

**Die Rolle von Myosin 9b und LFA-1 in  
Dendritischen Zellen für die DC/T-  
Zellinteraktion und die Induktion einer  
Immunantwort**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Stefanie Pektor**

geboren am 30. Juli 1981  
in Bingen am Rhein  
Mainz, November 2012

Angefertigt an der Hautklinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan: Prof. Dr.

1. Berichterstatter: Prof. Dr.

2. Berichterstatter: Prof. Dr.

Tag der mündlichen Prüfung:

|          |                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                          | <b>1</b>  |
| 1.1      | ANGEBORENES IMMUNSYSTEM.....                                                     | 1         |
| 1.2      | ADAPTIVES IMMUNSYSTEM .....                                                      | 3         |
| 1.3      | DENDRITISCHE ZELLEN.....                                                         | 3         |
| 1.3.1    | ENDOZYTOSE.....                                                                  | 6         |
| 1.3.2    | ANTIGEN-PROZESSIERUNG UND PRÄSENTATION.....                                      | 6         |
| 1.4      | ZELLMIGRATION.....                                                               | 8         |
| 1.4.1    | AKTIN-ZYTOSKELETT.....                                                           | 8         |
| 1.4.2    | REGULATION DER MIGRATION ÜBER RHO-GTPASEN.....                                   | 9         |
| 1.4.3    | MYOSIN 9B.....                                                                   | 10        |
| 1.5      | T-LYMPHOZYTEN.....                                                               | 13        |
| 1.6      | INTERAKTION VON DC UND T-LYMPHOZYTEN.....                                        | 16        |
| 1.7      | ZIEL DER ARBEIT.....                                                             | 18        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                               | <b>20</b> |
| 2.1      | MATERIAL .....                                                                   | 20        |
| 2.1.1    | ANTIKÖRPER.....                                                                  | 20        |
| 2.1.2    | LABORGERÄTE.....                                                                 | 21        |
| 2.1.3    | REAGENZIEEN UND CHEMIKALIEN.....                                                 | 22        |
| 2.1.4    | PUFFER.....                                                                      | 24        |
| 2.1.5    | MEDIEN.....                                                                      | 25        |
| 2.1.6    | SOFTWARE.....                                                                    | 26        |
| 2.1.7    | VERBRAUCHSMATERIALIEN.....                                                       | 26        |
| 2.1.8    | VERSUCHSTIERE.....                                                               | 27        |
| 2.1.9    | ZELLINIEN.....                                                                   | 30        |
| 2.2      | METHODEN .....                                                                   | 31        |
| 2.2.1    | ZELLISOLIERUNG UND KULTUR.....                                                   | 31        |
| 2.2.1.1  | BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL.....                                               | 31        |
| 2.2.1.2  | KNOCHENMARKSABGELEITETE DENDRITISCHE ZELLEN (BMDC).....                          | 31        |
| 2.2.1.3  | DENDRITISCHE ZELLEN AUS DER MILZ.....                                            | 31        |
| 2.2.1.4  | ISOLATION VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUS LN.....                                   | 32        |
| 2.2.1.5  | NAIVE T-ZELLEN UND NATÜRLICHE TREG.....                                          | 33        |
| 2.2.1.6  | GENERIERUNG VON INDUZIERTEN TREG (ITREG).....                                    | 33        |
| 2.2.2    | DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....                                                        | 34        |
| 2.2.2.1  | ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON OBERFLÄCHENANTIGENEN.....                                  | 34        |
| 2.2.2.2  | INTRAZELLULÄRE FOXP3-FÄRBUNG.....                                                | 34        |
| 2.2.2.3  | INTRAZELLULÄRE IFN- $\gamma$ FÄRBUNG.....                                        | 35        |
| 2.2.3    | IN VITRO-ANALYSEN.....                                                           | 35        |
| 2.2.3.1  | ENDOZYTOSE UND PROZESSIERUNG VON ANTIGENEN.....                                  | 35        |
| 2.2.3.2  | ZYTOKINSEKRETION (CBA).....                                                      | 36        |
| 2.2.3.3  | HERSTELLUNG EINER 3D-KOLLAGENMATRIX.....                                         | 37        |
| 2.2.3.4  | ANALYSE VON ZELLMIGRATION UND DC-T-ZELLINTERAKTION IN DER 3D-KOLLAGENMATRIX..... | 37        |
| 2.2.3.5  | IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN IN "CHAMBER SLIDES".....                               | 38        |
| 2.2.3.6  | EMIGRATION VON LANGERHANSZELLEN AUS EPIDERMISPRÄPARATEN.....                     | 38        |
| 2.2.3.7  | ANTIGENSPEZIFISCHER T-ZELLPROLIFERATIONSTEST.....                                | 39        |
| 2.2.3.8  | MLR.....                                                                         | 39        |
| 2.2.3.9  | ZELLADHÄSION AN EXTRAZELLULÄRE MATRIX.....                                       | 39        |
| 2.2.3.10 | ZELLADHÄSION AN ICAM-1.....                                                      | 40        |

|          |                                                                                                                                          |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.4    | TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....                                                                                                         | 40        |
| 2.2.4.1  | BETÄUBUNG VON VERSUCHSMÄUSEN.....                                                                                                        | 40        |
| 2.2.4.2  | BLUTABNAHME.....                                                                                                                         | 40        |
| 2.2.4.3  | IN VIVO-MIGRATION ("FITC-PAINTING").....                                                                                                 | 40        |
| 2.2.4.4  | IN VIVO-PROLIFERATION.....                                                                                                               | 40        |
| 2.2.4.5  | KONTAKTHYPERSENSIBILISIERUNG (CHS).....                                                                                                  | 41        |
| 2.2.5    | MOLEKULARBIOLOGIE.....                                                                                                                   | 42        |
| 2.2.5.1  | ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA ZUR GENOTYPISIERUNG.....                                                                                      | 42        |
| 2.2.5.2  | PCR.....                                                                                                                                 | 42        |
| 2.2.5.3  | DNA-GELELEKTROPHORESE.....                                                                                                               | 43        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>                                                                                                                   | <b>44</b> |
| 3.1      | ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DC UND T-ZELLEN.....                                                                                    | 44        |
| 3.1.1    | ANTIGENABHÄNGIGE STIMULATION VON CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN DURCH BMDC UND SP37A3.....                                                    | 44        |
| 3.1.2    | DIFFERENTIELLE STIMULATION VON BMDC UND SP37A3.....                                                                                      | 46        |
| 3.1.3    | INTERAKTION VON BMDC UND SP37A3 MIT CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN.....                                                                       | 49        |
| 3.1.4    | INTERAKTION VON BMDC UND SP37A3 MIT CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> TREGS.....                                                        | 54        |
| 3.1.5    | INTERAKTION VON UNTERSCHIEDLICH AKTIVIERTEN SP37A3 MIT CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-ZELLEN – INDUKTION VON TREGS.....            | 60        |
| 3.2      | ROLLE VON MYOSIN 9B.....                                                                                                                 | 69        |
| 3.2.1    | ZUCHT UND GENOTYPISIERUNG DER MYO9B <sup>-/-</sup> MÄUSE.....                                                                            | 69        |
| 3.2.2    | DIE RHO-SIGNALTRANSDUKTIONSAKTIVITÄT IN MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC IST VERSTÄRKT.....                                                     | 70        |
| 3.2.3    | PHÄNOTYP DER MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC.....                                                                                              | 71        |
| 3.2.4    | ANTIGENAUFNAHME, PROZESSIERUNG UND SEKRETION PRO-INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE DURCH MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC.....                         | 72        |
| 3.2.5    | DIE SPONTANE UND GERICHTETE MIGRATION DER MYO9B <sup>-/-</sup> DC IN DER 3D-KOLLAGENMATRIX IST IMMENS GESTÖRT.....                       | 74        |
| 3.2.6    | DIE EX VIVO UND IN VIVO EMIGRATION VON DC AUS DER HAUT VON MYO9B <sup>-/-</sup> MÄUSEN IST REDUZIERT.....                                | 78        |
| 3.2.7    | MYO9B <sup>-/-</sup> MÄUSE ENTWICKELN EINE REDUZIERTES CHS AUF TNCB.....                                                                 | 81        |
| 3.2.8    | DIE INTERAKTION ZWISCHEN MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC UND CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN IST VERÄNDERT.....                                      | 81        |
| 3.2.9    | MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC SIND SCHWACHE STIMULATOREN VON T-ZELLAKTIVIERUNG UND – PROLIFERATION IN EINER 3D UMGEBUNG.....                 | 83        |
| 3.2.10   | MYO9B <sup>-/-</sup> BMDC: ADHÄSION AN DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX.....                                                                    | 87        |
| 3.2.11   | MYO9B <sup>-/-</sup> CD4 T-ZELLEN: MIGRATION UND PROLIFERATION IN DER 3D-KOLLAGENMATRIX.....                                             | 90        |
| 3.3      | ROLLE VON LFA-1.....                                                                                                                     | 91        |
| 3.3.1    | AKTIVES LFA-1 VERMITTELT DIE ADHÄSION DENDRITISCHER ZELLEN AN ICAM-1.....                                                                | 91        |
| 3.3.2    | LFA-1 <sup>d/d</sup> BMDC WEISEN EINE VERLÄNGERTE INTERAKTION MIT T-ZELLEN AUF.....                                                      | 93        |
| 3.3.3    | INAKTIVES LFA-1 AUF BMDC IST ENTSCHEIDEND FÜR DIE AKTIVIERUNG UND PROLIFERATION VON T-ZELLEN.....                                        | 94        |
| 3.3.4    | DIE EXPRESSION VON AKTIVEM LFA-1 AUF BMDC FÜHRT ZU EINER VERRINGERTEN DTH.....                                                           | 97        |
| 3.3.5    | DER VERLUST VON CYTIP IN DC INDUZIERT VERLÄNGERTE KONTAKTE ZU T-ZELLEN UND BEEINTRÄCHTIGT DIE T-ZELLPROLIFERATION.....                   | 98        |
| 3.3.6    | DIE INHIBITION VON AKTIVEM LFA-1 AUF DC VERMINDERT DIE AUSBILDUNG LANGER KONTAKTE ZU T-ZELLEN UND VERSTÄRKT DIE T-ZELLPROLIFERATION..... | 100       |

|          |                                                                                                                                       |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION .....</b>                                                                                                               | <b>104</b> |
| 4.1      | ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DC UND T-ZELLEN.....                                                                                 | 103        |
| 4.1.1    | SP37A3 HABEN VERGLEICHBARE EIGENSCHAFTEN MIT BMDC.....                                                                                | 103        |
| 4.1.2    | ZWISCHEN MDC UND TREG KOMMT ES ZUR AGGREGATBILDUNG.....                                                                               | 104        |
| 4.1.3    | ANALYSE DER DC/T-ZELLINTERAKTION IN EINEM IMMUNSUPPRESSIVEN MILIEU....                                                                | 106        |
| 4.2      | ROLLE VON MYOSIN 9B .....                                                                                                             | 107        |
| 4.2.1    | DIE VERSTÄRKTE RHO-SIGNALTRANSDUKTIONSAKTIVITÄT IN MYO9B <sup>-/-</sup> DC FÜHRT<br>ZU EINER VERMINDERTEN MIGRATIONS-KAPAZITÄT.....   | 107        |
| 4.2.2    | DIE BEEINTRÄCHTIGTE <i>IN VIVO</i> MIGRATION RESULTIERT IN EINER REDUZIERTEN<br>CHS IN MYO9B <sup>-/-</sup> MÄUSEN.....               | 110        |
| 4.2.3    | MYO9B IST FÜR DIE DC-DIFFERENZIERUNG UND - MATURIERUNG SOWIE FÜR DIE<br>AUFNAHME UND PROZESSIERUNG VON ANTIGENEN NICHT NOTWENDIG..... | 111        |
| 4.2.4    | DER VERLUST VON MYO9B REDUZIERT DIE T-ZELLAKTIVIERUNG UND FÜHRT ZU<br>EINER VERÄNDERTEN DC/T-ZELLINTERAKTION.....                     | 112        |
| 4.3      | ROLLE VON LFA-1 .....                                                                                                                 | 114        |
| 4.3.1    | AKTIVES LFA-1 AUF DC FÜHRT ZU EINER VERLÄNGERTEN INTERAKTION MIT<br>T-ZELLEN.....                                                     | 114        |
| 4.3.2    | LFA-1 MUSS AUF DC INAKTIV VORLIEGEN, UM EINE EFFEKTIVE T-ZELLAKTIVIERUNG<br>UND PROLIFERATION ZU INDUZIEREN.....                      | 115        |
| 4.3.3    | AKTIVES LFA-1 FÜHRT ZU EINER REDUZIERTEN TH1 POLARISIERUNG GEFOLGT VON<br>EINER REDUZIERTEN DTH-ANTWORT.....                          | 116        |
| 4.3.4    | CYTIP KONTROLLIERT DIE DC/T-ZELLINTERAKTION INDEM ES DIE LFA-1 AKTIVITÄT<br>IN DC REGULIERT.....                                      | 117        |
| <b>5</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>                                                                                              | <b>118</b> |
| 5.1      | ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DC UND T-ZELLEN.....                                                                                 | 118        |
| 5.2      | ROLLE VON MYOSIN 9B .....                                                                                                             | 119        |
| 5.3      | ROLLE VON LFA-1 .....                                                                                                                 | 120        |
| <b>6</b> | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                                                                                    | <b>122</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATUR .....</b>                                                                                                                | <b>125</b> |
| <b>8</b> | <b>LEBENS-LAUF.....</b>                                                                                                               | <b>140</b> |
| <b>9</b> | <b>ANHANG.....</b>                                                                                                                    | <b>145</b> |
| 9.1      | KLONIERUNGSSTRATEGIE ZUR HERSTELLUNG DER MYO9B <sup>-/-</sup> MÄUSE .....                                                             | 145        |
| 9.2      | KLONIERUNGSSTRATEGIE ZUR HERSTELLUNG DER LFA-1 <sup>D/D</sup> MÄUSE .....                                                             | 146        |
| 9.3      | EIGENE PUBLIKATIONEN .....                                                                                                            | 147        |

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborenes Immunsystem

Jeder Organismus ist einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Pilzen, Bakterien sowie einzelligen (Protozoen) und mehrzelligen (Bandwürmer u.ä.) Parasiten ausgesetzt. Daher hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes System aus Abwehrmechanismen gebildet, das den Körper vor eintretenden Pathogenen schützt und ausgelöste Infektionen bekämpfen soll. Dabei gibt es allgemeine, angeborene Schutzmechanismen, aber auch pathogen-spezifische Reaktionen, wie die Bildung von Antikörpern. Aufgebaut ist das Immunsystem aus einem Netzwerk aus lymphatischen Organen im Körper und verschiedenen Zelltypen, die in der Lage sind, durch unterschiedliche Rezeptoren und lösliche Mediatoren auf Pathogene zu reagieren. Die unterschiedlichen Immunmechanismen des Körpers werden in angeborene und adaptive Immunität unterteilt.

Die angeborene Immunität umfaßt generelle, pathogenunspezifische Abwehrmechanismen und beinhaltet verschiedene Körperfunktionen, wie die physikalische Barriere der Haut und der Schleimhäute durch den leicht sauren pH-Wert bzw. die festen Zell-Zell-Verbindungen der einzelnen Hautschichten, aber auch die Schweißproduktion (enthält das Enzym Lysozym) und die in der Haut enthaltenen Fettsäuren. Desweiteren übernehmen antimikrobielle Peptide wie Defensine und Cathelizidine eine protektive Rolle in den frühen Phasen einer Infektion. Diese sind weit verbreitet in epithelialen Zellen und Phagozyten und liegen meist in großen Mengen vor (bis zu 10mg/ml) oder werden schnell als Reaktion auf eine Infektion hin produziert (Ganz, 2003).

Neben diesen physikalischen primären Epithelbarrieren des Körpers zählen zum angeborenen Immunsystem Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind, das Komplementsystem und Entzündungsreaktionen. Phagozytierende Zellen sind zum Beispiel Makrophagen, die allgemeine Pathogen-Bestandteile erkennen, diese dann aufnehmen und anschließend proinflammatorische Zytokine und Chemokine freisetzen. Die Zytokine und Chemokine beeinflussen andere Zellen des Immunsystems und lösen unter anderem deren Auswanderung aus dem Blut an den

Infektionsherd aus. Die Gesamtheit der durch Zytokine und Chemokine ausgelösten Vorgänge bezeichnet man als Entzündungsreaktion. Diese wird durch verschiedene Merkmale charakterisiert, wie Hautrötung, Wärme, Schmerz und Schwellung. Röte, Wärme und Schwellung werden durch die Erweiterung und erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße bedingt, wodurch der Blutfluss verstärkt wird und Flüssigkeit ins Gewebe austreten kann. Der Schmerz entsteht durch die Migration und Diapedese von angelockten Leukozyten und deren Ausschüttung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren. Zu diesen gehören hauptsächlich neutrophile Granulozyten, die ebenfalls Bakterien erkennen und phagozytieren.

Während der Entzündungsreaktion kommt es auch zu einer Akkumulation von Plasmaproteinen an der Infektionsstelle. Zu diesen Plasmaproteinen gehören die Komponenten des Komplementsystems. Durch das Komplement werden die Oberflächen der Mikroorganismen mit Fragmenten bedeckt (opsonisiert), die anschließend von phagozytierenden Zellen erkannt werden können. Außerdem wirken die kleinen Fragmente einiger Komplementproteine als Chemoattraktoren, die weitere Phagozyten anlocken und aktivieren. Weiterhin können durch bestimmte Komplementbestandteile Bakterien direkt zerstört werden, indem eine Pore in der Bakterienmembran erzeugt wird. Kann der Erreger nicht allein durch das angeborene Immunsystem eingedämmt werden, wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Die Verbindung zwischen beiden Systemen bilden antigenpräsentierende Zellen (APC), hauptsächlich dendritische Zellen (DC). Diese sind ebenfalls in der Lage, Pathogenmaterial aufzunehmen zu den drainierenden Lymphknoten (LN) zu wandern und dort Peptide der zuvor aufgenommenen Pathogene den Lymphozyten zu präsentieren (Macatonia et al., 1987). Um das adaptive Immunsystem aktivieren zu können, müssen phagozytierende Zellen bestimmte Rezeptoren an ihrer Oberfläche tragen, mit denen sie das Pathogen erkennen und hierdurch selbst aktiviert werden. Zu den wichtigsten Rezeptoren in diesem Zusammenhang gehören die Rezeptoren der Toll-ähnlichen Familie (TLRs). Die Signalweiterleitung über diese Rezeptoren führt zur Ausreifung der APC, ihrer gerichteten Migration in drainierende Lymphknoten und die Produktion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine. Diese sind nicht nur für die angeborene Immunität von Bedeutung, sondern auch zur Expression von kostimulatorischen Molekülen, die wiederum für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort essentiell sind.

## 1.2 Adaptives Immunsystem

Zusätzlich zum angeborenen Immunsystem verfügen Vertebraten über das so genannte adaptive Immunsystem. Dieses entwickelte sich vor etwa 500 Millionen Jahren. Es wird aktiv, wenn das angeborene System einen Erreger nicht alleine eindämmen kann. Die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem bilden wie vorstehend ausgeführt APC, vor allem DC (Banchereau et al., 2000). Eine aktivierte DC sezerniert Zytokine, welche die angeborene und die adaptive Immunität fördern. Die Zelle aktiviert Lymphozyten in den regionalen Lymphknoten durch Präsentation eines Peptids über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; major histocompatibility complex). Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, bei der mit verschiedenen Rezeptoren konservierte Oberflächenmerkmale erkannt werden, besitzen die Lymphozyten jeweils nur Rezeptoren für ein spezifisches Peptid (T-Zellen) bzw. Protein (B-Zellen), die sich unter den einzelnen Lymphozyten unterscheiden. Dabei entsteht die Erkennungsvielfalt durch die Anzahl der Zellen. Wird ein T-Lymphozyt durch Erkennung seines Antigens auf einer DC in Kombination mit kostimulatorischen Signalen aktiviert, kommt es zur klonalen Selektion. Antigenrezeptoren finden sich auf T- und auf B-Lymphozyten, die jeweils unterschiedliche Bereiche der Antigenerkennung abdecken. B-Zellen sind in der Lage, Antigene außerhalb von Körperzellen zu erkennen, wohingegen T-Zellen auch Antigene erkennen können, die innerhalb von Zellen gebildet werden.

## 1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) entstehen aus myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Nach ihrer Bildung verteilen sich DCs über die Blutbahn im Körper bzw. migrieren zu peripheren lymphatischen Organen. Im immaturren Zustand sind die Zellen klein und rund und exprimieren nur geringe Mengen an MHC- und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86. Nach ihrer Aktivierung bilden sie Zellausläufer (Dendriten) aus, die der Oberflächenvergrößerung dienen und für die DC-Migration und Interaktion mit T-Zellen relevant sind. Außerdem werden große Mengen an MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen exprimiert und proinflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-12 sezerniert. Eine



aktivierte DC kann mit 100 bis 3000 T-Zellen interagieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Zuerst beschrieben wurde eine Subpopulation von DC in der Haut 1868 durch Paul Langerhans, der ihnen eine neurologische Funktion zuordnete. Erst als um 1970 Ralph Steinman dendritische Zellen in der Milz beschrieb, konnten die nach ihrem Entdecker benannten Langerhans-Zellen dieser Zellart zugeordnet werden (Steinman et al., 1980).

In der Maus gibt zwei Hauptgruppen von dendritischen Zellen: Zum einen die klassischen oder konventionellen DC, welche wiederum in zwei Unterklassen unterteilt werden: die migratorischen und die Gewebe-residenten DC, und zum zweiten die plasmazytoiden DC (pDC). Klassische migratorische DC wandern konstitutiv durch die peripheren Gewebe auf der Suche nach Antigenen. Sie können in  $CD11b^+$  (auch dermale oder interstitielle DC) und in  $CD11b^-CD103^+$  DC unterteilt werden (Bedoui et al., 2009; Belz et al., 2004; Liu and Nussenzweig, 2010). Wenn migratorische DC Antigen aufgenommen haben, wandern sie über die afferenten Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten. In der Milz findet man keine migratorischen, sondern nur die lymphoiden Gewebe-residenten DC. Diese Gruppe kann weiter in drei Gruppen aufgesplittet werden: die  $CD4^+$ , die  $CD8\alpha^+$  und die  $CD4^-CD8\alpha^-$  DC.  $CD8\alpha^+$  DC sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit der Kreuz-Präsentation (den Haan et al., 2000) und ihre Hauptrolle für die Induktion zytotoxischer  $CD8^+$  T-Zellantworten (Allan et al., 2003; Belz et al., 2004; Edelson et al., 2010; Kim et al., 2009; Smith et al., 2003). Obwohl  $CD4^+$  und  $CD4^-CD8\alpha^-$  DC unter bestimmten Bedingungen auch in der Lage sind MHC-I restringierte Antigene zu präsentieren (Lukens 2009; Kim et al., 2009), ist ihre Hauptaufgabe, MHC-II-assoziierte Antigene  $CD4^+$  T-Zellen zu präsentieren (Allenspach et al., 2008; Mount et al., 2008; Pooley et al., 2001). Lymphoide Gewebe-residente DC entwickeln sich aus Vorläufer-DC im Gewebe selbst und wandern nicht aus anderen Geweben ein. Man findet sie neben der Milz auch in den LN und im Thymus (Naik et al., 2006), wo sie ideal platziert sind, um Antigene oder Pathogene aufzunehmen, die über das Blut transportiert werden (Belz et al., 2004; Lundie et al., 2008; Sponaas et al., 2006). Generell sind klassische DC darauf spezialisiert, Antigene zu prozessieren und zu präsentieren.

Langerhans-Zellen (LC), die in der Epidermis ansässig sind, gehören zwar auch zu

den migratorischen DC und migrieren zu den LN, um Antigen zu präsentieren. Anders als konventionelle DC, die aus Knochenmarksvorläufern entstehen, gehen Langerhanszellen aber aus einer lokalen LY6C<sup>+</sup> myelomonozytären Vorläuferzellpopulation in der Haut hervor (Chorro et al., 2009). Sie exprimieren große Mengen Langerin (CD207) und sind CD8α<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>. Charakteristisch für LC sind ihre Birbeck-Granula, deren Hauptbestandteil Langerin ist und denen eine Rolle in der Antigenaufnahme zugesprochen wurde (Valladeau et al., 2000; 2003). Neben den LC gibt es auch noch dermale Langerin<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup> DC (dDC). Diese sind nicht verwandt mit LC, wie es z.B. anhand von Knochenmarkschimären gezeigt werden konnte und gehören zu den konventionellen migratorischen DC. Nach einer sublethalen Bestrahlung werden dermale Langerin<sup>+</sup> DC durch Donorzellen ersetzt (Pouilin et al., 2007), während keine LC-Repopulierung auftrat, da die lokal residierenden Vorläuferzellen radioinsensitiv sind (Merad et al., 2002). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von epidermalen LC und dermalen Langerin<sup>+</sup> DC ist die Expression von EPCAM, welches von LC stark exprimiert wird, nicht aber von dermalen DC (Bursch et al., 2007; Nagao et al., 2009). Außerdem findet man dDC 24 h nach einer Sensibilisierung der Haut im drainierenden LN, während LC 3–4 Tage brauchen, um von der Epidermis in die LN zu migrieren (Kissenpfennig et al., 2005).

pDC sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit, infolge einer pathogenvermittelten Aktivierung schnell große Mengen an Typ I-Interferonen zu produzieren und sind hauptsächlich bei der Immunantwort gegen Viren beteiligt (Colonna et al., 2004). pDC exprimieren einige charakteristische Marker wie SIGLEC-H und BST2 in der Maus (BDCA2 und LILRA4 im Menschen). Außerdem exprimieren murine und humane pDC CD45RA (Reizis et al., 2011a). Sie besitzen eine schwache Antigen-Präsentations-Kapazität, wobei ihr genauer Beitrag zu Immunantworten immer noch relativ unklar ist (Reizis et al., 2011b). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass humane aktivierte pDC die Proliferation von T-Effektorzellen induzieren können, nicht aber die Aktivierung von Tregs und dass es dadurch zu einer Expansion von T-Effektorzellen kommt (Hubo and Jonuleit, 2012).

Unter inflammatorischen Bedingungen entwickelt sich aus zirkulierenden Blut-Monozyten noch eine weitere Untergruppe von DC: die Monozyten-abgeleiteten DC (Kool et al., 2008; Leon et al., 2007; Naik et al., 2006; Serbina et al., 2003). Ähnlich wie konventionelle DC exprimieren auch diese DC CD11c, MHCII, CD24, SIRPα und

DC-SIGN, verlieren aber die Expression von M-CSFR und LY6C. Diese Zellen stellen potente Antigen-präsentierende Zellen dar, die im Falle einer akuten Entzündung zur Stelle sind, um über den Mechanismus der Kreuz-Präsentation bestimmte Erreger schnell und wirksam zu bekämpfen (Cheong et al., 2010).

### 1.3.1 Endozytose

Immature DC können Antigene über verschiedene Wege effizient aufnehmen. Zum einen über die Makropinozytose, die Rezeptor-vermittelte Endozytose über Lektinrezeptoren (Mannoserezeptor, DEC-205, Langerin, DC-SIGN) (Engering et al., 1997; Jiang et al., 1995; Sallusto et al., 1995; Tan et al., 1997) oder die Fc-Rezeptoren I (CD64) und II (CD32) (Fanger et al., 1996) und über die Phagozytose von Partikeln, wie z.B. Latex-Beads (Matsuno et al., 1996), apoptotischen und nekrotischen Zellfragmenten (Albert et al., 1998a, b), Viren und Bakterien (Rescigno et al., 1999) sowie von intrazellulären Parasiten wie *Leishmania major* (Moll, 1993).

### 1.3.2 Antigen-Prozessierung und Präsentation

Generell werden aufgenommene Antigene nach ihrer Prozessierung von DC über MHC-II Moleküle präsentiert: Diese werden mit Peptiden beladen, die in Endosomen generiert werden. Zunächst werden die Antigene bei der Endozytose in Endosomen eingeschlossen. Diese werden dann zunehmend saurer und fusionieren schließlich mit Lysosomen. Endosomen und Lysosomen enthalten Proteasen wie Cathepsin S, die im sauren Milieu aktiviert werden und die Antigene in Peptide aufspalten (Chapman, 1998; Nakagawa and Rudensky, 1999; Pieters, 2000).

Neu synthetisierte MHC-II-Moleküle gelangen in das Endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie durch eine MHC-II-assoziierte invariante Kette (Ii) daran gehindert werden, zelleigene Peptide aus dem Lumen des ER zu binden. Eine Ii bindet so an das MHC-II-Molekül, dass ein Teil seiner Polypeptidkette in der Peptidbindungsfurche liegt, wodurch diese blockiert wird. Außerdem sorgt die Ii für den Transport des MHC-II-Moleküls aus dem ER zu den Lysosomen, wo die Beladung mit Peptid stattfindet (Brachet et al., 1997; Roche et al., 1991). Die Ii wird dort von Proteasen in mehreren Schritten geschnitten, so dass nur noch ein kurzes Ii-Stück in der Furche verbleibt, das man als CLIP-Fragment (*class-II-associated invariant-chain peptide*) bezeichnet. Um die Peptidanlagerung zu ermöglichen muss das CLIP-Fragment von der Bindungsfurche abdissoziieren oder verdrängt werden. Dieser Vorgang und die

Beladung der MHC-II-Moleküle werden durch sogenannte M-Moleküle katalysiert (Cella et al., 1997; Inaba et al., 2000; Watts, 2001). Anschließend wird der MHC-II:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und  $CD4^+$  T-Zellen präsentiert. MHC-II-Moleküle, die nach der Dissoziation von der invarianten Kette kein Peptid binden, sind instabil, aggregieren und werden schnell abgebaut.

Neben den klassischen MHC-II-Molekülen existieren weitere MHC-II-ähnliche Moleküle. Eine Variante ist das humane HLA-DM (murin H-2M). Dieses Molekül, das ebenfalls aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette besteht, besitzt eine geschlossene Bindungsfurche und ist somit nicht zur Peptidpräsentation fähig. Seine Aufgabe besteht vielmehr in der Stabilisierung leerer MHC-II-Moleküle, sowie in der Katalyse der Peptidbindung und der Freisetzung des CLIP-Fragments. Eine weitere wichtige Funktion von HLA-DM ist das Lösen von Peptiden aus der Bindungsfurche, die lediglich instabil gebunden werden können und durch andere Peptide mit einer festeren Bindung ersetzt werden, was als „peptide editing“ bezeichnet wird. Dadurch wird sichergestellt, dass die Peptid:MHC-II-Komplexe lange genug auf der Oberfläche der APC bleiben, um die entsprechenden  $CD4^+$  T-Zellen zu stimulieren (Jensen et al., 1999; Kropshofer et al., 1997).

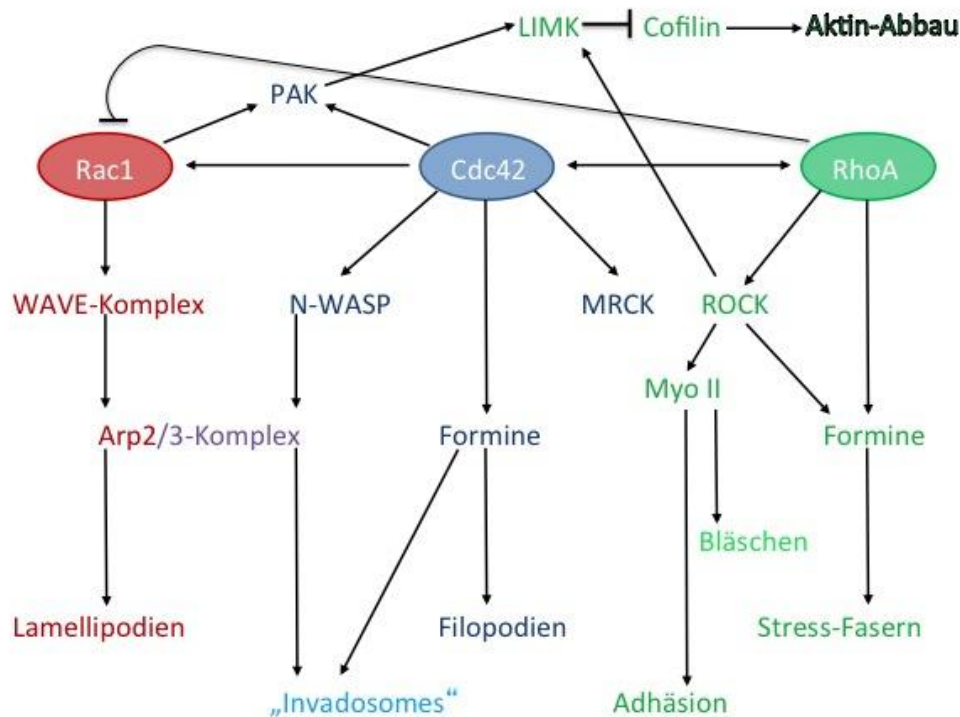
Über den Mechanismus der Kreuz-Präsentation können DC extrazelluläre Antigene aufnehmen, prozessieren und über MHC-I-Moleküle zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen präsentieren (Heath et al., 2004). Da alle somatischen Zellen konstitutiv MCHI exprimieren, erlaubt es dieser Mechanismus dem Immunsystem, Krebszellen oder von Viren oder intrazellulären Bakterien befallene Körperzellen zu eliminieren (Rock and Shen, 2005; Shen and Rock, 2006). Es gibt zwei Hauptmechanismen der Kreuz-Präsentation: Im ersten Weg werden die Antigene über ein Phagosom aufgenommen und ins Zytosol transferiert wo sie vom Proteasom aufgespalten werden. Die hier generierten Peptide werden dann von TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins ER transportiert, dort von den ER-Aminopeptidasen ERAP1 und 2 (in Mäusen nur ERAP1) auf die richtige Länge getrimmt, an MHC-I-Moleküle gebunden und dann in Phagosomen inkorporiert, oder direkt zu MHC-I-Molekülen in Phagosomen transferiert (Firat et al., 2007). Dort werden die Peptide weiter hydrolysiert, u.a. von der Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP) (Saveanu et al., 2009). Im zweiten Weg werden die kreuz-präsentierten Peptide direkt im Phagosom selbst generiert. Hier sorgen Cystein-Proteasen wie Cathepsin S für die Aufspaltung der Antigene in die Oligopeptide (Shen et al., 2004). Außerdem ist IRAP an der

Generierung präsentierter Peptide in diesem Kompartiment beteiligt (Saveanu et al., 2009). Beide Wege führen zur Ausbildung einer CD8 T-Zellantwort, aber der erste Weg über das Phagosom und das Cytosol trägt stärker dazu bei, als der zweite Weg.

## **1.4 Zellmigration**

### **1.4.1 Aktin-Zytoskelett**

Zellmigration ist essentiell für die Ausbildung von Immunantworten (Friedl and Gilmour, 2009). An erster Stelle steht in der Zellmigration die Polarisierung der Zelle, gefolgt von einer Veränderung der Zellform, die hauptsächlich durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts bedingt ist (Verkhovsky et al., 1999). An der Ausbildung der Zellpolarität sind außerdem Mikrotubuli beteiligt, welche aber nicht für die Migration benötigt werden (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Euteneuer and Schliwa, 1984). Die Kräfte, die an der Migration beteiligt sind, werden durch Netzwerke und Bündel von Aktin-Filamenten generiert und erhalten, die miteinander und mit der extrazellulären Matrix interagieren (Small et al., 2002). Die Migration kann in unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Zunächst kommt es zu einer Ausstülpung, zur Formation und Stabilisierung von Anhaftungsstellen an der Zellfront, gefolgt von einem Nachziehen des Zellkörpers und zur Destabilisierung der Anhaftungspunkte am hinteren Ende der Zelle (Mitchison and Cramer, 1996). Verschiedene Formen der Ausstülpung sind Lamellipodien, Filopodien und Bläschen (Small et al., 2002; Charras and Paluch, 2008).



**Abb. 1: Der Signaltransduktionsweg der Rho-GTPasen.**

Die Aktinzytoskelet-Reorganisation wird durch die Familie der kleinen Rho-GTPasen reguliert (Abb. aus Rottner and Stradal, 2011; verändert)

### 1.4.2 Regulation der Migration über Rho-GTPasen

Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Migration wird maßgeblich über die Rho-Familie der kleinen GTPasen gesteuert. Die am besten charakterisierten Mitglieder sind Rac1, Cdc42 und RhoA. Rac1 ist vor allem an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt, welche über den WAVE-Komplex (WASP-Familie Verprolin Homolog) ein NPF (*nucleation promoting factor*) für Arp2/3 und den Arp2/3-Komplex erfolgt (Rottner and Stradal, 2011). Cdc42 kann ebenfalls den Arp2/3-Komplex aktivieren, was zur Ausbildung von Endosomen führt (Stradal and Scita, 2006). Über die Aktivierung von Forminen wie mDia2 (*murine diaphanous-related formin 2*) werden vor allem die Aktin-Filamente in Filopodien downstream von Cdc42 induziert (Block et al., 2008). RhoA sorgt über die Ausbildung sogenannter Streß-Fasern für die Kontraktion der Zelle und die Zelladhäsion. Über die Phosphorylierung von ROCK (Rho-Kinase) werden zum einen die regulatorische

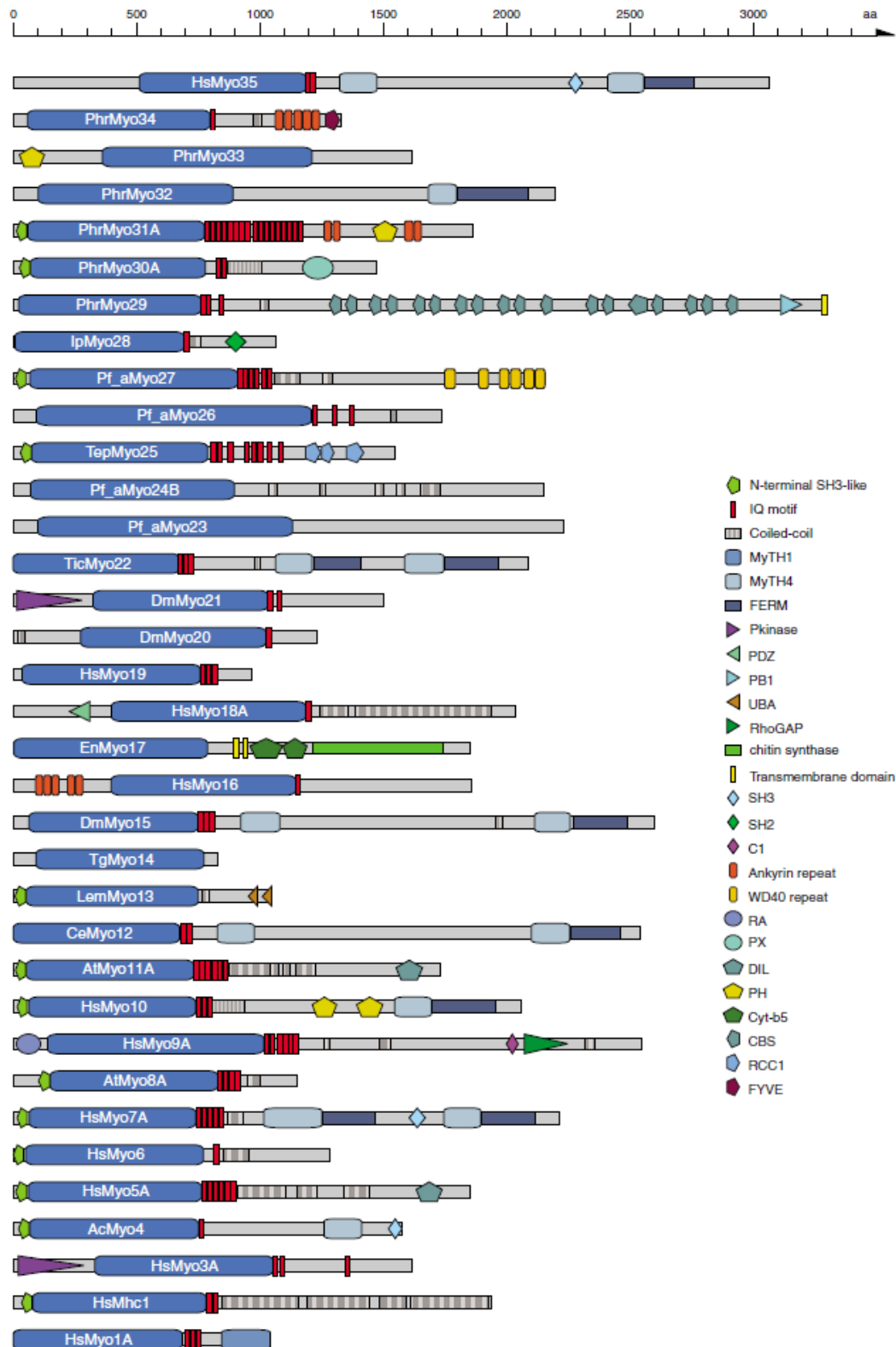
leichte Kette von Myosin II (MLC) und zum anderen Formine wie mDia1 aktiviert, was beides zur Ausbildung von *stress-fibres* führt (Rottner and Stradal, 2011). ROCK phosphoryliert und aktiviert auch die LIM-Kinase (LIMK), welche wiederum das Aktin-Filament-Depolymerisations-Protein Cofilin phosphoryliert und damit inaktiviert, wodurch vorhandene Aktin-Filamente stabilisiert und der Aktin-Umsatz in der Zelle reguliert werden (Maekawa et al., 1999). Cofilin ist konstitutiv aktiv in Zellen und wird lokal durch Phosphorylierung über den RhoA, aber auch den Cdc42 und Rac1-Weg inhibiert (Abb. 1). Neben den bereits genannten Aktin-Regulatoren Arp2/3 und mDia1 gibt es noch weitere Signalmodulatoren, die ein Fein-Tuning der Aktinstruktur ermöglichen: Aktin-Capping Proteine (z.B. Eps8), Aktin-Bindeproteine (z.B. Cortactin) und Aktin-Bündelungsproteine (z.B. Fascin, VASP). Diese binden an Arp2/3, Formine oder an die Rho-GTPasen direkt und können sogar stromaufwärts von ihnen agieren (Carlier and Pantaloni, 2007; Pollard and Borisy, 2003).

#### 1.4.2.1 Myosin9b

Myosine bilden eine große Aktin-abhängige molekulare Motorprotein-Superfamilie. Diese Moleküle sind heteromere Komplexe, die von einer oder zwei schweren und einer variablen Anzahl leichter Ketten gebildet werden. Schwere Ketten sind charakterisiert durch drei definierte Regionen: die Motor (Kopf)-, die Hals- und die Schwanz-Domäne (Krendel and Mooseker, 2005) (siehe auch Abb. 3). Die Motordomäne übernimmt die Hauptfunktion: die ATP-anhängige Bindung an Aktin (Coluccio et al., 2008; Vale, 2003). Die Halsdomäne besteht aus einer variablen Anzahl von IQ-Motiven, die die Bindung von leichten Ketten wie Calmodulin oder Calmodulin-verwandten Proteinen ermöglicht und als Hebelarm für die Bewegung der Motordomäne fungiert. Die Schwanzdomäne ist von variabler Länge; ihre Funktion hängt von den Motiven ab, die in ihrer Sequenz vorkommen. Dazu gehören z.B. Coiled-coiled Regionen zur Dimerisierung, SH3-Domänen für die Protein-Protein Interaktion und PH-Domänen für Lipidinteraktionen (Coluccio et al., 2008).

Myosine sind an vielen verschiedenen zellulären Vorgängen beteiligt, wie z.B. der Organellen-Wanderung (Vale, 2003), der Zytogenese (Scholey et al., 2003), der Ausbildung der Zellform (Yumura and Uyeda, 2003) und der Muskelkontraktion (Geeves and Holmes, 2005). Nach neuesten phylogenetischen Analysen anhand von

Myosinen unterschiedlicher Organismen konnten diese molekularen Motorproteine in 35 Klassen unterteilt werden (Abb. 2), von welchen 40 verschiedene Proteine in der Maus und im Menschen exprimiert werden (Foth et al., 2006; Odrionitz and Kollmar,

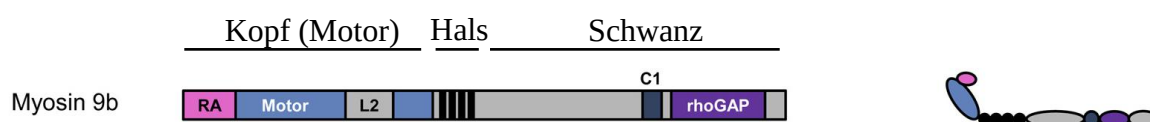




## Abb. 2: Schematisches Diagramm der Domänenstruktur repräsentativer Mitglieder der 35 Myosinklassen

Der Name des jeweiligen Myosins ist in der Motordomäne (blau) vermerkt. Die Abkürzungen für die einzelnen Domänen sind: C1, Proteinkinase C konservierte Region 1; CBS, Cystathionine-beta-Synthase; Cyt-b5, Cytochrom-b5 Heme/Steroid-bindende Domäne; DIL, *dilute*; FERM, Bande 4.1, Ezrin, Radixin und Moesin; FYVE, Zinkfinger in Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 und EEA1; IQ-Motiv, Isoleucin-Glutamin Motiv; MyTH1, Myosin „tail homology“ 1; MyTH4, Myosin „tail homology“ 4; PB1, Phox und Bem1p Domäne; PDZ, PDZ Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie; Pkinase, Proteinkinase Domäne; PX, Phox Domäne; RA, Ras-assozierte (RalGDS/AF-6) Domäne; RCC1, Regulator der Chromosomen-Condensation; RhoGAP, Rho GTPase-aktivierendes Protein; SH2, *src* Homolog 2; SH3, *src* Homolog 3; UBA, Ubiquitin-assozierte Domäne; WD40, WD (Tryptophan-Aspartat) oder beta-Transducin Repeats. (Abb. aus Odrionitz and Kollmar, 2007)

2007; Richards and Cavallier-Smith, 2005). Unter den bekannten Myosinen wurde durch Transkriptom-Analysen eine Untergruppe ausgemacht, die in hämatopoetischen Zellen vorhanden ist. Dazu gehören Myo1c, e, f und g, Myo2a (Myh9), Myo5a, Myo7a, Myo9b, Myo10 und Myo18a. Diese Motorproteine weisen ein immunzelltyp-spezifisch differentielles Expressionsmuster auf, das vermutlich auf die speziellen Funktionen in der Zelle zurechtgeschnitten ist (Maravillas-Montero and Santos-Argumedo, 2011).

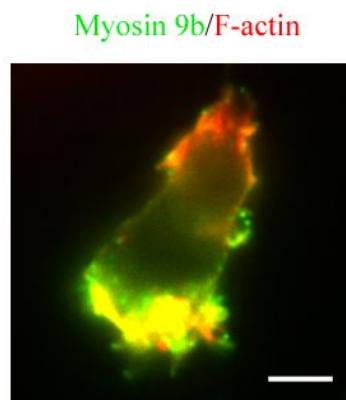


**Abb. 3: Schematische Struktur von Myo9b**

Schematischer Aufbau von Myo9b. RA: N-terminale Extension, L2: Insertion in Loop2, C1: Zink-bindende Domäne (Abb. aus Maravillas-Montero and Santos-Argumedo, 2011; verändert)

Myosin 9b (Myo9b) gehört neben Myo9a zur Klasse IX der Vertebraten-Myosine. Obwohl es nur eine Kopfdomäne besitzt (single-headed), kann es vergleichsweise lange und mit hoher Geschwindigkeit an Aktin-Filamenten entlangwandern, ohne zu dissoziieren (Inoue et al., 2002; Liao et al., 2010; Nishikawa et al., 2006; Post et al., 2002). Die Motordomäne hat eine N-terminale Extension mit strukturellen Ähnlichkeiten zu einer Ras-assozierten Domäne (Kalhammer et al., 1997). Weiterhin gibt es noch eine Insertion am Loop 2. Diese Insertion beherbergt eine Calmodulin-bindende Stelle (Liao et al., 2010) und verstärkt die Affinität der Kopfdomäne an F-

Aktin (Struchholz et al., 2009). An der Halsdomäne können vier Calmoduline oder Calmodulin-verwandte Proteine an die IQ-Motive binden (Bähler and Rhoads, 2002). Die Schwanzdomäne trägt eine C1-Domäne, an die zwei Zinkionen binden können, und eine Rho-GAP Domäne (Rho GTPase-aktivierendes Protein) (Abb. 3). Diese aktiviert die GTPase Aktivität des kleinen G-Proteins RhoA und schaltet es damit von seiner aktiven GTP-gebundenen Form in seine inaktive GDP-gebundene Form (Chierregatti et al., 1998; Müller et al., 1997; Post et al., 1998; Reinhard et al., 1995). Somit fungiert Myo9b als Negativregulator des Rho-Signaltransduktionsweges. Da dieser die Dynamik und Organisation des Aktin-Zytoskeletts reguliert (Jaffe and Hall, 2005), könnte Myo9b als Feedback-loop agieren, indem es an den Aktin-Filamenten entlang wandert, deren Organisation es reguliert. In migrierenden Zellen akkumuliert Myo9b an der Zellfront in Regionen aktiver Aktin-Polymerisation (van den Boom et al., 2007 und Abb. 4). Für Myo9b<sup>-/-</sup> Makrophagen wurde gezeigt, dass sie erhöhte Level an phosphoryliertem RhoA, phospho-MLC und phospho-Cofilin aufwiesen und damit übereinstimmend eine runde Zellform behielten und eine gestörte Migration zeigten (Hanley et al., 2010).



**Abb. 4: Subzelluläre Lokalisation von Myo9b und F-Aktin in Wt BMDC in einer Kollagenmatrix**

Immunofluoreszenz-Färbung von WT BMDCs in einer 3D Kollagenmatrix mit anti-Myo9b (FP3/F8) und F-Aktin (Texas Red phalloidin) (Maßstab: 5  $\mu$  m; Abb. von AG Bähler, Münster).

## 1.5 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich in verschiedene Subpopulationen aufteilen. Bereits bei ihrer Entwicklung spalten sie sich in  $\alpha\beta$ - bzw.  $\gamma\delta$ -T-Zellen, je nach Aufbau ihres Rezeptors.

Die meisten Subpopulationen der T-Zellen entspringen der Gruppe der  $\alpha:\beta$ -T-Zellen. Diese lassen sich aufgrund der Expression von Corezeptormolekülen in  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -T-Zellen unterscheiden.

Aktivierte  $CD8^+$ -T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es, infizierte und entartete endogene Zellen zu erkennen und abzutöten. Im Gegensatz zu den  $CD8^+$ -T-Zellen bilden die  $CD4^+$ -T-Zellen, auch T-Helferzellen genannt, eine Vielzahl an Untergruppen aus. Dazu gehört die klassische Unterteilung in Th1- und Th2-Zellen, sowie in Th9, Th17, folliculäre Th-Zellen (Thf) und regulatorische T-Zellen (Treg) (Zhou et al., 2009). Die Entscheidung darüber, in welche Richtung sich naive T-Zellen entwickeln, hängt vor allem von dem jeweiligen Niveau der in ihrer Umgebung produzierten Zytokine ab, und zum Teil auch von der Stärke der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem Antigen (Boyton and Altmann, 2002).

Th1-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor Tbet (Szabo et al., 2000) und ihre Entwicklung wird durch die Bildung von IL-12 und IFN- $\gamma$  eingeleitet. Sie sind charakterisiert durch ihre IFN- $\gamma$  Produktion und ihre Hauptaufgabe liegt in der Kontrolle von intrazellulären bakteriellen Infektionen. Ihre zweite Funktion besteht in der Produktion von kostimulatorischen Signalen für aktivierte B-Lymphozyten. Dies führt zur Produktion von Antikörpern gegen extrazelluläre Pathogene. Außerdem werden B-Zellen durch Th1-Zellen zum Isotyp-Klassenwechsel angeregt.

Eine T-Zell-Differenzierung in Th2 setzt die Expression von GATA3 voraus (Zheng et al., 1997). Th2-Zellen setzen IL-4, -5 und -13 frei (Croft and Swain, 1991) und werden für die Ausbildung einer humoralen Immunantwort benötigt, um Helminthen und andere extrazelluläre Pathogene zu kontrollieren.

Th9-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von IL-4 und TGF- $\beta$  aus naiven T-Zellen während der Aktivierung durch APC. Sie produzieren vor allem große Mengen IL-9 sowie IL-10 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Die Signalweiterleitung der Rezeptoren für IL-4 und TGF- $\beta$  führt zur Expression und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF4, PU.1 und STAT6, die die IL-9-Expression einleiten (Staudt et al., 2010; Chang et al., 2010). IL-9 spielt eine Rolle bei allergischem Asthma, inflammatorischen Darmerkrankungen und der Experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) (Stassen et al., 2012).

Th17-Zellen produzieren IL-17A und F und IL-22 und spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung extrazellulärer Bakterien und Pilze, vor allem an Schleimhaut-Oberflächen. Für ihre Differenzierung benötigen sie die Transkriptionsfaktoren *Retinoid-related orphan receptor  $\alpha$*  (ROR $\alpha$ ) und ROR $\gamma$ t, die durch TGF- $\beta$  in Kombination mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, -21 und -23 induziert werden (Chen et al., 2007; Yang et al., 2008). Th17-Zellen sind auch beteiligt an inflammatorischen Autoimmunreaktionen wie z.B. der EAE (Langrish et al., 2005).

