4). Bei der Quantifizierung der Migration konnte jedoch nicht zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen differenziert werden. Bei genauer Betrachtung konnte im Ezrin-T567/D-Ansatz eine kleine Population langsam-wandernder T-Zellen identifiziert werden, die mutmaßlich Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin repräsentierten. Diese Zellen wiesen stark reduzierte Wanderungsgeschwindigkeiten von unter 10 µm/min auf (Abb. 3.4). Wildtypische T-Zellen wandern dagegen im Mittel mit etwa 15 µm/min. T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin zeigten gegenüber Zellen mit wildtypischem Ezrin eine veränderte Morphologie mit stark verlängerten Uropoden auf (Abb. 3.3 B, Abb. 3.4 C). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass T-Zellen nicht von ICAM-1 deadhärieren können, wenn die Menge an aktiven ERM-Proteinen stark erhöht ist.
Diese Beobachtung wurde durch Ergebnisse der Forschungsgruppe um S. Shaw bestätigt. Diese erzeugten eine transgene Maus, deren T-Zellen spezifisch konstitutiv aktives Ezrin (Aminosäurensubstitution von Threonin durch Glutaminsäure: T567/E), oder wildtypisches

Ezrin als Kontrolle, exprimierten (Liu et al., 2012). Die in dieser Studie verwendeten T-Zellen von heterozygoten, Ezrin-T567/E transgenen Mäuse exprimierten wie die Ezrin-T567/D-transfizierten T-Zellen der vorliegenden Arbeit, neben dem mutanten (konstitutiv aktiven) auch endogenes Ezrin.
Die Wanderungsgeschwindigkeit von Ezrin-T567/E exprimierenden T-Zellen auf ICAM-1 war mit etwa 8 µm/min deutlich reduziert, verglichen mit circa 12 µm/min bei Ezrin-WT-exprimierenden T-Zellen (Liu et al., 2012). Der Phänotyp dieser langsam-wandernden T-Zellen wurde in der Publikation nicht näher erläutert. Jedoch wurde gezeigt, dass mehr Ezrin-T567/E exprimierende T-Zellen im statischen Adhäsionstest an ICAM-1 adhärierten als T-Zellen mit wildtypischem Ezrin (Liu et al., 2012). Eine verstärkte Adhäsion an ICAM-1 und damit verminderte Deadhäsion von ICAM-1 könnte die reduzierte Wanderungsgeschwindigkeit erklären.
Ein Einfluss von ERM-Proteinen auf die LFA-1 Aktivität und damit die Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1, kann aufgrund der Resultate der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Konstitutiv aktives Ezrin (T567/D) hatte keinen Einfluss auf die Menge an hoch-affinem LFA-1 auf der T-Zelloberfläche (Abb. 3.5). Auch die Aktivierbarkeit von LFA-1 durch Stimulation der Zellen mit Mg^{2+} / EGTA war durch konstitutiv aktives Ezrin nicht beeinträchtigt (Abb. 3.5). ERM-Proteine fungieren damit in der Signalkaskade „downstream“ und nicht „upstream“ von LFA-1. Eine veränderte LFA-1 Aktivität kann damit als Ursache für die verstärkte Adhäsion an und verminderte Deadhäsion von ICAM-1 in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin ausgeschlossen werden.
Diese Ergebnisse lieferten erste Erkenntnisse über die Rolle der ERM-Aktivität während der T-Zellmigration. Allerdings beeinträchtigte die Expression jeglicher GFP-Proteine (auch Ezrin-GFP) die Migration von T-Zellen auf ICAM-1. Nicht-fluoreszentes VSV-G beeinflusste die Migration nicht, erlaubte jedoch keine Identifizierung der transfizierten Zellen. Somit konnten durch die transiente Expression von konstitutiv aktivem Ezrin in T-Zellen lediglich initiale Eindrücke von der Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration gewonnen werden.

PP1 und PP2A wurden in der vorliegenden Arbeit das erste Mal als direkte ERM-Phosphatasen in T-Zellen identifiziert (Kapitel 3.2). Durch Inhibierung dieser Phosphatasen werden große Mengen an aktiven ERM-Proteinen induziert. Dieser Mechanismus erlaubte es, die Rolle der ERM-Proteine und ihrer Aktivitätsregulation bei der T-Zellmigration vertieft zu analysieren. Ein transienter „Knockdown“ von PP1 mittels siRNA führte aufgrund der Vermischung von transfizierten mit untransfizierten Zellen stets zu einer inhomogenen T-Zellpopulation (Daten nicht gezeigt). Eine Kotransfektion von GFP als Marker transfizierter Zellen war aufgrund dessen negativer Effekte auf die Zellmigration nicht möglich. Durch Verwendung der zellpermeablen PP1/PP2A-Inhibitoren Calyculin A und Okadainsäure

konnten große Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen in allen T-Zellen einer Population induziert werden (Abb. 3.6). Der Effekt umfasste sowohl Ezrin als auch Moesin. Die Analyse früh-apoptotischer Marker (Annexin V, gespaltene Caspase 3) zeigte, dass eine Behandlung der T-Zellen mit Calyculin A keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität hatte (Abb. 3.16). Die Spezifität der PP1/PP2A Inhibitoren für ERM-Proteine konnte in Immunoblot-Analysen nachgewiesen werden. Andere Phospho-Proteine wie phospho-IκB (Ser 32) (Abb. 3.7), phospho-p38 (Thr 180/Tyr 182) und phospho-ZAP70 (Tyr 319) (Daten nicht gezeigt) wurden in ihrem Phosphorylierungsstatus von den verwendeten PP1/PP2A Inhibitoren nicht beeinflusst.

Die Inhibition der Phosphatasen durch Calyculin A und Okadainsäure ermöglichte es damit, den Einfluss von hoch aktivem Ezrin/Moesin auf die einzelnen Schritte der „Multi-Step"-Kaskade bei der T-Zellmigration zu untersuchen. Dabei hat die PP1/PP2A Inhibition einen vergleichbaren Effekt in Bezug auf die Aktivität der ERM-Proteine wie die Expression von konstitutiv aktivem Ezrin (Abb. 4.1). Durch Verwendung der Inhibitoren konnte zusätzlich zur ERM-Aktivitätsregulation die Funktion von PP1/PP2A während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration analysiert werden.

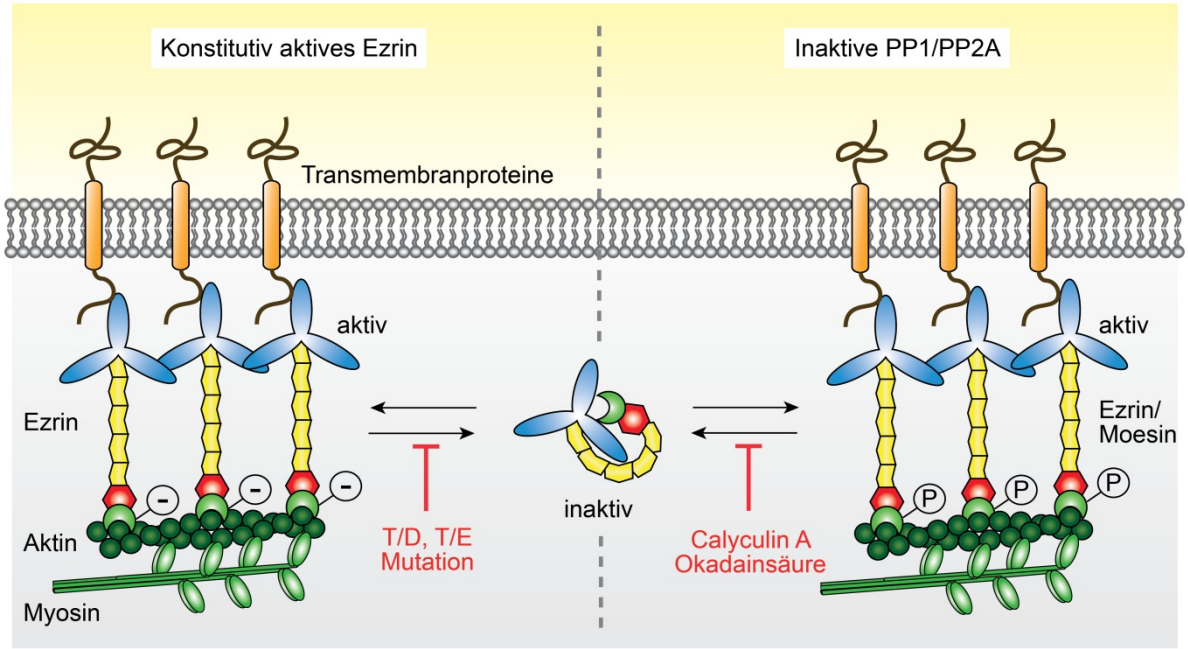

Abb. 4.1: Zwei experimentelle Möglichkeiten, die Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration zu untersuchen.
Die Expression von konstitutiv aktivem Ezrin (Ezrin-T567/D oder Ezrin-T567/E) stellt eine Möglichkeit zur Verschiebung des ERM-Gleichgewichts in T-Zellen dar. Auch die Inhibition von PP1/PP2A mit Hilfe der Inhibitoren Calyculin A oder Okadainsäure induziert hoch aktives Ezrin und Moesin. Letztere Methode erlaubt zudem, die Bedeutung der Signaltransduktion von LFA-1 über PP1/PP2A zu ERM-Proteinen zu untersuchen.

Ein wichtiger Schritt der T-Zellmigration ist die LFA-1 vermittelte Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 auf Endothelzellen. T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A und hohen Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen waren *in vitro* nicht in der Lage, an ICAM-1 zu adhärieren (Abb. 3.18). Eine verminderte Aktivität von LFA-1 als Folge der starken Phosphorylierung von ERM-Proteinen konnte sowohl hinsichtlich der LFA-1 Affinität wie auch der Valenz ausgeschlossen werden (Abb. 3.17). Der Adhäsionsdefekt scheint damit nicht auf einer defekten Aktivierung von LFA-1, sondern auf einer defekten Reorganisation des Zytoskeletts zu basieren. Für die Adhäsion an ICAM-1 muss eine T-Zelle polarisieren. Es kann angenommen werden, dass die dafür notwendige Ausbildung von Lamellipodien und Uropod aufgrund der verstärkten Assoziation von Plasmamembran und Zytoskelett durch aktive ERM-Proteine blockiert ist. Eine Videomikroskopie der 2D-Migration von T-Zellen mit inaktiven PP1/PP2A bestätigte, dass Zellen mit hohen pERM-Mengen nicht polarisieren und nicht an ICAM-1 adhärieren (Daten nicht gezeigt). Ein starres Zytoskelett aufgrund der erhöhten Mengen an pERM kann als Grund hierfür angenommen werden (Abb. 4.2).
Daten der Arbeitsgruppe um V. Niggli verdeutlichen, dass die Ausbildung eines Uropods während der T-Zellmigration von der ERM-Aktivität abhängig ist (Martinelli et al., 2013). Die elongierte Morphologie von T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin (EzrinT567/D) in der Videomikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung heben die Bedeutung der ERM-Aktivität für die Zytoskelett-Reorganisation während der Deadhäsion am Uropod hervor (Kapitel 3.1.3). Möglicherweise vermittelte endogenes Ezrin/Moesin die Polarisation der Ezrin-T567/D-transfizierten Zellen und die Adhäsion an ICAM-1. Während der Migration bewirkte jedoch konstitutiv aktives Ezrin, welches spezifisch im Uropod lokalisiert, eben dort eine Versteifung des Zytoskeletts, woraus eine defekte Deadhäsion und eine verlängerte Morphologie der T-Zellen resultierte (Abb. 4.2).

Von Endothel- und anderen Zellen freigesetzte Chemokine weisen T-Zellen den Weg aus dem Blutgefäß ins Gewebe sowie in entsprechende Regionen im interstitiellen Raum. Die Chemotaxis von T-Zellen ist damit ein wesentlicher Bestandteil der LFA-1 vermittelten Migration. Die Transmigration von T-Zellen durch 5 µm Poren in Richtung des Chemokins SDF1α war nach Inhibition von PP1/PP2A konzentrationsabhängig *in vitro* stark beeinträchtigt (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit rekapituliert Ergebnisse der Arbeitsgruppe um N. Gupta in B-Zellen. Diese zeigten, dass die Transmigration von B-Zellen durch 5 µm Poren in Richtung des Chemokins BLC nach Behandlung mit Calyculin A stark abnahm (Parameswaran et al., 2011). Calyculin A inhibierte die Chemokin-induzierte Dephosphorylierung von ERM-Proteinen und dadurch morphologische Zellveränderungen (Ausbildung von Membranausstülpungen) für die Initiation der B-Zellmigration (Parameswaran et al., 2011). Diese Daten bestätigen, dass die Calyculin A-sensitiven Phosphatasen PP1 und PP2A die

ERM-Aktivität und damit die Zytoskelett-Flexibilität während der chemotaktischen Migration von T- (und auch B-) Zellen regulieren.
In eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem Chemokin CCL21 in T-Zellen eine kurzfristige Dephosphorylierung von ERM-Proteinen induziert (Daten nicht gezeigt). In einer Veröffentlichung aus dem Labor von S. Shaw wurde gezeigt, dass ERM-Proteine auch als Antwort auf SDF1α in T-Zellen dephosphoryliert wurden (Brown et al., 2003). Calyculin A inhibierte die SDF1α-induzierte ERM-Dephosphorylierung und die Polarisation der Zelle, sowie die damit verbundene Ausbildung von Membranausstülpungen („Ruffles“) bei zeitgleichem Verlust der Mikrovilli (Brown et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Rolle der Phosphatasen PP1/PP2A als Regulatoren der ERM-Aktivität während der Chemotaxis hin. Dabei scheint eine Chemokin/Rezeptor-Interaktion zur Aktivierung von PP1/PP2A und damit Dephosphorylierung von ERM-Proteinen zu führen.
Daten der Arbeitsgruppe um J.K. Burkhardt bestätigen, dass ERM-Proteine in der Signalkaskade „downstream“ und nicht „upstream“ der Chemokinrezeptoren liegen. Sowohl die Expression des CCL19-Rezeptors CCR7 als auch die chemotaktische Migration in Richtung CCL19 war in Ezrin/Moesin-defizienten T-Zellen nicht beeinträchtigt (Chen et al., 2013).
Die ERM-Aktivität beeinflusst jedoch die Reorganisation des Zytoskeletts während der chemotaktischen Zellmigration. ERM-defiziente T-Zellen haben bei der Migration durch sehr enge Poren (3 µm) einen Nachteil gegenüber wildtypischen T-Zellen (Chen et al., 2013). Die Arbeitsgruppe um S. Shaw zeigte, dass die chemotaktische Migration von T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin (Ezrin-T567/E) durch 3 µm Poren reduziert war verglichen mit T-Zellen, die wildtypisches Ezrin exprimierten (Liu et al., 2012). Eine zyklische Aktivierung und Deaktivierung der ERM-Proteine ist damit entscheidend für die Flexibilität des Zytoskeletts während der chemotaktischen T-Zellmigration (Abb. 4.2).

Neben der chemotaktischen Migration war die transendotheliale Migration von T-Zellen mit hoch aktiven ERM-Proteinen (aufgrund inaktiver PP1/PP2A) stark reduziert (Abb. 3.20). Die Transmigration über entzündetes Endothel erfolgt durch Interaktion von LFA-1 auf den T-Zellen mit ICAM-1 auf dem Endothel (Laschinger & Engelhardt, 2000). Hierbei passieren die T-Zellen die Endothelzelleinzelschicht mittels parazellulärer Migration. Die Aktivität von LFA-1 sowie die Zytoskelett-Flexibilität stellen damit wichtige Parameter für eine erfolgreiche Transmigration dar. Da die LFA-1 Aktivität nicht von ERM-Proteinen beeinflusst wird, scheint die mangelnde Zytoskelett-Flexibilität Ursache für die reduzierte transendotheliale Migration von T-Zellen mit hoch aktiven ERM-Proteinen zu sein. Da die Inhibierung von PP1/PP2A auch die LFA-1 vermittelte Adhäsion der T-Zellen an ICAM-1 beeinträchtigte, blockiert das starre Zytoskelett aufgrund hoch aktiver ERM-Proteine möglicherweise zusätzlich die initiale Adhäsion während der transendothelialen Migration (Abb. 4.2).

