

Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinische Forschergruppe Sepsis
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

Einfluss der Aktivitätsregulation des Leukozytenintegrins LFA-1 auf die angeborene und adaptive Immunantwort

Monika Maria Semmrich

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. F. Elstner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 25.02.04 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.06.04 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Integrine und ihre Liganden.....	2
1.2 Die Bedeutung von LFA-1.....	5
1.2.1 Leukocyte adhesion deficiency (LAD).....	5
1.2.2 LFA-1 defiziente Mäuse.....	6
1.3 Integrinaktivierung.....	7
1.3.1 Bedeutung der flexiblen Integrinaktivierung.....	7
1.3.2 Mechanismen für die Änderung der Adhäsionsstärke.....	7
1.3.3 Konformationsänderungen während der Integrinaktivierung.....	9
1.4 Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domänen.....	10
1.4.1 Integrin-Zytoskelett Interaktionen.....	10
1.4.2 Die Rolle der zytoplasmatischen Domänen bei der Integrinaktivierung.....	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Bezugsquellennachweis.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Radiochemikalien.....	17
2.1.3 Kits und Sonstiges.....	17
2.1.4 Geräte.....	17
2.1.5 Enzyme.....	19
2.2 Medien und Puffer.....	19
2.2.1 Stammlösungen und Puffer.....	19
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur.....	21
2.2.3 Medien für die Zellkultur.....	22
2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere.....	23
2.3.1 Bakterienstämme.....	23
2.3.2 Zelllinien.....	24
2.3.3 Versuchstiere.....	24
2.4 Antikörper und Primer.....	24
2.4.1 Antikörper.....	24
2.4.2 Oligonukleotide.....	25
2.5 Klonierungsvektoren.....	25

2.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	26
2.6.1	Präparation von RNA.....	26
2.6.1.1	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zellen.....	26
2.6.1.2	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Geweben.....	26
2.6.2	cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription).....	27
2.6.3	Real-Time PCR mittels TaqMan.....	27
2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.6.5	Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel.....	29
2.6.6	Restriktionsverdau von DNA.....	29
2.6.7	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	29
2.6.7.1	Ausschneiden der DNA aus einem Vektor.....	29
2.6.7.2	DNA-Elution aus einem Agarosegel.....	30
2.6.7.3	Dephosphorylierung von Vektoren.....	30
2.6.7.4	DNA-Ligation.....	30
2.6.8	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	31
2.6.9	Präparation von Plasmid-DNA.....	31
2.6.9.1	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	32
2.6.9.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	32
2.6.9.3	Bestimmung der DNA-Konzentrationen.....	32
2.6.10	Isolierung von chromosomaler DNA.....	33
2.6.11	Sequenzierung.....	33
2.6.12	Southern Blot.....	33
2.7	Proteinanalytische Methoden.....	34
2.7.1	Aufreinigung von Ig-Fusionsproteinen.....	34
2.7.2	Aufkonzentrierung von Ig-Fusionsproteinen.....	35
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.7.4	Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie.....	36
2.8	Zellkultur.....	36
2.8.1	Kultivierung von 293T-Zellen.....	36
2.8.1.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	36
2.8.1.2	Transfektion von 293T-Zellen mit CaPO ₄	37
2.8.2	Methoden zur Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten.....	37
2.8.2.1	Zellkultur.....	37
2.8.2.2	Die Elektroporation von ES-Zellen.....	38
2.8.2.3	Die Selektion rekombinanter ES-Zellklone.....	38
2.8.2.4	Das Einfrieren von Zellen.....	38
2.8.3	Kultivierung von Splenozyten.....	38
2.9	Tierversuche.....	38
2.9.1	Superovulation.....	38
2.9.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten.....	39

2.9.3	Generierung chimärer Mäuse.....	39
2.9.4	Organentnahme.....	40
2.9.5	Thioglykollat-induzierte Peritonitis.....	39
2.9.6	Immunisierung von Mäusen.....	40
2.10	Immunologische und zellbiologische Methoden.....	40
2.10.1	Adhäsionsassay.....	40
2.10.1.1	Adhäsion an aufgereinigten Proteinliganden.....	40
2.10.1.2	Adhäsion an Endothelzellen.....	41
2.10.2	Proliferationsassays.....	41
2.10.3	„Allogene Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR).....	41
2.10.4	Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Ober- fläche (FACS-Analyse).....	42
2.10.4.1	FACS-Analyse von Oberflächenantigenen.....	42
2.10.4.2	Intrazelluläre Färbungen.....	42
2.10.5	Transmigrationsassay.....	42
2.10.6	CTL Chrom-Assay.....	43
2.11	Statistische Auswertung.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Generierung einer LFA-1 gain of-function Mausmutante.....	45
3.1.1	Klonierung des Rekombinationsvektors.....	45
3.1.2	Generierung von mutierten embryonalen Stammzellen.....	46
3.1.3	Generierung eines LFA-1 ^{d/d} Mausstammes aus rekombinierten ES- Zellen.....	48
3.1.4	Nachweis der Funktionalität der Mutation.....	50
3.2	Analyse des Phänotyps von LFA-1^{d/d} Mäusen und Zellen.....	52
3.2.1	Lymphozytendifferenzierung und Integrinexpression.....	53
3.2.2	Größe der lymphatischen Organe in mutierten Mäusen.....	57
3.2.3	Transmigration von mutierten Zellen durch bEnd5 Zellen.....	58
3.2.4	Thioglykollat-induzierte Peritonitis in LFA-1 ^{d/d} Mäusen.....	59
3.2.5	Proliferation von LFA-1 mutierten Zellen <i>in vitro</i>	60
3.2.6	Der Einfluss der Mutation auf die allogene MLR.....	64
3.2.7	CTL-Aktivität von LFA-1 ^{d/d} T-Zellen.....	64
4	Diskussion.....	67
4.1	Analyse der hämatopoetischen Zellpopulationen in LFA-1 mutierten Tieren.....	67
4.2	Einfluss der Mutation auf die Adhäsion an ICAM-1.....	69
4.3	Das Migrationsverhalten von LFA-1 ^{d/d} Leukozyten.....	70
4.4	Einfluss auf proliferative T-Zell Antworten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72

4.5	Vergleich der LFA-1 ^{d/d} und LFA-1 ^{-/-} Mäuse.....	76
4.6	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung.....	81
6	Abkürzungsverzeichnis.....	83
7	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung.....	102

1 Einleitung

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen haben große Bedeutung bei der physiologischen Rezirkulation von Leukozyten zwischen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen, sowie bei der Immunantwort auf Infektionen und Gewebeschäden. Die Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen wird durch Adhäsionsmoleküle reguliert, wobei man vier Familien – Cadherine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs) und Integrine – unterscheiden kann (s. Abb. 1.1).

Ein Zusammenspiel dieser Adhäsionsmoleküle findet bei der Rezirkulation von Lymphozyten über Venolen mit hohem Endothel (HEVs) durch lymphoide Organe und der gezielten Einwanderung von Leukozyten in verletztes Gewebe als Antwort auf proinflammatorische Signale statt. Der erste Schritt dieses mehrstufigen Prozesses ist die Bindung von L-Selektin auf den Lymphozyten an sulfanierte Kohlenhydratepitope von GlyCAM und CD34 auf den Endothelzellen, was das Entlangrollen der Lymphozyten am Endothel ermöglicht. Über Chemokin-induzierte Signale kommt es daraufhin zur Aktivierung von Integrinen wie LFA-1, was dessen Adhäsion an seine Liganden ICAM-1 und ICAM-2 bewirkt. Die dadurch geförderte feste Bindung von Lymphozyten an die Endothelzelle ermöglicht die Migration der Leukozyten durch das Endothel zum Entzündungsherd bzw. das „Homing“ naiver Lymphozyten in periphere Lymphknoten (Butcher, 1991; Springer, 1994).

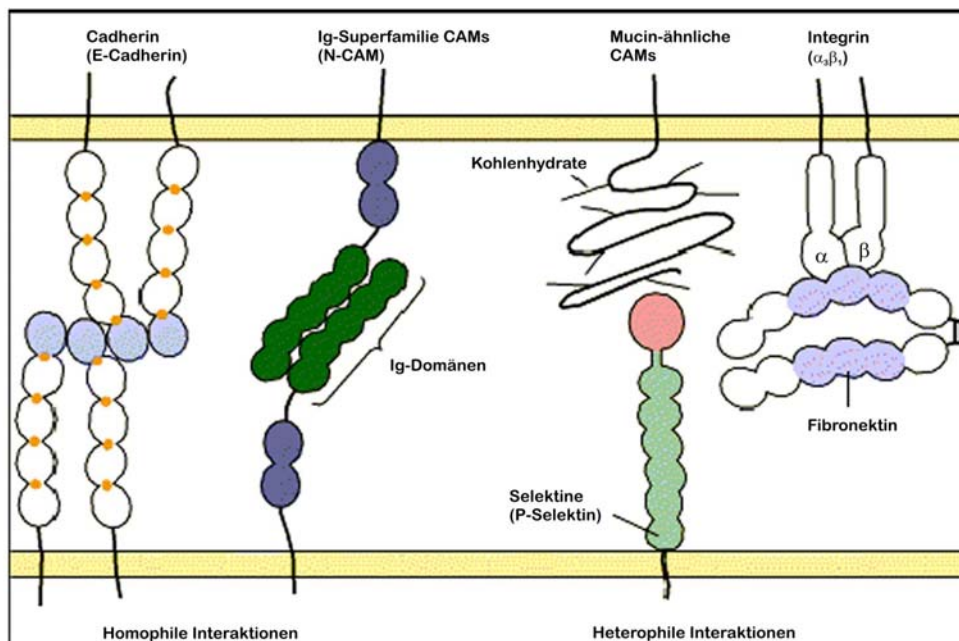


Abb. 1.1: Die vier Familien der Adhäsionsmoleküle. Dargestellt sind Mitglieder der Cadherine, Selektine, Ig-CAMs und der Integrine mit Interaktionspartnern (aus Lodish *et al.*, 2000).

Im Folgenden werden die an den Adhäsionsvorgängen beteiligten Familien kurz charakterisiert:

Cadherine sind in spezialisierten Membranbereichen, wie der *Zonula adherens* und den Desmosomen von Epithelzellen, lokalisiert und erkennen in einem Ca^{2+} -abhängigen Vorgang homophil Cadherine auf anderen Zellen. Sie sind essentiell für Entwicklungsvorgänge und den Erhalt von Gewebestrukturen, lösen aber auch Signaltransduktion aus (Huber *et al.*, 1996).

Die Selektine bilden mit drei Mitgliedern, L-, E- und P-Selektin, die kleinste der vier Familien (Lasky, 1995). Man findet sie auf Leukozyten, Blutplättchen und Endothelzellen. Wie zuvor erwähnt, initiieren diese über komplexe Oligosaccharidverbindungen den Kontakt zwischen Endothelzellen und Leukozyten, und ermöglichen damit das Rollen entlang des Endothels. Anschließend gehen aktivierte Integrine mit Rezeptoren der Ig-Superfamilie auf Endothelzellen eine feste, aber reversible Bindung ein. Dadurch wird der rollende Leukozyt fest gebunden, kann anschließend die Endothelbarriere durchqueren und ins Gewebe einwandern (Springer, 1995). Dies erklärt ihre wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen (Rosales und Juliano, 1995; Springer, 1995).

Mitglieder der Ig-Superfamilie üben ihre Funktion auf einer Vielzahl von Zellen aus und sind dementsprechend in eine Menge biologischer Prozesse wie der Entwicklung des Nervensystems (Baldwin *et al.*, 1996), der Wundheilung (Albeda und Buck, 1990) und der Aktivierung von T- und B-Zellen involviert (Weiss und Littman, 1994).

Da das im Mittelpunkt des Interesses stehende Molekül LFA-1 zur Familie der Integrine zählt, werden diese Adhäsionsrezeptoren im Folgenden genauer charakterisiert.

1.1 Integrine und ihre Liganden

Integrine sind seit ihrer Entdeckung vor 16 Jahren (Hynes, 1987) zu den am besten untersuchten Adhäsionsmolekülen avanciert.

Sie sind Rezeptoren für Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM; Buck und Horwitz, 1987), können aber auch Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Im Zuge dessen sind sie an der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität, der Embryonalentwicklung, dem Homing von Leukozyten und der transendothelialen Migration als Antwort auf Entzündungsreize beteiligt (Albeda und Buck, 1990; Hynes, 1992; Sonnenberg, 1993).

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die α -Kette weist hierbei eine Größe von 120 bis 180 kDa auf, während die β -Kette zwischen 90 und 110 kDa variiert. In der Hälfte der α -Ketten befindet sich eine sog. I/A Domäne. Sowohl α - wie auch β -Untereinheiten besitzen eine große N-terminale extrazelluläre Domäne mit der Liganden-

bindungsstelle, eine hydrophobe Transmembran-Region und daran anschließend einen kurzen, C-terminalen, zytoplasmatischen Bereich (Hynes, 1992; Ruoslahti, 1991). An der Ligandenbindung beteiligt ist neben der I/A-Domäne die β -Propeller-Domäne in der α -Kette. Letztere setzt sich aus sieben Wiederholungen von ca. 60 Aminosäuren zusammen (Harris *et al*, 2000).

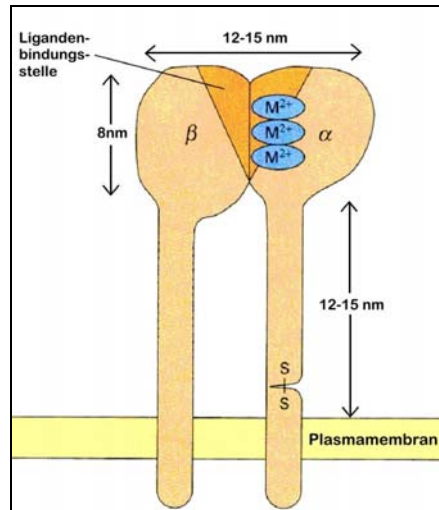


Abb. 1.2: Struktur eines Integrins (nach Hynes, 1992). Integrine bestehen aus einem kurzen, zytoplasmatischen Teil, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem extrazellulären Teil mit der Ligandenbindungsstelle.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 18 verschiedene α -Ketten und acht β -Ketten bekannt, die zusammen 24 unterschiedliche Heterodimere bilden können (Hynes, 2002; s. Abb. 1.3).

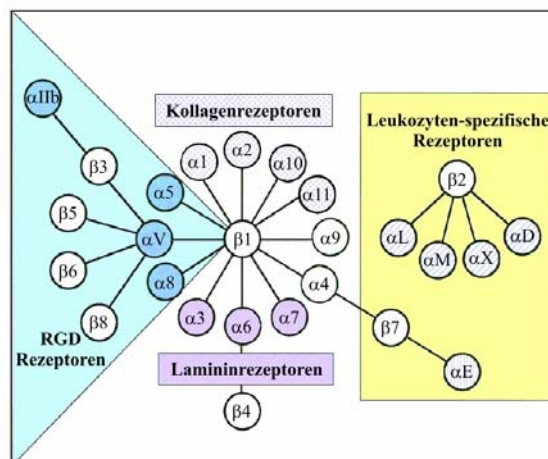


Abb. 1.3: Mitglieder der Integrinfamilie (nach Hynes, 2002). Acht β -Untereinheiten können mit 18 α -Ketten assoziieren, wodurch mindestens 24 verschiedene Integrine gebildet werden können. Die Integrine sind entsprechend ihrer Ligandenspezifität farblich unterteilt. Grau markierte Rezeptoren besitzen eine I/A Domäne.

Es gibt - der Anzahl der β -Ketten entsprechend - acht Familien, wobei die $\beta 1$ -Familie mit zwölf Mitgliedern die größte darstellt. Die Besonderheit der $\beta 2$ -Integrine liegt in ihrer ausschließlichen Expression auf Leukozyten (Arnout, 1990; Gahmberg, 1997). Dieser Gruppe gehört neben $\alpha M\beta 2$ (Mac-1), $\alpha X\beta 2$ und $\alpha D\beta 2$ das Integrin $\alpha L\beta 2$ (LFA-1) an.

Integrine binden gemäß ihrer weitgefächerten Funktionen an ein breites Spektrum von Liganden. Hierzu zählen Proteine der extrazellulären Matrix, Plasmaproteine wie Fibrinogen und integrale Membranproteine (Kolanus und Zeitlmann, 1998).

Manche der Adhäsionsrezeptoren erkennen nur einen Liganden, wie das bei $\alpha 5\beta 3$ in Bezug auf Fibronectin der Fall ist (Rosales und Juliano, 1995). Andere Integrine sind nicht monospezifisch und können verschiedene Proteine binden. Hierzu zählt z. B. $\alpha v\beta 3$, welches mit Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen Interaktionen eingehen kann (Kuhn und Eble, 1994).

Als Erkennungssequenz vieler Integrine (z. B. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha v\beta 3$) dient das Tripeptid RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), welches z. B. in Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin zu finden ist (Loftus und Liddington, 1997, Xiong *et al.*, 2002). Des Weiteren gibt es Integrine, die über andere Ligandenbindungsstellen eine Adhäsion an Laminin vermitteln (Hynes, 2000). Die Hälfte aller α -Ketten besitzt in der ECM eine 200 Aminosäure große I/A Domäne, welche ein MIDAS („metal ion-dependent adhesion site motif“-Motiv enthält. Über diese I/A Domäne binden z.B. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$ an Kollagen (Leitinger und Hogg, 1999). Auch den Mitgliedern der $\beta 2$ -Familie dient diese Region als Bindungsstelle. So zeigt LFA-1, bei welchem diese Domäne deletiert wurde, keine Bindungsaktivität (Leitinger und Hogg, 2000).

Die wichtigsten Liganden für die $\beta 2$ -Familie sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. So ist schon seit 1987 bekannt, dass das 76 bis 114 kDa große Glykoprotein ICAM-1 bei der LFA-1-abhängigen Adhäsion eine Rolle spielt (Marlin und Springer, 1987). Die Expression von ICAM-1 („intercellular adhesion molecule“) auf hämatopoetischen Zellen, Endothel- und Epithel-Zellen kann durch Zytokine, Endotoxin oder Phorbolster induziert werden, so dass als Folge die Leukozyten-Interaktionen mit diesen Zellen verstärkt werden (Wawryk *et al.*, 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch ICAM-2 und ICAM-3 Bindungspartner für LFA-1 darstellen (Bailly *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu ICAM-1 ist ICAM-2 auf Endothelzellen konstitutiv exprimiert, inflammatorische Signale können seine Expression nicht signifikant steigern (de Fougères *et al.*, 1991). Dies spricht für eine Rolle von ICAM-2 bei der Rezirkulation von Lymphozyten und bei der Einwanderung von Entzündungszellen während der frühen Phase von Immunantworten vor Hochregulation von ICAM-1. ICAM-3 scheint in die Tumor-Entwicklung (Doussis-Anagnostopoulou *et al.*, 1993; Patey *et al.*, 1996) und bei T-Zell Antworten (de Fougères *et al.*, 1994) beteiligt zu sein.

1.2 Die Bedeutung von LFA-1

LFA-1 (Leukocyte function-associated antigen-1; CD11a/CD18) ist im Gegensatz zu den anderen Molekülen der $\beta 2$ -Familie auf allen weißen Blutkörperchen detektierbar. Welche wichtige Funktion LFA-1 zukommt, wird im Folgenden an jeweils einem Beispiel von Mensch und Tier dargestellt.

1.2.1 Leukocyte adhesion deficiency (LAD)

Einblicke in den Ablauf biologischer Prozesse können durch das Studieren seltener, vererbbarer Krankheiten gewonnen werden. In diesem speziellen Fall wird die Bedeutung von LFA-1 und den übrigen $\beta 2$ -Integrinen anhand der Krankheit „Leukocyte adhesion deficiency I“ (LAD I) deutlich. LAD ist eine von drei autosomal rezessiv vererbten Krankheiten, die Integrin-Gene betreffen (Hogg und Bates, 2000). Patienten, die davon betroffen sind, leiden unter bakteriellen Infektionen und Leukozytose. Darüber hinaus sind die T- und B-Zell-Funktionen stark herabgesetzt (Etzioni *et al.*, 1999). Man kennt eine gemäßigte und eine schwere Form von LAD I. Sie unterscheiden sich auf molekularer Ebene dahingehend, dass bei der gemäßigten Defizienz ca. 5% der normal vorhandenen $\alpha\beta$ - Integrin-Komplexe auf der Oberfläche exprimiert werden. Bei der schweren Defizienz ist das nur bei weniger als einem Prozent der Heterodimere der Fall, was zur Folge hat, dass die Patienten bakterielle Infektionen nicht effizient bekämpfen können und aufgrund dessen meist schon im Kindesalter versterben. Den beiden Formen ist gemein, dass der Defekt jeweils auf der Seite der $\beta 2$ -Kette zu finden ist, wobei man „missense“ von „nonsense“ Mutationen unterscheiden kann (Anderson *et al.*, 1997). Es sind ca. 10 Mutationen bekannt, welche durch den Einbau einer falschen Aminosäure die Expression eines geänderten $\beta 2$ -Proteins zur Folge haben. Dabei scheint ein „Hotspot“ für Mutationen in der I/A-Domäne der $\beta 2$ -Kette zu liegen (Shimaoka *et al.*, 2002). Die mutierte β -Untereinheit kann nicht mit der α -Kette assoziieren, was Voraussetzung für eine Oberflächenexpression von Integrinen ist (Hogg und Bates, 2000).

Unter ebenso gravierenden Auswirkungen, wie solche, die für LAD I beschrieben sind, leiden Patienten, welche von LAD III betroffen sind. Im Gegensatz zu LAD I liegt die Ursache für diese zuletzt beschriebene Form allerdings nicht in der Expression der Integrine. Auch verfügen die Adhäsionsmoleküle über eine intakte intrinsische Aktivität, d. h. sie können durch Kationen oder mAk aktiviert werden. Vielmehr besteht ein Defekt im Signaling über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, was für die Aktivierung der Bindungsfunktionen von Integrinen wichtig ist. Dies zeigt, dass nicht nur das Vorhandensein der Integrine von Bedeutung ist, sondern deren Regulation eine ebenso wichtige Rolle zukommt (Alon und Etzioni, 2003).

1.2.2 LFA-1-defiziente Mäuse

An Hand der Leukozyten von an LAD I erkrankten Personen konnten Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von Integrinen gewonnen werden. Um weiterreichende Kenntnisse über die Funktion von LFA-1 *in vivo* zu erlangen, wurden LFA-1-defiziente Mäuse hergestellt.

Tiermodelle dienen allgemein zu einem besseren Verständnis biologischer Abläufe, wobei speziell die Immunologie erheblich von den in der Maus untersuchten Immunantworten profitiert. Eine der in diesem Zusammenhang besonders aussagekräftigen Techniken ist die Herstellung gendefizienter Mäuse, bei der durch das Fehlen eines einzigen Gens Vergleiche zur Wildtyp-Maus gezogen werden und somit Aufschlüsse über die Auswirkungen der Mutation und Funktionsweise des entsprechenden Gens im Organismus gewonnen werden können.