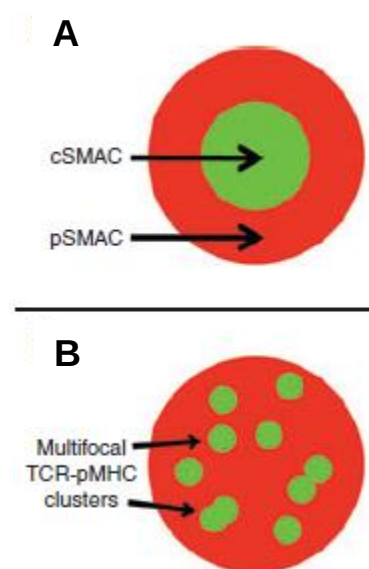
Tfh-Zellen sind wichtig für die B-Zell-T-Zellinteraktion und sind charakterisiert durch die Expression von Pax5, einem Transkriptionsfaktor, der auch für B-Zellen essentiell ist.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) haben, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen T-Zellen, supprimierende Funktionen und halten die periphere Toleranz aufrecht, indem sie Effektor-T-Zell-Antworten eindämmen und vor autoimmunen Antworten schützen (Chen et al., 2003). Charakterisiert werden sie nach wie vor im Maussystem durch die Expression des Forkhead Transkriptionsfaktors Foxp3 (Brunkow et al., 2001; Fontenot et al. 2003; Hori et al., 2003). Es gibt zwei Hauptkategorien von Foxp3<sup>+</sup> Tregs: natürliche Treg (nTreg), die im Thymus entstehen und TGF- $\beta$ - induzierte iTreg Zellen, die in der Peripherie generiert werden (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Josefowicz and Rudensky, 2009). Weitere adaptive Suppressor-T-Zellpopulationen sind auch die IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen und die TGF- $\beta$ -sezernierenden Th3-Zellen, wobei beide Treg-Klassen kein Foxp3 exprimieren.

$\gamma\delta$ -T-Zellen können weiter in konventionelle und kanonische (Nischen-spezifische)  $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgeteilt werden. Die konventionellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren ein breiteres TCR-Repertoire als kanonische, und ihre Festlegung in die funktionalen Untergruppen (IFN- $\gamma$  oder IL-17-produzierende) findet bereits im Thymus statt (Jensen et al., 2008). Kanonische  $\gamma\delta$ -T-Zellen wandern während der Embryonalentwicklung aus dem Thymus in spezifische Nischen wie die Epidermis (dendritische epidermale T-Zellen, DETC) und die Mucosa des Urogenitaltrakts und des Darms (IEL) (Lewis et al., 2006; Ishikawa et al., 2007).

## 1.6 Interaktion von DC und T-Lymphozyten

Um eine effektive adaptive Immunantwort auszulösen, müssen DC mit T-Zellen in lymphatischen Geweben interagieren. Dabei kommt es entlang der Interaktionsflächen auf beiden Zelltypen zu einer multimolekularen Zusammenlagerung von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, die immunologische Synapse (IS) genannt wird. Die klassische IS wird unterteilt in einen zentralen Ring, den sogenannten zentralen supramolekularen Aktivierungs-Cluster (cSMAC), in dem die TCR-Peptid-MHC (TCR-pMHC) Interaktionen sowie Signaltransduktionsmoleküle lokalisiert sind, und den peripheren SMAC (pSMAC), der Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 (CD11a/CD18) und ICAM-1 enthält (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998) (Abb. 5 A).



**Abb. 5: Schematische Struktur einer IS**

Schema einer klassischen (A) und einer multifokalen Synapse (B) (Abb. aus Thauland and Parker, 2010).

Die Ausbildung einer funktionalen Synapse zwischen T-Zellen und DC (Abb. 5B) weicht etwas von der klassischen IS ab, wie sie zwischen T-Zellen und B-Zellen gefunden wurde (Abb. 5A). Bei ersterer findet die Interaktion multifokal statt, d.h. es gibt mehrere kleine Interaktionspunkte und nicht eine große IS (Brossard et al., 2005; Dustin et al., 2006). Nach der Kontaktausbildung zwischen dem TCR und pMHC wird ein Signal durch den MHC-Komplex übertragen, der einen Affinitätsanstieg von LFA-1 auf den DC durch die Rekrutierung von Cytohesin-1 bewirkt. Hohe Level an CYTIP (*cytohesin-1 interacting protein*) im Zytoplasma von murenen DC wirken diesem

Signal aber direkt entgegen, indem Cytohesin von der Zellmembran entfernt wird (Boehm et al., 2003). So bleibt LFA-1 auf den DC in seiner inaktiven Konformation und die T-Zellen können sich über die Oberfläche der DC bewegen (Gunzer et al., 2000; Mempel et al., 2004). Ein knockdown von CYTIP in DC verstärkt deren Bindung an T-Zellen, aber reduziert ihr Potential zur T-Zellstimulation (Hofer et al., 2006). Da mature DC hohe Mengen kostimulatorischer B7-Moleküle, vor allem an B7.2 (CD86) und weniger an B7.1 (CD80) exprimieren, wird auf der T-Zellseite vor allem CD28 angesteuert, da dieses der bevorzugte Bindungspartner für CD86 ist. CTLA-4 hingegen wird eher von CD80 gebunden (Pentcheva-Hoang et al., 2004). Die Adressierung von CD28 verstärkt die proximale Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*)-Aktivierung durch die Inhibition von Rap1 (*Ras-proximate-1* oder *Ras-related protein 1*) (Carey et al., 2000). Das Ergebnis ist die vollständige T-Zellaktivierung durch einen Calcium-Anstieg, die Induktion der PKC (*protein kinase C*)-Aktivität und die RAS (*rat sarcoma*)-abhängige Aktivierung von ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) (Abb. 6).

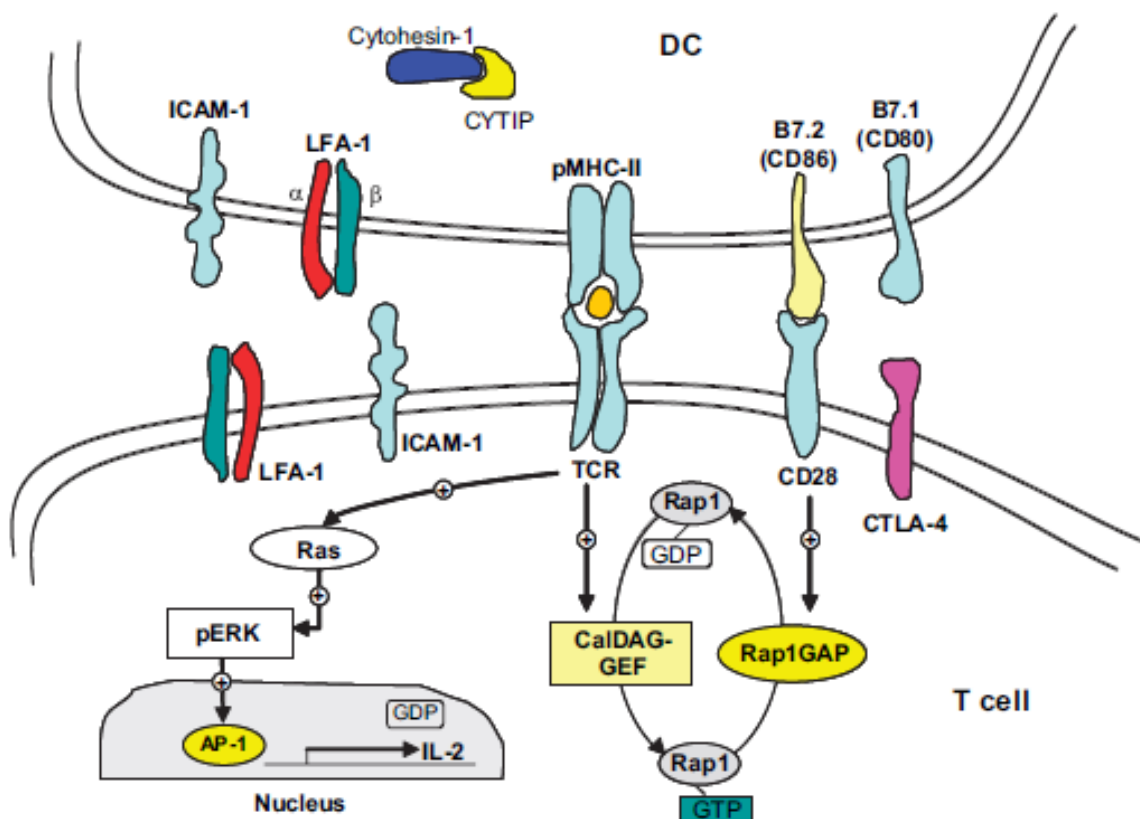


Abb. 6: Antigenerkennung des TCR auf einem MHC-Molekül durch Bildung einer IS

Für die Bildung einer IS muss der TCR an ein pMHC-Molekül binden. Außerdem wird die Expression verschiedener kostimulatorischer und Adhäsions-Moleküle benötigt, um ein Signal in die T-Zelle zu leiten, durch welches Rap1 inaktiviert wird (GDP-Rap1). Die Induktion der aktiven Form wird durch den  $\text{Ca}^{2+}$  DAG-Guanin-Exchange-Factor (CaDAG-GEF) vermittelt, wohingegen die GTPase-Aktivität von Rap1 durch das Rap1-GTPase-aktivierende Protein (Rap1-GAP) initiiert wird. (Abb. aus Reichardt et al., 2007)

Das DC-Zytoskelett spielt auch bei der Ausbildung einer IS eine wichtige Rolle. Im Vergleich zu B-Zellen weisen DC eine sehr hohe Zytoskelettaktivität auf, die es ihnen erlaubt, ihre Dendriten permanent zu bewegen und aktiv nach T-Zellen zu greifen (Gunzer et al., 2000, 2004). Außerdem polarisieren sie ihr Zytoskelett antigenspezifisch in Richtung einer kontaktierenden T-Zelle (Al-Alwan et al., 2001, 2003). Die Interaktion zwischen DC und antigenspezifischen naiven T-Zellen in einer 3D-Umgebung (Kollagenmatrix oder *in vivo*) kann in drei Phasen unterteilt werden und verläuft sehr dynamisch: Die T-Zellen bleiben trotz Kontakt mit der DC sehr beweglich und gehen in Folge kurze, serielle Kontakte mit vielen DC ein. Danach folgt eine Phase mit längeren Kontakten, gefolgt von einer Phase mit kurzen Kontakten (Gunzer et al., 2000, 2004; Mempel et al., 2004). Die kurzen Kontakte sind aber ausreichend, um eine effiziente T-Zellaktivierung zu erreichen. Es kommt dabei zu einer Akkumulation von Signalen von unterschiedlichen DC, aus denen eine vollständige T-Zellaktivierung resultiert, ohne dass die Ausbildung einer klassischen großen IS mit cSMAC und pSMAC benötigt wird (Faroudi et al, 2003; Brossard et al., 2005). Ein Grund dafür ist auch die innerhalb von Sekunden nach Kontaktaufnahme stattfindende Phosphorylierung von ZAP-70, wodurch die T-Zellaktivierung initiiert wird, lange bevor sich ein klassischer c-SMAC ausbilden kann (Lee et al., 2002). Im Gegensatz dazu führt eine suboptimale T-Zellaktivierung durch ineffiziente APC (unreife DC oder B-Zellen) dazu, dass seitens der T-Zelle die Formation definierter Bereiche (wie den p-SMAC) benötigt wird, in denen eine Aggregation von Signalmolekülen und deren Phosphorylierung in Mikro-Clustern stattfinden kann.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es zum Einen, die Interaktionsphysiologie zwischen verschiedenen DC-Populationen und naiven sowie regulatorischen T-Zellen zu analysieren. Dies erfolgte seitens der DC anhand einer DC-Linie und seitens der T-Zellen anhand antigenspezifischer transgener Zellen. Dabei wurde die Kontaktdauer und Häufigkeit bestimmt sowie die daraus folgende Aktivierung der T-Zellen in einer

3D-Kollagenmatrix. Zum zweiten wurde die Rolle eines Aktin-Motorproteins (Myo9b), welches außerdem eine Signaltransduktionsfunktion besitzt, bei der Zellmigration sowie bei der DC-T-Zellinteraktion und der Ausbildung von Immunantworten analysiert. Zum Dritten wurde untersucht, welche Auswirkung die konstitutive Aktivierung des Adhäsionsmoleküls LFA-1 auf DC auf die DC-T-Zellinteraktion ausübt und welche Konsequenzen sich daraus für die Aktivierung der T-Zellen ergeben.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

| Verwendung | Antigen                | Klon         | Markierung                   | Herkunft                  |
|------------|------------------------|--------------|------------------------------|---------------------------|
| FACS       | CD3                    | 145-2C11     | PE, PerCP                    | eBioscience               |
|            | CD4                    | GK1.5        | APC-Cy7, PE<br>FITC, PE-Cy7  | BD,<br>eBioscience        |
|            |                        | L3T4 (RM4-5) | APC, PE                      | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD8                    | 53-6.7       | APC-Cy7, PE,<br>FITC, PE-Cy7 | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD11b                  | M1/70        | eFluor450, PE                | eBioscience               |
|            | CD11c                  | N418         | APC, PE, PE-<br>Cy7          | eBioscience               |
|            | CD16/32 (FC-<br>Block) | 93           | LEAF purified                | eBioscience,<br>Biolegend |
|            | CD19                   | 1D3          | APC, PerCP-<br>Cy5.5         | BD                        |
|            | CD25                   | PC61         | PE, APC-Cy7                  | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD40                   | 1C10, 3/23   | APC, PE                      | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD45.1                 | A20          | APC,<br>eFluor450            | eBioscience               |
|            | CD54 (ICAM-<br>1)      | 3E2          | FITC                         | BD                        |
|            | CD62L                  | MEL-14       | PE, PE-Cy7                   | BD                        |
|            | CD69                   | H1.2F3       | FITC, PE                     | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD80                   | 16-10A1      | FITC, PE                     | BD                        |
|            | CD86                   | GL-1         | FITC, PE                     | BD,<br>eBioscience        |
|            | CD152 (CTLA-<br>4)     | UC10-4B9     | APC                          | Biolegend                 |

|                             |                   |                     |                           |                            |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|
|                             | CD154<br>(CD40L)  | MR1                 | PE                        | BD                         |
|                             | CD197<br>(CCR7)   | 4B12                | PE                        | eBioscience                |
|                             | CD207             | eBioL31,<br>205C1   | PE,<br>A.-Fluor647        | eBioscience,<br>Dendritics |
|                             | CD317<br>(PDCA-1) | eBio129c            | PE                        | eBioscience                |
|                             | CD357 (GITR)      | YGITR765            | PE-Cy7                    | Biolegend                  |
|                             | Foxp3             | FJK-16s             | APC, FITC                 | eBioscience                |
|                             | GARP              | YGIC86              | eFluor450, PE             | eBioscience                |
|                             | I-A/I-E (MHCII)   | M5/114.15.2,<br>2G9 | eFluor450,<br>FITC        | eBioscience,<br>BD         |
|                             | IFN- $\gamma$     | XMG1.2              | APC                       | eBioscience                |
|                             | IL-4              | 11B11               | APC                       | eBioscience                |
|                             | IL-10             | JES5-16E3           | Pacific Blue              | Biolegend                  |
|                             | Ly6C              | AL-21               | APC                       | BD                         |
|                             | Ly6G              | 1A8                 | V450                      | BD                         |
|                             | Nrp-1             | 130603              |                           | R&D                        |
|                             | V $\alpha$ 2      | B20-1               | APC, PE                   | eBioscience                |
| Fluoreszenz-<br>mikroskopie | F-Aktin           |                     | Texas Red-X<br>Phalloidin | Invitrogen                 |
| Zellkultur                  | CD3               | 145-2C11            | NA/LE                     | eBioscience                |
|                             | CD28              | 37.51               | NA/LE                     | eBioscience                |
|                             | CD40              | 1C10                | NA/LE                     | eBioscience                |
|                             | CD11a             | Fb441.8             | NA/LE                     | Leinco                     |
|                             | CD18              | M18/2               | NA/LE                     | BD                         |

## 2.1.2 Laborgeräte

Abzug

$\beta$ -Szintillationscounter

Analysenfeinwagen

Universitätsmedizin Mainz

LKB

Tuning Fork Vibration, Shinko Denshi

|                       |                                     |
|-----------------------|-------------------------------------|
|                       | MC1 Analytic AC210S, Sartorius      |
| Autoklav              | H+P Labortechnik                    |
| Brutschrank           | Typ HERAccl 240, Heraeus            |
| Durchflusszytometer   | FACScalibur, BD Biosciences         |
|                       | FACScan, BD Biosciences             |
|                       | LSR-II, BD Biosciences              |
| Elektrophorese-Kammer | Peqlab                              |
| Floureszenzmikroskope | BX61, Olympus                       |
|                       | Axiovert S100, Zeiss                |
|                       | Observer Z1 mit LSM710, Zeiss       |
| Infrarotlampe         | Philips                             |
| Lichtmikroskope       | Leitz DMIL, Leica                   |
|                       | CH-2, Olympus                       |
| MACS Mix              | Miltenyi Biotec                     |
| Magnetrührer          | Ikamag RCT, Labotec                 |
| Mehrkanal-Pipette     | CAPP, Eppendorf, HAT                |
| Multipette            | Eppendorf                           |
| PCR-Geräte            | Primus 96 advanced gradient, Peqlab |
|                       | UnoCycler, VWR                      |
| Pipetus               | Hirschmann                          |
| Pipetten              | Eppendorf                           |
| Robosep               | Stemcell Technologies               |
| Sterilbank            | Lamin Air HB 2472, Heraeus          |
| UV-Lampe              | Universall Hood II, Bio-Rad         |
| Vortexer              | Bender & Hobein AG                  |
| Wasserbad             | GFL                                 |
| Zählkammer            | Neubauer-Zählkammer, Optik Labor    |
| Zentrifugen           | Megafuge 1.0R, Heraeus              |
|                       | Biofuge fresco, Heraeus             |

### 2.1.3 Reagenzien und Cemikalien

|                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| <sup>3</sup> H-Thymidin | ICN Biomedicals GmbH   |
| 7-AAD                   | eBioscience, Biolegend |
| Annexin V               | BD, Biolegend          |

|                          |                                        |
|--------------------------|----------------------------------------|
| Aceton                   | Sigma                                  |
| Aqua dest.               | Apotheke der Universitätsmedizin Mainz |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | Sigma                                  |
| Brefeldin A              | Sigma                                  |
| BSA                      | Roth                                   |
| $C_2H_3NaO_2$            | Roth                                   |
| $C_3H_3NaO_3$            | Sigma                                  |
| rm CCL-19                | R&D                                    |
| rm CCL-21                | R&D                                    |
| Di-n-butylphtalat        | Sigma                                  |
| Dispase                  | Roche                                  |
| DMSO                     | Sigma                                  |
| DNBS                     | Sigma                                  |
| DNFB                     | Sigma                                  |
| dNTPs                    | Roth                                   |
| EDTA                     | Sigma, Merck                           |
| Ethanol                  | Merck                                  |
| Ethanol 70%              | Brüggemann Alcohol                     |
| FCS                      | PAA                                    |
| FITC                     | Sigma                                  |
| Gentamicin               | PAA                                    |
| GM-CSF                   | eBioscience, Immunotools, Biozol       |
| Heparin                  | Ratiopharm                             |
| HEPES                    | Gibco                                  |
| rh IL-2                  | Labgen                                 |
| rm IL-4                  | eBioscience, Immunotools               |
| Isopropanol              | Merck                                  |
| Ketamin                  | Ratiopharm                             |
| L-Glutamin               | Gibco                                  |
| MicroBeads               | Miltenyi                               |
| $Na_2CO_3$               | Roth                                   |
| NaCl                     | Roth                                   |
| $NaH_2PO_4$              | Roth                                   |
| $NaHCO_3$                | Roth                                   |

|                           |                                        |
|---------------------------|----------------------------------------|
| NaN <sub>3</sub>          | Roth                                   |
| NAatriumpyruvat           | Gibco                                  |
| NEAA                      | Gibco                                  |
| Olivenöl                  | Apotheke der Universitätsmedizin Mainz |
| Penicillin / Streptomycin | Gibco                                  |
| Primer                    | eurofins, MWG                          |
| PCR-Puffer 5x             | New England Biolabs                    |
| rh TGF-β                  | Peprtech                               |
| Retinolsäure              | Sigma                                  |
| Rompun                    | Bayer                                  |
| Saponin                   | Sigma                                  |
| Taq-Polymerase (Crimson)  | New England Biolabs                    |
| TNBS                      | Sigma                                  |
| TNCB                      | VeZerf Laborsynthesen                  |
| Tris                      | Roth                                   |
| Trypanblau                | Merck, Sigma                           |
| Tween 20                  | Sigma                                  |

#### 2.1.4 Puffer

|                    |                                                                                          |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACK-Puffer         | 0,1 mM EDTA<br>150 mM NH <sub>4</sub> Cl<br>1 mM KHCO <sub>3</sub><br>in Wasser (pH 7,3) |
| Cytofix / Cytoperm | BD Pharmingen                                                                            |
| FACS-Puffer        | 1 % (v/v) FCS<br>2 mM EDTA<br>in 1x PBS                                                  |
| HBSS               | PAA                                                                                      |
| MACS-Puffer        | 5 % (v/v) FCS<br>2 mM EDTA                                                               |

|                          |                                                                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          | in 1x PBS                                                                                           |
| PBS (10x)                | 1,4 M NaCl<br>0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>in ddH <sub>2</sub> O (pH 7,2) oder von PAA |
| PBS (1x)                 | aus 10x PBS verdünnt (pH 7,2) oder von Gibco bezogen                                                |
| Permeabilisierungspuffer | 10mM EDTA<br>0,5 % (w/v) BSA<br>0,02 % (w/v) Natrium-Azid<br>0,1 % (w/v) Saponin<br>in 1x PBS       |
| Robosep-Puffer           | StemCell                                                                                            |
| Trypanblaulösung         | 0,5 % (v/v) Trypanblau<br>0,02 % (w/v) Natrium-Azid<br>in 1x PBS                                    |

## 2.1.5 Medien

|            |                                                                                                                          |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DC-Medium  | RPMI<br>5% FCS<br>2mM L-Glutamin<br>500nM $\beta$ -Mercaptoethanol<br>1x NEAA<br>500 $\mu$ l Gentamycin<br>4ng/ml GM-CSF |
| DHB-Medium | DMEM<br>25mM HEPES<br>0,5% (w/v) BSA                                                                                     |

pH 7,4

**Komplettmedium**

10% (v/v) FCS  
2mM L-Glutamin  
1x NEAA  
100U/ml Pen/Strep  
10mM HEPES  
1mM Natriumpyruvat

**T-Zellmedium**

5% (v/v) FCS  
2mM L-Glutamin  
500nM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
1x NEAA  
100U/ml Pen/Strep  
10mM HEPES  
1mM Natriumpyruvat

**2.1.6 Software**

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| CellP                | Olympus        |
| CellQuest3.3         | BD Biosciences |
| Diva6.1.1            | BD Biosciences |
| FCAP Array 1.0.1     | BD Biosciences |
| FlowJo 7.5           | Treestar       |
| GraphPad Prism 5.0   | Statcon        |
| Office               | Microsoft      |
| Photoshop CS3        | Adobe          |
| Quantity One         | Bio-Rad        |
| Reference Manager 11 | Thomson        |
| ZEN 2009             | Zeiss          |

**2.1.7 Verbrauchsmaterialien**

|                   |             |
|-------------------|-------------|
| „Chamber Slides“  | Nunc        |
| Deckgläschen      | Menzel      |
| Einweg-Handschuhe | Semper Care |

|                           |                                                                                   |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Entsorgungsbeutel         | Roth                                                                              |
| FACS-Röhrchen             | 5 ml Falcon, BD                                                                   |
| Feindosierungsspritze     | 1 ml BRAUN                                                                        |
| Kanülen (steril)          | BD MicrolanceTM3<br>Sterican <sup>®</sup> , 21 G x 1 $\frac{1}{2}$ ", Gr.2, Braun |
| MACS-Säulen               | MS, LS, Miltenyi Biotec                                                           |
| Mikrotiterplatten         | 96-Well, NUNC                                                                     |
| Objekträger               | Menzel                                                                            |
| Plastikpipetten           | 5, 10 und 25 ml Greiner                                                           |
| Pipettenspitzen           | 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl, Greiner, StarLab                                          |
| „Printed Filtermat“       | 102 x 258 mm, Wallac                                                              |
| Probeneinschweißfolie     | 102 x 258 mm, Wallac                                                              |
| Reaktionsgefäße           | 0,5, 1,5 und 2 ml, Eppendorf, Greiner, VWR                                        |
| Serologische Glaspipetten | 5 und 10 ml, Hirschmann                                                           |
| Skalpelle                 | Feather                                                                           |
| Spritzen                  | Omnifix                                                                           |
| Wäge-Schiffchen           | Corning incorporated                                                              |
| Zellkulturplatten         | 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well, Greiner, Costar                                       |
| Zellsiebe                 | 30, 40 und 70 µm, BD Falcon                                                       |
| Zentrifugen-Röhrchen      | 15 ml/50 ml, Greiner                                                              |
| Zellkulturflaschen        | BD Falcon                                                                         |

### 2.1.8 Versuchstiere

Es wurden Mäuse im Alter zwischen 6 und 12 Wochen verwendet, die in der ZVTE der Universitätsmedizin Mainz bzw. vom Nutzer selbst gezüchtet und gehalten werden. Die Mäuse erhalten Futter und Wasser ad libidum. Eine Genehmigung der Aufsichtsbehörde lag für alle Tierversuche vor.

#### Stämme:

|         |                                                 |
|---------|-------------------------------------------------|
| Balb/c  | ZVTE Mainz, ursprünglich von Jackson Laboratory |
| C57BL/6 | ZVTE Mainz, ursprünglich von Jackson Laboratory |



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B6.OT1       | Es handelt sich um einen Transgenstamm, der spezifische T-Zellrezeptor (TCR) alpha- und beta-Ketten exprimiert, die als funktioneller heterodimerer TCR $\alpha/\beta$ -Komplex, zusammen mit dem murinen CD8 Korezeptor, Spezifität für das Hühner-Ovalbumin-abgeleitete Peptid SIINFEKL aufweisen. Dabei unterliegt der murine TCR einer MHC-I und H-2 <sup>b</sup> Restriktion. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6 (Hogquist et al., 1994).                                          |
| B6.OT1xLy5.1 | Der Stamm kombiniert das OT1-Transgen mit dem Ly5.1-Allel. Ly5.1 wird auch als <i>Ptprc</i> ( <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i> ) oder geläufiger als CD45.1 bezeichnet. (Morse et al., 1987; Charbonneau et al., 1988) Alle CD8 <sup>+</sup> T-Zellen tragen den transgenen TCR zusammen mit dem CD45.1-Antigen, welches ein guter Marker für Knochenmarkstransplantationen oder andere <i>in vivo</i> -Studien in Mäusen mit C57BL/6 (CD45.2) - Hintergrund darstellt. |
| B6.OT2       | Der Transgenstamm exprimiert eine murine TCR $\alpha$ - und $\beta$ -Kette, die zusammen mit dem murinen CD4 Korezeptor spezifisch an das Hühner Ovalbumin Epitop 323-339 im Kontext von I-A b binden. Der transgene murine TCR unterliegt also einer MHC-II und H-2 <sup>b</sup> Restriktion. Die offizielle Stammbezeichnung lautet C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (The Jackson Laboratory, Stock No 004194). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6J (Barnden et al., 1998).               |
| B6.OT2xLy5.1 | Der Stamm kombiniert das OT2-Transgen mit dem Ly5.1-Allel. Alle CD4 <sup>+</sup> T-Zellen tragen den                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

transgenen TCR zusammen mit dem CD45.1-Antigen (siehe B6.OT1xLy5.1).

#### B6.OT2xDEREG

Der Stamm kombiniert die OT-2 und DERE (*depletion of regulatory T cells*) Transgene. Das OT2- Transgen kodiert für einen MHC-II und H-2<sup>b</sup> restringierten TCR mit Spezifität für ein Ovalbumin-Antigen (s.o.). Der Transgenstamm DERE exprimiert ein Fusionsprotein des Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) und des *Green Fluorescent Proteins* (GFP). Das Fusionsgen steht unter der transkriptionellen Regulation des *foxp3*-Genpromoters. Die transgenen Mäuse exprimieren das DTR/GFP Fusionsprotein spezifisch in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen, so dass diese durch DT-Gabe spezifisch ablatiert werden können (Lahl et al., 2007). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6.

#### LFA-1<sup>d/d</sup>

In diesen Mäusen wurde durch Deletion der hochkonservierten GFFKR-Sequenz in der  $\alpha_L$ -Kette der zytoplasmatischen Domäne des LFA-1-Moleküls (Schema zur Generation der LFA-1<sup>d/d</sup> Mäuse siehe Anhang Abb. 48) eine Unterbrechung der Interaktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit verursacht, was zur konstitutiven Aktivierung des Integrins führt (Semmrich et al., 2005). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6.

#### KO-Myo9b

Das vorher gefloxtes Exon 2 des genetischen Locus (Bezeichnung des Flox-Allels: Myo9btm1.1Bah) wird durch eine loxP Rekombinationsstelle ersetzt. Die offizielle Bezeichnung des Allels lautet Myo9btm1.2Bah (myosin IXb; targeted mutation

1.2, Martin Bahler) Eine zu Selektionszwecken eingebrachte Neomycin-Resistenzkassette war zunächst mit Frt-Rekombinationszwecken flankiert und wurde durch Einkreuzung eines Flp-Deleter-Stammes deletiert (siehe Anhang Abb. 47). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6 (Hanley et al., 2010). Die Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Bähler (Münster) zur Verfügung gestellt und nach einem Embryonentransfer auch in der ZVTE Mainz eingeführt.

### 2.1.9 Zelllinien

SP37A3 Murine DC-Linie, die in den Laboratorien der Firma Merck nach dem Protokoll von *Winzler et al.* (1997) aus primären myeloiden Vorläuferzellen von Milzen aus C57BL/6-Mäusen durch Langzeitkultur in Gegenwart von GM-CSF und M-CSF etabliert wurde (von Dr. A. Sutter und F. Jährling der AG Reske-Kunz (Hautklinik Mainz) zur Verfügung gestellt); können bis etwa zur 38. Passage als Expansionskultur gehalten werden, ohne dass sie ihre Eigenschaften wesentlich verändern

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellisolierung und Kultur

#### 2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird ein Aliquot der Zellen in physiologischer Trypanblaulösung verdünnt. Dadurch erscheinen tote Zellen im Lichtmikroskop blau, da sie den Farbstoff durch die poröse Membran aufnehmen. Gezählt werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (Kammerfaktor  $10^4$ ). Berechnet wird die Zellkonzentration mit der folgenden Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4/\text{ml}$$

#### 2.2.1.2 Knochenmarkabgeleitete Dendritische Zellen (BMDC)

Die Mäuse werden mit CO<sub>2</sub> abgetötet und mit 70% Ethanol abgesprüht. Das Fell der Hinterbeine wird entfernt und die Beine dann so präpariert, dass die Knochen (Tibia und Femur) geschlossen bleiben. Die Knochen werden vom Fleisch befreit, kurz in Ethanol geschwenkt und dann in PBS/1% FCS überführt. Ober – und Unterschenkel werden vom Knie und Beckenknochen getrennt und die Knochenenden abgeschnitten. Dann wird das Knochenmark mit einer dünnen Kanüle mittels PBS/1% FCS herausgespült und eine Einzelzellsuspension durch Resuspendieren hergestellt. Die Zellen werden 5 min bei 1400 rpm abzentrifugiert und in BMDC-Medium aufgenommen.  $3 \times 10^6$  Zellen pro Well werden für 7 bis 9 Tage in 5 ml BMDC-Medium in 6-Well-Platten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. An Tag 3 der Kultur werden 2/3 des Mediums durch frisches Medium ersetzt. An Tag 6 werden die DC geerntet und in neue Platten umgesetzt ( $2 \times 10^6$  Zellen in 3 ml BMDC-Medium pro Well). Zur Stimulierung werden die DC an Tag 7 entweder mit LPS (100ng/ml), Poly I:C und /oder CpG für 24h inkubiert, oder mit anti-CD40 (2µg/ml) für 48h. Danach erfolgt die Analyse der BMDC mittels Durchflusszytometrie und der Einsatz in Experimenten.

#### 2.2.1.3 Dendritische Zellen aus der Milz

##### Konventionelle DC

Die Mäuse werden mit CO<sub>2</sub> abgetötet und die Milzen entnommen. Für die Isolierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> DC wird in die Milzen zunächst Kollagenase D (2mg/ml) injiziert

und für 30min bei 37°C verdaut. Danach erfolgt die Aufreinigung der DC mit dem CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Isolation Kit von Miltenyi entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Zellen werden in zwei Schritten aufgereinigt: Zuerst erfolgt eine Depletion von T-, B-, NK-Zellen und Granulozyten, die mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern und anti-Biotin-Microbeads indirekt magnetisch markiert und über eine LD-Magnetsäule gegeben werden, wobei alle markierten Zellen in der Säule hängenbleiben. Aus dem Durchfluss erfolgt anschließend eine Positivselektion der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> DC mittels direkter magnetischer Markierung mit CD4 bzw. CD8-Microbeads. Über eine MS-Säule erfolgt dann die Separation der erwünschten Zellen, die in der Säule gebunden werden und nach dem Entfernen des Magneten von dieser eluiert werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### **Plasmazytoide DC (pDC)**

Die Mäuse werden mit CO<sub>2</sub> abgetötet und die Milzen entnommen. Für die Isolation von pDC werden die Milzen zunächst mit zwei Skalpellen mechanisch zerkleinert und über 70µm Zellsiebe gegeben. Danach erfolgt die Aufreinigung der pDC mit dem pDC Isolation Kit II von Miltenyi entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Zellen werden mittels Negativ-Selektion aufgereinigt: Es erfolgt eine Depletion aller Nicht-pDC, die mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern und anti-Biotin-Microbeads indirekt magnetisch markiert und über eine LS-Magnetsäule gegeben werden, wobei alle markierten Zellen in der Säule hängenbleiben und die unmarkierten pDC sich im Durchfluss befinden. Die Reinheit der isolierten Zellen wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### **2.2.1.4 Isolation von dendritischen Zellen aus Lymphknoten (LN)**

Für die Analyse von emigrierten Langerhans – und dermalen dendritischen Zellen nach „FITC-painting“ (siehe 2.2.4.3), werden diese aus den drainierenden LN herausverdaut. Die Mäuse werden mit CO<sub>2</sub> abgetötet und die zervikalen und inguinalen LN entnommen. Zunächst werden die LN in 3ml HBSS in 12-Well-Platten aufgenommen, mit Kanülen zerpfückt und für 30 bis 45 min bei 37°C mit Kollagenase III (120 Units/Well) verdaut. Danach wird mit einer 1ml Plastik-Pipettenspitze resuspendiert und die Zellsuspension dann über 100 µm Zellsiebe gegeben und zweimal mit PBS/1% FCS gewaschen.

### 2.2.1.5 Naive T-Zellen und natürliche Treg

Es werden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten (axillare, inguinale, brachiale, zervikale) hergestellt, indem die präparierten Organe mit Spritzenstempeln durch 40  $\mu\text{m}$  Zellsiebe gerieben werden. Die Zellkonzentration wird mit MACS-Puffer auf  $2,5 \times 10^8$  Zellen/ml in MACS Puffer eingestellt und die T-Zellen mit dem CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II von Miltenyi entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Bei diesem Protokoll wird das Verfahren der Negativselektion angewandt: Alle Nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden indirekt magnetisch mit biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC Klasse II and Ter-119 markiert, gefolgt von einer Inkubation mit Anti-Biotin Microbeads. Die so immunmagnetisch markierten Zellen werden über eine LS-Säule depletiert. Im Durchlauf befinden sich die gewünschten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren Reinheit durchflusszytometrisch bestimmt wird. Danach erfolgt die Depletion und/oder Aufreinigung der CD25<sup>+</sup> T-Zellen. Dazu werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt, mit anti-CD25-PE und anschließend mit anti-PE-Microbeads (jeweils 15min, 4°C) inkubiert und dann auf MS-Säulen gegeben. Für die Gewinnung der CD25<sup>-</sup> T-Zellen wird nur der erste Durchlauf verwendet, um zu gewährleisten, dass man nur CD25<sup>-</sup> Zellen eluiert. Zur Gewinnung der CD25<sup>+</sup> T-Zellen wird die Säule zweimal mit MACS-Puffer ausgedrückt und die Reinheit beider Zellpopulationen im FACS analysiert.

Wenn Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufgereinigt werden sollen, wird alternativ das „Easy Sep CD4 T cell Enrichment Kit“ von Stemcell unter Zuhilfenahme des Roboseps benutzt. Auch diese Aufreinigung funktioniert über die magnetische Depletion aller Nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.1.6 Generierung von induzierten Treg (iTreg)

Für die Induktion von Tregs werden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> wie in 2.3.1.5 beschrieben isoliert und für 1-4 Tage in Kompletmedium oder in Kollagengelen mit rIL-2 (2U/ml), TGF- $\beta$  (2ng/ml) und RA (10nM) zusammen mit unterschiedlich stimulierten DC inkubiert (im DC:TC-Verhältnis von 1:5; Protokoll von Dr. Baru (Labor von Prof. Tim Sparwasser), verändert). Alle zwei Tage wird frisches Medium mit den vorgenannten Zusätzen dazugegeben. Anschließend werden die Zellen durchflusszytometrisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch auf ihre Foxp3-Expression (GFP-Expression bei DEREK Zellen oder intrazelluläre Foxp3-Färbung (2.2.2.2)) untersucht.

## 2.2.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) können fluoreszenzmarkierte Zellen analysiert werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird durch eine Nadel angesaugt und in einzelnen Tropfen, in denen sich jeweils nur eine Zelle befindet, an verschiedenen Lasern vorbeigeführt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle und die daraus entstehende Lichtabschwächung (Messung im *Forward Scatter*) kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Außerdem können durch die Streuung des Laserstrahls (Messung im *Side Scatter*) Informationen über die Granularität der Zelle gewonnen werden. Wurden die Zellen zuvor mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, werden die Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlängen. Abhängig von der Anzahl der Laser und der Filter können bei der Färbung mit verschiedenen Anregungswellenlängen bis zu 12 verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden.

### 2.2.2.1 Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Für durchflusszytometrische Analysen werden maximal  $10^6$  Zellen eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden die Zellen vor der Markierung mit einem Fc-Block (15 min bei 4 °C im Dunkeln) blockiert. Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgt in 100 µl FACS-Puffer für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen einmal mit FACS -Puffer gewaschen und zur Messung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung und Auswertung der Proben erfolgt am LSRII mit der Diva Software 6.0. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen kann vor der Messung 30 µl (10 µg/ml) 7-AAD-Lösung zugesetzt werden, wodurch die toten Zellen angefärbt werden.

### 2.2.2.2 Intrazelluläre Foxp3-Färbung

Um Foxp3<sup>+</sup> als Marker regulatorischer T-Zellen zu analysieren, wird zunächst eine Oberflächenfärbung der Zellen (2.2.2.1) durchgeführt. Anschließend werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für mindestens 30 min im Dunkeln mit 500 µl Fixation/Permeabilisation Solution (1 Teil Fixation/Permeabilisation mit 3 Teilen Fixation/Permeabilisation Diluent verdünnt) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen

mit 1 ml 1x Permeabilisation Buffer wird 1 µl des Foxp3- Antikörpers auf die permeabilisierten Zellen pipettiert und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und gemessen.

### **2.2.2.3 Intrazelluläre IFN-γ-Färbung**

Für die IFN-γ-Expressionsanalyse von Lymphozyten aus dem Blut werden die Zellen ex vivo mit Peptid restimuliert. Die Zellen produzieren daraufhin IFN-γ. Dieses soll für einen intrazellulären Nachweis in der Zelle zurückgehalten werden. Hierfür wird der Golgi-Apparat der Zelle blockiert. Das Zytokin sammelt sich dann in der Zelle an und kann intrazellulär angefärbt werden. Hierfür müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals werden nicht mit Peptid restimulierte Zellen ebenfalls gefärbt.

Nach einer Erythrozyten-Lyse mit ACK-Puffer und zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer werden die Proben in einer 96-Wellplatte mit rundem Boden in 200µl KM ausgesät ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Well). Benötigt werden zwei Wells pro Probe. Beide Proben werden mit Brefeldin A (5 µg/ml) und IL-2 (25 U/ml) versetzt. Die Positivprobe wird zusätzlich mit 1 µg/ml Ova-Peptid<sub>323-339</sub> und 0,1 µg/ml SIINFEKL stimuliert. Anschließend inkubieren die Proben für 5-6 Stunden bei 37 °C. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen für den Nachweis von Oberflächenantigenen markiert (2.2.2.1). Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen für die Intrazellulär-Färbung mit 100 µl PFA für 10 Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend werden die Proben mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und intrazellulär gefärbt. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgt ebenfalls in Permeabilisierungspuffer (1:400). Die Färbung erfolgt für 30 Minuten bei 4 °C. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers werden die Proben gewaschen und dann durchflusszytometrisch analysiert.

## **2.2.3 In vitro-Analysen**

### **2.2.3.1 Endozytose und Prozessierung von Antigenen**

Eine quantitative Analyse von Makropinozytose und Mannose-Rezeptor vermittelter Endozytose wird mit unterschiedlichen Partikeln mit verschiedener Markierung durchgeführt. Dafür werden die BMDC an Tag 6 geerntet und  $5 \times 10^5$  Zellen zunächst für 10 min in 50 µl DHB-Medium äquilibriert und danach mit EGFP-*E.coli* (1:20), 1



mg/ml FITC-Dextran oder OVA-anti-Dec205-AK-Partikeln (kurz OVA-Dec205) bei 37 °C oder 4 °C für verschiedene Zeiträume (10, 30 und 90 min) inkubiert. Um die Protein-Prozessierungseigenschaften der BMDC zu testen, werden diese mit 5 µg/ml DQ-Ovalbumin bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Durch proteolytischen Abbau wird dabei das an Ova gekoppelte Fluorochrom abgespalten und leuchtet grün, was als Maß für die Prozessierung dient. Die Endozytose und Prozessierung wird zu den vorgenannten Zeitpunkten durch schnelles Herunterkühlen der Zellen auf Eis, gefolgt von 3 maligem Waschen mit eiskaltem PBS, gestoppt. Dann werden die Zellen mit anti-CD11c gefärbt und der Prozentsatz der Zellen, die Partikel aufgenommen haben sowie ihr MFI durchflusszytometrisch analysiert.

### **2.2.3.2 Zytokinsekretion (CBA)**

Das CBA-System beruht darauf, dass Partikel mit distinkten Fluoreszenz-Intensitäten mit „Capture“-Antikörpern beschichtet werden, die spezifisch für die einzelnen Zytokine sind. Diese können dann anhand ihrer unterschiedlich starken Fluoreszenzen im FI-3 Kanal (APC und APC-Cy7) aufgetrennt werden, d.h. wenn man diese beiden Kanäle im Dotplot gegeneinander aufträgt, erhält man für die zu messenden Zytokine unterschiedliche, klar voneinander abgetrennte Beadpopulationen.

Zunächst transferiert man pro Probe (Zellkultur-Überstände und Zytokin-Standards) von jedem Capture Bead (vorher gut vortexen) umgerechnet 0,2 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und füllt dann mit PBS/1% FCS auf 12 µl auf. 10 µl des Mastermixes werden in FACS-Röhrchen vorgelegt, mit 10 µl der Probe vermischt und für 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Hierbei werden die Beads über Antikörper an die Zytokine gebunden. Anschließend wird ein PE-gekoppelter Antikörper gegen das Zytokin hinzugefügt (PE Detection Reagent). Dafür werden auch wieder umgerechnet 0,2 µl von jedem PE Detection Reagent gemischt und auf je 12 µl aufgefüllt. 10 µl des PE Detection Reagent-Mastermixes werden zu den Proben hinzugefügt, 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert und die Proben danach einmal gewaschen. Je nach im Überstand vorhandener Zytokinmenge weisen die Beads bei der Messung am LSRII eine unterschiedlich starke Fluoreszenz in PE auf. Anhand der Fluoreszenzstärke wird nach der Messung dann die Zytokinmenge mit Hilfe der BD CBA Analysis Software bestimmt.

### 2.2.3.3 Herstellung einer 3D-Kollagenmatrix

Für die Herstellung von Kollagengelen werden zunächst die Gelkammern vorbereitet. Objektträger werden mit 3-4 Lagen Paraffinwachs bestrichen, auf die ein Deckgläschen aufgelegt wird, dessen Ränder ebenfalls mit Wachs versiegelt werden, wobei eine Seite offen bleibt (siehe Abb. 7).

Die folgenden Reagenzien werden der Reihe nach gemischt: 5  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 %), 10  $\mu\text{l}$  MEM (10x) und 75  $\mu\text{l}$  PureCol (3 mg/ml). 66  $\mu\text{l}$  dieses Gemischs (2/3) werden dann zu den Zellen gegeben, die zuvor in 33  $\mu\text{l}$  KM (1/3) resuspendiert worden sind und vorsichtig gemischt. Standardmäßig werden für Migrationsstudien  $3 \times 10^5$  Zellen eingesetzt und für DC-T-Zellinteraktionsstudien  $1 \times 10^5$  DC und  $1 \times 10^6$  T-Zellen.

Die Lösung wird dann blasenfrei in die Gelkammer gegeben und 30 bis 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit das Gel polymerisieren kann. Danach wird die Kammer mit KM aufgefüllt und mit Wachs verschlossen.

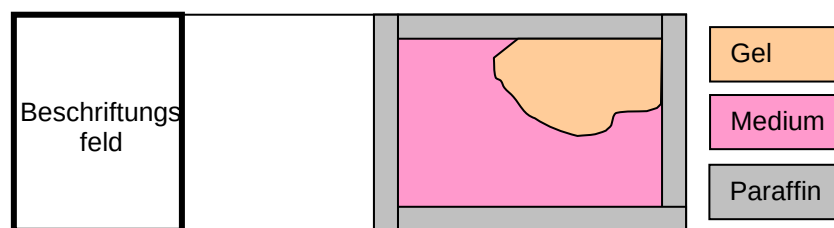


Abb. 7: Aufbau der Gelkammer

### 2.2.3.4 Analyse von Zellmigration und DC-T-Zellinteraktion in der 3D-Kollagenmatrix

Die Migration und Interaktion von unterschiedlich behandelten DC wird anhand von Zeitrafferaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop BX61 (Olympus) mit einer UAPO Linse (20 x/340, NA 0.75) über einen Zeitraum von 8 – 10 Stunden analysiert. Falls nicht anders erwähnt wird alle 2 min ein Bild mit der FView oder der XM10 Kamera (Olympus) aufgenommen und die Filme werden später mit der Cell P Software (SIS) ausgewertet. Als Parameter werden die Migrationsgeschwindigkeit, die zurückgelegte Distanz und die Richtung der Migration bewertet.

Für die Interaktionsstudien wurden die DC zuvor eine Stunde mit 1  $\mu\text{g/ml}$  OVA-Peptid<sub>323-339</sub> inkubiert und dann in einem Verhältnis von 1:5 bzw. 1:10 mit OVA-

reaktiven T-Zellen ins Gel gegeben. Ausgewertet wird die Anzahl und Dauer der Kontakte.

#### **2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen in „Chamber Slides“**

Zur Untersuchung der IS werden  $0,5 \times 10^6$  DCs mit  $1 \mu\text{g/ml}$  OVA- Peptid<sub>323-339</sub> beladen und für 2 Stunden in einem Well eines 4-kämmrigen Chamber Slides zusammen mit  $1 \times 10^6$  T Zellen / Well inkubiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit 4 % PFA fixiert. Nach zweimaligem Waschen werden sie für 10 min mit 0,15 M Glycin bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Aldehyd-Gruppen abzufangen. Für extrazelluläre Färbungen werden die Zellen zunächst mit Blockierungspuffer (5 % (v/v) Serum in PBS) 30 min bei RT behandelt. Für intrazelluläre Färbungen wird ein Puffer verwendet, der zusätzlich Saponin (0,05 %) enthält, um die Zellen zu permeabilisieren. Danach wird mit dem primären Antikörper 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gefärbt. Die Zellen werden drei Mal gewaschen und die sekundären Antikörper zusammen mit den direkt markierten Antikörpern und gegebenenfalls mit Texas Red-Phalloidin für F-Aktin-Färbungen für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Präparate werden in DAPI-Mounting-Medium aufbewahrt.

#### **2.2.3.6 Emigration von Langerhanszellen aus Epidermispräparaten**

Mausohren werden in dorsale und ventrale Hälften gespalten und mit der dermalen Seite nach unten in DC-Medium in bakteriologischen Petrischalen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 24 Stunden werden die Ohrhälften in frisches Medium überführt, welches für weitere 24 Stunden mit  $100 \text{ ng/ml}$  CCL-21 als Chemoattrahans versetzt wird. Dann werden die ausgewanderten Zellen geerntet, gezählt und durchflußzytometrisch analysiert.

Um die in der Epidermis zurückgebliebenen Langerhans Zellen zu quantifizieren, wird die Epidermis von der Dermis getrennt, in 4 % PFA fixiert und mit Glycin (0,15 M) inkubiert. Nach Permeabilisierung und Blockierung (siehe auch 2.3.3.5) werden die Präparate für jeweils 1 Stunde sequentiell mit einem anti-MHCII Antikörper und einem Rhodamin-konjugierten Antikörper bei RT inkubiert. Die Präparate werden dann fluoreszenzmikroskopisch analysiert (LSM 510 oder Axiophot Fluoreszenzmikroskop (beide von Zeiss)).

### 2.2.3.7 Antigen-spezifischer T-Zellproliferationstest

Zur Überprüfung der T-Zellstimulationsfähigkeit unterschiedlicher BMDC-Populationen werden diese mit einem spezifischen Antigen (OVA- Peptid<sub>323-339</sub> oder 0,1 µg/ml SIINFEKL) für 1 Stunde bei 37 °C beladen und dann in Dreifachansätzen in 96-Well-Platten ausplattiert. Dabei werden in die ersten 3 Wells  $5 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  BMDC vorgelegt und eine 1:2 oder 1:3 Verdünnungsreihe durchgeführt, so dass sich in jedem Well 100 µl an DC-Suspension befinden. Am Schluss wird jedes Well mit  $5 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5$  antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> OT-II oder CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen auf 200 µl aufgefüllt.

Nach 48 Stunden Kultivierung im Brutschrank werden die DC/T-Zell-Kokulturen für die letzten 10 -12 Stunden mit 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin (Methyl <sup>3</sup>H-Tymidin) / Well gepulst. Radioaktiv markiertes Thymidin wird in neu synthetisierte DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Die Zellen werden dann mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf ein Glasfaserfilter übertragen, gewaschen und getrocknet. Anschließend werden 20 µl Szintillationsflüssigkeit pro Well auf die Filter gegeben. Mit Hilfe eines β-Szintillationscounters wird die Menge an eingebauter Radioaktivität gemessen, was zur Quantifizierung der Zellproliferation dient.

### 2.2.3.8 MLR

Die MLR ist ein allogener Proliferationstest. Dafür werden entweder BMDC aus Mäusen mit einem Balb/c Hintergrund eingesetzt und mit CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen mit BL/6 Hintergrund inkubiert oder umgekehrt. Die Durchführung erfolgt wie unter 2.2.3.7 beschrieben.

### 2.2.3.9 Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix

Um die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix zu untersuchen, wurden Glasobjektträger mit Fibronectin (1,5 µg/ml) beschichtet, oder es wurden Objektträger verwendet, die bereits mit Poly-L-Lysin beschichtet waren. Auf eine 1 cm<sup>2</sup> große Fläche wurden  $0,5 \times 10^5$  BMDC aufgetragen und unterschiedlich lange im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden nicht adhärenzte Zellen mit PBS abgespült und die adhärenzten Zellen wurden fixiert und durchlichtmikroskopisch hinsichtlich Anzahl und Morphologie analysiert.

#### **2.2.3.10 Zelladhäsion an ICAM-1**

96-Well Platten wurden mit 1,5µg/ml rekombinantem Maus ICAM-1/Fc oder mit humanem IgG bei 4°C für 24 Stunden beschichtet.  $3.5 \times 10^5$  DC wurden für 60 min bei 37°C in die Wells gegeben. Die Anzahl adhärenter Zellen wurde mittels Computer-basierter Bildanalyse mit NIH Image 1.55 Software ermittelt.

### **2.2.4 Tierexperimentelle Methoden**

#### **2.2.4.1 Betäubung von Versuchsmäusen**

Für manche Versuche müssen die Mäuse betäubt werden. Dazu werden sie in ein Glasgefäß gesetzt, in welches zuvor Forene gegeben wurde. Nach ein paar Sekunden sind die Tiere eingeschlafen und man kann die Behandlung durchführen. Diese Betäubung hält nur 1 bis 2 min an.