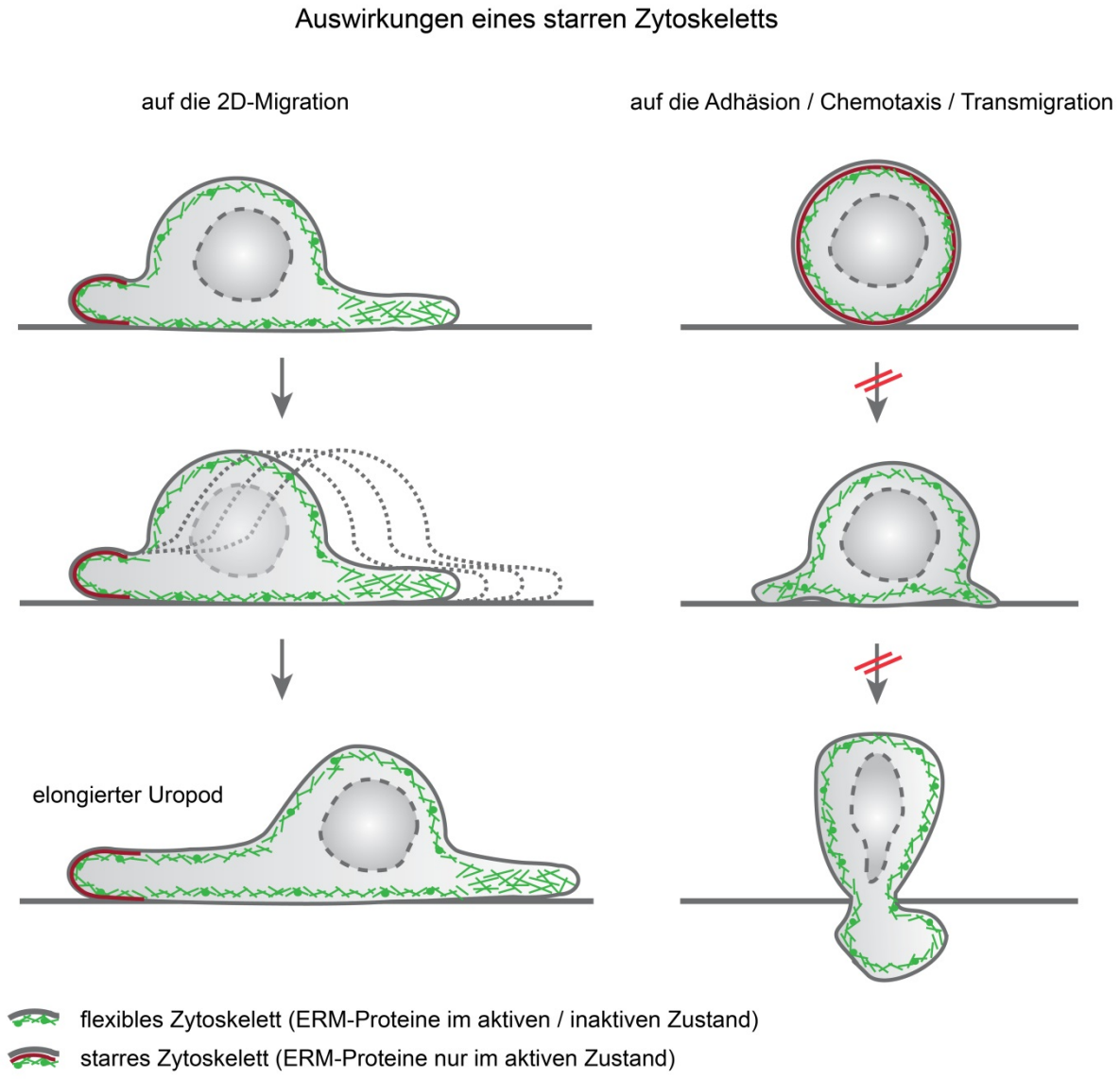

Abb. 4.2: Auswirkungen eines starren Zytoskeletts auf die LFA-1 vermittelte (2D) Migration sowie Adhäsion, Chemotaxis und Transmigration von T-Zellen *in vitro*.
Hoch aktive ERM-Proteine verursachen ein starres Zytoskelett durch kontinuierliche Assoziation der Plasmamembran mit kortikalem Aktomyosin. Infolgedessen ist die Deadhäsion der Zelle am Uropod während der 2D-Migration auf ICAM-1 in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin (Ezrin-T567/D oder -T567/E) gestört. Ebenso ist die Polarisation von T-Zellen mit hoch aktivem Ezrin aufgrund inaktiver PP1/PP2A defekt. Die LFA-1 vermittelte Adhäsion und in Folge die Transmigration durch Endothelzellen, sowie die Migration in Richtung eines Chemokins (Chemotaxis) kann nicht erfolgen.

Die vorgelegten Daten unterstützen damit die Hypothese, dass große Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen zu einer Versteifung der Zelle führen. Durch die kontinuierliche Assoziation von Plasmamembran und Zytoskelett verliert die Zelle an Flexibilität und die reversible Modulation der Zellform ist gestört. Y. Liu und Kollegen zeigten, dass die Spannkraft der Membran in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin (Ezrin-T567/E) zunimmt (Liu et al., 2012). Die Spannkraft von Membranen wird gemessen, indem die Membran punktuell in

Form von „Tether“ (dünne Membranschläuche) vom Zellkörper gezogen wird. Die dafür aufzubringende Zugkraft ist ein Maß für die Spannkraft der Membran. Je weniger die Membran mit dem darunterliegenden Zytoskelett assoziiert ist, desto niedriger ist die Spannkraft der Membran und desto weniger Zugkraft muss aufgebracht werden, um Membran-„Tether“ zu ziehen (Sheetz & Dai, 1996). Liegen ERM-Proteine konstitutiv aktiv in der Zelle vor, ist die Membran stark mit dem Zytoskelett verknüpft, und die aufzubringende Zugkraft für die Ausbildung von Membran-„Tether“ stark erhöht (Liu et al., 2012). Auf ähnliche Weise sollen in weiterführenden Experimenten die Membranflexibilität und Zytoskelett-Verankerung von T-Zellen mit hoch aktiven ERM-Proteinen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Benoit & Gaub, 2002) untersucht werden.

Die Resultate der *in vitro*-Experimente konnten mit Hilfe des „Homing“-Tests zur Untersuchung der T-Zell-Rekrutierung in sekundäre lymphatische Organe *in vivo* bestätigt werden. Die aktive Migration von naiven T-Zellen mit inaktiver PP1/PP2A über das Endothel von HEV in den Lymphknoten bzw. über das Endothel des Marginalsinus in die weiße Pulpa der Milz war defekt (Abb. 3.21, Abb. 3.22). Lediglich durch einen passiven Transport mit der Lymphe gelangten PP1/PP2A-inhibierte T-Zellen in die rote Pulpa der Milz. Auch bei geringerer Konzentration des Inhibitors (25 nM) erreichten nur wenige Calyculin A-behandelte T-Zellen das Lymphknotenparenchym bzw. die weiße Pulpa der Milz (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl rekrutierter, Calyculin A-behandelter Zellen war jedoch erhöht im Vergleich zur hohen Inhibitorkonzentration (50 nM). Dieses Resultat bestätigte, dass die T-Zell-Rekrutierung in Lymphknoten und Milz aufgrund der PP1/PP2A-Inhibierung gestört ist, und aktive PP1/PP2A als Regulatoren der ERM-Aktivität essentiell für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration *in vivo* sind.

Die Arbeitsgruppe um N. Gupta zeigte, dass B-Zellen nach Inhibition von PP1/PP2A durch Calyculin A nur begrenzt in Milz und Lymphknoten einwanderten (Parameswaran et al., 2011). Die Rekrutierung der Calyculin A-behandelten Zellen in die Milz war weniger stark beeinträchtigt als die Rekrutierung in den Lymphknoten (Parameswaran et al., 2011). Da die Daten durch Messung in der Durchflußzytometrie erhoben wurden, konnte zwar die Anzahl der rekrutierten B-Zellen im jeweiligen lymphatischen Organ bestimmt werden. Jedoch wurde dabei die Lokalisation der Zellen nicht berücksichtigt. Deshalb kann mit dieser Methode keine Aussage darüber gemacht werden, ob Calyculin A-behandelte B-Zellen in andere Kompartimente der Milz rekrutiert wurden als unbehandelte Zellen. Dennoch bestätigen diese Daten in B-Zellen die eigenen Daten in T-Zellen und heben die Bedeutung aktiver PP1/PP2A für die Migration von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe hervor.

Welche Schritte der „Multi-Step“-Kaskade *in vivo* genau von der Aktivität der ERM-Phosphatasen PP1/PP2A abhängig sind, war aus den Ergebnissen des „Homing“-Tests nicht ersichtlich. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Steffen Massberg (Medizinische Klinik und Poliklinik I, LMU München) sollen deshalb die einzelnen Schritte der Kaskade von T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A mittels Multi-Photonen-Mikroskopie im Lymphknoten *in vivo* analysiert werden (SFB 914-Zentralprojekt Z1).
Die Arbeitsgruppe um S. Shaw veröffentlichte bereits Ergebnisse einer Intravitalmikroskopie im Lymphknoten nach adoptivem Transfer von fluoresenzmarkierten, Ezrin-T567/E transgenen T-Zellen (Liu et al., 2012): die Rekrutierung von T-Zellen mit hoch aktivem Ezrin in den Lymphknoten war im Vergleich zu Ezrin-wt transgenen T-Zellen reduziert. Dabei waren das Entlangrollen der T-Zellen am Endothel und die feste Adhäsion an das Endothel durch konstitutiv aktives Ezrin nicht beeinträchtigt. Die Rate der transendothelialen Migration, die interstitielle Migration im Lymphknotenparenchym und die Auswanderung aus dem Lymphknoten wurden jedoch durch die Expression von hoch aktivem Ezrin negativ beeinflusst (Liu et al., 2012). Diese Daten zeigen, dass konstitutiv aktives Ezrin diejenigen Schritte der T-Zellrekrutierung stark beeinträchtigt, bei denen sich die Zelle stark verformen und das Zytoskelett flexibel sein muss.
Das Entlangrollen der T-Zellen am Endothel war nicht betroffen, obwohl die Menge an L-Selektin in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin leicht reduziert war (Liu et al., 2012). Laboreigene Arbeiten zeigten, dass L-Selektin nach Inhibition von PP1/PP2A durch Calyculin A oder Cantharidin (Inhibition PP2A > PP1) an der T-Zelloberfläche proteolytisch abgespalten wurde (T. Weisser, M. Laschinger, unveröffentlichte Daten). Inaktive PP1/PP2A induzieren erhöhte Mengen an phosphorylierten ERM-Proteinen, welche verstärkt an L-Selektin binden und die proteolytische Abspaltung dessen extrazelllulärer Domäne auslösen. Daten der Arbeitsgruppe um A. Ridley bestätigen dieses Ergebnis: können ERM-Proteine nicht an L-Selektin binden, erfolgt keine extrazelluläre Abspaltung von L-Selektin (Ivetic et al., 2004). Möglicherweise beeinflusst LFA-1 über PP1/PP2A und ERM-Proteine die proteolytische Abspaltung von L-Selektin an der Zelloberfläche. Eine derartige Signaltransduktion stellt eine potentielle Quervernetzung der einzelnen Schritte innerhalb der „Multi-Step“-Kaskade dar.

Die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Aktivitätsregulation der ERM-Proteine durch die Phosphatasen PP1/PP2A für die Verformung der T-Zelle durch Reorganisation des Zytoskeletts während der LFA-1 abhängigen Migration essentiell ist. Während in der Literatur die zugrundeliegende Signaltransduktionskaskade unerforscht blieb, konnte diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit das erste Mal in T-Zellen beschrieben werden.

4.2 Die Signaltransduktion von LFA-1 über PP1/PP2A zu ERM-Proteinen

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Signal, ausgelöst von LFA-1 an der Zelloberfläche, die ERM-vermittelte Modulation des Aktomyosin-Zytoskeletts während der LFA-1 abhängigen T-Zellmigration reguliert. Ein kontinuierlicher Wechsel zwischen aktiven und inaktiven ERM-Proteinen ist essentiell für Assoziation und Dissoziation von Plasmamembran und Zytoskelett und damit für die Flexibilität der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass LFA-1 und ERM-Proteine in der Deadhäsionsregion wandernder T-Zellen kolokalisieren (Abb. 3.1). Jedoch konnte eine direkte Interaktion von LFA-1 mit Ezrin oder Moesin nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Eine direkte Signalweiterleitung von LFA-1 über ERM-Proteine zum Zytoskelett war damit ausgeschlossen.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Signaltransduktion „downstream“ von LFA-1 die Aktivität von ERM-Proteinen reguliert. Dabei führte die Bindung von T-Zellen über LFA-1 an ICAM-1 *in vitro* spezifisch zur Dephosphorylierung von ERM-Proteinen (Abb. 3.12). Die alleinige Aktivierung von LFA-1 durch Induktion der hoch-affinen Konformation oder durch „Inside-Out“-Signale hatte keinen direkten Effekt auf den Aktivitätsstatus der ERM-Proteine in T-Zellen (Abb. 3.13, Abb. 3.14). Dadurch wurde bestätigt, dass die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 als „Outside-In“-Signal spezifisch eine intrazelluläre Signaltransduktion zur Regulation der ERM-Aktivität auslöst. Durch die Zellpolarisation induzierte Signale konnten als Auslöser für die Modulation des ERM-Phosphorylierungsstatus ausgeschlossen werden, da selbst nicht-adhärente T-Lymphoblasten eine polarisierte Form haben. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 die Dephosphorylierung der ERM-Proteine und die Reorganisation des Zytoskeletts direkt induziert.

Die Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A konnten im Rahmen dieser Arbeit als Bindeglied zwischen LFA-1 und ERM-Proteinen identifiziert werden. Beide Phosphatasen interagierten direkt mit LFA-1 (Abb. 3.11) und dephosphorylierten ERM-Proteine (Abb. 3.7). Ob PP1 und PP2A dabei redundante Funktionen aufweisen, kann nicht abschließend beantwortet werden. Nach Angaben des Herstellers inhibiert Calyculin A präferentiell PP1, und Okadainsäure vornehmlich PP2A (vgl. Kapitel 3.4.1). Die Auswirkungen eines PP1/PP2A Inhibitors auf die LFA-1 vermittelte Adhäsion und Migration von T-Zellen *in vitro* waren bei Verwendung von Calyculin A oder Okadainsäure vergleichbar. Dies würde für redundante Funktionen von PP1 und PP2A sprechen.

Dagegen weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass der Effekt von Calyculin A auf die Menge an pERM stärker ist als der Einfluss von Okadainsäure: bei geringerer Konzentration und kürzerer Inkubationszeit hatte Calyculin A in T-Zellen einen stärkeren Effekt auf den Phosphorylierungsstatus von ERM-Proteinen als Okadainsäure (Abb. 3.6). Diese Resultate lassen vermuten, dass die selektive Hemmung von PP1 einen stärkeren Effekt auf pERM hat als die selektive Hemmung von PP2A. PP2A scheint demnach im Vergleich zu PP1 eine untergeordnete Rolle bei der Dephosphorylierung von ERM-Proteinen zu spielen. Obwohl beide Phosphatasen im Uropod wandernder T-Zellen lokalisierten, konnte PP2A C in geringem Maße außerhalb dieser Deadhäsionsregion detektiert werden (Abb. 3.9). Die leicht unterschiedliche Lokalisation von PP1 und PP2A C in auf ICAM-1 wandernden T-Zellen unterstützt die Hypothese, dass die Funktionen der Phosphatasen nicht redundant sind.
Entgegen der Annahme, dass Calyculin A und Okadainsäure PP1 und PP2A selektiv hemmen, zeigten eigene Daten, dass Calyculin A beide Phosphatasen gleichermaßen inhibiert: sowohl die PP1- als auch die PP2A-vermittelte Dephosphorylierung von ERM-Proteinen konnte mit Hilfe von Calyculin A in nahezu identischem Ausmaß blockiert werden (Abb. 3.7). Möglicherweise kann die Frage nach der Redundanz von PP1 und PP2A mit den verwendeten Inhibitoren nicht geklärt werden. *In vitro* Experimente mit hoch-selektiven, rekombinanten (nicht zell-permeablen) Inhibitoren von PP1 (NIPP-1, DARPP-32, Inhibitor-2) (Beullens et al., 1999; Huang et al., 1999), bzw. von PP2A (I_1^{PP2A}) (Li et al., 1995), könnten Aufschluss über potentielle unterschiedliche Funktionen der Phosphatasen geben.