LFA-1-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zur Wildtyp-Maus verkleinerte periphere Lymphknoten auf. Im Gegensatz dazu scheint die Einwanderung von Leukozyten in mukosale Lymphknoten weitgehend LFA-1 unabhängig zu sein, was die größere Bedeutung der $\alpha 4$ -Integrine in diesem Kompartiment unterstreicht (Berlin-Rufenach *et al.*, 1999). Auch die Lymphozytenproliferation ist in Abwesenheit von LFA-1 reduziert. Darüber hinaus ist die T-Zell-Aktivierung durch lösliches CD3 um 90% herabgesetzt. Man kann außerdem eine starke Reduktion der NK-Zell-Zytotoxizität feststellen, während die DTH-Antwort (Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ) gänzlich fehlt. Des Weiteren zeigt sich eine verminderte Zellrekrutierung nach Thioglykollat-Injektion in die Bauchhöhle, was die zentrale Rolle von LFA-1 für Neutrophilen- und Monozytenantworten bei lokalen Infektionen unterstreicht (Schmits *et al.*, 1996; Shier *et al.*, 1996). Auch wurde deutlich, dass LFA-1 notwendig ist, den ersten, Selektin-vermittelten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen zu stabilisieren. In Abwesenheit des Leukozytenintegrins LFA-1 ist die „Rollgeschwindigkeit“ der Neutrophilen beachtlich erhöht (Henderson *et al.*, 2001).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass LFA-1 in Kooperation mit anderen organspezifischen Adhäsionsmolekülen dafür sorgt, dass Lymphozyten bei ihrer Zirkulation durch die Venolen mit hohem Endothel (HEV) der Lymphknoten und postkapillären Venolen in Entzündungsregionen gelangen, und somit die Lymphozytenrezirkulation und Entzündungsreaktionen steuern. Weiterhin weisen diese Ergebnisse auf eine zentrale Rolle von LFA-1 bei der zellulären Interaktion von Immunzellen wie etwa von T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen hin (Berlin-Rufenach *et al.*, 1999).

1.3 Integrinaktivierung

1.3.1 Bedeutung der flexiblen Integrinaktivierung

Zentrales Merkmal von Integrinen ist eine dynamische Regulation der Ligandenbindung durch Aktivierung und Inaktivierung, so dass eine flexible Anpassung an die jeweiligen Anforderungen möglich ist. Das bedeutet, dass Integrine nicht konstitutiv aktiv sind, sondern in der Regel in einem Bindungs-inaktiven („Off“) Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert sind, in dem sie weder Liganden binden noch Signale weiterleiten können.

Am besten untersucht ist diese Regulation der Integrinaktivität am Adhäsionsmolekül α IIB β 3, welches auf Blutplättchen zu finden ist. Wenn α IIB β 3 konstitutiv aktiv exprimiert werden würde, würde eine konstitutive Bindung des Integrins an seinen Liganden Fibrinogen zur Aggregation der Zellen und schließlich zur Ausbildung von Thrombosen führen. Die gezielte Aktivierung von α IIB β 3 kann u.a. über Thrombin, ADP, von Willebrand-Faktor oder das Integrin α 2 β 1 erfolgen.

Letzteres ist ein Beispiel für Kommunikation von Molekülen innerhalb der Integrinfamilie. Der „crosstalk“ kann wie in diesem Fall eine Aktivierung bewirken oder aber auch das Gegenteil zur Folge haben. Letzteres, also die Inhibierung eines Integrins durch ein anderes, wird auch als trans-dominante Inaktivierung bezeichnet (van der Flier und Sonnenberg, 2001).

Auch an Hand der Leukozytenintegrine der β 2-Familie wird deutlich, wie wichtig eine kontrollierte Integrinaktivität ist. In aktiviertem Zustand binden diese Adhäsionsrezeptoren über Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie an Endothelzellen und APCs, was Effektorleistungen wie Phagozytose oder zytotoxisches Killing zur Folge hat. Die Notwendigkeit aktiver Integrine für protektive Immunantworten wird z. B. an Hand der LFA-1 defizienten Mäuse oder der Krankheit LAD deutlich. Auch sind Integrine unter pathophysiologischen Bedingungen von Bedeutung. So zeigen Antikörper gegen CD11a und auch Antagonisten gegen das Integrin α 4 bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen viel versprechende Ansätze (Gottlieb *et al.*, 2000; Jackson, 2002).

1.3.2 Mechanismen für die Änderung der Adhäsionsstärke

Es gibt zwei zentrale Mechanismen, die bei der Aktivierung von Integrinen eine Rolle spielen. Zum einen sind dies Konformationsänderungen, welche die Affinität eines einzelnen Integrins für seine Liganden erhöht. Das kann ausgelöst werden durch intrazelluläre Signale - wie z.B. Ras oder Rho GTPasen - und als Antwort auf physiologische Agonisten. So bewirken sehr niedrige Konzentrationen an Chemokinen eine Erhöhung der Affinität

von LFA-1 für ICAM-1 innerhalb weniger Minuten (Constantin *et al.*, 2000). Neben den beschriebenen Konformationsänderungen, die im Falle von β 1- und β 2-Integrinen durch Antikörper detektierbar sind (O' Toole, 1991; Stewart und Hogg, 1996), gilt das Integrin-Clustering als ein Schlüsselereignis bei der Integrinaktivierung.

So hat man festgestellt, dass Agonisten, die Integrine auf physiologische Weise aktivieren, wie der TCR/CD3-Komplex, keinen Einfluss haben auf die Affinität der Rezeptoren (Stewart *et al.*, 1996), sondern das Clustering essentiell ist für eine Adhäsion von LFA-1 an ICAM-1 (Stewart, 1998). Allerdings sind Affinitätsmessungen schwierig, da nur maximale Änderungen in der Bindungs-Kinetik detektierbar sind, aber intermediäre Stadien für eine Aktivierung der Zelladhäsion genügen sollten (Shimaoka *et al.*, 2002). Auch wenn die für das Clustering verantwortlichen Mechanismen noch nicht völlig bekannt sind, so ist dennoch klar, dass durch Lösen der Integrine vom cortikalen Zytoskelett deren laterale Beweglichkeit erhöht wird, was somit eine Aviditätserhöhung durch Clustering ermöglicht (Hughes und Pfaff, 1998; van Kooyk *et al.*, 1999). Neue Studien legen einen Einfluss der Transmembranregionen auf das Clustering der Rezeptoren nahe. Dabei scheinen diese Domänen die Bildung von Homodimeren im Falle von α IIb bzw. Homotrimeren aus β 3 zu fördern, was mit einer Aktivierung der Integrine einhergeht (Li *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass in den Clustering-Prozess Signalmoleküle wie SLAP 130 (Griffiths *et al.*, 2001), Vav1 (Krawczyk *et al.*, 2002) und die GTPase Rap-1 (Szebda, *et al.*, 2002) involviert sind. Ob diese jedoch zusammenwirken oder an verschiedenen Wirkungsmechanismen beteiligt sind, ist nicht geklärt.

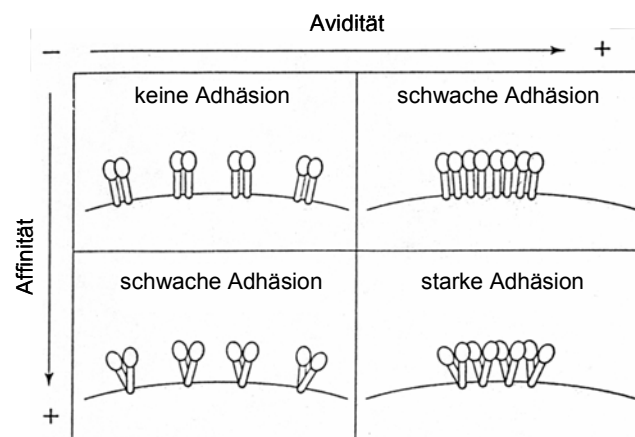


Abb. 1.4: Die Bindung von Integrinen an Liganden wird durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert. Maximale Adhäsion wird erreicht, wenn hochaffine Rezeptoren auf der Oberfläche vernetzt sind (nach Lub *et al.*, 1995).

Affinität und Avidität schließen sich nicht aus, sondern tragen beide zusammen zur Aktivierung der Integrine bei. An Hand des Beispiels α IIb β 3 wurde gezeigt, dass Affinitätsänderungen für eine erste, reversible Bindung sorgen, wodurch ein Clustering der Rezeptoren ausgelöst wird (Hato *et al.*, 1998).

Der relative Beitrag von Affinität und Avidität für die Ligandenbindung variiert zwischen verschiedenen Integrinen. Auch scheint die Ligandendichte dabei eine Rolle zu spielen (Constantin *et al.*, 2000). Die stärkste Adhäsion kommt jedoch dann zustande, wenn sowohl Affinität als auch Avidität erhöht werden.

1.3.3 Konformationsänderungen während der Integrinaktivierung

Das Signaling über die Transmembranregion, was zur Integrinaktivierung führt, kann z.B. durch Oberflächenmoleküle wie G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren initiiert werden. Daraufhin lösen intrazelluläre Signale eine erhöhte Haftfähigkeit in den extrazellulären Domänen aus (inside-out signaling). Andererseits können über das outside-in signaling (Ligandenbindung) direkt intrazelluläre Signale hervorgerufen werden, die Effektorleistungen bewirken. In diese bidirektionalen Signalprozesse sind weitreichende, reversible Konformationsänderungen der Integrine involviert. Diese betreffen das gesamte Molekül vom C-terminalen Ende bis zur Ligandenbindungsstelle. Erste Anhaltspunkte für jene Vorgänge stammen aus dem Jahr 1992, als Weisel *et al.* zeigten, dass mit einer Bindung von α IIb β 3 an Fibrinogen ein Trennen der zytoplasmatischen Untereinheiten einhergeht. Das gegenwärtige Modell in Abb. 1.5 besagt, dass ein inaktives Integrin eine gebogene Form einnimmt, in der die zytoplasmatischen Domänen aneinander gelagert sind. Eine Aktivierung führt zur Aufrichtung des Adhäsionsmoleküls, was die Ligandenbindungsstelle mit der β -Propeller- und der I-Domäne exponiert. Damit einhergehend findet eine Trennung der zytoplasmatischen Untereinheiten statt (Liddington und Ginsberg, 2002; Takagi, 2002). NMR („nuclear magnetic resonance“) und FRET („fluorescence resonance energy transfer“) -Studien bestätigen dieses Modell, nach welchem der Separation der intrazellulären Domänen eine Schlüsselrolle bei der Integrinaktivierung sowohl durch inside-out wie auch outside-in signaling zukommt (Vinogradova *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

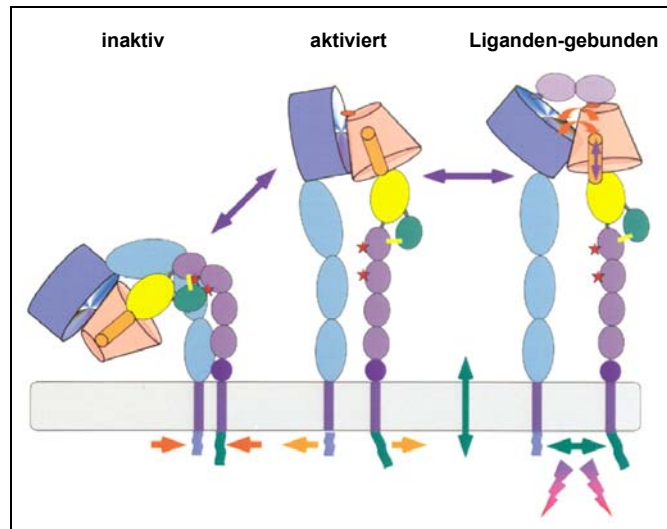


Abb. 1.5: Modell für Konformationsänderungen, die während der Integrinaktivierung vollzogen werden (nach Hynes, 2002).

Das inaktive Integrin nimmt eine gebogene Form ein. Nach Aktivierung kommt es zum Aufrichten des Rezeptors, was eine Ligandenbindung ermöglicht. Weitere Konformationsänderungen, die mit Ligandenbindung verknüpft sind, führen zu Signaltransduktion („outside-in“). Damit verbunden ist eine Trennung der zytosomatischen Domänen. All diese Änderungen stehen in einem reversiblen Gleichgewicht zueinander.

1.4 Die Bedeutung der zytosomatischen Domänen

Die zytosomatischen Domänen der Integrine enthalten viele hoch konservierte Regionen. So weist ein großer Teil der gesamten β -Ketten hohe Homologien untereinander auf. In Bezug auf die α -Ketten ist der membranproximale Teil hoch konserviert (Hynes, 2002; s. Abb. 1.7). Gemeinsam stellen die zytosomatischen Untereinheiten einen Verknüpfungspunkt zwischen extrazellulärer Umgebung und intrazellulären Strukturen dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Trotz der Tatsache, dass die zytosomatischen Bereiche der Integrine um vieles kleiner sind als die extrazellulären Domänen, können sie dennoch den Aktivierungsstatus der Integrine regulieren und somit Struktur und Funktion der extrazellulären Untereinheiten bestimmen.

1.4.1 Integrin-Zytoskelett Interaktionen

Verschiedene Studien belegen die Bedeutung vom Zusammenspiel von Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett (Brakebusch *et al.*, 2002).

Ligandenbindung führt zum Clustering der Integrine, worauf hin Aktin-Filamente und Signalproteine an die zytosomatische Domäne der Integrine rekrutiert werden (Hynes, 2002). Diese ausgebildeten Zentren heißen im unreifen Stadium „focal complexes“ und

reifen zu „focal adhesions“. Sie sind wichtig für die Effektorfunktionen von Integrinen. Verbindungen zwischen Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett sind sehr dynamisch und Bestandteil vieler regulatorischer Prozesse wie z.B. der Wundheilung oder der Metastasierung. Beteiligt sind sie auch an Entwicklungsvorgängen oder Immunantworten (Grose *et al.*, 2002).

Zu den Proteinen, die Integrine und Aktin-Zytoskelett verbinden, zählen Talin, Filamin, α -Aktinin und die Integrin-linked Kinase (ILK).

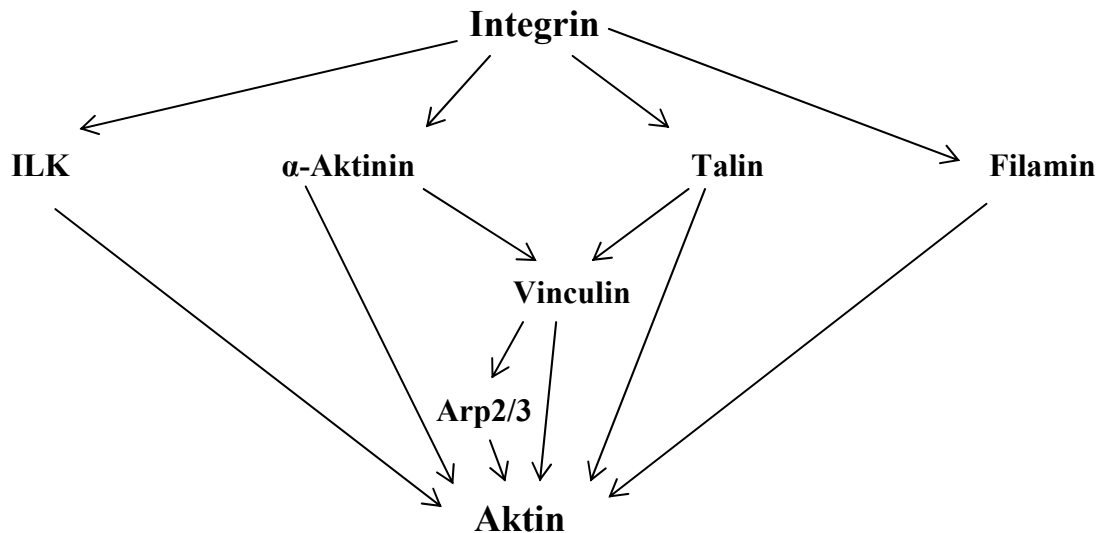


Abb. 1.6: Darstellung der verschiedenen Signalwege, über welche ein Integrin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden werden kann (nach Brakebusch und Fässler, 2003).

Letztere gehört unter den Bindungspartnern der Integrine zur Gruppe der potentiellen Signalmoleküle (Dedhar *et al.*, 1999). ILK ist eine Serin/Threonin Kinase, die an die zytosplasmatischen Domänen von $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ bindet (Hannigan *et al.*, 1996). Die Abwesenheit von ILK führt zu einer verminderten Integrin-vermittelten Adhäsion, die in Drosophila eine defekte Muskelkontraktion zur Folge hat. Die Plasmamembran ist hierbei zwar in Kontakt mit der ECM, kann aber keine Verbindung mit Aktin-Filamenten eingehen (Zervas *et al.*, 2001).

„Angriffspunkt“ für die Signalproteine bilden die Zytoskelett-assoziierten Proteine, die Integrine mit dem Zytoskelett verbinden. Zu ihnen zählen α -Aktinin, Talin und Filamin.

α -Aktinin kann ein crosslinking von Aktin-Filamenten bewirken und diese mit den zytosplasmatischen Domänen von Transmembranrezeptoren verbinden. Dabei kommt es zur Interaktion von Aktinin mit verschiedenen zytosplasmatischen Proteinen wie Vinculin, Zyxin, Erk1/2 und der PI3-Kinase (Wachsstock *et al.*, 1987; Crawford und Beckerle, 1991; Leinweber *et al.*, 1999). Diese Protein-Protein-Interaktionen können auf verschiedene Weise moduliert werden. So erhöht Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) die Interaktion mit Aktin, während PIP3 dem entgegen wirkt (Greenwood *et al.*, 2000).

Auch das Protein Filamin stellt eine weitere Schaltstelle zwischen Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett dar (Sharma *et al.*, 1995). Es kann auch mit Signalmolekülen wie Rho-GTPasen (Ohta *et al.*, 1999) und MEKK (Marti *et al.*, 1997) assoziieren. Deletions-Studien haben gezeigt, dass die Funktion von Filamin redundant zu der von α -Aktinin ist (Rivero *et al.*, 1999).

Das 250-kD große Protein Talin bindet über seine FERM-Domäne u. a. an Integrine, die „focal adhesion kinase“ (FAK) und PIP2 (Horwitz *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1995). Die Bindung von Talin an den zytoplasmatischen Teil der β -Kette von Integrinen stellt einen entscheidenden Schritt bei der Integrinaktivierung dar, indem es über Konformationsänderungen eine erhöhte Integrinaffinität bewirkt (Tadokoro *et al.*, 2003; siehe 1.4.2). Eine Interaktion von Talin und Vinculin erleichtert die Bindung von letzterem an Aktin (Gilmore und Burridge, 1996). Vinculin kann auch durch die Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes Aktin-Polymerisation induzieren (De Mali *et al.*, 2002).

Nach Ligandenbindung aktivieren Integrine Signalkaskaden, welche Umbildungen von Aktin-Filamenten bewirken. Dabei sind Signale, die von Rho-GTPasen (RhoA, Rac1, Cdc42) ausgehen, wichtig (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Diese werden ihrerseits zum einen durch Integrine über FAK und Src Kinasen (Schaller, 2001; Arthur *et al.*, 2002) und zum anderen durch Moleküle wie ILK (Degani *et al.*, 2002; Rosenberger *et al.*, 2003) aktiviert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mehr als 20 Moleküle beschrieben sind, die direkt mit den intrazellulären Domänen von Integrinen in Kontakt treten. Darüber hinaus sind noch viele indirekt eingebunden in Multiproteinkomplexen und in die Interaktionen involviert. Dieser hohe Grad der Regulation erlaubt viele zellspezifische Antworten.

1.4.2 Die Rolle der zytoplasmatischen Domänen bei der Integrinaktivierung

Zu den Proteinen, die unmittelbar an den zytoplasmatischen Domänen angreifen, gehört Cytohesin-1. Durch dessen direkte Bindung werden β 2-Rezeptoren spezifisch aktiviert (Kolanus *et al.*, 1996). Im Fall von β 3-Molekülen wird diese Funktion von Endonexin übernommen (Shattil *et al.*, 1995). Wie zuvor schon erläutert, ist auch das zytoplasmatische Protein Talin in die Integrinaktivierung über das inside-out signaling involviert. Inaktives Talin liegt in einer geschlossenen Konformation vor. Es kann zum einen über eine Spaltung durch Calpain aktiviert werden (Yan *et al.*, 2001) und zum anderen durch Interaktion mit Phosphatidylinositolen (Martel *et al.*, 2001). In beiden Fällen bindet daraufhin die FERM-Domäne von Talin an den zytoplasmatischen Bereich der β -Kette (Calderwood *et al.*, 1999, 2002). Dadurch wird die im inaktiven Status bestehende Interaktion zwischen α - und β -Kette aufgehoben (Vinogradova *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003), was mit

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Integrine unterliegen einer starken Aktivitätsregulation, die über Affinitäts- und Aviditätsänderungen beeinflusst wird. Den zytoplasmatischen Domänen der Integrine kommt dabei eine bedeutende Rolle zu.

Da mit Ausnahme einer Arbeit an *Drosophila* (Martin-Bermudo *et al.*, 1998) nur Daten aus *in vitro*-Experimenten vorliegen, die einen Einfluss der α -Ketten der zytoplasmatischen Domäne auf die Integrinaktivität nahe legen, ist es Ziel des Projekts, die Integrinregulation an einem Mausmodell *in vivo* zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang ist das Integrin LFA-1 von besonderem Interesse, weil es auf allen Leukozyten exprimiert wird und dadurch in vielen Bereichen ihrer Funktionen involviert ist. So spielt LFA-1 eine Rolle bei der Migration von Leukozyten über die Venolen mit hohem Endothel, sowohl während der normalen Lymphozyten-Rezirkulation durch die Lymphknoten als auch als Antwort auf inflammatorische Signale. Des Weiteren ist LFA-1 von Bedeutung bei der Formation der „immunologischen Synapse“, welche den Kontakt zwischen T-Zellen und APCs bei Immunantworten beschreibt.