#### **2.2.4.2 Blutabnahme**

Zur Blutabnahme werden die Mäuse kurz unter Rotlicht leicht erwärmt, um den Blutfluss zu erhöhen. Anschließend werden die Tiere in eine Blutungskammer gezogen, um sie ruhig zu stellen. Die Abnahme erfolgt am Schwanz. Mit einem Skalpell wird die Schwanzarterie angeschnitten und 3 bis 4 Blutstropfen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen.

#### **2.2.4.3 In vivo-Migration ("FITC-painting")**

Zur Markierung aus der Haut auswandernder antigenpräsentierender Zellen wird eine FITC-Lösung auf die Ohren von betäubten Tieren aufgetragen. Die Lösung setzt sich zusammen aus einem 1:1 Verhältnis von Di-n-butylphthalat und Aceton, 5 % DMSO und 3,3 mg/ml FITC. Aufgetragen werden 15 µl pro Ohr. 18 Stunden später werden die drainierenden Lymphknoten sowie als Kontrolle die inguinalen entnommen und für durchflusszytometrische Untersuchungen aufgearbeitet (siehe 2.2.1.4).

#### **2.2.4.4 In vivo-Proliferation**

Um die antigenspezifische T-Zell-Proliferation in vivo zu testen, werden syngenene Mäusen CFSE-gefärbte transgene Zellen injiziert. Nach Immunisierung der Mäuse entweder mit einem spezifischen Peptid, das von endogenen APC den Ag-reaktiven

T-Zellen präsentiert wird, oder aber nach Immunisierung mit Ag-beladenen DC, kann anhand der CFSE-Verdünnung im FACS die Proliferationsstärke gemessen werden. Aus Milzen und LN von OT-I x Ly5.1 and OT-II x Ly5.1 Mäusen wird eine Einzelzell-Suspension hergestellt. Die Erythrozyten werden mit Hilfe von ACK-Puffer lysiert und in PBS auf  $10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden mit 1  $\mu$ M CFSE für 10 min bei 37 °C markiert. Anschließend werden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und je  $10^7$  in 200  $\mu$ l pro Maus in die Schwanzvene injiziert (Tag 0). Nach 24 Stunden werden die Mäuse mit  $10^6$  Ag-beladenen (1  $\mu$ g/ml OVA<sub>257-264</sub> und 10  $\mu$ g/ml OVA<sub>323-339</sub>) BMDC unterschiedlicher Genotypen i.v. immunisiert. Alternativ dazu können Mäuse (z.B. unterschiedlicher Genotypen) mit dem spezifischen Antigen immunisiert werden. Nach weiteren drei Tagen werden Milz und LN der Mäuse entnommen und die proliferierten CD45.1<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD45.1<sup>+</sup>V $\alpha$ 2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Abnahme ihrer CFSE-Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert.

#### 2.2.4.5 Kontakthypersensibilisierung (CHS)

Diese ist in 2 Phasen gegliedert:

1. Sensibilisierung: In dieser Phase wird allen Tieren 450  $\mu$ g TNCB in 15  $\mu$ l AOO auf ein rasiertes Hautareal (Abdomen) gegeben. Der Kontrollgruppe wird reines Lösungsmittel Olivenöl/Aceton (AOO 1:3) auf die Haut appliziert. Jede Gruppe besteht aus mindestens sechs Mäusen.

2. Auslösung der Entzündungsreaktion: Fünf Tage nach der Sensibilisierung wird bei allen Mäusen die Ohrdicke des rechten Ohres gemessen. Direkt anschließend wird eine Dosis von 45  $\mu$ g TNCB in 15  $\mu$ l AOO auf dasselbe Ohr appliziert. 24 Stunden danach werden nochmals die Ohrdicken gemessen und danach für *in vitro* Versuche die axillären, inguinalen und zervikalen Lymphknoten (drainierenden Lymphknoten) entnommen.

##### Ohrschwellung:

Die mittels einer Mikrometerschraube (Öditest, Kroeplin GmbH&Co.KG) vor und nach dem Auslösen der Entzündungsreaktion gemessenen Ohrdicken werden nach folgender Formel ausgewertet:

$\Delta\mu\text{m}$  = Ohrdicke 24 Stunden nach Auftragen der Entzündungsreaktion – Ohrdicke vor Auftragen der Entzündungsreaktion.

## 2.2.5 Molekularbiologie

### 2.2.5.1 Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung

Um transgene Mäuse zu genotypisieren, wird entweder eine Ohr – oder Schwanzbiopsie entnommen und über Nacht in 30 (Ohr) bzw. 200  $\mu$ l (Schwanzspitze) Proteinase K-Lösung (1:50 in Willi-Puffer) bei 55 °C im Heizschüttler verdaut. Am nächsten Tag wird die Proteinase durch Erhitzen auf 95 °C für 2 min inaktiviert, und die Proben werden auf 200 (Ohr) bzw. 1200  $\mu$ l (Schwanz) mit Aqua dest. aufgefüllt und gevortext. Für eine Standard Screening-PCR wird 1  $\mu$ l der DNA-Probe eingesetzt.

### 2.2.5.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen. Dabei werden die zu amplifizierenden Bereiche durch zwei (oder mehr) Primer festgelegt und das dazwischen liegende DNA-Stück wird von einer thermostabilen Polymerase mit den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) aufgefüllt. Es gibt die unterschiedlichsten Anwendungen der PCR: Hier wurden ausschließlich Screening-PCRs durchgeführt, um den Genotyp gezüchteter Mäuse festzustellen.

Standard-PCR-Protokoll (25 $\mu$ l-Ansatz):

| Zusätze               | $\mu$ l |
|-----------------------|---------|
| Primer F1 (10mM)      | 0,5     |
| Primer F2 (10mM)      | 0,5     |
| Primer R3 (10mM)      | 0,5     |
| dNTPs (10mM)          | 0,5     |
| PCR-Puffer + Mg (10x) | 5       |
| Taq-Polymerase        | 0,125   |
| H <sub>2</sub> O      | 16,875  |
| DNA                   | 1       |

Standard-Reaktionsbedingungen:

|       |      |          |
|-------|------|----------|
| 35x { | 95°C | 5 min    |
|       | 95°C | 30 sec   |
|       | 61°C | 1 min    |
|       | 68°C | 1 min    |
|       | 68°C | 5 min    |
|       | 4°C  | $\infty$ |

Primersequenzen:

Myo9b F1 CTCAGGACCTTAAGAATGCCTG  
Myo9b F2 GGGCCAACAGATTGATGTGC  
Myo9b R3 CAGCATACTTTTGCATACATGC

### 2.2.5.3 DNA-Gelelektrophorese

Mit diesem Verfahren können DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe in einem elektrischen Feld in Agarosegelen aufgetrennt werden. Gemäß ihrer negativen Ladung wandert die DNA durch die poröse Matrix in Richtung Kathode.

Entsprechend der Fragmentgröße (< 1 kb) werden 2 % Agarose in 1 x TAE-Puffer erhitzt und das Gel mit GelRed DNA-Stain (1:10000) versetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Die DNA-Proben werden nach dem Aushärten des Gels in die Geltaschen geladen und eine Stromstärke von 110-120 mA angelegt. Um eine Aussage über die Fragmentgröße machen zu können, wird gleichzeitig eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen. Nach 1,5 bis 2 Stunden wird die DNA mit dem QuantityOne Dokumentationssystem von Biorad unter der UV-Lampe sichtbar gemacht.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analyse der Interaktion zwischen DC und T-Zellen

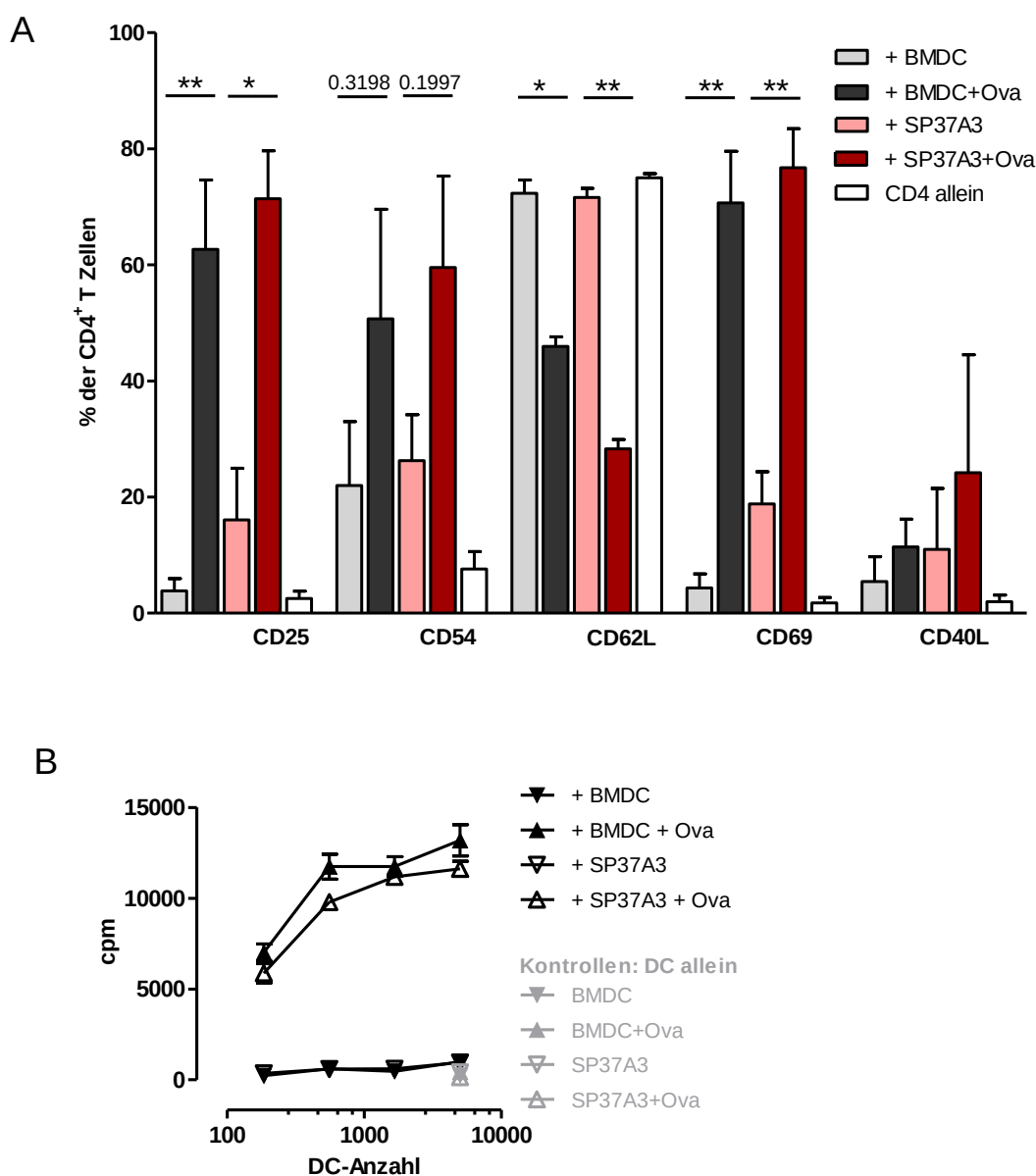
Ziel des Projektes war es, die Interaktion von DC in unterschiedlichen Reifungsstadien, unreif, in Gegenwart von Dexamethason alternativ aktiviert (semi-matur) und voll ausgereift mit naiven T-Zellen und Treg vergleichend zu analysieren. Die DC/T-Zellinteraktion wurde mit Hilfe der Lebendzell-Videomikroskopie in einer 3D-Kollagenmatrix untersucht. Als DC-Population dienten Zellen der DC-Linie SP37A3, welche eine homogene Population von myeloiden DC repräsentieren. Als T-Zell-Quellen wurden Ovalbumin-TCR-transgene OT-II-Mäuse sowie DEREg $\times$ OT-II-Mäuse verwendet. Letztere exprimieren neben dem transgenen TCR ein Fusionsprotein aus EGFP und dem Diphtherietoxinrezeptor unter der Kontrolle von regulatorischen Elementen des Foxp3-Gens. In einem ersten Schritt wurde die Interaktion von SP37A3-Zellen bzw. BMDC mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen und mit nTreg vergleichend analysiert. Daran anschließend wurde die Induktion von Treg (iTreg) während der Kokultur von naiven T-Zellen mit DC unterschiedlicher Reifungsstadien untersucht.

#### 3.1.1 Antigenabhängige Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch BMDC und SP37A3

Um zu überprüfen, ob sowohl BMDC als auch SP37A3 in der Lage sind eine antigenspezifische Aktivierung transgener OT-II T-Zellen zu induzieren, wurden zunächst DC/T-Zellkokulturen angesetzt, bei denen auch unbeladene DC im Vergleich zu OVA-Peptid beladenen DC als Stimulatoren eingesetzt wurden. Dazu wurden mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ausgereifte BMDC und SP37A3 (Bros et al., 2007) unbeladen oder mit OVA-Peptid beladen mit OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und die T-Zellen nach 24 Stunden durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsstatus hin analysiert. Nach drei Tagen wurde die T-Zellproliferation gemessen. Da in den folgenden Versuchen die Interaktion der DC mit den T-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix untersucht wurde und diese physiologisch relevanter ist, als eine

normale Flüssigkokultur, wurden die Kokulturen zur Messung der Aktivierung und der Proliferation in einem Kollagengel durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt, dass mature BMDC und SP37A3 nur bei vorheriger Beladung mit dem spezifischen OVA-Peptid die transgenen T-Zellen aktivierten, was an einem erhöhten Prozentsatz von CD25<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD40L<sup>+</sup> und einem reduzierten Anteil von CD62L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen ist (Abb. 8A). Damit übereinstimmend war auch die durch BMDC und SP37A3 angeregte T-Zellproliferation antigenabhängig (Abb. 8B).



**Abb. 8: Die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch stimulierte BMDC und SP37A3 erfolgt antigenabhängig.**

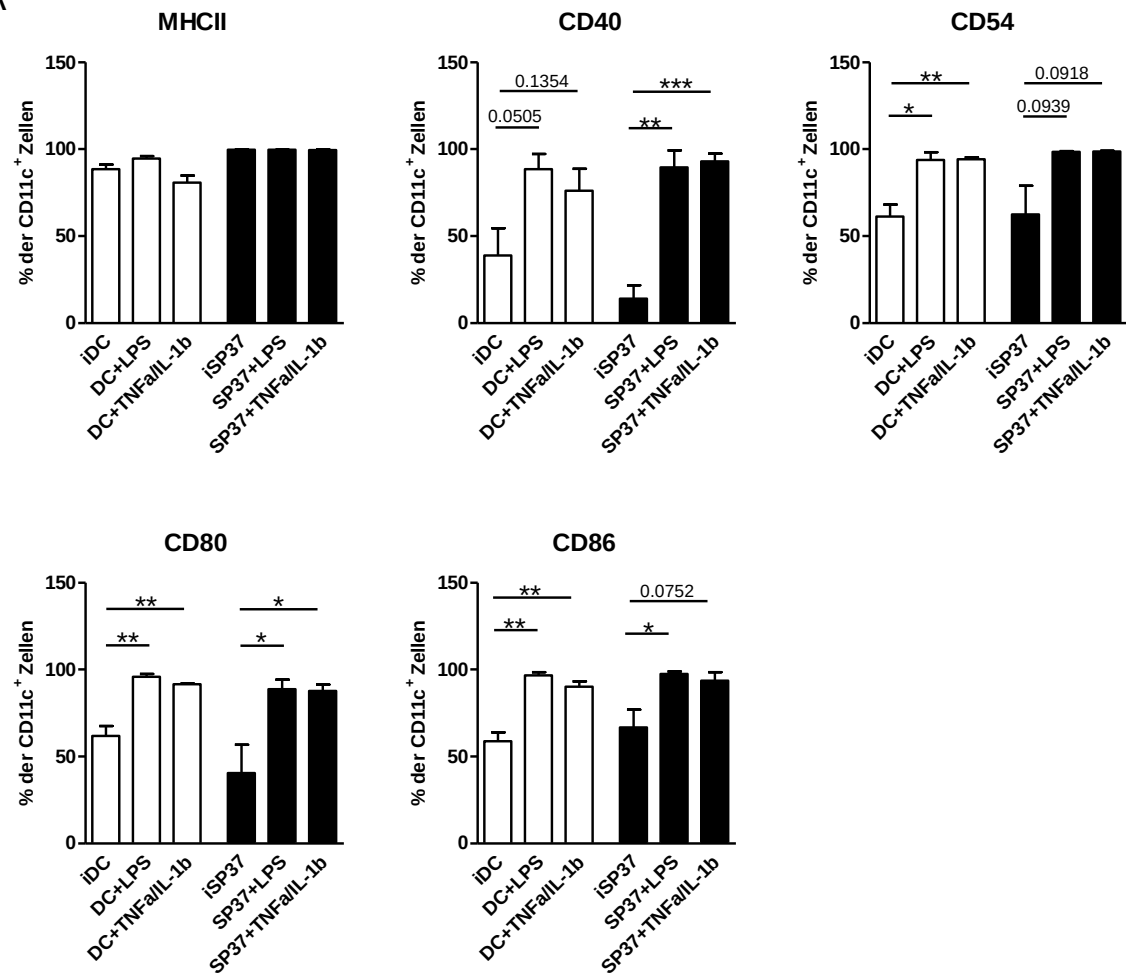
Mit TNF- $\alpha$  und Il-1 $\beta$  (jeweils 15  $\mu$ g/ml, für 3 Tage) stimulierte BMDC und SP37A3 wurden für 2 Stunden mit 10  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und dann mit OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in 3D-

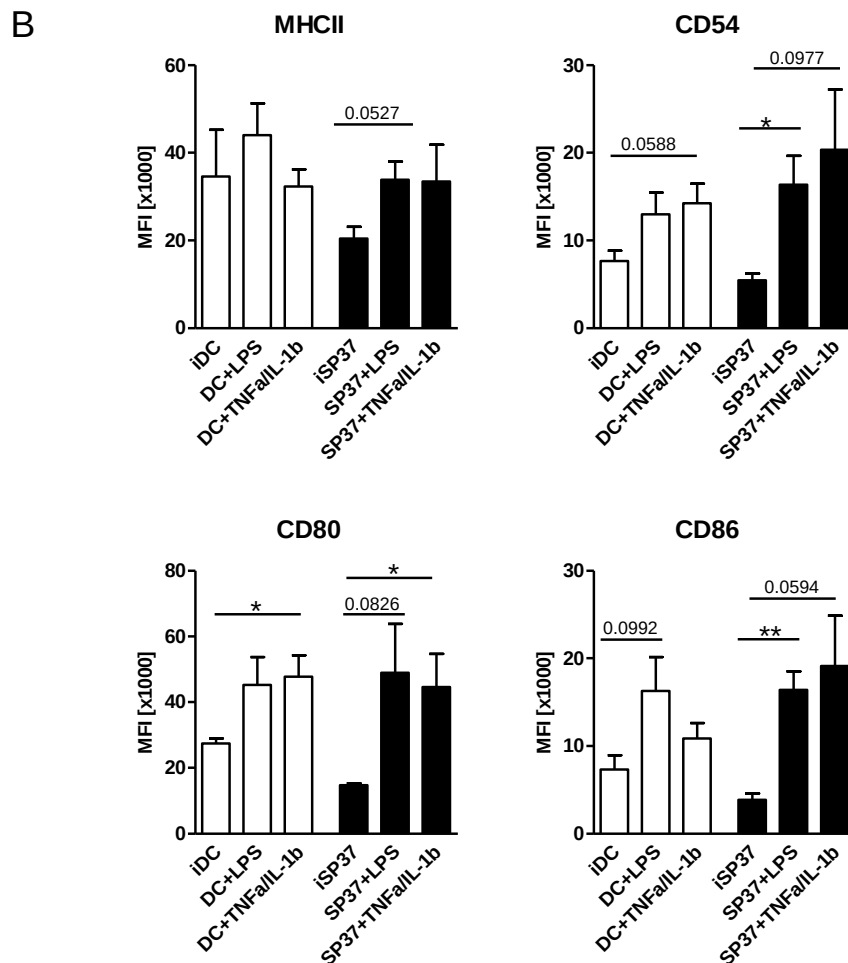
Kollagengelen kokultiviert. (A) Nach 24 Stunden wurden die Gele mit Kollagenase 3 verdaut und die Expression aktivierungsabhängiger T-Zellmarker durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Nach 48 Stunden wurden die Kokulturen für die letzten 12-16 Stunden mit radioaktivem  $[^3\text{H}]$ -Thymidin gepulst, die Gele mit Kollagenase 3 verdaut und dann die Proliferation anhand des eingebauten Thymidins gemessen. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt (in Triplikaten  $\pm$  SEM).

### 3.1.2 Differentielle Stimulation von BMDC und SP37A3

Im Folgenden wurde der Immunphänotyp von unterschiedlich stimulierten BMDC und SP37A3 durchflusszytometrisch vergleichend analysiert, um zu prüfen, ob verschiedene Stimulationswege der DC zu einer unterschiedlichen Aktivierung OVA-spezifischer T-Zellen führen. Dafür wurden die DCs zuvor entweder für 24 Stunden mit LPS oder für 72h mit TNF- $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  stimuliert. In Parallelansätzen wurden auch immature DC untersucht. Abbildung 9A zeigt, dass beide vorgenannten Stimulationswege BMDC und SP37A3 in gleichem Maße stimulierten. Die Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 sowie das Adhäsionsmolekül CD54 wurden nach der Aktivierung von fast allen CD11c<sup>+</sup> Zellen exprimiert. MHCII wurde von der Mehrzahl (> 80%) der unstimulierten bzw. stimulierten DC exprimiert. Auch der MFI der Aktivierungsmarker und von CD54 wurde von BMDC und SP37A3 aktivierungsbedingt hochreguliert (Abb. 9B).

A

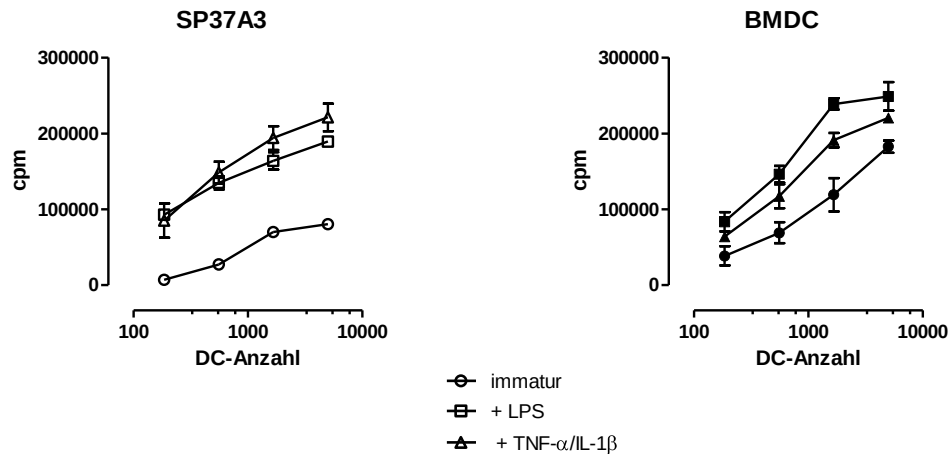




**Abb. 9: Aktivierungsmarker werden bei der Ausreifung von BMDC und SP37A3 in vergleichbarem Maße hochreguliert.**

BMDC wurden entweder an Tag 6 der Kultur mit TNF- $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  (jeweils 15  $\mu$ g/ml) für 3 Tage oder an Tag 8 mit 100ng/ml LPS für 1 Tag stimuliert. SP37A3 wurden in gleicher Weise differentiell stimuliert. Ein Teil der Zellen blieb unstimuliert. Anschließend wurden die unstimulierten sowie die differentiell stimulierten DC-Populationen durchflusszytometrisch auf die Expression der Marker CD11c, CD40, CD54, CD80, CD86 und MHCII untersucht. (A) Prozentualer Anteil; (B) MFI der Datensätze aus (A). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen.

Als nächstes wurde die Fähigkeit der unterschiedlich aktivierten BMDC und SP37A3 analysiert, OVA-Peptid spezifische OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, proliferierten die T-Zellen bei Stimulierung durch die unterschiedlich aktivierten DC-Populationen in etwa gleich gut. Auffällig ist, dass selbst unstimulierte BMDC die T-Zellen schon zur Proliferation anregen konnten, wobei die durch unstimulierte SP37A3 induzierte T-Zellproliferation deutlich unter der durch stimulierte Zellen induzierten Proliferation lag.



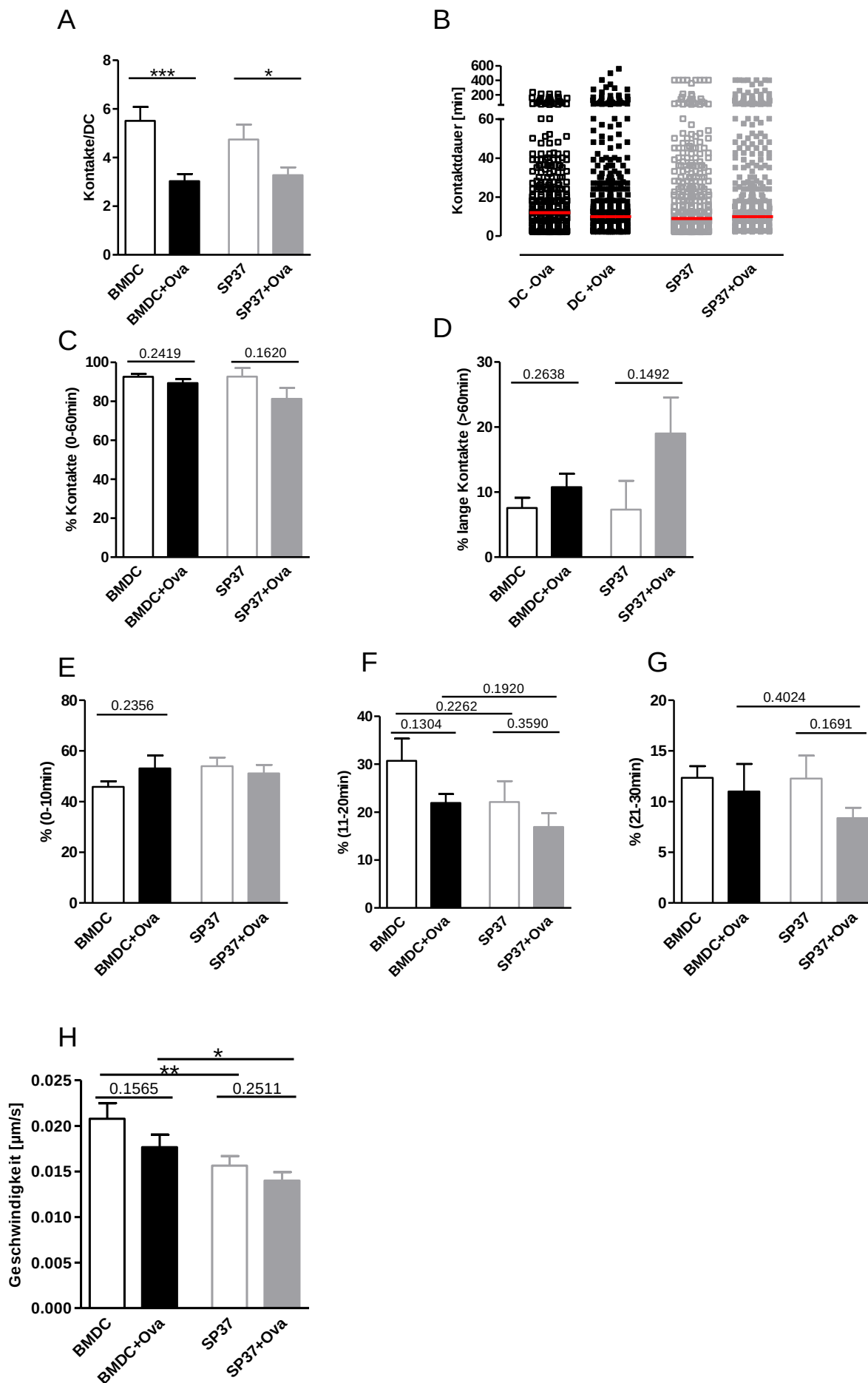
**Abb. 10: Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Kokultur mit BMDC oder SP37A3.**

Unstimulierte und stimulierte (vgl. Abb. 9) BMDC und SP37A3 wurden für 2 Stunden mit 10 µg/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und dann für 3 Tage mit OT-II-CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. In den letzten 12-16 Stunden wurde die Kultur mit radioaktivem [3H]-Thymidin gepulst und dann die Proliferation anhand des eingebauten Thymidins gemessen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert (± SEM) aus zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.3 Interaktion von BMDC und SP37A3 mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In früheren Studien (Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004) wurde bereits gezeigt, dass es bei der T-Zell-Aktivierung sowohl kurze als auch lange T-Zell-BMDC-Interaktionen gibt. Da bisher noch nicht untersucht wurde, ob SP37A3 ähnliche Interaktionsparameter aufweisen wie BMDC und die Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zwischen DC und T-Zelle für die T-Zellaktivierung essentiell ist, wurden im Folgenden die Interaktions-Charakteristika zwischen den stimulierten DC-Populationen (SP37A3 und BMDC) und OT-II T-Zellen im 3D-Kollagengel vergleichend analysiert.

Zunächst wurde die erste Phase der Interaktion (0 – 10 Stunden) zwischen BMDC bzw. SP37A3 und OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Dabei wurden die Kontaktfrequenz (Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC), die Dauer der Kontakte und der Prozentsatz an kurzen und langen Kontakten, sowie die Migrationsgeschwindigkeit von BMDC und SP37A3, die zuvor mit dem spezifischen Peptid beladen wurden untersucht.



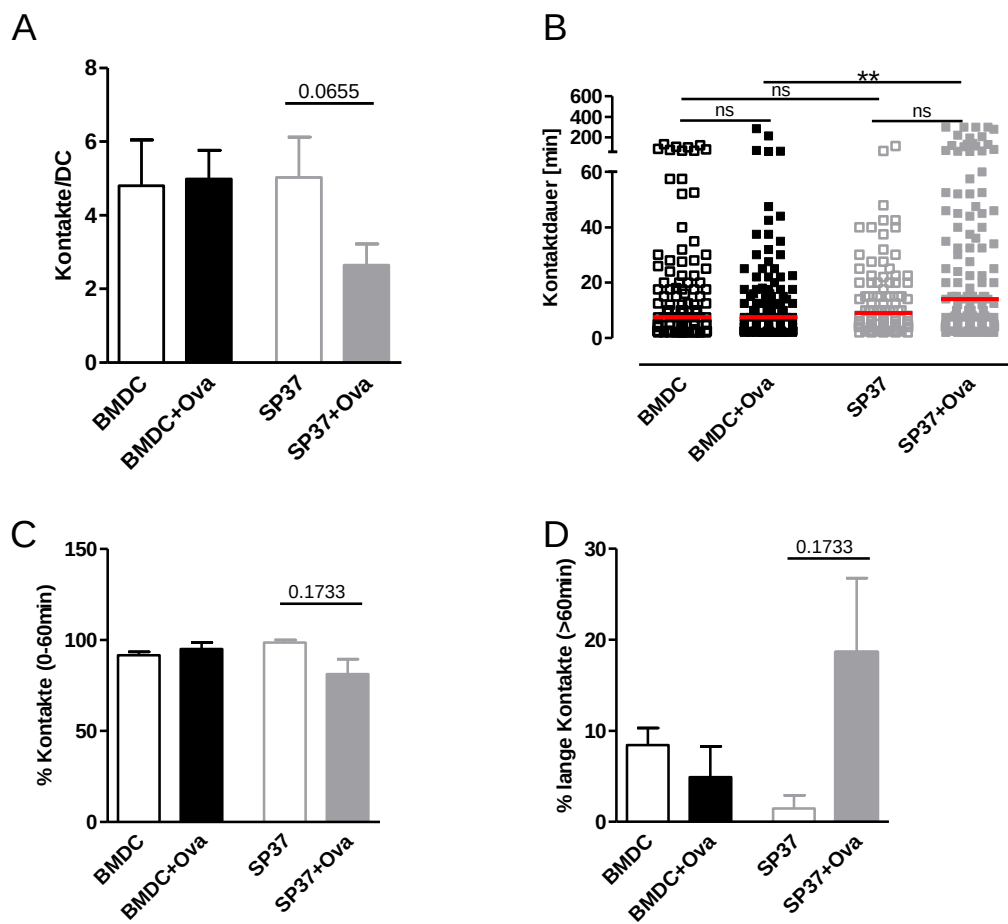
**Abb. 11: Die Kontaktphysiologie der DC-T-Zell-Interaktion weist in den ersten 10 Stunden antigenabhängige und -unabhängige Aspekte auf.**

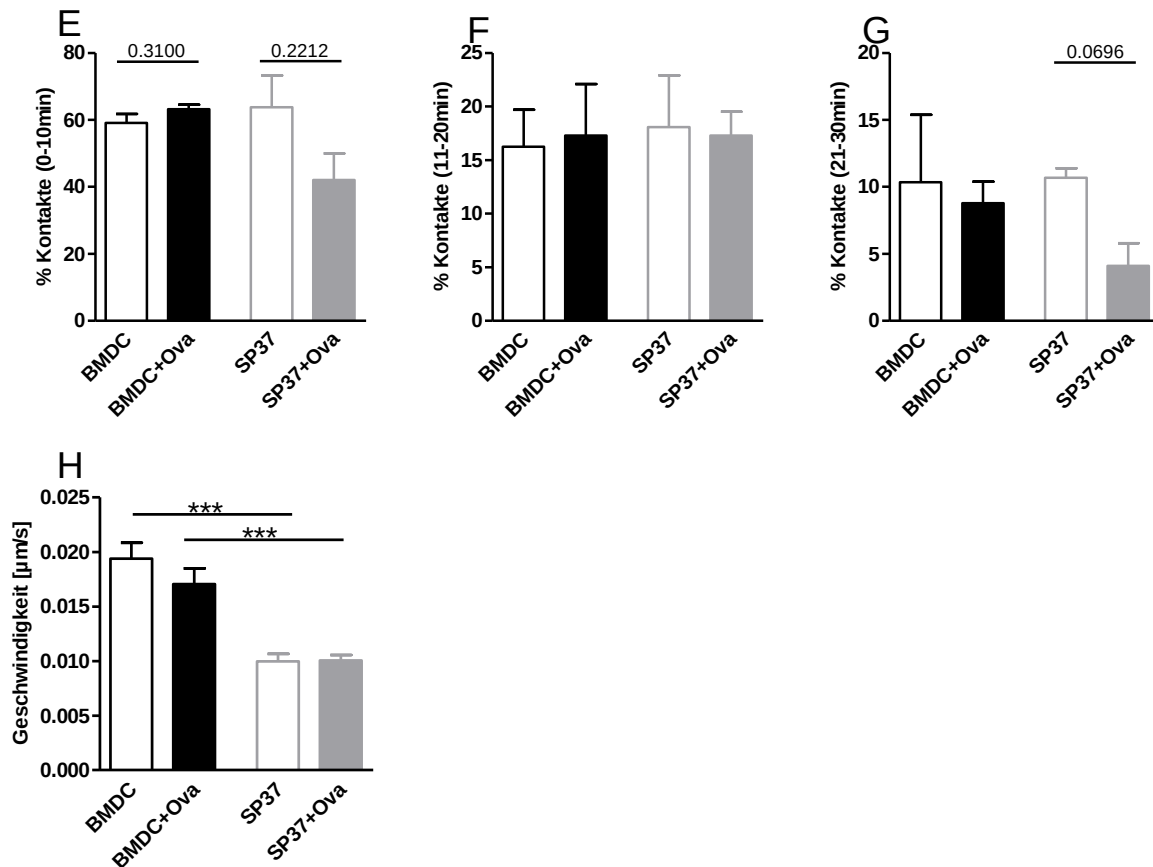
Stimulierte BMDC und SP37A3 (vgl. Abb. 9) wurden entweder unbeladen oder mit OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen mit OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Etwa 400 Kontakte pro Gruppe, die für 0-10 Stunden mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen wurden, sind dargestellt. (A) Die Anzahl der Kontakte von T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), der Prozentsatz an Kontakten, (C) die 0-60 min, (D) über 60 min, (E) 0-10 min, (F) 11-20 min und (G) 21-30 min anhielten und (H) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von vier unabhängigen Versuchen. (A) und (C) bis (H) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass die Zugabe des OVA-Peptids zu einer signifikant verringerten Kontaktanzahl zwischen einzelnen BMDC bzw. SP37A3 mit T-Zellen führt (Abb. 11A). Betrachtet man die Kontaktdauern über den gesamten Beobachtungszeitraum, kann man im Median keine signifikanten Unterschiede in Kokulturen mit unbeladenen gegenüber antigenbeladenen DC erkennen (Abb. 11B). Unterteilt man die Kontaktzeiten in Kontakte, die 0 bis 60 min anhalten und in solche, die länger als 60 min (lange Kontakte) anhalten, sieht man gewisse Unterschiede in den langen Kontaktdauern. Hier gibt es tendenziell mehr lange Kontakte in Kokulturen, die OVA-beladene DC beinhalten, als in Kokulturen mit unbeladenen DC, egal ob BMDC oder SP37A3 als APC eingesetzt werden (Abb. 11C und D). Unterteilt man die Kontakte von 0 bis 30 min noch weiter (Abb. 11E-G), findet man keine Unterschiede in den Kontakten, die 0 bis 10 min anhalten (Abb. 11E). Bei den 11 bis 20 min langen Kontakten sieht man tendenziell erhöhte Prozentsätze bei den Kokulturen, in denen unbeladene DC als APC eingesetzt wurden (Abb. 11F). Ähnliches gilt bei den 21 bis 30 min langen Kontakten im Falle von SP37A3, während bei den BMDC-beinhaltenen Kokulturen keine Unterschiede auftreten (Abb. 11G). Schließlich wurde auch noch die Migrationsgeschwindigkeit der DC im Kollagengel analysiert um zu untersuchen, ob die Interaktionsdauer Einfluss auf die Motilität der DC nimmt. Beide APC-Populationen migrierten mit leicht verminderter Geschwindigkeit, wenn sie zuvor mit OVA-Peptid beladen wurden (Abb. 11H).

Nach der ersten wurde auch die zweite Phase (10 – 20 Stunden) der Interaktion zwischen BMDC bzw. SP37A3 und OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht (Abb. 12). Die Anzahl der Kontakte pro DC war bei den OVA-gepulsten SP37A3 im Vergleich zu allen anderen Gruppen verringert (Abb. 12A). Betrachtet man sich die einzelnen Kontakte, sieht man auch nur bei dieser Gruppe tendenziell einen Anstieg in der medianen Kontaktzeit im Vergleich zu der Kokultur mit unbeladenen DC (Abb. 12B).







**Abb. 12: Die zweite Phase DC-T-Zell-Interaktion (10 – 20 Stunden) zeigt nur bei den SP37A3 antigenabhängige Aspekte.**

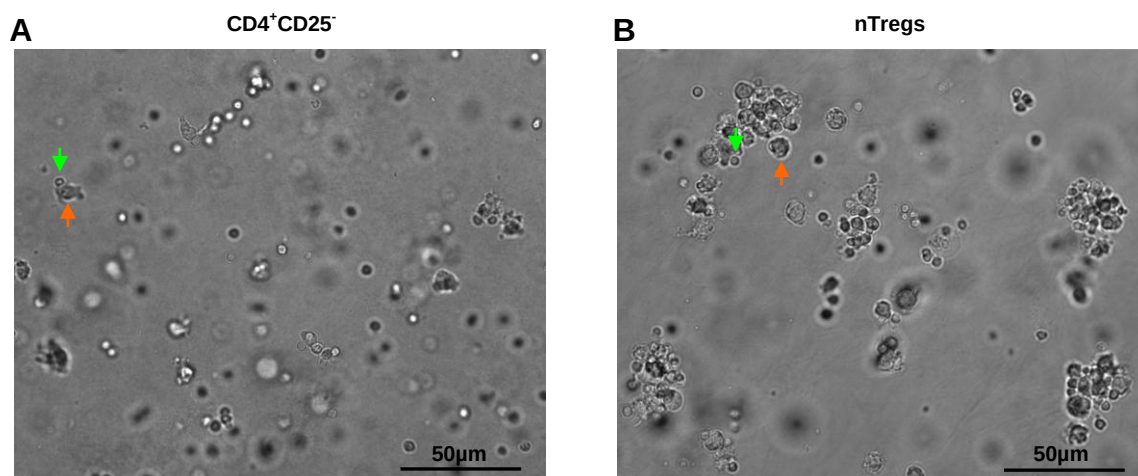
Stimulierte BMDC und SP37A3 (vgl. Abb. 9) wurden entweder unbeladen oder mit OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen mit OT-II CD4<sup>+</sup> T-Zellen in 3D-Kollagengelen für 10 Stunden kokultiviert. Innerhalb der 10-20-Stunden-Phase wurden etwa 100 Kontakte pro Gruppe mittels Lebendzellmikroskopie erfasst. (A) Die Anzahl der T-Zell-Kontakte pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an Kontakten, die 0-60 min, (D) über 60 min, (E) 0-10 min, (F) 11-20 min und (G) 21-30 min anhielten und (H) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von vier unabhängigen Versuchen. (A) und (C) bis (H) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

Unterteilt man die Kontaktzeiten in Kontakte, die 0 bis 60 min anhalten und in solche, die länger als 60 min (lange Kontakte) anhalten, sieht man nur Unterschiede in den langen Kontakten. Hier gibt es nur in den SP37A3-Kokulturen mit OVA-beladenen Zellen tendenziell mehr lange Kontakte, als in Kokulturen mit unbeladenen DC. In den BMDC-T-Zell-Kokulturen sieht man keine Unterschiede in der Anzahl der langen Kontakte (Abb. 12C und D). Splittet man die Kontakte von 0 bis 60 min Dauer weiter auf, findet man in der SP37A3-T-Zell-Kokultur mit Peptid tendenziell weniger Kontakte, die 0 bis 10 min anhalten, als in den anderen Gruppen (Abb. 12E). Bei den 11 bis 20 min langen Kontakten sieht man keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 12F), und bei den 21 bis 30 min langen Kontakten keine Unterschiede in den BMDC-Kokulturen. Bei den T-Zell-Kokulturen mit SP37A3

hingegen sieht man eine geringere Anzahl an Kontakten, wenn die DC mit Peptid beladen wurden gegenüber Kokulturen mit unbeladenen DC (Abb. 12G). Die Migrationsgeschwindigkeit der SP37A3 war im Vergleich zu der der BMDC geringer. Bei beiden DC-Arten war die Migrationsgeschwindigkeit unabhängig von einer vorherigen Beladung mit Antigen vergleichbar (Abb. 12H).

### 3.1.4 Interaktion von BMDC und SP37A3 mit $CD4^+CD25^+$ Tregs

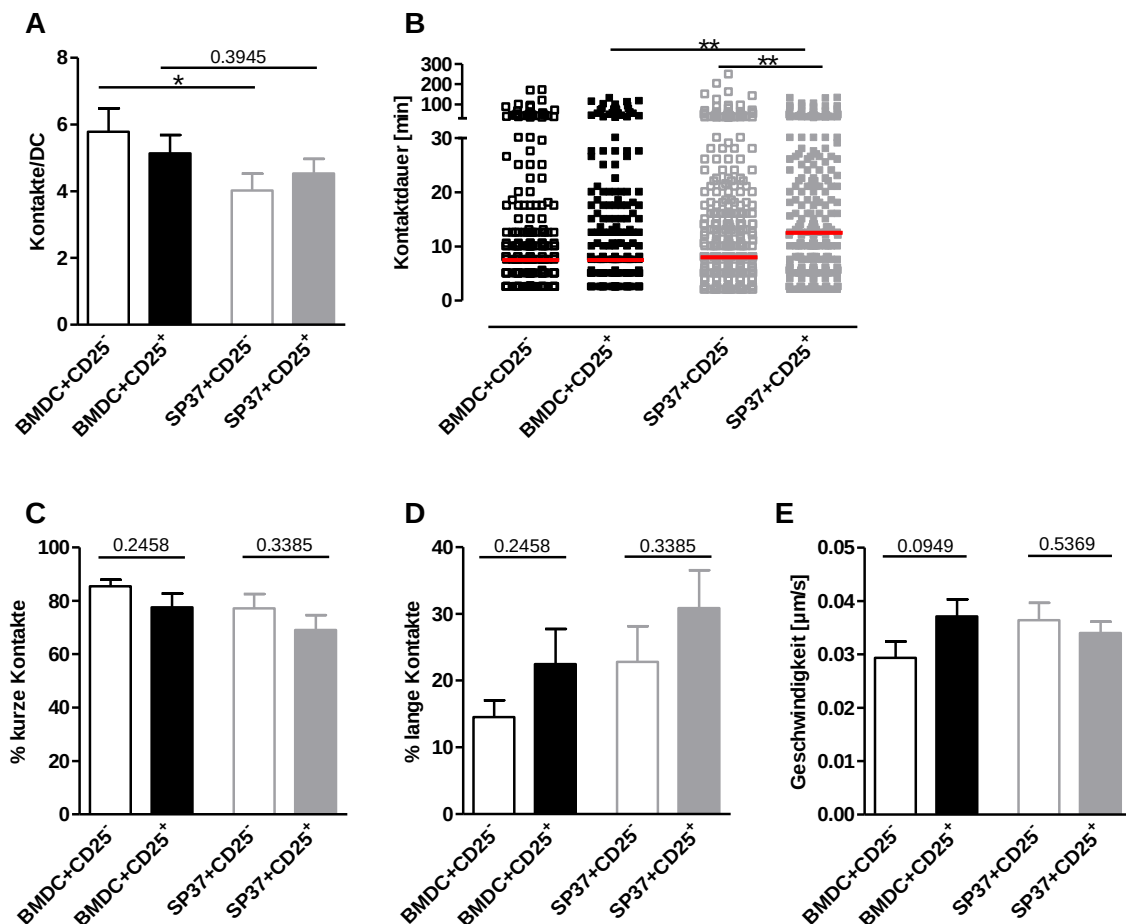
Balkow et al. (2007) konnten bereits für reife BMDC und T-Zellen aus Balb/c Mäusen zeigen, dass es auch bei der Interaktion von reifen DC mit nTregs kurze und lange Kontakte gibt, dass aber im Vergleich zur Interaktion mit naiven  $CD4^+$  T-Zellen signifikant mehr lange Kontakte zwischen DC und nTregs auftreten. Im Folgenden wurde die Interaktion zwischen maturen BMDC bzw SP37A3 und naiven  $CD4^+$  T-Zellen oder nTregs aus OT-II Mäusen im Kollagengel vergleichend analysiert. Abbildung 13 zeigt exemplarisch Durchlichtaufnahmen von stimulierten SP37A3 mit den beiden vorgenannten T-Zellpopulationen. In Kokultur mit nTregs bilden sowohl stimulierte SP37A3 als auch BMDC (nicht gezeigt) große Zellaggregate (Abb. 13B), wohingegen sie mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen kleinere Aggregate ausbildeten. Betrachtet man die Anzahl einzelner T-Zellkontakte pro DC pro Stunde, sieht man, dass SP37A3 weniger Kontakte pro Zeiteinheit mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen ausbilden, als BMDC (Abb. 14A). Bei der medianen Kontaktdauer gibt es keine Unterschiede zwischen BMDC-Kokulturen mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen und nTreg-Kokulturen. SP37A3, die mit nTregs kokultiviert wurden, zeigten im Median eine signifikant längere Kontaktzeit als solche, die mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen kokultiviert wurden (Abb.14B). Betrachtet man sich weiterhin kurze ( $< 3$ facher Median) und lange Kontakte ( $> 3$ facher Median) getrennt voneinander, sieht man bei den kurzen Kontakten kaum Unterschiede



**Abb. 13: Stimulierte SP37A3 bilden mit nTregs Zellaggregate aus.**

Stimulierte SP37A3 wurden entweder mit (A) naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit (B)  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen zeigen stimulierte SP37A3 mit der jeweiligen T-Zellpopulation 1 Stunde nach Ansetzen der Kokultur (grüne Pfeile: T-Zellen; orange Pfeile: DC). Stimulierte BMDC ergaben vergleichbare Ergebnisse.

zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 14C). Bei den Anteilen langer Kontakte findet man jeweils in den Kokulturen mit nTregs einen höheren Prozentsatz im Vergleich zu den Kokulturen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 14D). Die Migrationsgeschwindigkeit der BMDC, die mit nTregs kokultiviert wurden, lag tendenziell höher als die Geschwindigkeit derer, die mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen kultiviert wurden und bei den SP37A3-T-Zell-Kokulturen gab es kaum Unterschiede (Abb.14E).

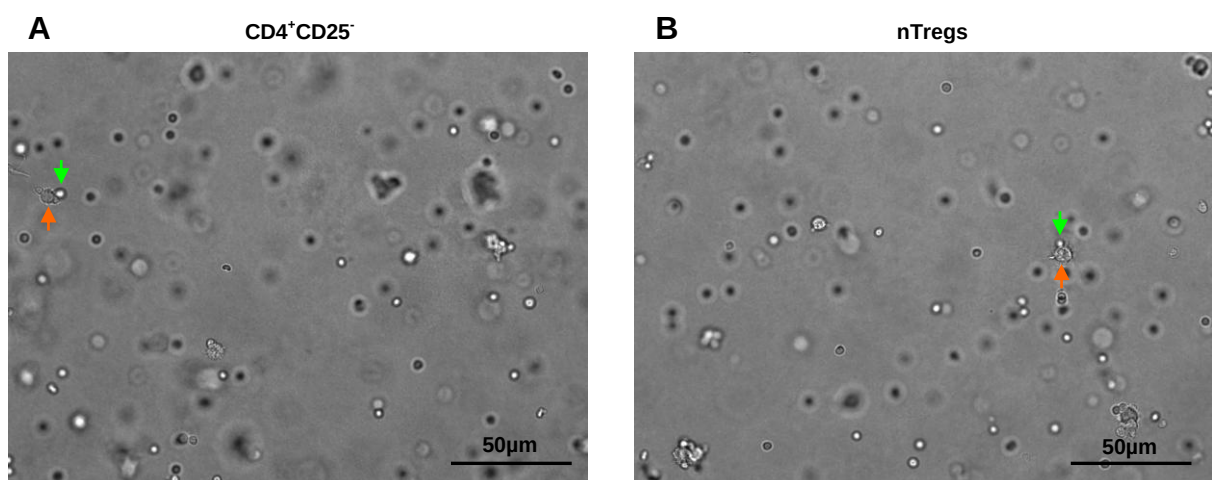
**Abb. 14: mBMDC und SP37A3 bilden mit nTregs mehr lange Kontakte aus als mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen.**

Stimulierte BMDC und SP37A3 wurden entweder mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 10 Stunden wurden etwa 250 Kontakte pro Gruppe mittels

Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten ( $< 3$ -facher Median), (D) an langen Kontakten ( $> 3$ -facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Versuchen. (A) und (C - E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

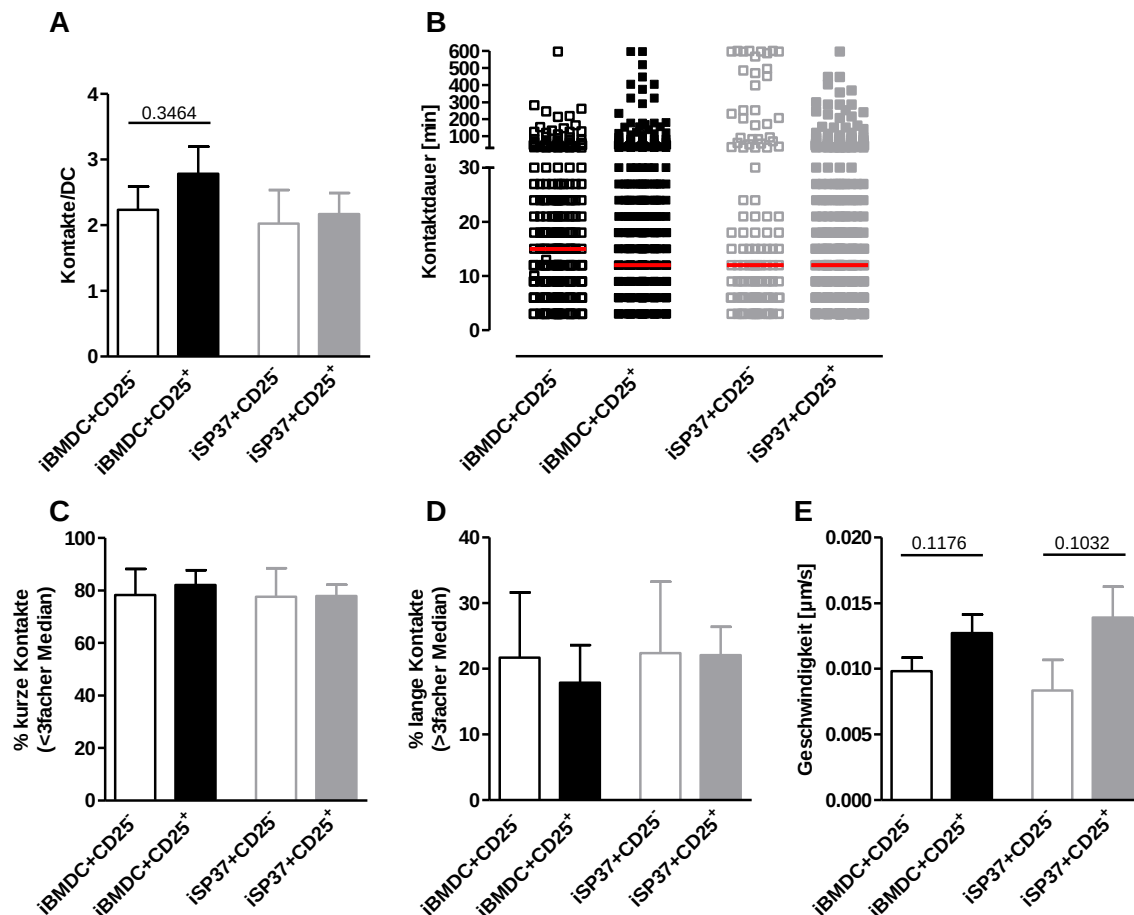
Da immature DC (iDC) ein anderes T-Zellstimulationspotential aufweisen wie mature DC (siehe auch Abb. 10), wurde als nächstes auch die Interaktion zwischen unstimulierten BMDC (iBMDC) bzw SP37A3 (iSP37A3) und naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder nTregs im Kollagengel vergleichend analysiert. Abbildung 15 zeigt exemplarisch Durchlichtaufnahmen von iSP37A3, die mit den beiden T-Zellpopulationen kokultiviert wurden. In Kokulturen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 15A) und nTregs bilden sowohl iSP37A3 (Abb. 15B) als auch iBMDC (nicht gezeigt) keine Zellaggregate aus.