Die Phosphatasen PP1 und PP2A werden als Holoenzyme aus verschiedenen Untereinheiten gebildet. PP1δ konnte als katalytische Untereinheit und MYPT1 als regulatorische Untereinheit von PP1 in T-Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.3). Die Ausbildung eines PP1-Holoenzyms durch diese beiden Untereinheiten wurde auch in Fibroblasten beobachtet (Eto et al., 2005). Für das PP2A-Holoenzym konnte PP2A A als strukturelle Untereinheit und PP2A C als katalytische Untereinheit identifiziert werden (Kapitel 3.2.3). Da der spezifische Antikörper gegen PP2A C beide Isoformen (α und β) erkennt, konnte nicht zwischen den beiden Isoformen differenziert werden. Die Identifikation der regulatorischen Untereinheit, PP2A B, stellte sich aufgrund deren Diversität und Vielzahl als schwierig dar. Eigene, vorläufige Ergebnisse zeigten, dass PR55 als PP2A B-Untereinheit möglicherweise ausgeschlossen werden kann: eine Kopräzipitation von PR55 mit PP2A C oder LFA-1 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um PP2A B-Untereinheiten der PP2A B‘, PP2A B‘‘, PP2A B‘‘‘ Untergruppen als potentielle regulatorische Untereinheiten von PP2A in T-Zellen zu testen, bedarf es weiterer Untersuchungen mit Hilfe von Immunpräzipitationen oder durch massenspektrometrische Analyse eines anti-PP2A C Präzipitats aus T-Zelllysaten.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Kopräzipitation von LFA-1 mit PP1 und PP2A in T-Zellen lässt keine Rückschlüsse darauf zu, ob die Interaktion der Phosphatasen über die αL- oder die β2-Kette des LFA-1 Moleküls erfolgt. In der Literatur wurde beschrieben, dass Phosphatasen an die α-Kette von Integrinen binden. So bindet PP1 C aus neuronalen (PC12)-Zellen an α3- und an α1-Integrine (Mutz et al., 2006). PP1 C bindet in Blutplättchen an die αIIb-Kette von αIIbβ3-Integrinen (Vijayan et al., 2004). PP2A C bindet ebenfalls in Blutplättchen an die αIIb-, nicht aber an die β3-Kette von αIIbβ3-Integrinen (Gushiken et al., 2008). Präzipitationen mit synthetischen Peptiden, die entweder Teilen oder der vollständigen zytoplasmatischen Domäne der Integrin α-Kette entsprachen, zeigten, dass PP1 C mit der membran-proximalen, zytoplasmatischen Region von α3- und α1-Integrin am GFFKR-Motiv interagiert (Mutz et al., 2006). *In vitro* wurde mit Hilfe von Peptidsequenzen ein (R/K)(V/I)xF-Motiv für die Bindung von PP1 C an dessen regulatorische Untereinheiten identifiziert (Egloff et al., 1997). Ein solches Motiv ist auch in den zytoplasmatischen Domänen der α3-, α1-, αIIb- und der αL-Kette in direkter Nähe zur Transmembrandomäne zu finden (Abb. 4.3). Die Substitution des Lysin(K)-, Valin(V) oder Phenylalanin(F)-Restes durch einen Alanin(A)-Rest in der αIIb-Kette führt dazu, dass PP1 C nicht mehr binden kann (Vijayan et al., 2004). Damit stellt das (R/K)(V/I)xF-Motiv in den α–Ketten der Integrine eine Bindestelle für PP1 C dar.

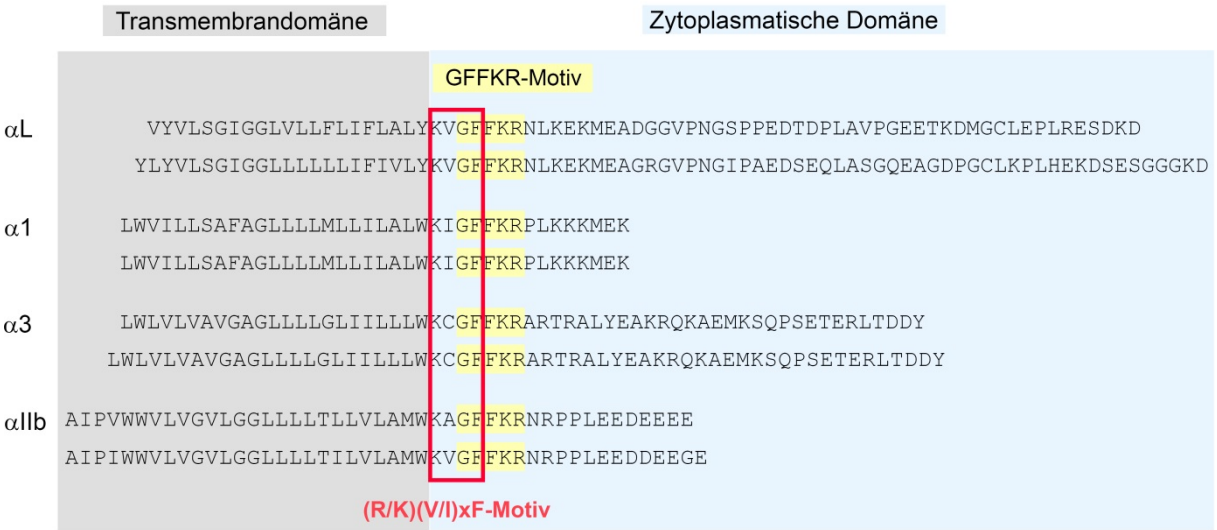

Abb. 4.3: Darstellung der Aminosäuresequenzen der Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen der αL-, α1-, α3- und αIIb-Integrinketten.
Die Aminosäuresequenzen der murinen (jeweils obere) und humanen (jeweils untere) α-Ketten von αL-, α1-, α3- und αIIb-Integrinen sind dargestellt. Das in den α-Ketten hoch konservierte GFFKR-Motiv ist in Gelb hervorgehoben. Das (R/K)(V/I)xF-Motiv als potentielles Bindemotiv von PP1/PP2A ist rot markiert. Sequenzen: UniProt murines αL: Q9R200, α1: Q3V3R4, α3: Q62470, αIIb: Q9QUM0; humanes αL P20701, α1: P56199, α3: P26006, αIIb: P08514.

Die Arbeitsgruppe um K.V. Vijayan zeigte, dass PP2A C membran-proximal nahe des hoch-konservierten (KV)GFFKR-Motivs an αIIb bindet (Gushiken et al., 2008). PP2A C bindet damit möglicherweise über dieselbe Binderegion wie PP1 C an Integrine.
Eigene Daten zeigten, dass PP1 C auch bei Deletion der GFFKR-Sequenz der αL-Kette (LFA-$1^{d/d}$ T-Zellen) mit LFA-1 interagierte (eigene Diplomarbeit: Fütterer, 2008). Dieses Resultat spricht gegen eine Beteiligung des GFFKR-Motivs an der direkten Interaktion von PP1 C mit dem (R/K)(V/I)xF-Motiv der αL-Kette von LFA-1 (Abb. 4.3). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Existenz einer bislang unbekannten PP1 C-Bindestelle in der αL-Kette. Alternativ könnte die Bindung der Phosphatasen an LFA-1 durch direkte Interaktion der regulatorischen anstelle der katalytischen Untereinheit erfolgen. Diese Hypothese wird durch eigene Daten gestützt, die darauf hindeuten, dass die Interaktion der katalytischen Untereinheit PP1 C bzw. PP2A C mit LFA-1 indirekt über die jeweilige regulatorische Untereinheit erfolgt (Kapitel 3.3.1). Ein potentielles Bindemotiv der regulatorischen PP1-Untereinheit MYPT1 an αL-Integrin konnte bislang nicht identifiziert werden.

Ob PP1/PP2A durch die Interaktion mit LFA-1 zur Plasmamembran und damit zu ihren Zielproteinen (pERM) rekrutiert werden, oder ob die Interaktion mit LFA-1 die Aktivität von PP1/PP2A beeinflusst, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Eine Publikation von K.V. Vijayan und Kollegen zeigte, dass in Blutplättchen inaktives PP1 C konstitutiv mit der zytoplasmatischen Domäne von αIIbβ3-Integrin assoziiert. Nach Bindung von Fibrinogen an αIIbβ3 löst sich PP1 C als aktive Phosphatase vom Integrin, das Phosphorylierungsniveau von PP1-Zielproteinen nimmt ab (Vijayan et al., 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Integrin-Liganden-Interaktion die Aktivierung und / oder Dissoziation der Phosphatase und folglich die Desphosphorylierung der Zielproteine induziert. Eigene Daten zeigten, dass nach Bindung von LFA-1 auf T-Zellen an ICAM-1 ERM-Proteine dephosphoryliert werden (Abb. 3.12). Dies spricht für die Aktivierung der ERM-Phosphatasen PP1/PP2A nach Ligandenbindung an LFA-1. Ob allein die Aktivierung von LFA-1 durch Konformationsänderung bereits Einfluss auf die Aktivität und / oder Dissoziation von PP1/PP2A nimmt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Obwohl nach Mg^{2+}/EGTA-Stimulation (= Induktion von hoch-affinem LFA-1) in T-Zellen geringfügig weniger MYPT1 mit αL kopräzipitierte (Daten nicht gezeigt), blieb die Menge an pERM nach Stimulation der T-Zellen mit Mg^{2+}/EGTA unverändert (Abb. 3.13). Diese Resultate lassen vermuten, dass eine Konformationsänderung von LFA-1 bereits zur Dissoziation von PP1/PP2A führt, jedoch erst die Bindung von bivalentem ICAM-1 die Aktivierung der ERM-Phosphatasen auslöst.

Daten von F.C. Gushiken und Kollegen sprechen gegen eine Aktivierung von PP2A nach Integrin-Liganden-Interaktion: die Bindung von Fibrinogen an αIIbβ3-Integrin führt in Blutplättchen sogar zur Reduktion der PP2A-Aktivität und induziert keine Dissoziation der konstitutiv-gebundenen Phosphatase vom Integrin (Gushiken et al., 2008).
Resultate von R. Pankov und Kollegen lassen vermuten, dass β1-Integrin die Aktivität von gebundener PP2A negativ beeinflusst: ein Tryptophanrest an Position 775 in der zytoplasmatischen Region von β1-Integrin scheint für die Aktivitätshemmung gebundener PP2A essentiell zu sein. Ist dieser Tryptophanrest mutiert, ist PP2A aktiv und dephosphoryliert sein Zielprotein (Protein Kinase B) (Pankov et al., 2003). Diese Daten deuten darauf hin, dass PP1/PP2A durch Assoziation mit Integrinen in ihrer Aktivität gehemmt werden.
Eigene Daten zeigten dagegen, dass LFA-1 nur dann mit MYPT1 interagiert, wenn dieses nicht am Threoninrest 696 phosphoryliert ist, und PP1 aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat lässt vermuten, dass LFA-1 spezifisch mit aktivem PP1-Holoenzym interagiert und die Interaktion von PP1/PP2A mit LFA-1 vornehmlich der Rekrutierung aktiver ERM-Phosphatasen an die Plasmamembran, in die Nähe ihrer Zielproteine dient.

Möglicherweise beeinflussen die mit LFA-1 interagierenden Phosphatasen PP1/PP2A die Aktivität von LFA-1. In der β2-Kette von LFA-1 befindet sich ein Threonin-Triplet (Abb. 4.4), das durch „Inside-Out“-Signaltransduktion nach T-Zell-Rezeptor-Ligation oder Stimulation mit Phorbolester phosphoryliert wird (Fagerholm et al., 2004). Die Phosphorylierung des Threonin-Triplets führt zu erhöhter Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 (Nurmi et al., 2007). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe um S. Fagerholm zeigen, dass die Phosphorylierung dieses Threonin-Triplets der β2-Kette für die Kindlin-3 vermittelte Aktivierung von LFA-1 über das membran-distale NPxF-Motiv essentiell ist (Morrison et al., 2012, European Congress of Immunology). Auch die αL-Kette von LFA-1 weist Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen auf (Abb. 4.4). Die Phosphorylierung des Serinrest 1140 ist für die Aktivierung von humanem LFA-1 als Antwort auf eine „Inside-Out“-Signaltransduktion essentiell (Fagerholm et al., 2005).
Die Modulation der Phosphorylierung an diesen Positionen stellt einen potentiellen Mechanismus zur Regulation der LFA-1 Aktivität durch die Phosphatasen PP1/PP2A dar. Da die Inhibierung von PP1/PP2A jedoch keinen Effekt auf die LFA-1 Aktivität hatte, scheint diese Regulation nur unwesentlich oder nur unter bestimmten Bedingungen eine Rolle zu spielen.

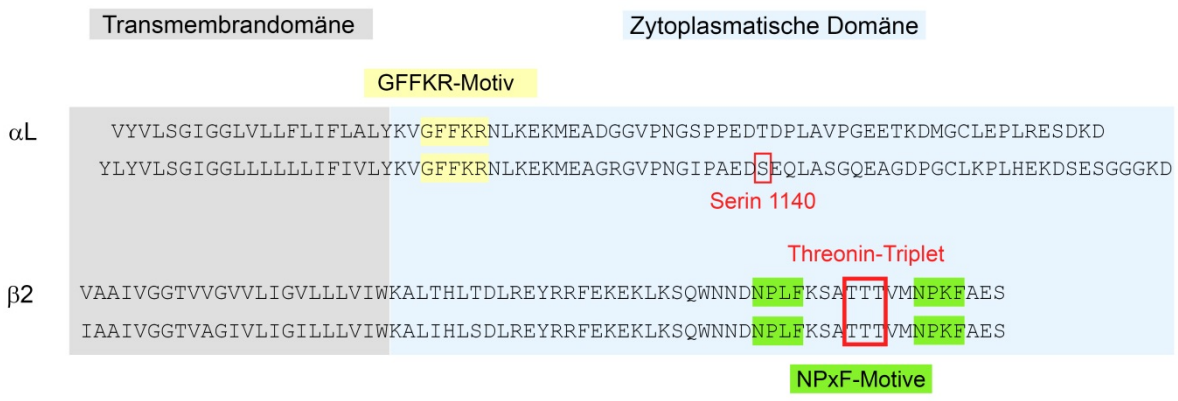

Abb. 4.4: Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domänen von αL und β2, die zur Regulation der LFA-1 Aktivität beitragen.
Es sind die Transmembrandomänen sowie zytoplasmatischen Domänen der murinen (jeweils obere Reihe) und humanen (jeweils untere Reihe) αL- bzw. β2-Kette von LFA-1 dargestellt. Das GFFKR-Motiv der αL-Kette ist in Gelb, die NPxF-Motive in der β2-Kette in Grün dargestellt. Serin- bzw. Threonin-Phosphorylierungsstellen, die mit der Aktivität von LFA-1 in Zusammenhang stehen, sind rot markiert. Sequenzen: UniProt murines αL: Q9R200, humanes αL: P20701, murines β2: P11835, humanes β2: P05107.