Am Beispiel von α IIb β 3 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Deletion von GFFKR zu einer konstitutiv aktiven Form des Adhäsionsmoleküls führt (O'Toole *et al.*, 1994). Darüber hinaus gibt es auch *in vitro* Daten für LFA-1, welche die Bedeutung des Motivs GFFKR für den inaktiven Zustand des Integrins α L β 2 belegen (Lu und Springer, 1997). Dieses hochkonservierte Motiv GFFKR sollte nun *in vivo* in der α -Kette des Integrins LFA-1 deletiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beschriebene Mutation des α L-Gens durch homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen einzuführen. Anschließend sollte durch Analyse des Phänotyps der daraus entstandenen Knock-In-Mäuse, die konstitutiv aktives LFA-1 exprimieren sollten, die Bedeutung der Aktivitätsregulation für die Rezeptorfunktion *in vivo* aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% N,N' Methylbisacrylamid)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Biorad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Sigma, Taufkirchen
CpG-1668	MWG Biotech, Ebersberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
dNTP	Eurogentec, Belgien
Eosin Y	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Fibronektin	Roche, Mannheim
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
FKS Gold	PAA, Linz, Österreich
Formaldehyd (37% ige Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex
Giemsa	Merck, Darmstadt
G418 (Neomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
H 33342 (Bispenzimid)	Calbiochem, Bad Soden
HEPES	Sigma, Taufkirchen
HBSS	Sigma, Taufkirchen

IL-2 (human, rekombinant)	Eurocetus, Amsterdam, Niederlande
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Sigma, Taufkirchen
Lachssperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Laminin	Roche, Mannheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS Serotyp 0127:B8	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Marker 1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Oligo(dT)12-18 Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Seelze
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS) w/o Mg^{2+} , Ca^{2+}	Biochrom, Berlin
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat)	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Random Primers	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Sigma, Taufkirchen
SINFEKL (OVA peptide 257-264)	Research Genetics, Huntsville, AL
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Toxin Technology, Serosota, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N`N` - Tetraethylmethylen-diamin)	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Thioglykollat	Difco Labs, Detroit, USA
TNF- α	Bioconcept, Umkirch
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen, Seelze
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
X-Gal (X-Galactopyranosid)	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Radiochemikalien

[α - ^{32}P]-dCTP redivue, spezifische Aktivität ~ 3000 Ci/mmol, $T_{1/2} = 14,3$ d

[Methyl- ^3H] Thymidin, spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol, $T_{1/2} = 13,3$ y

^{51}Cr als $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, spezifische Aktivität 35 mCi/ml, $T_{1/2} = 27,7$ d

Die Reagenzien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

2.1.3 Kits und Sonstiges

Centricon-10, Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit	Millipore, Eschborn
Gene Screen Plus	NEN Life Science, Boston, USA
NucleoBond Plasmid Maxi Kit	Clontech, Palo Alto, USA
NucTrap Probe Purification Columns	Stratagene, Heidelberg
3MM Whatman Filterpapier	GLW, Würzburg
MicroAmp® Optical Tubes	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Caps	Applied Biosystems
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Plastikwaren	Falcon, New Jersey, USA Nunc, Naperville, USA Corning, New York, USA
Poly-Prep-Säulen	BioRad, München
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Plasmid Purification Kit (Maxi)	Qiagen GmbH, Hilden
Rediprime DNA labelling system	Amersham, Braunschweig
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Smart Ladder (DNA Größenstandard)	Eurogentec, Belgien
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

2.1.4 Geräte

β -Counter	Matrix™96, Packard, USA
γ -Counter	Cobra® Auto Gamma Reader, Packard, USA

Brutschrank	Kendro Laboratory Products GmbH, München
CASY1 Model TT Cell Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Elektrophoresekammer für DNA	Fischer Scientific, Ingolstadt
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
ELISA-„Reader“	Biolumin TM 960, Kinetic Fluorescence/Absorbance, Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
Fluoreszenz-Zellsorter (FACS)	„FACS-Calibur“ BD Biosciences, Heidelberg
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge	Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0 R, Hereus, Hanau
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Jena DMRBE, Leica, Nussloch
Photometer	Spectronic Genesys5, Spectronic Instruments
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics, Krefeld
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad	Mixing Rotor, Renner, Darmstadt
Schüttler	Celloshaker Variospeed, Cemetron Products, Biotec, Fischer
Sterilbank	Hersafe, Kendro Laboratory Products GmbH, München
Stromquellen Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen; Uno-Thermoblock, Biometra, Göttingen
Thermocycler für TaqMan	ABI Prism TM 7700 Sequence Detector
Tischzentrifugen	Biofuge 15, Heraeus, Hanau Picofuge, Heraeus, Hanau
UV-Crosslinker	UV Stratalinker®2400, Stratagene, Hamburg
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann Labor Technik
Zell-Harvester	Micro 96 Harvester, Skatron Instruments UK

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Rediprime TM II Random priming labelling system	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	BioLabs, New England Fermantas, Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNasin	Promega, Madison, USA
Superscript II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR [®] Gene Polymerase Kit	Applied Biosystems
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

2 x BBS	50 mM 280 mM 1,5 mM	BES NaCl Na ₂ HPO ₄ pH 6, 96
Citratpuffer	8 ml 17 ml 25 ml	0,1 M Zitronensäure 0,1 M Natriumcitrat H ₂ O _{dd}
Coomassie Brillant-Blau Färbelösung	0,25% 50% 10%	Coomassie brillant Blue R-250 Methanol Essigsäure
Entfärbelösung für Coomassie Brillant-Blau	45% 10%	Methanol Essigsäure
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM 10% (v/v)	NH ₄ Cl Tris-HCl, pH = 7,65 pH = 7,2

Material und Methoden

DEPC-H ₂ O	0,1%	DEPC in H ₂ O _{dd} , 12-24 h rühren und danach, zum Inaktivieren des nicht gebundenen DEPCs, autoklavieren
DNA-Auftragspuffer (6x)	1 ml 1 ml 1 ml 3 ml	10x TAE Orange G (10 mg/ml) Glyzerol H ₂ O _{dd}
Intrazelluläre Färbung – Waschpuffer	0,5% 0,02%	BSA Natriumazid in PBS
Intrazelluläre Färbung – Fixierungspuffer	2%	Paraformaldehyd in PBS
Intrazelluläre Färbung – Permeabilisierungspuffer	0,5% 0,02% 0,5%	BSA Natriumazid Saponin in PBS
5x KCM	500 mM 150 mM 250 mM	KCl CaCl ₂ MgCl ₂
2x SDS-Probenpuffer	5% 30% 2% 80 mM	Bromphenolblau Saccharose SDS Tris-HCl; pH 6,8
20x SSC	3M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat pH 7
Southern Blot - Hybridisierungslösung	50 g 50 ml 423 ml 29 g	Dextransulfat SDS (10%) H ₂ O _{dd} für 30 min unter Rühren auf 65°C erwärmen NaCl
Southern Blot - Waschlösung A	2x 1%	SSC SDS
Southern Blot - Waschlösung B	0,2x 0,1%	SSC SDS

Southern Blot – „Stripping“-Lösung	0,5%	SDS
50x TAE	2 M 1 M 0,1 M	Tris, pH = 8,0 Eisessig EDTA
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 EDTA, pH = 8,0
TNE	10 mM 100 mM 1 mM	Tris, pH = 8,0 NaCl EDTA, pH = 8,0
TSB-Puffer („transformation and storage buffer“)	85% 5% 10% 10 mM 10 mM	LB-Medium (v/v) DMSO (v/v) Polyethylenglycol 4000 (v/v) MgCl ₂ MgSO ₄
Verdaulösung	500 µl 50 µl 7,5 µl	TNE SDS 10% Proteinase K

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von *E.coli* wurde ausschließlich durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiertes Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet.

LB-Medium	1,0%	Trypton
	0,5%	Hefeextrakt
	1,0%	NaCl
		pH 7,2

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

Folgende Antibiotika wurden zur Selektion von Bakterienkulturen verwendet:

Ampicillin	100 µg/ml	Medium
SOC-Medium	2,0%	Trypton
	0,5%	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂

20 mM Glukose (nach dem Autoklavieren steril zugeben)
pH 7,2

2.2.3 Medien für die Zellkultur

FKS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch 30 Minuten auf 56°C erhitzt.

EF-Medium	DMEM
	5% FKS
	2 mM L-Glutamin
	0,1 mM β -Mercaptoethanol
ES-Medium	DMEM
	15% FKS
	2 mM L-Glutamin
	0,1 mM β -Mercaptoethanol
	1% LIF („leukemia inhibitory factor“)
Einfriermedium	90% FKS
	10% DMSO
293T-Zellen	DMEM
	10% FKS
	2 mM L-Glutamin
Splenozyten	RPMI
	10% FKS Gold
	2 mM L-Glutamin
	0,1 mM β -Mercaptoethanol
bEnd5 Zellen	DMEM
	10% FKS
	2 mM L-Glutamin
	1% NEAA
	1% NaPyruvat
	0,1 mM β -Mercaptoethanol

EL-4 Zellen	RPMI
	10% FKS
	2 mM L-Glutamin
	0,1 mM β -Mercaptoethanol

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> DH5 α	F- <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , (<i>argF-lac zya</i>), U169, $\phi 80lacZ\Delta M15$	Stratagene, Heidelberg
<i>E.coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), $\phi 80lacZ\Delta M15$, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i>	Invitrogen, Niederlande
<i>E.coli</i> JM110	<i>rpsL</i> (Str ^r), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacV</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)[F' <i>tra D36pro AB lacI ZAM15</i>]	Stratagene, Heidelberg

2.3.2 Zelllinien

Tabelle 2.2: Verwendete Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
E14.1 (ES)	murine embryonale Stammzellen (129SvJ)	A. Joyner, Toronto, Kanada
EF	Embryonale Fibroblasten aus CD 1-Mäusen	Primärkultur
293T	humane embryonale Nieren-Zelllinie	ATCC Nummer CR-11268
Splenozyten	primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	
bEnd.5	Maus Endotheliom Linie aus Primärkulturen von Gehirndothel	B. Engelhardt, Münster
EL-4	Murine T Zell Lymphom Zelllinie (C57BL/6)	ATCC Nummer TIB-39

2.3.3 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten. Als Blastozystenspender dienten C57BL/6 Mäuse, als Ammenmütter (C57BL/6 × BALB/c) F1 Tiere. Die LFA-1 Mutation wurde auf den C57BL/6 Stamm rückgekreuzt, ausgehend von (C57BL/6 × 129/Ola) F1 LFA-1^{d/+} Tieren.

C57BL/6 und Balb/c Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann, Borcheln im Alter von 6-8 Wochen bezogen.

2.4 Antikörper und Primer

2.4.1 Antikörper

In Tabelle 2.3 sind Antikörper und Protein Standards aufgeführt, die bei FACS-Färbungen, Immunhistochemie und der *in vitro* Stimulation zum Einsatz kamen.

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon/Spezies	Verwendung	Quelle
Anti-Maus B220-PE	RA3-6B2/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD3ε	145-2C11/armenischer Hamster	Stimulation	BD PharMingen
Anti-Maus CD4-PE	GK1.5/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD4-FITC	RM4-5/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD8-FITC	53-6.7/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD11a-biotin	2D7/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD25-FITC	7D4/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD28	37.51/syrischer Hamster	Stimulation	BD PharMingen
Anti-Maus CD44-PE	IM7/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus IgD-PE	11-26/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus IgM-FITC		FACS	Jackson ImmunoResearch
Anti-Maus Gr1-FITC	RB6-8C5/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD11b-PE	M1/70/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus TCRγδ-PE	GL3/armenischer Hamster	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD25-PE	3C7/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD69-PE	H1.2F3/armenischer Hamster	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD18-FITC	C71/16/Ratte	FACS	CALTAG
Anti-Maus CD49d-FITC	R1-2/Ratte	FACS	BD PharMingen
Streptavidin-Cy-Chrome		FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD11c-FITC	HL3/armenischer Hamster	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD18-FITC	C71/16/Ratte	FACS	BD PharMingen

Anti-Maus CD49b-FITC	Ha1/29/armenischer Hamster	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD49d-FITC	9C10/Ratte	FACS	BD PharMingen
Anti-Maus CD62L-FITC	MEL-14/Ratte	FACS	BD Pharmingen

2.4.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden alle von der Firma GATC (Konstanz) synthetisiert.

KA/for: 5' AAG CTT TAC AGA TCT CTT CCT GTC CCT GGA GCA GAT GCC
ACC GAC TGT GGT GTA 3'

KA/rev: 5' ATC GAT AGC AGA AGA CAG GCT TCA CCG ATG GCC CTC TTG
GC CTT CAT C 3'

screening/for: 5' ACC ACA CCT GGC CTC ACT GCT TC 3'

screening/rev: 5' GGT CCT GAG ATG GCA GTT TCT CCG 3'

Neo1500: 5' TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG 3'

cre2+: 5' CAT CGC CAT CTT CCA GCA 3'

cre-3: 5' GAT CGC TGC CAG GAT ATA CG 3'

genotyp/for: 5' AGC CCT GGC TAT CCT AGA CTC 3'

3'FP/for: 5' GAC TAA GGA GGG TTC CCAC GCT GTG CA 3'

3'FP/rev: 5' AGC GGA GAG AGT AAG CAA TCA ACT GT 3'

mICAM/for: 5' GAG AGG GAA TTC CCT GCA ATG GCT TCA ACC 3'

mICAM/rev: 5' GAG AGA GAG GAT CCA GGC TCC TGG CCT CGG AGA C 3'

Primer für die Real-Time PCR:

α L/for: 5' GCT GAT GGA GGT GTT CCA AA 3'

α L/rev: 5' AGA CCT AGG CCT TAG TCC TT 3'

β 2/for: 5' GTG CTA CGA CAA CGG TCA T 3'

β 2/rev: 5' GCT GTA AGC CAC GTT GTG TT 3'

β -Aktin/for: 5' AGC CAA GTC CAG ACG CAG G 3'

β -Aktin/rev: 5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC 3'

2.5 Klonierungsvektoren

pBluescript II KS: Klonierungsvektor; fl ori, ColE1 ori, lacZ, Ampicillin^R (Invitrogen)

pGEM-T-Easy: PCR-Vektor; fl ori, ori, lacZ, Ampicillin^R (Promega)

pCR II: PCR-Vektor; fl ori, pUCori, lacZ α , Ampicillin^R, Kanamycin^R
(Invitrogen)

pcDNA3.1 IgG abgeleitet vom pcDNA3.1, Expressionsvektor für die Expression von IgG-Fusionsproteinen

2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.6.1 Präparation von RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Pipettenspitzen und Geräte verwendet. Die Geräte wurden vor Gebrauch mit einer 3%-igen H₂O₂-Lösung oder mit einer 1N NaOH-Lösung behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren.

2.6.1.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zellen

RNA aus Geweben und Zellen wurden nach der Methode von Chirgwin (Chirgwin *et al.*, 1979) gewonnen. 1×10^8 Zellen oder 1g Gewebe wurden einmal mit PBS gewaschen und in 7ml einer GTC-Lösung lysiert. Das Zelllysate wurde 3-5 mal mit Hilfe einer Spritze durch eine 20G-Kanüle gepresst, um die genomische DNA zu scheren. In Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, München) wurden 3ml einer 5,7M Cäsiumchloridlösung vorgelegt und mit dem Zelllysate überschichtet. Die Röhrchen wurden in einem SW 41-Rotor für mindestens 6h bei 32.000 upm bei 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, die als Pellet vorliegende RNA wurde in 0,3M Natriumacetat resuspendiert und mit 3 Volumen absolutem Ethanol ü.N. gefällt. Anschließend wurde die RNA für 30 min bei 15.000 upm bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, und das Pellet nach dem Trocknen in 100-200 µl ddH₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde durch eine OD₂₆₀-Bestimmung ermittelt.

2.6.1.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Geweben

Für die Gewinnung gesamtzellulärer RNA aus Geweben wurden Reagenzien von Qiagen (Hilden) verwendet. Nach Entnahme der Organe wurden ca. 250 mg derselben zur Stabilisierung der Gewebe in RNAlater gegeben. Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte mittels Ultra-Turrax im Puffer RLT. Anschließend wurde das Gewebelysate für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Dem dadurch gewonnenen Überstand wurde dasselbe Volumen 70% Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt bevor die Hälfte davon auf eine Qiagen-Säule pipettiert wurde. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min wurde dieser Schritt mit dem zweiten Teil wiederholt. Es wurde Puffer RW1 auf die Säule gegeben und für weitere 5 min zentrifugiert. Um die komplette DNA zu verdauen, ließ man ein DNase Mix für 15 min auf der Säulenmembran einwirken bevor sich ein zweiter Zentrifu-

gationsschritt mit RW1 anschloss. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit RPE (4000 rpm, 5 min) konnte die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert werden (4000 rpm, 5 min).

2.6.2 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dieses Verfahren beruht auf den aus der Replikation von Retroviren gewonnenen Erkenntnissen (Houts *et al.*, 1979; Kotewicz *et al.*, 1985; Gerard *et al.*, 1986). Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in einem Volumen von 8 µl eingesetzt. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide, die sich an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagern. In einem ersten Schritt wurde die mRNA mit jeweils 1 µl 10 µM Oligo-dT- und „random hexamer“-Primer für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Nach Zugabe von 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 2 µl dNTP-Mix (200 µM), 0,5 µl RNasin (Promega) und 1 µl Superscript II Plus (200 E/µl) wurde die mRNA während einer Inkubation bei 37°C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurde.

Die so erhaltene cDNA wurde sowohl als Template für RT-PCRs (s. 2.6.3) als auch zur Amplifizierung und anschließenden Klonierung von bestimmten DNA-Fragmenten eingesetzt.

2.6.3 Real-Time PCR mittels TaqMan

Mit Hilfe der TaqMan RT-PCR erhält man über die Menge der gebildeten cDNA eine direkte quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA. Zur Durchführung der RT-PCRs wurde das SYBR[®] Green System verwendet. Dabei handelt es sich um einen DNA interkalierenden Farbstoff. Durch dessen Bindung in die „minor groove“ der doppelsträngigen DNA wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach einer bestimmten Zyklenzahl wird Fluoreszenz messbar (Ct). Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt wie auch die DNA-Menge exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus setzt dies in Verhältnis zu einem „Housekeeping“-Gens wie β-Aktin, erhält man eine quantitative Aussage.

Ein PCR-Ansatz besteht aus:	15 µl	SYBR [®] Green Master Mix
	5 µl	DNA (0,1 µg/µl)
	je 1 µl	Primer (20 pmol)
	8µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen für die verwendeten Primerpaare:

52°C	2 min
95°C	10 min
95°C	0,15 min
66°C	1 min

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurden auf dem ABI Prism™ 7700 Sequence Detector durchgeführt und mit Hilfe des Programmes Sequence Detector v.1.6.3 ausgewertet.

2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Saiki, R.K. *et al.*, 1988) können definierte DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, amplifiziert werden.

Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (*annealing*) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle DNA-Polymerase verlängert, wobei aus einem Doppelstrang zwei neue synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung dieser Reaktionsfolge kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden.

Wenn auf erhöhte Kopiergenauigkeit Wert gelegt wurde, so wurde als Polymerase das Expand™-System (Boehringer) oder die Pwo DNA Polymerase verwendet. Beide Polymerasen besitzen eine „proofreading“ Aktivität. Im Normalfall kam jedoch die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zum Einsatz.

In einem 50 µl-Ansatz wurden 100-150 ng DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl 10x Nukleotidgemisch (je 200 µM aller vier Desoxynukleotide), jeweils 50 pmol der Primer und 1µl Taq-Polymerase (5 U) gemischt und mit *aqua bidest* auf 50 µl aufgefüllt. Bei Verwendung eines Reaktionspuffers ohne MgCl₂ wurden noch 2-3 mM MgCl₂ hinzugefügt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

Ein Reaktionszyklus umfaßte im allgemeinen die Denaturierung der DNA bei 95°C für 60 Sekunden. Darauf folgte die Anlagerung der Primer für ebenfalls 60 Sekunden, wobei die Temperatur einige Grad unter der Schmelztemperatur der Primer gehalten wurde. Daran schloß sich die Reaktionszeit der Polymerase (*extension*) für ein bis drei Minuten (1 min/1000 bp) bei 72°C an. Dieser Zyklus wurde in der Regel 30 mal wiederholt.

Sollte das Reaktionsprodukt für eine Klonierung weiterverwendet werden, erfolgte eine Fragmentisolierung aus dem Agarosegel zur Entfernung überschüssiger Primer, Nebenprodukte und der Polymerase (s. 2.6.7.2).

2.6.5 Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden in 1% bis 1,5% igen Agarosegelen (in TAE-Puffer) aufgetrennt. Der Gellösung wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker entsprechend der zu erwartenden Banden. Die DNA konnte nach Einbau des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.6.6 Restriktionsverdau von DNA

DNA-Moleküle verfügen über Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen und können so sequenzspezifisch gespalten werden. Die Restriktionsanalyse von DNA diente entweder dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Umklonieren von DNA-Fragmenten (s.2.6.6).

Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten fanden meist in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt. Dabei wurden mindestens 2 Units Enzym/µg DNA unter den entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei der Verdau für mindestens eine Stunde bei 37°C durchgeführt wurde. Beachtet wurde dabei, daß auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde, um die inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu verringern.

Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster mit dem anhand von Restriktionsenzymsschnittkarten ermittelten Schnittmuster verglichen.

2.6.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.6.7.1 Ausschneiden der DNA aus einem Vektor

Sowohl die gewünschte DNA (Insert) als auch der Vektor wurden mit Hilfe von zwei identischen Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten und nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel eluiert.

2.6.7.2 DNA-Elution aus einem Agarosegel

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen erfolgte mit Hilfe der Reagenzien des Qiaquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen).

Die gewünschte Bande wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorfröhrchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Um die DNA an die Säule zu binden, wurde der Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben und für eine Minute bei 13.000 upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um restliche Alkoholspuren zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 13.000 upm für eine Minute zentrifugiert und dann auf ein frisches Eppendorfröhrchen gegeben. Nun wurden 30 - 40 µl H₂O auf die Säule gegeben, für eine Minute inkubiert und durch eine weitere Zentrifugation wurde die DNA von der Säule eluiert. Ein Aliquot wurde zur Überprüfung von Reinheit und Menge auf ein 1% iges Agarosegel gegeben.

2.6.7.3 Dephosphorylierung von Vektoren

Um Religationen von Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Hierfür wurden die 1-5 µg der in 50 µl H₂O gelösten DNS mit 5 µl 10x Phosphatasepuffer (5 mM Tris/HCl, 0,1 M EDTA, pH 8) und 1 µl alkalischer Phosphatase (1E) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch anschließende Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte erneut eine Aufreinigung über Qiaquick-Säulchen (s. 2.6.6.2)

2.6.7.4 DNA-Ligation

Die Ligation zweier kompatibler DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Diese katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatenden.

Hierzu wurde geschnittene und gereinigte Vektor-DNA mit einem 3-10 fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragmentes, 1 µl 10x Ligase-Puffer (660 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5) und 1 µl T4-DNA-Ligase gemischt und in einem Gesamtvolumen von 10 µl für mindestens 4 Stunden bei RT oder bei 16°C über Nacht inkubiert.

Anschließend erfolgte mit dem Ligationsansatz die Transformation von Bakterien.

Zur Ligation von PCR-Produkten wurde der TA-Cloning[®] Kit verwendet. In diesem Kit wurde die Eigenschaft der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ausgenutzt, an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen. PCR-Produkte konnten so direkt mit dem Vektor pCRTMII (Invitrogen) ligiert

werden, da diese jeweils kompatible Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzen. Die Ligationen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.8 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien verlief nach der Methode von Chung und Miller (1988). Dafür wurden Bakterien auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Davon wurde eine Einzelkolonie in 20 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 1 ml dieser Vorkultur wurden in 1000 ml LB-Medium gegeben und nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm wurden die Bakterien bei 4°C für 10 min bei 6000 upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis in 75 ml TSB resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und in Aliquots zu je 500 µl portioniert. Diese Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 100 ng der DNA bzw. 5 µl des Ligationsansatzes mit 20 µl 5x KCM gemischt. Dieser Ansatz wurde mit ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und auf 4°C vorgekühlt. Nach Zugabe von 100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien wurde die Suspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C inkubiert und sofort für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die durch Aufnahme des Vektors die entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, bildeten Kolonien, die gepickt, expandiert und zur Plasmid-DNA-Isolierung genutzt werden konnten.