In Phase 1 (0 – 10 Stunden) ist die Anzahl der Kontakte zwischen iBMDC und nTregs im Vergleich zu denen mit  $CD4^+CD25^-$  tendenziell erhöht, wohingegen es bei den iSP37A3 keine Unterschiede gibt (Abb. 16A). Die mediane Kontaktdauer zwischen iBMDC, die mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen interagierten, war tendenziell etwas länger, als die mit nTregs. Die iSP37A3 zeigten im Median keine Unterschiede in der DC/T-Zell-Kontaktdauer (Abb.16B). Betrachtet man sich weiterhin kurze ( $< 3$ -facher Median) und lange Kontakte ( $> 3$ -facher Median) getrennt voneinander, sieht man in beiden Fällen kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 16C, D). Die Migrationsgeschwindigkeit von iBMDC und iSP37A3, die mit nTregs kokultiviert wurden, lag jeweils tendenziell höher, als bei Kokulturen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb.16E).



**Abb. 15:** Immature SP37A3 bilden sowohl mit  $CD4^+CD25^-$  als auch mit nTregs keine Zellcluster aus.

Immature SP37A3 (iSP37A3) wurden entweder mit (A) naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit (B)  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von immaturren SP37A3 mit der jeweiligen T-Zellpopulation 1 Stunde nach Ansetzen der Kokultur sind exemplarisch dargestellt (grüne Pfeile: T-Zellen; orange Pfeile: DC). IBMDC ergaben vergleichbare Ergebnisse.

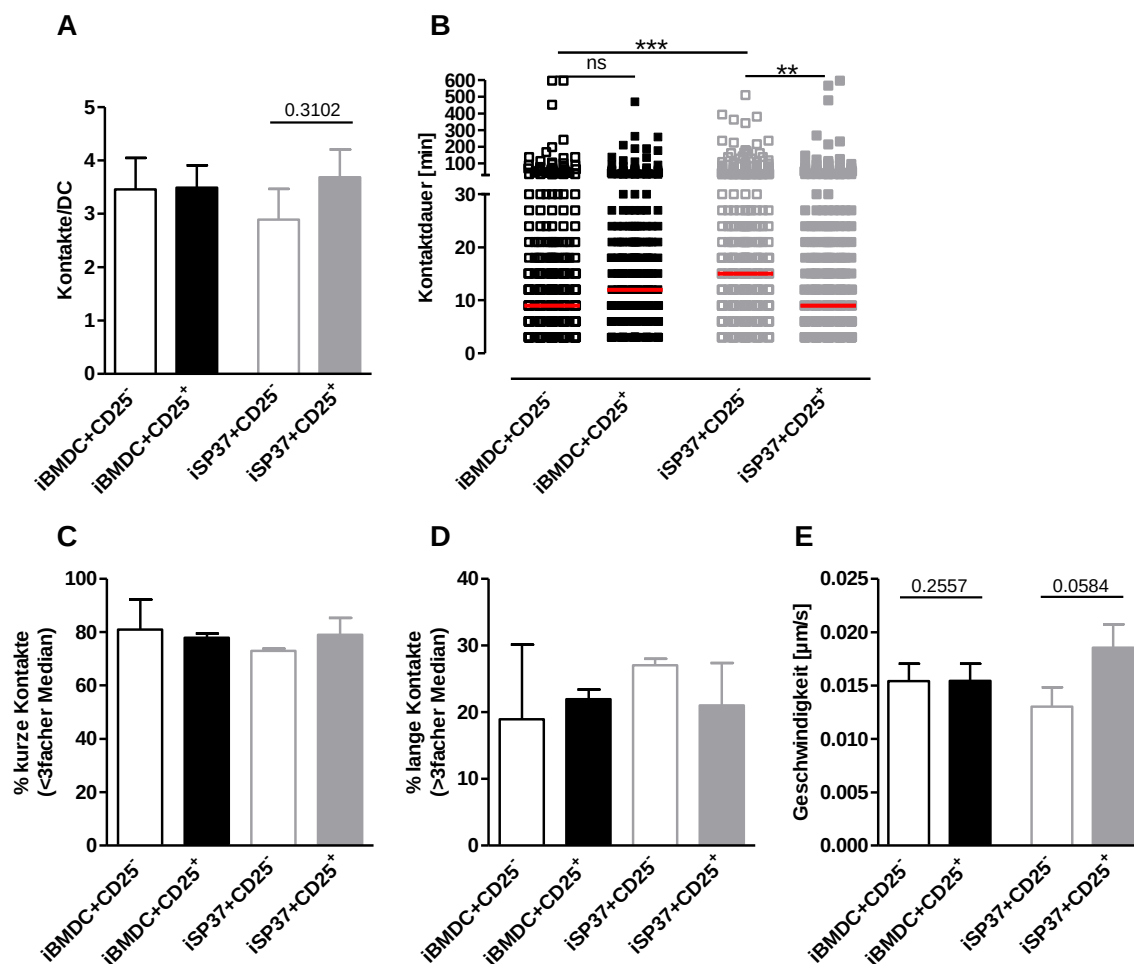


**Abb. 16: Interaktion von iBMDC und iSP37A3 mit nTregs oder  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Phase1).**

iBMDC und iSP37A3 wurden entweder mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Etwa 300 Kontakte pro Gruppe wurde für etwa 10 (Phase 1) Stunden mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten (< 3facher Median), (D) an langen Kontakten (> 3facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von zwei unabhängigen Versuchen. (A) und (C-E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

In der zweiten Phase (10 – 20 Stunden) der Interaktion zwischen iBMDC bzw. iSP37A3 mit nTregs oder  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen ist die Anzahl der Kontakte zwischen iSP37A3 und nTregs im Vergleich zu denen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen leicht erhöht, wohingegen es bei den iBMDC-T-Zell-Kontakten kaum Unterschiede gibt (Abb. 17A). Auch in der medianen Kontaktdauer gab es bei den BMDC keine signifikanten

Unterschiede in der Interaktion mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder nTregs (Abb. 17B). Die iSP37A3 zeigten im Median eine signifikant niedrigere Kontaktdauer mit nTregs als mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 17B). Betrachtet man sich weiterhin kurze (< 3-facher Median) und lange Kontakte (> 3-facher Median) getrennt voneinander, sieht man in beiden Fällen kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 17C, D). Nur der Prozentsatz langer Kontakte liegt bei den iSP37A3 mit nTreg tendenziell etwas niedriger als mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 17D). Die Migrationsgeschwindigkeit von iSP37A3, die mit nTregs kokultiviert wurden, lag tendenziell höher, als die Geschwindigkeit derer, die mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen kokultiviert wurden (Abb. 17E). Bei den iBMDC gab es keine Unterschiede im Migrationsverhalten.

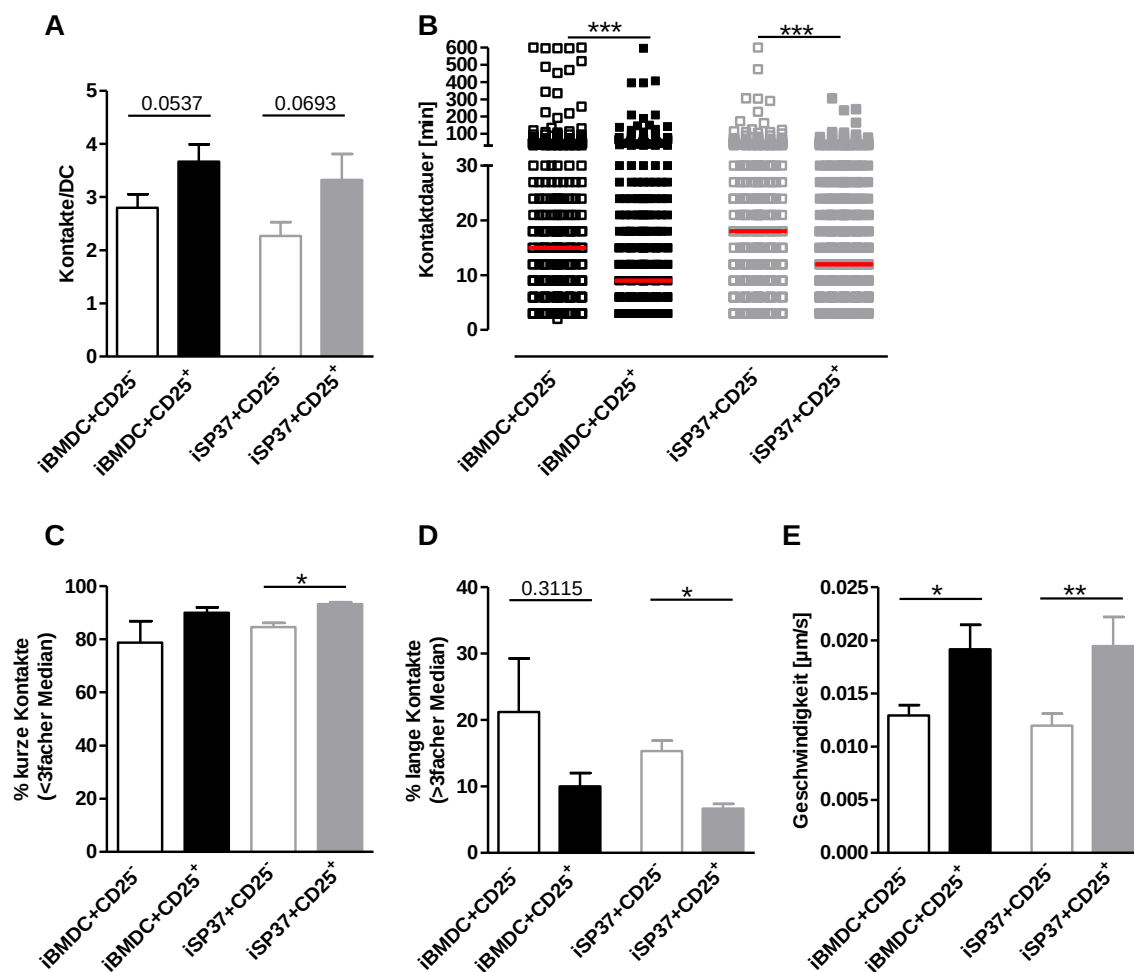


**Abb. 17: Interaktion von iBMDC und iSP37A3 mit nTregs oder  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Phase 2).**

iBMDC und iSP37A3 wurden entweder mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Im Zeitraum von 10 – 20 Stunden (Phase 2) wurden pro Gruppe 350 Kontakte mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der T-Zell-Kontakte pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der

Prozentsatz an kurzen Kontakten (< 3-facher Median), (D) an langen Kontakten (> 3-facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von zwei unabhängigen Versuchen. (A) und (C-E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

In der dritten Phase der DC/T-Zell-Interaktion zeichnen sich deutlichere Unterschiede ab als in den früheren Zeiträumen (Abb. 18). Sowohl bei iBMDC, als auch bei iSP37A3 findet man in den Kokulturen mit nTregs jeweils eine höhere Kontaktfrequenz (Abb. 18A) und eine signifikant kürzere mediane Kontaktdauer als in den Kokulturen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 18B).



**Abb. 18: Interaktion von iBMDC und iSP37A3 mit nTregs oder  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Phase 3).**

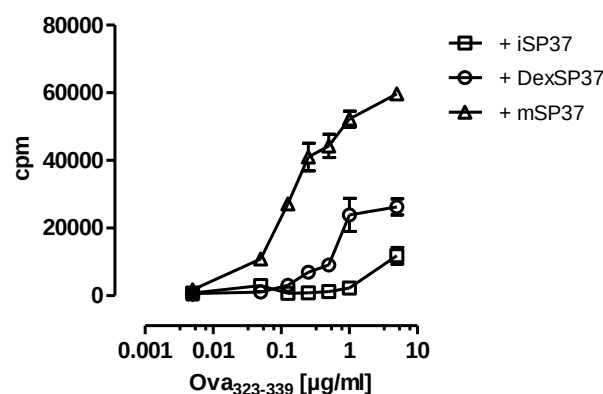
iBMDC und iSP37A3 wurden entweder mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen oder mit  $CD4^+CD25^+$  nTregs aus OT-II Mäusen im Verhältnis 1:10 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Im Zeitraum von 20 – 30 Stunden wurden etwa 350 Kontakte pro Gruppe (Phase 3) mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten (< 3-facher Median), (D) an langen Kontakten (> 3-facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von zwei unabhängigen Versuchen. (A) und (C-E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.



Dieses Ergebnis spiegelt sich auch wider in der Aufteilung in kurze und lange Kontakte. Kurze Kontakte ( $< 3$ -facher Median) findet man vermehrt in den Kokulturen mit nTregs (Abb. 18C), lange Kontakte in den Kokulturen mit  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen (Abb. 18D). Zudem ist die Migrationsgeschwindigkeit von iBMDC und iSP37A3, die mit nTregs kultiviert wurden, signifikant erhöht (Abb. 18E).

### 3.1.5 Interaktion von unterschiedlich aktivierten SP37A3 mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen – Induktion von Tregs

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, wie DC mit differentiellem Aktivitätszustand mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen interagieren und unter welchen Bedingungen es zur Induktion von iTregs kommt. Hierzu wurde wiederum die DC-Linie SP37A3 als APC-Typ eingesetzt und die T-Zellen aus DERE-OT-II Mäusen gewonnen. Die DC wurden zur Maturierung wie zuvor für drei Tage mit jeweils 15 ng/ml IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ausgereift oder alternativ aktiviert, unter zusätzlicher Gabe von Dexamethason (Dex,  $10^{-5}$  M). Um die Induktion von iTregs zu forcieren, wurde den Kokulturen außerdem ein „Toleranzcocktail“ aus IL-2, Retinolsäure und TGF- $\beta$  zugegeben.

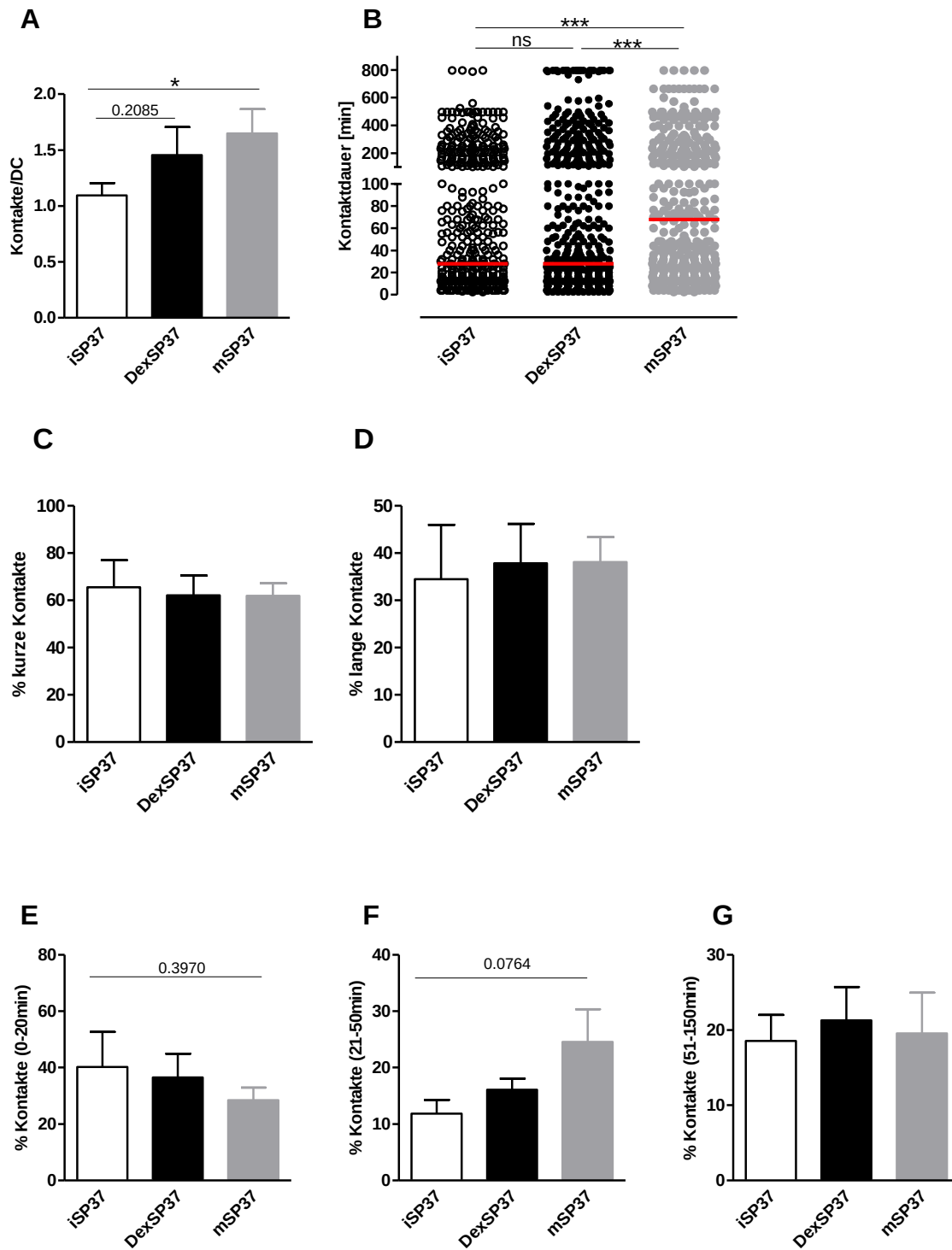


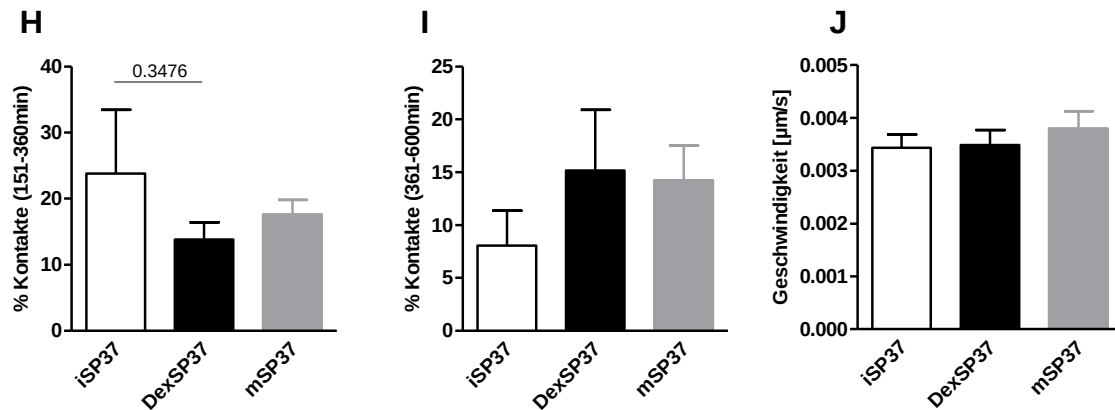
**Abb. 19: Proliferation naiver  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen induziert durch unterschiedlich beladene und aktivierte SP37A3.**

Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit unterschiedlichen Dosen OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen aus DERE-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Kokultur für die letzten 16 Stunden mit radioaktivem  $[^3H]$ -Thymidin gepulst und dann die Proliferation anhand des eingebauten Thymidins gemessen. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen (jeweils in Triplikaten  $\pm$  SEM).

Zunächst wurden verschiedenen Peptidkonzentrationen ausgetestet, um die für diese Versuche optimale Peptidmenge zu finden (Abb. 19). Dabei wurden 0,5 µg/ml als

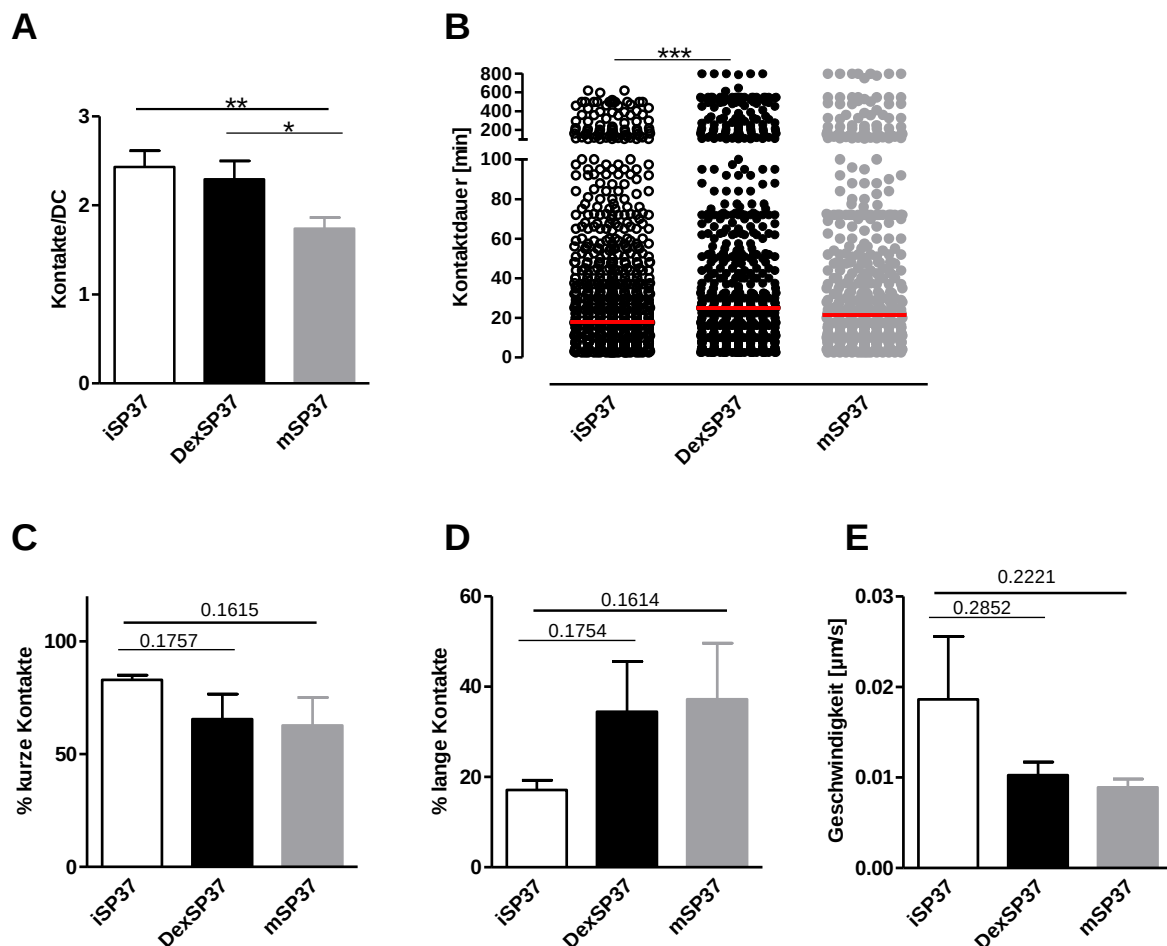
günstig für die iTreg-Experimente angesehen, da bei dieser Konzentration durch mSP37A3 eine sehr starke Proliferation in den naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen induziert wurde, durch DexSP37A3 eine intermediäre und durch iSP37A3 eine sehr geringe. Danach wurden alle darauf folgenden Kontaktanalysen innerhalb der ersten 30 Stunden der Interaktion zwischen DC, die mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ova beladen wurden und T-Zellen im Kollagengel durchgeführt. In der ersten Phase (0-10 Stunden) der Interaktion sieht man von immaturen über alternativ aktivierte zu maturen SP37A3 (mSP37A3) eine zunehmende Tendenz in der Anzahl der Kontakte zu T-Zellen (Abb. 20A). Betrachtet man sich die Kontakte im Einzelnen, findet man in der DC/T-Zell-Kokultur mit mSP37A3 eine signifikant gesteigerte mediane Kontaktzeit im Vergleich zu immaturen und Dex-maturierten DC (Abb. 20B), wobei die mediane Kontaktzeit bei Kokulturen mit immaturen und Dex-maturierten DC vergleichbar ist. Unterteilte man die Kontaktzeiten in kurze ( $< 3$ -facher Median, Abb. 20C) und lange Kontakte ( $> 3$ -facher Median, Abb. 20D), waren die Prozentsätze jeweils in allen drei Gruppen vergleichbar. Um zu entschlüsseln, woher diese stark erhöhte mediane Kontaktzeit kommt, wurden die Kontakte zunächst in kleinere Zeiträume unterteilt (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die erste Stunde der DC/T-Zell-Interaktion in 10-Minuten Abschnitte unterteilt und der Zeitraum von einer Stunde bis zehn Stunden in 30-Minuten Abschnitte. Im Folgenden wurden die aneinander grenzenden Zeitabschnitte in denen vergleichbare Kontaktmuster auftraten zusammengefasst (Abb. 20 E-I). Hier ist zu erkennen, dass es bei den Kontakten, die relativ kurz anhielten (0-20 min, Abb.20E) in Kokulturen, die iSP37A3 beinhalteten tendenziell die höchste, bei Dex-SP37A3 eine intermediäre und bei Verwendung maturer SP37A3 die geringste Frequenz gab. Bei den 21-50 min anhaltenden Kontakten hingegen sah man von den immaturen zu den maturen Kokulturen eine deutlich ansteigende Tendenz (Abb. 20F). Die Prozentsätze der 51-150 min andauernden Kontakte zeigten in allen Gruppen ähnliche Werte (Abb. 20G). In der nächsten Zeitspanne (151-360 min; Abb. 20H) konnte man in den Kokulturen mit immaturen DC mehr Kontakte finden als für Dex-maturierte und mature DC und in der letzten Zeitspanne weniger bei den immaturen als bei den beiden anderen Gruppen (Abb. 20I). Die Migrationsgeschwindigkeit der unterschiedlich aktivierten DC war in allen drei Fällen vergleichbar (Abb. 20J).





**Abb. 20: Interaktion von unterschiedlich aktivierten SP37A3 mit  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen (Phase 1).**

Immature, mit  $\text{IL-1}\beta/\text{TNF-}\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-Zellen aus DREG-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Über einen Zeitraum von 10 Stunden (Phase 1) wurden etwa 470 Kontakte pro Gruppe mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der T-Zell-Kontakte pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten ( $< 3$ -facher Median), (D) der Prozentsatz an langen Kontakten ( $> 3$ -facher Median), (E) an Kontakten, die 0-20min, (F) 21-50min, (G) 51-150min, (H) 151-360min und (I) 361-600min dauerten und (J) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von fünf unabhängigen Versuchen. (A) und (C-J) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.



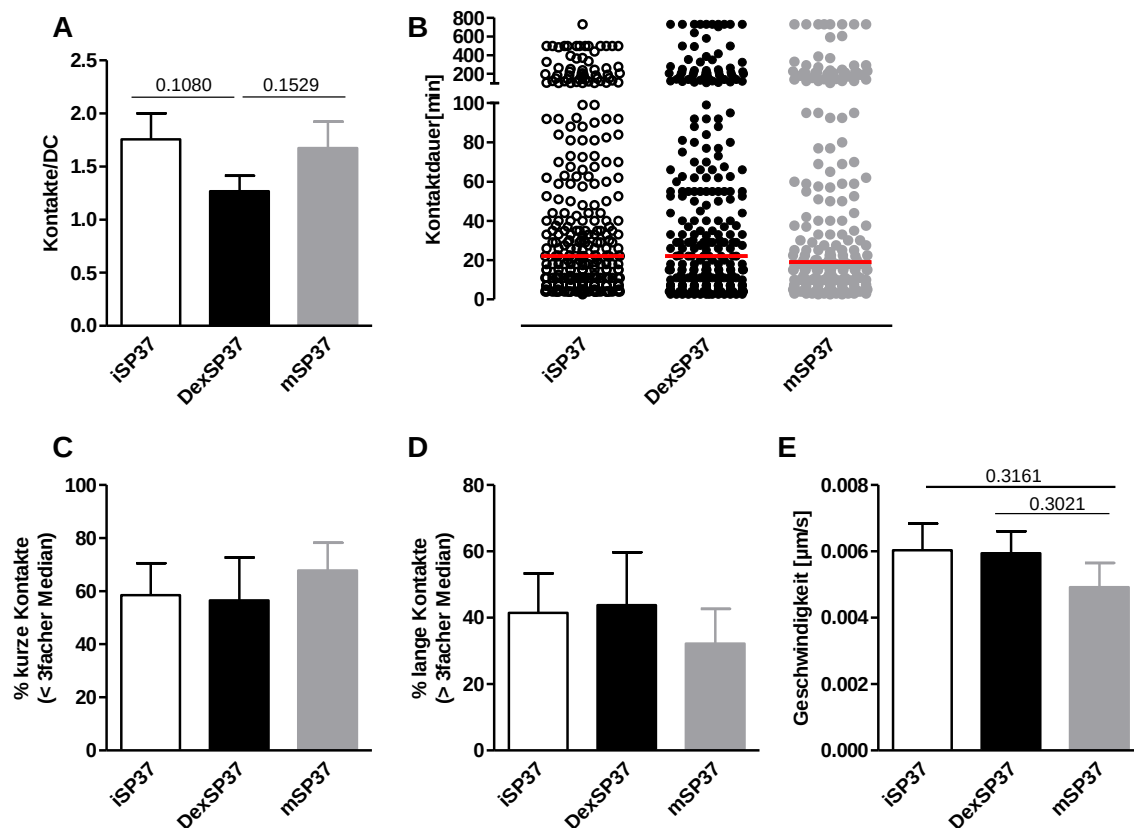
**Abb. 21: Interaktion von unterschiedlich aktivierten SP37A3 mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (Phase 2).**

Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus DREG-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Über einen Zeitraum von 10 -20 Stunden (Phase 2) wurden etwa 700 Kontakte pro Gruppe mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten (< 3-facher Median), (D) an langen Kontakten (> 3-facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von vier unabhängigen Versuchen. (A) und (C-E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

In der zweiten Phase (10-20 Stunden) der Interaktion erfolgte eine höhere Anzahl an DC/T-Zell-Kontakten, als in der ersten Phase (Abb. 21A). Dabei kam es zwischen immaturen und Dex-behandelten SP37A3 im Durchschnitt zu etwa 2,4 und bei den maturen SP37A3 zu 1,7 Kontakten pro Stunde. Betrachtet man sich die Kontakte im Einzelnen, findet man in der Kokultur mit Dex-maturierten SP37A3 eine signifikant gesteigerte mediane Kontaktzeit im Vergleich zu Kokulturen mit immaturen DC (Abb. 21B), wobei die mediane Kontaktzeit der maturen DC/T-Zell-Kokulturen intermediär war. Generell war die mediane Kontaktzeit im Vergleich zur ersten Interaktionsphase stark reduziert. Als nächstes wurde wieder der Prozentsatz an kurzen dem Prozentsatz an langen Kontakten gegenübergestellt. In den Kokulturen mit immaturen DC findet man etwas mehr als 80 % kurze Kontakte (< 3-facher Median) und in den Kulturen mit Dex-behandelten und maturen DC jeweils etwa 65 % (Abb. 21C). Der Prozentsatz an langen Kontakten (> 3-facher Median) lag bei den immaturen DC/T-Zell-Kokulturen bei unter 20 % und bei den Dex-behandelten und den maturen bei etwa 35 % (Abb. 21D). Die Migrationsgeschwindigkeit der immaturen DC war etwa doppelt so hoch wie bei Dex-behandelten und den maturen DC (Abb. 21E). Im Vergleich mit der Migrationsgeschwindigkeit der DC in der ersten Interaktionsphase lag die Migrationsgeschwindigkeit in der zweiten Phase zwei- bis vierfach höher.

In der dritten Phase der DC/T-Zell-Interaktion bildeten immature und mature SP37A3 häufiger Kontakte zu T-Zellen aus als Dex-maturierte (Abb. 22A). Die Analyse der Dauer der einzelnen Kontakte ergab für alle drei Gruppen ähnliche Werte im Median (ca. 20 min), wobei der Wert für die maturen SP37A3-/T-Zell-Kokulturen etwas niedriger war (Abb. 22B). Der Anteil an kurzen und langen Kontakten ergab ebenfalls kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 22C, D). Bei der

Migrationsgeschwindigkeit war der Wert bei den mturen DC etwas niedriger als bei den anderen beiden Gruppen (Abb. 22E).



**Abb. 22: Interaktion von unterschiedlich aktivierten SP37A3 mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (Phase 3)**

Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus DERE-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Über einen Zeitraum von 20 - 30 Stunden (Phase 3) wurden etwa 280 Kontakte pro Gruppe mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (A) Die Anzahl der Kontakte mit T-Zellen pro DC, (B) die Kontaktdauer (rote Linie = Median), (C) der Prozentsatz an kurzen Kontakten (< 3-facher Median), (D) an langen Kontakten (> 3-facher Median) und (E) die Migrationsgeschwindigkeit der DC wurde analysiert. Gezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Versuchen. (A) und (C-E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, (B) als Median.

Zusätzlich zur Kontaktphysiologie wurden zudem der Aktivierungsstatus der mit den SP37A3-Populationen kokultivierten T-Zellen und die Induktion von iTregs untersucht. Dabei wurden an den in Abb. 23 aufgeführten Tagen die Kollagengele mit Kollagenase verdaut und der Zustand der T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nachdem tote Zellen und DC von der Analyse ausgeschlossen waren, wurden zunächst die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 gemessen (Abb. 23A, B). Beide Marker wurden in hohem Maße von T-Zellen exprimiert, die mit mturen SP37A3 kokultiviert wurden und zu einem sehr geringen Prozentsatz von T-Zellen,

die mit immaturren oder Dex-maturierten SP37A3 in Kokultur gehalten wurden. Für CD25 kann man von Tag 1 bis Tag 3 eine deutliche Zunahme der Expression in Kokulturen mit maturen SP37A3 erkennen (von ca. 25 auf 45 %), wobei für CD69 direkt an Tag 1 das Maximum erreicht wurde und der Prozentsatz an Tag 4 sogar wieder etwas abnahm. Immature und Dex-behandelte SP37A3 waren ebenfalls kaum in der Lage, iTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) zu induzieren, während mature SP37A3 in etwa 15 % der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen Foxp3 (an Tag 3) induzieren konnten (Abb. 23C). Auch hier lag wie für die Hochregulation von CD25 das Maximum an Tag 3. Als Maß für die Aktivierung der iTregs wurde GARP - und GITR-positive T-Zellen (jeweils vorgegated auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) gemessen (Abb. 23D, E). Für GARP zeigt sich ein komplett anderes Bild. Hier fand man in den Kokulturen

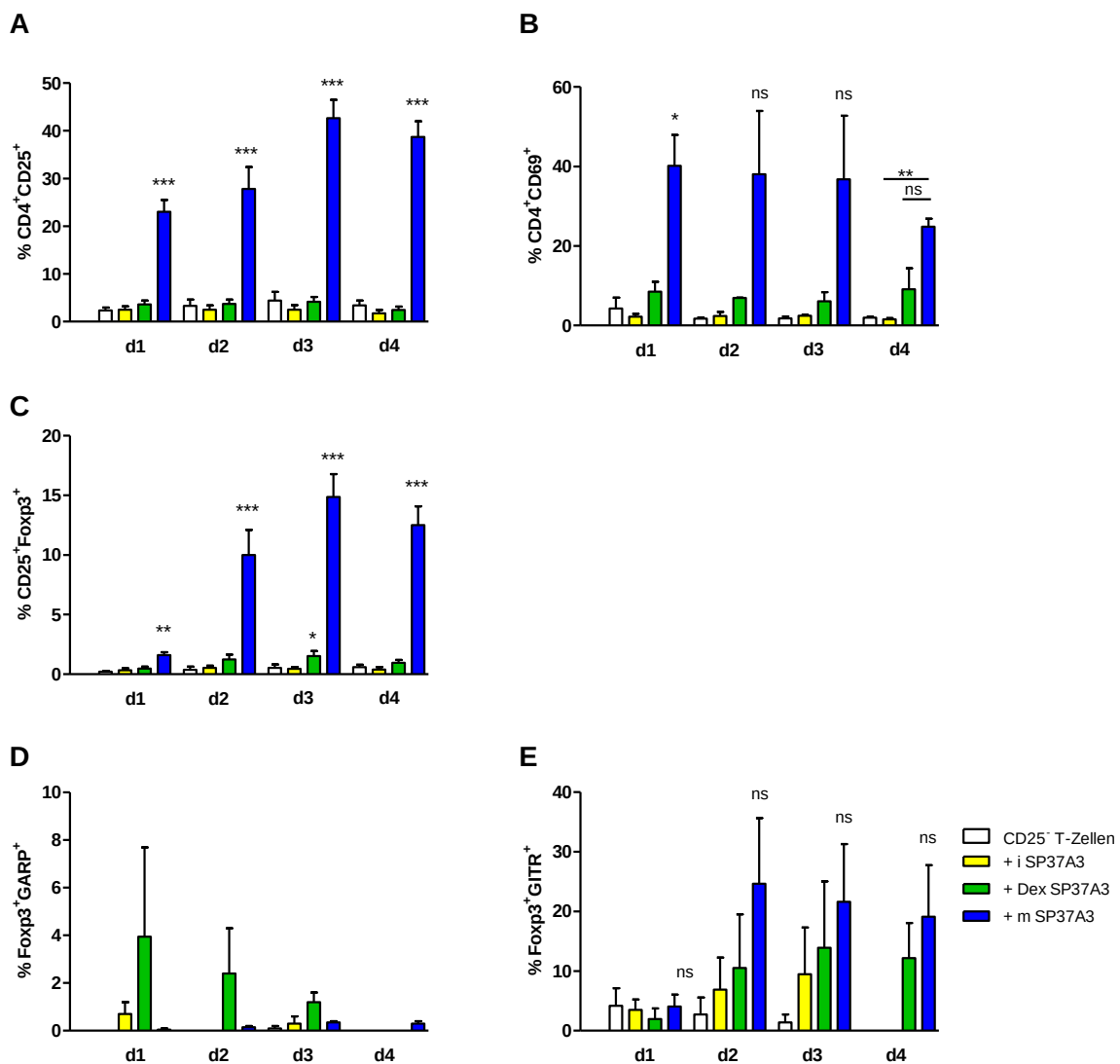
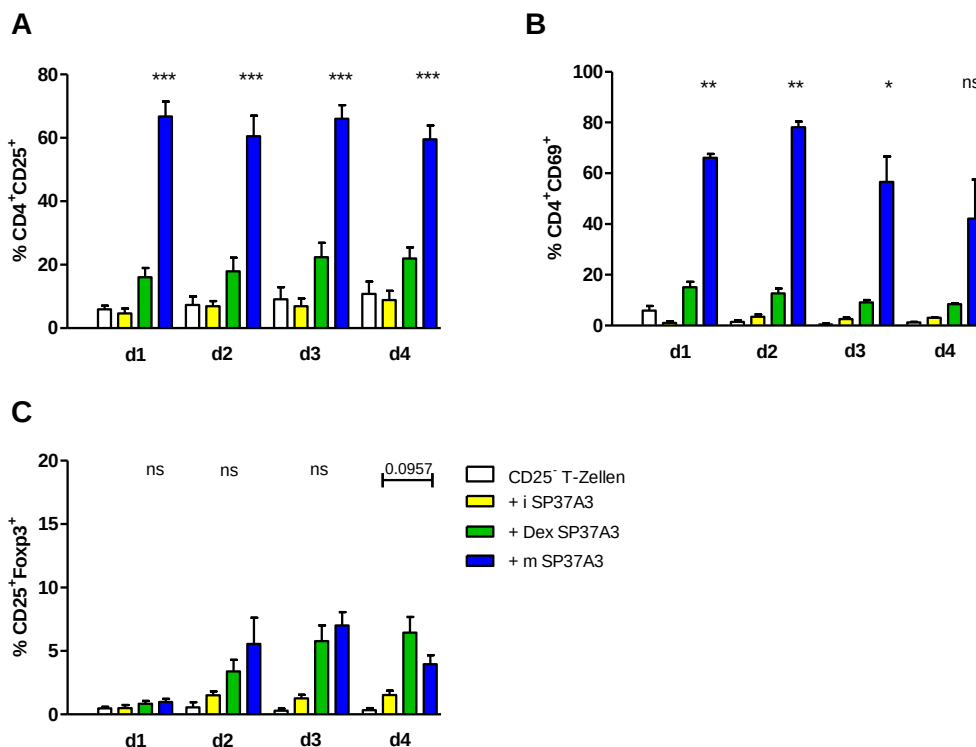


Abb. 23: Mature SP37A3 induzieren den größten Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in einer 3D-Matrix

Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus DREG-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. An den angegebenen Tagen wurden die Gele mit Kollagenase 3 verdaut und die T-Zellen auf die Expression von Aktivierungs – und Treg-Markern hin durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der jeweilige Prozentsatz an (A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, (D) Foxp3<sup>+</sup>GARP<sup>+</sup> und (E) Foxp3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> T-Zellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM).

mit Dex-behandelten SP37A3 den höchsten Prozentsatz an GARP-positiven Zellen, der von Tag 1 bis Tag 3 kontinuierlich abnahm. An Tag 4 konnten überhaupt keine GARP-positiven T-Zellen mehr gefunden werden. In allen anderen Ansätzen konnten an allen Tagen kaum GARP-positive T-Zellen gemessen werden (Abb.23D). GITR wiederum konnte am Häufigsten auf T-Zellen gefunden werden, die mit murenen SP37A3 für zwei Tage inkubiert wurden. In den Kokulturen mit immaturen und Dex-maturierten SP37A3 lag der Prozentsatz an GITR-positiven T-Zellen an Tag 2 bei etwa 10 % und stieg an Tag 3 noch etwas an (Abb. 23E).



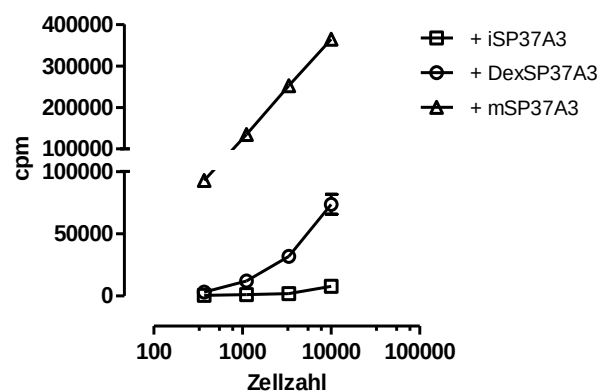
**Abb. 24: In der Flüssigkultur induzieren Dex und mature SP37A3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen**

Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus DREG-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in Flüssigkultur kokultiviert. An den angegebenen Tagen wurden die T-Zellen auf die Expression von Aktivierungs – und Treg-Markern hin durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der jeweilige Prozentsatz an (A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> und (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM).



Bei der Analyse des Aktivierungstatus der T-Zellen in Flüssigkultur ergab sich folgendes Bild: Auch hier wurde durch mSP37A3 in den meisten T-Zellen CD25 und CD69-Expression induziert. Die Induktion der Foxp3-Expression hingegen war durch DexSP37A3 und mSP37A3 in etwa gleich und an d4 sogar etwas höher in den Kokulturen mit DexSP37A3.

Schließlich wurde von Tag 2 auf Tag 3 noch die Proliferation der T-Zellen mittels 3H-Thymidineinbau gemessen. Mature SP37A3 induzierten eine sehr starke Proliferation der T-Zellen, wohingegen Dex-behandelte eine deutlich geringere und immature so gut wie keine Proliferation induzierten (Abb. 25).



**Abb. 25: Mature SP37A3 induzieren die höchste Proliferation von  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen.**

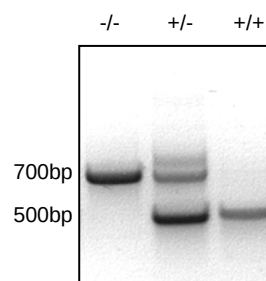
Immature, mit IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  maturierte sowie in Anwesenheit von Dex alternativ aktivierte SP37A3 wurden mit 0,5  $\mu$ g/ml OVA Peptid<sub>323-339</sub> beladen und mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen aus DREG-OT-II Mäusen im Verhältnis 1:5 in 3D-Kollagengelen kokultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Kokultur für die letzten 16 Stunden mit radioaktivem [3H]-Thymidin gepulst und dann die Proliferation anhand des eingebauten Thymidins gemessen. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt (in Triplikaten  $\pm$  SEM).

## 3.2 Rolle von Myosin 9b

In diesem Projekt wurde die Rolle des Motorproteins Myosin 9b (Myo9b) für DC und die Auslösung einer adaptiven Immunantwort anhand von  $\text{Myo9b}^{-/-}$  Mäusen untersucht. Der größte Teil dieses Projekts wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Bähler (Münster) als Gemeinschaftsprojekt mit Yan Xu durchgeführt. Die Vorgehensweise des knock-outs (KO) von Myo9b befindet sich im Anhang (Abb. 47). Zunächst wurden *in vitro* Versuche mit  $\text{Myo9b}^{-/-}$  BMDC und primären DC-Populationen durchgeführt, um die grundlegenden DC-Eigenschaften zu überprüfen. Des Weiteren wurden *in vivo* Versuche mit  $\text{Myo9b}^{-/-}$  Mäusen durchgeführt, um die *in vitro* Daten zu validieren und darüber hinaus zu testen, inwieweit Myo9b an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt ist.

### 3.2.1 Zucht und Genotypisierung der $\text{Myo9b}^{-/-}$ Mäuse

Zum Aufbau einer eigenen  $\text{Myo9b}^{-/-}$  Zucht wurden zunächst heterozygote Mäuse aus Münster miteinander verpaart. Die Typisierung der Nachkommen erfolgte mittels PCR. Die Genotypenverteilung entsprach in etwa der Vererbungslehre von Mendel (1/4 homozygot, 1/4 wildtypisch und 1/2 heterozygot). Dabei erhält man bei homozygoten ( $-/-$ ) Mäusen ein PCR-Produkt von 700 bp und für das wildtypische Allel ( $+/+$ ) eine Bande von 500 bp. Bei heterozygoten ( $+/-$ ) Mäusen erhält man beide Banden (Abb. 26). Für die folgenden Versuche wurden nur die  $-/-$  Tiere eingesetzt. Als Wt-Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse oder die aus der Zucht anfallenden  $+/+$  Tiere.

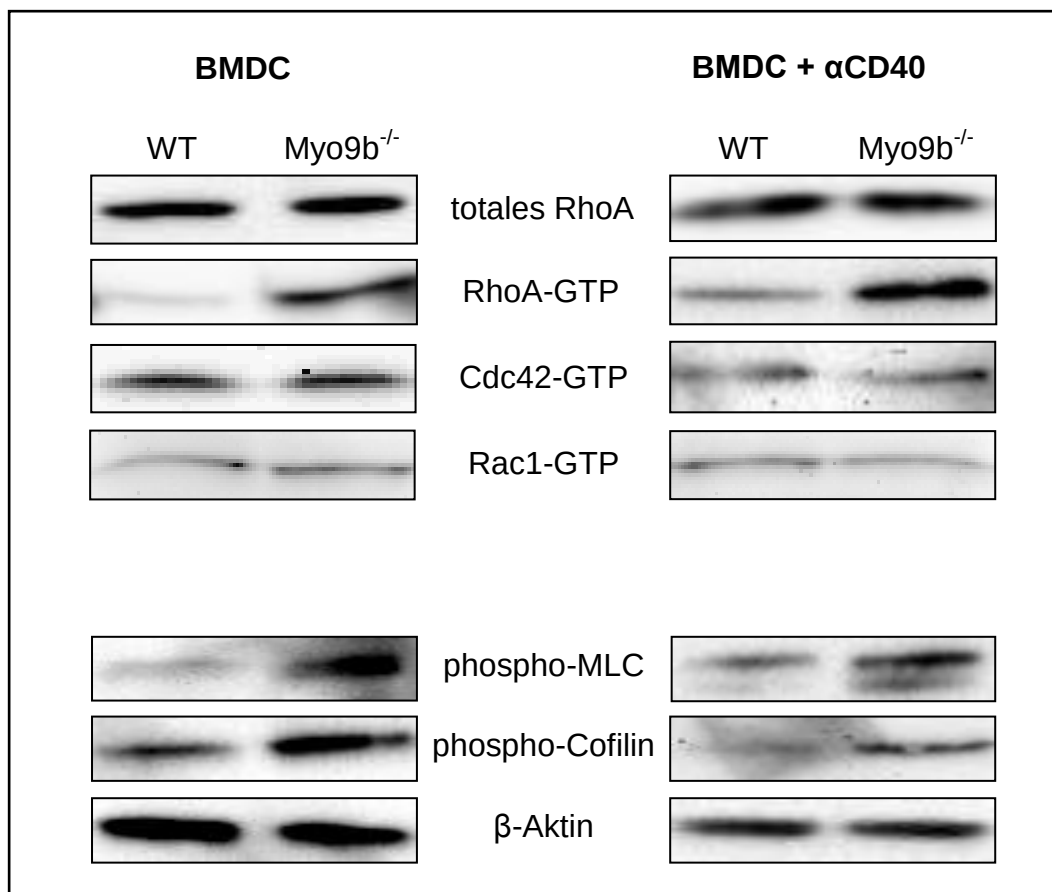


**Abb. 26: Genotypisierung von  $\text{Myo9b}$  KO-Nachkommen**

PCR-Analyse genomischer DNA aus Ohrbiopsien von homozygoten ( $-/-$ ), heterozygoten ( $+/-$ ) und WT ( $+/+$ ) Mäusen.

### 3.2.2 Die Rho-Signaltransduktionsaktivität in *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC ist verstärkt

Da aus früheren Studien bereits bekannt ist, dass *Myo9b* eine Rho-GAP Funktion ausübt (Chieragatti et al., 1998; Müller et al., 1997; Post et al., 1998; Reinhard et al., 1995), die über die Phosphorylierung der kleinen G-Proteine an der Organisation des Cytoskeletts und der Zellmigration beteiligt ist, wurden die G-Proteine hinsichtlich ihrer Expression und ihres Phosphorylierungszustandes mittels Western-Blot analysiert. Sowohl immature als auch stimulierte *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC weisen im Vergleich zum WT eine erhöhte RhoA-Aktivität auf, wohingegen Gesamt-RhoA, Cdc42-GTP und Rac1-GTP in gleichem Maße exprimiert werden (Abb. 27). Auch wurden erhöhte phosphorylierte Mengen der Rho-Ziel-Moleküle "Myosin light chain" (p-MLC) und p-Cofilin in den *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC detektiert. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *Myo9b* ein wichtiger Bestandteil der Rho-GAP Signaltransduktionskaskade ist, wie es auch schon in Makrophagen gezeigt werden konnte (Hanley et al., 2010).