PP1 und PP2A konnten in der vorliegenden Arbeit das erste Mal als direkte Phosphatasen von ERM-Proteinen in T-Zellen identifiziert werden (Abb. 3.7). Die Interaktion der jeweiligen katalytischen Untereinheit von PP1/PP2A mit ERM-Proteinen scheint kurzweilig zu sein. Eine schnelle „On-Off"-Interaktion zwischen Phosphatase und Zielprotein erklärt, weshalb eine Kopräzipitation von PP1δ und Ezrin nur schwer möglich war (Abb. 3.8). Eine andere Erklärungsmöglichkeit stellt die Bindung der Phosphatasen PP1/PP2A über ihre regulatorischen Untereinheiten an ERM-Proteine dar. Die Arbeitsgruppe um K. Kaibuchi zeigte, dass rekombinantes MYPT1 *in vitro* mit seinem C-Terminus an die N-terminalen Domänen von Ezrin und Moesin bindet (Fukata et al., 1998). Möglicherweise wird die katalytische Untereinheit von PP1 durch zeitgleiche Bindung an den N-Terminus von MYPT1 zu den Zielproteinen rekrutiert. Auch die Interaktion von PP2A mit ERM-Proteinen kann über potentielle Binderegionen der regulatorischen Untereinheit an Ezrin/Moesin erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen wesentlich zur Aufklärung der Signaltransduktion „downstream" von LFA-1 während der T-Zellmigration bei (Abb. 4.5). Nach Bindung von LFA-1 an ICAM-1 regulieren die Phosphatasen PP1/PP2A die Aktivität von Ezrin und Moesin, wodurch die Reorganisation des Zytoskeletts vermittelt wird. Eine Störung der Signalweiterleitung von LFA-1 an das Zytoskelett führt dazu, dass die T-Zelle versteift und infolgedessen nicht mehr wandern kann. Die Regulation der ERM-Aktivität durch PP1 und PP2A „downstream" von LFA-1 ist demnach von entscheidender Bedeutung für die T-Zellmigration.

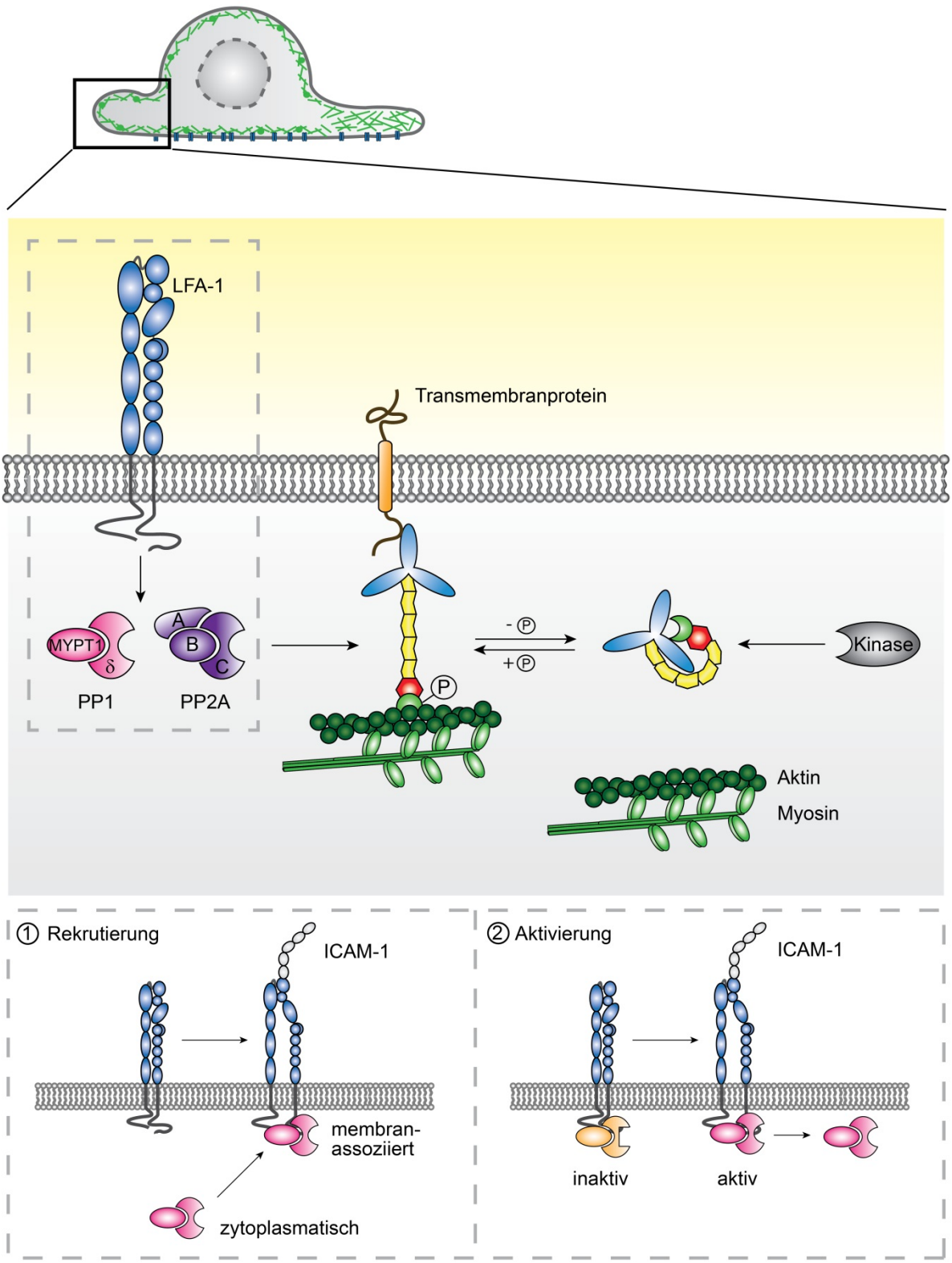

Abb. 4.5: Modell der Signaltransduktion bei der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration im Uropod. Nach Bindung von LFA-1 an ICAM-1 werden (1) aktive PP1/PP2A durch Interaktion mit LFA-1 an die Plasmamembran rekrutiert oder (2) durch LFA-1 aktiviert und anschließend freigesetzt. PP1 und PP2A dephosphorylieren Ezrin/Moesin direkt und regulieren dadurch deren Aktivitätszustand. Als Antagonisten der Phosphatasen fungieren Kinasen. Ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven ERM-Proteinen ist essentiell für die Reorganisation des Aktomyosin-Zytoskeletts und damit für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration.

Es gibt Hinweise darauf, dass ERM-Proteine an der antigenspezifischen Aktivierung von T-Zellen durch APC beteiligt sind. Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Regulation der ERM-Aktivität für die T-Zellmotilität während dem initialen Abtasten der APC durch die T-Zelle wichtig ist. Nach Antigenerkennung wird eine „reife“ immunologische Synapse zwischen T-Zelle und APC ausgebildet, in der LFA-1 Moleküle auf der T-Zell-Oberfläche einen peripheren Ring um zentral-gelegene T-Zell-Rezeptoren bilden. Durch Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 auf der APC wird der Kontakt stabilisiert und die polyklonale Aktivierung der T-Zelle ermöglicht. Die Arbeitsgruppe um S. Shaw zeigte, dass sowohl Ezrin als auch Moesin wichtig für die T-Zellaktivierung sind (Shaffer et al., 2009). Möglicherweise wird die Zytoskelett-Reorganisation in der immunologischen Synapse analog der T-Zellmigration durch eine Signaltransduktion von LFA-1 über PP1/PP2A zu ERM-Proteinen reguliert.

In vitro Studien zeigen, dass nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors Ezrin und Moesin dephosphoryliert werden, was die Relaxation des Zytoskeletts an der Kontaktzone und die Ausbildung einer Synapse durch eine glatte, weiche Membranoberfläche der T-Zelle erlaubt (Faure et al., 2004). Möglicherweise initiiert ein vom T-Zell-Rezeptor ausgelöstes „Inside-Out“-Signal die Aktivierung von LFA-1 und, nach Ligandenbindung, die PP1/PP2A vermittelte Inaktivierung der ERM-Proteine.

Während diese kurzfristige Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Dephosphorylierung von Ezrin und Moesin führt (Faure et al., 2004), induziert die langfristige Stimulation die Rephosphorylierung von beiden ERM-Proteinen in T-Zellen (Ilani et al., 2007; Shaffer et al., 2009). Nach Antigen-Bindung durch den T-Zell-Rezeptor wird das Glykoprotein CD43 durch Interaktion mit phosphorylierten ERM-Proteinen aktiv aus der T-Zell/APC-Kontaktzone in distale Regionen am entgegengesetzten Pol der Synapse rekrutiert (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001). Diese Rekrutierung verhindert, dass CD43 die Ausbildung der reifen Synapse zwischen T-Zelle und APC sterisch behindert. Die Mechanismen dieser Akkumulation von CD43 und phosphorylierten ERM-Proteinen am distalen Pol der T-Zelle in der Synapse stimmen möglicherweise mit denen der Rekrutierung von CD43, CD44 und phospho-ERM in den Uropod polarisierter T-Zellen während der LFA-1 vermittelten Migration überein.

Daten der Arbeitsgruppe um A. Bretscher zeigen, dass die Regulation des Ezrin/Moesin-Phosphorylierungsstatus wichtig für die Ausbildung einer immunologischen Synapse ist und weisen eine mögliche Beteiligung einer Calyculin A sensitiven Phosphatase an diesem Prozess auf (Ilani et al., 2007). Diese Daten weisen auf eine Funktion von PP1/PP2A bei der Aktivitätsregulation von ERM-Proteinen während der T-Zellaktivierung hin.

Das Lösen der LFA-1/ICAM-1 Bindung ist für die Deadhäsion von T-Zellen am Uropod, aber auch für das Ablösen der T-Zelle von der antigenpräsentierenden Zelle nach erfolgreicher T-Zell-Stimulation essentiell (Balkow et al., 2010). Die Signaltransduktion „downstream“ von LFA-1 zum Zytoskelett der T-Zelle vermittelt möglicherweise beide Vorgänge.

4.3 Kinasen als Antagonisten der ERM-Phosphatasen

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Regulation der ERM-Aktivität essentiell für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration ist. Es wurde nachgewiesen, dass PP1 und PP2A ERM-Proteine direkt dephosphorylieren (Abb. 3.7). Kinasen fungieren als ihre Antagonisten, indem sie ERM-Proteine phosphorylieren. In der Literatur wurden ROCK, PKCα/θ, LOK, Mst1/2/4 und SLIK als ERM-Kinasen beschrieben (vgl. Kapitel 1.4.3).

Die Rolle von ROCK als Kinase von ERM-Proteinen ist nicht vollständig geklärt. T. Matsui und Kollegen zeigten, dass ROCK *in vitro* ERM-Proteine phosphoryliert (Matsui et al., 1998). In Fibroblasten stellt ROCK jedoch keine ERM-Kinase dar (Matsui et al., 1999). Daten von J.H. Lee und Kollegen sprechen ebenfalls gegen die Phosphorylierung von ERM-Proteinen durch ROCK *in vitro* (Lee et al., 2004). Eigene Vorarbeiten zeigten, dass die Inhibierung von ROCK durch den Inhibitor Y27632 *in vitro* nur einen geringen Effekt auf die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen in T-Zellen hatte (eigene Diplomarbeit: Fütterer, 2008). Eine Interaktion von ROCK und Ezrin konnte durch Kopräzipitation nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Demnach hat ROCK als Kinase möglicherweise keinen direkten Effekt auf die Aktivität von Ezrin/Moesin in T-Zellen (Abb. 4.6).
ROCK kann die Aktivität von ERM-Proteinen auch auf indirekte Weise beeinflussen. In der Literatur wurde gezeigt, dass ROCK die regulatorische Untereinheit von PP1, MYPT1, an zwei Threoninresten phosphoryliert (Feng et al., 1999). Dies bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: nach Inhibierung von ROCK durch Y27632 in T-Zellen sank das Phosphorylierungsniveau von phospho-MYPT1 an den Aminosäureresten Threonin 696/694 und Threonin 853/852 (Abb. 3.10).
Die Phosphorylierung des Threoninrestes 696 von MYPT1 wirkt inhibitorisch auf die katalytische Untereinheit PP1 C des Holoenzyms (Feng et al., 1999). Eigene Daten zeigten, dass eine Inhibierung von PP1 durch Calyculin A in T-Zellen mit der Phosphorylierung von MYPT1 am Threoninrest 696/694 korreliert (Daten nicht gezeigt). ROCK scheint damit weniger durch direkte Phosphorylierung von ERM-Proteinen sondern vielmehr indirekt durch Phosphorylierung und dadurch Inhibierung der regulatorischen Untereinheit MYPT1 des PP1-Holoenzyms aktives Ezrin/Moesin zu induzieren (Abb. 4.6).
Daten aus der Literatur zeigen, dass die Phosphorylierung von MYPT1 am Threoninrest 850 durch ROCK die Interaktion mit Myosin blockiert (Velasco et al., 2002). Da der Effekt der ROCK-Inhibition auf den homologen murinen Phosphorylierungsrest (Threonin 852) in T-Zellen nur sehr schwach war (Abb. 3.10), ist davon auszugehen, dass dieser Regulationsmechanismus in T-Zellen nur von geringer Bedeutung ist (Abb. 4.6).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Funktion von PP1 – in Bezug auf das Zytoskelett – in T-Zellen weniger stark auf die Inaktivierung der leichten Myosin-Kette, sondern überwiegend auf die Regulation der ERM-Aktivität konzentriert ist. Gleichzeitig lassen die Daten vermuten, dass Calyculin A in T-Zellen mit hoher Spezifität die PP1/PP2A induzierte Dephosphorylierung von Ezrin und Moesin inhibiert.

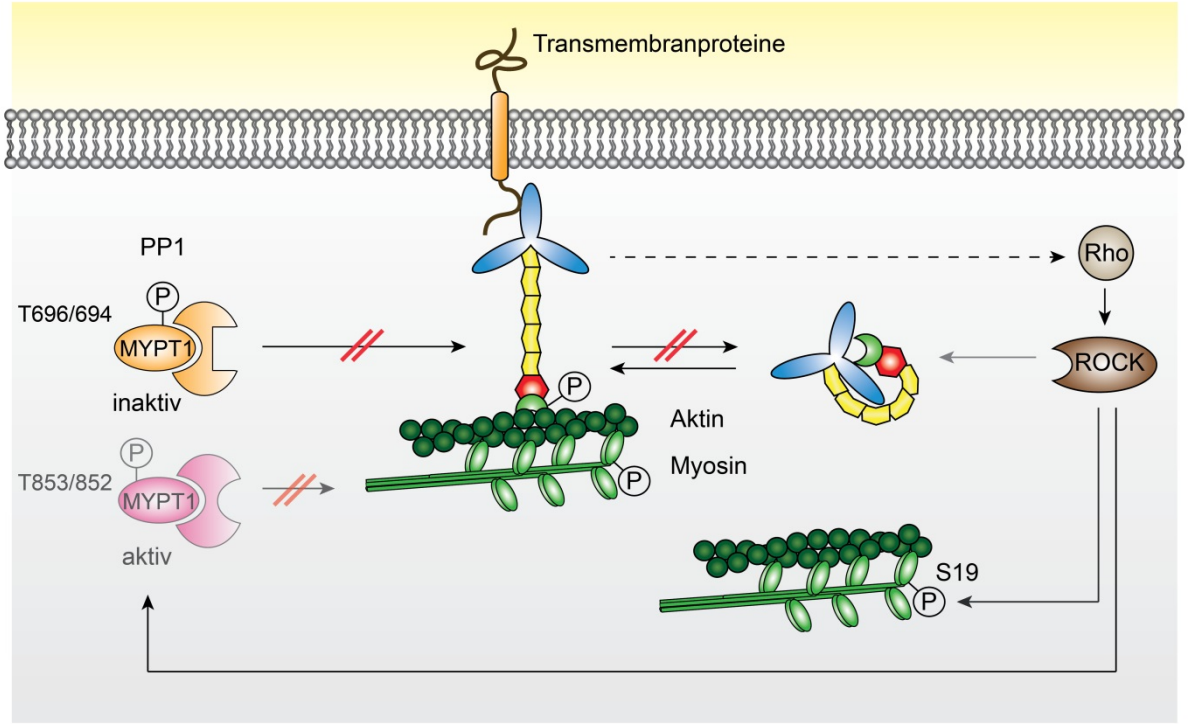

Abb. 4.6: Die Rolle von ROCK bei der Regulation der ERM-Aktivität im Uropod von T-Zellen.
ROCK beeinflusst die Aktivität von ERM-Proteinen hauptsächlich indirekt durch Inhibition der ERM-Phosphatase PP1: ROCK phosphoryliert MYPT1 am inhibitorischen Threonin 696/694 und inaktiviert dadurch PP1. Zudem phosphoryliert ROCK MYPT1 am Threonin 853/852, wodurch die Bindung an Myosin blockiert wird. ROCK beeinflusst das Zytoskelett direkt durch Phosphorylierung der leichten Myosin-Kette am Serin 19. Die Funktion von ROCK als direkte ERM-Kinase sowie als Regulator der Myosin-Bindekapazität von PP1 spielt in T-Zellen eine untergeordnete Rolle (deshalb transparente Darstellung). Phosphoryliertes Ezrin beeinflusst die ROCK-Aktivität über die GTPase Rho.