2.6.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge über eine Minipräparation (Ausbeute etwa 30 µg Plasmid-DNA) für analytische Zwecke oder eine Maxipräparation (Ausbeute etwa 800 µg Plasmid-DNA) in präparativem Maßstab. Dafür wurde jeweils eine Einzelkolonie in der zur Präparation erforderlichen Menge LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im 37°C Schüttler inkubiert.

2.6.9.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

1,5 ml Bakteriensuspension einer 2 ml Übernachtskultur wurde bei 6.000 upm für zwei Minuten pelletiert und in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl des Puffers 2 folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde durch 300 µl Puffer 3 neutralisiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 upm, 4°C) wurde der Plasmid-haltige Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und durch Zugabe des 0,8 fachen Volumens an Isopropanol gefällt. Nach Inkubation bei RT für zehn Minuten wurde die DNA durch Zentrifugation (15 min, 11000 upm) gefällt. Nachdem das entstandene Pellet mit 70% igem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet worden war, wurde es in 50 µl ddH₂O gelöst.

Die verwendeten Puffer 1-3 wurden dem Plasmid Purification Kit (Maxi) der Firma Qiagen (Hilden) entnommen.

2.6.9.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparationen der Plasmid-DNA-Isolierung wurden die Reagenzien von Qiagen (Hilden) verwendet. 500 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert (4°C, 5.000 upm, zehn Minuten) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz vorsichtig geschüttelt und nicht länger als fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 (3M Kac, pH 5,5) zur Neutralisation zugegeben. Es wurde wiederum vorsichtig geschüttelt und 20 Minuten auf Eis gekühlt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie. Nach Zentrifugation (4°C, 30 Minuten, 15.000 upm) wurde der klare Überstand auf eine Qiagen-Säule 500 pipettiert, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0,7 fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (4°C, 30 Minuten, 12.000 upm) und mit 5 ml 70% igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 300-500 µl ddH₂O gelöst.

Die Präparation der BAC-Klone („bacterial artificial chromosome“) erfolgte mit dem NucleoBond Plasmid Maxi Kit der Firma Clontech laut Protokoll.

2.6.9.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm gegen ddH₂O. Bei einer Plasmid-DNA-Lösung entspricht eine optische Dichte von 1,0 einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml.

2.6.10 Isolierung von chromosomaler DNA

Aus Proteinase-verdauten Mausschwanzproben oder ES-Zellen wird die genomische DNA nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen direkt durch Ausspinnen gewonnen. Die ES-Zellen bzw. Schwanzproben wurden ü.N. in Verdauung (Kapitel 2.2.1) bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Das Lysat wurde 2 min bei 15000 UpM abzentrifugiert und der Überstand in ein neues ERG überführt. Die Proteine wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde der DNA zweifaches Volumen absoluter Alkohol zugegeben und das ERG wurde mehrmals geschwenkt. Anschließend wurde die DNA mit der Pipettenspitze ausgesponnen, in 70% EtOH gewaschen und in 200 µl TE-Puffer bei 37°C für ca. 1h gelöst. Gelöste chromosomale DNA wird bei 4°C gelagert.

2.6.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt.

2.6.12 Southern Blot (Southern, 1975)

In der Southern Blot Analyse werden DNA-Moleküle unter Einsatz einer bekannten DNA als Sonde nachgewiesen. Dabei wird die DNA elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und fixiert. Nach Inkubation der Membran mit radioaktiv markierten Sonden können nach Hybridisierung die entstandenen DNA-DNA-Hybride lokalisiert und die Transkripte des der Sonde zugrundeliegenden Gens sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden.

Nach einem Verdau ü.N. von 30 µg chromosomaler DNA oder 1-3 µg BAC-Klon mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurden die Ansätze mit Ethanol gefällt, mit Probenauftragspuffer versetzt und in einem 0,8% igen Agarosegel bei 30 V ü.N. aufgetrennt.

Bevor nun die aufgetrennten DNA-Moleküle auf eine Nylonmembran geblottet werden konnten, mussten das Gel und die Membran entsprechend vorbehandelt werden.

Dazu wurde das Gel zur partiellen Depurinierung für 10 min in 0,25 N HCl gewaschen. Daraufhin wurde es für 30 Minuten in 0,4 N NaOH geschwenkt. Die Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und in 0,4 N NaOH äquilibriert.

Für den Transfer wurden zwei Schalen mit je 300 ml 0,4 N NaOH/0,6 M NaCl gefüllt, eine Glasplatte auf die Schale gelegt und ein Filterpapierstreifen so über die Glasplatte gelegt, dass er an beiden Seiten in die NaOH-Lösung eintauchte. Das Gel wurde nun auf das Filterpapier gelegt, an den Rändern mit Parafilmstreifen abgedichtet und mit der vorbehandelten Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) luftblasenfrei bedeckt. Auf die

Membran wurden drei in NaOH/NaCl angefeuchtete 3MM Whatman Papiere und ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Dieser Aufbau wurde mit einer Glasplatte und 500 g Gewicht beschwert. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen, um NaOH und Gelreste zu entfernen. Die transferierte DNA wurde auf der noch feuchten Membran mittels UV-Kreuzvernetzung fixiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der spezifischen DNA-Sonde musste die Membran prähybridisiert werden. Dazu wurde die Membran in 30 ml Prähybridisierungslösung für mindestens acht Stunden unter Rotieren bei 65°C inkubiert. Der Hybridisierungslösung wurden 300 µl denaturierte „Lachssperma“ DNA (10 mg/ml) zum Blockieren unspezifischer DNA-DNA-Wechselwirkungen zugesetzt.

Als Sonde wurden 20 ng gereinigter DNA mit Hilfe des „readiprime“-Kits der Firma Amersham nach den Angaben des Herstellers mit 50 µCi ³²P-dCTP markiert und die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit einer „NucTrap Probe Purification Column“ von der markierten Sonde getrennt. Diese so aufgereinigte DNA wurde anschließend 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und zur Hybridisierungslösung zugegeben, nachdem 20 ml derselben verworfen wurden. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C ü.N. Ungebundene Sonde wurde am nächsten Tag durch zwei Waschschriffe von je 30 min mit Waschlösung A und einem anschließenden Durchgang (30 min) mit Puffer B bei 65°C entfernt. Spezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch Detektion mit Hilfe des Phosphoimagers dokumentiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Membran zu keinem Zeitpunkt völlig austrocknet, um ein späteres erneutes Hybridisieren nach vorherigem Entfernen der alten Sonde zu ermöglichen.

Hierzu muss die radioaktive DNA-Sonde durch Waschen unter sehr stringenten Bedingungen (Strippen) abgelöst werden. Dies erfolgte durch einmaliges Waschen für 10 min bei 90°C in einem 0,5% igem SDS-Waschpuffer. Danach konnte die Membran wie oben beschrieben erneut hybridisiert werden.

2.7 Proteinanalytische Methoden

2.7.1 Aufreinigung von Ig-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von Proteinen können Fusionsproteine eingesetzt werden. Fusionen von Proteinen mit dem konstanten Abschnitt des humanen Immunglobulin G (IgG) können mit Hilfe von an Sepharose gekoppeltem Protein A aufgereinigt werden. Dabei wurden 40 ml der Überstände, welche die von transfizierten 293T Zellen sezernierten gewünschten Proteine enthalten, mit 150 µl Protein A Sepharose (Protein A Sepharose 1:10 verdünnt mit

Sepharose) ü.N. auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert, um die Bindung des Fusionsproteins an die Protein A Sepharose zu ermöglichen. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS aufgenommen und eine Poly-Prep-Säule damit befüllt. Das gewünschte Protein wird mit 500 µl Citratpuffer (0,1 M; pH 3) eluiert und in einem EPR aufgefangen, in dem zuvor 75 µl Tris/HCl Puffer (1 M; pH 10) zur Neutralisation vorgelegt wurden.

2.7.2 Aufkonzentrierung von Ig-Fusionsproteinen

Um die Konzentration von aufgereinigtem Fusionsprotein zu erhöhen, wird das Volumen des Protein-Eluats durch Zentrifugation über Centricon-10 Röhrchen eingeengt. Im Zuge dessen wurde das gereinigte und evtl. gepoolte Fusionsprotein in das Röhrchen gegeben und bei 4000 g für eine Stunde zentrifugiert, wodurch die gewünschten Proteine mit einem höheren Molekulargewicht von Lösungen und niedermolekulare Stoffen getrennt werden.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β-Mercaptoethanol, das im Laemmli-Auftragspuffer enthalten ist, reduziert Disulfidbrücken. Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich an die Hauptkette der Proteine an und kompensieren so Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen. Die Auftrennung im Polyacrylamid erfolgt daher hauptsächlich aufgrund der Masse der Proteine. Um eine optimale Auftrennung der Proteine im Gel zu erhalten, kann die Porengröße des Gels variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt. Die in den Vorschriften angegebenen Gelkonzentrationen beziehen sich auf die Acrylamid-Konzentration im Gel. Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst im Sammelgel konzentriert und wandern dann ins Trenngel ein.

Sammelgel (3%)	0,5 ml	Acrylamidlösung (30%/0,8%)
	1,2 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
	50 µl	10% SDS
	3,3 ml	H ₂ O
	50 µl	10% APS
	2,5 µl	TEMED

Trenngel (10%)	6,7 ml	Acrylamidlösung (30%/0,8%)
	5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 8,8
	230 µl	10% SDS
	8 ml	H ₂ O
	11,4 µl	10% APS
	2,5 µl	TEMED

Die Proteinproben wurden in Auftragspuffer 5 min bei 95°C denaturiert und in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen eingefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „SeeBlue Pre-Stained Standard“ verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 80-160 V.

2.7.4 Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurde eine Lösung mit Coomassie-Brilliant Blau R-250 verwendet. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit Proteinen. Die Polyacrylamidgele wurden ca. 20 min in der Coomassie Färbelösung (0,25 g Coomassie, 90 ml Methanol, 10 ml Essigsäure) geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung (90 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 90 ml H₂O) gebadet, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Mit dieser Methode können Proteinmengen von 1 µg gerade noch detektiert werden.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung von 293T-Zellen

2.8.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellablösung adhärenter Zellen erfolgte durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt, und die Zellen wurden in der gewünschten Verdünnung neu ausgesät.

2.8.1.2 Transfektion von 293T-Zellen mit CaPO₄

Durch die transiente Transfektion können in geeignete Vektoren klonierte Genabschnitte transient exprimiert werden.

Die transiente Transfektion von 293T-Zellen erfolgte nach der CaPO₄- Methode (Chen und Okayama, 1987). Am Tag vor der Transfektion wurden die subkonfluent wachsenden 293T-Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und gezählt. Pro 10 cm Kulturschale wurden 1×10^6 Zellen in 8 ml Transfektionsmedium ausgesät und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 16 µg Plasmid-DNA mit 80 µl 1 M CaCl₂ vermischt und mit ddH₂O auf 400 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 400 µl 2x BBS zugegeben und die Mischung wurde gevortext. Nach 10- minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung langsam unter Schwenken zu den Zellen in der Kulturschale hinzu pipettiert. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Nach 12-16 h erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurden die Zellen bei 7% CO₂ inkubiert. Die maximale Expression ist nach 48 h erreicht.

2.8.2 Methoden zur Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Fibroblasten

2.8.2.1 Zellkultur

ES-Zellen wurden grundsätzlich auf mit Mitomycin C vorbehandelten EF-Zellen (2 h, 37°C) kokultiviert, um die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Entscheidend ist, dass ES-Zellkolonien nicht ausdifferenzieren. Bei einer optimalen Kultivierung erscheinen sie bei der Betrachtung im Mikroskop als spindelförmige Kolonien mit einem glatten, hellscheinenden Rand. Ausdifferenzierende Kolonien flachen sich ab, werden matt und bilden Pseudopodien aus.

2.8.2.2 Die Elektroporation von ES-Zellen

ES-Zellen wurden wie beschrieben auf drei 15 cm-Zellkulturplatten expandiert (ca. 5×10^7 Zellen), für die Elektroporation in 7 ml ES-Medium aufgenommen und mit 200 µg linearisiertem Rekombinationskonstrukt in 1 ml PBS gemischt. Die Transfektion erfolgte in einem Volumen von je 0,8 ml in Elektroporationsküvetten (gap 4 mm, BioRad) bei 200 Ω, 250 µF und 0,34 Volt, wobei die Zeitkonstante zwischen 0,36 sec und 0,4 sec lag. Nach Abkühlen auf Eis wurden jeweils 0,4 ml des Transfektions-ansatzes auf eine vorbereitete EF-Kultur in 10 cm Schalen plattiert.

2.8.2.3 Die Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert, ab Tag 2 der Antibiotika-Selektion mit 200 g/ml G418 und ab Tag 4 zusätzlich der Selektion durch 2 mg/ml Gancyclovir unterworfen. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Sobald ES-Zellkolonien nach 10-14 Tagen herangewachsen waren, wurden diese mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und unter einem Binokular steril mit einer Mikropipette von der Platte gepickt. Die Kolonien wurden zunächst in 96-Well Mikrotiterplatten mit Trypsin/EDTA vereinzelt und anschließend wieder mit EF-Zellen kokultiviert. Nach zwei Tagen wurden die ES-Kolonien auf drei Mikrotiterplatten geteilt, wobei zwei für die PCR-Untersuchung der Kolonien nach vier Tagen mit PBS gewaschen wurden und das Pellet bei -20°C eingefroren wurde. Die Klone der verbleibenden Platte wurden währenddessen auf eine 48-Well Mikrotiterplatte transferiert und nach weiteren drei Tagen Kultur bis zum Vorliegen des Ergebnisses der PCR-Untersuchung in Einfriermedium eingefroren.

2.8.2.4 Das Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren von Zellen erfolgte im hierfür vorgesehenen Medium (s. 2.2.3). Dazu wurden die Zellen zunächst 30 min bei -20°C und anschließend für 24 h bei -80°C gelagert, ehe sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

2.8.3 Kultivierung von Splenozyten

Nach Entnahme (siehe 2.9.4) wurde die Milz in Medium über ein 70 µm Zellsieb homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurde nach Zentrifugation (1500 UpM für 3 min) das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 2.2.1) aufgenommen und für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und gegebenenfalls nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen sind anhand ihrer Blaufärbung von vitalen Zellen zu unterscheiden und werden nicht mitgezählt.

2.9 Tierversuche

2.9.1 Superovulation

Um Embryonen im Blastozystenstadium entnehmen zu können und um die Anzahl der gebildeten Embryonen zu erhöhen, wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurde

den Mäusen zwischen 14-17 Uhr 10 U PMSG und 44-48 h später 10 U hCG intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Artgenossen verpaart. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

2.9.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten für die Kultivierung von ES-Zellen wurden aus superovulierten CD1 Mäusen am Tag 14 post coitum gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert, in PBS gewaschen und der Kopf und die fötale Leber abgetrennt, um einen Großteil der fibroblastischen Zellen zu entfernen. Das restliche embryonale Gewebe wurde mit einem Skalpell so fein wie möglich zerteilt, dann durch ein Sieb gedrückt und in EF Medium kultiviert. Pro 10 cm Kulturschale wurden etwa 5×10^6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit Medium versorgt, expandiert und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.9.3 Generierung chimärer Mäuse

Für die Generierung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES-Zellen kam die Blastozysteninjektion zur Anwendung. Die Embryonen wurden dazu im Blastozystenstadium am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus superovulierter C57BL/6 Weibchen retrograd ausgespült und in M2 Medium aufgenommen. Etwa 15-20 der homolog rekombinierten ES-Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe von Mikromanipulatoren in das Blastocoel injiziert. Anschließend erfolgte der Uterustransfer der manipulierten Blastozysten in pseudoschwangere Ammenmütter. Bis zu 15 Blastozysten wurden pro Uterushorn transferiert.

2.9.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen, wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen.

2.9.5 Thioglykollat-induzierte Peritonitis

Um die Auswirkungen der Mutation auf die Reaktion eines lokalen Reizes zu untersuchen, wurde den Versuchstieren 0,8 ml Thioglykollat i.p. injiziert. Daraufhin wurde nach 0, 6 und 12 h die Anzahl der in die Bauchhöhle eingewanderten Leukozyten bestimmt. Um

diese Zellen genauer charakterisieren zu können, wurden darüber hinaus verschiedene FACS-Färbungen durchgeführt.

2.9.6 Immunisierung von Mäusen

Um die CD8 T Zell Funktion in einem Chrom-Assay zu testen, wurde den Mäusen in beide hinteren Füße subcutan je 50 µl Immunisierungslösung injiziert. Diese enthielt 150 µg Ovalbumin und als Adjuvans 5 nmol des Oligonukleotids (ODN) 1668 (5' – TCCATGACGTTCCCTGATGCT – 3'). Vier Tage nach Injektion wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten isoliert und die daraus gewonnen Zellen mit 10 U/ml IL-2 für weitere 4 Tage inkubiert. Die Durchführung des ⁵¹Cr-Zytoxizitätstests ist unter 2.10.6 beschrieben.

2.10 Immunologische und zellbiologische Methoden

2.10.1 Adhäsionsassays

2.10.1.1 Adhäsion an aufgereinigten Proteinliganden

Um die Adhäsion von Zellen an gereinigten Proteinliganden zu untersuchen, wurden 96 Loch ELISA Platten bei 4°C ü.N. mit gereinigtem ICAM-1 (1,5 µg/Loch in 100 µl PBS), VCAM-1 (0,8 µg/Loch in 100 µl PBS) und zur Kontrolle mit gereinigtem Fc (0,5 µg/Loch in 100 µl PBS) beschichtet. Letzteres wurde zuvor mit ICAM-1 und VCAM-1 zu deren Expression und Aufreinigung fusioniert. Die Platten wurden gewaschen und 1h bei 37°C mit HBSS-Puffer plus 1% BSA blockiert. In der Zwischenzeit wurde die für eine Konzentration von ca. 2×10^6 Thymozyten/ml benötigte Zellzahl abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 2 ml HBSS-Puffer resuspendiert. Hierzu wurden 12 µg/ml H33342 Fluoreszenzfarbstoff gegeben und die Zellen 30 min lang bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in HBSS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Mg^{2+} (5 mM), Mn^{2+} (1 mM) oder PMA (20 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert. Pro Loch wurden je 100 µl Zellen auf die beschichtete ELISA Platte gegeben. Die Platten wurden 10 min bei 10g zentrifugiert und anschließend in einem Biolumineszenzgerät vermessen. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurden die Platten in einer mit PBS befüllten Wanne untergetaucht und mit einer Folie abgeklebt. Danach wurden die Platten mit der Oberseite nach unten 10 min bei 50g zentrifugiert. Indem man die Plattenöffnungen auf Zellstoffpapier drückte, konnte ein Großteil des Puffers aus den Löchern entfernt werden. Reste wurden sorgfältig abge-

saugt und anschließend die Löcher mit 100 µl HBSS gefüllt. Nach nochmaliger Messung der Platte konnten die Prozentzahlen der gebundenen Zellen durch Verrechnung der 100% Werte aus der ersten Messung ermittelt werden.

2.10.1.2 Adhäsion an Endothelzellen

Um die Adhäsion von Zellen an Endothelzellen zu untersuchen, wurden 16 Loch Chamberslides mit 2,5 µg Fibronectin für 45 min beschichtet. Nach weiteren 60 min Trockenzeit wurden pro Loch 2×10^4 Endothelzellen in 200 µl ausplattiert und die Platten für 48 h bei 37°C inkubiert. Je nach Experiment wurde nach ca. 32 h 5 nM TNF- α pro Loch zugegeben. Nach 2 Tagen wurden die Objektträger zweimal mit je 200 µl Medium (DMEM + 5% FCS + 2% Glutamin + 25 mM HEPES) gewaschen. Anschließend wurden pro Loch 5×10^5 Lymphozyten in 100 µl Medium gegeben. Die Platten wurden bei RT für 30 min auf dem Wipptisch inkubiert. Daraufhin wurden sie durch zweimaliges Eintauchen in PBS gewaschen. Nachdem die Zellen 2 h in 2,5% Glutaraldehyd fixiert wurden, erfolgte die Auswertung der Assays durch Auszählen der Platten mit Hilfe eines Zähllokulars.

2.10.2 Proliferationsassays

Ruhende Zellen können durch eine Reihe von polyklonalen Aktivatoren zur Proliferation angeregt werden. Die proliferative Antwort ist anhand des [^3H]-Thymidineinbaus messbar. Zur Untersuchung der TZR-vermittelten Zell-Aktivierung wurden Splenozyten in der Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung mit verschiedenen Stimulatoren für 72 h inkubiert. Für die letzten 16 h wurde in jedes Loch 1 µCi [^3H]-Thymidin zugegeben. Der Einbau des [^3H]-Thymidins wurde anschließend mittels eines β -Counters vermessen.

2.10.3 „Allogene Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR)

Als „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) wird die Proliferation von T-Lymphozyten in Kultur als Antwort auf Zellen bezeichnet, die allogene MHC-Moleküle exprimieren. Die Splenozyten eines Donors wurden radioaktiv bestrahlt (30 Gy) und dienen als Stimulator-Zellen, die nicht mehr über DNA-Synthese oder Zellteilung auf die Stimulation durch die zweite Population antworten können. Die nicht-bestrahlte Population proliferiert und differenziert zu Effektorzellen aus. Im vorliegenden Fall wurden Splenozyten des Haplotyps H-2^d als Stimulator-Zellen und Splenozyten des allogenen Haplotyps H-2^b als Effektorzellen verwendet. Letztere wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Loch eingesetzt, wobei doppelt so viele bestrahlte Zellen hinzu pipettiert wurden. Im Folgenden wurde analog zum Vorgehen bei den Proliferationsassays verfahren.

2.10.4 Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Oberfläche (FACS-Analyse)

Durch eine FACS-Analyse können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, die durch Bindung von Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern geschlossen werden. So ist eine Aussage über die Expressionsdichte von markierten Oberflächenantigenen auf der Zelloberfläche möglich. Permeabilisiert man die Zellmembran mit Detergenzien, ist auch eine Färbung von intrazellulären Molekülen möglich.

2.10.4.1 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Pro Färbung wurden ca. 5×10^5 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und in 96-V- Mikrotiterplatten mit 1 μ g Antikörper pro Färbung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen, falls diese mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, in PBS resuspendiert und binnen ein bis zwei Stunden im Fluoreszenz-Zellsorter analysiert. Bei Färbungen mit unmarkierten Primärantikörpern wurde ein Färbeschritt mit direkt markierten Sekundärantikörpern angeschlossen.

Die SINFEKL-Tetramere zur Bestimmung der Antigen-spezifischen T-Zellen wurden von Dirk Busch synthetisiert. Die Färbung mit den Peptid-MHCII Tetrameren wurde analog zu herkömmlichen Ak für 45 min auf Eis im Dunkeln durchgeführt.