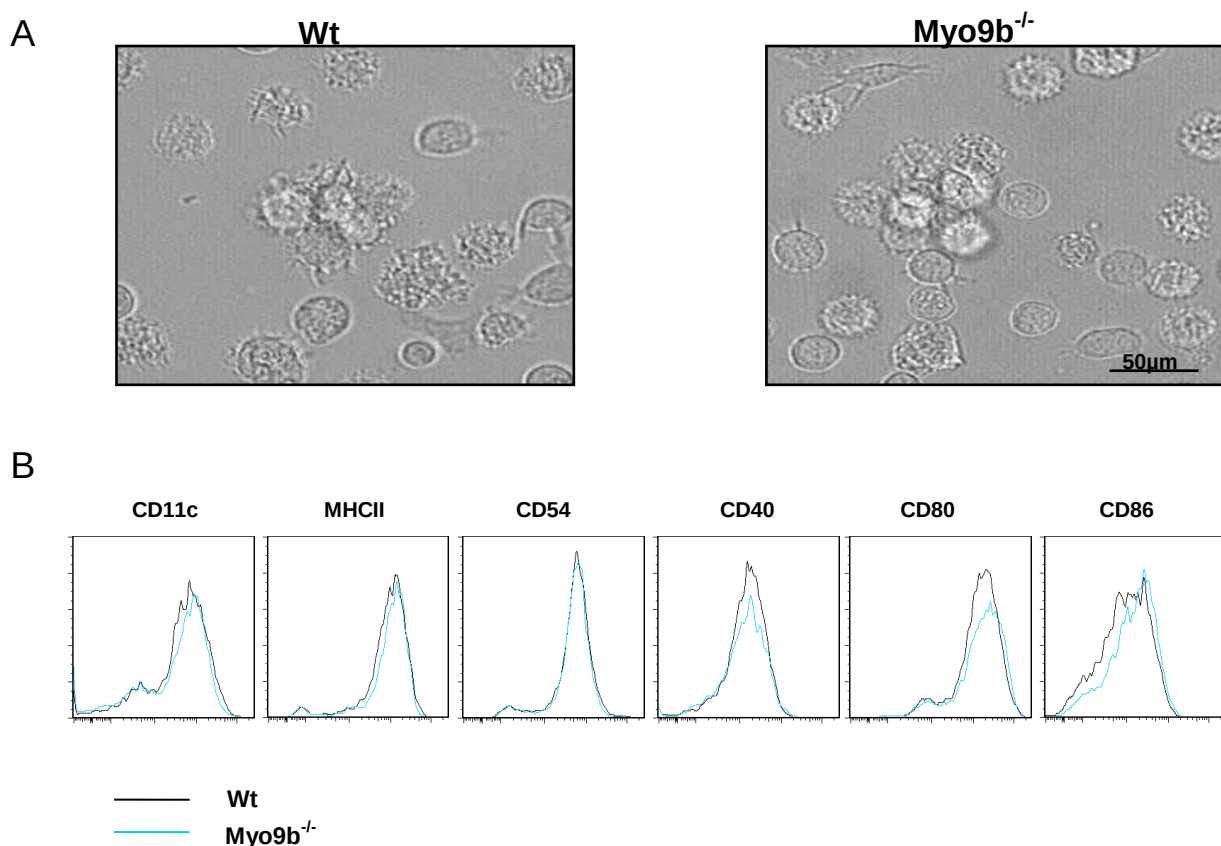


**Abb. 27: Die Rho-Signaltransduktionskaskade ist in *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC verstärkt**

GST-pull down und Westernblot Analyse der RhoA, Cdc42, Rac1, Cofilin und Myosin Light Chain (MLC) Expression und Phosphorylierung in unstimulierten und stimulierten (+ αCD40) Wt und *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC. β-Aktin diente als Kontrolle für gleiche Probenbeladung. Blots von Y. Xu, Münster.

### 3.2.3 Phänotyp der *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC

Zur besseren Charakterisierung des *Myo9b*<sup>-/-</sup>-Mausstamms wurden zunächst die aus dem Knochenmark generierten dendritischen Zellen bis Tag sieben in GM-CSF und IL-4-haltigem Medium kultiviert, für 2 Tage mit anti-CD40-AK ausgereift und im Folgenden lichtmikroskopisch und durchflußzytometrisch analysiert. Abbildung 28A zeigt stimulierte *Myo9b*<sup>-/-</sup> und Wt BMDC an Tag 9 der Kultur in einer durchlichtmikroskopischen Aufnahme. Genau wie Wt BMDC weisen auch *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC die für reife DC typische Dendriten – und Clusterbildung auf.



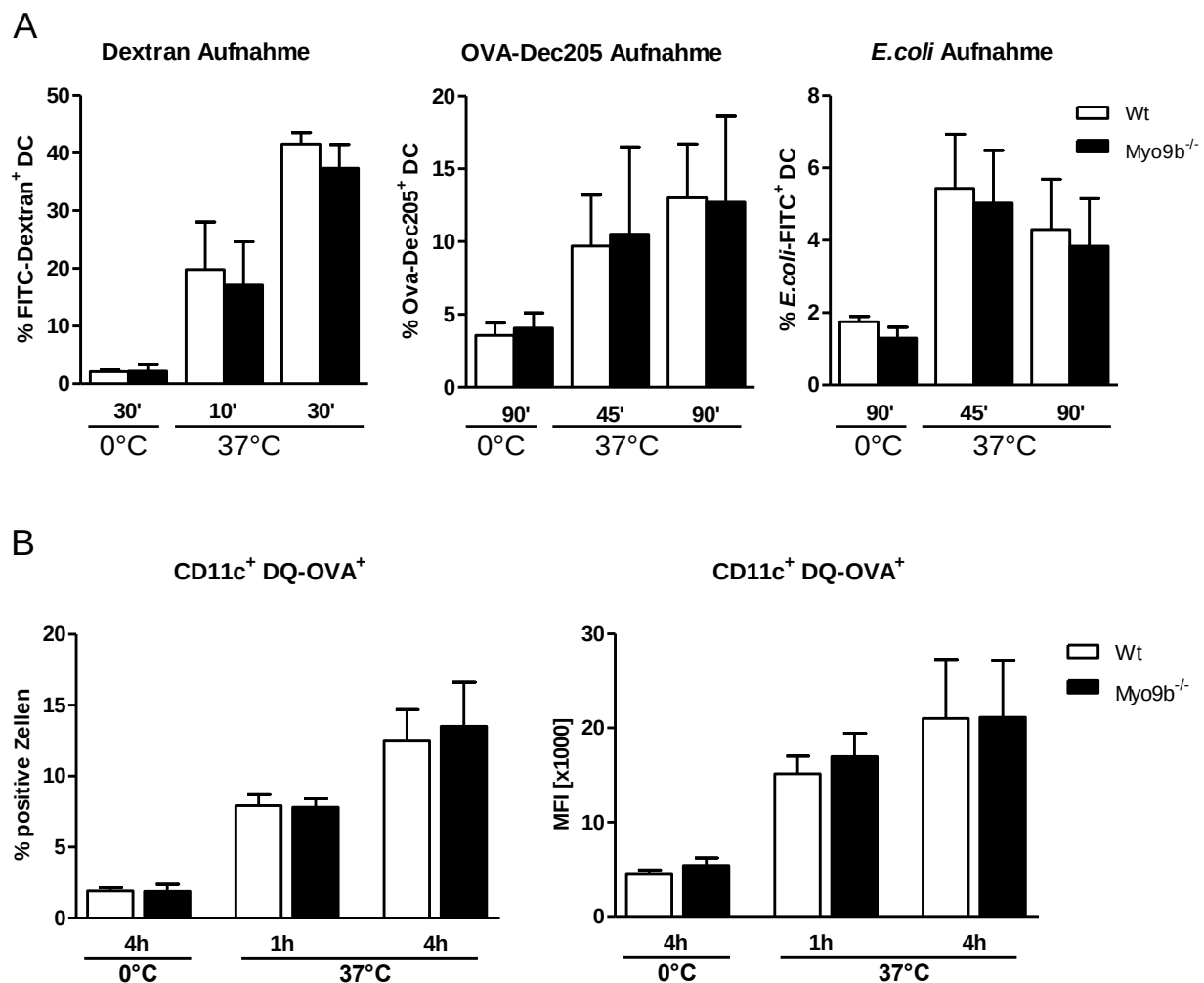
**Abb. 28: *Myo9b*<sup>-/-</sup> und Wt BMDC zeigen keine phänotypischen Unterschiede in der Zellkultur und in der Expression kostimulatorischer Moleküle**

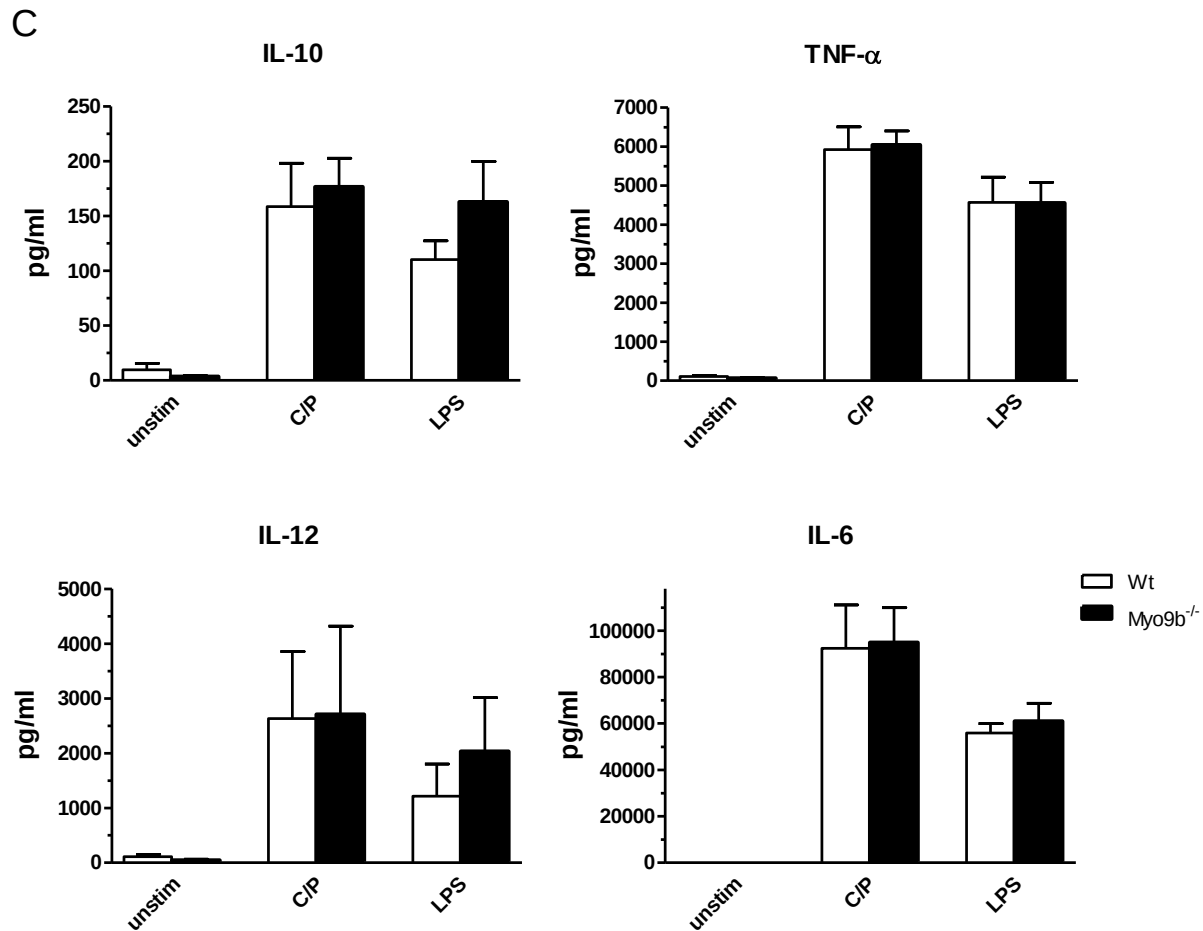
(A) Knochenmarksgenerierte *Myo9b*<sup>-/-</sup> und Wt DC wurden an Tag sieben der Kultur mit anti-CD40 für zwei Tage stimuliert und an Tag neun lichtmikroskopisch analysiert. (B) Durchflußzytometrische Analyse der wie in (A) kultivierten und stimulierten BMDC. Dargestellt sind die Histogramme der auf CD11c vorgegatteten Zellen. Graue Linie: Wt, blaue Linie: *Myo9b*<sup>-/-</sup>. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehr als sieben Versuchen. (Daten S. Pektor und Y. Xu)

Auch die Expression von CD11c, MHCII und kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD54, CD80, CD86) ist zwischen Wt und *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC vergleichbar, wie die durchflußzytometrische Analyse in Abb. 28B zeigt.

### 3.2.4 Antigenaufnahme, Prozessierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC

Da sowohl die Aufnahme, als auch die Prozessierung von Pathogenen sowie die darauffolgende stimulierungsassoziierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine von Komponenten des Zytoskelets abhängig ist (Chhabra and Higgs, 2007; Galletta and Cooper, 2009), wurde als nächstes die Funktion von Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC hinsichtlich dieser Parameter überprüft.





**Abb. 29: Die Aufnahme von Antigenen und die Sekretion von Zytokinen ist in Myo9b-defizienten BMDC nicht beeinträchtigt**

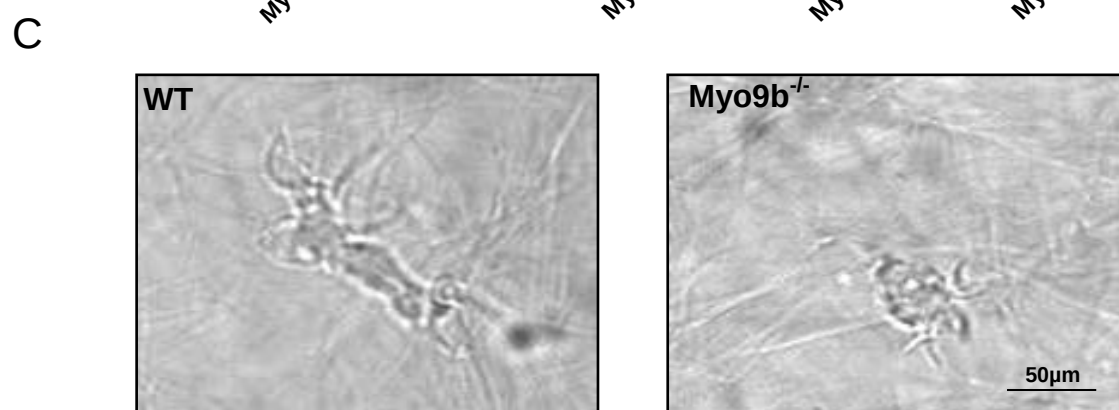
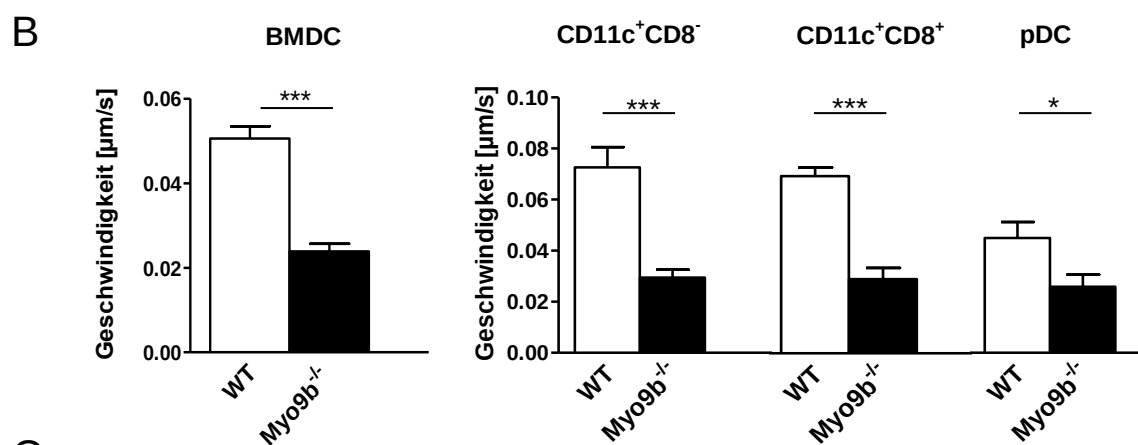
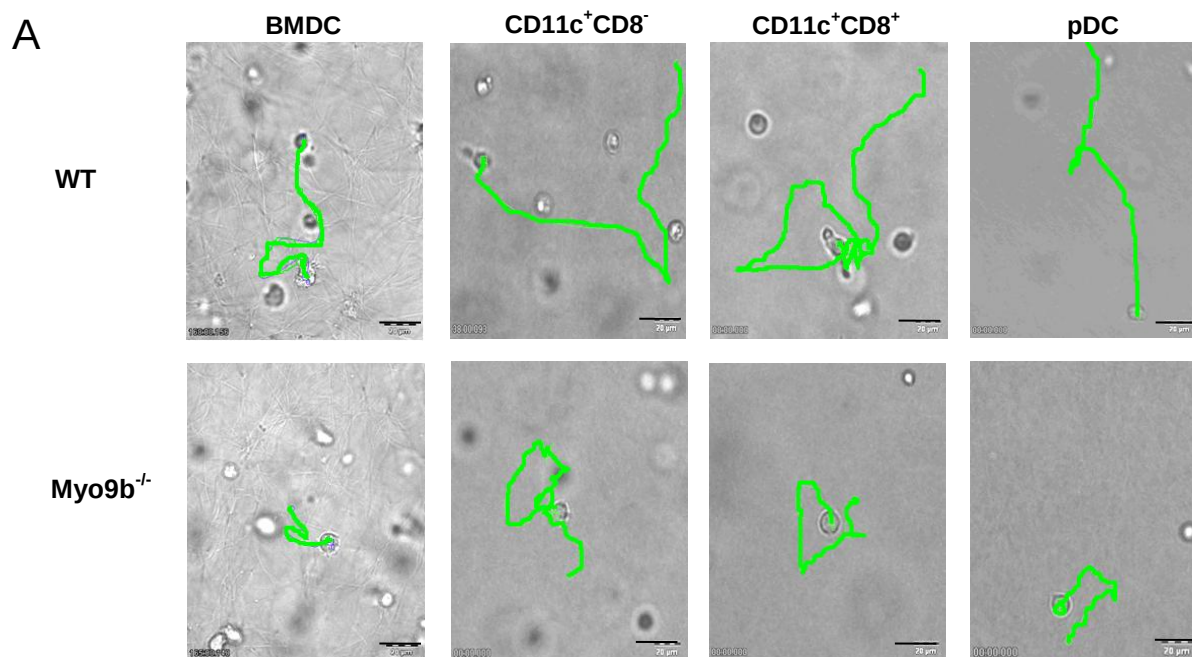
(A) Knochenmarksgenerierte Myo9b<sup>-/-</sup> und Wt DC wurden an Tag sechs mit fluoreszenzgekoppelten *E. coli*, Dextran oder OVA-Dec205-Partikeln bei 37° C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Eine Kontrollgruppe wurde auf Eis gehalten. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die Partikel aufgenommen haben. (B) Wie in (A) nur mit DQ-OVA. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die OVA prozessiert haben. (C) Die Überstände von Tag sieben (unstimuliert) und Tag neun (stimuliert mit CpG + Poly I:C oder LPS) Wt und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC wurden abgenommen und die Zytokinproduktion mittels CBA gemessen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM). (A-B: Daten S. Pektor und Y. Xu; C: Daten S. Pektor)

Wie man Abbildung 29A entnehmen kann, ist der Mechanismus der Antigenaufnahme in den Myo9b-defizienten BMDC nicht verändert. Wt und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC nehmen in gleichem Maße Antigene über die verschiedenen Wege der Endozytose auf. Zum einen über die Rezeptor-vermittelte Endozytose, die durch die Aufnahme von FITC-Dextran (hauptsächlich Rezeptor-vermittelt, aber auch Makropinozytose) und OVA-Dec205 Partikeln repräsentiert wird und zum zweiten für die Makropinozytose (Lanzavecchia, 1996; Sallusto et al., 1995). Auch die Prozessierung aufgenommener OVA-Moleküle durch Myo9b<sup>-/-</sup> und Wt BMDC ist vergleichbar (Abb. 29B). Dies wird anhand der FITC-Expression, die umso stärker

ist, je mehr OVA-Protein proteolytisch abgebaut wird, im FACS sichtbar gemacht. Schaut man sich im Weiteren die auf eine Stimulation mit CpG + Poly I:C oder LPS folgende Sekretion sowohl der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  an, als auch von IL-10 (Abb. 29C), kann man auch in diesem Fall keine Unterschiede zwischen Wt und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC erkennen. Somit scheint Myosin 9b keine tragende Rolle in der Antigenaufnahme und – prozessierung sowie in der Sekretion von Zytokinen zu spielen.

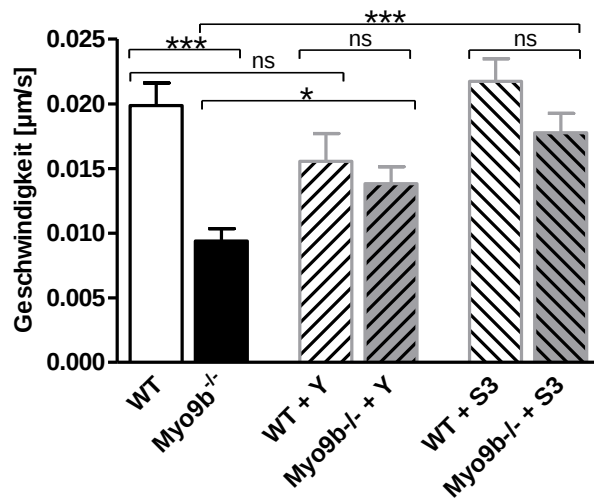
### **3.2.5 Die spontane und gerichtete Migration der Myo9b<sup>-/-</sup> DC in der 3D-Kollagenmatrix ist immens gestört**

Im Hinblick darauf, dass einige morphologie – und migrationsregulierende Moleküle des Rho-Signaltransduktionsweges in Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC verstärkt phosphoryliert vorliegen (RhoA-GTP, p-MLC und p-Cofilin; Abb. 27), wurde in weiteren Experimenten das Migrationsverhalten dieser BMDC untersucht. WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC, sowie konventionelle (CD8<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup>) und plasmazytoide DC aus der Milz wurden immunomagnetisch isoliert und in 3D-Kollagengele eingebettet. Über einen Zeitraum von bis zu 10 Stunden wurden mittels mikroskopischer Lebendzellanalyse die zurückgelegte Wegstrecke (Abb. 30A) sowie die Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 30B) von mehr als 50 DC jeder Population aufgezeichnet. Abbildung 30A zeigt einzelne Migrationspfade der analysierten Zellen in der Kollagenmatrix. Innerhalb des gleichen Beobachtungszeitraums wanderten WT DC deutlich weitere Strecken als Myo9b<sup>-/-</sup> DC. Auch die Migrationsgeschwindigkeit der Myo9b<sup>-/-</sup> DC-Populationen war im Vergleich zu den korrespondierenden WT Zellen signifikant reduziert (Abb. 30B).





D



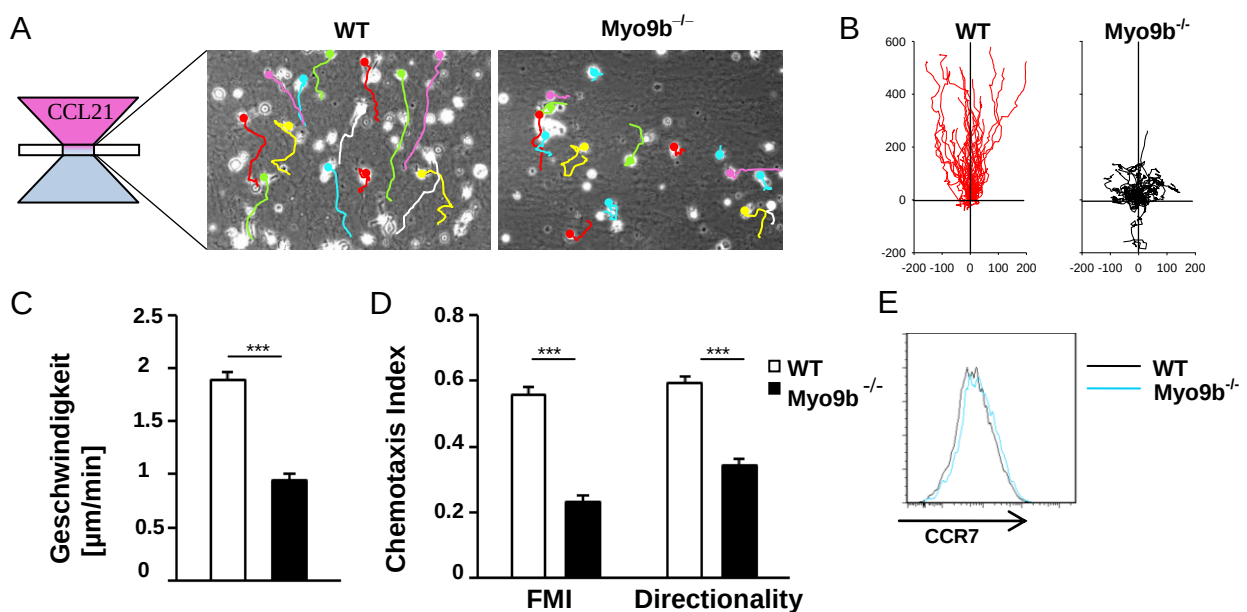
**Abb. 30: Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC, pDC und konventionelle DCs bewegen sich mit deutlich reduzierter Geschwindigkeit durch Kollagengele**

(A-B) Unstimulierte BMDC, plasmazytoide und konventionelle CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> bzw. CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Milz-DCs wurden für 8-10 Stunden in Kollagengelen kultiviert und ihre Mobilität mittels Lebendzellanalyse aufgezeichnet. (A) Einzelne Migrationspfade der analysierten Zellpopulationen sind gezeigt. Der Meßbalken beträgt 70µm. (B) Die Geschwindigkeit von mehr als 50 DCs jeder Sorte wurde gemessen. (C) Stimulierte BMDC in der 3D-Kollagenmatrix mit höherer Vergrößerung, als in (A). (D) Die Migrationsgeschwindigkeit von je 45 stimulierten BMDC ± Y-27632 (ROCK-Inhibitor) und ± S3-Fragment ADF/Cofilin (LIM-Kinase Inhibitor) wurde analysiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (± SEM). (A-C: S. Pektor und Y. Xu; D: S. Pektor)

Schaut man sich stimulierte WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC in der Kollagenmatrix etwas genauer mit einer höheren Vergrößerung an, sieht man bei den WT Zellen die typische elongierte, dendritische Form, wohingegen die Myo9b<sup>-/-</sup>-Zellen in den meisten Fällen eine sphärische Morphologie mit verhältnismäßig kleinen Zellausläufern aufweisen (Abb. 30C).

Um zu testen, welche Auswirkungen eine Hemmung des Rho-Signaltransduktionswegs auf die Migration von reifen BMDC hat, wurde der ROCK Inhibitor Y-27632 in das Gel dazugegeben und wiederum die Migrationsgeschwindigkeit der DC analysiert. Ohne den ROCK-Inhibitor migrieren die reifen WT BMDC signifikant schneller als die stimulierten KO BMDC (Abb. 30D, links). Nach Zugabe des Inhibitors wird die Migrationsgeschwindigkeit der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC auf WT Niveau erhöht (Abb. 30D, Mitte). Die Behandlung der BMDC mit dem Decoy-Peptid S3-Fragment ADF/Cofilin, welches die Phosphorylierung von Cofilin durch Inhibition der LIM-Kinase1 verhindert (Aizawa et al., 2001; Nishita et al., 2002; Heredia et al., 2006), konnte die Migrationsgeschwindigkeit der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC ebenfalls auf die Geschwindigkeit der WT BMDC erhöhen (Abb. 30D, rechts).

Leukozyten migrieren nicht nur spontan, sondern auch in Richtung eines Chemokingradienten. Um den Effekt einer Myo9b-Defizienz auf das gerichtete Migrationsverhalten zu analysieren, wurden stimulierte WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC in einen dünnen Kollagenkanal gefüllt, der an eine mit dem Chemokin CCL-21 gefüllte Kammer angrenzt. Im Folgenden wurden die Zellen, die sich in dem chemotaktischen Feld bewegten, hinsichtlich ihrer Migrationsgeschwindigkeit und Migrationseffizienz (persistente Bewegung in Richtung des Chemokins) analysiert (Abb. 31).



**Abb. 31: Myo9b-defiziente BMDC zeigen keine gerichtete Migration (gestörte Chemotaxis)**

(A) Schematische Darstellung der “ $\mu$ -slide chemotaxis3D chamber”. Die Zellen wurden in eine Kollagenmatrix gegeben, an welche an einer Seite ein Chemokingradient (CCL-21) angelegt wurde. (B) Die Migrationspfade von WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDCs (je 40 Zellen) nach Normalisieren des Startpunktes auf  $x = 0$  und  $y = 0$  sind dargestellt. Die y-Achse zeigt in Richtung des Chemokins. (C) Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit der BMDCs entlang des CCL-21 Gradienten. (D) Quantifizierung des “forward migration index” (FMI) und der “directionality”, als Maß für gerichtete Bewegung der BMDCs entlang des Chemokingradienten (A-D: Y. Xu). (E) FACS-Analyse der CCR7<sup>+</sup> BMDC (E: S. Pektor).

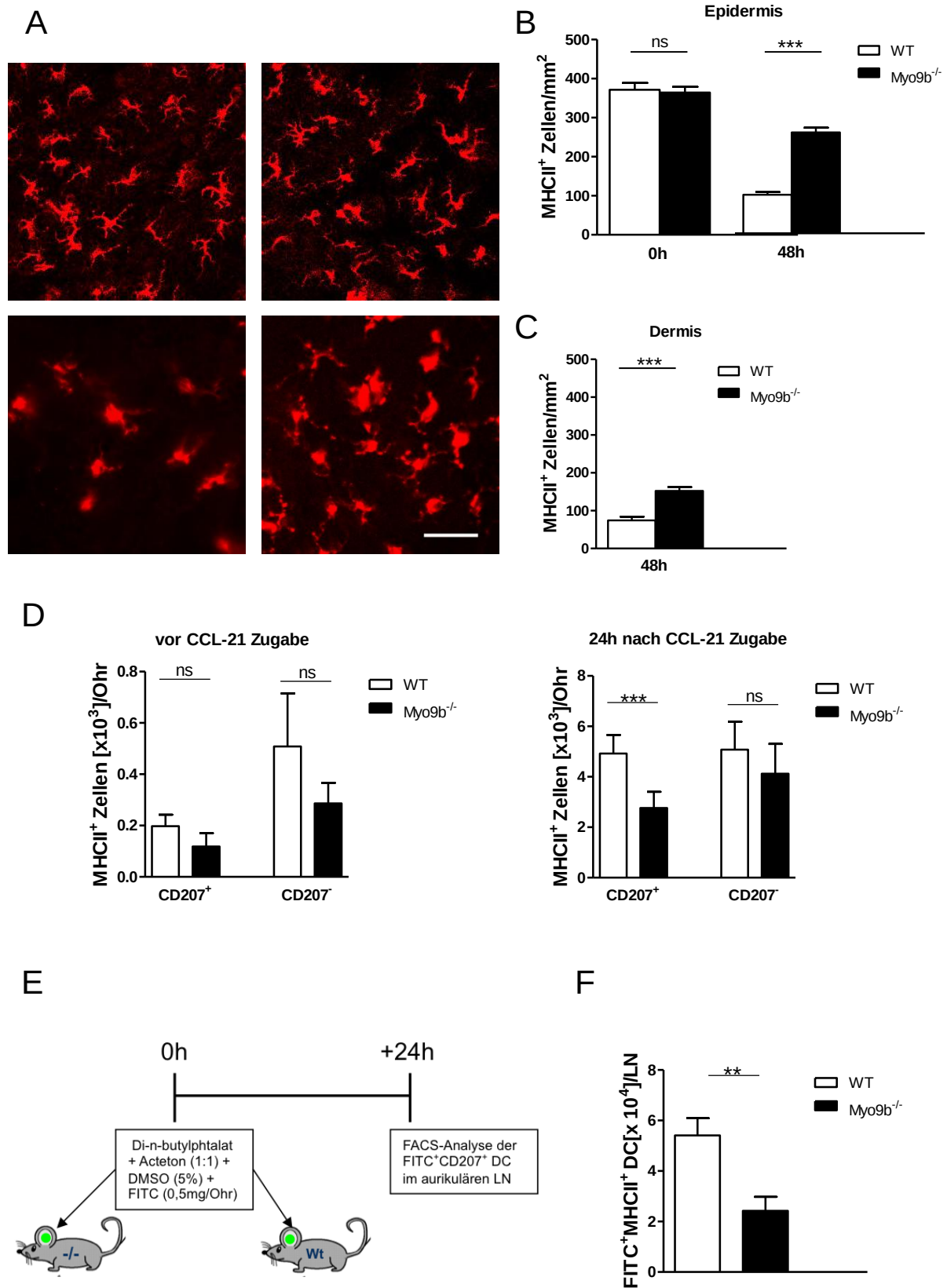
Abbildung 31A zeigt den chematischen Aufbau der Chemotaxis-Kammer und die einzelnen Migrationspfade der analysierten Zellen. Man sieht im Falle der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC eine deutlich geringere Migrationsstrecke, was in Abb. 31B durch Normalisieren aller Migrationsstartpunkte, noch eindeutiger wird. Die Quantifizierung der Migration ergab, dass sich die Myo9b<sup>-/-</sup> DC mit signifikant verringerter

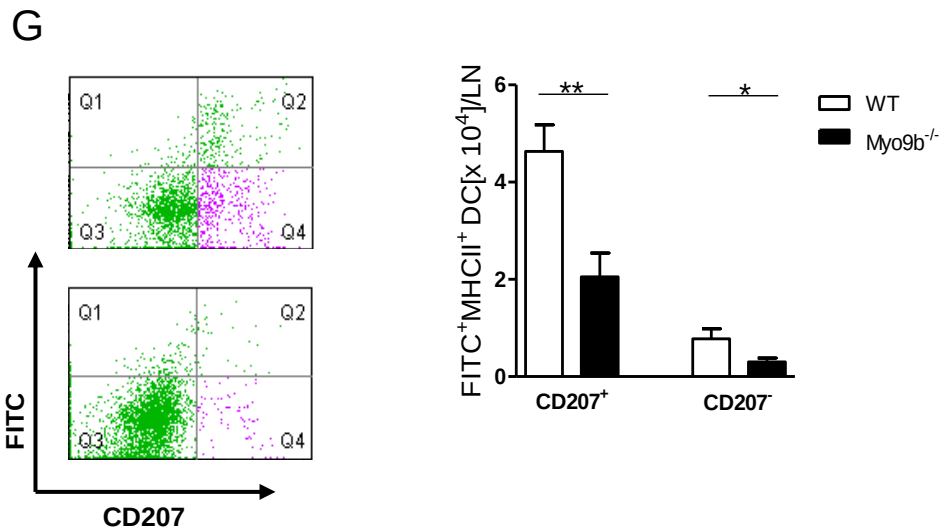
Geschwindigkeit (Abb. 31C) sowie Effizienz (Abb. 31D FMI und Directionality) in Richtung des Chemokins fortbewegten. Um auszuschließen, dass die stark verminderte Chemotaxis auf eine geringere Expression des CCL-21-Rezeptors, CCR-7 zurückzuführen ist, wurde dessen Oberflächenexpression auf WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDCs durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 31E). Die Messung ergab, dass CCR-7 von beiden BMDC in gleichem Maße exprimiert wurde. Myo9b ist somit sowohl für die spontane als auch für die gerichtete DC-Migration essentiell.

### **3.2.6 Die *ex vivo* und *in vivo* Emigration von DC aus der Haut von Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen ist reduziert**

Basierend auf diesen *in vitro*-Daten, die Myo9b eine wichtige Rolle in der DC-Migration zuschreiben, wurde als nächstes die Migrationsfähigkeit kutaner DC *ex vivo* und *in vivo* analysiert. Frisch isolierte Epidermis von WT und Myo9b<sup>-/-</sup> Mausohren war hinsichtlich der Verteilung, Dichte und Gestalt der Langerhans Zellen (LC) vergleichbar (Abb. 32A, obere Reihe und B, links). Um das Emigrationsverhalten der LC aus der Epidermis zu untersuchen, wurden die Ohrhälften mit der dermalen Seite nach unten für 48 Stunden in DC-Medium kultiviert, in welches während der letzten 24 Stunden CCL-21 zugegeben wurde, um die chemotaktische Emigration der DC zu forcieren. Danach wurden wieder die Dichte und Zellgestalt der LC in der Epidermis fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Myo9b<sup>-/-</sup> Epidermis enthielt signifikant mehr LC als die WT Epidermis (Abb. 32A, untere Reihe und 32B, rechts), wohingegen keine Unterschiede in der Zellform zu sehen waren. Im Vergleich zur unbehandelten Epidermis wiesen die LC in beiden Fällen jedoch eine sphärischere Morphologie auf. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis ergab die durchflusszytometrische Messung der ausgewanderten Zellen im Überstand vor der Zugabe von CCL-21 keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Myo9b<sup>-/-</sup> DC-Kultur, jedoch waren in beiden Fällen mehr Langerin<sup>-</sup> als Langerin<sup>+</sup> DC in der Kultur zu finden (Abb. 32D, links). Nach Zugabe von CCL-21 waren im Vergleich zum WT in den Myo9b<sup>-/-</sup> Ohrenkulturen eine signifikant reduzierte Anzahl an Langerin<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC vorhanden. Die Anzahl an Langerin<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup> DC im Überstand der Myo9b<sup>-/-</sup>-Kultur war nur moderat reduziert (Abb. 32D, rechts). Neben der Epidermis wurde auch die Emigration von DC aus der Dermis untersucht. Dieser

Versuch ergab ebenfalls eine geringere Auswanderungsrate von MHCII<sup>+</sup> dermalen Myo9b<sup>-/-</sup> DC (Abb. 32C).





**Abb. 32: Reduzierte *ex vivo* und *in vivo* Emigration von DC aus der Ohrhaut von Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen**

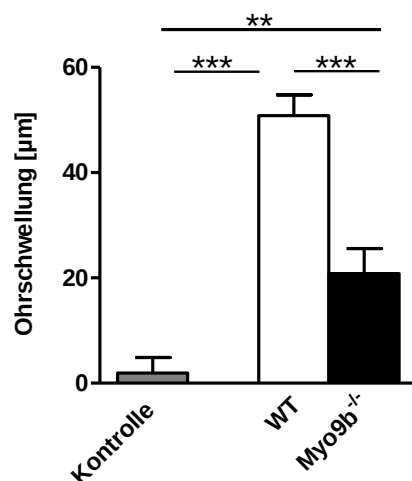
(A) Verteilung und Zellmorphologie von LC in unbehandelter Epidermis (oberes Panel) und nach 48 Stunden *ex vivo* Kultur (24 Stunden + CCL-21; unteres Panel). Fluoreszenzmikroskopische Analyse durch Anfärben der Epidermispräparate mit anti-MHCII Antikörper (rot). Der Maßbalken beträgt 100µm. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Vorgehensweise. (C) Quantifizierung der in der Dermis verbliebenen DC. (D) Durchflusszytometrische Quantifizierung der emigrierten MHCII<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> und MHCII<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup> DC aus der Haut vor und nach CCL-21 Gabe. (E) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Kontaktsensibilisierung. (F) Anzahl der FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> kutanen DC im drainierenden aurikulären LN 24 Stunden nach FITC Sensibilisierung. (G) Gating-Strategie und Anzahl der FITC<sup>+</sup> CD207<sup>+</sup> und FITC<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup> Subpopulationen im drainierenden LN 24 Stunden nach FITC Sensibilisierung. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen (± SEM). (S. Pektor und Y. Xu)

Im Folgenden wurde die *in vivo* Migration kutaner DC in einem Kontakt-Sensibilisierungsmodell (Kripke et al., 1990) analysiert. Dabei wurde die Ohrhaut von WT und Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer FITC-Lösung (in Di-butylphthalat und Aceton gelöst) bestrichen und 24 Stunden später der Anteil an immigrierten FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC im drainierenden LN durchflusszytometrisch bestimmt. In Übereinstimmung mit der beeinträchtigten *ex vivo*-Migration der Myo9b<sup>-/-</sup> DC aus Hautexplantaten, war die Anzahl der FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC im drainierenden LN von Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger als in den LN der WT Mäuse (Abb. 32F). Die Migration der Langerin<sup>+</sup> DC (beinhalten LC und CD207<sup>+</sup> dermale DC) und der Langerin<sup>-</sup> DC innerhalb der FITC<sup>+</sup> Population war dabei in etwa gleichem Ausmaß beeinträchtigt, wobei sowohl in WT als auch in Myo9b<sup>-/-</sup>-Mäusen der Anteil an immigrierten Langerin<sup>-</sup> DC deutlich niedriger lag, als der Langerin<sup>+</sup> DCs. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Myo9b eine Schlüsselrolle in der Emigration

aktivierter DC aus der Haut einnimmt, wobei die Immigration von LC-Vorläufern in die Haut unbeeinträchtigt von Myo9b bleibt.

### 3.2.7 Myo9b<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln eine reduzierte CHS auf TNCB

Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Migrationsdaten suggerierten, dass Myo9b eine tragende Rolle bei der Ausbildung einer kutanen Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion übernehmen könnte, da epidermale LC und dermale DC essentiell an der Prozessierung von Allergenen und der Stimulation hapten-spezifischer T-Zellen beteiligt sind (Kripke et al., 1990; Bennett et al., 2005; Bennett et al., 2007). Nach Applikation des Kontaktallergens TNCB auf die Ohren von WT und Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen entwickelten letztere eine signifikant geringere Ohrschwellung als die WT Mäuse (Abb. 33).



**Abb. 33: Schwächere Ohrschwellung auf TNCB in Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen**

Messung der Ohrschwellung (µm) von WT and Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sensibilisierung und Challenge mit TNCB. Dargestellt ist der Mittelwert (± SEM) von zwei unabhängigen Versuchen mit sechs Mäusen pro Gruppe. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (unpaired *t*-test) (S. Pektor).

### 3.2.8 Die Interaktion zwischen Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist verändert

Die Ausbildung der IS geht einher mit einer Umlagerung des Cytoskelets. Wie bereits gezeigt wurde, wird Rho-GAP Myo9b für die Aus- und Rückbildung von Membranausstülpungen und die Vorwärtsbewegung von Makrophagen benötigt (Hanley et al., 2010). Infolge des überaktiven Rho-Signallings (Abb. 27) und des ausgeprägten Migrationsdefektes von Myo9b<sup>-/-</sup> DC (Abb. 30, 31 und 32) kam die

Frage auf, ob und in welchem Maße diese DC fähig sind, eine organisierte IS auszubilden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Anzahl und Dauer der Kontakte von BMDC mit transgenen  $CD4^+$  T-Zellen über einen Zeitraum von ca. 10 Stunden in einer 3D-Kollagenmatrix quantifiziert. Die durchschnittliche Anzahl an T-Zellen, die eine  $Myo9b^{-/-}$  DC kontaktierten (Mittelwert: 3,4 TC/DC) war signifikant geringer im Vergleich zu den WT DC/T-Zell-Kokulturen (Mittelwert: 7,5; Abb. 34A). Überraschenderweise war die Kontaktzeit zwischen  $Myo9b^{-/-}$  DC und T-Zellen (Median: 27 min) signifikant länger als mit WT DC (Median: 8 min), wenn der Kontakt erst einmal hergestellt war (Abb. 34B). Dieser Unterschied war das Ergebnis einer stark erhöhten Anzahl an langen  $Myo9b^{-/-}$  DC/T-Zell-Kontakten, die 3 mal so lang waren, wie der Median zwischen WT DC und T-Zellen (Abb. 34C).

Aufgrund der ausgeprägten Kolo­kalisierung von  $Myo9b$  mit F-Aktin (Abb. 4) wurde auch die F-Aktin-Verteilung in der IS zwischen WT oder  $Myo9b^{-/-}$  BMDC und T-Zellen analysiert. Interessanterweise konnte zwischen WT BMDC und T-Zellen eine höhere Akkumulation von F-Aktin im synaptischen Spalt festgestellt werden, als zwischen  $Myo9b^{-/-}$  DC und T-Zellen (Abb. 34D), was auch anhand des MFIs quantifiziert werden konnte (Abb. 34E).

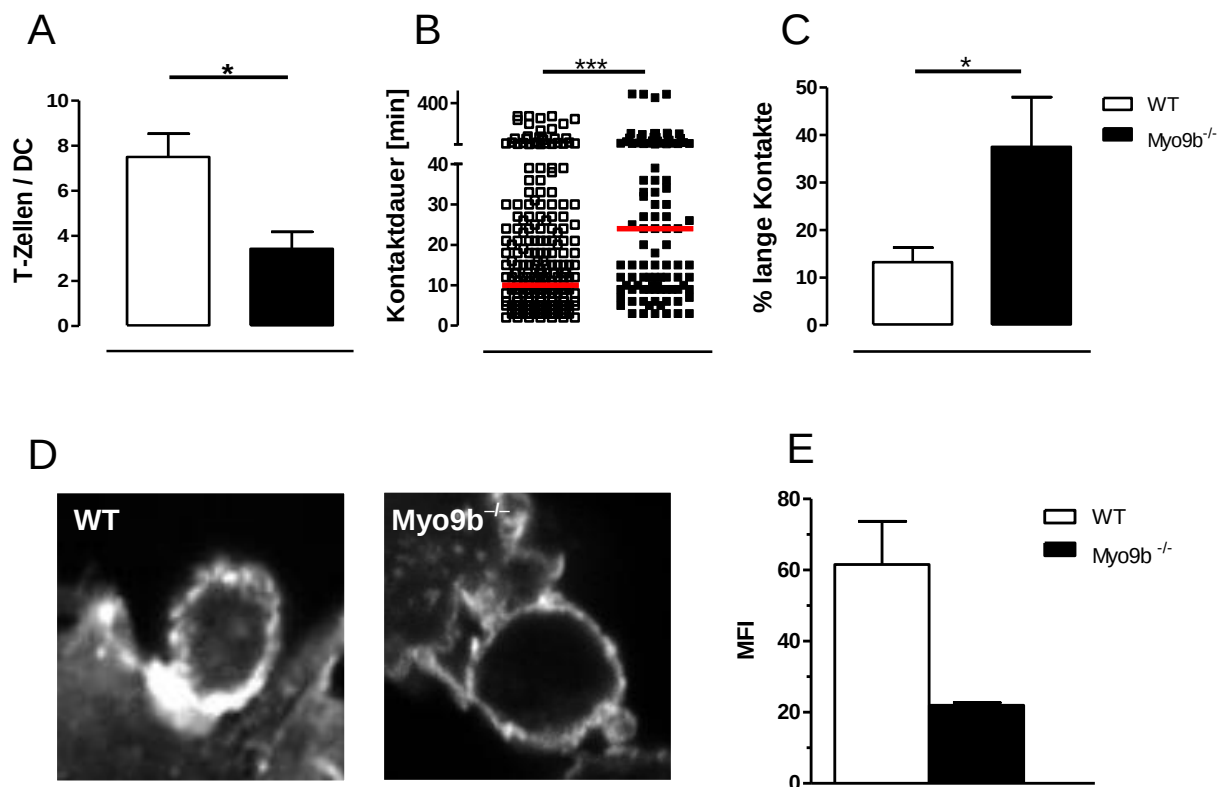


Abb. 34: Veränderte Interaktion von  $Myo9b^{-/-}$  BMDC mit  $CD4^+$  T-Zellen

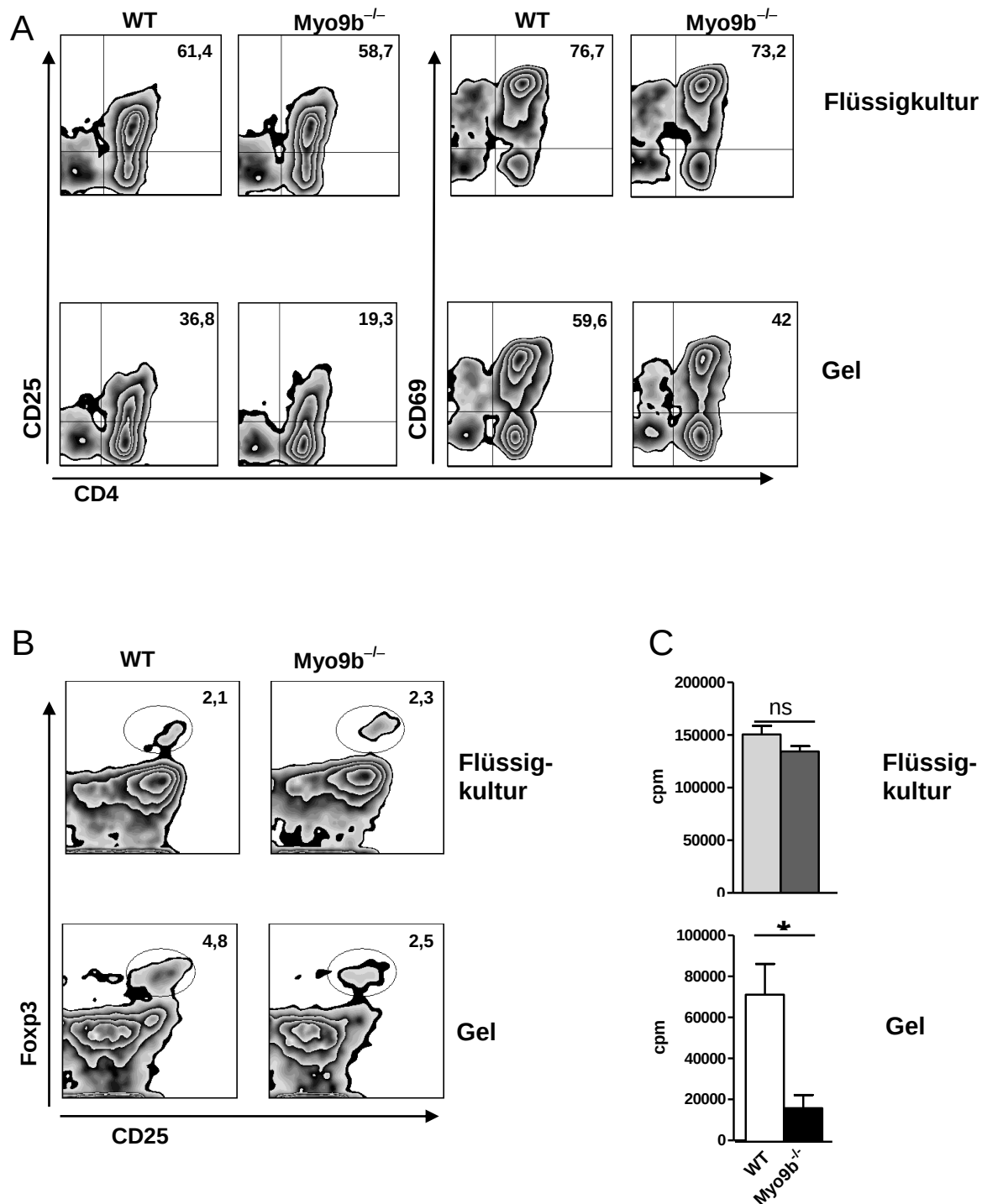
(A) Anzahl der CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen, die im Kollagengel mit einer stimulierten, OVA-Peptid beladenen BMDC interagieren (B) Kontaktdauer und (C) Prozentsatz an langen Kontakten. 100-250 Kontakte wurden über Nacht pro Gruppe mittels Lebendzellmikroskopie aufgenommen. (B) Die rote Linie zeigt die mediane Kontaktzeit an (10-24 min). (C) Kontakte zwischen BMDC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die länger als der 3-fache Median der Kontaktdauer zwischen WT BMDC und T-Zellen anhielten, wurden als lange Kontakte definiert und sind in Prozent angegeben. Gezeigt sind die Daten von zwei unabhängigen Versuchen. (A), (C) und (E) sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. (D) Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von F-Aktin mittels TexasRed-Phalloidin in der IS. (E) Quantifizierung der F-Aktin-Färbung in der IS. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  \*\*\*,  $P < 0.001$ . (S. Pektor und Y. Xu)

### **3.2.9 Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC sind schwache Stimulatoren von T-Zellaktivierung und –proliferation in einer 3D Umgebung**

Stimulierte Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC zeigten im Durchflusszytometer gegenüber WT BMDC einen unveränderten Phänotyp (Abb. 28B), aber im Hinblick auf ihre reduzierte Migrationsfähigkeit und ihre veränderte Interaktion mit antigenspezifischen T-Zellen, erhob sich die Frage, ob diese DC T-Zellen genauso effizient wie WT DC aktivieren können.

Um zu analysieren, in welchem Ausmaß T-Zellen durch Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC aktiviert werden können, wurden verschiedene T-Zellaktivierungsmarker 24 Stunden (48 und 72 Stunden; nicht gezeigt) nach Beginn der Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. In der Flüssigkultur konnten keine DC-genotypenabhängigen Unterschiede in der Expression von CD25 und CD69 (Abb. 35A) sowie von Foxp3 (Abb. 35B) in den jeweils kokultivierten T-Zellen festgestellt werden, wohingegen die Expression dieser Moleküle in einer 3D-Kollagenmatrix stärker ausfiel, wenn WT BMDC als Stimulatoren eingesetzt wurden.