Da ROCK in T-Zellen nicht mit LFA-1 kopräzipitierte (Daten nicht gezeigt), ist eine direkte Signalweiterleitung von LFA-1 zum Zytoskelett über ROCK unwahrscheinlich. Phosphoryliertes Ezrin aktiviert in T-Zellen durch Interaktion mit dem Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor Dbl die GTPase Rho (Lee et al., 2004), die wiederum ROCK aktiviert (Abb. 4.6). Somit könnte LFA-1 indirekt über ERM-Proteine die Aktivität von ROCK regulieren. In Folge beeinflusst ROCK die Zytoskelett-Reorganisation durch Regulation der PP1-Aktivität, aber auch durch direkte Phosphorylierung von Myosin (am Serinrest 19) (Abb. 4.6).

Weitere Kinasen, die an der Regulation der ERM-Aktivität in T-Zellen beteiligt sein können, sind die Mst-Kinasen 1, 2 und 4. Mst4 ist durch Regulation der Ezrin-Aktivität an der Ausbildung des Mikrovilli-Bürstensaums auf intestinalen Epithelzellen beteiligt (ten Klooster et al., 2009). In derselben Publikation wurden in einem *in vitro* Kinase-Test mit Ezrin-Peptiden Mst1 und Mst2 als ERM-Kinasen identifiziert. Mst1 wird vor allem in lymphatischen Organen, Mst2 dagegen im Gehirn exprimiert (Oh et al., 2009). Die Menge an Mst2-Protein in Lymphozyten ist relativ gering (Katagiri et al., 2006). Daten von K. Katagiri zeigen, dass Mst1 in Rap1-aktivierten Lymphozyten an RAPL, und RAPL an die αL-Kette von LFA-1 bindet (Katagiri et al., 2003; Katagiri et al., 2006). Auch S. Kliche und Kollegen postulieren, dass nach Stimulation mit Chemokinen in T-Zellen ein Komplex aus Mst1/RAPL/Rap1 an die αL-Kette von LFA-1 bindet (Kliche et al., 2012). Eigene Daten ergaben, dass LFA-1 in T-Zellen nicht mit Mst1 kopräzipitierte (Daten nicht gezeigt). Als Erklärung kann die indirekte Interaktion zwischen Mst1 und LFA-1 über RAPL aufgeführt werden.

Die Bindung von Mst1 an LFA-1 scheint dessen Aktivität zu regulieren: Mst1 defiziente T-Zellen können aufgrund einer defekten LFA-1 Aktivierung (Valenz) *in vitro* nicht an ICAM-1 und *in vivo* nicht an Endothelzellen adhärieren; infolgedessen ist die Rekrutierung der T-Zellen in lymphatische Gewebe gestört (Katagiri et al., 2009). In Kooperation mit Christoph Klein (Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München) konnte in eigenen Arbeiten gezeigt werden, dass Mst1 defiziente T-Zellen von Patienten (Abdollahpour et al., 2012) verstärkt aktives LFA-1 in „Cluster“ auf ihrer Oberfläche aufweisen und die T-Zellmigration auf ICAM-1 *in vitro* gestört ist (Daten nicht gezeigt). Ob Mst1 die LFA-1 Aktivität positiv oder negativ beeinflusst, ist damit nicht abschließend geklärt.

Als potentielle Kinase von ERM-Proteinen beeinflusst Mst1 möglicherweise neben der Aktivität von LFA-1, die Aktivität von ERM-Proteinen und dadurch die Reorganisation des Zytoskeletts. Laboreigene Daten zeigen, dass die LFA-1 unabhängige Wanderung muriner, Mst1-defizienter T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen im 3D-Kollagen-Gel stark reduziert ist (T. Weißer, M. Laschinger; unveröffentlichte Daten). Diese Daten weisen auf eine defekte Zytoskelett-Reorganisation in Mst1 defizienten Zellen hin und lassen vermuten, dass Mst1 für die ERM vermittelte Zytoskelett-Reorganisation während der T-Zellmigration essentiell ist.

Möglicherweise hat Mst1 eine duale Rolle während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration. Zum einen fungiert Mst1 in T-Zellen als „upstream“-Regulator der LFA-1 Aktivität, insbesondere in Bezug auf dessen Valenz. Zum anderen ist Mst1 möglicherweise als ERM-Kinase an der Regulation der Zytoskelett-Flexibilität während der T-Zellmigration beteiligt.

4.4 Pathophysiologische Funktionen der ERM-Proteine

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation durch PP1/PP2A und die Reorganisation des Zytoskeletts für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration charakterisiert. ERM-Proteine sind neben der Zellmigration auch an der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beteiligt (Arpin et al., 2011). Vermutlich aufgrund dieser Funktionen, sind ERM-Proteine auch an der Ablösung (Migration) primär adhärenter Zellen aus einem Zellverband während der metastatischen Kaskade beteiligt (Hunter, 2004). Es ist denkbar, dass die Migration von Tumorzellen vergleichbar der Migration von T-Zellen durch Signaltransduktion „downstream“ von Integrinen als Zelladhäsionsmoleküle über ERM-Proteine reguliert wird.

Das Metastasierungspotential von Bauchspeicheldrüsenkrebs und Rhabdomyosarkomen (Weichteiltumor) korreliert mit einer verstärkten Expression einzelner ERM-Proteine (Yu et al., 2004; Cui et al., 2009). In Osteosarkomen ist neben der Expression von ERM-Proteinen auch deren Aktivität (Khanna et al., 2004), in Brustkarzinomen vor allem die Lokalisation von ERM-Proteinen (Sarrio et al., 2006) entscheidend für die Metastasierung. Die Migration von Tumorzellen wird demnach wie die Migration von T-Zellen maßgeblich durch ERM-Proteine und deren Aktivitätsregulation bestimmt.
Neben Integrinen können andere Zelladhäsionsmoleküle die Funktion von ERM-Proteinen, möglicherweise während der Tumorgenese, beeinflussen. CD44 vermittelt bei hoher Zelldichte nach Bindung seines Liganden Hyaluronsäure die Aktivierung des Tumorsuppressors Merlin (ein ERM-verwandtes Protein) in Bezug auf dessen proliferationshemmenden Wirkung (Morrison et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um A.M. Hopkins zeigte, dass CD44 bei der Migration von Zellen einer Brustkrebs-Zelllinie außerhalb von „Lipid Rafts“ relokalisiert und dort mit phosphoryliertem Ezrin interagiert (Donatello et al., 2012). Auf diese Weise erfolgt, vergleichbar der Signaltransduktion „downstream“ von LFA-1 während der T-Zellmigration, eine Signalweiterleitung von der Plasmamembran zu ERM-Proteinen, und damit zum Zytoskelett.

Auch bei Autoimmunerkrankungen wie der SLE („systemic lupus erythematodus“) scheinen ERM-Proteine eine wichtige Rolle zu spielen. T-Zellen von SLE-Patienten weisen eine verstärkte Expression von CD44 und eine erhöhte Phosphorylierung von ERM-Proteinen auf. Die T-Zell-Adhäsion an Hyaluronsäure sowie die Transmigration über Hyaluronsäure in Richtung des Chemokins SDF1α sind stark erhöht (Li et al., 2007). Diese Daten erklären die systemische Infiltration von T-Zellen in Organe von SLE-Patienten.

Damit spielen ERM-Proteine nicht nur in einer Vielzahl physiologischer Situationen, sondern auch in unterschiedlichen pathophysiologischen Situationen eine bedeutende Rolle. Die Aufklärung, ob der Migration von Tumorzellen oder der T-Zellmigration in SLE-Patienten eine fehlerhafte Regulation der ERM-Aktivität (über PP1/PP2A) „downstream“ von Integrinen zugrunde liegt, bietet großes Potential für die Entwicklung therapeutischer Mittel zur Behandlung pathophysiologischer Tumor- und Immunerkrankungen.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit trägt wesentlich dazu bei, die der Deadhäsion zugrundeliegenden Mechanismen während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration aufzuklären. „Outside-In“-Signale (ICAM-1 Bindung) lösen eine Signaltransduktion von LFA-1 über die Phosphatasen PP1/PP2A zur Regulation der ERM-Aktivität und damit der Zytoskelett-Reorganisation im Uropod aus.

Dabei scheinen die regulatorischen Untereinheiten der ERM-Phosphatasen PP1/PP2A die Interaktion mit LFA-1 zu vermitteln. MYPT1 fungiert als regulatorische Untereinheit von PP1. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die regulatorische Untereinheit von PP2A zu ermitteln. Mit Hilfe eines proteomischen „Screens“ sollen in der Arbeitsgruppe um Reinhard Fässler / Ralph Böttcher (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zytoplasmatische Interaktionspartner in Abhängigkeit von der LFA-1 Konformation identifiziert werden (SFB 914-Teilprojekt A5). Dazu werden die zytoplasmatischen Domänen der αL- und β2-Kette von LFA-1 als rekombinantes Proteindimer in *E. coli* exprimiert. Alle, mit diesem Proteindimer interagierenden Proteine werden aus einem Leukozyten-Zelllysat mittels *in vitro* „Pull-Down“-Experimenten präzipitiert und mit Hilfe der Massenspektometrie identifiziert. Damit können potentielle regulatorische Untereinheiten von PP2A identifiziert werden. Des Weiteren kann mit dieser Methode festgestellt werden, ob der Aktivitätsstatus von LFA-1 Einfluss auf die Interaktion von PP1/PP2A mit LFA-1 hat.

Um die Frage zu klären, ob die Phosphatasen mit LFA-1 über dessen αL- oder β2-Kette interagieren und welche Aminosäuresequenz das Bindemotiv für diese Interaktion darstellt, erscheinen Präzipitationsstudien mit Peptiden als geeignet. Peptide, die die gesamte Länge der zytoplasmatischen Domänen oder nur Teilbereiche von diesen repräsentieren, könnten Aufschluss über diese Frage geben.

Ob die Interaktion zwischen LFA-1 und PP1/PP2A die Aktivierung der Phosphatasen direkt induziert, sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Phosphatase-Aktivitätstests in einem LFA-1 Präzipitat untersucht werden. Jedoch konnte über die Aktivität kopräzipitierter Phosphatasen, vermutlich aufgrund zu geringer präzipitierter Proteinmengen, keine Aussage getroffen werden. Ein sensitiverer Test könnte

Aufschluss darüber geben. Durch Präzipitationen von hoch- oder mittel-affinem LFA-1 durch konformationsspezifische Antikörper in humanen T-Zellen soll geprüft werden, ob die Interaktion zwischen LFA-1 und den Phosphatasen konstitutiv oder konformationsabhängig erfolgt.

Ein weiteres Ziel ist die Identifizierung der ERM-Kinase, die als Antagonist zu den ERM-Phosphatasen PP1/PP2A fungiert. Es ist zu prüfen, ob LFA-1 über Kinasen ebenfalls Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der ERM-Proteine hat. Durch Inhibitionsstudien könnte die Beteiligung definierter Kinasen untersucht werden. Eine Rolle von Mst1 als potentielle Kinase von ERM-Proteinen wird derzeit im Labor mit Hilfe Mst1-defizienter Mäuse (Oh et al., 2009) genauer untersucht.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Steffen Massberg (Medizinische Klinik und Poliklinik I, LMU München) soll die intravitale Migration von T-Zellen mit inaktivem PP1/PP2A mit Hilfe der Multi-Photonen-Mikroskopie *in vivo* analysiert werden (SFB 914-Zentral-projekt Z1). Erste Versuche zur Etablierung der Intravitalmikroskopie in der Milz und im inguinalen Lymphknoten wurden bereits durchgeführt. Die Methode ermöglicht eine detaillierte Untersuchung davon, welche Schritte der „Multi-Step“-Kaskade *in vivo* von der Aktivität der ERM-Phosphatasen PP1/PP2A abhängig sind. Im „Homing“-Test konnte bislang nur der finale Effekt der PP1/PP2A-Inhibition auf die T-Zell-Rekrutierung *in vivo* analysiert werden.

Die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass eine Verschiebung des ERM-Gleichgewichts zugunsten des aktiven Zustandes zu einer Versteifung des Zytoskeletts führt. Um Aufschluss über die Flexibilität der Zelle nach PP1/PP2A Inhibierung zu erhalten, ist die Messung der Membranspannung mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Martin Benoit (Institut für Biophysik, LMU München) geplant (SFB 914-Teilprojekt A3). Diese Methode erlaubt die Beantwortung der Frage-stellung, ob die ERM-Aktivität maßgeblich die Verankerung der Membran am Zytoskelett und die Ausbildung adhäsiver Kontakte der Zelle auf ICAM-1 reguliert.

5 Zusammenfassung

Die T-Zellmigration ist essentiell für (1) die Homöostase naiver T-Zellen, (2) ihre antigenspezifische Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen im Lymphknoten und (3) die Bekämpfung lokaler Infektionen durch zytotoxische T-Zellen. T-Zellen wandern an der endothelialen Gefäßwand entlang, um eine optimale Region für die Extravasation in umliegendes Gewebe zu finden. Bei diesem „Crawling“ adhäriert die T-Zelle am vorderen Ende und deadhäriert am Uropod. Eine kontrollierte Interaktion von LFA-1 mit dessen endothelialem Liganden ICAM-1 sowie die Reorganisation des Zytoskeletts gewährleisten diese Adhäsion und Deadhäsion. Die bidirektionale Signaltransduktion zwischen LFA-1 an der Plasmamembran und dem Zytoskelett stellt die Grundlage für eine effiziente T-Zellmigration dar.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Regulation der ERM-Aktivität essentiell für die T-Zellmigration ist. Aktive ERM-Proteine stabilisieren die Morphologie der Zelle durch Verknüpfung der Plasmamembran mit kortikalem Aktin. Nach ihrer Deaktivierung lösen ERM-Proteine diese Interaktion. Ein kontinuierlicher Wechsel von aktiven und inaktiven ERM-Proteinen ermöglicht die Zytoskelett-Reorganisation bei der LFA-1 abhängigen T-Zellmigration.

Die Aktivität von ERM-Proteinen wird über ihre Phosphorylierung am konservierten Threonin 567/558 durch Kinasen und Phosphatasen reguliert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2A als direkte Phosphatasen von Ezrin/Moesin in T-Zellen fungieren. PP1 wurde in T-Zellen als Holoenzym aus der regulatorischen Untereinheit MYPT1 und der katalytischen Untereinheit PP1δ identifiziert. PP2A besteht aus der strukturellen Untereinheit PP2A A, einer unbekannten regulatorischen Untereinheit PP2A B und der katalytischen Untereinheit PP2A C. PP1/PP2A interagieren mit LFA-1 und sind das entscheidende Bindeglied in der Signalweiterleitung zwischen LFA-1 und ERM-Proteinen.

Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Adhäsion von LFA-1 an ICAM-1 ein intrazelluläres „Outside-In“-Signal zur Dephosphorylierung von ERM-Proteinen auslöst. Hierbei werden entweder aktive PP1/PP2A durch Interaktion mit LFA-1 an die Plasmamembran rekrutiert oder an LFA-1 konstitutiv gebundene Phosphatasen werden durch die LFA-1/ICAM-1 Interaktion aktiviert. Infolge dieser Signaltransduktion dephosphorylieren und inaktivieren PP1/PP2A ERM-Proteine an der Plasmamembran. Diese lösen sich von kortikalem Aktin und Transmembranproteinen und ermöglichen die Reorganisation des Zytoskeletts. *In vitro* und *in vivo* Ergebnisse heben die Bedeutung dieser Signalkaskade für die LFA-1 abhängige T-Zellmigration entlang des Endothels und deren Rekrutierung in lymphatische Gewebe hervor.