2.10.4.2 Intrazelluläre Färbungen

Für die Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen in 1 ml Fixierungspuffer für 20 min bei RT fixiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Zellen für 25 min bei RT in 200-300 μ l des dafür vorgesehenen Puffers permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen Antikörperlösungen (1:50 in Permeabilisierungspuffer) für 30 min bei RT inkubiert, zweimal gewaschen und in Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden im FACS-Scan analysiert.

2.10.5 Transmigrationsassay

Das Migrationsverhalten von Lymphozyten durch Endothelzellen kann man *in vitro* mit Hilfe eines sog. Zweikammersystems untersuchen. Dazu wurden die 12 Filtereinsätze (5 μ m Porengröße, 6,5 mm Durchmesser; Corning, USA) mit 2,5 μ g Laminin für 30 min beschichtet. Nach weiteren 60 min Trockenzeit wurden pro Loch 5×10^4 Endothelzellen in 200 μ l ausplattiert und die Platten für 48 h bei 37°C bis zur Konfluenz inkubiert. Je nach Experiment wurde nach ca. 32 h 5 nM TNF- α pro Loch zugegeben. Nach 2 Tagen wurden die Inserts nach zweimaligem Waschen mit 1×10^6 Lymphozyten beladen. Zuvor wurde

600 µl Medium in die bisher freien Vertiefungen der 24-Loch Platte vorgelegt, in welche die Filter eingesetzt wurden. Nun folgte eine vierstündige Inkubationszeit bei 37°C, 7% CO₂, während dieser die Lymphozyten durch den Endothel-Monolyer und den Filter in die untere Kammer wanderten. Die Anzahl der durchgewanderten Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellzählgerätes (CASY, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt.

Um etwaige Abweichungen in den Triplikaten zu erklären, wurde der Endothelzell-Monolayer überprüft. Dazu wurden die Filter 2 h durch Formalin-Dampf fixiert. Anschließend wurden die Einsätze 15 min in einer 5% Giemsa-Lösung gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Membranen nach dem Ausstanzen aus den Trägern zur Lagerung in Entellan eingebettet.

2.10.6 CTL Chrom-Assay

Die CD8 T Zell-Funktion kann in einem CTL Chrom-Assay analysiert werden, indem die spezifische Lyse einer Zielzelle durch eine aktivierte zytotoxische T Zelle gemessen wird. Lebende Zellen nehmen radioaktiv markiertes Natrium-Chromat (Na₂⁵¹CrO₄) auf, geben es aber spontan wieder ab. Wenn diese markierten Zielzellen abgetötet werden, wird das radioaktive Chromat freigesetzt und kann im Überstand von Kulturgemischen aus Zielzellen und zytotoxischen Effektor T Zellen gemessen werden.

Nach Entnahme der poplietalen und inguinalen Lymphknoten vier Tage nach Injektion von Ovalbumin/1668 wurden die Lymphozyten für vier Tage in 24-well Platten mit 3-4 x 10⁶ Zellen pro Loch kultiviert.

Einen Tag vor Durchführung des Assays wurden die EL-4 Zellen, die als Zielzellen eingesetzt wurden, umgesetzt. Am nächsten Tag wurden 2 x 10⁶ Zielzellen mit 12,5 MBq Na₂⁵¹CrO₄ für 1 h bei 37°C zur Markierung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Hälfte der Zielzellen mit der aus Ovalbumin stammenden Peptidsequenz SINFEKL für weitere 30 min inkubiert, was die spezifische Erkennung und anschließende Lyse durch die aktivierten T-Zellen ermöglicht. Nach weiteren zwei Waschschrritten wurden 100 µl (10³) Zielzellen im Verhältnis 1:1 zu seriell verdünnten Effektor-Zellen in 96-well V-Boden Platten zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37°C. Daraufhin wurden 100 µl Überstand aus jeder Vertiefung entnommen und die Radioaktivität im γ-Counter vermessen. Dabei errechnet sich die spezifische Lyse nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = [\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] / [\text{cpm (Maximallyse)} - (\text{Spontanlyse})] \times 100$$

Für die Messungen der Spontanlyse (8-fach Bestimmung) und der Maximallyse (4-fach Bestimmung) wurden Überstände aus Vertiefungen entnommen, in denen sich während der

Inkubationszeit nur Zielzellen befanden. Die Maximallyse wurde durch starke Resuspension der Zellen vor der Messung erreicht.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch den „Student's t“-Test. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, d. h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung einer LFA-1 gain of-function Mausmutante

Gezielte Eingriffe in das Genom der Maus erlauben eine direkte Korrelation zwischen genetischer und phänotypischer Veränderung. Um die Bedeutung der Aktivitätsregulation des Integrins LFA-1 für die Rezeptorfunktion *in vivo* untersuchen zu können, wurde die Methode der homologen Rekombination angewandt (Mansour *et al.*, 1988). Der Ansatz beruht darauf, dass die Neomycin-Resistenz Kasette auf beiden Seiten flankiert ist von unterschiedlich langen, homologen Bereichen des αL Lokus, um eine korrekte Rekombination des Vektors zu ermöglichen.

3.1.1 Klonierung des Rekombinationsvektors

Die Klonierung des Targetvektors, einschließlich der Aufklärung der Sequenzinformation und dem Einführen der Mutation in den „kurzen Arm“ wurde ausführlich in der vorangegangenen Diplomarbeit (Semmrich, Diplomarbeit) beschrieben. Aus dem Intron zwischen Exon 30 und Exon 31 stammt die Sequenz des langen Arms, die natürlicherweise eine HpaI Schnittstelle enthält. Der „kurze Arm“ beinhaltet Sequenzinformationen aus dem Exon 31, in dem sich auch das zu deletierende Motiv GFFKR und eine zusätzlich generierte HpaI Schnittstelle befindet. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der „kurze Arm“ gekürzt, um eine bessere Rekombinationseffizienz zu erreichen.

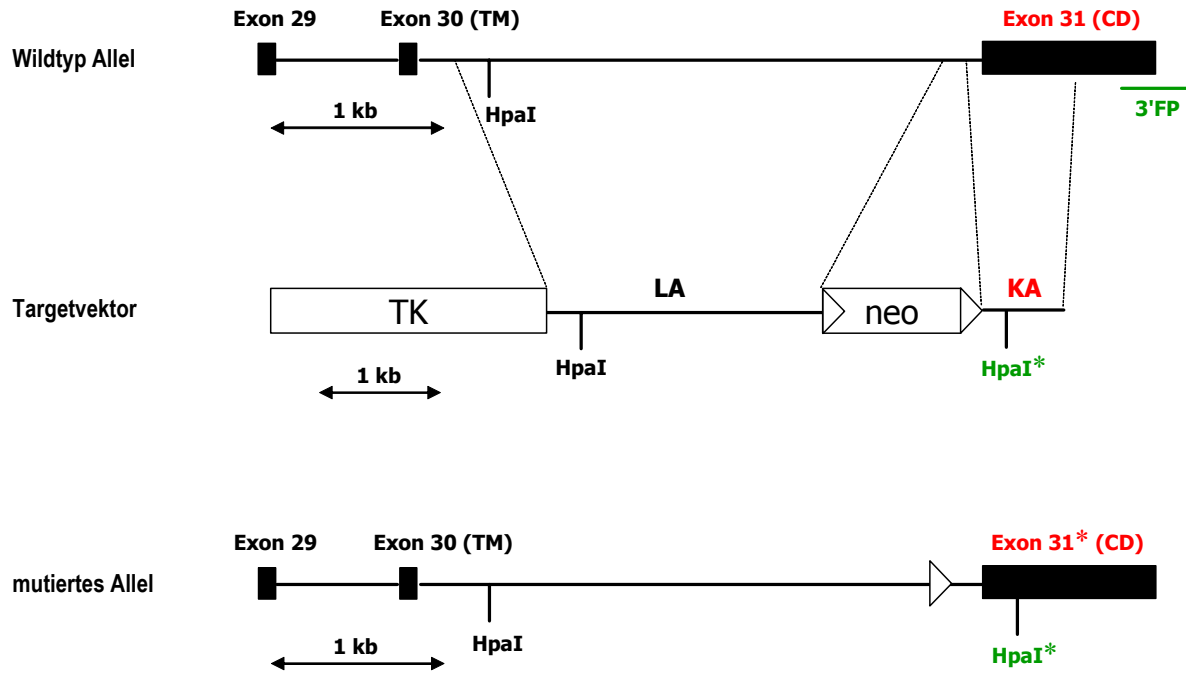


Abb. 3.1: Mutation des murinen α L-Gens durch homologe Rekombination. Schematisch dargestellt sind das Wildtyp Allel sowie der Rekombinationsvektor und der mutierte Lokus mit den relevanten Schnittstellen. Für die Southern Blot Analyse wird die DNA mit HpaI geschnitten. Nach der Hybridisierung mit der 3' Sonde (3'FP) wird für das mutierte Allel ein um 3 kb kleineres Fragment erwartet. Die zusätzlich eingeführte Schnittstelle ist mit HpaI* bezeichnet. (TM = Transmembrandomäne; CD = cytoplasmatische Domäne)

3.1.2 Generierung von mutierten embryonalen Stammzellen

Zur Herstellung von durch homologe Rekombination mutierten Stammzellen wurde der linearisierte Vektor in E14.1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen; 129/Ola) elektroporiert und die transfizierten ES-Zellen auf embryonale Fibroblasten (EF-Zellen) in Anwesenheit von G418 und Gancyclovir kultiviert. Am Tag 10 nach Beginn der Antibiotika-Selektion konnten resistente ES-Zell-Kolonien in 96-well Platten gepickt werden. Anschließend wurde eine konfluente 96-well Platte aufgeteilt, wobei die eine Hälfte der Zellen eingefroren wurde und die andere Hälfte der Zellen zur Identifizierung homolog rekombinierter Klone mittels „Screening-PCR“ verwendet wurde.

Im Zuge dieser PCR wurden alle 228, durch mehrere Elektroporationen gewonnenen, gepickten Klone auf eine 96-Thermowell Platte überführt und dort lysiert. Mit diesem Lysat wurde anschließend die PCR durchgeführt, wobei ein Primer innerhalb der Neomycin-Resistenz Kasette (Neo1500, siehe 2.4.2), der zweite (screening/rev) im kurzen Arm des Vektors nach der eingeführten Mutation bindet. Auf diese Weise erhält man ein Amplifikationsprodukt nur bei homologer Rekombination. Um schwache oder nicht eindeutige Sig-

nale im Agarosegel zu überprüfen, wurden die Gele auf eine Nylonmembran geblottet und mit dem „kurzen Arm“ des Vektors als Sonde hybridisiert. Positive Klone wurden für die DNA-Gewinnung über die eingefrorene Platte expandiert, so dass der endgültige Nachweis positiver Klone durch Southern Blot Analyse erfolgte.

Die Expansion PCR-positiver Klone erfolgte ohne embryonale Fibroblasten als feeder-layer, um so die Verunreinigung mit Wildtyp DNA gering zu halten. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend mit HpaI verdaut. Die entsprechende Schnittstelle wurde durch den Targetvektor im Bereich der Mutation eingeführt. Nach dem Blotten des Agarosegels auf eine Nylonmembran wurde mit der 3'flankierenden Sonde (Abb. 3.1), die außerhalb des Targetvektors liegt, hybridisiert. Die 6 kb große Bande entspricht dem WT Allel, während man für das mutierte Allel ein um 3 kb kleineres Fragment erwartet. Dieses zusätzliche Fragment gibt an, dass es in Klon #2 zur gewünschten homologen Rekombination kam (Abb. 3.2 a). Die Hybridisierung mit der 3'FP schließt allerdings nicht aus, dass neben der homologen Rekombination zusätzliche zufällige Integrationen in das Genom stattgefunden haben. Aus diesem Grund wurde die mit HpaI verdaute DNA darüber hinaus mit einer Neo-Sonde hybridisiert. Der später injizierte Klon #2, aber nicht die Klone 19, 22 und E14.1-WT DNA zeigen ein Signal in der korrekten Größe von 4 kb (Abb. 3.2).

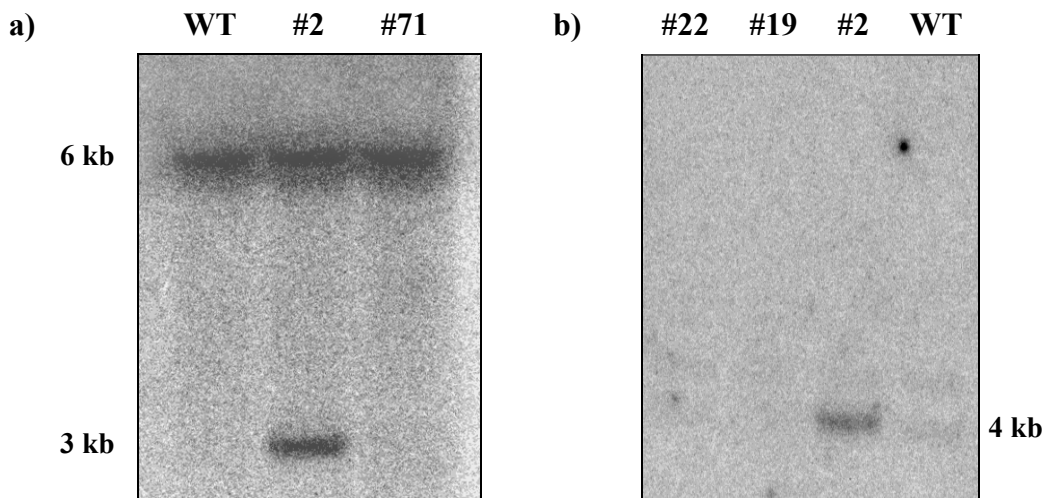


Abb. 3.2: Southern Blot Analyse von einem der in der PCR positiven Klone.

a) Hybridisierung mit der 3'FP. #2 zeigt das für das mutierte Allel erwartete 3 kb große Fragment. Die 6 kb große Bande repräsentiert das WT-Allel.

b) Hybridisierung mit der Neo Sonde. Das bei #2 einzige Signal in Höhe von 4 kb bestätigt, dass es nicht zu einer Mehrfachintegration des Vektors in das Genom kam.

3.1.3 Generierung eines LFA-1^{d/d} Mausstammes aus rekombinierten ES-Zellen

ES-Zellen aus dem Klon #2, welche heterozygot für die spezifische Mutation und homozygot für die Fellfarbe agouti sind, wurden in 2,5 Tage alte Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert. Diese Embryos wurden dann anschließend in pseudoschwangere Weibchen implantiert. Ein Teil des daraus resultierenden Nachwuchses sind Chimären, was man an der Fellfarbe ablesen kann. Hochchimäre Tiere, bei welchen ein vergleichsweise hoher Prozentsatz des Fells agoutifarben ist, wurden daraufhin mit C57BL/6 Männchen verpaart, und agoutifarbene Nachkommen auf Keimbahntransmission getestet.

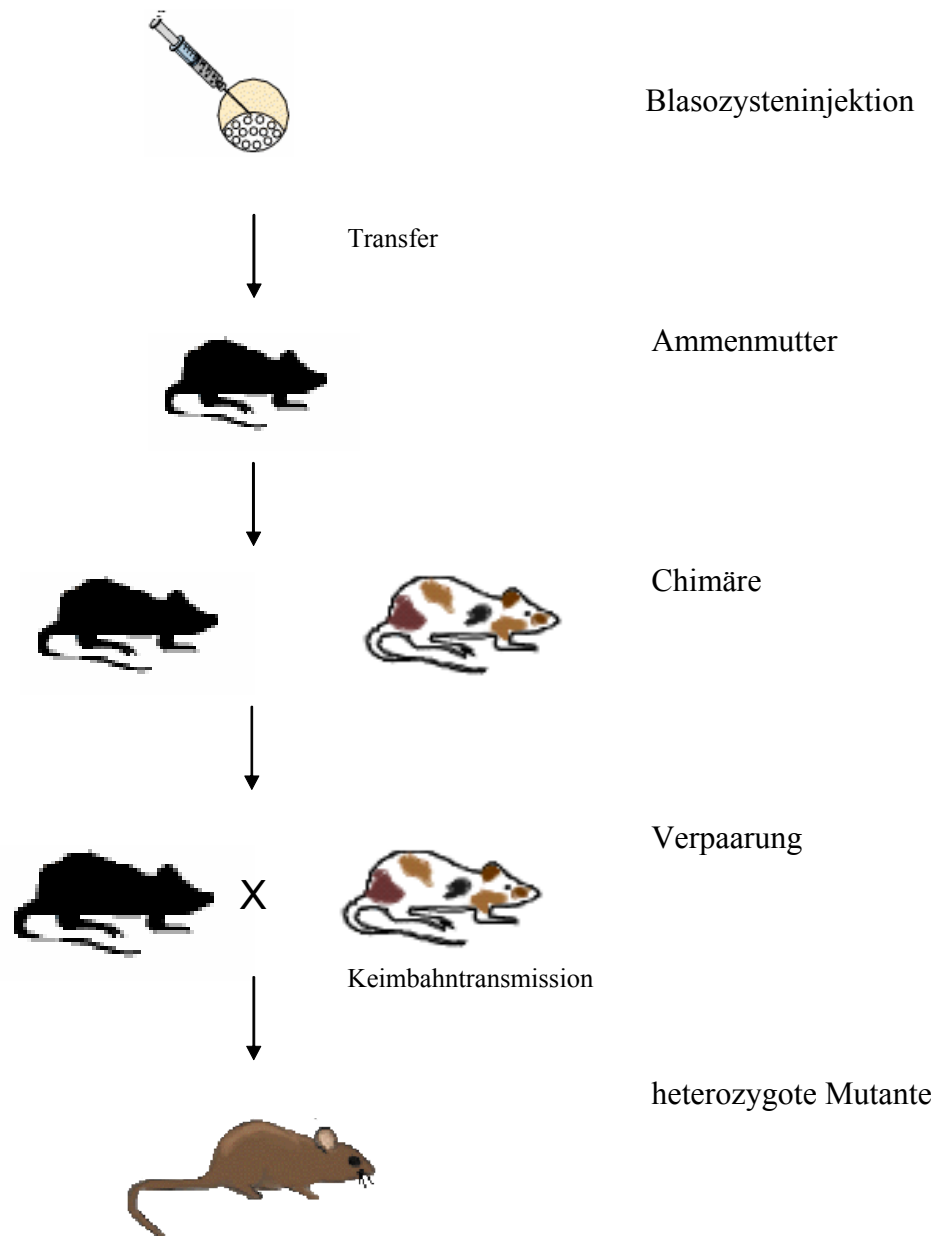


Abb. 3.3: Herstellung gendefizienter Mäuse aus homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen durch Blastozysteninjektion. Der Anteil mutierter ES Zellen in chimären Tieren korreliert mit dem Anteil der Fellfarbe agouti. Hochchimäre Tiere werden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Heterozygote Tiere erkennt man an der braunen Fellfarbe.

Die Keimbahntransmission wurde anhand von Schwanz-Biopsien, aus welchen genomische DNA gewonnen wurde, überprüft. Die DNA diente als Material für die Typisierungs-PCR und die Southern-Blot Analyse, die den Beweis für das Vorhandensein des mutierten Allels liefern sollten.

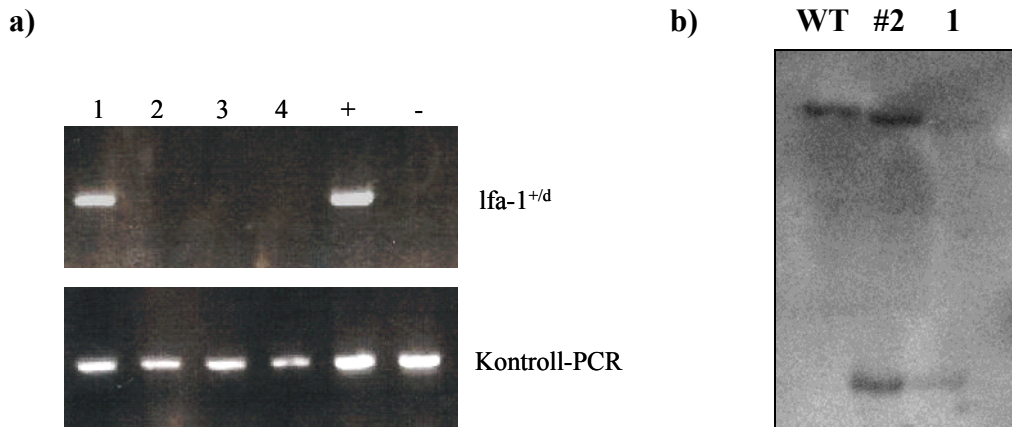


Abb. 3.4: PCR und Southern Blot Analyse von vier Nachkommen zum Testen auf Keimbahntransmission.

a) PCR Analyse mit den Primern screening/for und /rev (s. 2.4.2) zeigt die WT-Bande (Kontroll-PCR). Das mutierte Allel wird detektiert über die Neo-Kassette mit Primern Neo/for und /rev. Probe 1 zeigt heterozygote Mutante.

b) Southern Blot Analyse mit der 3'FP (analog zur Abb. 3.2).

Da zu erwarten war, dass die in das Genom eingefügte Neomycin-Kassette die Expression des LFA-1 Gens in negativer Weise beeinflussen wird, wurde dieses zusätzliche Gen durch das Cre-Rekombinase System entfernt (Fiering *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1998).

Im Zuge dessen wurden homozygot mutierte Mäuse mit Tieren des sog. Deleter-Stammes verpaart. Letztere exprimieren ubiquitär die DNA-Rekombinase Cre, welche die lox P-Motive erkennt und das dazwischen liegende DNA-Segment deletiert (Gu *et al.*, 1993; Rossant und McMahon, 1999). Probe Nr. 4 in Abb. 3.5 zeigt das gewünschte Ergebnis.

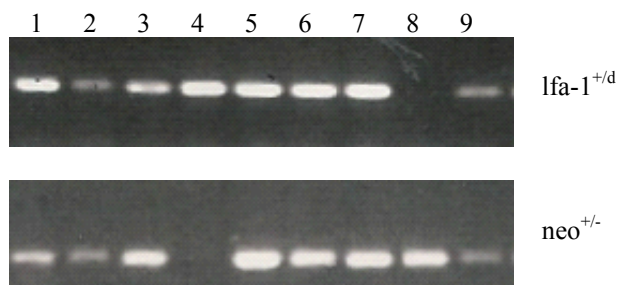


Abb. 3.5: PCR-Analyse, die Verlust der Neomycin-Kassette belegt. Nachkomme Nr. 4 ist heterozygot für die eingeführte Mutation, hat aber gleichzeitig die Neo-Kassette verloren.

In einem nächsten Schritt wurden die aus dieser Kreuzung entstandenen Tiere, welche sowohl für das mutierte Allel als auch für die Cre-Rekombinase heterozygot sind, mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Daraufhin wurden Tiere der nächsten Generation, die keine Cre-Rekombinase besitzen, aber dennoch heterozygot für das mutierte Allel sind, untereinander gekreuzt. Mit den daraus resultierenden homozygoten Mutanten und den entsprechenden Littermate-Kontrollen wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt (Abb. 3.6).