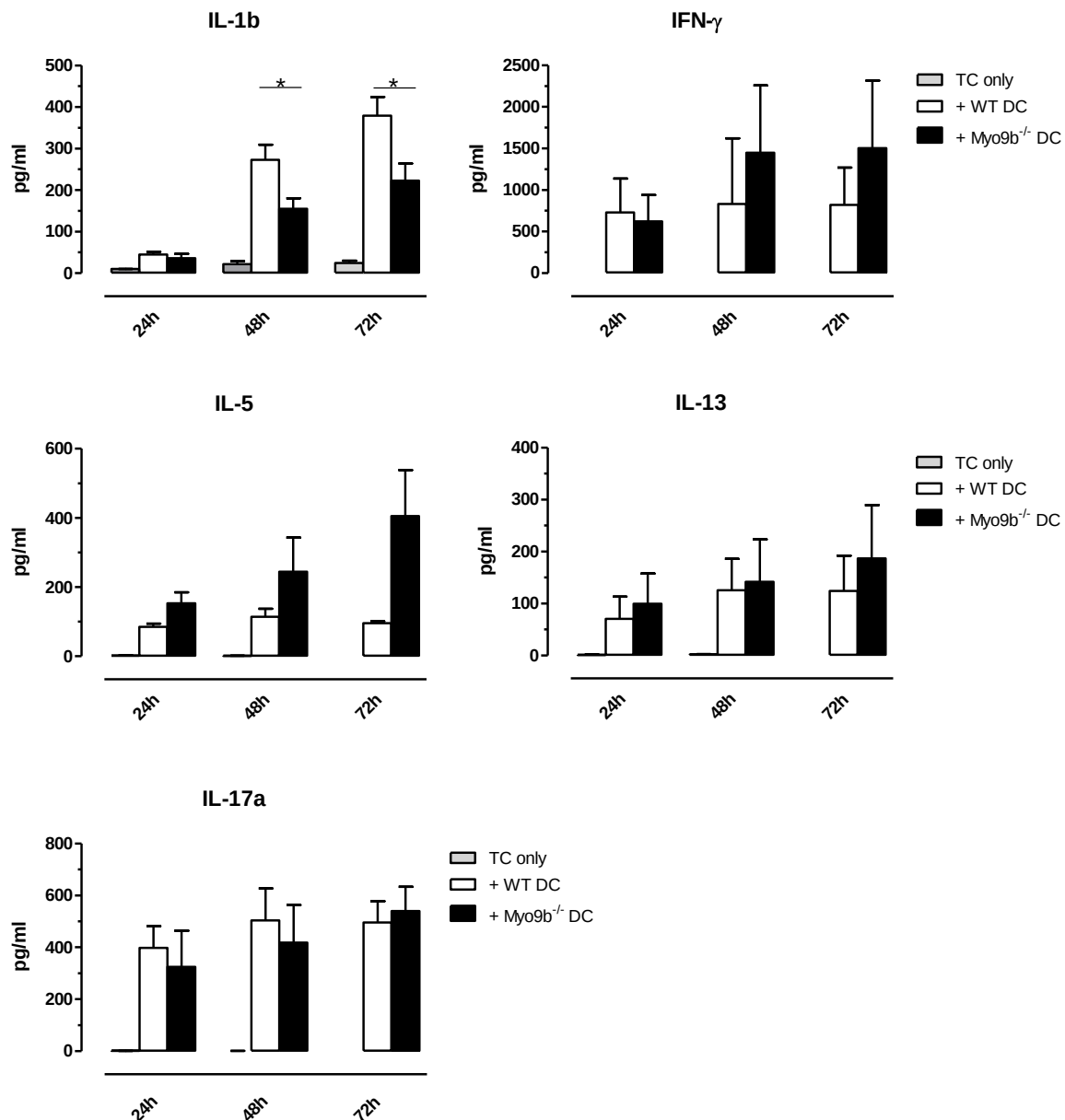


**Abb. 35: Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC induzieren eine geringere T-Zellaktivierung in Kollagengelen**

(A+B) WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC wurden mit CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in Flüssigkultur und in Kollagengelen kokultiviert. 24 Stunden später wurden die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 (A) sowie Foxp3 (B) durchflusszytometrisch analysiert. (C) Die Proliferation der OT-II-CD4<sup>+</sup> T-Zellen, kokultiviert mit BMDC in Flüssigkultur (oben) oder in Kollagengelen (unten), wurde durch den Einbau von radioaktivem [<sup>3</sup>H] Thymidin an Tag 3 gemessen. Je ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. (A+B: S. Pektor; C: S. Pektor und Y. Xu)

Weiterhin wurde auch das Zytokinprofil in Überständen von DC/T-Zell Flüssigkulturen gemessen (Abb. 36). Th1-Zytokine betreffend wurde IL-1 $\beta$  stärker in WT DC/T-Zell-

Kokulturen gebildet, während die Produktion von IFN- $\gamma$  in den Myo9b<sup>-/-</sup> DC/T-Zell-Kokulturen tendenziell erhöht war. Das Th2-Zytokin IL-5 wurde vermehrt von T-Zellen gebildet, die mit Myo9b-defizienten BMDC kokultiviert wurden und IL-13 in etwa gleich. IL-17 wurde ebenfalls vergleichbar stark sezerniert (Abb. 36).

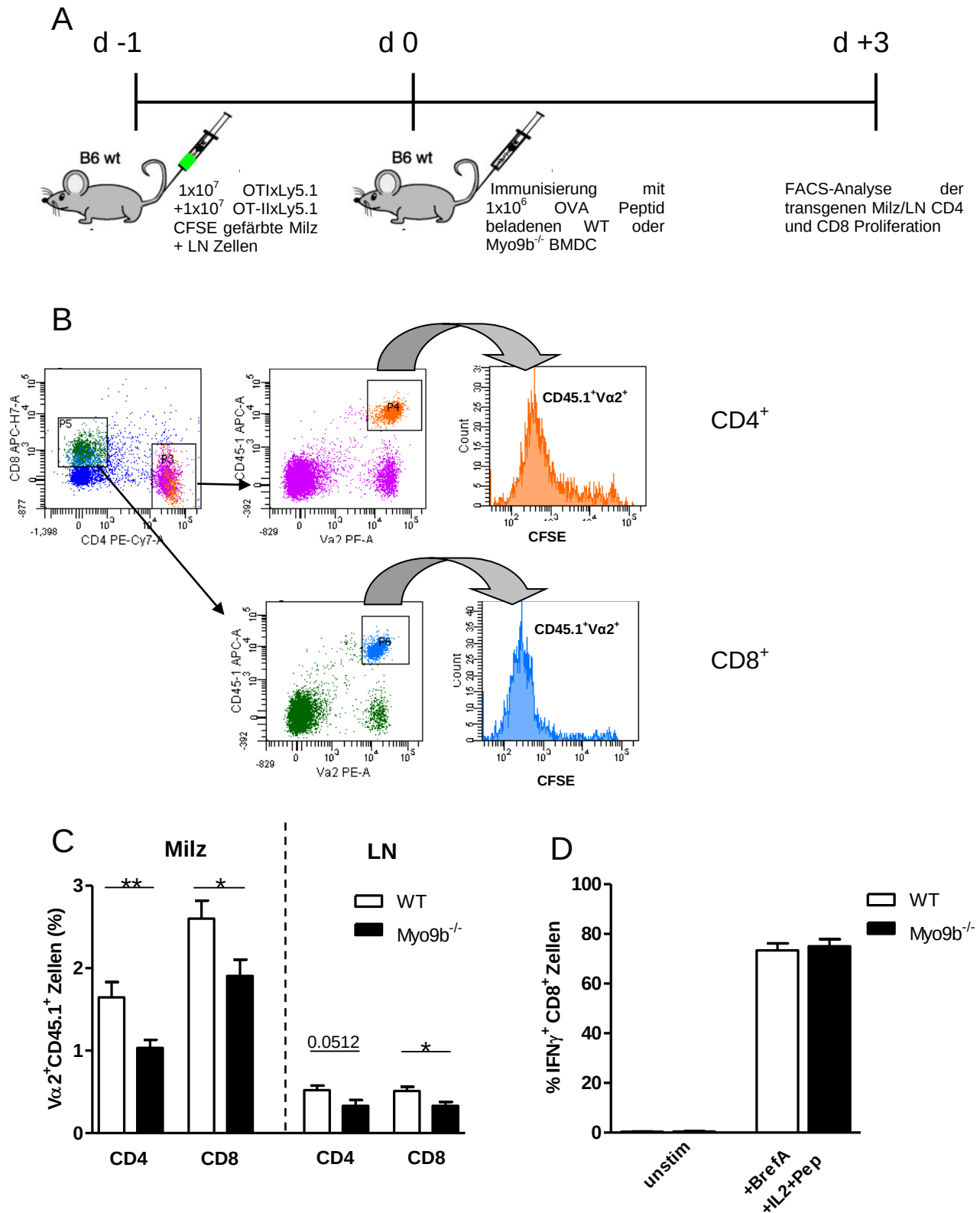


**Abb. 36: Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC induzieren ein anderes Zytokinprofil in T-Zellen als WT BMDC**

WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC wurden mit CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in Flüssigkultur kokultiviert. Die Sekretion von TH1/TH2 Zytokinen wurde mittels CBA zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus 2-3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung vom Mittelwert ( $\pm$  SEM). (S. Pektor)

Im Hinblick auf die Myo9b- abhängigen Veränderungen in der DC/T-Zellinteraktion und das veränderte T-Zell Zytokinprofil, wurde im Folgenden die Fähigkeit von

Myo9b-defizienten BMDC analysiert, T-Zellproliferation zu induzieren. Interessanterweise war die nach drei Tagen gemessene OT-II Proliferation in Flüssigkultur vergleichbar (Abb. 35C, oben), wohingegen die Proliferation im Kollagengel signifikant reduziert war, wenn Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC als Stimulatoren eingesetzt wurden anstatt WT BMDC (Abb. 35C, unten).



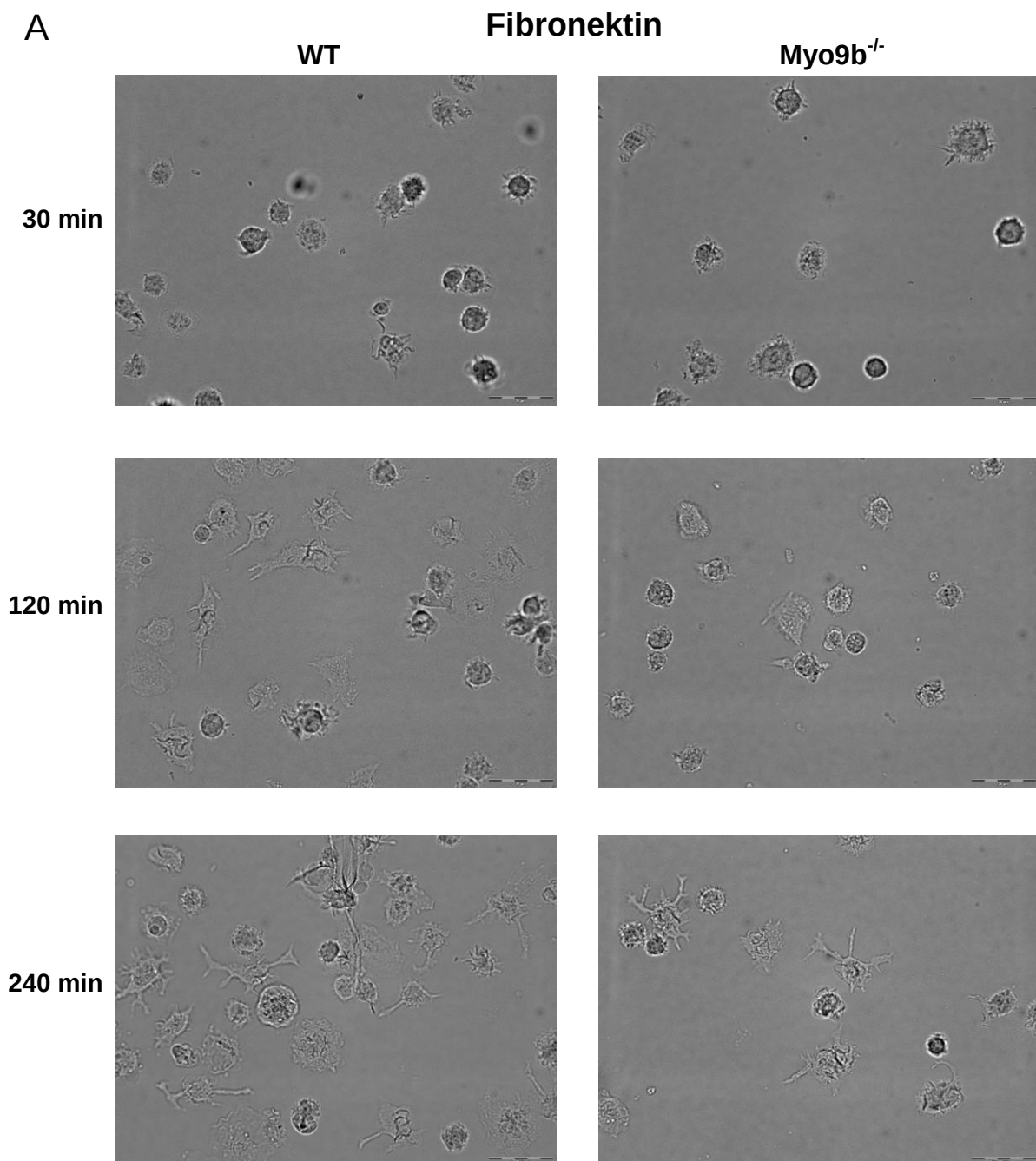
**Abb. 37: Reduzierte *in vivo* T-Zellproliferation durch Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC**

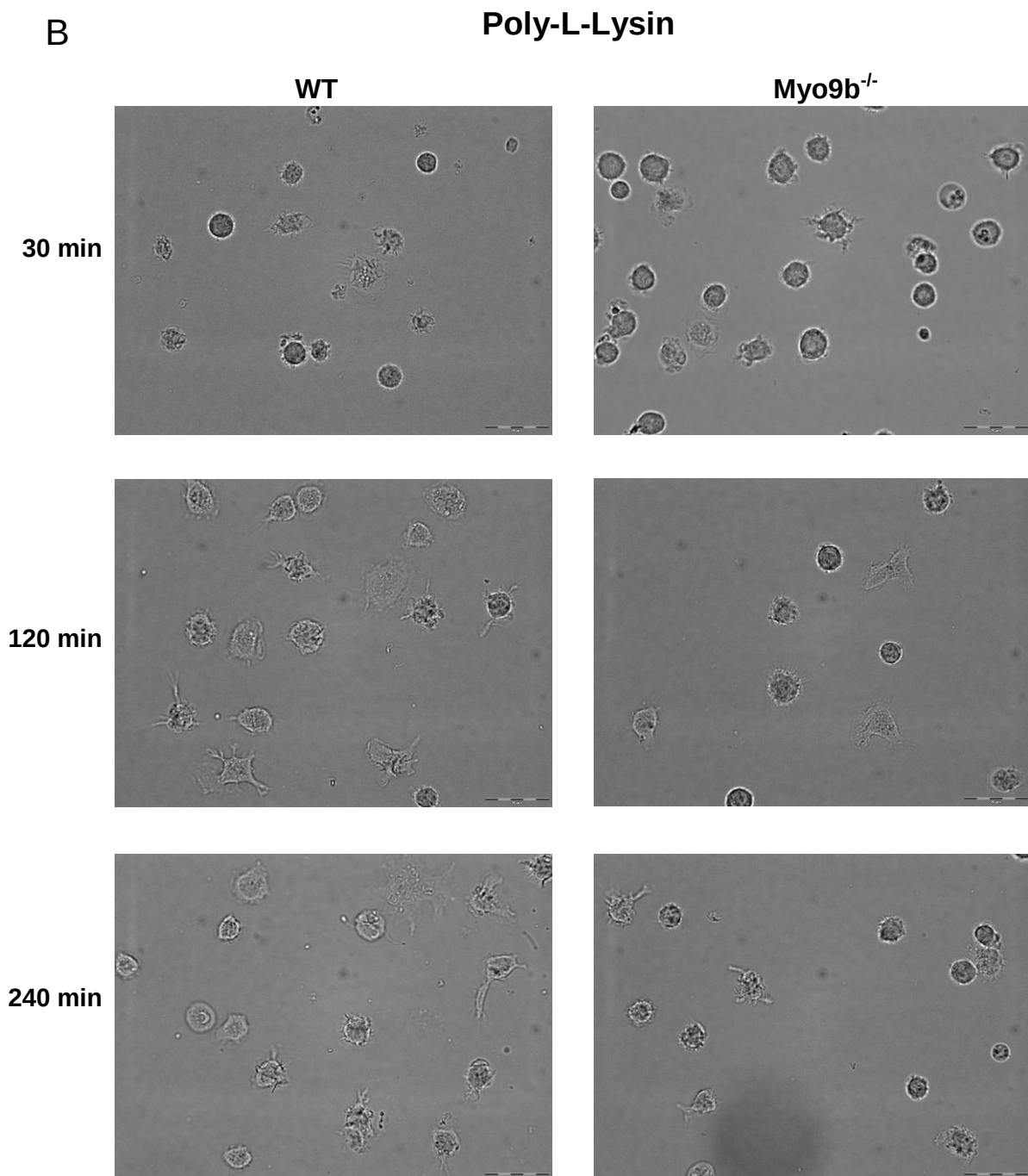
(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des adoptiven Transfers zur Messung der *in vivo* Proliferation. (B) Gating-Strategie und (C) Prozentsatz der proliferierten Vα2<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und LN 3 Tage nach Immunisierung. (D) Prozentsatz der IFN-γ produzierenden, proliferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung vom Mittelwert (± SEM). (S. Pektor und Y. Xu)

Da die Umgebung in einer 3D-Kollagengelmatrix der *in vivo*-Situation ähnelt, wurde als nächstes die Proliferation transgener T-Zellen *in vivo* in einem adoptiven Transfermodell analysiert (Abb. 37A). In Übereinstimmung mit den *in vitro*-Ergebnissen im Kollagengel, fiel die Proliferation CFSE-markierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in C57BL/6 Mäuse injiziert wurden, nach Immunisierung mit OVA-Peptid beladenen BMDC in Milz und LN geringer aus, wenn Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC zur Immunisierung benutzt wurden (Abb. 37B und C). In der IFN-γ-Produktion der restimulierten, proliferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden keine Unterschiede zwischen Mäusen, die mit WT oder Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC immunisiert wurden, gefunden (Abb. 37D). Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC sind demnach *in vitro* in Flüssigkultur, in ihrer Kapazität, naive T Zellen zu stimulieren unbeeinträchtigt, aber *in vitro* und *in vivo*, wenn das T-Zellpriming migratorische Aktivität der DCs benötigt, induzieren sie eine geringere T-Zellproliferation.

**3.2.10 Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC : Adhäsion an die extrazelluläre Matrix**

Im Folgenden sollte getestet werden, inwieweit Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC an die extrazelluläre Matrix adhären können. Zu diesem Zweck wurden Glasobjektträger entweder mit Fibronectin oder mit Poly-L-Lysin beschichtet und dann jeweils 1x10<sup>5</sup> immature BMDC für unterschiedlich lange Zeiträume im Brutschrank inkubiert. Danach wurden nicht anhaftende Zellen abgespült und die auf dem Objektträger verbliebenen BMDC fixiert. Nach 30 min konnte man sowohl bei Fibronectin als auch bei Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern keine Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit von WT und Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC. Wenn man sich hingegen die 120 und 240 min Werte betrachtet, konnte man sowohl für Fibronectin als auch für Poly-L-Lysin deutliche Unterschiede feststellen: In beiden Fällen blieb eine höhere Anzahl von WT DC auf dem jeweiligen Substrat haften, als von den Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC. Darüber hinaus entwickelten die WT DC eine dendritischere Morphologie als die Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC (Abb. 38A und B).



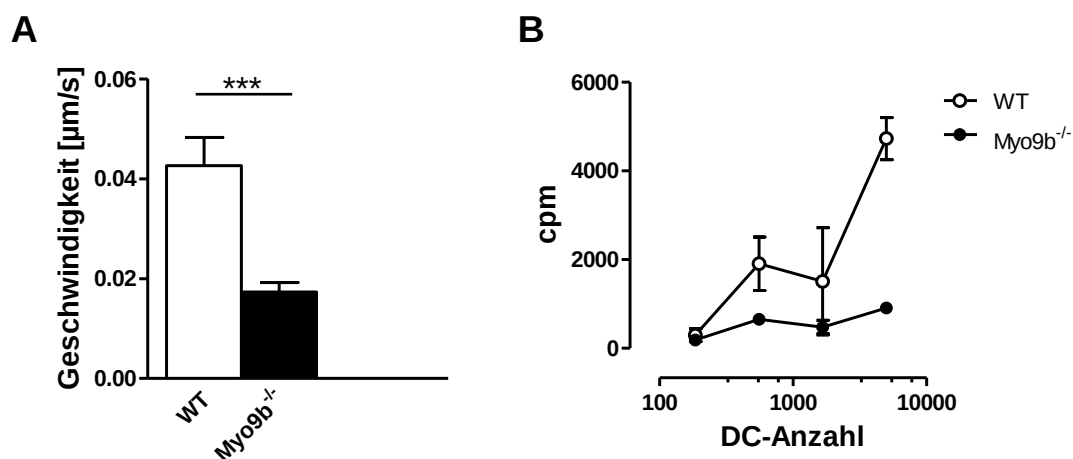


**Abb. 38: Die Adhäsion von Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC an die extrazelluläre Matrix ist gestört.**

1x10<sup>5</sup> iBMDC wurden auf Objektträger gegeben, die mit Fibronectin (A) oder mit Poly-L-Lysin (B) beschichtet wurden und 30, 120 und 240 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellmorphologie und Zelldichte durchlichtmikroskopisch begutachtet. (S. Pektor)

### 3.2.11 Myo9b<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen: Migration und Proliferation in der 3D-Kollagenmatrix

Neben Makrophagen und dendritischen Zellen wird Myosin9b auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (Y. Xu, 2011). Es war demnach auch von Interesse zu untersuchen, welche Rolle Myo9b in diesem Zelltyp spielt. Wie zuvor bei den DC wurde hier als funktioneller Parameter die Migration und die Proliferation von aus LN isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kollagengel analysiert. Obwohl Myo9b in CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu DC viel schwächer exprimiert wird, war die Migrationsgeschwindigkeit der KO T-Zellen im Vergleich zu den WT T-Zellen signifikant reduziert (Abb. 39A). In einer MLR mit allogenen Balb/c BMDC zeigte sich, dass die Myo9b<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kollagengel eine geringere Proliferation aufweisen, als WT T-Zellen (Abb. 39B). Dies legt den Schluss nahe, dass Myosin9b nicht nur wichtig ist bei der Zellmigration und beim Priming von naiven T-Zellen, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und/oder T-Zellaktivierung übernimmt.

**Abb. 39: Myo9b<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewegen sich langsamer und proliferieren schlechter.**

(A) 3x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Kollagengelen resuspendiert und über Nacht mittels Lebendzellanalyse beobachtet. Die Geschwindigkeit von mehr als 40 T-Zellen wurde anhand der totalen Wegstrecke berechnet. (B) WT und Myo9b<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit allogenen Balb/c BMDC in Kollagengelen kokultiviert. Am Tag 5 wurde die T-Zellproliferation mittels [<sup>3</sup>H] Thymidineinbau bestimmt. Daten von zwei unabhängigen Versuchen sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. \*\*\*, P < 0.001. (S. Pektor)

### 3.3 Rolle von LFA-1

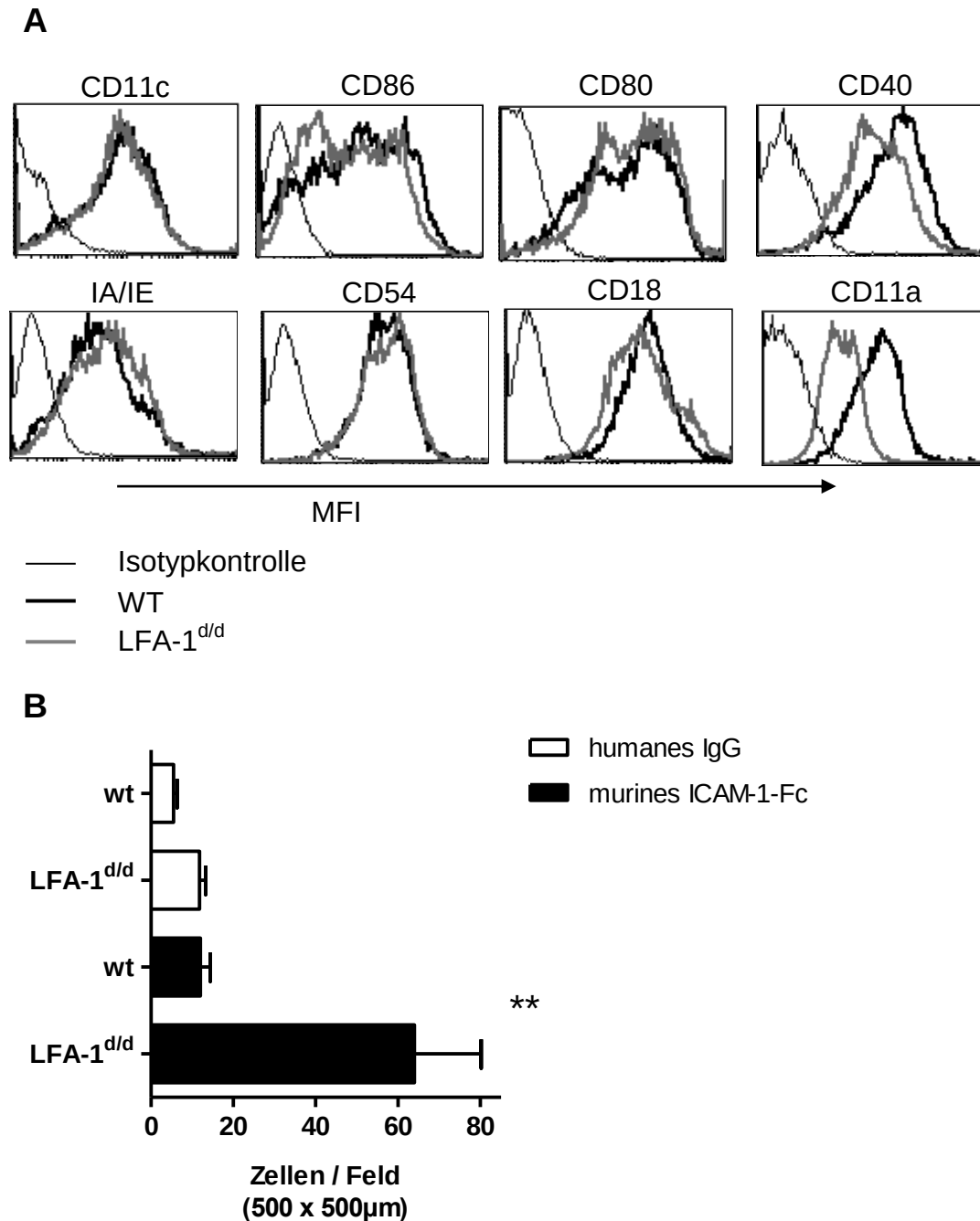
LFA-1 wird normalerweise in einer inaktiven Form auf der DC-Oberfläche exprimiert. Unter Verwendung von LFA-1<sup>d/d</sup> Mäusen wurde in diesem Projekt die Rolle von konstitutiv aktivem LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) auf DC untersucht. In diesen Mäusen wurde durch Deletion der hochkonservierten GFFKR-Sequenz in der  $\alpha_L$ -Kette der zytoplasmatischen Domäne des Moleküls (Schema zur Generation der LFA-1<sup>d/d</sup> Mäuse siehe Anhang Abb. 48) eine Unterbrechung der Interaktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit verursacht, was zur konstitutiven Aktivierung des Integrins führt (Kim et al., 2003; Lu and Springer, 1997; Lu et al., 2001, Semmrich et al., 2005). Dieses Projekt wurde in Kooperation mit S. Balkow und M. Laschinger durchgeführt und 2010 in Blood publiziert.

#### 3.3.1 Aktives LFA-1 vermittelt die Adhäsion Dendritischer Zellen an ICAM-1

Zur Immunphänotypisierung der BMDC wurde die Expression typischer Maturierungsmarker stimulierter WT und LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression von CD40, 80 und 86, sowie von MHCII und CD54 war zwischen den beiden BMDC-Gruppen vergleichbar (Abb. 40A). In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen an LFA-1<sup>d/d</sup> T-Zellen (Semmrich et al., 2005), war die Expression von CD11a auf den LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC im Vergleich zu den WT BMDC reduziert.

Um zu testen, ob LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC prinzipiell in der Lage sind, aktives LFA-1 zu nutzen, um an ICAM-1 zu binden, wurde ein Adhäsionstest an immobilisiertes rekombinantes ICAM-1-Fc durchgeführt. Während nur wenige WT DC an ICAM-1 haften blieben, führte die Expression von konstitutiv aktivem LFA-1 auf LFA-1<sup>d/d</sup> DC zu einer signifikant gesteigerten Zelladhäsion (Abb. 40B).



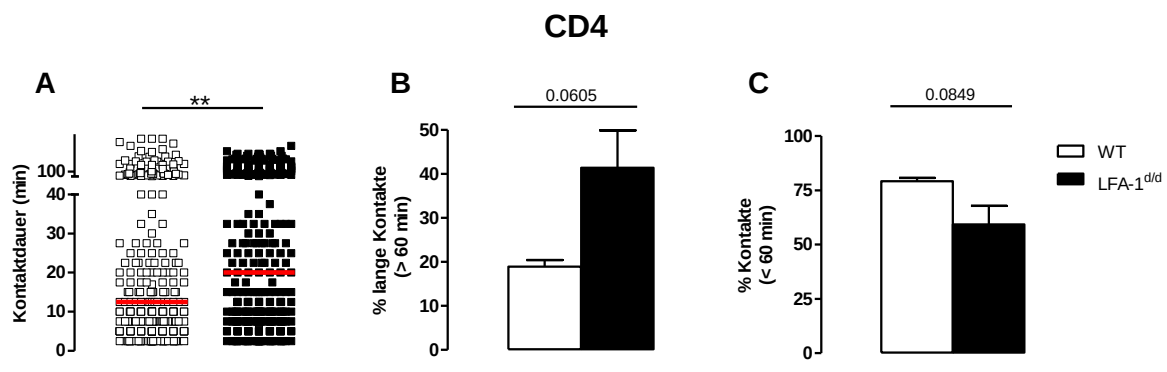


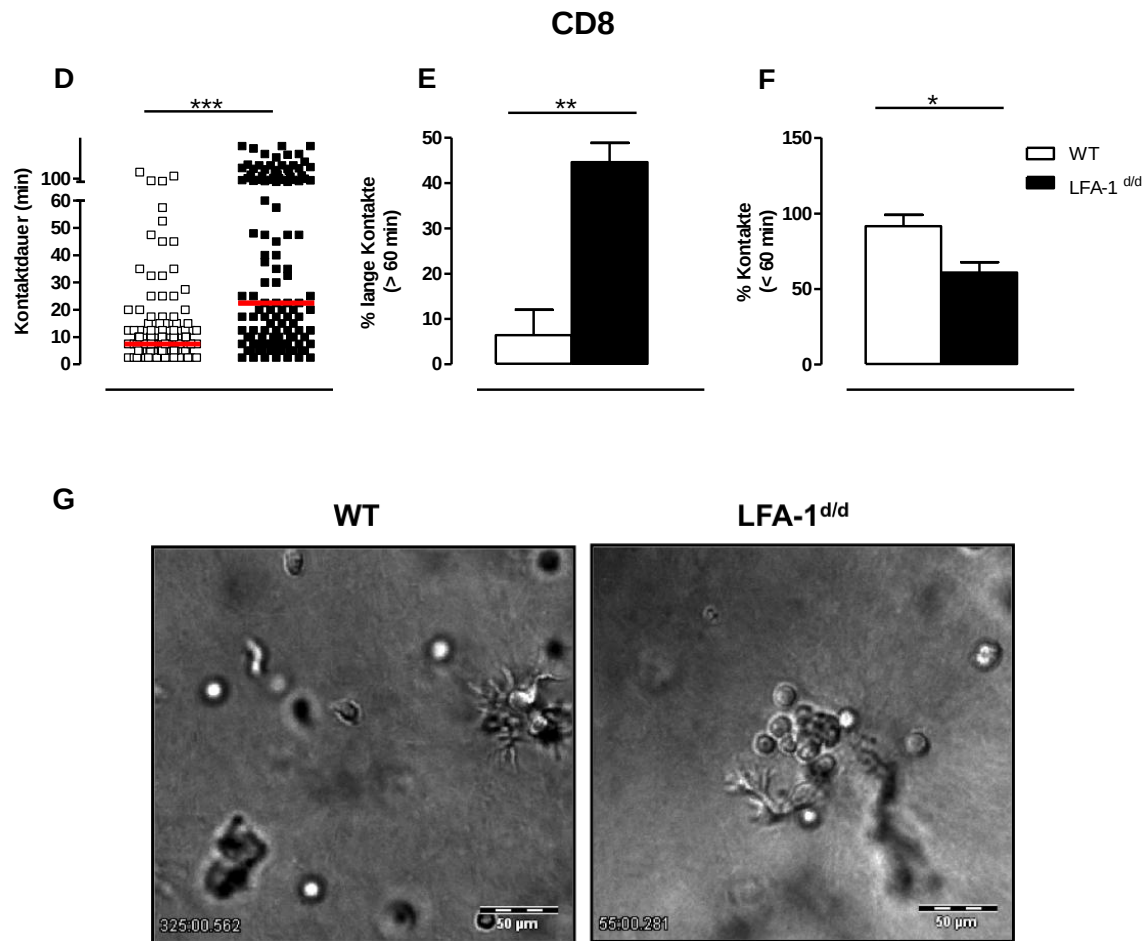
**Abb. 40: Aktives LFA-1 auf stimulierten BMDC induziert ihre Adhäsion an ICAM-1**

(A) WT und LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC wurden für 48 Stunden mit anti-CD40-Antikörper stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Histogramme der auf CD11c vorgateten DC. Gezeigt sind die Ergebnisse eines von sechs unabhängigen Experimenten. (B) Wie in (A) stimulierte WT und LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC wurden in Platten inkubiert, die mit rekombinantem ICAM-1/Fc oder mit Kontroll-IgG beschichtet wurden und die Anzahl gebundener Zellen wurde bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert von 3 Experimenten. Jedes Experiment wurde in Duplikaten angesetzt. \*\*p < 0.01.

### 3.3.2 LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC weisen eine verlängerte Interaktion mit T-Zellen auf

Da aktives LFA-1 es den BMDC ermöglichte, an ICAM-1 zu binden, wurde im Folgenden untersucht, ob antigen-beladene BMDC LFA-1 auch dazu nutzen, um an T-Zellen zu binden. Dazu wurden stimulierte WT und LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC mit OVA-Peptid beladen, mit TCR-transgenen OT-I bzw. OT-II T-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix kokultiviert und ihre Interaktion beobachtet. Die mediane Kontaktdauer zwischen CD4<sup>+</sup> OT-II bzw. CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC war dabei gegenüber der WT BMDC/T-Zell-Kontaktdauer signifikant erhöht (Abb. 41A, D). Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Kontaktzeiten wurden die DC/T-Zellinteraktionen in zwei Klassen unterteilt: 1) kurze Kontakte (< 60 min) und 2) Kontakte, die länger als 60 min anhielten (> 60 min) (Abb. 41B, C und E, F). Dabei wurden deutlich mehr lange Kontakte zwischen LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC und den beiden T-Zellpopulationen gefunden, als zwischen WT BMDC und OT-I bzw. OT-II T-Zellen. Damit übereinstimmend gingen WT BMDC mit OT-I und OT-II T-Zellen vorzugsweise kurze Kontakte ein. Die Induktion der langen Kontakte ging einher mit der Akkumulation vieler T-Zellen auf den LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC (Abb. 41G). Somit beeinflusst aktives LFA-1 auf DC spezifisch die Ausbildung langer DC/T-Zell-Kontakte, indem es die Interaktion mit T-Zellen verstärkt.





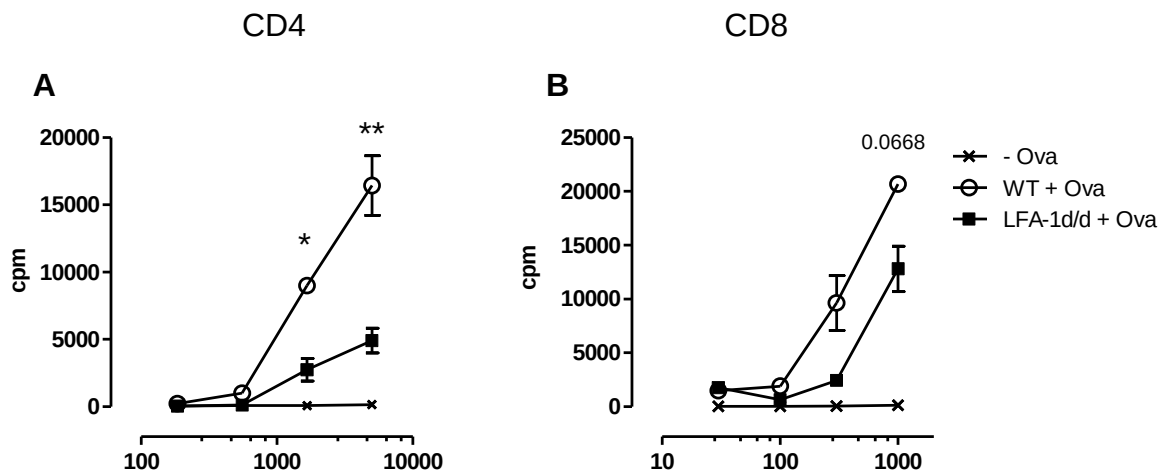
**Abb. 41: Aktives LFA-1 auf BMDC verstärkt die Ausbildung langer Kontakte mit T-Zellen.**

Stimulierte, mit OVA-Peptid beladene WT oder LFA-1<sup>d/d</sup> BMDCs wurden mit CD4<sup>+</sup> OT-II (A) oder CD8<sup>+</sup> OT-I (D) T-Zellen in 3-D Kollagengelen kultiviert. Die Kontaktzeiten von einzelnen DC/T-Zellkontakten innerhalb der ersten 10 Stunden der Kokultur wurden analysiert. Der Prozentsatz an Kontakten zwischen DC und CD4<sup>+</sup> (B) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (E), die länger als 60 min anhielten, sowie der Prozentsatz an Kontakten, die kürzer als 60 min waren (C: CD4; F: CD8), wurde bestimmt. (G) Durchlichtaufnahmen von WT (links) bzw. LFA-1<sup>d/d</sup> (rechts) DC/OT-II T-Zellinteraktion. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

### 3.3.3 Inaktives LFA-1 auf BMDC ist entscheidend für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen

Da aktives LFA-1 auf DC ihre Interaktion mit T-Zellen positiv reguliert, wurde im Folgenden untersucht, ob konstitutiv aktives LFA-1 (LFA-1<sup>d/d</sup>) die Proliferation naiver T-Zellen beeinflusst. Hierzu wurden antigen-beladene stimulierte BMDC mit CD4<sup>+</sup> OT-II bzw. CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen in 3D-Kollagengelen kokultiviert und die Proliferation nach drei Tagen gemessen. Sowohl die CD4<sup>+</sup> OT-II als auch die CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, die mit LFA-1<sup>d/d</sup> DC kokultiviert wurden, proliferierten signifikant geringer, als in

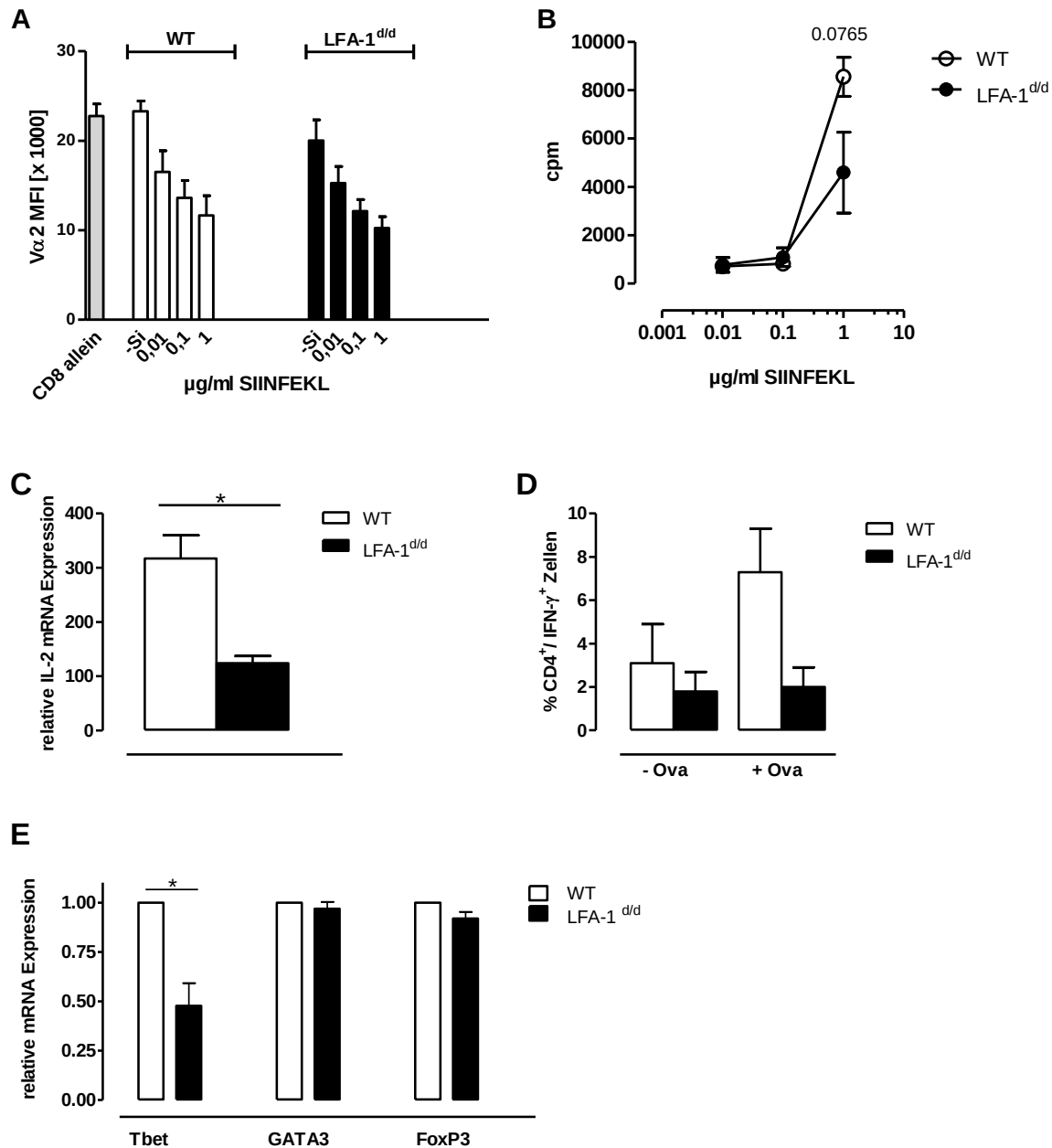
Kokultur mit WT BMDC (Abb. 42A, B). Dies zeigt, dass aktives LFA-1 auf DC die antigen-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen negativ beeinflusst.



**Abb. 42: Aktives LFA-1 auf BMDC verringert die T-Zellproliferation.**

Stimulierte WT und LFA-1<sup>d/d</sup> DC wurden mit OVA-Peptiden beladen und mit CD4<sup>+</sup> OT-II (A) bzw. CD8<sup>+</sup> OT-I (B) für drei Tage in 3-D Kollagengelen kokultiviert. Für die letzten 16 Stunden wurde der Kultur [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben, um die T-Zellproliferation zu bestimmen. Jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen ist dargestellt. Jedes Experiment wurde in Triplikaten angesetzt. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01

Als nächstes wurde überprüft, ob LFA-1<sup>d/d</sup> DC in der Lage sind, die Internalisierung des T-Zellrezeptors zu induzieren, was in der antigen-spezifischen T-Zellaktivierung ein frühes Signal ist (Alcover et al., 2000). Die Endozytose des TCRs von CD8<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, die mit WT BMDC kokultiviert wurden, auf unterschiedliche Peptiddosen hin, korrelierte im wesentlichen mit der induzierten T-Zellproliferation (Abb. 43A, B). Die Stärke der durch LFA-1<sup>d/d</sup> und WT BMDC induzierten TCR-Internalisierung unterschied sich kaum (Abb. 43A), wohingegen die durch unterschiedliche Peptiddosen induzierte T-Zellproliferation wieder geringer als in den WT DC/T-Zell-Kokulturen ausfiel (Abb. 43B). Dies zeigt, dass die frühe Erkennung der Peptid-MHC-Komplexe durch die Anwesenheit von aktivem LFA-1 auf der DC-Oberfläche nicht gestört ist, wohl aber die später einsetzende T-Zellproliferation.



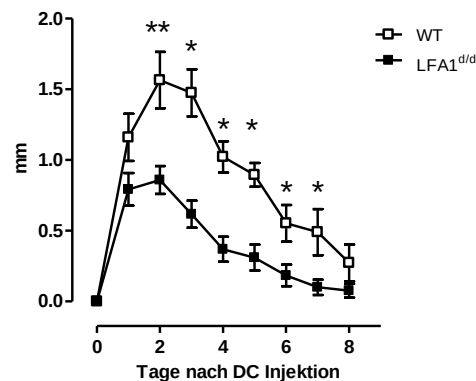
**Abb. 43: Aktives LFA-1 auf BMDC interferiert mit der T-Zellaktivierung und der Generation von Th1-Zellen.**

(A) WT oder LFA-1<sup>d/d</sup> DC wurden mit unterschiedlichen Dosen SIINFEKL beladen und für 4 Stunden mit OT-I T-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix kokultiviert. Nach Isolation aus der Matrix wurde die Expression der Vα2-Kette des TCRs durchflusszytometrisch gemessen. Der MFI von Vα2 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist dargestellt (n=3). (B) Wie in (A) beladene DC wurden mit OT-I T-Zellen für drei Tage in einer Kollagenmatrix kultiviert. Innerhalb der letzten 16 Stunden wurde der Kultur [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben, um die T-Zellproliferation zu bestimmen. Jeweils ein repräsentatives Ergebnis von zwei Versuchen ist dargestellt. Jedes Experiment wurde in Triplikaten angesetzt. (C) Stimulierte WT und LFA-1<sup>d/d</sup> DC wurden mit OVA-Peptid beladen und mit CD4<sup>+</sup> OT-II in 3-D Kollagengelen kokultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Gele verdaut, die RNA extrahiert und die relative Expression der IL-2 mRNA mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt. (n=3). \*p < 0.05. (D) Kokultur wie in (C) nur mit oder ohne OVA-Peptid. Nach dem Verdau der Gele wurde der Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die IFNγ produzieren mittels intrazellulärem FACS ermittelt (n=2). (E) Wie in (C). Hier wurde die relative Expression von Tbet (n=4), GATA3 (n=4) und FoxP3 (n=3) mRNA bestimmt. Die Expression der WT Ansätze wurde auf 1 gesetzt. \*p < 0.05. (Die Real-time PCRs wurden von M. Laschinger in München durchgeführt.)

In Übereinstimmung mit der verminderten T-Zellproliferation waren auch die mRNA-Level von IL-2 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit LFA-1<sup>d/d</sup> DC kokultiviert wurden, im Vergleich zu T-Zellen, die mit WT DC kultiviert wurden, signifikant reduziert (Abb. 43C). Die Frequenz IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen lag auf Hintergrund-Niveau, wenn die T-Zellen mit LFA-1<sup>d/d</sup> DC kokultiviert wurden, wohingegen antigen-beladene WT DC eine intrazelluläre IFN $\gamma$ -Produktion in den T-Zellen induzierten (Abb. 43D). Aktives LFA-1 auf DC beeinträchtigt also nicht nur die T-Zellproliferation, sondern hat ebenso einen Einfluss auf die Generierung von IL-2/IFN-g produzierenden Th1 Zellen. Um diese Hypothese zu validieren, wurde die mRNA-Expression von Tbet, GATA3 und Foxp3 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht, die mit antigen-beladenen WT oder LFA-1<sup>d/d</sup> DC kokultiviert wurden. Während die mRNA-Level von GATA3 und Foxp3 in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht durch die Expression von aktivem LFA-1 beeinträchtigt wurden, wurde im Vergleich zu mit WT BMDC kokultivierten T-Zellen eine signifikant reduzierte Menge an Tbet mRNA in den T-Zellen detektiert, die mit LFA-1<sup>d/d</sup> DC kokultiviert wurden. (Abb. 43E).

### **3.3.4 Die Expression von aktivem LFA-1 auf BMDC führt zu einer verringerten DTH**

Um die *in vitro* Ergebnisse zu untermauern, wurden im Folgenden die Auswirkungen von konstitutiv aktivem LFA-1 auf DC für die Induktion einer Immunantwort in einem DTH-Model *in vivo* untersucht. Nach adoptivem Transfer naiver CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in naive Empfängermäuse und zweimaliger subkutaner Injektion von antigen-beladenen BMDC beider Genotypen, wurde zwei Tage später das Maximum der Fußschwellung erreicht (Abb. 44). In Folge einer Injektion antigen-beladener LFA-1<sup>d/d</sup> DC trat eine signifikant geringere Fußschwellung (Reduktion um 47%) am zweiten Tag nach DC-Transfer auf, als bei einer Immunisierung mit antigen-beladenen WT BMDC. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde jeweils eine signifikant verminderte Hautverdickung gemessen, wenn LFA-1<sup>d/d</sup> DC in WT Empfängermäuse gespritzt wurden. Die Regulation der Aktivität von LFA-1 auf DC ist demnach entscheidend an der Ausbildung einer effektiven Immunantwort *in vivo* beteiligt, indem es die Aktivierung und Proliferation antigen-spezifischer T-Zellen *in vivo* kontrolliert.



**Abb. 44: Eine DTH-Antwort wird durch die Expression von aktivem LFA-1 auf DC vermindert.**

CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen wurden in syngene B6 Empfängermäuse injiziert. Nach zweimaliger Injektion von WT bzw. LFA-1<sup>d/d</sup> DC (24 Stunden und 17 Tage nach T-Zelltransfer) in die Fußsohle des Hinterbeins wurde 24 Stunden nach dem finalen DC-Transfer die Fußschwellung gemessen (n=8 Mäuse). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. (S. Balkow (Mainz))

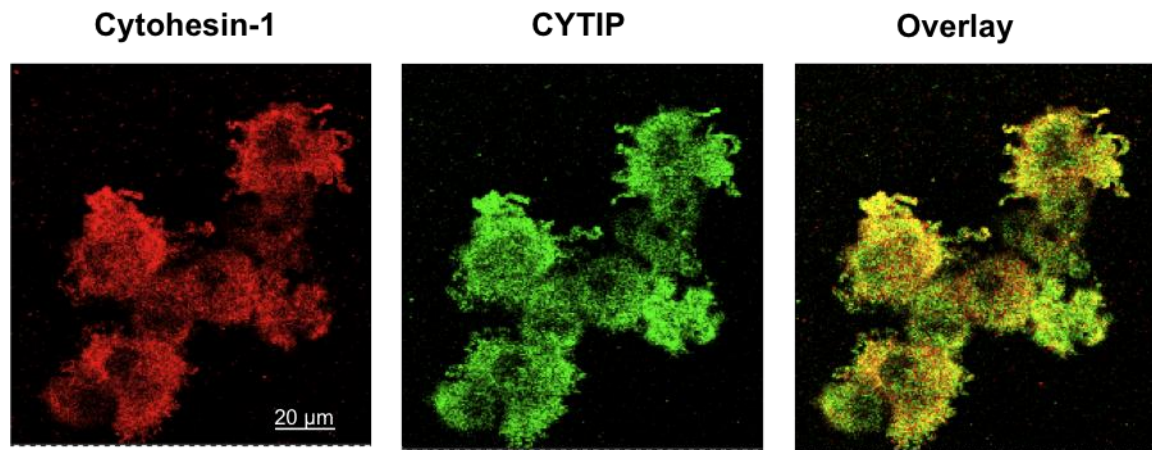
### 3.3.5 Der Verlust von CYTIP in DC induziert verlängerte Kontakte zu T-Zellen und beeinträchtigt die T-Zellproliferation

Cytohesin-1-interagierendes Protein (CYTIP) kontrolliert die Deaktivierung von  $\beta$ 2-Intergrinen auf DC, indem es Cytohesin-1 von der Plasmamembran ins Cytoplasma rekrutiert (Boehm et al., 2003). Wie bereits gezeigt wurde, führt ein Knock-down von CYTIP in DC zu einer reduzierten antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellexpansion (Hofer et al., 2006). Da noch nicht bekannt war, ob für diese Beobachtung eine Veränderung der DC/T-Zell Kontaktzeit oder der LFA-1-Aktivität auf den DC verantwortlich war, wurde CYTIP in WT DC mittels siRNA ausgeschaltet und ihre Interaktion mit naiven T-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix beobachtet. Mature DC, die entweder unbehandelt oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, exprimierten CYTIP vor allem im Cytoplasma (Abb. 45A, B). Die Transfektion der DC mit einer spezifischen CYTIP siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der CYTIP-Expression in den Zellen (Abb. 45B), nahm aber keinen Einfluss auf die Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker (Abb. 45C).

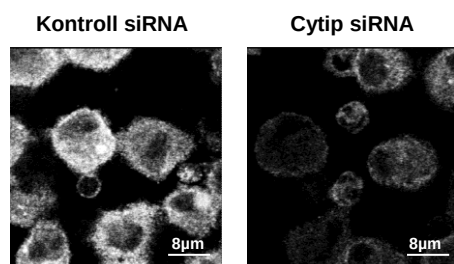
Die Analyse der Interaktionszeit zwischen DC und CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen zeigte, dass die T-Zellen, verglichen mit den Kontrollgruppen, längere Kontakte mit den DC eingingen, in denen CYTIP ausgeschaltet wurde (Abb. 45D). Die vorangegangenen Versuche bestätigend resultierten auch hier die verlängerten DC/T-Zell-Kontaktzeiten

in einer signifikant reduzierten T-Zellproliferation nach Kokultur mit antigen-beladenen DC, in denen CYTIP ausgeschaltet wurde (Abb. 45E).