Die Aufklärung der „Outside-In“-Signaltransduktion von LFA-1 über PP1/PP2A zu ERM-Proteinen und zum Zytoskelett trägt wesentlich zum Verständnis der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration in physiologischen und pathophysiologischen Situationen bei.

6 Summary

Several steps during T cell function highly depend on T cell migration: (1) homeostasis of naive T cells, (2) antigen-specific T cell activation and differentiation into effector T cells within lymph nodes, and (3) elimination of infected cells by cytotoxic T cells. T lymphocytes crawl along the vascular endothelium searching for appropriate sites to extravasate into the tissue. A crawling T cell adheres at the front, and deadheres at the uropod. Adhesion and de-adhesion are tightly controlled by LFA-1 binding to its endothelial ligand ICAM-1 and by cytoskeletal rearrangement. Bidirectional signaling between LFA-1 at the membrane and the cytoskeleton is therefore a prerequisite for efficient T cell migration.

Results of the present thesis indicate that regulation of ERM activity controls T cell migration. Active ERM-proteins connect surface receptors on the plasma membrane with actin, thus stabilizing the cell morphology. Inactive ERM-proteins dissociate from integral membrane proteins and actin. Transition between both activity states enables ERM-proteins to modulate the cytoskeletal rearrangement during LFA-1 mediated T cell migration.

Kinases and phosphatases control the activity of ERM-proteins by regulating their phosphorylation state at the conserved threonine 567/558. In the present study, the serine/ threonine phosphatases PP1 and PP2A could be identified as direct phosphatases of ezrin and moesin in T cells for the first time. The PP1 holoenzyme is demonstrated to consist of the regulatory subunit MYPT1 and the catalytic subunit PP1δ. PP2A is formed by PP2A A as scaffolding subunit, an unknown PP2A B regulatory subunit and PP2A C as catalytic subunit. PP1 and PP2A directly bind to LFA-1 and act as linkers in the signaling pathway between LFA-1 and ERM-proteins.

Data from the present study demonstrate that LFA-1 binding to ICAM-1 induces a specific outside-in-signaling cascade resulting in dephosphorylation of ERM-proteins. For this purpose, either active phosphatases are recruited to the membrane by interaction with LFA-1 or constitutively bound phosphatases get activated upon LFA-1/ICAM-1 binding. In consequence, active PP1/PP2A dephosphorylate and thereby inactivate ERM-proteins at the plasma membrane. Ezrin and moesin detach from the cortical actin and transmembrane proteins, thus enabling rearrangement of the cytoskeleton. *In vitro* and *in vivo* data point towards a crucial role of this newly identified signaling pathway regulating LFA-1 mediated T cell migration across the endothelium and recruitment into secondary lymphoid organs.

Investigating the outside-in-signaling from LFA-1 via PP1/PP2A to ERM-proteins and towards the cytoskeleton, this thesis contributes to a better understanding of LFA-1 mediated T cell migration under physiological and pathophysiological conditions.

7 Literatur

Abdollahpour, H., Appaswamy, G., Kotlarz, D., Diestelhorst, J., Beier, R., Schaffer, A.A., Gertz, E.M., Schambach, A., Kreipe, H.H., Pfeifer, D., Engelhardt, K.R., Rezaei, N., Grimbacher, B., Lohrmann, S., Sherkat, R. and Klein, C., 2012. The phenotype of human STK4 deficiency. Blood 119, 3450-7.

Abram, C.L. and Lowell, C.A., 2007. Convergence of immunoreceptor and integrin signaling. Immunol Rev 218, 29-44.

Abram, C.L. and Lowell, C.A., 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. Annu Rev Immunol 27, 339-62.

Adair, B.D. and Yeager, M., 2002. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIbbeta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14059-64.

Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. and Arpin, M., 1993. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. J Cell Biol 120, 129-39.

Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K. and Sperling, A.I., 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. Immunity 15, 739-50.

Alon, R. and Etzioni, A., 2003. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. Trends Immunol 24, 561-6.

Arnaout, M.A., Mahalingam, B. and Xiong, J.P., 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 381-410.

Arpin, M., Chirivino, D., Naba, A. and Zwaenepoel, I., 2011. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. Cell Adh Migr 5, 199-206.

Bajenoff, M., Egen, J.G., Koo, L.Y., Laugier, J.P., Brau, F., Glaichenhaus, N. and Germain, R.N., 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. Immunity 25, 989-1001.

Balkow, S., Heinz, S., Schmidbauer, P., Kolanus, W., Holzmann, B., Grabbe, S. and Laschinger, M., 2010. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. Blood 116, 1885-94.

Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D., 2010. Integrins. Cell Tissue Res 339, 269-80.

Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P. and Niggli, V., 2000. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. J Cell Biol 151, 1067-80.

Belkina, N.V., Liu, Y., Hao, J.J., Karasuyama, H. and Shaw, S., 2009. LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 4707-12.

Ben-Aissa, K., Patino-Lopez, G., Belkina, N.V., Maniti, O., Rosales, T., Hao, J.J., Kruhlak, M.J., Knutson, J.R., Picart, C. and Shaw, S., 2012. Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker. J Biol Chem 287, 16311-23.

Benoit, M. and Gaub, H.E., 2002. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. Cells Tissues Organs 172, 174-89.

Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L. and Butcher, E.C., 1995. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell 80, 413-22.

Berryman, M., Franck, Z. and Bretscher, A., 1993. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. J Cell Sci 105 (Pt 4), 1025-43.

Beullens, M., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Connor, J., Shenolikar, S., Stalmans, W. and Bollen, M., 1999. Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. J Biol Chem 274, 14053-61.

Bianchi, A.B., Mitsunaga, S.I., Cheng, J.Q., Klein, W.M., Jhanwar, S.C., Seizinger, B., Kley, N., Klein-Szanto, A.J. and Testa, J.R., 1995. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 10854-8.

Boatright, K.M. and Salvesen, G.S., 2003. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15, 725-31.

Bork, P., Doerks, T., Springer, T.A. and Snel, B., 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. Trends Biochem Sci 24, 261-3.

Brault, E., Gautreau, A., Lamarine, M., Callebaut, I., Thomas, G. and Goutebroze, L., 2001. Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. J Cell Sci 114, 1901-12.

Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R. and Reczek, D., 2000. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. Annu Rev Cell Dev Biol 16, 113-43.

Bretscher, A., Edwards, K. and Fehon, R.G., 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 586-99.

Brown, M.J., Nijhara, R., Hallam, J.A., Gignac, M., Yamada, K.M., Erlandsen, S.L., Delon, J., Kruhlak, M. and Shaw, S., 2003. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. Blood 102, 3890-9.

Buensuceso, C., de Virgilio, M. and Shattil, S.J., 2003. Detection of integrin alpha IIbbeta 3 clustering in living cells. J Biol Chem 278, 15217-24.

Calderwood, D.A., Yan, B., de Pereda, J.M., Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C. and Ginsberg, M.H., 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. J Biol Chem 277, 21749-58.

Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O. and Ginsberg, M.H., 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. J Biol Chem 274, 28071-4.

Carlow, D.A., Gossens, K., Naus, S., Veerman, K.M., Seo, W. and Ziltener, H.J., 2009. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. Immunol Rev 230, 75-96.

Carman, C.V., 2009. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. J Cell Sci 122, 3025-35.

Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. and Springer, T.A., 2007. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. Immunity 26, 784-97.

Carman, C.V. and Springer, T.A., 2003. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? Curr Opin Cell Biol 15, 547-56.

Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E.S., Fuller, M.T., Echard, A. and Payre, F., 2008. Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. J Cell Biol 180, 739-46.

Casasnovas, J.M., Pieroni, C. and Springer, T.A., 1999. Lymphocyte function-associated antigen-1 binding residues in intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) and the integrin binding surface in the ICAM subfamily. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3017-22.

Casasnovas, J.M., Stehle, T., Liu, J.H., Wang, J.H. and Springer, T.A., 1998. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4134-9.

Charrin, S. and Alcover, A., 2006. Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. Front Biosci 11, 1987-97.

Chen, E.J., Shaffer, M.H., Williamson, E.K., Huang, Y. and Burkhardt, J.K., 2013. Ezrin and moesin are required for efficient T cell adhesion and homing to lymphoid organs. PLoS One 8, e52368.

Cohen, P.T., 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. J Cell Sci 115, 241-56.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C. and Laudanna, C., 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. Immunity 13, 759-69.

Coscoy, S., Waharte, F., Gautreau, A., Martin, M., Louvard, D., Mangeat, P., Arpin, M. and Amblard, F., 2002. Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 12813-8.

Cui, Y., Wu, J., Zong, M., Song, G., Jia, Q., Jiang, J. and Han, J., 2009. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. Int J Cancer 124, 1614-21.

Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J.C. and Arnaud, P., 2002. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. Biol Pharm Bull 25, 1600-3.

Dangerfield, J., Larbi, K.Y., Huang, M.T., Dewar, A. and Nourshargh, S., 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. J Exp Med 196, 1201-11.

de Fougerolles, A.R. and Springer, T.A., 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. J Exp Med 175, 185-90.

Delon, J., Kaibuchi, K. and Germain, R.N., 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. Immunity 15, 691-701.

den Haan, J.M. and Kraal, G., 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. J Innate Immun 4, 437-45.

Diakowski, W., Grzybek, M. and Sikorski, A.F., 2006. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. Folia Histochem Cytobiol 44, 231-48.

Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S., 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. J Biol Chem 274, 2315-21.

Donatello, S., Babina, I.S., Hazelwood, L.D., Hill, A.D., Nabi, I.R. and Hopkins, A.M., 2012. Lipid raft association restricts CD44-ezrin interaction and promotion of breast cancer cell migration. Am J Pathol 181, 2172-87.

Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A. and Hogg, N., 1992. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. J Cell Biol 116, 219-26.

Dunne, J.L., Ballantyne, C.M., Beaudet, A.L. and Ley, K., 2002. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. Blood 99, 336-41.

Dustin, M.L., Bivona, T.G. and Philips, M.R., 2004. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. Nat Immunol 5, 363-72.

Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. and Springer, T.A., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J Immunol 137, 245-54.

Dustin, M.L., Staunton, D.E. and Springer, T.A., 1988. Supergene families meet in the immune system. Immunol Today 9, 213-5.

Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P. and Barford, D., 1997. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. EMBO J 16, 1876-87.

Eichhorn, P.J., Creyghton, M.P. and Bernards, R., 2009. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. Biochim Biophys Acta 1795, 1-15.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391, 43-50.

Eto, M., Kirkbride, J.A. and Brautigan, D.L., 2005. Assembly of MYPT1 with protein phosphatase-1 in fibroblasts redirects localization and reorganizes the actin cytoskeleton. Cell Motil Cytoskeleton 62, 100-9.

Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A. and Hogg, N., 2009. Integrins in immunity. J Cell Sci 122, 215-25.

Fagerholm, A.E., Habrant, D. and Koskinen, A.M., 2010. Calyculins and related marine natural products as serine-threonine protein phosphatase PP1 and PP2A inhibitors and total syntheses of calyculin A, B, and C. Mar Drugs 8, 122-72.

Fagerholm, S.C., Hilden, T.J. and Gahmberg, C.G., 2004. P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. Trends Biochem Sci 29, 504-12.

Fagerholm, S.C., Hilden, T.J., Nurmi, S.M. and Gahmberg, C.G., 2005. Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. J Cell Biol 171, 705-15.

Faure, S., Salazar-Fontana, L.I., Semichon, M., Tybulewicz, V.L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R.N. and Delon, J., 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. Nat Immunol 5, 272-9.

Fehon, R.G., McClatchey, A.I. and Bretscher, A., 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 276-87.

Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J. and Nakano, T., 1999. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. J Biol Chem 274, 37385-90.

Fievet, B.T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. and Arpin, M., 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. J Cell Biol 164, 653-9.

Fukata, Y., Kimura, K., Oshiro, N., Saya, H., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K., 1998. Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. J Cell Biol 141, 409-18.

Fütterer, K., 2008. Diplomarbeit: Molekulare Mechanismen der LFA-1 vermittelten Wanderung von Lymphozyten.

Gary, R. and Bretscher, A., 1993. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10846-50.

Gary, R. and Bretscher, A., 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. Mol Biol Cell 6, 1061-75.

Gautreau, A., Louvard, D. and Arpin, M., 2000. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. J Cell Biol 150, 193-203.

Gottschalk, K.E., Adams, P.D., Brunger, A.T. and Kessler, H., 2002. Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin. Protein Sci 11, 1800-12.

Gupta, V., Ogawa, A.K., Du, X., Houk, K.N. and Armstrong, R.W., 1997. A model for binding of structurally diverse natural product inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A. J Med Chem 40, 3199-206.

Gushiken, F.C., Patel, V., Liu, Y., Pradhan, S., Bergeron, A.L., Peng, Y. and Vijayan, K.V., 2008. Protein phosphatase 2A negatively regulates integrin alpha(IIb)beta(3) signaling. J Biol Chem 283, 12862-9.

Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S. and Hakoshima, T., 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. EMBO J 19, 4449-62.

Hanna, S. and Etzioni, A., 2012. Leukocyte adhesion deficiencies. Ann N Y Acad Sci 1250, 50-5.

Hao, J.J., Liu, Y., Kruhlak, M., Debell, K.E., Rellahan, B.L. and Shaw, S., 2009. Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. J Cell Biol 184, 451-62.

Hashimoto, S., Amaya, F., Matsuyama, H., Ueno, H., Kikuchi, S., Tanaka, M., Watanabe, Y., Ebina, M., Ishizaka, A., Tsukita, S. and Hashimoto, S., 2008. Dysregulation of lung injury and repair in moesin-deficient mice treated with intratracheal bleomycin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295, L566-74.

Hayflick, J.S., Kilgannon, P. and Gallatin, W.M., 1998. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. Immunol Res 17, 313-27.

Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. and Carpen, O., 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. J Biol Chem 273, 21893-900.

Helander, T.S., Carpen, O., Turunen, O., Kovanen, P.E., Vaheri, A. and Timonen, T., 1996. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. Nature 382, 265-8.

Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T. and Narumiya, S., 2012. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. Int Immunol 24, 705-17.

Hishiya, A., Ohnishi, M., Tamura, S. and Nakamura, F., 1999. Protein phosphatase 2C inactivates F-actin binding of human platelet moesin. J Biol Chem 274, 26705-12.

Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K. and McDowall, A., 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. J Cell Sci 116, 4695-705.

Hogg, N., Patzak, I. and Willenbrock, F., 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. Nat Rev Immunol 11, 416-26.

Horwitz, A.R. and Parsons, J.T., 1999. Cell migration--movin' on. Science 286, 1102-3.

Hu, P. and Luo, B.H., 2013. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. J Cell Physiol 228, 306-12.

Huang, C., Lu, C. and Springer, T.A., 1997. Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin beta2 subunit requires association with the alpha subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 3156-61.

Huang, C. and Springer, T.A., 1995. A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). J Biol Chem 270, 19008-16.

Huang, H.B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S.R., Tsay, H.J., Li, H.C., Greengard, P. and Nairn, A.C., 1999. Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. J Biol Chem 274, 7870-8.

Hunter, K.W., 2004. Ezrin, a key component in tumor metastasis. Trends Mol Med 10, 201-4.

Hynes, R.O., 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48, 549-54.

Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110, 673-87.

Ikebe, M. and Hartshorne, D.J., 1985. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. J Biol Chem 260, 10027-31.

Ilani, T., Khanna, C., Zhou, M., Veenstra, T.D. and Bretscher, A., 2007. Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. J Cell Biol 179, 733-46.

Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. and Hartshorne, D.J., 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. Mol Cell Biochem 259, 197-209.

Ivetic, A., Deka, J., Ridley, A. and Ager, A., 2002. The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. J Biol Chem 277, 2321-9.