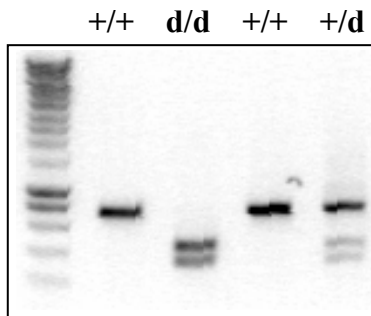


Abb. 3.6: PCR-Analyse von vier Nachkommen. Das amplifizierte Produkt (mit Primern genotyp/for und screening/rev; siehe 2.4.2) wurde aufgereinigt und anschließend mit HpaI verdaut. DNA homozygoter WT Mäuse wird nicht geschnitten. Das PCR-Produkt homozygot mutierter Tiere wird komplett geschnitten und zeigt somit zwei Banden, da in den Bereich der Mutation zusätzlich eine HpaI Schnittstelle eingeführt wurde. Heterozygote Tiere besitzen beide Allele.

Um sicher zu gehen, dass die gewünschte Mutation in der exakten Basenabfolge in den mutierten Mäusen exprimiert wird, wurde aus Milzzellen mutierter von LFA-1^{d/d} Mäusen cDNA gewonnen. Diese diente als Template für eine PCR-Reaktion, welche den Bereich der Mutation GFFKR abdeckt. Das aufgereinigte Produkt wurde sequenziert, wodurch das korrekte Einfügen der Mutation bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

LFA-1^{d/d} Mäuse wurden mit der erwartenden Mendelschen Frequenz geboren, erschienen gesund und waren fertil.

3.1.4 Nachweis der Funktionalität der Mutation

In vitro Versuche haben gezeigt, dass die Deletion der Sequenz GFFKR in der zytoplasmatischen Domäne der α L-Kette eine konstitutive Aktivierung des Integrins zur Folge hat (Lu und Springer, 1997).

Um nachzuweisen, dass die eingeführte Mutation auch die gewünschten Auswirkungen auf die Bindungsaktivität des Integrins LFA-1 hat, wurden Adhäsionsassays mit Thymozyten der Tiere durchgeführt.

Dabei wurde die Adhäsion an das aufgereinigte Protein ICAM-1 analysiert, welches einer der LFA-1 Liganden darstellt. Die Adhäsion an VCAM-1, dessen Hauptligand das Integrin

$\alpha 4\beta 1$ ist, diente als Kontrolle für die LFA-1 unabhängige Adhäsion. Zum einen wurde die basale Aktivität des Integrins in Anwesenheit von Mg^{2+} ermittelt. Zum anderen wurden Mn^{2+} -Ionen zugegeben, welche Integrine *in vitro* durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen in einen höheren Affinitätszustand versetzen, während der Phorbol ester PMA Integrine *in vitro* über zytoplasmatische Mechanismen zu stimuliert (Diamond und Springer, 1994).

Abb. 3.7 zeigt, dass die Adhäsion von Thymozyten aus LFA-1^{d/d} Mäusen an mICAM-1 im Vergleich zu Wildtyp Zellen um etwa das Dreifache erhöht ist. Dies ist der Fall in Ansätzen ohne spezifische Stimulation der Zellen sowie nach Inkubation mit Mn^{2+} -Ionen oder PMA. Eine Kombination der Stimuli PMA und Mn^{2+} jedoch hat auf Wildtyp-Zellen eine ergänzende Wirkung, was deren Adhäsionskapazität auf das Niveau der mutierten Thymozyten erhöht. Die Unterschiede bei der Bindung an VCAM-1 via $\alpha 4\beta 1$ sind nicht signifikant, was deutlich macht, dass die Mutation spezifische Auswirkungen auf LFA-1 vermittelte Interaktionen hat.

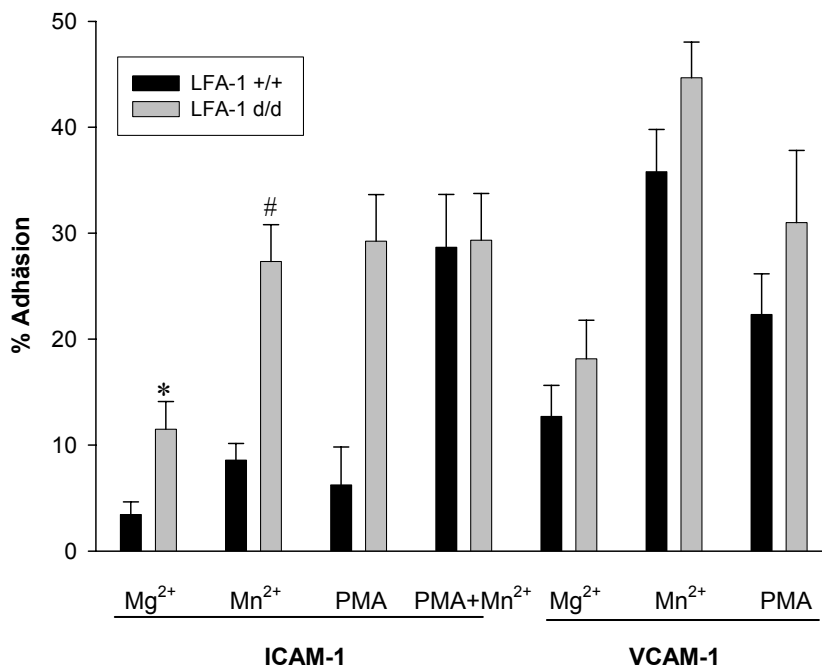


Abb. 3.7: Adhäsion von LFA-1^{d/d} (graue Balken) und LFA-1^{+/+} (schwarze Balken) Thymozyten an ICAM-1 und VCAM-1. Die Adhäsion wurde nach zehnmütiger Inkubation mit 5 mM Mg^{2+} , 1 mM Mn^{2+} , 20 ng/ml PMA + 5 mM Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} + PMA ermittelt. Die Daten sind angegeben als % Adhäsion zur Ausgangsmessung, wobei die unspezifische Adhäsion der Zellen an ein Kontrollprotein subtrahiert wurde. (n = 7; # p < 0,001; * p < 0,01)

Die Adhäsion von T-Zellen an Gefäßendothel ist eine wichtige Voraussetzung für deren spätere Auswanderung durch das Endothel in Gewebe. Aus diesem Grund wurde auch die Adhäsion von aus Milz und Lymphknoten gewonnenen Zellen an Endothelzellen (bEnd5) untersucht. Dabei wurde das Adhäsionsvermögen an ruhendes und TNF- α aktiviertes Endothel verglichen. bEnd5-Zellen exprimieren konstitutiv ICAM-1 und in geringerer Dichte

ICAM-2. Durch Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α wird eine Entzündungssituation simuliert, in der es zur Hochregulation von ICAM-1 kommt (Reiss *et al.*, 1998). In diesem Fall ist die Adhäsion von Zellen aus LFA-1 Mäusen fast um das Doppelte erhöht im Vergleich zu WT-Zellen. Die Adhäsion an ruhende Endothelzellen weist hingegen nur geringe Unterschiede zwischen Kontrollzellen und LFA-1^{d/d}-Zellen auf. Dieser Befund unterstreicht die verstärkte Affinität von mutiertem LFA-1 für seinen Liganden ICAM-1.

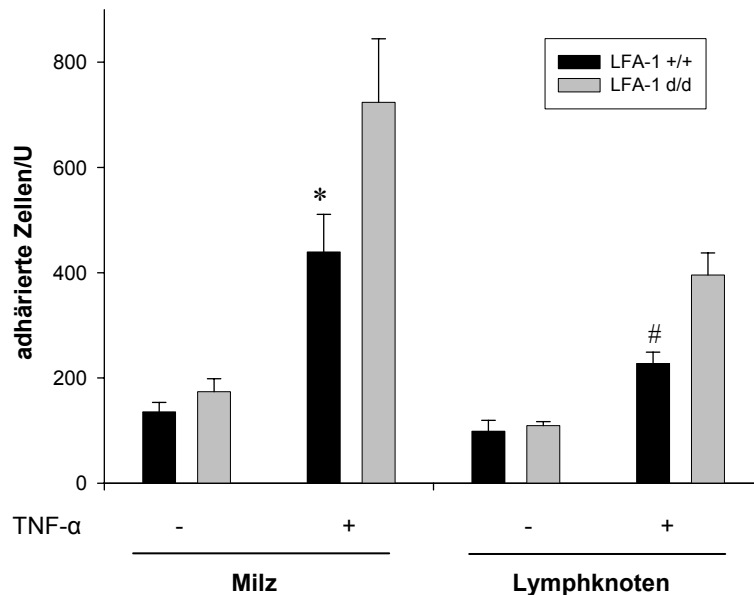


Abb. 3.8: Adhäsion von LFA-1^{d/d} (graue Balken) und LFA-1^{+/+} (schwarze Balken) Zellen an Endothelzellen. Zum Teil wurden die Endothelzellen vor Adhäsion der *ex vivo* Zellen für 16 h mit 5 nM TNF stimuliert. Die Adhäsion wurde als Anzahl adhärerter Zellen/Flächeneinheit ausgedrückt, wobei pro Wert Triplikate ermittelt wurden. (n = 5; # p < 0,01; * p < 0,05)

Weitere Experimente haben bestätigt, dass die erhöhte Adhäsion der LFA-1^{d/d} Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen durch Bindung an den Liganden ICAM-1 hervorgerufen wird. So bestanden bei der Adhäsion an ICAM-1 defiziente Zellen (bEndJ1.1; Reiss *et al.*, 1998) keine signifikanten Unterschiede zwischen LFA-1^{+/+} und LFA-1^{d/d} Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.2 Analyse des Phänotyps von LFA-1^{d/d} Mäusen und Zellen

Die oben aufgeführten Daten zeigen, dass eine Deletion des Motivs GFFKR die erwarteten funktionellen Auswirkungen nach sich zieht, was durch die erhöhte Bindungsaktivität von LFA-1^{d/d}-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen belegt wurde. Die Konsequenzen dieser

Veränderung wurden im Folgenden durch die Analyse des Phänotyps von LFA-1^{d/d} Mäusen und Zellen untersucht.

3.2.1 Lymphozytendifferenzierung und Integrinexpression

Durch die Expression von LFA-1 auf T-Zellen ist ein Einfluss der erhöhten LFA-1 Aktivität auf die Architektur z. B. von Milz und Thymus möglich. FACS-Analysen von Milz, peripheren Lymphknoten, Thymus und Knochenmark zeigen jedoch keine Unterschiede in den Lymphozyten Subpopulationen.

So wurde, wie Abb. 3.9 zeigt, eine normale CD4/CD8 Verteilung in Thymus und peripheren Lymphknoten beobachtet. Außerdem ist die Anzahl der IgM⁺ und B220⁺ Zellen im Knochenmark vergleichbar. Dabei sind keine Unterschiede in den verschiedenen Stadien der B-Zell Entwicklung erkennbar. Pro B-Zellen geben den frühesten Zeitpunkt an. Während der Entwicklung zu Prä B-Zellen kommt es zur Hochregulation von B220 und zur Umordnung der VDJ Segmente. B-Zellen sind schließlich IgM-positiv. Auch entspricht die Verteilung von B1- und B2-B-Zellen in der Milz von LFA-1^{d/d} Mäusen der von Kontrolltieren. In der Milz befinden sich erwartungsgemäß wenige B1-Zellen, bei denen nur geringe Mengen an IgD auf der Oberfläche vorliegen.

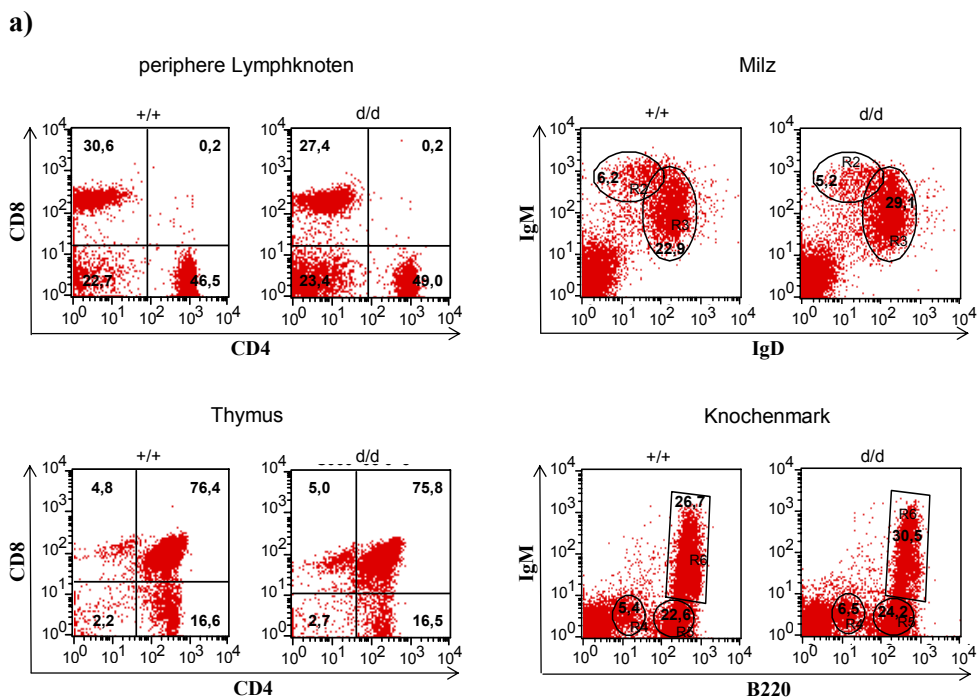


Abb. 3.9: FACS-Analysen von Lymphozytenmarkern auf den Zelloberflächen.

a) Dargestellt ist je eine exemplarische Doppelfärbung von Oberflächenmolekülen auf Zellen aus den verschiedenen lymphatischen Organen. Gezeigt sind ausgewählte repräsentative Färbungen aus fünf unabhängigen Experimenten.

Milz: R2 = B1 Zellen, R3 = B2 Zellen.

Knochenmark: R4 = Pro B-Zellen, R5 = Prä B-Zellen, R6 = B-Zellen.

b)

	+/+	d/d
Thymus		
CD4 ⁺ CD8 ⁻	14 ± 3	21 ± 7
CD4 ⁻ CD8 ⁺	4 ± 2	6 ± 2
Lymphknoten		
CD4 ⁺ CD8 ⁻	51 ± 5	47 ± 9
CD4 ⁻ CD8 ⁺	27 ± 5	24 ± 1
Milz		
B1	8 ± 2	8 ± 3
B2	29 ± 6	29 ± 3
Knochenmark		
Pro B	6 ± 1	7 ± 2
Prä B	21 ± 5	18 ± 5
B	33 ± 11	33 ± 7

b) Zusammenfassung aller durchgeführten Experimente in einer Tabelle. Eingetragen sind die Anzahl der positiven Zellen in % ± Standardabweichung.

Um auszuschließen, dass das Fehlen von GFFKR in der zytoplasmatischen Domäne von LFA-1 Auswirkungen auf die Oberflächenexpression von Integrinen hat, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Oberflächenexpression verschiedener Integrin-Ketten durch die Deletion des Motivs GFFKR nicht beeinflusst ist (vgl. Abb. 3.10). Hierzu zählen u.a. die Untereinheiten α M und α X, die ebenso wie LFA-1 mit β 2 assoziieren. Unverändert ist auch die Expression der β 1-Kette, die durch Assoziation mit verschiedenen α -Ketten wie α 4 und α 2 die größte Familie bildet. Diese Ergebnisse wurden sowohl mit T- und B- Zellen aus der Milz wie auch mit aus Knochenmark gewonnenen Granulozyten erzielt.

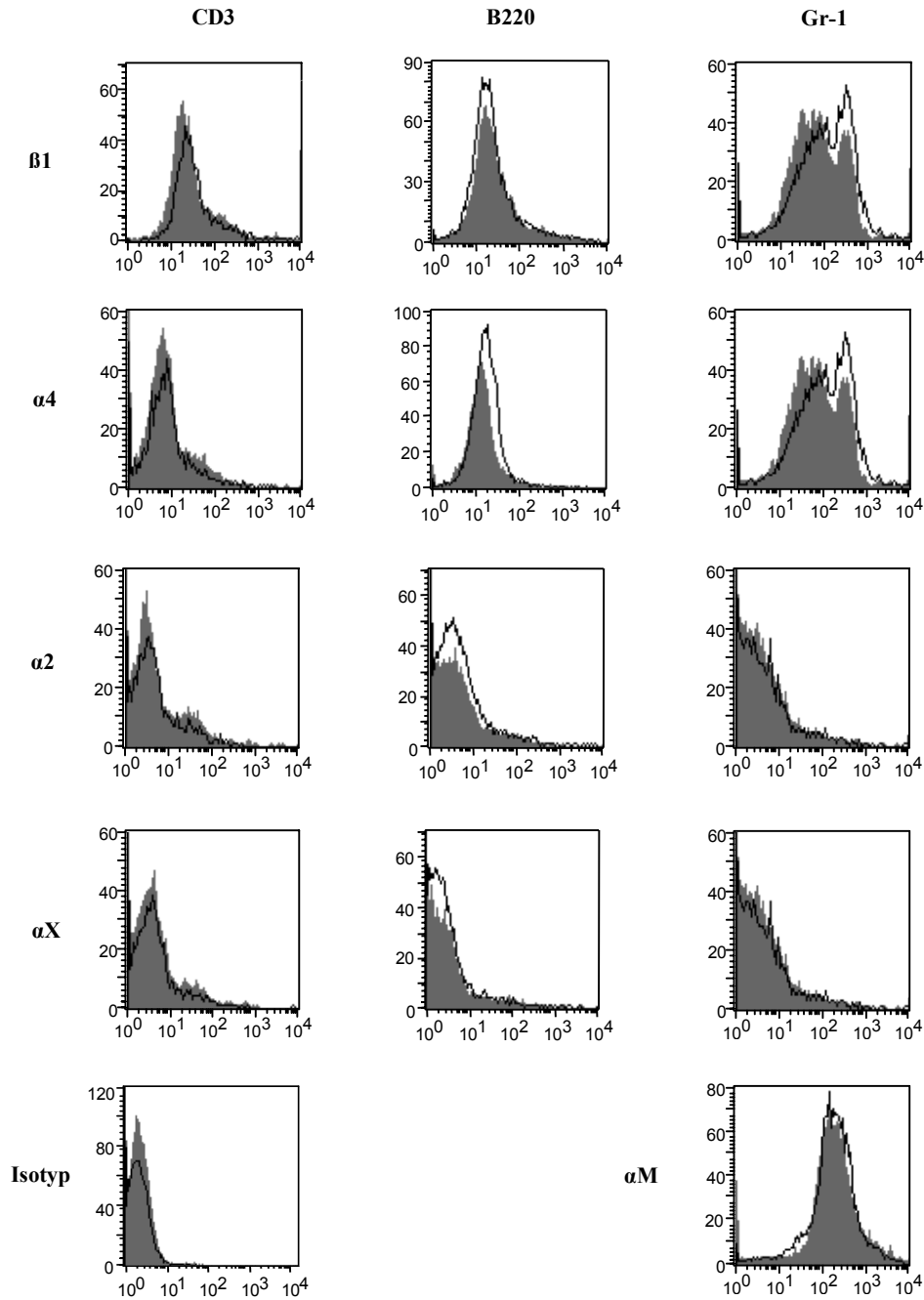
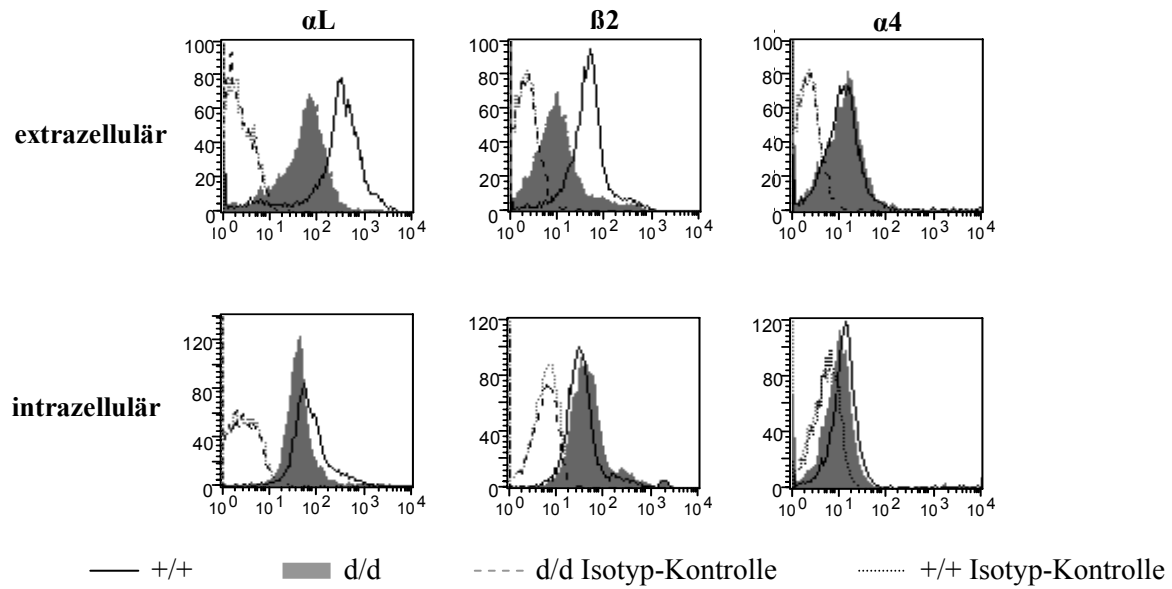


Abb. 3.10: Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten auf LFA^{d/d}-Zellen. Die FACS-Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen die einzelnen alpha-Ketten und die $\beta 1$ -Untereinheit. Die Expression wurde untersucht auf Gr-1-, CD3- und B220-positive Zellen also auf Granulozyten, T- und B-Zellen. Die schwarze Linie beschreibt LFA-1^{+/+} Zellen, der grau hinterlegte Peak gibt die LFA-1^{d/d} Zellen an.

Während verschiedenste Integrin-Ketten in normalen Mengen auf den Oberflächen detektiert werden konnten, wurde jedoch eine reduzierte Expression der Untereinheiten αL und $\beta 2$ beobachtet (Abb. 3.11a). Diesem Befund könnte die Tatsache zu Grunde liegen, dass das deletierte Motiv GFFKR für eine effektive Heterodimerbildung des Integrins LFA-1 auf der Oberfläche nötig ist (Lu und Springer, 1997).