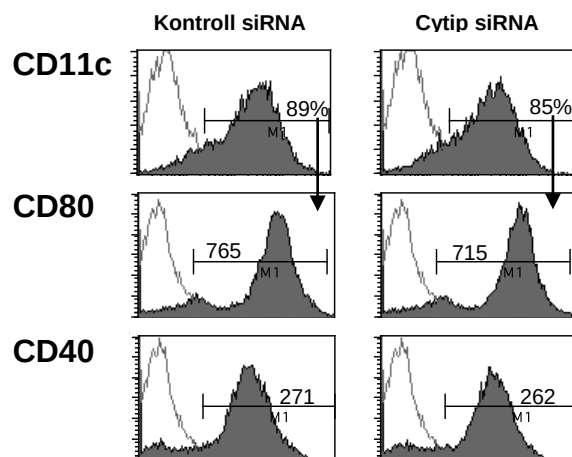
**A**



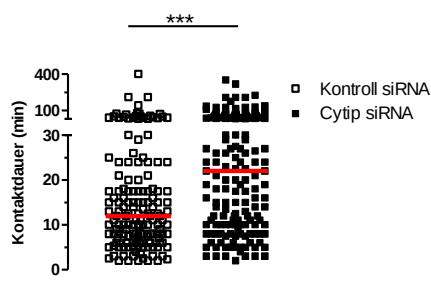
**B**



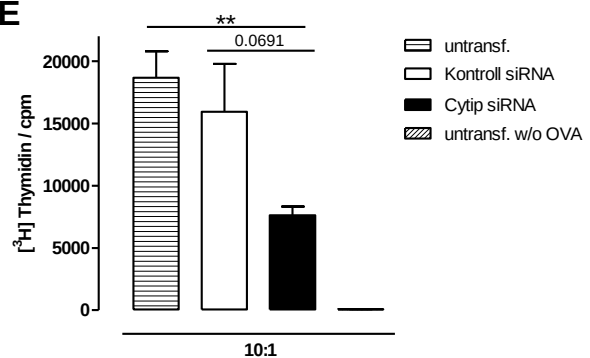
**C**



**D**



**E**





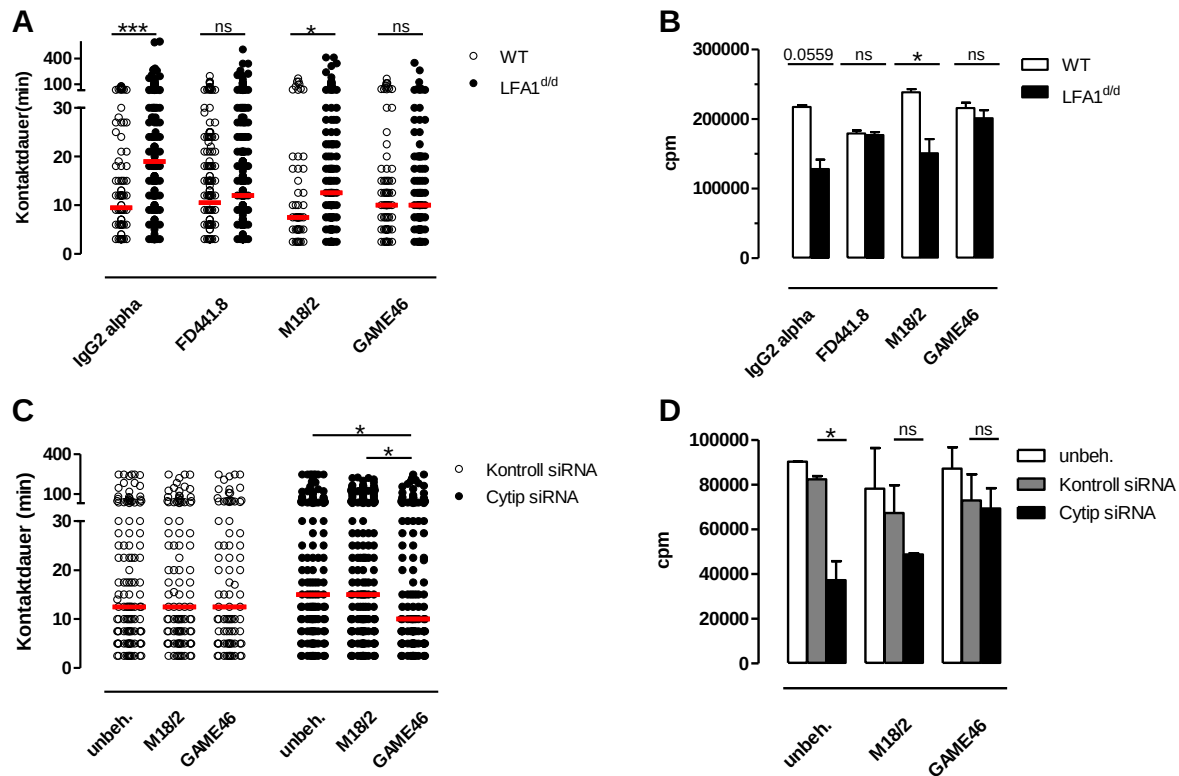
**Abb. 45: Knock-down von CYTIP in DC induziert verlängerte Kontakte mit T-Zellen und beeinträchtigt die antigen-spezifische Proliferation.**

(A) Nachweis der Koexpression von CYTIP und Cytohesin in maturen WT BMDC mittels Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit einem konfokalen LSM (Leica). (B) Die CYTIP Expression wurde durch Knock-down inhibiert und ist hier anhand von Immunfluoreszenz-Aufnahmen dargestellt. Die CYTIP-Expression in stimulierten WT DC wurde 24 Stunden nach Transfektion mit Kontroll- und CYTIP-siRNA überprüft. (C) Nach der Transfektion von WT DC mit Kontroll- bzw. CYTIP siRNA, wurde die Oberflächenexpression von CD11c, CD40 und CD80 durchflusszytometrisch analysiert. Ungefülltes Histogramm: Isotypkontrolle, gefülltes Histogramm: spezifische Färbung. Der Prozentsatz (CD11c) oder der geometrische Mittelwert (CD40, CD80) sind im FACS-Profil angegeben. (D) Stimulierte transfizierte DC wurden mit Ovalbumin-Peptid beladen und mit CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in einem 3-D Kollagengel kultiviert. Die Kontaktzeiten von einzelnen DC/T-Zellkontakten innerhalb der ersten 10 Stunden der Kokultur wurden analysiert. Rote Linie: Median. (E) Antigen-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen, die für drei Tage mit stimulierten, OVA-beladenen Kontroll- oder CYTIP-siRNA- transfizierten DC in 3-D Kollagengelen kokultiviert wurden. Für die letzten 16 Stunden wurde der Kultur [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben, um die T-Zellproliferation zu bestimmen. Jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen ist dargestellt. Jedes Experiment wurde in Triplikaten angesetzt. \*\*, P < 0.01 \*\*\*, P < 0.001. (Die Cytip knock-down Experimente wurden von S. Balkow durchgeführt.)

### **3.3.6 Die Inhibition von aktivem LFA-1 auf DC vermindert die Ausbildung langer Kontakte zu T-Zellen und verstärkt die T-Zellproliferation**

In früheren Studien wurde gezeigt, dass LFA-1 auf DC in einer inaktiven Form vorliegt und es deshalb keine funktionale Relevanz für die DC-Aktivität hat (Varga et al., 2007; Cambi et al., 2006). Im Zusammenhang mit unseren Daten kam die Vermutung auf, dass LFA-1 für eine voll funktionsfähige DC in ihrer inaktiven Form vorliegen muss, um eine optimale T-Zellinteraktion und ein effizientes T-Zellpriming zu erreichen. Zur Überprüfung, ob die Inhibition von aktivem LFA-1 diese DC-Funktionen wiederherstellt, wurden antigen-beladene WT bzw. LFA-1<sup>d/d</sup> DC mit funktionalen blockierenden anti-LFA-1 (CD11a/CD18) Antikörpern vorbehandelt und ihre Interaktion mit CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix analysiert. Die Antikörper, die gegen CD11a (FD441.8) oder CD18 (GAME46) gerichtet waren, beeinflussten die Kontaktzeit von WT DC mit T-Zellen nicht (Abb. 46A). Dies bestätigt, dass im Gegensatz zu aktivem LFA-1 (LFA-1<sup>d/d</sup>) Wildtyp-LFA-1 auf DC die DC/T-Zellinteraktion nicht beeinträchtigt. Die Inhibition von CD11a oder CD18 auf DC hingegen, die konstitutiv aktives LFA-1 auf der Oberfläche exprimieren (LFA-1<sup>d/d</sup>), reduzierte ihre Kontaktzeit mit T-Zellen im Vergleich zu LFA-1<sup>d/d</sup> DC, die mit einem Kontroll-Antikörper oder mit einem nicht-blockierenden CD18 Antikörper (M18/2) inkubiert wurden auf WT-Niveau (Abb. 46A). Demnach reduziert die Inhibition von aktivem LFA-1 auf DC die Ausbildung langer Kontakte zwischen LFA-1<sup>d/d</sup> DC und T-Zellen. In Übereinstimmung mit früheren Studien hatte das Blockieren von WT LFA-1

keinen Einfluss auf die DC-Interaktion mit naiven T-Zellen. Darüber hinaus konnte die T-Zellstimulationskapazität der LFA-1<sup>d/d</sup> DC durch eine Vorbehandlung mit den inhibitorischen CD11a (FD441.8) oder CD18 (GAME46) Antikörpern auf das Niveau von WT DC erhöht werden (Abb. 46B).



**Abb. 46: Die Inhibition von aktivem LFA-1 auf DC verhindert die Ausbildung langer Kontakte und stellt die antigen-spezifische T-Zell-Proliferation wieder her.**

(A, B) Stimulierte WT und LFA-1<sup>d/d</sup> DC wurden entweder mit inhibitorischen Antikörpern gegen CD18 (GAME46), CD11a (FD441.8), mit einem nicht-blockierenden CD18 Antikörper (M18/2) und einer Isotypkontrolle vorbehandelt oder unbehandelt belassen. Danach wurden die DC mit Ovalbumin-Peptid beladen und mit CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen in einem 3-D Kollagengel kultiviert. (A) Die Kontaktzeiten von einzelnen DC/T-Zellkontakten innerhalb der ersten 10 Stunden der Kokultur wurden analysiert. (B) Die antigenspezifische Proliferation der CD4<sup>+</sup> OT-II T-Zellen wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Der Versuch wurde in Triplikaten angesetzt. (C) Wie in (A) nur mit Kontroll-siRNA oder CYTIP-spezifischer siRNA transfizierten WT DC. (D) Wie in (B) nur mit den wie in (C) transfizierten WT DC. N=3. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001. (Die Cytip knock-down Experimente (C und D) wurden von S. Balkow durchgeführt.)

Da die Herunterregulation von CYTIP in DC zu verlängerten Kontaktzeiten und einer reduzierten T-Zellproliferation führte (Abb. 45D, E) und es nicht bekannt ist, ob die Inaktivierung von CYTIP seinen Effekt über die Aktivierung von LFA-1 ausübt, wurde im Folgenden untersucht, ob die antigenspezifische T-Zellproliferation durch die Blockade von LFA-1 auf DC, in denen CYTIP ausgeschaltet wurde, wiederhergestellt

werden kann. Die Vorbehandlung der DC mit einem inhibitorischen Antikörper gegen CD18 (GAME46) verminderte die Kontaktzeit zwischen den DC, in denen CYTIP ausgeschaltet wurde, und naiven T-Zellen (Abb. 46C) und erhöhte die T-Zellproliferation auf ein vergleichbares Level, wie DC, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb. 46D). Insgesamt zeigen die Daten, dass aktives LFA-1 auf DC inhibitorisch auf die antigenspezifische T-Zellproliferation wirkt und implizieren, dass CYTIP in maturen DC die LFA-1-abhängige T-Zellablösung reguliert, eine wichtige Voraussetzung für erfolgreiches T-Zellpriming.

## 4 Diskussion

### 4.1 Analyse der Interaktion zwischen DC und T-Zellen

Die Kontaktdauer zwischen DC und T-Zellen hat einen wesentlichen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung: Zum einen führen stabile Kontakte zu einer produktiven T-Zell-Aktivierung und –Proliferation (Benvenuti et al., 2004; Hugues et al., 2004). Andererseits können stabile Kontakte zu einer signifikant reduzierten T-Zell-Aktivierung führen (Balkow et al., 2007; Balkow et al., 2010). Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass es im einen Fall zur Aktivierung und im anderen Fall zur Suppression kommt, wurde in diesem Projekt anhand differentiell vorbehandelter SP37A3-DC mit bekanntermaßen immunogenen gegenüber tolerogenen Eigenschaften untersucht.

#### 4.1.1 SP37A3 haben vergleichbare Eigenschaften mit BMDC

Der Einsatz einer DC-Linie bietet viele Vorteile. Für die hier gezeigten Untersuchungen wurde deshalb neben BMDC auch die DC-Linie SP37A3 für vergleichende Interaktionsstudien mit  $CD4^+$  T-Zellen verwendet. Unstimulierte SP37A3 entsprechen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer funktionellen Eigenschaften immaturen myeloiden DC, stellen aber eine homogenere Zellpopulation dar als BMDC (Bros et al., 2007 und eigene Daten). Ausgereifte SP37A3-Zellen sind charakterisiert durch ausgeprägte Dendriten, durch eine erhöhte, homogene Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen, eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie eine potente Stimulation von allopathen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* sowie von syngen, OVA-TCR-transgenen T-Zellen *in vitro* (Bros et al., 2007). Im direkten Vergleich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass BMDC und die Zelllinie SP37A3 einen vergleichbaren Immunphänotyp für die untersuchten Moleküle bezüglich der Expression unter Basalbedingungen sowie nach Stimulation aufweisen. Anhand der durch BMDC und SP37A3 induzierten Proliferation antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen sieht man, dass iSP37A3 eine sehr homogene Zellpopulation darstellen und keine

bereits voraktivierten DC enthalten, da die durch sie ausgelöste T-Zellproliferation deutlich unter der durch LPS oder TNF- $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  stimulierte SP37A3 lag. Bei den BMDC war dieser Unterschied nicht so deutlich, was die Heterogenität dieser DC-Population im unreifen Zustand bestätigt. Diese Ergebnisse implizierten, dass es durch den Einsatz einer homogenen DC-Population auch zu einer auf Einzellebene statistisch besser abgrenzbaren Interaktion unreifer gegenüber reifer DC mit antigenspezifischen T-Zellen kommen könnte (s. 4.1.2).

Bei der genaueren Analyse der vergleichenden DC/T-Zellinteraktion im Kollagengel zeigte sich, dass mit TNF- $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  stimulierte BMDC und SP37A3-Zellen pro Zeiteinheit weniger Kontakte zu T-Zellen eingingen, wenn die DC zuvor mit Antigen beladen wurden. Die mediane DC/T-Zell-Kontaktzeit war allerdings nicht von der Anwesenheit des OVA-Pepids beeinflusst. Schaute man sich kurze und lange Kontakte getrennt voneinander an, verliefen bei Verwendung beider DC-Populationen die kurzen Kontakte antigenunabhängig ab, wohingegen es vor allem bei den SP37A3 bei Präsentation des Antigens eine Zunahme von langen Kontakten gab.

#### **4.1.2 Zwischen mDC und Treg kommt es zur Aggregatbildung**

Inwieweit die DC/T-Zellinteraktionszeit die T-Zellaktivierung beeinflusst, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Faroudi et al., 2003; Shakhar et al., 2005; Stoll et al., 2002). Balkow et al (2007) konnten bereits für DC und T-Zellen aus Balb/c bzw. DO11.10 Mäusen zeigen, dass antigenbeladene, stimulierte BMDC mit antigenreaktiven nTreg mehr lange Kontakte eingingen, als mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen gleicher TCR-Spezifität. Auch die hier verwendeten murenen, antigenbeladenen BMDC aus C57BL/6 Mäusen sowie die SP37A3-DC (C57BL/6-Genotyp) wiesen vermehrt lange Interaktionszeiten mit syngen nTregs auf. Darüber hinaus bildeten sie mit diesen nTregs große Zellaggregate, was bei Kokulturen mit naiven antigenspezifischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Wie bereits gezeigt werden konnte, bilden Milz-DC nicht nur Aggregate mit syngen nTregs sondern auch mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus. In Abhängigkeit von LFA-1 können die Tregs aber die Aggregatbildung mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen inhibieren und die Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80/86) auf den DC herunterregulierten (Onishi et al., 2008). Auch humane Tregs bilden stabile und langanhaltende Aggregate mit syngen myeloiden DC aus. Dies

geschieht in Abhängigkeit der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-3 und ICAM-3 und führt zu einer Herunterregulation von CD80 auf den DC (Herman et al., 2012). In fortführenden Studien soll auch in den hier gezeigten Daten überprüft werden, inwieweit Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 an der Aggregatbildung beteiligt sind und wo sie in den Aggregaten lokalisiert sind. Das soll zum einen anhand von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen geschehen, aber auch durchflusszytometrisch untersucht werden. Weiterhin werden auf DC-Seite auch kostimulatorische Moleküle (wie CD40, 80, 86) durchflusszytometrisch analysiert, um festzustellen, ob es seitens der DC, die mit nTregs interagieren zu einer Tolerogenisierung und damit Herunterregulation dieser Moleküle kommt.

Unstimulierte, antigenbeladene BMDC und SP37A3 bildeten weder mit nTreg noch mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen große Zellaggregate aus, und im Gegensatz zu maturen DC beider Populationen lagen die Kontaktzeiten zwischen imaturen DC beider Populationen und nTregs (vor allem in Phase 3 (20-30h)) niedriger als mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen. Die letztere Beobachtung steht im Gegensatz zu den Daten von Sarris et al. (2008), die gezeigt haben, dass iBMDC mit syngen nTreg öfter lange Kontakte eingingen, als mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen. In deren Arbeit wurde allerdings nicht in einer 3D-Umgebung gearbeitet, sondern in einer 2D-Flüssigkultur. Desweiteren wurden lange Kontakte anders definiert: Kontakte, die länger als 400 sec (= 6,7 min) anhielten, wurden als lange Kontakte klassifiziert, wohingegen in der vorliegenden Arbeit lange Kontakte als solche klassifiziert wurden, die länger anhielten als 45 min. Ein weiterer Unterschied besteht in dem Genotyp der verwendeten Mäuse: In der vorliegenden Arbeit wurde mit Mäusen gearbeitet, deren genetischer Hintergrund C57BL/6 ist, wohingegen in der Arbeit von Sarris et al. Mäuse mit einem Balb/c-Hintergrund verwendet wurden.

Die Überlegung, dass die Verwendung von SP37A3-Zellen mit ihrem gegenüber BMDC jeweils homogenen Phänotyp im unreifen wie auch stimulierten Zustand zu einer geringeren Spreitung der DC/T-Zellkontaktzeiten führt, konnte nicht bestätigt werden: Wie auch bei der Verwendung von BMDC gibt es kurze und lange Kontakte, wobei die Anzahl der kurzen Kontakte deutlich überwiegt. Auch eine Homogenisierung der T-Zellen durch Depletion oder Anreicherung von  $CD25^+$  T-Zellen führte nicht zu einer geringeren Spreitung der DC/T-Zellkontaktzeiten. Bisherige Daten, die unter Verwendung von Gesamt- $CD4^+$  T-Zellen generiert wurden

(Balkow et al., 2007 und eigene Daten), legten den Schluss nahe, dass nach einer Depletion aller CD25<sup>+</sup> T-Zellen vor der Kokultur, die Kontaktzeiten auch etwas homogener werden, was aber nicht der Fall war, wie die DC/T-Zellkontaktanalysen mit naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> zeigen.

#### **4.1.3 Analyse der DC/T-Zellinteraktion in einem immunsuppressiven Milieu**

Mature DC, welche mit Hilfe von immunmodulatorischen Zytokinen (z.B. IL-10, TGF- $\beta$ ) oder immunsupprimierenden pharmakologischen Substanzen (z.B. Dexamethason, Vitamin D<sub>3</sub>) in einen tolerogenen Status differenziert wurden, induzieren in interagierenden alloreaktiven naiven T-Zellen die Differenzierung zu Treg (Hackstein and Thomson, 2004; Rutella and Lemoli, 2004). Dies wurde auch für SP37A3-Zellen beschrieben, welche in Gegenwart von Dexamethason ausgereift wurden (alternativ aktivierte SP37A3-Zellen) (Bros et al., 2007). Aber auch immature humane monozytenabgeleitete DC fördern die Entwicklung von alloreaktiven naiven T-Zellen zu Treg (Jonuleit et al., 2000). Bisher wurden solche Studien immer in Flüssigkultursystemen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion unterschiedlich aktivierter SP37A3 mit syngen naiven T-Zellen aus DEREOT-II Mäusen in der 3D-Kollagenmatrix untersucht und der Aktivierungsstatus der T-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur (parallel auch in Flüssigkultur) analysiert sowie ihre mögliche Konversion zu Foxp3<sup>+</sup> iTreg, die aufgrund der Foxp3-Genpromotor-abhängigen Expression von EGFP entsprechend markiert werden.

Um ein in der Literatur definiertes immunsuppressives Milieu abzubilden, das eine DC-abhängige Konversion naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu iTregs forciert, wurden den Kokulturen die immunsupprimierenden Agenzien Retionolsäure (RA, ein Vitamin-A-Metabolit) und TGF- $\beta$  zugefügt. T-Zellen, die mit mSP37A3 interagierten, wiesen in der ersten Phase der Interaktion im Median deutlich längere Interaktionszeiten auf, als mit DexSP37A3 oder iSP37A3 kokultivierte T-Zellpopulationen sowie eine deutlich stärkere T-Zell-Aktivierung in Bezug auf Frequenz Aktivierungsmarker-positiver Zellen und T-Zellproliferation. Auch Foxp3 wurde in den DC/T-Zellkokulturen mit mSP37A3 von mehr T-Zellen exprimiert, als in Kokulturen mit DexSP37A3 oder iSP37A3. Dies legt den Schluss nahe, dass eine verlängerte Interaktion zwischen SP37A3 und naiven T-Zellen in der 3D-Kollagenmatrix verstärkt zur Induktion von Treg führt, aber auch zu einer stärkeren Aktivierung der CD4-T-Zellen und damit zur Bildung von T-Effektorzellen. In den Flüssigkulturansätzen kam es zwar auch in den

mSP37A3-T-Zellkokulturen zur stärksten Aktivierung der T-Zellen, allerdings gab es in der Frequenz Foxp3<sup>+</sup> Zellen kaum Unterschiede zwischen DexSP37A3- und mSP37A3-enthaltenden Kokulturen. Denkbar wäre, dass die DC/T-Zellinteraktion im Kollagengel so weit herabgesetzt wird, dass im Falle von DexSP37A3 als Stimulatoren für eine Induktion von Foxp3 zu wenig Signal in interagierenden T-Zellen ankommt, wohingegen es bei der Interaktion mit mSP37A3 ausreicht. In der Flüssigkultur, in der die Interaktion zwischen DC und T-Zellen stärker ist, da beide Populationen nicht aktiv zueinander migrieren müssen wie im Gel, kommt es an Tag 4 sogar zur Induktion von mehr Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen wenn DexSP37A3 als Stimulatoren genutzt wurden, im Vergleich zu mSP37A3. In weiterführenden Studien soll vergleichend getestet werden, inwiefern es sich auf die DC-abhängige Induktion von Treg auswirkt, wenn die immunsupprimierenden Substanzen RA und TGF- $\beta$  nicht in der Kokultur anwesend sind. Weiterhin sollen auch die supprimierenden Eigenschaften der generierten Tregs analysiert werden, die an Hand ihrer EGFP-Floureszenz mittels Zellsort aufgereinigt werden, da die GARP-Expression der Tregs aus den Kollagengelen mit mSP37A3 deutlich unter der von DexSP37A3-Kokulturen lag. GARP gilt als Marker für die aktivierte Tregs und ist demnach wichtig für ihre Suppressoraktivität.

## 4.2 Rolle von Myosin 9b

Eine strikte Kontrolle der Motilität von Immunzellen und ihrer Interaktion untereinander ist notwendig, um die Immunität eines Wirtsorganismus gegenüber Krankheitserregern aufrecht zu erhalten bzw zu ermöglichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myo9b, ein motorisierter Rho-Inhibitor, eine wichtige Signaltransduktionskomponente darstellt, die sowohl für die Migration, als auch für das T-Zell Stimulierungspotential von DC notwendig ist.

### 4.2.1 Die verstärkte Rho-Signaltransduktionsaktivität in Myo9b<sup>-/-</sup> DC führt zu einer verminderten Migrationskapazität

Die genetische Deletion von Myo9b resultierte in erhöhten Mengen von phosphoryliertem RhoA in BMDC. Diese übermäßige RhoA-Signaltransduktionsaktivität wiederum führte zu einer verstärkten Phosphorylierung



von MLC und Cofilin, was auf eine erhöhte Acto-Myosin-Kontraktilität und auf eine reduzierte F-Aktin-Aktivität hinweist.

Auf funktionaler Ebene war sowohl die spontane, als auch die gerichtete Migration von Myo9b<sup>-/-</sup> DC in einem 3D-Kollagengel erheblich gestört. In einer Studie zu Myo9b-defizienten Makrophagen aus der Maus konnte auch auf einem 2D-Substrat eine reduzierte Zellmotilität und Chemotaxis beobachtet werden (Hanley et al., 2010). Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, führt die Expression einer konstitutiv aktiven Form von RhoA oder die Anwendung von Toxinen, die eine nachhaltige RhoA-Aktivierung induzieren, zu einer Inhibition der DC-Migration (Blöcker et al., 2006; Shurin et al., 2005). Weiterhin hat die Oberflächenexpression von Thy-1, ein Glycophosphatidyl-Inositol (GPI) gebundenes Glykoprotein, welches die Rho-Aktivierung, durch Modulierung der Aktivität von p190 RhoGAP induziert, zur Inhibition der in vitro Migration von Fibroblasten geführt (Barker et al., 2004). Ebenso war die erhöhte RhoA-Aktivität Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen von BCL6-defizienten Mäusen mit einer beeinträchtigten Zellausbreitung und Motilität assoziiert (Pixley et al., 2005).

In der Studie von Hanley et al (2010) konnte durch die Inhibition von RhoA mit dem *Clostridium botulinum* Toxin C3 die spontane Migration, nicht aber die chemotaktische Aktivität der Myo9b<sup>-/-</sup> Makrophagen normalisiert werden. Interessanterweise erhöhte C3 aber nicht nur die Geschwindigkeit der Myo9b<sup>-/-</sup> sondern auch der WT Makrophagen. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass C3 sowohl die spontane als auch die CCL-19 abhängige chemotaktische Migration von humanen PBMC-abgeleiteten DC auf Fibronectin-beschichteten Platten reduziert (Riol-Blanco et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass C3 auf die Migration der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC keinen Einfluss hatte, wohl aber auf die der WT BMDC, deren Migrationsgeschwindigkeit auf das Niveau der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC reduziert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Diskrepanz zwischen der bei Makrophagen beobachteten Wirkung von C3 (Hanley et al., 2010) könnte zum Einen aus den zelltypspezifischen Unterschieden zwischen Makrophagen und DC resultieren, zum Anderen daraus, dass die Makrophagen im Gegensatz zu den DC unstimuliert analysiert wurden. Die Behandlung von Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 führte fast zur Wiederherstellung des WT-Migrationsphänotyps. Auch in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) konnte durch Y-27632 eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen festgestellt werden, wobei aber die

gerichtete Bewegung in einem elektrischen Feld reduziert war (Zhang et al., 2011). In humanen neuronalen Stammzellen (hNSC) übte der Inhibitor wiederum keinen Einfluss auf die gerichtete Migration aus (Feng et al., 2012). Demnach ist ROCK nicht in allen Zelltypen gleichermaßen für die Zellmotilität verantwortlich. Weiterhin kommt es auch auf die verwendete Konzentration an. Setzt man höhere Konzentrationen des ROCK-Inhibitors ein, kommt es auch in WT BMDC zu einem signifikanten Mobilitätsverlust (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung der BMDC mit dem Decoy-Peptid S3-Fragment ADF/Cofilin, welches die Phosphorylierung von Cofilin durch Inhibition der LIM-Kinase1 verhindert (Aizawa et al., 2001; Nishita et al., 2002; Heredia et al., 2006), konnte die Migrationsgeschwindigkeit der *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC bei allen getesteten Konzentrationen auf das Niveau der WT BMDC anheben (nur eine Konzentration gezeigt). Dies zeigt, dass die Phosphorylierung von Cofilin, wenngleich es in der Signaltransduktionskaskade der Rolle von RhoA und ROCK nachgeschaltet ist, eine tragende Rolle in der Migrationskapazität muriner DC einnimmt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass eine Blockade von ROCK mehrere nachgeschaltete Signalwege beeinflusst, als eine Inhibition der Phosphorylierung von Cofilin. Deshalb führt der Einsatz des S3-Fragments ADF/Cofilin spezifisch zu einer Wiederherstellung der WT Migrationskapazität in den *Myo9b*<sup>-/-</sup> BMDC, da hier die übermäßige Phosphorylierung von Cofilin verhindert oder reduziert wird. Die Phosphorylierung einzelner Bestandteile des Rho-Signalweges muss demnach sehr genau reguliert werden, um eine erfolgreiche Migration von dendritischen Zellen gewährleisten zu können.

Ähnlich zu den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen mit RhoGAP *Myo9b*-defizienten DC wiesen auch DC, denen die GTPase *Cdc42* fehlt (Lämmermann et al., 2009) oder das Actin-capping Protein *Eps8* (Frittoli et al., 2011) eine verringerte gerichtete Migration in einer 3D-Matrix auf. Da die künstliche 3D-Gelmatrix im Wesentlichen der natürlichen Umgebung einer Zelle ähnelt, benötigt die DC-Migration in der 3D-Kollagenmatrix wie auch *in vivo* eine vergleichbare Membranaktivität, um enge Passagen zu durchqueren. *Cdc42*<sup>-/-</sup> DC entwickeln sehr starke Ausstülpungen in alle Richtungen, was dazu führt, dass sie sich sofort in der Matrix verstricken und darin hängen bleiben (Lämmermann et al., 2009), wohingegen *Eps8*-defiziente DC kein ausreichend dichtes Aktin-Netzwerk an ihrem vorderen Ende ausbilden, um eine gleichmäßige Zellausstülpung und damit Fortbewegung zu bewirken (Frittoli et al., 2011).

Die Membranausstülpungsaktivität in Richtung der Bewegung wurde als die treibende Kraft in der 3D-Migration von Leukozyten, inklusive DC, beschrieben (Lämmermann et al., 2008). Man kann sich also vorstellen, dass in Wt DC das Motorprotein Myo9b Richtung Plus-Ende polymerisierender Aktinfilamente in den vorderen Bereich der Zelle wandert und dort lokal die Hydrolyse von Rho-GTP katalysiert, wobei es eine ungünstige Acto-Myosin Formation verhindert und die Membranausstülpung an der Zellfront begünstigt (Liao et al., 2010; van den Boom et al., 2007). Ein Fehlen von Myo9b führt also in DC zu einer migratorischen Dysfunktion und legt den Schuss nahe, dass auch nachgeschaltete Immunfunktionen beeinträchtigt sind.

#### **4.2.2 Die beeinträchtigte *in vivo* Migration resultiert in einer reduzierten CHS in Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen**

Um letztendlich T-Zellen effektiv stimulieren zu können, müssen DC zuvor Antigene in der Peripherie aufnehmen und zu den drainierenden Lymphknoten transportieren. Deshalb ist die Migration von DC ein wichtiger Aspekt in der Ausübung ihrer immunologischen Funktion. Myo9b-defiziente kutane DC (CD207<sup>+</sup> LC, dermale CD207<sup>+</sup> DC und CD207<sup>-</sup> DC) zeigten *ex vivo* eine deutlich reduzierte CCL-21 induzierte Emigration aus der Epidermis und Dermis von Hautexplantaten. Die Anzahl an LC im unbehandelten Ohr war hingegen nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass Myo9b für die Immigration von LC-Vorläufern in die Haut nicht verantwortlich ist. Auch *in vivo*, nach der Sensibilisierung der Ohren mit einer FITC-Lösung, trat in den Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen eine im Vergleich zu WT Mäusen stark reduzierte Migration dermalen und epidermalen DC zu den drainierenden Lymphknoten auf. Demnach ist Myo9b notwendig für die Regulation des „DC-Homings“ während einer adaptiven Immunantwort. Da epidermale LC und dermale DC eine tragende Rolle in der Prozessierung von Allergenen und in der Stimulation haptenspezifischer T-Zellen in den drainierenden LN übernehmen (Kripke et al., 1990; Bennett et al., 2005; Bennett et al., 2007), legten diese Ergebnisse nahe, dass Myo9b für die Ausbildung einer kutanen Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion (CHS) wichtig ist. Tatsächlich war Myo9b essentiell an der Ausbildung einer TNCB-induzierten CHS beteiligt. Frühere Studien zeigten, dass man die Reduktion einer CHS korrelieren kann mit der geringen Dichte an LC in der Haut (Toews et al., 1980; Rheins et al., 1986). Da in der vorliegenden Arbeit aber keine Unterschiede in der Dichte und Verteilung der epidermalen LC gefunden wurden, kann man diesen Grund hier ausschließen. Viel wahrscheinlicher

tragen die reduzierte Migration der Myo9b<sup>-/-</sup> LC und dermalen DC zum drainierenden LN und die reduzierte T-Zellstimulationskapazität Myo9b<sup>-/-</sup> DC zu der verminderten Ohrschwellung in der CHS bei. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Myo9b eine Schlüsselrolle in der Induktion einer adaptiven Immunantwort einnimmt.

#### **4.2.3 Myo9b ist für die DC-Differenzierung und - Maturierung sowie für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen nicht notwendig**

Obwohl die Funktion von RhoA für den Prozess der Antigenaufnahme kontrovers diskutiert wird und vermutlich von dem jeweiligen Endozytoseweg abhängt (Khelifaoui et al., 2009; Laakkonen et al., 2009; Lamaze et al., 2001), war es überraschend, dass sowohl unterschiedliche Endozytosemechanismen, als auch die Prozessierung von Antigenen in den Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC nicht beeinflusst wurden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Regulation der Endozytose durch RhoA indirekt verläuft, möglicherweise über einen "Cross-Talk" zwischen dem RhoA- und dem Rac/Cdc42-Signalweg. Da die Aktivitäten von Rac und Cdc42 in den Myo9b<sup>-/-</sup> Zellen unverändert war, könnten sie funktional gegenüber der erhöhten RhoA-Aktivität während der Endozytose kompensatorisch wirken. Diese Hypothese unterstützend wurde gezeigt, dass *Pasteurella multocida*-Toxin (PMT) RhoA in DC stimuliert, die Rac-Aktivität und die Makropinocytose aber nicht beeinflusst (Blöcker et al., 2006). Andere Inhibitoren wiederum, wie *Clostridium difficile* Toxin B, blockieren die Endozytose komplett, indem sie Rho, Rac und Cdc42 inhibieren (Yanagawa et al., 2003).

Myo9b scheint auch keine Funktion hinsichtlich der stimulierungsabhängigen Aufregulation von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen auszuüben. In Übereinstimmung damit, konnte die Expression von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen auf DC über eine Inhibition des durch Myo9b regulierten Signalmoleküls RhoA durch C3 nicht beeinflusst werden (Kobajashi et al., 2001). Dies zeigt, dass Myo9b über RhoA zwar maßgeblich an der Migration von DC beteiligt ist, nicht aber an der Expression von Oberflächenmolekülen und an Endozytosemechanismen, was den selektiven Phänotyp von Myo9b<sup>-/-</sup> DC unterstreicht.

#### 4.2.4 Der Verlust von Myo9b reduziert die T-Zellaktivierung und führt zu einer veränderten DC/T-Zellinteraktion

Eine effiziente T-Zellaktivierung erfordert eine effiziente Interaktion von antigenspezifischen T-Zellen mit APC und geht einher mit der Ausbildung einer hoch organisierten IS (Bromley et al., 2001; Sims and Dustin, 2002). Nach wie vor wird äußerst kontrovers diskutiert, inwiefern die Dauer der APC/T-Zellinteraktion das Ausmaß der T-Zellstimulierung bestimmt. Während einige Studien zeigen, dass für eine maximale T-Zellaktivierung verlängerte APC/T-Zellkontakte notwendig sind (Benvenuti et al., 2004; Hugues et al., 2004), zeigen andere, dass eine längere DC/T-Zellinteraktion zu einer verringerten T-Zellaktivierung und damit Proliferation führt (Balkow et al., 2007; Balkow et al., 2010). Die hier erhobenen Daten, dass ein Verlust von Myo9b *in vitro* in 3D-Kollagengelen eine erhöhte Anzahl an langen DC/T-Zellkontakten und auch *in vivo* eine reduzierte T-Zellproliferation zur Folge hat, unterstützen die Kernaussagen der letzteren Studien. Während Balkow et al. (2007) allerdings postulierten, dass die verlängerte Kontaktzeit zwischen DC und T-Zelle die Expansion Foxp3<sup>+</sup> Tregs begünstigt, kam es in den hier gezeigten Ergebnissen in den Kokulturen mit Myo9b<sup>-/-</sup> DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zu einer Expansion dieser Treg-Population. Dies zeigt, dass lange DC/T-Zellkontakte allein nicht unbedingt zur Induktion bzw. Expansion von Foxp3<sup>+</sup> Tregs führen.

Auf den ersten Blick scheint der Hauptgrund für die durch Myo9b<sup>-/-</sup> DC im Vergleich zu WT DC induzierte reduzierte T-Zellaktivierung im 3D-Kollagensystem die beeinträchtigte DC-Migration zu sein. Schaut man sich allerdings die Interaktion der knock-out versus WT DC mit den kokultivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauer an, findet man innerhalb der gleichen Zeitspanne bedeutend mehr T-Zellinteraktionen mit einer WT DC, als mit einer Myo9b<sup>-/-</sup> DC. Gleichzeitig tritt aber auch eine erhöhte Frequenz an langen DC/T-Zellkontakten zwischen Myo9b<sup>-/-</sup> DC und T-Zellen auf. Demnach ist die Anzahl der mit den DC interagierenden T-Zellen für ein effizientes T-Zellpriming wichtiger, als die Dauer der Interaktion. Zu Gunsten dieser These sprechen auch die Daten von Kobajashi et al. (2001), wonach in Folge einer Inhibition von Rho in DC durch C3-Toxin weniger T-Zellen mit diesen DC interagierten und es zu einer vergleichsweise geringeren T-Zellproliferation kam.

Aus den verlängerten Myo9b<sup>-/-</sup> DC/T-Zellkontaktzeiten lässt sich außerdem schlussfolgern, dass das Zytoskelett der APC (und nicht nur die Antigen-spezifität und

der Aktivierungszustand der T-Zelle) die Dauer der APC-T-Zellinteraktion an der IS mitbestimmt.

Man kann sich außerdem vorstellen, dass die verlängerte Myo9b<sup>-/-</sup> DC/T-Zellinteraktion eine Konsequenz unzureichender T-Zellaktivierungssignale ist, die seitens der DC über Oberflächenmoleküle in der IS bereitgestellt werden. Somit müssten die Myo9b<sup>-/-</sup> DC-T-Zellinteraktionen länger sein, um diese Aktivierungssignale zu akkumulieren. Wie bereits von Kobajashi et al. (2001) gezeigt wurde, konnten auch hier keine Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen zwischen WT und Myo9b<sup>-/-</sup> DC festgestellt werden. Aber was macht die Myo9b<sup>-/-</sup> DC in der DC-T-Zellinteraktion so adhäsiv? In der FACS-Analyse wurden in der Expression von MHCII- und Adhäsionsmolekülen (CD11a, CD54) keine Unterschiede gefunden. Man könnte sich aber vorstellen, dass in der Wt-IS die MHCII-Moleküle mit dem TCR einen organisierten cSMAC ausbilden und es in den Myo9b<sup>-/-</sup> DC/T-Zellkokulturen nicht zur Ausbildung einer organisierten IS kommt. Zusammen mit der ebenfalls reduzierten F-Aktinkonzentration an der IS könnte dies ein Grund für die gestörte Kommunikation zwischen Myo9b<sup>-/-</sup> DC und T-Zellen sein, da bereits gezeigt wurde, dass die Polarisierung des Aktin-Zytoskelett seitens der DC essentiell für die Ausbildung der IS ist (Al-Alwan et al, 2001). Diese Ergebnisse implizieren weiterhin, dass die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, durch Myo9b die Ausbildung der IS und ihrer Signalstärke maßgeblich beeinflusst. Welche Rolle das Aktin-bindende Protein Cofilin in DC bei der Ausbildung der IS spielt, ist momentan nicht bekannt. Da Cofilin aber im Allgemeinen verantwortlich ist für den Umsatz und die Reorganisation von Aktin-Filamenten (Bamburg et al., 1999; Svitkina et al., 1999), soll in weiteren Untersuchungen an Hand von konfokalen LSM-Aufnahmen geklärt werden, ob Cofilin direkt mit der IS assoziiert ist oder indirekt über Myo9b auf die Ausbildung der IS wirkt. Bisher bekannt ist, dass in humanen DC im Zuge der Maturierung aktives Cofilin vom Zytoplasma in die Zellmembran umgelagert wird und inaktives phosphoryliertes Cofilin kaum noch vorhanden ist (Verdijk et al., 2004). Für Podozyten konnte gezeigt werden, dass Cofilin unter normalen homöostatischen Bedingungen dephosphoryliert und aktiv vorliegt. Während einer glomerulären Nierenerkrankung wird es aber verstärkt phosphoryliert und damit inaktiviert und vom Zytoplasma in den Nukleus der Podozyten transloziert. Dies verhindert, dass Cofilin an F-Aktin bindet und eine Umorganisation des Zytoskeletts veranlasst (Ashworth et al., 2010). Da in den Myo9b-defizienten DC Cofilin auch verstärkt vorliegt, kann man

sich hier ein ähnliches Szenario vorstellen: Phosphoryliertes Cofilin wird in den Kern umgelagert, oder zumindest nicht in die Zellmembran und kann demnach dort nicht an der Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts mitwirken.

Für eine genauere Analyse der Rolle von Cofilin in der DC/T-Zellinteraktion könnte man auch aus Cofilin-defizienten Mäusen DC generieren und ihre Interaktion mit T-Zellen und ihr T-Zellstimulierungspotential untersuchen.

## **4.3 Rolle von LFA-1**

Die Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen durch DC ist Voraussetzung für die erfolgreiche Induktion einer adaptiven Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LFA-1 auf DC in einem inaktiven Status vorliegen muss, um eine optimale T-Zellaktivierung zu gewährleisten. Die Regulation der LFA-1-Aktivität erlaubt es den DC, die T-Zellproliferation aktiv zu kontrollieren und effektive Immunantworten auszulösen.

### **4.3.1 Aktives LFA-1 auf DC führt zu einer verlängerten Interaktion mit T-Zellen**

Frühere Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Ausbildung langer Kontakte zwischen T-Zellen und antigen-beladenen DC für die T-Zellaktivierung und die klonale Expansion obligatorisch ist (Celli et al. 2007; Scholer et al. 2008). Eine hohe TCR-Dichte (Grakoui et al., 1999) aber auch die Stärke der Antigensignale werden in Betracht gezogen, die DC/T-Zellinteraktion zu beeinflussen, während hoch-affine nicht aber niedrig-affine Peptid-MHC Moleküle auf DC verlängerte Kontakte induzieren (Skokos et al., 2007). Außerdem korrelierte auch die Antigenendosis mit der Dauer der T-Zell/APC-Interaktion und mit der T-Zellproliferation (Henrickson et al., 2008). In Anwesenheit von niedrigen Antigen-Dosen auf DC sind die T-Zellen sehr beweglich und gehen viele kurze Kontakte hintereinander mit verschiedenen DC ein (Henrickson et al., 2008), was zu einer Akkumulation der Signale führen könnte (Bajenoff et al., 2002; Celli et al., 2005; Faroudi et al., 2003). Ebenso wie die Aktivierung von Mac-1 einen Effekt auf die DC/T-Zellinteraktionszeit hatte (Varga et al., 2007), konnte auch in dieser Arbeit demonstriert werden, dass aktives LFA-1 auf DC einen T-Zell-Arrest induziert. Die Expression von aktivem LFA-1 regulierte die Ausbildung langer nicht aber kurzer Kontakte und impliziert, dass LFA-1 auf DC für kurze antigenspezifische T-Zellinteraktionen entbehrlich ist. Ähnliche Beobachtungen

wurden auch zuvor schon *in vivo* gemacht, die zeigen, dass die ICAM-1 Expression maturer DC entscheidend für lang anhaltende Kontakte mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist, während kurze Kontakte dadurch nicht beeinflusst wurden (Scholer et al., 2008). Die hier erhobenen Daten implizieren weiterhin, dass aktives LFA-1 auf DC nicht zu einer unkontrollierten Adhäsion an ICAM-1-tragende Zellen führt, sondern vielmehr spezifisch die Anzahl langanhaltender DC/T-Zellkontakte erhöht.

#### **4.3.2 LFA-1 muss auf DC inaktiv vorliegen, um eine effektive T-Zellaktivierung und Proliferation zu induzieren**

Im Gegensatz zu anderen Berichten, wurde hier gezeigt, dass die Ausbildung verlängerter DC/T-Zellkontakte negativ mit der antigen-spezifischen T-Zellproliferation korreliert. Dies suggeriert, dass die Ausbildung langer DC/T-Zellkontakte allein nicht ausreichend ist für eine produktive T-Zellaktivierung. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die exakte Dauer langlebiger Kontakte *in vivo* schwierig zu bestimmen scheint und von 6 Stunden bis hin zu einigen Tagen dauern kann (Celli et al., 2007; Mempel et al., 2004; Scholer et al., 2008). Wenn nicht die Kontaktzeit zwischen APC und T-Zelle über eine erfolgreiche T-Zellaktivierung entscheidet, könnte die LFA-1 vermittelte Signaltransduktion in den DC den "Cross-Talk" mit den T-Zellen während der Antigenpräsentation beeinflussen. Es zeigte sich bereits, dass eine CD80/86 abhängige Voraktivierung von T-Zellen durch DC die Ausbildung stabiler DC/T-Zellkontakte und die nachgeschaltete T-Zellproliferation begünstigt (Rothoef et al., 2006). Alternativ dazu könnte es für eine erfolgreiche T-Zellaktivierung –und Proliferation auch nötig sein, dass die T-Zellen sich wieder von der DC lösen, was impliziert, dass die DC/T-Zelladhäsion transient sein muss. *In vivo* wurde ein Zusammenhang zwischen der T-Zellablösung von antigen-tragenden DC und der T-Zellteilung beobachtet (Stoll et al., 2002). Darüber hinaus konnte die T-Zellstimulationskapazität und die Interaktionszeit der LFA-1<sup>d/d</sup> DC durch eine Vorbehandlung mit inhibitorischen CD11a (FD441.8) oder CD18 (GAME46) Antikörpern wiederhergestellt werden, was die Wichtigkeit einer T-Zellablösung unterstreicht. Außerdem unterstützen diese Daten die Ergebnisse der DC-Phänotypisierung und zeigen, dass die reduzierte T-Zellaktivierung durch LFA-1<sup>d/d</sup> DC nicht von einem unreifen DC-Phänotyp oder einer veränderten DC-Funktion resultieren.



Weiterhin ist auch bekannt, dass die Integrin-vermittelte Signaltransduktion die Zellteilung reguliert (Aszodi et al., 2003; Geginat et al., 1999; Reverte et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit führte die Expression von aktivem LFA-1 auf DC zu einer Akkumulation von T-Zellen auf der DC-Oberfläche, was zeigt, dass eine fehlende LFA-1 Deaktivierung ein Stop-Signal induziert, welches die T-Zellen davon abhält, sich von der APC zu lösen. Für aktives LFA-1 auf T-Zellen wurde bereits gezeigt, dass es ihre Ablösung von Endothelzellen inhibiert und so migrierende T-Zellen zum Halten bringt (Semmrich et al., 2005). Die Erkennung von MHCII Peptidkomplexen durch T-Zellen fixiert LFA-1 in seiner hoch-affinen Konformation (Dustin et al., 1997), was ein Stop-Signal induziert, das die DC/T-Zellinteraktion stabilisiert. Außerdem ist auch bekannt, dass die Termination des TCR-Signalling die T-Zellablösung von der APC begünstigt (Celli et al., 2007). Zusammengefasst weisen diese Daten auf eine bedeutende Rolle der LFA-1/ICAM-1 vermittelten T-Zellablösung von den DC hin und suggerieren, dass die dynamische Regulation der LFA-1 Aktivität auf DC ihren Kontakt mit T-Zellen kontrolliert und die antigenspezifische T-Zellproliferation beeinflusst.

#### **4.3.3 Aktives LFA-1 führt zu einer reduzierten Th1 Polarisierung gefolgt von einer reduzierten DTH-Antwort**

Die Ausbildung langdauernder Kontakte zwischen antigen-tragenden DC und naiven T-Zellen fördert *in vivo* die IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion durch aktivierte T-Zellen (Celli et al., 2005; Mempel et al., 2004). Außerdem wurde auch beschrieben, dass die IFN- $\gamma$  Freisetzung durch CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen von ICAM-1 abhängigen stabilen DC/T-Zellkontakten abhängt (Scholer et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktives LFA-1 auf DC intrazelluläre IL-2 und IFN- $\gamma$  Level negativ beeinflusst, während es langanhaltende DC/T-Zellinteraktionen induziert. Passend dazu war die mRNA Expression Th1-induzierter Gene spezifisch reduziert. Da die Th1-Effektorfunktion unter anderem darin besteht, DTH-Reaktionen zu unterstützen, wurde nachfolgend auch eine reduzierte DTH- Antwort nach Transfer von LFA-1<sup>d/d</sup> DC beobachtet. Diese Ergebnisse implizieren, dass nicht nur die verlängerte Kontaktzeit, sondern vielmehr auch die defekte LFA-1 Deaktivierung zu einer reduzierten T-Zellaktivierung durch LFA-1<sup>d/d</sup> DC beitragen. Im Gegensatz dazu schien die Generation von Th2 –und Treg Zellen *in vitro* unbeeinträchtigt durch aktives LFA-1 auf DC. Demnach induziert die Expression aktiven LFA-1 *per se* keine Treg. Dies bestätigt frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Expression

aktiver  $\beta 2$ -Integrine auf DC die Proliferation  $CD4^+CD25^+$  Treg nicht beeinflusst (Varga et al., 2007). Weiterhin implizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass die Induktion von verlängerten DC/T-Zellkontakten nicht der einzige Faktor ist, der die Generation von Tregs kontrolliert, wie es auch schon für die Interaktion von T-Zellen mit naiven B-Zellen gezeigt wurde (Reichardt et al., 2007).

#### **4.3.4 CYTIP kontrolliert die DC/T-Zellinteraktion indem es die LFA-1 Aktivität in DC reguliert**

Frühere Publikationen suggerierten, dass die DC/T-Zellbindung die Zusammenlagerung von inaktivem LFA-1 auf der DC-Membran einleitet (van Gisbergen et al., 2005). Es blieb aber unklar, wie die Deaktivierung von LFA-1 in DC zu Stande gebracht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde durch den „knockdown“ von CYTIP in maturen DC die Anzahl langer Kontakte mit T-Zellen erhöht und gleichzeitig die T-Zellproliferation reduziert. Dies geschah in Abhängigkeit von LFA-1, denn die Zugabe von inhibitorischen anti-LFA-1 Antikörpern hob diesen Effekt wieder auf. Demnach fungiert CYTIP als Regulator der LFA-1 Aktivität in DC, indem es die DC/T-Zellablösung kontrolliert und somit eine effektive T-Zellproliferation ermöglicht. Im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten zeigten Hofer et al (2006), dass ein CYTIP-knockdown in DC zu einem geringeren  $CD8^+$  T-Zellpriming führte, aber nur wenn ein kleiner Teil der DC mit Antigen beladen wurde. Wurden alle DC mit Antigen beladen, wurde eine leicht erhöhte T-Zellproliferation durch CYTIP-knockdown DC induziert. Dies impliziert, dass während einer effektiven DC/T-Zellinteraktion stabilere Kontakte mit CYTIP-knockdown DC die T-Zellproliferation positiv regulieren. Die Unterschiede zu den hier gezeigten Daten resultieren vermutlich aus dem unterschiedlichen Versuchsaufbau beider Studien. Während die Daten von Hofer et al in einem 2D-System erhoben wurde, wurden die hier gezeigten Daten in einer 3D-Umgebung durchgeführt, welche die aktive Aufnahme von Zell-Zellkontakten erlaubt und der DC/T-Zellinteraktion in einem Lymphknoten *in vivo* ähnelt (Gunzer et al. 2000; Gunzer et al, 2004). Desweiteren wurden die Versuche von Hofer et al mit  $CD8^+$  T-Zellen durchgeführt, während die hier gezeigten Daten mit  $CD4^+$  T-Zellen durchgeführt wurden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Analyse der Interaktion zwischen DC und T-Zellen

Die vergleichende Analyse des DC/T-Zellinteraktionsverhaltens von BMDC und der DC-Linie SP37A3 ergab, dass beide DC-Arten jeweils durch verschiedene Stimuli aktiviert werden können und in der Lage sind, transgene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Bei der genaueren Untersuchung der DC/T-Zellinteraktion im Kollagengel gingen beide DC-Arten weniger Kontakte zu T-Zellen ein, wenn sie zuvor mit Antigen beladen wurden und zeigten auch ansonsten vergleichbare Interaktionscharakteristika hinsichtlich der medianen Kontaktzeiten. Im Gegensatz zur Kokultur mit naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen bildeten sowohl BMDC als auch SP37A3 im stimulierten Zustand mit nTregs große Zellaggregate und vermehrt lange Kontakte aus, wohingegen beide DC-Arten im unreifen Stadium mit keiner der beiden T-Zellpopulationen Aggregate ausbildeten. In fortführenden Studien sollte die Rolle verschiedener Adhäsionsmoleküle für die DC-/T-Zell-Aggregationsbildung untersucht werden. Zunächst könnte man Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und andere  $\beta 2$ -Integrine und bekannte integrinbindende Rezeptoren wie ICAM-1 in den Aggregaten anfärben. Für kolokalisierte Rezeptorpärchen könnte man durch Präinkubation mit rezeptorblockierenden Antikörpern klären, ob dadurch die DC-/T-Zell-Aggregatbildung per se verhindert werden kann oder sich bereits vorhandene Aggregate wieder lösen, wenn die Antikörper erst zur Kokultur hinzugegeben werden.