Ivetic, A., Florey, O., Deka, J., Haskard, D.O., Ager, A. and Ridley, A.J., 2004. Mutagenesis of the ezrin-radixin-moesin binding domain of L-selectin tail affects shedding, microvillar positioning, and leukocyte tethering. J Biol Chem 279, 33263-72.

Ivetic, A. and Ridley, A.J., 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. Immunology 112, 165-76.

Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M.J. 2005. Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Science Publishing.

Janssens, V. and Goris, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J 353, 417-39.

Johnson, D., Cohen, P., Chen, M.X., Chen, Y.H. and Cohen, P.T., 1997. Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. Eur J Biochem 244, 931-9.

Jun, C.D., Carman, C.V., Redick, S.D., Shimaoka, M., Erickson, H.P. and Springer, T.A., 2001. Ultrastructure and function of dimeric, soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). J Biol Chem 276, 29019-27.

Kansas, G.S., 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. Blood 88, 3259-87.

Katagiri, K., Imamura, M. and Kinashi, T., 2006. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. Nat Immunol 7, 919-28.

Katagiri, K., Katakai, T., Ebisuno, Y., Ueda, Y., Okada, T. and Kinashi, T., 2009. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. EMBO J 28, 1319-31.

Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. and Kinashi, T., 2003. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. Nat Immunol 4, 741-8.

Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H. and Shimizu, A., 2004. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. J Exp Med 200, 783-95.

Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., Hashimoto, K., Fujita, S. and Furuya, T., 1986. Bioactive marine metabolites. Part 16. Calyculin A. A novel antitumor metabolite from the marine sponge Discodermia calyx. J. Am. Chem. Soc. 108, 2780-2781.

Khanna, C., Wan, X., Bose, S., Cassaday, R., Olomu, O., Mendoza, A., Yeung, C., Gorlick, R., Hewitt, S.M. and Helman, L.J., 2004. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. Nat Med 10, 182-6.

Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylanne, J. and Calderwood, D.A., 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. Mol Cell 21, 337-47.

Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., Tsukita, S. and Tsukita, S., 2002. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. Nat Genet 31, 320-5.

Kinashi, T., 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. Nat Rev Immunol 5, 546-59.

Kishimoto, T.K., Hollander, N., Roberts, T.M., Anderson, D.C. and Springer, T.A., 1987. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. Cell 50, 193-202.

Kliche, S., Worbs, T., Wang, X., Degen, J., Patzak, I., Meineke, B., Togni, M., Moser, M., Reinhold, A., Kiefer, F., Freund, C., Forster, R. and Schraven, B., 2012. CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. Blood 119, 777-85.

Kloeker, S., Major, M.B., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H., Jones, D.A. and Beckerle, M.C., 2004. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. J Biol Chem 279, 6824-33.

Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M. and Brown, E.J., 1996. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. J Clin Invest 97, 2139-44.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-5.

Lamb, R.F., Ozanne, B.W., Roy, C., McGarry, L., Stipp, C., Mangeat, P. and Jay, D.G., 1997. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. Curr Biol 7, 682-8.

Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R. and Sixt, M., 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. Nature 453, 51-5.

Lämmermann, T. and Sixt, M., 2009. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. Curr Opin Cell Biol 21, 636-44.

Larsen, M., Tremblay, M.L. and Yamada, K.M., 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 700-11.

Laschinger, M. and Engelhardt, B., 2000. Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. J Neuroimmunol 102, 32-43.

Lawrence, M.B., Berg, E.L., Butcher, E.C. and Springer, T.A., 1995. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. Eur J Immunol 25, 1025-31.

Lebedeva, T., Dustin, M.L. and Sykulev, Y., 2005. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. Curr Opin Immunol 17, 251-8.

Lee, J.H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M. and Shimizu, A., 2004. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. J Cell Biol 167, 327-37.

Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. and Liddington, R., 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). Cell 80, 631-8.

Lefort, C.T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B.G., Zarbock, A., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., Fassler, R. and Ley, K., 2012. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. Blood 119, 4275-82.

Legate, K.R. and Fässler, R., 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. J Cell Sci 122, 187-98.

Leitinger, B. and Hogg, N., 2002. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. J Cell Sci 115, 963-72.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. and Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol 7, 678-89.

Li, M., Guo, H. and Damuni, Z., 1995. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. Biochemistry 34, 1988-96.

Li, R., Gorelik, R., Nanda, V., Law, P.B., Lear, J.D., DeGrado, W.F. and Bennett, J.S., 2004. Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes. J Biol Chem 279, 26666-73.

Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J.W., Lear, J.D., DeGrado, W.F. and Bennett, J.S., 2003. Activation of integrin alphaIIbbeta3 by modulation of transmembrane helix associations. Science 300, 795-8.

Li, Y., Harada, T., Juang, Y.T., Kyttaris, V.C., Wang, Y., Zidanic, M., Tung, K. and Tsokos, G.C., 2007. Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol 178, 1938-47.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G. and Luther, S.A., 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Nat Immunol 8, 1255-65.

Liu, Y., Belkina, N.V., Park, C., Nambiar, R., Loughhead, S.M., Patino-Lopez, G., Ben-Aissa, K., Hao, J.J., Kruhlak, M.J., Qi, H., von Andrian, U.H., Kehrl, J.H., Tyska, M.J. and Shaw, S., 2012. Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. Blood 119, 445-53.

Louvet-Vallee, S., 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. Biol Cell 92, 305-16.

Luo, B.H. and Springer, T.A., 2006. Integrin structures and conformational signaling. Curr Opin Cell Biol 18, 579-86.

Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G. and Cyster, J.G., 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 12694-9.

Mangeat, P., Roy, C. and Martin, M., 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. Trends Cell Biol 9, 187-92.

Marchesi, V.T. and Gowans, J.L., 1964. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. Proc R Soc Lond B Biol Sci 159, 283-90.

Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C. and Sonnenberg, A., 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. Curr Opin Cell Biol 23, 607-14.

Martinelli, S., Chen, E.J., Clarke, F., Lyck, R., Affentranger, S., Burkhardt, J.K. and Niggli, V., 2013. Ezrin/Radixin/Moesin proteins and flotillins cooperate to promote uropod formation in T cells. Front Immunol 4, 84.

Martuza, R.L. and Eldridge, R., 1988. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). N Engl J Med 318, 684-8.

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. and Tsukita, S., 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. J Cell Biol 140, 647-57.

Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S., 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. Curr Biol 9, 1259-62.

McClatchey, A.I., Saotome, I., Mercer, K., Crowley, D., Gusella, J.F., Bronson, R.T. and Jacks, T., 1998. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. Genes Dev 12, 1121-33.

McClatchey, A.I., Saotome, I., Ramesh, V., Gusella, J.F. and Jacks, T., 1997. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. Genes Dev 11, 1253-65.

Mebius, R.E. and Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol 5, 606-16.

Meggio, F., Donella Deana, A., Ruzzene, M., Brunati, A.M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., Furet, P. and et al., 1995. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. Eur J Biochem 234, 317-22.

Menasche, G., Kliche, S., Bezman, N. and Schraven, B., 2007. Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. Immunol Rev 218, 82-91.

Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, C.P. and Dustin, M.L., 1995. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. J Exp Med 182, 1231-41.

Mitchison, T.J. and Cramer, L.P., 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell 84, 371-9.

Miyasaka, M. and Tanaka, T., 2004. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. Nat Rev Immunol 4, 360-70.

Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H. and Herrlich, P., 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. Genes Dev 15, 968-80.

Morrison, V.L., MacPherson, M., Lek, H.S., Prescott, A.R. and Fagerholm, S.C., 2012. Talk: Mutation of the kindlin-3 binding site in the beta2-integrin cytoplasmic tail reduces T cell homing to lymph nodes but not T cell activation in vivo. European Congress of Immunology, 05.-08.09.2012.

Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.V., Sperandio, M. and Fassler, R., 2009a. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. Nat Med 15, 300-5.

Moser, M., Legate, K.R., Zent, R. and Fassler, R., 2009b. The tail of integrins, talin, and kindlins. Science 324, 895-9.

Mutz, D., Weise, C., Mechai, N., Hofmann, W., Horstkorte, R., Bruning, G. and Danker, K., 2006. Integrin alpha3beta1 interacts with I1PP2A/Ianp and phosphatase PP1. J Neurosci Res 84, 1759-70.

Naor, D., Sionov, R.V. and Ish-Shalom, D., 1997. CD44: structure, function, and association with the malignant process. Adv Cancer Res 71, 241-319.

Ng, T., Parsons, M., Hughes, W.E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I. and Parker, P.J., 2001. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. EMBO J 20, 2723-41.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. and et al., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376, 37-43.

Nourshargh, S., Hordijk, P.L. and Sixt, M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 366-78.

Nurmi, S.M., Autero, M., Raunio, A.K., Gahmberg, C.G. and Fagerholm, S.C., 2007. Phosphorylation of the LFA-1 integrin beta2-chain on Thr-758 leads to adhesion, Rac-1/Cdc42 activation, and stimulation of CD69 expression in human T cells. J Biol Chem 282, 968-75.

O'Neill, A.S., van den Berg, T.K. and Mullen, G.E., 2013. Sialoadhesin - a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. Immunology 138, 198-207.

Oh, S., Lee, D., Kim, T., Kim, T.S., Oh, H.J., Hwang, C.Y., Kong, Y.Y., Kwon, K.S. and Lim, D.S., 2009. Crucial role for Mst1 and Mst2 kinases in early embryonic development of the mouse. Mol Cell Biol 29, 6309-20.

Okayama, T., Kikuchi, S., Ochiai, T., Ikoma, H., Kubota, T., Ichikawa, D., Fujiwara, H., Okamoto, K., Sakakura, C., Sonoyama, T., Kokuba, Y., Doi, Y., Tsukita, S., Bissell, D.M. and Otsuji, E., 2008. Attenuated response to liver injury in moesin-deficient mice: impaired stellate cell migration and decreased fibrosis. Biochim Biophys Acta 1782, 542-8.

Pankov, R., Cukierman, E., Clark, K., Matsumoto, K., Hahn, C., Poulin, B. and Yamada, K.M., 2003. Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A. J Biol Chem 278, 18671-81.

Parameswaran, N., Matsui, K. and Gupta, N., 2011. Conformational switching in ezrin regulates morphological and cytoskeletal changes required for B cell chemotaxis. J Immunol 186, 4088-97.

Parsons, J.T., Horwitz, A.R. and Schwartz, M.A., 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 633-43.

Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A. and Karplus, P.A., 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. Cell 101, 259-70.

Pellinen, T. and Ivaska, J., 2006. Integrin traffic. J Cell Sci 119, 3723-31.

Penninckx, F., Cheng, N., Kerremans, R., Van Damme, B. and De Loecker, W., 1983. The effects of different concentrations of glycerol and dimethylsulfoxide on the metabolic activities of kidney slices. Cryobiology 20, 51-60.

Pietromonaco, S.F., Simons, P.C., Altman, A. and Elias, L., 1998. Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. J Biol Chem 273, 7594-603.

Ponta, H., Sherman, L. and Herrlich, P.A., 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 33-45.

Porter, J.C., Bracke, M., Smith, A., Davies, D. and Hogg, N., 2002. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. J Immunol 168, 6330-5.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J., 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111, 229-33.

Rees, D.J., Ades, S.E., Singer, S.J. and Hynes, R.O., 1990. Sequence and domain structure of talin. Nature 347, 685-9.

Reilly, P.L., Woska, J.R., Jr., Jeanfavre, D.D., McNally, E., Rothlein, R. and Bormann, B.J., 1995. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. J Immunol 155, 529-32.

Rouleau, G.A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B. and et al., 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. Nature 363, 515-21.

Rowe, R.G. and Weiss, S.J., 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? Trends Cell Biol 18, 560-74.

Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M.A., 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. EMBO J 18, 501-11.

Saotome, I., Curto, M. and McClatchey, A.I., 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. Dev Cell 6, 855-64.

Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S.M., Dotor, A., Calero, F., Hardisson, D. and Palacios, J., 2006. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 98, 71-9.

Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S., 1992. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. J Cell Sci 103 (Pt 1), 131-43.

Schmidt, S., Moser, M. and Sperandio, M., 2013. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. Mol Immunol 55, 49-58.

Schneider, D. and Engelman, D.M., 2004. Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. J Biol Chem 279, 9840-6.

Semmrich, M., Smith, A., Feterowski, C., Beer, S., Engelhardt, B., Busch, D.H., Bartsch, B., Laschinger, M., Hogg, N., Pfeffer, K. and Holzmann, B., 2005. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. J Exp Med 201, 1987-98.

Serrador, J.M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F. and Sanchez-Madrid, F., 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. J Cell Biol 138, 1409-23.

Serrador, J.M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F., 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. Blood 91, 4632-44.

Shaffer, M.H., Dupree, R.S., Zhu, P., Saotome, I., Schmidt, R.F., McClatchey, A.I., Freedman, B.D. and Burkhardt, J.K., 2009. Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. J Immunol 182, 1021-32.

Shcherbina, A., Bretscher, A., Kenney, D.M. and Remold-O'Donnell, E., 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. FEBS Lett 443, 31-6.

Sheetz, M.P. and Dai, J., 1996. Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. Trends Cell Biol 6, 85-9.

Shi, Y., 2009. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. Cell 139, 468-84.

Shimaoka, M., Lu, C., Palframan, R.T., von Andrian, U.H., McCormack, A., Takagi, J. and Springer, T.A., 2001. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 6009-14.

Simmons, D., Makgoba, M.W. and Seed, B., 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. Nature 331, 624-7.

Singbartl, K., Thatte, J., Smith, M.L., Wethmar, K., Day, K. and Ley, K., 2001. A CD2-green fluorescence protein-transgenic mouse reveals very late antigen-4-dependent CD8+ lymphocyte rolling in inflamed venules. J Immunol 166, 7520-6.

Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B. and Sorokin, L., 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. Immunity 22, 19-29.

Smith, A., Bracke, M., Leitinger, B., Porter, J.C. and Hogg, N., 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. J Cell Sci 116, 3123-33.

Smith, A., Carrasco, Y.R., Stanley, P., Kieffer, N., Batista, F.D. and Hogg, N., 2005. A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. J Cell Biol 170, 141-51.

Smith, A., Stanley, P., Jones, K., Svensson, L., McDowall, A. and Hogg, N., 2007. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. Immunol Rev 218, 135-46.

Sperandio, M., Smith, M.L., Forlow, S.B., Olson, T.S., Xia, L., McEver, R.P. and Ley, K., 2003. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. J Exp Med 197, 1355-63.

Springer, T.A., 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 65-72.

Staunton, D.E., Dustin, M.L., Erickson, H.P. and Springer, T.A., 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. Cell 61, 243-54.

Staunton, D.E., Dustin, M.L. and Springer, T.A., 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. Nature 339, 61-4.

Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. and Springer, T.A., 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. Cell 52, 925-33.

Stone, S.R., Hofsteenge, J. and Hemmings, B.A., 1987. Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. Biochemistry 26, 7215-20.

Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kituchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. and Schmitz, F.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria. J. Am. Chem. Soc. 103, 2469-2471.

Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H. and Calderwood, D.A., 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. Science 302, 103-6.

Takada, Y., Ye, X. and Simon, S., 2007. The integrins. Genome Biol 8, 215.

Takagi, J., Beglova, N., Yalamanchili, P., Blacklow, S.C. and Springer, T.A., 2001. Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 11175-80.

Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F., 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun 135, 397-402.

ten Klooster, J.P., Jansen, M., Yuan, J., Oorschot, V., Begthel, H., Di Giacomo, V., Colland, F., de Koning, J., Maurice, M.M., Hornbeck, P. and Clevers, H., 2009. Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex. Dev Cell 16, 551-62.

Tohyama, Y., Katagiri, K., Pardi, R., Lu, C., Springer, T.A. and Kinashi, T., 2003. The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. Mol Biol Cell 14, 2570-82.

Tomei, A.A., Siegert, S., Britschgi, M.R., Luther, S.A. and Swartz, M.A., 2009. Fluid flow regulates stromal cell organization and CCL21 expression in a tissue-engineered lymph node microenvironment. J Immunol 183, 4273-83.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 4350-4.

Trofatter, J.A., MacCollin, M.M., Rutter, J.L., Murrell, J.R., Duyao, M.P., Parry, D.M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A.G., Pulaski, K. and et al., 1993. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. Cell 75, 826.

Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A. and Tsukita, S., 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. J Cell Biol 126, 391-401.

Tsukita, S. and Yonemura, S., 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. J Biol Chem 274, 34507-10.

Tsukita, S., Yonemura, S. and Tsukita, S., 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. Trends Biochem Sci 22, 53-8.

Turunen, O., Wahlstrom, T. and Vaheri, A., 1994. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. J Cell Biol 126, 1445-53.

Vachino, G., Chang, X.J., Veldman, G.M., Kumar, R., Sako, D., Fouser, L.A., Berndt, M.C. and Cumming, D.A., 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. J Biol Chem 270, 21966-74.

Valdembri, D., Sandri, C., Santambrogio, M. and Serini, G., 2011. Regulation of integrins by conformation and traffic: it takes two to tango. Mol Biosyst 7, 2539-46.

Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S. and Cohen, P., 2002. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. FEBS Lett 527, 101-4.

Vijayan, K.V., Liu, Y., Li, T.T. and Bray, P.F., 2004. Protein phosphatase 1 associates with the integrin alphaIIb subunit and regulates signaling. J Biol Chem 279, 33039-42.

Voisin, M.B., Probstl, D. and Nourshargh, S., 2010. Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low-expression regions: characterization in multiple tissues and remodeling during inflammation. Am J Pathol 176, 482-95.

Wang, S., Voisin, M.B., Larbi, K.Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P.H., Sorokin, L. and Nourshargh, S., 2006. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. J Exp Med 203, 1519-32.

Wiesner, S., Legate, K.R. and Fässler, R., 2005. Integrin-actin interactions. Cell Mol Life Sci 62, 1081-99.

Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L. and Arnaout, M.A., 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. Science 294, 339-45.

Xu, H., Bickford, J.K., Luther, E., Carpenito, C., Takei, F. and Springer, T.A., 1996. Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. J Immunol 156, 4909-14.

Xu, H.M. and Gutmann, D.H., 1998. Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. J Neurosci Res 51, 403-15.

Yang, Y., Jun, C.D., Liu, J.H., Zhang, R., Joachimiak, A., Springer, T.A. and Wang, J.H., 2004. Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface. Mol Cell 14, 269-76.

Yu, P., Wang, Y., Chin, R.K., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Kosco-Vibois, M.H., Cyster, J. and Fu, Y.X., 2002. B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. J Immunol 168, 5117-23.

Yu, Y., Khan, J., Khanna, C., Helman, L., Meltzer, P.S. and Merlino, G., 2004. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. Nat Med 10, 175-81.

Zaidel-Bar, R. and Geiger, B., 2010. The switchable integrin adhesome. J Cell Sci 123, 1385-8.

Zang, Q., Lu, C., Huang, C., Takagi, J. and Springer, T.A., 2000. The top of the inserted-like domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1 beta subunit contacts the alpha subunit beta -propeller domain near beta-sheet 3. J Biol Chem 275, 22202-12.

Zhang, K. and Chen, J., 2012. The regulation of integrin function by divalent cations. Cell Adh Migr 6, 20-9.

Zhu, J., Zhu, J. and Springer, T.A., 2013. Complete integrin headpiece opening in eight steps. J Cell Biol 201, 1053-68.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Neben den gebräuchlichen SI-Einheiten, den SI-Präfixen, der IUPAC Nomenklatur und dem Ein/Dreibuchstabencode der kanonischen Aminosäuren wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ADMIDAS	adjacent MIDAS
APC	antigen presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)
APS	Ammoniumpersulfat
BIAP	bovine intestine alkaline phosphatase
BLC	B-lymphocyte chemoattractant
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
Ca/CaM PKII	Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CAD	caspase-activatable Dnase
Cal	Calyculin A
cAMP	cyclic adenosin monophosphate
CCL	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CCR	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
C-ERMAD	C-terminale ERM-Assoziationsdomäne
ConA	Concanavalin A
DAPI	4‘,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH_2O	Bidestilliertes Wasser
DIC	differential interference contrast
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDC-HCl	1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure

ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
E-Selektin	Endothel-Selektin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes-Zell-Sorting
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	fetal bovine serum
FERM	four.1-ezrin-radixin-moesin
FITC	fluorescein-isothiocyanat
FRZ	fibroblastische Retikulumzelle
FSC	Forwardscatter
funkt. Assay	funktionaler Assay
G-Aktin	globuläres Aktin
GDI	GDP dissociation inhibitor
GEF	Guanin Nukleotid Exchange Factor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	hour
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEV	hochendotheliale Venole
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-2	Interleukin-2
IP	Immunpräzipitation
JAMs	junctional adhesion molecules
LAD	Leukozyten-Adhäsionsdefizienz
LERs	low expression regions
LFA-1	lymphocyte function associated antigen 1
LOK	lymphocyte-oriented kinase
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
mAb24	monoklonaler Antikörper 24
mAb38	monoklonaler Antikörper 38
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule 1
MαDM	Methyl-α-D-Mannopyranosid
MBS	Myosin-binding subunit
Merlin	Moesin-Ezrin-Radixin-like Protein
MFI	Mittelwert der Fluoreszenzintensität

MHC	major histocompatibility complex
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site
min	Minute
MLC	Myosin-light-chain
MMM	metallophile Makrophagen der Marginalzone
Mst1	mammalian sterile-20-like kinase
MYPT1	Myosin phosphatase targeting
MZM	Marginalzone-Makrophagen
n.s.	nicht signifikant
NBL4	novel band 4.1-like
N-ERMAD	N-terminale ERM-Assoziationsdomäne
NP-40	Nonidet-P40
Os	Okadainsäure
PBM	perivaskuläre Basalmembran
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
pERM	phosphorylierte ERM-Proteine
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PIP_2	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pMYPT1	phosphoryliertes MYPT1
PNAd	peripheral lymph node addressin
PP	Prolin-reiche Region
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
P-Selektin	Platelet(Blutplättchen)-Selektin
PSGL-1	P-selectin glyoprotein ligand 1
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
PTPH	Protein Tyrosin Phosphatasen
pZAP70	phosphoryliertes ZAP70
RAPL	regulator of cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissue
RIAM	Rap1 GTP-interacting adaptor molecule

ROCK	Rho-associated protein kinase
ROI	Region of interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SDF1α	stromal cell-derived factor 1α
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SIGLEC	sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin1
siRNA	small interfering RNA
SLE	systemic lupus erythematodus
SLIK	Sterile20-like kinase
SSC	Sidescatter
Stau	Staurosporin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
v/v	volume/volume
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
VSV-G	vesicular stomatitis virus – Glycoprotein
w/v	weight/volume
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZAP70	Zeta-chain-associated protein with 70kDa
ZD	zytoplasmatische Domäne

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die „Multi-Step“-Kaskade der T-Zellrekrutierung. ... 3
Abb. 1.2: Die vier Unterfamilien der Integrine. ... 6
Abb. 1.3: Struktur des LFA-1-Heterodimers. ... 8
Abb. 1.4: Die drei Konformationen von LFA-1. ... 10
Abb. 1.5: Die bidirektionale Signalweiterleitung von LFA-1. ... 12
Abb. 1.6: Morphologie einer T-Zelle während der LFA-1 vermittelten Migration. ... 15
Abb. 1.7: Der Modus der Fortbewegung und die Beteiligung des Aktomyosin-Zytoskeletts während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration. ... 16
Abb. 1.8: Schematische Darstellung der ERM-Proteine als Mitglieder der Band 4.1 Superfamilie. ... 19
Abb. 1.9: Konformationsänderung der ERM-Proteine und Modell der FERM-C-ERMAD-Interaktion. ... 20
Abb. 1.10: Schematische Darstellung der ERM-Aktivitätsregulation. ... 21
Abb. 3.1: Lokalisation von ERM-Proteinen im T-Zell-Uropod bei der LFA-1 vermittelten Migration. ... 54
Abb. 3.2: Keine direkte Interaktion von LFA-1 mit Ezrin oder Moesin. ... 56
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Ezrin-Konstrukte und ihre Lokalisation während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration. ... 58
Abb. 3.4: Defekte Deadhäsion von Zellen mit konstitutiv aktivem Ezrin. ... 61
Abb. 3.5: Kein Effekt von konstitutiv aktivem Ezrin auf die LFA-1 Konformation. ... 63
Abb. 3.6: Calyculin A und Okadainsäure inhibieren die Dephosphorylierung von ERM-Proteinen. ... 65
Abb. 3.7: PP1 und PP2A dephosphorylieren ERM-Proteine spezifisch. ... 66
Abb. 3.8: Identifizierung der PP1/PP2A-Untereinheiten und „On-Off“-Interaktion von PP1 mit Ezrin. ... 69
Abb. 3.9: Lokalisation der PP1- und PP2A-Untereinheiten im Uropod wandernder T-Zellen. ... 70
Abb. 3.10: Phosphorylierung von MYPT1 am Threonin 696/694 und Threonin 852 durch ROCK. ... 72
Abb. 3.11: Interaktion von LFA-1 mit PP1 (PP1δ / MYPT1) und PP2A C. ... 73
Abb. 3.12: Dephosphorylierung von ERM-Proteinen nach Bindung von LFA-1 an ICAM-1. ... 75
Abb. 3.13: Kein Effekt einer LFA-1 Konformationsänderung auf den ERM-Phosphorylierungsstatus. 76
Abb. 3.14: Kein Effekt eines T-Zell-Rezeptor-Signals auf den ERM-Phosphorylierungsstatus. ... 77
Abb. 3.15: Langzeitige Erhöhung des pERM-Levels nach Inhibition von PP1/PP2A. ... 79
Abb. 3.16: Kein Effekt der PP1/PP2A Inhibition auf die Zellviabilität. ... 81
Abb. 3.17: Kein Einfluss der PP1/PP2A Inhibition auf die LFA-1 Aktivität. ... 84
Abb. 3.18: Verminderte Adhäsion an ICAM-1 nach PP1/PP2A Inhibition. ... 86
Abb. 3.19: Verminderte chemotaktische Migration nach PP1/PP2A Inhibition. ... 88
Abb. 3.20: Verminderte transendotheliale Migration nach PP1/PP2A Inhibition. ... 89
Abb. 3.21: Keine Rekrutierung naiver T-Zellen in den Lymphknoten nach PP1/PP2A Inhibition. ... 91
Abb. 3.22: Keine Rekrutierung naiver T-Zellen in die weiße Pulpa nach PP1/PP2A Inhibition. ... 93
Abb. 4.1: Zwei experimentelle Möglichkeiten, die Bedeutung der ERM-Aktivitätsregulation während der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration zu untersuchen. ... 97
Abb. 4.2: Auswirkungen eines starren Zytoskeletts auf die LFA-1 vermittelte (2D) Migration sowie Adhäsion, Chemotaxis und Transmigration von T-Zellen *in vitro*. ... 100
Abb. 4.3: Darstellung der Aminosäuresequenzen der Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen der αL-, α1-, α3- und αIIb-Integrinketten. ... 105

Abb. 4.4: Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domänen von αL und β2, die zur Regulation der LFA-1 Aktivität beitragen. 108
Abb. 4.5: Modell der Signaltransduktion bei der LFA-1 vermittelten T-Zellmigration im Uropod. 109
Abb. 4.6: Die Rolle von ROCK bei der Regulation der ERM-Aktivität im Uropod von T-Zellen. 112

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Stammlösungen und Puffer. 28
Tab. 2.2: Verwendete Zellkulturmedien. 29
Tab. 2.3: Verwendete Zellen und Zelllinien. 29
Tab. 2.4: Verwendete Erstantikörper. 31
Tab. 2.5: Verwendete Zweitantikörper. 32
Tab. 2.6: Verwendete Isotyp-Kontrollantikörper. 32
Tab. 2.7: Weitere verwendete Färbereagenzien. 33
Tab. 2.8: Verwendete Reagenzienkits. 33
Tab. 2.9: Verwendete Expressionskonstrukte. 34
Tab. 2.10: Parameter der Amaxa-Transfektionen. 39
Tab. 2.11: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele 41

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der vergangenen Jahre großzügig unterstützt haben.

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Dr. Melanie Laschinger für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ihre ansteckende Begeisterung und ihr fundiertes, fachliches Wissen in der Welt der Integrine und der T-Zellmigration trugen wesentlich zum Fortschritt meiner Arbeit bei. Dabei war es für mich von unschätzbarem Wert, jederzeit Ergebnisse und Probleme diskutieren zu können. Liebe Melanie, ich verdanke dir nicht nur eine große, fachliche, sondern auch persönliche Entwicklung. Ich bin stolz als deine erste Doktorandin diese Arbeit fertig zu stellen.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann danke ich dafür, dass ich meine Arbeit im Labor der Chirurgischen Forschergruppe im Klinikum rechts der Isar unter besten Bedingungen durchführen konnte. Ich möchte mich für das entgegengebrachte Interesse an meinem Thema und die fachlichen Anregungen in vielen Fragen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan bedanken. Großen Dank auch an Herrn PD Dr. Klaus-Peter Janßen für seine Denkanstöße zur rechten Zeit und die kritische Diskussion meiner Arbeit. Frau Prof. Dr. Monique Arpin vom Institut Curie danke ich für die Bereitstellung der Ezrin-Konstrukte.

Während meiner Doktorarbeit haben mich drei Mädels, jede zu ihrer Zeit und auf ihre besondere Art, eng begleitet. Ich möchte Patricia, Heike und Tanja für die Unterstützung im Labor und den großen Spaß an der Arbeit danken. Tanja möchte ich speziell dafür danken, dass sie all meine Ohrwürmer mit mir geteilt und mit ihrer „alles-easy“ Art viele Aufregungen ausgeglichen hat.

Für die große Hilfsbereitschaft im Laboralltag, die wirklich gute Stimmung und die lustigen Mittagspausen, möchte ich mich bei Felicitas, Alex, Widya, Gabi, Tanja R., Anja, Uli, Ann-Kathrin alias A-K und den beiden „verrückten Hühnern“, Anne und Sabine, herzlich bedanken. Dank Euch werde ich immer sehr gerne an meine Doktoranden-Zeit zurückdenken. Danke auch an Mela, die zwar schon vor langer Zeit das Labor verlassen, mich jedoch weiterhin von Berlin aus begleitet hat.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie. Tausend Dank an meine lieben Eltern und meine Schwester Manu, für die unermüdliche Unterstützung und dafür, dass ihr immer für mich da seid. Dankeschön auch an meinen Mann Andi, der stets an mich geglaubt hat. Lieber Andi, ich danke dir für deine Motivation, deine Zuversicht und deine bleibende, positive Lebenseinstellung während der vergangenen Jahre!

Publikationen

Publizierter Kongressbeitrag

Fehlner K., Laschinger M. (2012). Regulation of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-activity during LFA-1-mediated T cell migration. Immunology 137 (Suppl. 1), 378 (P0582).

Manuskript

Fehlner K., Weißer T., Holzmann B., Laschinger M. The integrin LFA-1 signals through the serine/threonine Phosphatase PP1 and PP2A to control ERM activity during T cell migration.

Kongressbeiträge

Vorträge

Fehlner K., Laschinger M. (2013). ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-activity regulation during LFA-1 controlled T cell migration. 2. Meeting des SFB914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ (Obergurgl, Österreich).

Fehlner K., Laschinger M. (2012). Regulation of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-activity during LFA-1-mediated T cell migration. Meeting des Graduiertenprogramms IRTG („Intgrated Research Training Group“) des SFB914 (San Servolo, Venedig, Italien).

Fütterer K., Laschinger M. (2012). Regulation of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-activity during LFA-1-mediated T cell migration. 1. Meeting des SFB914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ (Kreuth, Deutschland).

Poster Präsentationen

Fehlner K., Laschinger M. (2012). Regulation of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-acitivity during LFA-1-mediated T cell migration. European Congress of Immunology (Glasgow, Schottland).

Fütterer K. Hons M., Schmidbauer P., Anders H., Stein J.V., Laschinger M. (2011). Requirement of LFA-1 activity regulation for T cell function. 5. Zoo Meeting “Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer” (Amsterdam, Niederlande).