Intrazelluläre FACS-Analysen der Ketten α L und β 2 bestätigten diese Vermutung insofern, als intrazelluläre Expressionsdichten von Wildtyp-Zellen und LFA-1^{d/d} Zellen vergleichbar waren (Abb. 3.11a). Dies macht deutlich, dass kein Defekt auf Stufe der Translation besteht, sondern dass der Transport der mutierten LFA-1-Moleküle an die Oberfläche inhibiert ist.

a)



b)

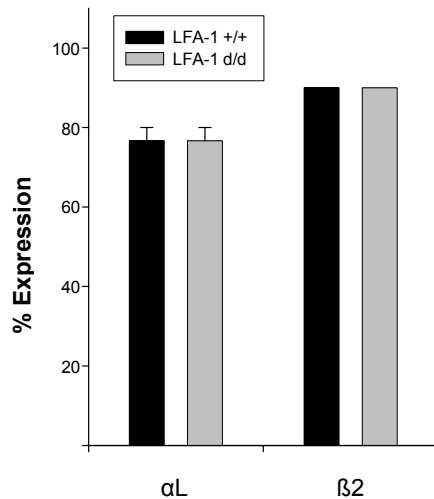


Abb. 3.11: Expression des Integrins LFA-1.

a) FACS-Analysen zeigen die Oberflächenexpression der Integrinuntereinheiten α L, β 2 und α 4. Im Vergleich dazu stehen die intrazellulären Färbungen.

b) Die mRNA-Level der Integrin-Ketten werden durch eine RT-PCR ermittelt. Dargestellt ist die Expressionsmenge der einzelnen Untereinheiten anteilig an der β -Aktinmenge (100%). (n = 3)

Diese Ergebnisse konnten durch eine quantitative TaqMan-PCR gestützt werden. Hierfür wurde aus den aus Kontroll-Tieren und homozygot LFA-1^{d/d} Mäusen entnommenen Milzen gesamtzelluläre RNA gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben, welche für die RT-PCR eingesetzt wurde. Neben den Ansätzen für die LFA-1 Untereinheiten α L und β 2 wurde ein Fragment des „house-keeping“ Gens β -Aktin als Kontrolle amplifiziert. Es konnten dabei keine Unterschiede in der mRNA-Expression von α L und β 2 nachgewiesen werden (Abb. 3.11b).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Lymphozytendifferenzierung in Milz, Lymphknoten, Peyer'schen Plaques, Thymus und Knochenmark ein ähnliches Expressionsmuster in LFA-1^{d/d}-Mäusen und Kontroll-Tieren zeigen. Dies beinhaltet auch die Expressionsdichte verschiedener Integrinuntereinheiten. Die reduzierte Oberflächenexpression der Untereinheiten des Integrins LFA-1 ist auf die eingeführte Mutation zurückzuführen, die jedoch keinen Einfluss auf die intrazellulären Protein- und mRNA-Mengen von α L und β 2 hat. Auswirkungen auf die Funktion können ebenfalls ausgeschlossen werden, was durch die erhöhte Bindung von LFA-1^{d/d} Zellen gezeigt wurde (s. 3.1.4).

3.2.2 Größe der lymphatischen Organe in LFA-1^{d/d} Mäusen

Die makroskopische Analyse der lymphatischen Organe zeigte, dass Lymphknoten und Peyer'sche Plaques in LFA-1^{d/d} Mäusen kleiner waren als in WT Mäusen, während die Milz hingegen vergrößert erschien. Dies spiegelt sich in veränderten Zellzahlen wider (vgl. Abb. 3.12). Keine Unterschiede wurden in den Zellzahlen von Knochenmark, Thymus und Blut detektiert.

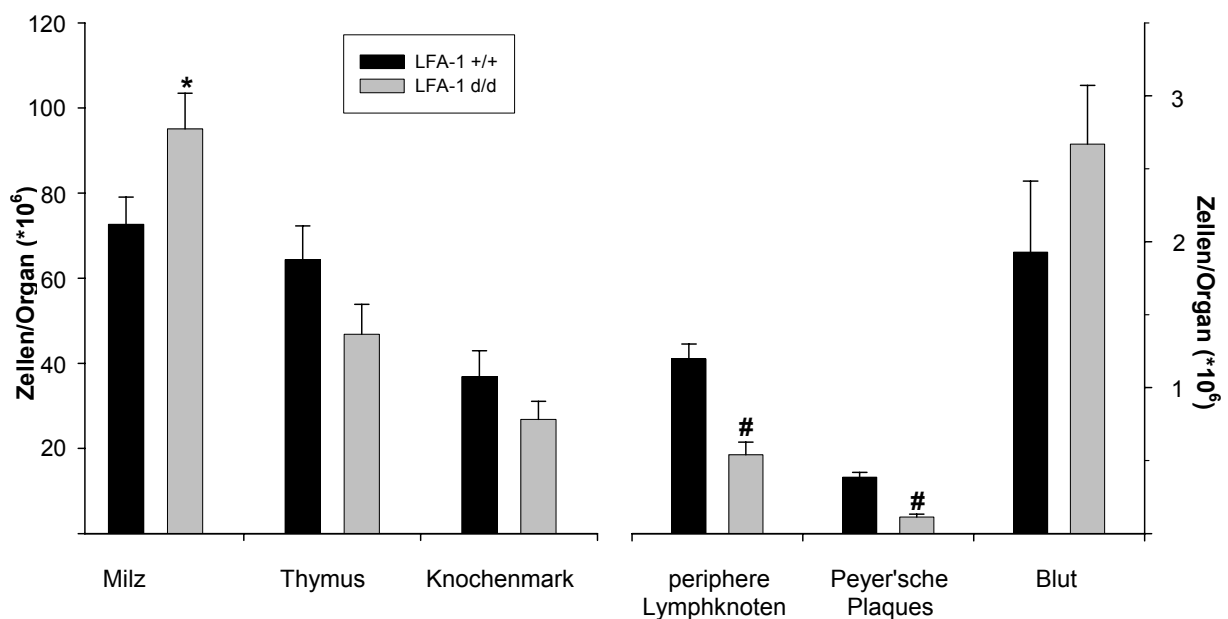


Abb. 3.12: Die Größe der lymphatischen Organe. (n = 6-22; * p < 0,05; # p < 0,001)

Dieser Befund könnte mit einem Migrationsdefekt der LFA-1^{d/d} Zellen auf Grund stärkerer Endothelinteraktionen erklärbar sein.

3.2.3 Transmigration von mutierten Zellen durch bEnd5 Zellen

Nachdem die Adhäsion der LFA-1^{d/d} Zellen verstärkt ist und lymphoide Organe z. T. verkleinert sind, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Transmigration der Zellen *in vitro* in Folge einer erhöhten Adhäsion beeinflusst wird.

Die Migration von Leukozyten durch ein Monolayer aus Endothelzellen (bEnd5 Zellen) wurde *in vitro* mit einem Zwei-Kammer-System untersucht. Dazu wurden bEnd5 Zellen auf zuvor mit Fibronektin beschichteten Transwell-Filtern ausgesät und 48 h bis zur Konfluenz inkubiert. Bei der Migration durch nicht aktivierte Endothelzellen ist kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und LFA-1^{d/d} Zellen zu beobachten. Eine Aktivierung der Endothelzellen mit TNF- α führt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und zu einer verstärkten Adhäsion von LFA-1^{d/d} Leukozyten im Vergleich zu WT-Zellen (Abb. 3.8). Abb. 3.13 zeigt, dass eine Stimulation der Endothelzellen zu einer Erhöhung der Migration der WT-Zellen um mehr als das Doppelte führt. Hingegen ist die Migrationsrate von LFA-1^{d/d} Zellen sowohl aus der Milz als auch aus den Lymphknoten nach Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α kaum erhöht, was mit der verstärkten Adhäsion der Zellen in Korrelation steht.

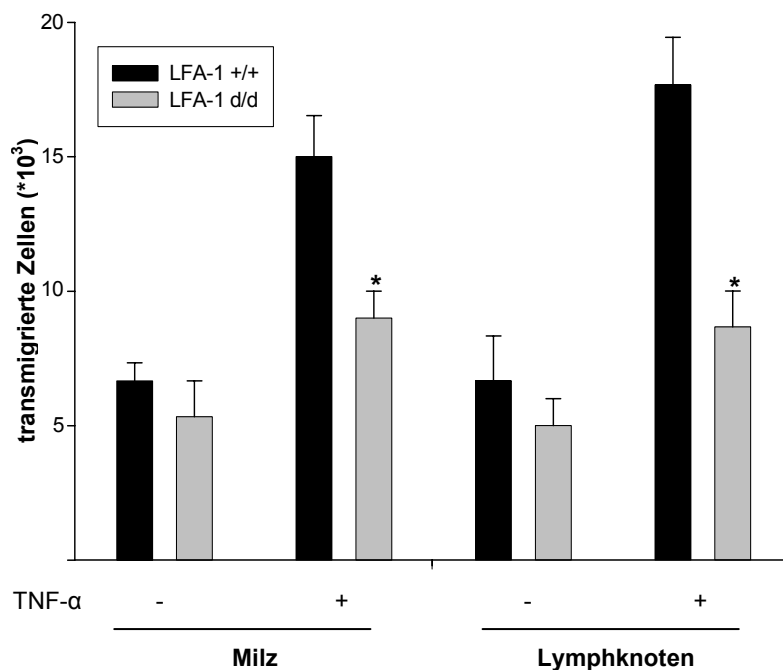


Abb. 3.13: Transendotheliale Migration von Leukozyten durch Monolayer aus bEnd5-Zellen. Dargestellt sind die Anzahl migrierter Zellen durch stimulierte (+) und unstimulierte (-) Endothelzellen. (n = 3; * p < 0,05)

3.2.4 Thioglykollat-induzierte Peritonitis in LFA-1^{d/d} Mäusen

Nachdem ein verändertes Migrationsverhalten von LFA-1^{d/d} Zellen aus den oben gezeigten *in vitro* Untersuchungen deutlich hervorgeht, wurde im Folgenden dieser Sachverhalt durch *in vivo* Experimente näher betrachtet. Als Modell diente die Thioglykollat-induzierte Peritonitis. Hierbei wird durch die Injektion von Thioglykollat in die Bauchhöhle der Versuchstiere ein chemischer, steriler Reiz gesetzt, was zur Einwanderung von Leukozyten führt, die sich größtenteils aus Granulozyten und Makrophagen zusammensetzen. Durch Spülen der Bauchhöhle nach 0, 6 und 12 Stunden wurde hier die gerichtete Einwanderung der Zellen untersucht.

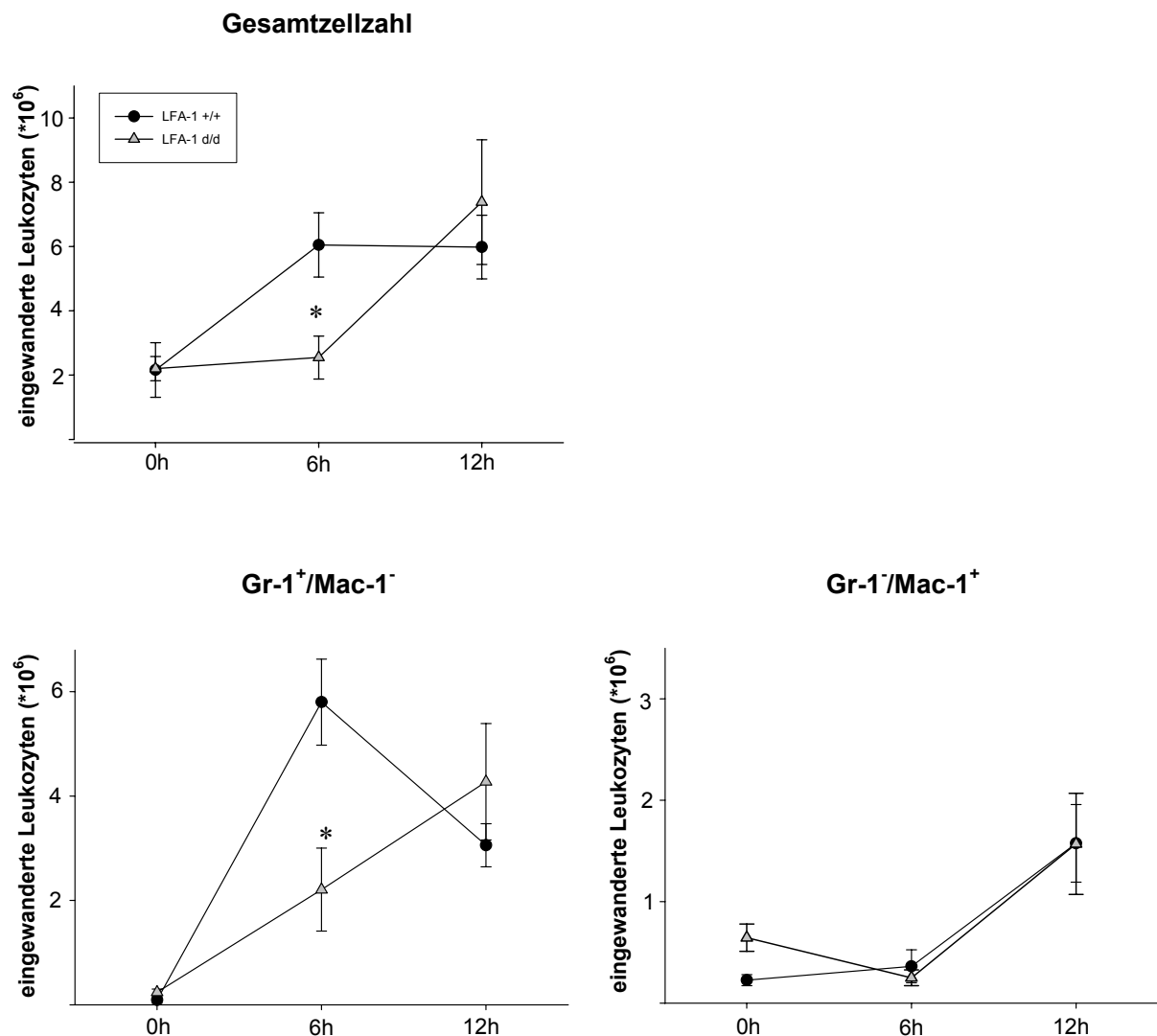


Abb. 3.14: Leukozyten-Migration als Antwort auf die intraperitoneale Injektion von Thioglykollat. Sowohl die Gesamtzahl der eingewanderten Zellen wie auch der Anteil an Granulozyten und Makrophagen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Injektion bestimmt. (n = 4-6; * p < 0,05)

Sechs Stunden nach Injektion konnte eine reduzierte Gesamtzahl an eingewanderten Zellen in LFA-1^{d/d} Mäusen nachgewiesen werden, während nach 12 Stunden kein Unterschied mehr auszumachen war (Abb. 3.14). Eine detaillierte Auswertung der eingewanderten Leukozyten ergab, dass der Unterschied auf Granulozyten zurückzuführen ist, welche die Hauptpopulation an Zellen darstellen, während bezogen auf Makrophagen keine Differenzen zwischen WT- und LFA-1^{d/d} Zellen bestehen.

Die Einwanderung von vermeintlich konstitutiv aktiven Granulozyten in die Bauchhöhle scheint also verzögert zu sein, was mit verstärkten Endothel-Interaktionen erklärt werden könnte.

3.2.5 Proliferation von LFA-1^{d/d} Zellen *in vitro*

LFA-1 ist nicht nur in Migrations- und Adhäsionsvorgänge involviert, wie zuvor gezeigt werden konnte. Es spielt auch im Zuge von Zell-Zell-Kontakten eine Rolle bei der Proliferation von T-Zellen (Schmits *et al.*, 1996). Um die Proliferation von LFA-1^{d/d} Splenozyten *in vitro* zu untersuchen, erfolgte die Stimulation der Zellen zum einen durch Kreuzvernetzung der T-Zellrezeptoren (TZR) mit löslichem anti-CD3 als auch mit dem Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B (SEB). Bakterielle Superantigene können T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität durch Bindung an MHC Klasse II-Moleküle Antigen-präsentierender Zellen und an TZR polyklonal stimulieren. Das bedeutet, dass für die Präsentation von SEB auf APCs keine Prozessierung der Antigene nötig ist, sondern eine direkte Bindung der Proteine an MHC II von außen erfolgt. Auf Seiten der T-Zelle bindet SEB an die v β 8 Region der β -Kette, wodurch es zur Anregung von ca. 20% der T-Zellen kommt (White *et al.*, 1989). Für diese Interaktion ist der direkte Zell-Zell-Kontakt von Bedeutung, worin auch das Integrin LFA-1 involviert ist. Die Stimulation der Zellen durch PMA bzw. PMA mit Ca/Ionophor erfolgt im Gegensatz zu den anderen Agentien nicht über den TZR, sondern diese aktivieren PKC und Calcineurin direkt. Die durch die verschiedenen Stimuli ausgelöste Proliferationsaktivität wurde schließlich mittels Thymidin-einbaus gemessen.

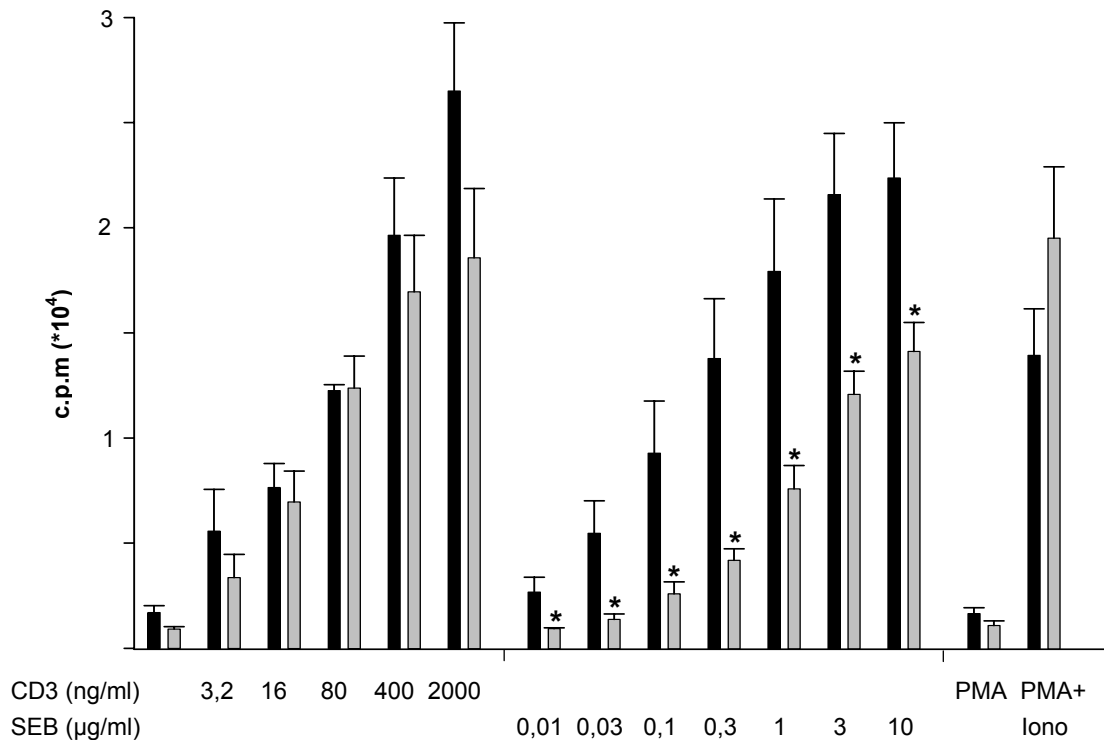


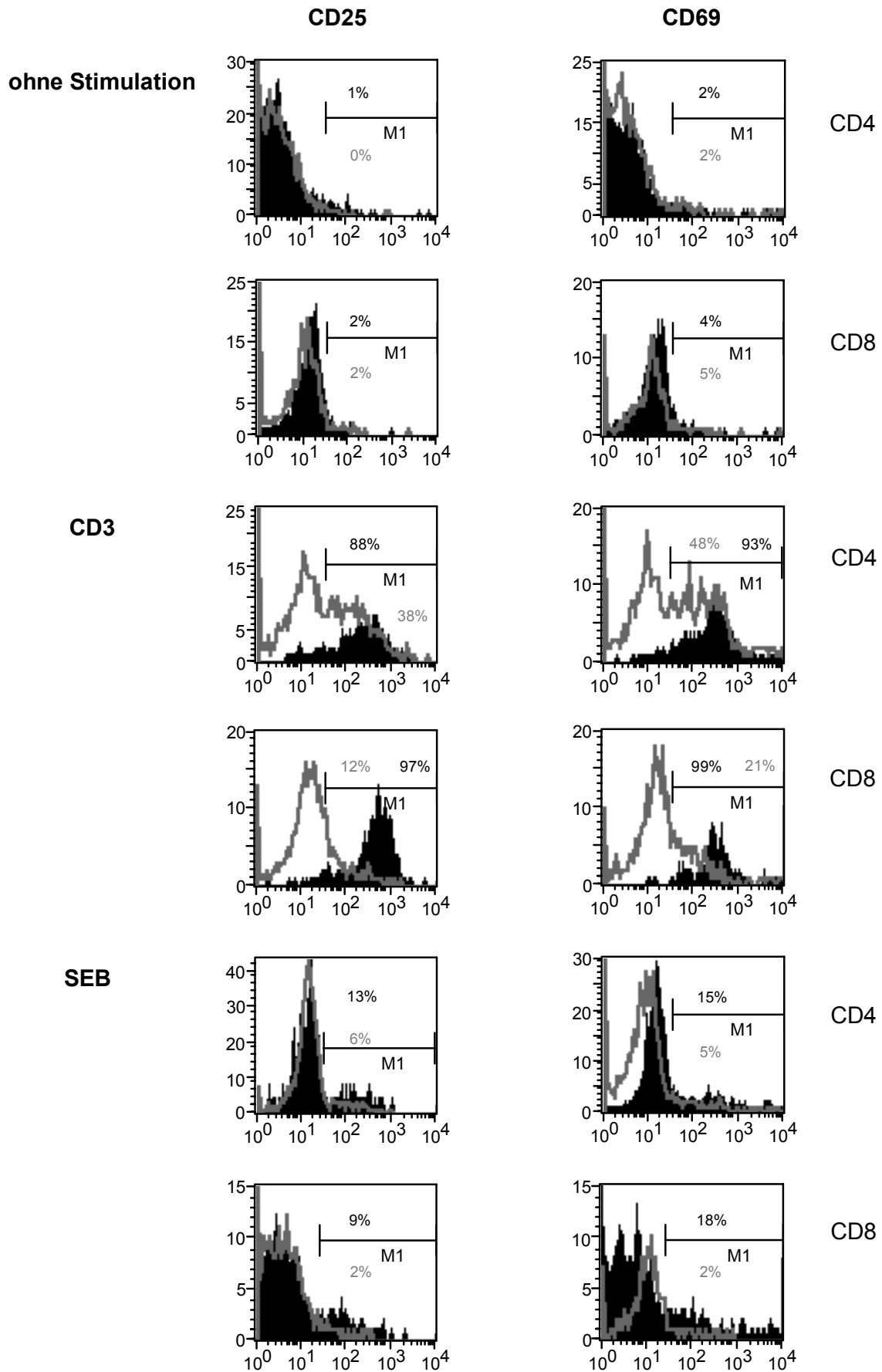
Abb. 3.15: [³H] Thymidineinbau von LFA-1^{d/d} Splenozyten (graue Balken) im Vergleich zu Zellen aus Kontroll-Mäusen (schwarze Balken). Die Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an löslichem anti-CD3 mAk bzw. SEB für 64 h stimuliert. Alternativ erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml PMA bzw. 10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Calcium/Ionophore. Für die letzten 16 h der Kultur wurden die Zellen mit 1 µCi gepulst. (n = 3-10; * p < 0,05)

Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich ist, zeigten Splenozyten aus LFA-1^{d/d} Mäusen eine reduzierte Proliferation als Antwort auf titrierte Mengen an SEB. Im Gegensatz dazu war der durch anti-CD3 mAk oder PMA induzierte Thymidineinbau zwischen WT und LFA-1^{d/d} Zellen nicht verändert. Dies zeigt, dass die Aktivitätsregulation von LFA-1 wichtig ist für Zell-Zell-Interaktionen, während die Stimulation über Kreuzvernetzung der TZR nicht beeinträchtigt wird.