In einem immunsuppressiven Milieu, in welchem im direkten Vergleich die Interaktion von iSP37A3, DexSP37A3 und mSP37A3 mit naiven T-Zellen untersucht wurde, fand man in der ersten Interaktionsphase eine deutlich höhere Interaktionszeit zwischen mSP37A3 und T-Zellen. In diesem Ansatz wurde auch an jedem Tag der höchste Prozentsatz neu generierter iTregs identifiziert. Gleichzeitig wurde aber in den Kokulturen mit DexSP37A3 ein höherer Anteil GARP-positiver Tregs detektiert, was dafür spricht, dass die in diesem Ansatz generierten Tregs aktiviert sind und ihre Suppressoraktivität ausüben können. Diese Hypothese sollte in weiterführenden Studien anhand positiv sortierter EGFP<sup>+</sup> iTregs überprüft werden, die aus den verschiedenen DC-/T-Zell-Kokulturansätzen isoliert und komparativ in

Suppressionstesten eingesetzt werden. Durch lentivirale Überexpression koinhibitorischer Moleküle in DC (wie z.B. PD-L1, ICOS-Ligand, B7-H3, B7-H4) könnte man weiterhin prüfen, inwieweit diese Moleküle einen Einfluß auf die Interaktion zwischen DC und T-Zellen und die Toleranzinduktion haben.

## 5.2 Rolle von Myosin 9b

In dieser Arbeit wurde auch die Rolle von Myo9b für die Funktion von DC und deren Interaktion mit T-Zellen und der daraus resultierenden Induktion einer adaptiven Immunantwort untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl Knochenmarks-abgeleitete DC, als auch primäre DC aus der Milz von Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber Wt DC in einer 3D-Kollagenmatrix eine deutlich reduzierte Migrationskapazität aufwiesen. Damit übereinstimmend war die *in vivo*-Migration von dermalen DC in Myo9b<sup>-/-</sup> Mäusen stark vermindert, was wahrscheinlich zu der im Vergleich zu Wt Mäusen viel niedrigeren Ohrschwellung in einem CHS-Model führte. Das T-Zellstimulierungspotential von Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC war *in vitro* in einem Flüssigkultursystem unbeeinträchtigt, aber *in vivo* und *in vitro* in einer 3D-Kollagenmatrix, unter Bedingungen, in denen die T-Zellaktivierung DC-Migration erfordert wurde eine deutlich geringere T-Zellproliferation induziert, als durch Wt BMDC. Eine genauere Untersuchung der jeweiligen Interaktion zwischen BMDC der beiden Genotypen mit T-Zellen in einem Kollagengel ergab, dass Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC deutlich weniger Kontakte mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen insgesamt eingingen, dafür aber mehr lange Kontakte ausbildeten, als Wt DC. Gleichzeitig zeigte sich in der immunologischen Synapse (IS) zwischen Wt BMDC und T-Zellen eine stärkere Akkumulation von F-Aktin auf der DC-Seite als bei T-Zell-kontaktierenden Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC. Weitere Untersuchungen zur Akkumulation von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen in der IS durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie könnten Aufschluss über die gestörte Kommunikation zwischen Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC und T-Zellen geben.

Da Myo9b die Aktivität des G-Proteins Rho negativ reguliert, wurde untersucht, inwieweit Rho-regulierte Kinasen und -Effektormoleküle an diesen DC-Dysfunktionen beteiligt sind. Hierbei zeigte sich, dass sowohl RhoA, als auch seine Ziel-Moleküle MLC und Cofilin verstärkt phosphoryliert vorliegen. Die Zugabe eines LIMK-Inhibitors, welcher die Phosphorylierung von Cofilin verhindert, konnte die Migrationsgeschwindigkeit der Myo9b<sup>-/-</sup> BMDC auf Wt- Geschwindigkeit anheben und

deutet somit auf eine Schlüsselrolle von Cofilin unter der Kontrolle von Myo9b innerhalb des Rho-Signaltransduktionsweges hin. Somit kontrolliert Myo9b über die Regulation des Rho-Signaltransduktionsweges die Migration und das T-Zellstimulierungspotential von DC. Der Verlust von Myo9b stört aber nicht generell alle Aktin-abhängigen Prozesse in der Zelle, da sowohl die Endozytose als auch die Prozessierung von Antigenen in den Myo9b-defizienten DC nicht verändert waren. Basierend auf diesen Ergebnissen und der Beobachtung, dass Myo9b eine Rolle bei entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen spielt (Monsuur et al., 2005; Persengiev et al., 2010), ist es für die Zukunft von Interesse, inwieweit eine Dysregulation bzw. -funktion von Myo9b die Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beeinflusst. Weiterhin könnte man auch seine Rolle hinsichtlich Immunreaktionen gegen Infektionen und allergische Reaktionen, die durch DC vermittelt werden, untersuchen. Dies soll anhand von CD11c-spezifischen Myo9b knock-out Mäusen durchgeführt werden. Als generellen therapeutischen Ansatz bei Autoimmunerkrankungen könnte man Myo9b auch gezielt über siRNA oder DC-adressierende Nanopartikel inhibieren, was zur Wiederherstellung oder Verbesserung der peripheren Toleranz beitragen könnte.

### 5.3 Rolle von LFA-1

Neben der Rolle des intrazellulären Motorproteins Myo9b wurde in dieser Arbeit auch die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls LFA-1 für DC-Funktionen untersucht. Dabei kamen LFA-1<sup>d/d</sup> Mäuse zum Einsatz, deren Lymphozyten konstitutiv aktives LFA-1 exprimieren. LFA-1<sup>d/d</sup> BMDC zeigten eine vermehrte Ausbildung langer Zellkontakte mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, induzierten aber eine reduzierte T-Zellproliferation und eine geringere Differenzierung zu Th1-Effektorzellen. Durch die Inhibition von aktivem LFA-1 auf den DC mittels blockierender Antikörper konnte eine Normalisierung der Interaktionsparameter und T-Zellproliferation auf Wildtyp-Niveau wiederhergestellt werden. Dies zeigt, dass für eine effektive T-Zellaktivierung inaktives LFA-1 benötigt wird. Durch ein Ausschalten von CYTIP in Wt DC und dem damit einhergehenden Verlust der Deaktivierbarkeit von LFA-1 über Cytohesin wurde ebenfalls eine erhöhte Interaktionszeit mit T-Zellen und eine reduzierte T-Zellproliferation beobachtet. Dies bestätigt, dass die Kontrolle des CYTIP-abhängigen LFA-1 Aktivierungsstatus auf DC eine Schlüsselrolle einnimmt, und dass DC über diesen Mechanismus ihre

Interaktion mit T-Zellen regulieren, was eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zellaktivierung darstellt. Um die Rolle des LFA-1 Aktivierungsstatus auf DC *in vivo* genauer zu untersuchen, wäre die Generierung CD11c-spezifischer LFA-1<sup>d/d</sup> Mäuse sinnvoll. Anhand verschiedener Krankheitsmodelle (Infektionsmodelle, Autoimmunerkrankungen, Tumormodelle) könnte man anhand dieser Mäuse die Notwendigkeit einer Deaktivierung von LFA-1 auf DC weiter erörtern. Auch eine Analyse von DC aus LAD (*Leukocyte Adhesion Deficiency*) I Patienten, deren Leukozyten eine defekte Adhäsion an Endothelien aufweisen und damit einhergehend an immer wiederkehrenden bakteriellen Infektionen leiden (Hanna and Etzioni, 2012), wäre im direkten Vergleich mit LFA-1<sup>d/d</sup> DC interessant. Dabei könnte man untersuchen, ob diese DC überhaupt mit T-Zellen interagieren können und wie die Interaktionsparameter im Vergleich zu Wt und LFA-1<sup>d/d</sup> DC verändert sind.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|                                                |                                                            |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 7-AAD                                          | 7-Aminoactinomycin                                         |
| Ag                                             | Antigen                                                    |
| AOO                                            | Aceton Olivenöl                                            |
| APC                                            | Antigenpräsentierende Zelle                                |
| APC                                            | Allophycocyanin                                            |
| BSA                                            | bovines Serumalbumin                                       |
| CBA                                            | <i>cytometric bead array</i>                               |
| CCR7                                           | Chemokinrezeptor 7                                         |
| CD                                             | <i>cluster of differentiation</i>                          |
| cDC                                            | konventionelle DC                                          |
| CFSE                                           | <i>5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i> |
| C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> | Natrium-Acetat                                             |
| C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> | Natriumpyruvat                                             |
| CHS                                            | Kontakthypersensibilisierung                               |
| CLIP                                           | <i>class II-associated invariant chain peptide</i>         |
| CTL                                            | zytotoxischer Lymphozyt                                    |
| CTLA-4                                         | <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>                    |
| CYTIP                                          | Cytohesin-1-interagierendes Protein                        |
| DC                                             | Dendritische Zelle(n)                                      |
| dDC                                            | dermale DC                                                 |
| DMSO                                           | Dimethylsulfoxid                                           |
| DNS                                            | Desoxyribunocleinsäure                                     |
| DT                                             | Diphtherietoxin                                            |
| EGFP                                           | <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>                  |
| ER                                             | Endoplasmatisches Retikulum                                |
| FACS                                           | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter                          |
| FCS                                            | fötales Kälberserum                                        |
| FITC                                           | Fluorescein-isothiocyanat                                  |
| FOXP3                                          | Forkhead Box Protein 3                                     |
| GARP                                           | <i>Glycoprotein A Repetitions Predominant</i>              |
| GITR                                           | Glucocorticoid -Induzierter Tumornekrosefaktor Rezeptor    |

|                                  |                                                       |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| GMCSF                            | Granulozyten-Monozyten-Kolonien-Wachstumsfaktor       |
| HLA                              | <i>human leukocyte antigen</i>                        |
| IFN                              | Interferon                                            |
| IL                               | Interleukin                                           |
| Ig                               | Imunoglobulin                                         |
| i.p.                             | intraperitoneal                                       |
| IS                               | immunologische Synapse                                |
| ITAM                             | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| iTreg                            | induzierbare regulatorische T Zelle                   |
| i.v.                             | intravenös                                            |
| LAT                              | <i>linker of activation in T-cells</i>                |
| LC                               | Langerhans Zelle                                      |
| MACS                             | Magnetische Zell Separation                           |
| MHC                              | Haupthistokompatibilitätskomplex                      |
| MLR                              | <i>mixed lymphocyte reaction</i>                      |
| MTOC                             | <i>microtubule organizing centre</i>                  |
| NEAA                             | Non Essential Amino Acids                             |
| NFAT                             | <i>nuclear factor of activated T-cells</i>            |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                        |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | Natriumcarbonat                                       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Natriumhydrogenphosphat                               |
| NaHCO <sub>3</sub>               | Natriumhydrogencarbonat                               |
| NaN <sub>3</sub>                 | Natriumazid                                           |
| nTreg                            | natürlich vorkommende regulatorische T Zelle          |
| n.s.                             | nicht signifikant                                     |
| OVA                              | Ovalbumin                                             |
| PBS                              | <i>phosphate buffered saline</i>                      |
| pDC                              | plasmazytoide DC                                      |
| PE                               | Phycoerythrin                                         |
| RAG                              | <i>recombination activation genes</i>                 |
| s.c.                             | subcutan                                              |
| SMAC                             | supramolekulerer Aktivierungscluster                  |
| TAP                              | <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| TCR                              | T-Zellrezeptor                                        |



|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| TGF- $\beta$ | <i>tumor growth factor betta</i>     |
| Th           | T-Helfer Zelle                       |
| TLR          | Toll-like-Rezeptor                   |
| TNCB         | 2, 4, 6-Trinitro-1-Chlorobenzol      |
| TNF          | Tumornekrosefaktor                   |
| Tr1          | T regulatory Typ1                    |
| Treg         | regulatorische T-Zelle               |
| ZAP          | $\zeta$ -Ketten-assoziiertes-Protein |

## 7 Literatur

- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A. et al. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 4 (4):367-373, 2001.
- Al-Alwan, M. M., Rowden, G., Lee, T. D. G. et al. Cutting Edge: The Dendritic Cell Cytoskeleton Is Critical for the Formation of the Immunological Synapse. *J Immunol* 166 (3):1452-1456, 2001.
- Al-Alwan, M. M., Liwski, R. S., Haeryfar, S. M. M. et al. Cutting Edge: Dendritic Cell Actin Cytoskeletal Polarization during Immunological Synapse Formation Is Highly Antigen-Dependent. *J Immunol* 171 (9):4479-4483, 2003.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M. et al. Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via  $\alpha_v\beta_5$  and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188 (7):1359-1368, 1998.
- Albert, M. L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392 (6671):86-89, 1998.
- Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T. et al. Epidermal Viral Immunity Induced by CD8a<sup>+</sup> Dendritic Cells But Not by Langerhans Cells. *Science* 301 (5641):1925-1928, 2003.
- Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M. et al. Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T-cells. *Immunity* 29 (5):795-806, 2008.
- Ashworth, S., Teng, B., Kaufeld, J. et al. Cofilin-1 Inactivation Leads to Proteinuria - Studies in Zebrafish, Mice and Humans. *PLoS ONE* 5 (9):e12626, 2010.
- Aszodi, A., Hunziker, E. B., Brakebusch, C. et al. Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes & Development* 17 (19):2465-2479, 2003.
- Bajenoff, M., Wurtz, O. and Guerder, S. Repeated Antigen Exposure Is Necessary for the Differentiation, But Not the Initial Proliferation, of Naive CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol* 168 (4):1723-1729, 2002.
- Balkow, S., Krux, F., Loser, K. et al. Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells. *Blood* 110 (12):3949-3958, 2007.
- Balkow, S., Heinz, S., Schmidbauer, P. et al. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood* 116 (11):1885-1894, 2010.
- Bamburg, J. R., McGough, A. and Ono S. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends in Cell Biology* 9 (9):364-370, 1999.

Banchereau, J. and Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673):245-252, 1998.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C. et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18 (1):767-811, 2000.

Barker, T. H., Grenett, H. E., MacEwen, M. W. et al. Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Experimental Cell Research* 295 (2):488-496, 2004.

Bähler, M. and Rhoads, A. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Letters* 513 (1):107-113, 2002.

Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J. et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10 (5):488-495, 2009.

Belz, G. T., Smith, C. M., Kleinert, L. et al. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (23):8670-8675, 2004.

Belz, G. T., Smith, C. M., Eichner, D. et al. Cutting Edge: Conventional CD8a+ Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming CTL Immunity to Viruses. *J Immunol* 172 (4):1996-2000, 2004.

Bennett, C. L., van Rijn, E., Jung, S. et al. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *The Journal of Cell Biology* 169 (4):569-576, 2005.

Bennett, C. L., Noordegraaf, M., Martina C. A. et al. Langerhans Cells Are Required for Efficient Presentation of Topically Applied Hapten to T Cells. *J Immunol* 179 (10):6830-6835, 2007.

Benvenuti, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Grandjean, I. et al.. Dendritic Cell Maturation Controls Adhesion, Synapse Formation, and the Duration of the Interactions with Naive T Lymphocytes. *J Immunol* 172 (1):292-301, 2004.

Block, J., Stradal, T. E. B., Hänisch, J. et al. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *Journal of Microscopy* 231 (3):506-517, 2008.

Blöcker, D., Berod, L., Fluhr, J. W., et al. Pasteurella multocida toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. *International Immunology* 18 (3):459-464, 2006.

Boehm, T., Hofer, S., Winklehner, P. et al. Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J* 22 (5):1014-1024, 2003.

Boyton, R. J. and Altmann, D. M. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in Immunology* 23 (11):526-529, 2002.

- Brachet, V., Raposo, G., Amigorena, S. et al. Ii Chain Controls the Transport of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules to and from Lysosomes. *The Journal of Cell Biology* 137 (1):51-65, 1997.
- Bromley, S. K., Iaboni, A., Davis, S. J. et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2 (12):1159-1166, 2001.
- Bros, M., Jährling, F., Renzing, A. et al. A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood* 109 (9):3820-3829, 2007.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A. et al. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur.J.Immunol.* 35 (6):1741-1753, 2005.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27 (1):68-73, 2001.
- Bursch, L. S., Wang, L., Igyarto, B. et al. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J.Exp.Med.* 204 (13):3147-3156, 2007.
- Cambi, A., Joosten, B., Koopman, M. et al. Organization of the Integrin LFA-1 in Nanoclusters Regulates Its Activity. *Molecular Biology of the Cell* 17 (10):4270-4281, 2006.
- Carey, K. D., Dillon, T. J., Schmitt, J. M. et al. CD28 and the Tyrosine Kinase Lck Stimulate Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in T Cells via Inhibition of the Small G Protein Rap1. *Molecular and Cellular Biology* 20 (22):8409-8419, 2000.
- Carlier, M. F. and Pantaloni, D. Control of Actin Assembly Dynamics in Cell Motility. *Journal of Biological Chemistry* 282 (32):23005-23009, 2007.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V. et al. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388 (6644):782-787, 1997.
- Celli, S., Garcia, Z. and Bousso, P. CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo. *J.Exp.Med.* 202 (9):1271-1278, 2005.
- Celli, S., Lemaître, F. and Philippe Bousso. Real-Time Manipulation of T Cell-Dendritic Cell Interactions In Vivo Reveals the Importance of Prolonged Contacts for CD4+ T Cell Activation. *Immunity* 27 (4):625-634, 2007.
- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R. et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* 11 (6):527-534, 2010.
- Charras, G. and Paluch, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9):730-736, 2008.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N. et al. Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 198 (12):1875-1886, 2003.

- Chen, Z., Laurence, A. and O'Shea, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in Immunology* 19 (6):400-408, 2007.
- Cheong, C., Matos, I., Choi J. H. et al. Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas. *Cell* 143 (3):416-429, 2010.
- Chieriegatti, E., Gartner, A., Stoffler, H. E. et al. Myr 7 is a novel myosin IX-RhoGAP expressed in rat brain. *Journal of Cell Science* 111 (24):3597-3608, 1998.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M. et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J.Exp.Med.* 206 (13):3089-3100, 2009.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5 (12):1219-1226, 2004.
- Croft, M. and Swain, S. L. B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J Immunol* 146 (12):4055-4064, 1991.
- Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30 (5):626-635, 2009.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H. et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nat Immunol* 9 (12):1347-1355, 2008.
- den Haan, J. M. M., Lehar, S. M. and Bevan, M. J. Cd8+ but Not Cd8- Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J.Exp.Med.* 192 (12):1685-1696, 2000.
- Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z. et al. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (8):3909-3913, 1997.
- Dustin, M. L., Tseng, S. Y., Varma, R. et al. T cell/dendritic cell immunological synapses. *Current Opinion in Immunology* 18 (4):512-516, 2006.
- Edelson, B. T., Wumesh, KC., Juang, R. et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8a+ conventional dendritic cells. *J.Exp.Med.* 207 (4):823-836, 2010.
- Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D. et al. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27 (9):2417-2425, 1997.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Current Opinion in Cell Biology* 15 (1):67-72, 2003.
- Euteneuer, U. and Schliwa, M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* 310(5972):58-61,1984.

- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L. et al. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157 (2):541-548, 1996.
- Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P. et al. Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J Immunol* 171 (3):1128-1132, 2003.
- Feng, J. F., Liu, J., Zhang, X. Z. et al. Guided Migration of Neural Stem Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells by an Electric Field. *STEM CELLS* 30 (2):349-355, 2012.
- Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P. et al. The Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Aminopeptidase 1 in Immunity to Infection and in Cross-Presentation. *J Immunol* 178 (4):2241-2248, 2007.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4 (4):330-336, 2003.
- Foth, B. J., Goedecke, M. C. and Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10):3681-3686, 2006.
- Friedl, P. and Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (7):445-457, 2009.
- Frittoli, E., Matteoli, G., Palamidessi, A. et al. The Signaling Adaptor Eps8 Is an Essential Actin Capping Protein for Dendritic Cell Migration. *Immunity* 35 (3):388-399, 2011.
- Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3 (9):710-720, 2003.
- Geeves, M. A. and Holmes, K. C. The Molecular Mechanism of Muscle Contraction. In: *Advances in Protein Chemistry Fibrous Proteins: Muscle and Molecular Motors*, edited by M. Squire John, Academic Press, 2005, p. 161-193.
- Geginat, J., Bossi, G., Bender, J. R. et al. Anchorage Dependence of Mitogen-Induced G1 to S Transition in Primary T Lymphocytes. *J Immunol* 162 (9):5085-5093, 1999.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C. et al. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* 285 (5425):221-227, 1999.
- Gunzer, M., Schäfer, A., Borgmann, S. et al. Antigen Presentation in Extracellular Matrix: Interactions of T Cells with Dendritic Cells Are Dynamic, Short Lived, and Sequential. *Immunity* 13 (3):323-332, 2000.
- Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A. et al. A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* 104 (9):2801-2809, 2004.

- Hackstein, H. and Thomson, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4 (1):24-35, 2004.
- Hanley, P. J., Xu, Y., Kronlage, M. et al. Motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) controls cell shape and motility. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107 (27):12145-12150, 2010.
- Hanna, S. and Etzioni, A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1250 (1):50-55, 2012.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M. N. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 199 (1):9-26, 2004.
- Heng, T. S. P., Painter, M. W., Elpek, K. et al. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* 9 (10):1091-1094, 2008.
- Henrickson, S. E., Mempel, T. R., Mazo, I. B. et al. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol* 9 (3):282-291, 2008.
- Heredia, L., Helguera, P., de Olmos, S. et al. Phosphorylation of Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin by LIM-Kinase Mediates Amyloid  $\beta$ -Induced Degeneration: A Potential Mechanism of Neuronal Dystrophy in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 26 (24):6533-6542, 2006.
- Herman, S., Krenbek, D., Klimas, M. et al. Regulatory T cells form stable and long-lasting cell cluster with myeloid dendritic cells (DC). *International Immunology* 24 (7):417-426, 2012.
- Hofer, S., Pfeil, K., Niederegger, H. et al. Dendritic cells regulate T-cell deattachment through the integrin-interacting protein CYTIP. *Blood* 107 (3):1003-1009, 2006.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299 (5609):1057-1061, 2003.
- Hubo, M. and Jonuleit, H. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Inefficient in Activation of Human Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 7 (8):e44056, 2012.
- Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L. et al. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 5 (12):1235-1242, 2004.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T. et al. The Formation of Immunogenic Major Histocompatibility Complex Class II-Peptide Ligands in Lysosomal Compartments of Dendritic Cells Is Regulated by Inflammatory Stimuli. *J.Exp.Med.* 191 (6):927-936, 2000.
- Inoue, A., Saito, J., Ikebe, R. et al. Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. *Nat Cell Biol* 4 (4):302-306, 2002.
- Ishikawa, H., Naito, T., Iwanaga, T. et al. Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunological Reviews* 215 (1):154-165, 2007.

- Jaffe, A. B. and Hall, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 21 (1):247-269, 2005.
- Jensen, K. D. C., Su, X., Shin, S. et al. Thymic Selection Determines gd T Cell Effector Fate: Antigen-Naïve Cells Make Interleukin-17 and Antigen-Experienced Cells Make Interferon  $\gamma$ . *Immunity* 29 (1):90-100, 2008.
- Jensen, P. E., Weber, D. A., Thayer, W. R. et al. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunological Reviews* 172 (1):229-238, 1999.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C. et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375 (6527):151-155, 1995.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G. et al. Induction of Interleukin 10-Producing, Nonproliferating CD4<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J.Exp.Med.* 192 (9):1213-1222, 2000.
- Josefowicz, S. Z. and Rudensky, A. Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity* 30 (5):616-625, 2009.
- Kalhammer, G., Bähler, M., Schmitz, F. et al. Ras-binding domains: predicting function versus folding. *FEBS Letters* 414 (3):599-602, 1997.
- Khelfaoui, M., Pavlowsky, A., Powell, A. D. et al. Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Human Molecular Genetics* 18 (14):2575-2583, 2009.
- Kim, M., Carman, C. V. and Springer, T. A. Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science* 301 (5640):1720-1725, 2003.
- Kim, T. S. and Braciale, T. J. Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Cell Responses. *PLoS ONE* 4 (1):e4204, 2009.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B. et al. Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells. *Immunity* 22 (5):643-654, 2005.
- Kobayashi, M., Azuma, E., Ido, M. et al. A Pivotal Role of Rho GTPase in the Regulation of Morphology and Function of Dendritic Cells. *J Immunol* 167 (7):3585-3591, 2001.
- Konecny, P., Stagg, A. J., Jebbari, H. et al. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur.J.Immunol.* 29 (6):1803-1811, 1999.
- Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M. et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* 205 (4):869-882, 2008.



- Krendel, M. and Mooseker, M. S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* 20 (4):239-251, 2005.
- Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A. et al. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 145 (9):2833-2838, 1990.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G. et al. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 15(22):6144-6154, 1996.
- Laakkonen, J. P., Makela, A. R., Kakkonen, E. et al. Clathrin-Independent Entry of Baculovirus Triggers Uptake of E. coli in Non-Phagocytic Human Cells. *PLoS ONE* 4 (4):e5093, 2009.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T. et al. Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway. *Molecular Cell* 7 (3):661-671, 2001.
- Lämmermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J. et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453 (7191):51-55, 2008.
- Lämmermann, T., Renkawitz, J., Wu, X. et al. Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration. *Blood* 113 (23):5703-5710, 2009.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 201 (2):233-240, 2005.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L. et al. T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science* 295 (5559):1539-1542, 2002.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M. and Ardavin, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* 26 (4):519-531, 2007.
- Lewis, J. M., Girardi, M., Roberts, S. J. et al. Selection of the cutaneous intraepithelial  $\gamma\delta^+$  T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol* 7 (8):843-850, 2006.
- Liao, W., Elfrink, K. and Bähler, M. Head of myosin IX binds calmodulin and moves processively toward the plus-end of actin filaments. *J Biol Chem.* 285 (32):24933-24942, 2010.
- Liao, W., Elfrink, K. and Martin Bähler. Head of Myosin IX Binds Calmodulin and Moves Processively toward the Plus-end of Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* 285 (32):24933-24942, 2010.
- Liu, K. and Nussenzweig, M. C. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 234 (1):45-54, 2010.

- Lu, C. F. and Springer, T. A. The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 159 (1):268-278, 1997.
- Lu, C., Takagi, J. and Springer, T. A. Association of the Membrane Proximal Regions of the  $\alpha$  and  $\beta$  Subunit Cytoplasmic Domains Constrains an Integrin in the Inactive State. *Journal of Biological Chemistry* 276 (18):14642-14648, 2001.
- Lukens, M. V., Kruijsen, D., Coenjaerts, F. E. J. et al. Respiratory Syncytial Virus-Induced Activation and Migration of Respiratory Dendritic Cells and Subsequent Antigen Presentation in the Lung-Draining Lymph Node. *Journal of Virology* 83 (14):7235-7243, 2009.
- Lundie, R. J., de Koning-Ward, T. F., Davey, G. M. et al. Blood-stage Plasmodium infection induces CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (38):14509-14514, 2008.
- Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J. S. et al. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J.Exp.Med.* 166 (6):1654-1667, 1987.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S. et al. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285 (5429):895-898, 1999.
- Maravillas-Montero, J. L. and Santos-Argumedo, L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of Leukocyte Biology* 91 (1):35-46, 2012.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., et al. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J.Exp.Med.* 183 (4):1865-1878, 1996.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E. and von Andrian, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427 (6970):154-159, 2004.
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H. et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3 (12):1135-1141, 2002.
- Mitchison, T. J. and Cramer, L. P. Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion. *Cell* 84 (3):371-379, 1996.
- Monks, C. R. F., Freiberg, B. A., Kupfer, H. et al. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395 (6697):82-86, 1998.
- Mount, A. M., Smith, C. M., Kupresanin, F. et al. Multiple Dendritic Cell Populations Activate CD4<sup>+</sup> T Cells after Viral Stimulation. *PLoS ONE* 3 (2):e1691, 2008.

- Müller, R. T., Honnert, U., Reinhard, J. et al. The Rat Myosin myr 5 Is a GTPase-activating Protein for Rho In Vivo: Essential Role of Arginine 1695. *Molecular Biology of the Cell* 8 (10):2039-2053, 1997.
- Nagao, K., Ginhoux, F., Leitner, W. W. et al. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9):3312-3317, 2009.
- Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A. et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7 (6):663-671, 2006.
- Nakagawa, T. Y. and Rudensky, A. Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunological Reviews* 172 (1):121-129, 1999.
- Nishikawa, M., Nishikawa, S., Inoue, A. et al. A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 (4):1159-1164, 2006.
- Nishita, M., Aizawa, H. and Mizuno, K. Stromal Cell-Derived Factor 1a Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology* 22 (3):774-783, 2002.
- Odrionitz, F. and Kollmar, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology* 8 (9):R196, 2007.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. et al. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (29):10113-10118, 2008.
- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J. G., Wojnoonski, K. et al. B7-1 and B7-2 Selectively Recruit CTLA-4 and CD28 to the Immunological Synapse. *Immunity* 21 (3):401-413, 2004.
- Pieters, J. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. In: *Advances in Immunology*, Anonymous Academic Press, 2000, p. 159-208.
- Pixley, F. J., Xiong, Y., Yu, R. Y. et al. BCL6 suppresses RhoA activity to alter macrophage morphology and motility. *Journal of Cell Science* 118 (9):1873-1883, 2005.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112 (4):453-465, 2003.
- Pooley, J. L., Heath, W. R. and Shortman, K. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8<sup>-</sup> Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8<sup>+</sup> Dendritic Cells. *J Immunol* 166 (9):5327-5330, 2001.

Post, P. L., Bokoch, G. M. and Mooseker, M. S. Human myosin-IXb is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. *Journal of Cell Science* 111 (7):941-950, 1998.

Post, P. L., Tyska, M. J., O'Connell, C. B. et al. Myosin-IXb Is a Single-headed and Processive Motor. *Journal of Biological Chemistry* 277 (14):11679-11683, 2002.

Poulin, L. F., Henri, S., de Bovis, B. et al. The dermis contains langerin<sup>+</sup> dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J.Exp.Med.* 204 (13):3119-3131, 2007.

Reichardt, P., Dornbach, B., Rong, S. et al. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 110 (5):1519-1529, 2007.

Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K. et al. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* 14(8):1583-1589. 1995.

Reizis, B., Colonna, M., Trinchieri, G. et al. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol* 11 (8):558-565, 2011.

Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu.Rev.Immunol.* 29 (1):163-183, 2011.

Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S. et al. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunology Today* 20 (5):200-203, 1999.

Reverte, C. G., Benware, A., Jones, C. W., et al. Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *The Journal of Cell Biology* 174 (4):491-497, 2006.

Rheins, L. A. and Nordlund, J. J. Modulation of the population density of identifiable epidermal Langerhans cells associated with enhancement or suppression of cutaneous immune reactivity. *J Immunol* 136 (3):867-876, 1986.

Richards, T. A. and Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436 (7054):1113-1118, 2005.

Riese, R. J., Mitchell, R. N., Villadangos, J. A. et al. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101 (11):2351-2363, 1998.

Riol-Blanco, L., Sanchez-Sanchez, N., Torres, A. et al. The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed. *J Immunol* 174 (7):4070-4080, 2005.

Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. J. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354 (6352):392-394, 1991.

Rock, K. L. and Shen, L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological Reviews* 207 (1):166-183, 2005.

Rothoeft, T., Balkow, S., Krummen, M. et al. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. *Eur.J.Immunol.* 36 (12):3105-3117, 2006.

Rottner, K. and Stradal, T. EB. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Current Opinion in Cell Biology* 23 (5):569-578, 2011.

Rutella, S. and Lemoli, R. M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunology Letters* 94 (1GÇô2):11-26, 2004.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182 (2):389-400, 1995.

Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F. et al. Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* 28 (3):402-413, 2008.

Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M. et al. IRAP Identifies an Endosomal Compartment Required for MHC Class I Cross-Presentation. *Science* 325 (5937):213-217, 2009.

Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A. et al. Intercellular Adhesion Molecule-1-Dependent Stable Interactions between T Cells and Dendritic Cells Determine CD8+ T Cell Memory. *Immunity* 28 (2):258-270, 2008.

Scholey, J. M., Brust-Mascher, I. and Mogilner, A. Cell division. *Nature* 422 (6933):746-752, 2003.

Semmrich, M., Smith, A., Feterowski, C. et al. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J.Exp.Med.* 201 (12):1987-1998, 2005.

Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A. et al. TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* 19 (1):59-70, 2003.

Shakhar, G., Lindquist, R. L., Skokos, D. et al. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* 6 (7):707-714, 2005.

Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. et al. Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation In Vivo. *Immunity* 21 (2):155-165, 2004.

Shen, L. and Rock, K. L. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology* 18 (1):85-91, 2006.

Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Chatta, G. S. et al. Small Rho GTPases Regulate Antigen Presentation in Dendritic Cells. *J Immunol* 174 (6):3394-3400, 2005.

- Sims, T. N. and Dustin, M. L. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunological Reviews* 186 (1):100-117, 2002.
- Skokos, D., Shakhar, G., Varma, R. et al. Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 8 (8):835-844, 2007.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E. et al. The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology* 12 (3):112-120, 2002.
- Smith, C. M., Belz, G. T., Wilson, N. S. et al. Cutting Edge: Conventional CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cells Are Preferentially Involved in CTL Priming After Footpad Infection with Herpes Simplex Virus-1. *J Immunol* 170 (9):4437-4440, 2003.
- Sponaas, A. M., Cadman, E. T., Voisine, C. et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *J.Exp.Med.* 203 (6):1427-1433, 2006.
- Stassen, M., Schmitt, E. and Bopp, T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247 (1):56-68, 2012.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M. et al. Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity* 33 (2):192-202, 2010.
- Steinman, R. M., Witmer, M. D., Nussenzweig, M. C. et al. Dendritic cells of the mouse: identification and characterization. *J Invest Dermatol* 75, 14-16 1980.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M. et al. Dynamic Imaging of T Cell-Dendritic Cell Interactions in Lymph Nodes. *Science* 296 (5574):1873-1876, 2002.
- Stradal, T. EB and Scita, G. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 18 (1):4-10, 2006.
- Struchholz, S., Elfrink, K., Pieper, U. et al. Functional Role of the Extended Loop 2 in the Myosin 9b Head for Binding F-actin. *Journal of Biological Chemistry* 284 (6):3663-3671, 2009.
- Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *The Journal of Cell Biology* 145 (5):1009-1026, 1999.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L. et al. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100 (6):655-669, 2000.
- Tan, M. C. A., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W. et al. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27 (9):2426-2435, 1997.
- Thauland, T. J. and Parker, D. C.. Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* 131 (4):466-472, 2010.

- Toews, G. B., Bergstresser, P. R. and Streilein, J. W. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124 (1):445-453, 1980.
- Vale, R. D. The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. *Cell* 112 (4):467-480, 2003.
- Valladeau, J., Ravel, O., Zutter-Dambuyant, C. et al. Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity* 12 (1):71-81, 2000.
- Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C. and Saeland, S. Langerin/CD207 sheds light on formation of birbeck granules and their possible function in langerhans cells. *Immunologic Research* 28 (2):93-107, 2003.
- van den Boom, F., Dussmann, H., Uhlenbrock, K. et al. The Myosin IXb motor activity targets the myosin IXb RhoGAP domain as cargo to sites of actin polymerization. *Mol.Biol Cell* 18 (4):1507-1518, 2007.
- van Gisbergen, K. P. J. M., Paessens, L. C., Geijtenbeek, T. B. H. et al. Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunology Letters* 97 (2):199-208, 2005.
- Varga, G., Balkow, S., Wild, M. K. et al. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood* 109 (2):661-669, 2007.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J. et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9 (12):1341-1346, 2008.
- Verdijk, P., van Veelen, P. A., de Ru, A. H. et al. Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *Eur.J.Immunol.* 34 (1):156-164, 2004.
- Verkhovsky, A. B., Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Current Biology* 9 (1):11-S1, 1999.
- Watts, C. Antigen processing in the endocytic compartment. *Current Opinion in Immunology* 13 (1):26-31, 2001.
- Yanagawa, Y., and Onoé, K. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* 101 (12):4923-4929, 2003.
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* 28 (1):29-39, 2008.
- Yumura, S., Uyeda, T.Q. Myosins and cell dynamics in cellular slime molds. *Int Rev Cytol* 224:173-225, 2003.

Zheng, W. and Flavell, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89 (4):587-596, 1997.

Zhou, L., Chong, M. M. W. and Littman, D. R. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30 (5):646-655, 2009.



## 8 Lebenslauf

**Stefanie Pektor** (geb. Heinz)

\* 30. Juli 1981 in Bingen am Rhein  
verheiratet

---

### Mein Profil:

- Diplom-Biologin mit mehrjähriger Erfahrung als Wissenschaftlerin im Forschungsbereich Immunologie
- Fundierte und umfassende Kenntnisse in verschiedenen Bereichen der Zell- und Molekularbiologie sowie im tierexperimentellen Arbeiten
- Besondere Kenntnisse im Bereich der „Live-cell imaging“ Mikroskopie und in der Durchflusszytometrie
- Mehrjährige Erfahrung in der Anleitung und Betreuung von Studenten und technischen Mitarbeitern
- Umfangreiche Beteiligung beim Erstellen von wissenschaftlichen Publikationen auf Deutsch und Englisch
- Sehr gute Selbstorganisation und Problemlösungskompetenz

## Beruflicher Werdegang

---

### Hautklinik

**Universitätsmedizin, Mainz**  
seit Oktober 2007

### Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorarbeit)

Labor: Prof. Dr. med. Stephan Grabbe

- Projekt: Untersuchung der Funktion des Adhäsionsmoleküls LFA-1 und der intrazellulären Rho-GTPase Myosin9b (Myo9b) für dendritische Zellen (DC)
  - Erfolgreiche Etablierung der Myosin9b-knock-out Zucht inklusive eines Screening-Systems zur Genotypisierung der Nachkommen mittels PCR
  - Phänotypische und funktionelle Charakterisierung primärer DC-Populationen mittels FACS, Fluoreszenzmikroskopie, Konvokalmikroskopie, Live-cell imaging Mikroskopie (Migrations- und Interaktionsstudien), Endozytose- und Proliferationsassays
  - Etablierung und Anwendung von in vivo Assays zur Validierung der in vitro Ergebnisse (Migration, Proliferation, CHS)
- Ergebnis: Fehlen von Myo9b und das Vorhandensein von konstitutiv aktivem LFA-1 in bzw. auf DC führt in vitro und in vivo zu einer verminderten Immunantwort, kann aber in vitro durch die Zugabe inhibitorischer Substanzen wiederhergestellt werden
- Anleiten von Studenten, Diplomanden und technischen Mitarbeitern
- Veröffentlichung dreier Fachartikel
- Kostenstellenverwaltung

### Medizin Controlling

**Universitätsmedizin, Mainz**  
Aug – Sep 2007

### Kaufmännische Mitarbeiterin

Leitung: Dr. Harald Jockwig

- Aufgaben: Vervollständigung von Patientenakten und Aufsetzen von Briefen zur Weiterleitung an den MDK

### I. Medizinische Klinik

**Universitätsmedizin, Mainz**  
März – Juli 2007

### Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Labor: Prof. Dr. med. Markus Neurath

- Projekt: Analyse der Rolle des humoralen Immunsystems für die Pathogenese des entzündungsassoziierten kolorektalen Karzinoms
  - Kultivierung muriner Zelllinien und primärer Mastzellen
  - Proteinexpression löslicher Rezeptorfusionsproteine in Hamsterzellen
  - Western-Blot und ELISA
  - Tierexperimentelle Studien in einem murinen 2Stufenmodell der Kolonkarzinogenese
  - Klonierung eines Konstrukts zur Generierung konditionaler transgener Mauslinien

### Institut für Zoologie

**Universität, Mainz**  
Jan – Okt 2006

### Diplomarbeit

Labor: Prof. Dr. Jürgen Markl

- Projekt: *Biomphalaria glabrata* Hämoglobin (BgHb2): Rekombinante Expression in Insektenzellen

## Akademische Ausbildung

---

**Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz**  
*Jan/2006 – Okt/2006*

**Diplomarbeit**  
Note: 1,3

**Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz**  
*Okt/2003 – Okt/2006*

**Hauptstudium Biologie**  
Diplom-Prüfungsfächer: Zoologie (Note: 1,0), Immunologie  
(Note: 1,0), Genetik (Note: 1,7)

**Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz**  
*Okt/2001 – Sep/2003*

**Grundstudium Biologie**  
Vordiplomprüfung mit der Note 2,3

**Hildegardisschule,  
Bingen**  
*Sept/1992 – Jun/2001*

**Abitur**  
Note 2,6

## Stipendien und Preise

---

**Keystone Symposia,  
Silverthorne, Colorado**  
*Feb/2011*

**Reisestipendium**  
zum Keystone Symposium „Dendritic Cells and the  
Initiation of Adaptive Immunity“ in Santa Fe, New Mexico

**Hautklinik  
Universitätsmedizin, Mainz**  
*Dez/2010*

**Doktorandenpreis**

**Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz**  
*04/2006 – 09/2006*

**Förderungsstipendium**

## Fort- und Weiterbildungen

---

**IZKS,  
Mainz**  
*Oktober/2012*

**Einführung in das Klinische Monitoring**  
dreitägiges Seminar

**Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz**  
*Mai/2012*

**Projektmanagement**  
zweitägiges Seminar

**Universitätsmedizin,  
Mainz**  
*Apr/2012*

**Drittmittelmanagement**  
zweitägiges Seminar

Johannes-Gutenberg Universität,  
Mainz  
März/2012

Kommunikation und Gesprächsführung  
eintägiges Seminar

## Weitere Qualifikationen

---

### Sprachen

Deutsch: Muttersprache

Englisch: verhandlungssicher in Wort und Schrift

Latein: großes Latinum

Französisch: Grundkenntnisse

### EDV

Routinierte Verwendung von Microsoft Windows und Mac OS X

Erfahrene Anwenderin des MS-Office Paketes sowie von Adobe Photoshop

Spezialkenntnisse in FACS Software (DIVA, Cell Quest, Flo Jo), Graph Pad

Prism, Olympus Cell P

Erweiterte Grundkenntnisse in ZEISS LSM software ZEN 2009

Routinierte Benutzung von Datenbanken zur Literaturrecherche: PubMed, ISI

Web of Knowledge

Grundkenntnisse in der Anwendung von NCBI, Expasy, Chromas, Clone

Manager, ClustalX, GeneDoc, Lalign, Oligonucleotide Properties

## Publikationen

---

Y. Xu\*, **S. Pektor\***, S. Balkow, K. Grobe, P. J. Hanley, L. Shen, M. Bros, M. Bähler and S. Grabbe (2012)  
The Rho-GTPase-activating protein myosin IXb regulates dendritic cell migration and interaction with T cells

\* equal contribution

*Manuskript in Vorbereitung*

V. Moeller, R. Dürr, L. Sarraf-Zadeh, S. Keller, **S. Heinz**, N. Hellmann, A. Moeller, B. Lieb, J. Markl (2011)

Recombinant functional multidomain hemoglobin from the gastropod *Biomphalaria glabrata*  
*IUBMB Life. 2011 May;63(5):323-8*

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

\* equal contribution

*Blood. 2010 Sep 16;116(11):1885-94.*

M. Krummen, S. Balkow, L. Shen, **S. Heinz**, C. Loquai, H.C. Probst, S. Grabbe (2010)  
Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signalling is indispensable for TLR synergy

*J Leukoc Biol. 2010 Jul;88(1):189-99.*

## Konferenzbeiträge

---

**S. Heinz**, Y. Xu, S. Balkow, M. Bros, K. Grobe, L. Shen, M. Bähler and S. Grabbe (2011)  
Loss of the signalling motor protein Myosin 9B leads to impaired immune responses  
*Joint Annual Meeting SIICA-DGFI 2011, Riccione*

**S. Heinz**, Y. Xu, S. Balkow, K. Grobe, L. Shen, M. Bähler and S. Grabbe (2011)  
A motor protein with signalling properties is crucial for the induction of immune responses  
*Keystone Symposium "Dendritic Cells" 2011, Santa Fe, New Mexico*

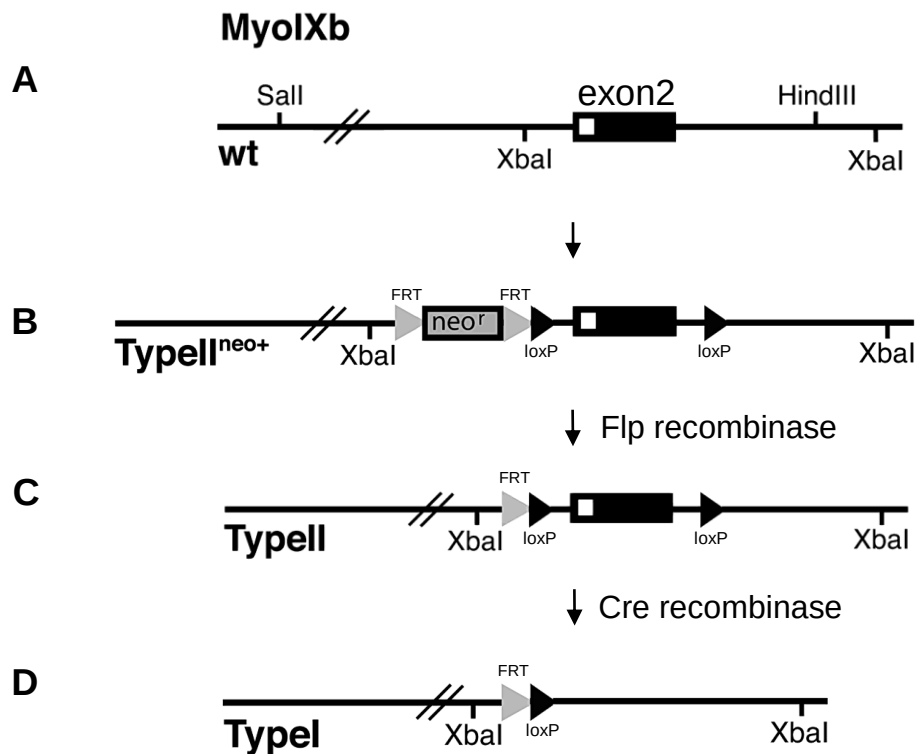
**S. Heinz**, Y. Xu, S. Balkow, K. Grobe, M. Krummen, M. Bähler and S. Grabbe (2010)  
A motor protein with signalling properties is crucial for the development of immune responses  
*DGFI 2010, Leipzig*

**S. Heinz**, Y. Xu, S. Balkow, K. Grobe, M. Krummen, M. Bähler and S. Grabbe (2010)  
The role of MyosinIXb in different dendritic cell subtypes and T cells  
*ADF 2010, Lübeck*

**S. Heinz**, S. Balkow, Y. Höhn, N. Voltz, C. Loquai, M. Krummen, A. Reske-Kunz and S. Grabbe  
Live-cell imaging of BMDC versus SP37A3: Interaction with naive T cells and regulatory T cells within 3D collagen gels  
*ADF 2009, Heidelberg*

## 9 Anhang

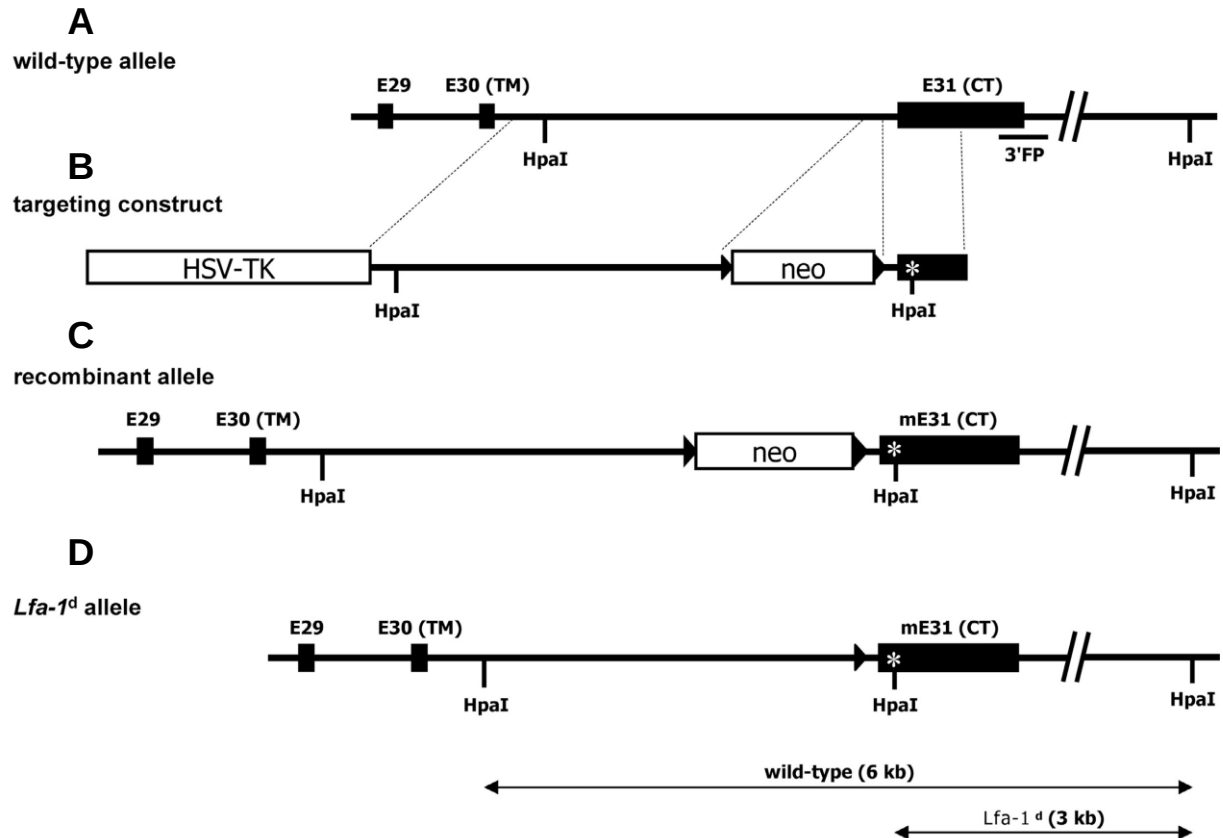
### 9.1 Klonierungsstrategie zur Herstellung der Myo9b<sup>-/-</sup> Mäuse



**Abb. 47: Generierung der Myo9b ko Mäuse**

(A) Native Struktur des Exon2 von Myo9b. (B) In den Myo9b Locus werden zwei Flp recognition sites (FRT) eingebaut, die eine Neomycin-Kassette (neo<sup>r</sup>) enthält und Exon2 wird von zwei Cre-Rekombinasestellen (loxP) flankiert. (C) Der Genlocus nach Entfernen des Neomycin Resistenzmarkers durch eine Flp-Rekombinase (Flp-Deleter Stamm). (D) Das finale rekombinierte, nicht-funktionelle Myo9b ko Allel nach Entfernen von Exon2 durch eine Cre-Rekombinase (Cre-Deleter Stamm). (Abb. aus Hanley et al., 2010)

## 9.2 Klonierungsstrategie zur Herstellung der LFA-1<sup>d/d</sup> Mäuse



**Abb. 48: Generierung der LFA-1 d/d Mäuse**

(A) Organisation des murinen Lfa-1 Genlocus. (B) Targeting Vector mit der spezifischen Mutation und einer zusätzlichen HpaI-Schnittstelle. Außerdem wurde eine HSV-Thymidinkinase (HSV-TK) Kasette und eine Neomycin-Resistenz-Kasette (neo) eingebaut. (C) Das rekombinante LFA-1 Allel. (D) Das LFA-1 d/d Allel nach Entfernen der neo-Kasette mit einem Cre-Deleter Stamm. (Abb. aus Semmrich et al., 2005)

## 9.3 Eigene Publikationen

### **LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming**

BLOOD 2010 116: 1885-1894  
Prepublished online June 8, 2010;  
doi:10.1182/blood-2009-05-224428

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/116/11/1885.full.html>