Um den Aktivierungsstatus der stimulierten T-Zellen genauer definieren zu können, folgte außerdem nach Stimulation eine Färbung der Oberflächenmoleküle CD25 und CD69. Diese sind Aktivierungsmarker auf T-Zellen, wobei CD69 einer schnelleren Induktionskinetik folgt als CD25.

Abb. 3.16 zeigt, dass sowohl nach Stimulation mit 2 µg/ml anti-CD3 mAk wie auch 1 µg/ml SEB der Prozentsatz an aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-positiven Zellen bei den LFA-1^{d/d} Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert war.

a)



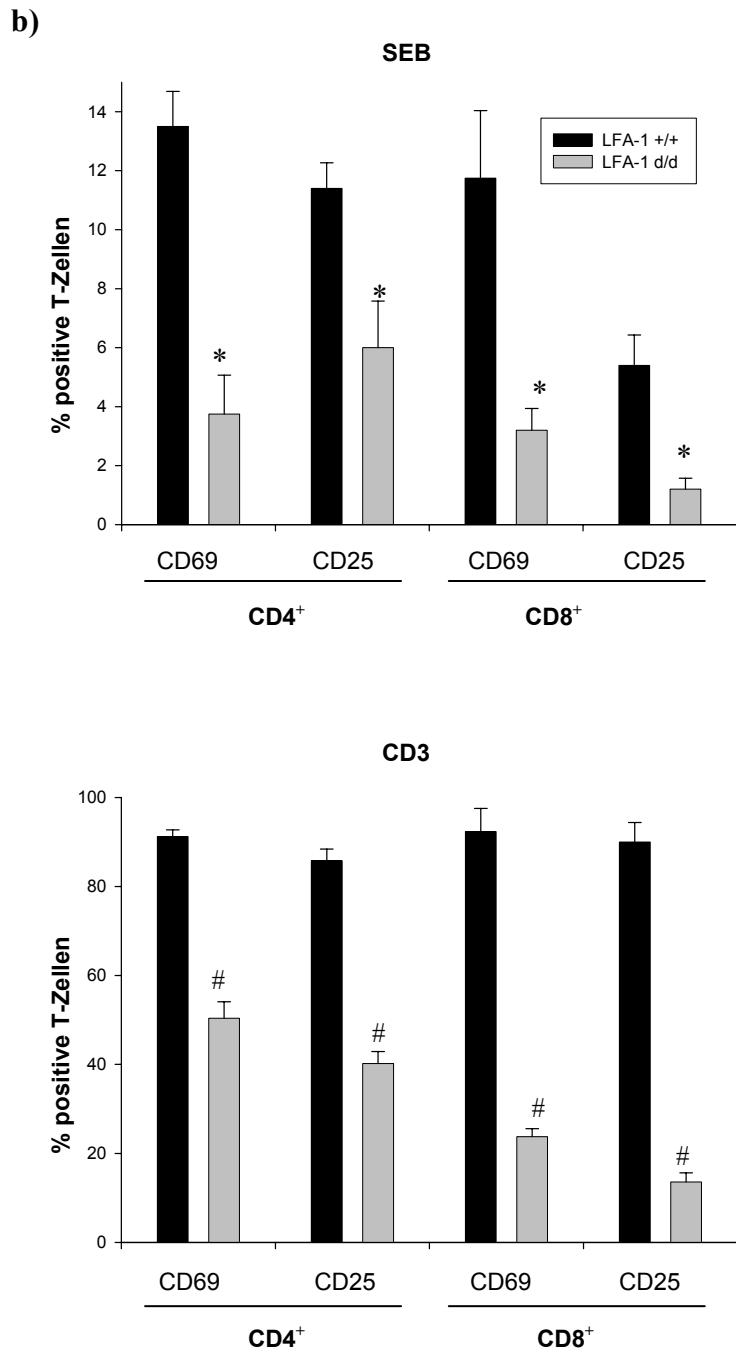


Abb. 3.16: Aktivierungsmarker auf T-Zellen nach Stimulation mit 2 µg/ml löslichem anti-CD3 mAk bzw. 1 µg/ml SEB für 16 h.

a) Die FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle erfolgte mit anti-CD69 und anti-CD25 und wurde nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen getrennt.

b) Zusammenfassung aller durchgeführten Experimente in einem Diagramm. Dargestellt ist der Prozentsatz an CD69 bzw. CD25 positiven CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen. (n = 6, # p < 0,005, * p < 0,05)

3.2.6 Der Einfluss der LFA-1^{d/d} Mutation auf die allogene MLR

Um den Einfluss der in das α L-Gen eingeführten Mutation auf Zell-Zell-Interaktionen näher zu untersuchen, wurden allogene „Mixed Lymphocyte Reactions“ (MLRs) durchgeführt. Splenozyten aus LFA-1^{d/d} Mäusen (H-2^b) und Kontrolltieren des Haplotyps H-2^b wurden mit radioaktiv bestrahlten allogenen H-2^d Milzzellen für fünf Tage stimuliert. Als Kontrolle diente ein syngener Ansatz, bei dem Stimulator- und Responder-Zellen den gleichen Genotyp aufweisen. Die Proliferation als Antwort auf die Stimulator-Zellen wurde an Hand des Thymidineinbaus gemessen.

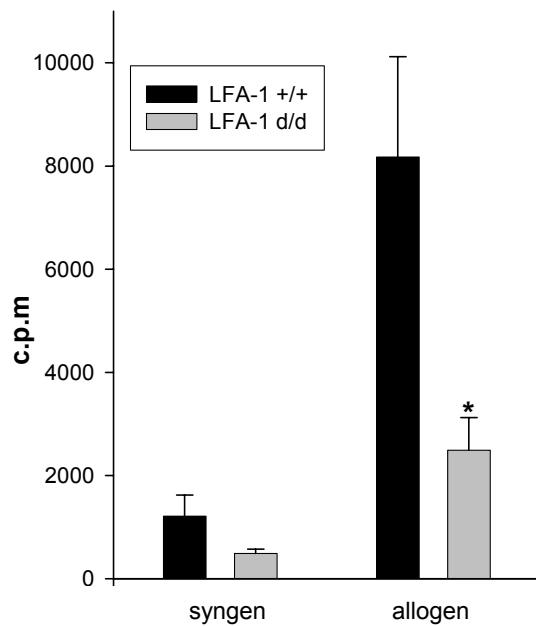


Abb. 3.17: Proliferation von H2^b-Effektorzellen als Antwort auf allogene Stimulator-Zellen. An Tag 5 der allogenen MLR wurde die Proliferation von WT-Zellen und mutierten Zellen an Hand des Thymidineinbaus gemessen. Im Vergleich dazu diente die Antwort auf syngene Stimulator-Zellen desselben Haplotyps als Kontrolle. (n = 8; * p < 0,05)

Die Effektorzellen aus LFA-1^{d/d} Mäusen zeigten eine deutlich reduzierte Antwort auf die Präsentation fremder MHC Moleküle im Vergleich zu Splenozyten aus LFA-1^{+/+} Tieren. Wie erwartet reagierten keine der beiden Populationen auf die syngenen Kontrollzellen (Abb. 3.17).

Dieses Ergebnis unterstreicht einen Einfluss der Mutation auf Zell-Zell-Interaktionen und steht somit in guter Übereinstimmung mit den in Abb. 3.15 gezeigten Daten.

3.2.7 CTL-Aktivität von LFA-1^{d/d} T-Zellen

Nachdem ein Defekt in der T-Zell Aktivierung und Proliferation festgestellt wurde, wurde in einem nächsten Schritt die CTL-Antwort analysiert. Dazu erhielten die Tiere eine Injek-

tion mit 100 µg Ovalbumin als Modellantigen und 10 nmol des Adjuvans ODN1668 subcutan in die hinteren Pfoten. Kontrollgruppen wurden lediglich mit ODN1668 immunisiert. ODN1688 wirkt dabei als Adjuvans, indem es das Immunsystem über TLR9 stimuliert. Nach vier Tage wurden die poplietalen und inguinalen Lymphknoten auf beiden Seiten entnommen und die daraus gewonnenen Zellen für weitere vier Tage *in vitro* expandiert. Anschließend wurde die spezifische Zytotoxizität der aktivierten T-Zellen in einem ^{51}Cr -Freisetzungssassay ermittelt. Als Zielzellen dienten mit ^{51}Cr markierte EL-4 Zellen, welche mit aus der Ovalbuminsequenz abgeleitetem SINFEKL beladen wurden und von den *in vivo* induzierten und *in vitro* expandierten T-Zellen lysiert werden sollten. EL-4 Zellen ohne Peptid dienten als Negativkontrolle. Das Effektor/Zielzell-Verhältnis wurde von 100/1 über 7 Stufen in 1:2 Verdünnungsschritten titriert. Nach 4h wurde das freigesetzte ^{51}Cr im Überstand mit einem γ -Counter vermessen.

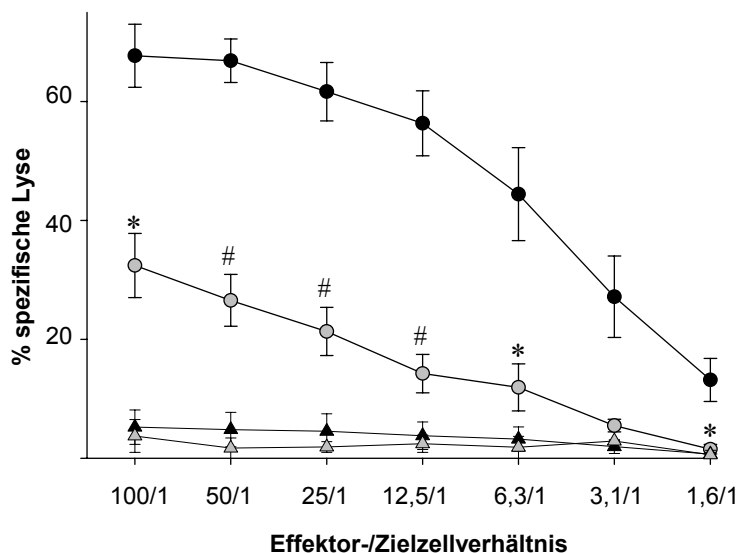


Abb. 3.18: Induktion eine CTL-Antwort. Die CTL-Aktivität der LFA-1^{d/d} (graue Symbole) und LFA-1^{+/+} (schwarze Symbole) Zellen wurde in einem Chrom-Assay getestet. Angegeben ist der Prozentsatz lysierter, mit Peptid beladenen EL-4 Zielzellen (Kreise). Als Kontrolle dienten EL-4 Zellen ohne Peptid (Dreiecke). (LFA-1^{d/d}: n = 4; LFA-1^{+/+}: n = 3; * p < 0,05; # p < 0,005)

Wie aus Abb. 3.18 hervorgeht, ist die Induktion einer CTL-Antwort mit ODN1668 als Adjuvans und Ovalbumin als Antigen in LFA-1^{d/d} Mäusen deutlich weniger effizient als in WT-Mäusen.

Im Folgenden diente die Tetramer Technik zur genaueren Analyse der CTL-Antwort (Altmann *et al.*, 1996). Dabei sollten mit SINFEKL-Peptid beladene Tetramere näheren Aufschluss bringen über Quantität und Qualität der T-Zell Antworten (Busch und Pamer, 1999). Dadurch kann man feststellen, ob dem Defekt zu wenige aktivierte T-Zellen zu Grunde liegen oder ob die Ursachen auf Seiten der Qualität der spezifischen Lyse zu su-

chen sind. Dazu wurden die Tiere wie für die Durchführung des CTL-Assays mit 100 μg Ovalbumin und 5 nmol ODN1668 immunisiert. Nach 9 Tagen wurden die Lymphknoten entnommen und die daraus gewonnenen Zellsuspensionen in die Färbungen eingesetzt. Wie in Abb. 3.19 dargestellt ist, wurde bezogen auf CD8^+ T-Zellen der Anteil an SINFEKL-Tetramer⁺-Zellen bestimmt, die CD62L nur schwach exprimierten. L-Selektin (CD62L) wird auf Lymphozyten und Neutrophilen nach deren Aktivierung innerhalb weniger Minuten herunterreguliert und kann somit als Aktivierungsmarker herangezogen werden.

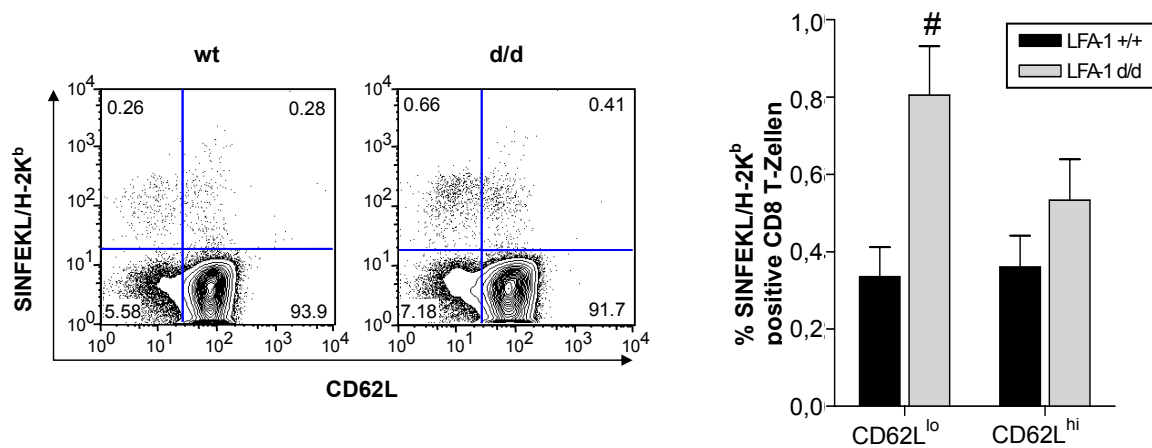


Abb. 3.19: Anteil der Antigen-spezifischen T-Zellen nach Immunisierung mit 100 μg Ovalbumin und 5 nmol 1668. Bestimmt wurde die Anzahl der $\text{SINFEKL}^+/\text{CD62L}^{\text{lo}}$ CD8^+ T-Zellen in poplietalen und inguinalen Lymphknoten. Links dargestellt ist eine repräsentative Färbung aus drei unabhängigen Experimenten. Rechts sind diese in einem Diagramm zusammengefasst. (n = 3)

Abb. 3.19 zeigt, dass der Anteil an Antigen-spezifischen Zellen in den $\text{LFA-1}^{\text{d/d}}$ Mäusen sogar größer ist als in Kontrolltieren, so dass die verminderte CTL-Aktivität nicht auf die Quantität der Zellen zurückzuführen ist. Es ist daher zu vermuten, dass die Interaktion von CTL mit Zielzellen gestört ist.

4 Diskussion

Integrine sind in vielfältige Aspekte bei der Entwicklung des Immunsystems und dessen Abwehrleistungen involviert. Sowohl durch Experimente mit inhibierenden Antikörpern oder anderen Antagonisten als auch durch die Analyse Gen-defizienter Mäuse konnte in die Bedeutung der einzelnen Integrinuntereinheiten im Immunsystem Einblick gewonnen werden. Trotz all dieser Kenntnisse ist bis dato wenig bekannt über den Einfluss der Aktivitätsregulation von Integrinen auf die Immunantwort *in vivo*. Es gibt dazu zwar Anhaltspunkte aus verschiedenen *in vitro* Studien, jedoch können diese Ergebnisse nicht direkt auf das *in vivo* System übertragen werden. So wurden zum Beispiel in Knockout-Modellen kompensierende Effekte sichtbar, was die Komplexität der Prozesse zeigt (Hynes und Wagner, 1996). Auch kamen bei Blockierungsstudien unerwartete transdominante Effekte z. B. zwischen den Integrinen $\alpha\beta3$ und $\alpha4\beta1$ zum Vorschein (Imhof *et al.*, 1997).

Da zu dem Einfluss der Aktivitätsregulation von Integrinen lediglich Daten aus *in vitro* Experimenten vorliegen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das hochkonservierte Motiv GFFKR in der α -Untereinheit des Leukozytenintegrins LFA-1 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen deletiert. Aus den bekannten *in vitro* Experimenten kann man dadurch eine konstitutiv aktive Form des Integrins LFA-1 erwarten (O'Toole *et al.*, 1994). Die bisherige Hypothese, dass konstitutiv aktive $\beta2$ -Integrine zu unkontrollierten Entzündungsreaktionen führen (Hynes, 2002), kann bis dato jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr scheinen voraktivierte Integrine eine Beeinträchtigung der Effektorfunktionen zur Folge zu haben.

4.1 Analyse der hämatopoetischen Zellpopulationen in LFA-1 mutierten Tieren

LFA-1^{d/d} Mäuse erscheinen gesund und sind fertil. Eine Analyse der lymphatischen Organe ergab, dass die peripheren Lymphknoten und Peyer'sche Plaques der LFA-1^{d/d} Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Tieren signifikant verkleinert sind. Im Gegenzug ist die Milz größer. Auf diesen Befund der veränderten Organgrößen wird unter 4.3 noch näher eingegangen.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Gesamtzellzahlen der einzelnen Organe und einer Verschiebung in den Zellpopulationen konnte jedoch nicht hergestellt werden, da die Verhältnisse in den Lymphozyten Subpopulationen der LFA-1^{d/d} Mäuse normal sind. So ist das CD4/CD8 Verhältnis in LFA-1^{d/d} Tieren unauffällig, was auf eine normale T-

Zell Entwicklung schließen lässt, obwohl *in vitro* Untersuchungen die Notwendigkeit des Integrins LFA-1 in diesen Prozess nahe legen (Fine and Kruisbeek, 1991). Demnach sind in die Kolonisation vom Thymus durch T-Zell Vorläufer und deren Entwicklung neben LFA-1 verschiedener Integrine involviert. Während der Differenzierung der Thymozyten, welche durch die gerichtete Wanderung der Zellen vom Cortex in die Medulla begleitet wird, kommt es zur Differenzierungs-spezifischen Expression unterschiedlicher Integrine (Shimizu *et al.*, 1998). Die exakte Rolle der Adhäsionsrezeptoren bei der T-Zell Entwicklung ist jedoch weiter unklar. So zeigen auch LFA-1 defiziente Mäuse eine normale T-Zell Entwicklung (Shier *et al.*, 1996; Schmits *et al.*, 1996).

Eine Hauptfunktion von Integrinen ist in der gerichteten Einwanderung von Lymphozyten in Gewebe über Gefäßwände zu sehen. Dort regulieren sie Proliferation und Differenzierung der Zellen. Ähnliche Integrin-abhängige Prozesse finden in Entwicklungsvorgängen statt, welche die Bildung des Immunsystems über Vorläuferzellen initiieren (Shimizu *et al.*, 1998). So kontrollieren Integrine das Homing von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark. Im Zuge dessen ist auf Knochenmarks-Vorläuferzellen neben den Integrinen $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ auch $\alpha L\beta 2$ exprimiert (Liesveld *et al.*, 1993). Da *in vitro* die Endothel-Transmigration durch anti- $\beta 2$ Ak teilweise blockiert werden kann, war ein Einfluss der Mutation nicht auszuschließen. Jedoch ist, wie FACS-Färbungen des Blutes zeigen, die Hämatopoese in den Gain-of function Mutanten ebenso wie in $\beta 2$ -defizienten Menschen (LADI Patienten) und Mäusen nicht beeinträchtigt (Schmits *et al.*, 1996).

Was die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle betrifft, so ergab die Analyse keinen Einfluss der Mutation auf andere Integrine wie die $\beta 2$ -Familienmitglieder $\alpha M\beta 2$, $\alpha D\beta 2$ und $\alpha X\beta 2$. Hingegen kommt es durch die Deletion des hochkonservierten Motivs GFFKR in der αL Untereinheit des Integrins LFA-1 zu einer reduzierten Oberflächenexpression der Integrinketten αL und $\beta 2$. Intrazelluläre Färbungen und RT-PCR Analysen ergaben jedoch keine Unterschiede zwischen WT-Zellen und LFA-1^{d/d} Zellen bezüglich der RNA- und intrazellulären Protein-Mengen von LFA-1. Somit ist in LFA-1^{d/d} Zellen der Transport des Integrins LFA-1 an die Oberfläche inhibiert. Eine Erklärung dieser Auffälligkeit bietet eine Untersuchung von Lu und Springer (1997). Sie konnten einen Einfluss des Motivs GFFKR auf die Oberflächenexpression und die dafür notwendige Heterodimerbildung nachweisen. Negative Auswirkungen auf die Funktionalität des Rezeptors sind aber nicht zu erwarten, da nur etwa 20% der normal vorhandenen Mengen an Rezeptoren auf der Oberfläche in Zell-Zell-Interaktionen involviert sind (Hamann *et al.*, 1986). Dies findet auch Bestätigung in der gemäßigten Form der Krankheit LAD, bei der eine Expression von 5-10% der normal vorhandenen $\beta 2$ -Integrine zu einer deutlichen Besserung des Zustandes der Patienten führt im Vergleich zu der schweren Defizienz (Kishimoto *et al.*, 1987).

4.2 Einfluss der Mutation auf die Adhäsion an ICAM-1

Die Funktionalität des mutierten LFA-1 Integrins wurde an Hand von Adhäsionsassays getestet. Dadurch sollte die Hypothese, dass eine Deletion des Motivs GFFKR in einer Aktivierung des Integrins resultiert, überprüft werden.

Die durchgeführten Adhäsionsassays konnten die erhöhte Bindungsaktivität von LFA-1^{d/d} Zellen an den Liganden ICAM-1 beweisen. Sowohl nach Stimulation mit Mg²⁺-Ionen wie auch mit Mn²⁺ bzw. PMA war die Adhäsion an den aufgereinigten, immobilisierten Proteinliganden ICAM-1 von LFA-1^{d/d} Thymozyten stärker als die von WT-Zellen. Lediglich eine kombinierte Stimulation mit Mn²⁺-Ionen und PMA konnte die Adhäsion von WT-Zellen auf das Niveau der LFA-1^{d/d} Zellen anheben. Dies ist damit erklärbar, dass Mn²⁺-Ionen die Integrine über die I/A-Domäne extrazellulär stimulieren, während PMA über intrazelluläre Mechanismen zur Trennung der zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Ketten führt, was eine Aktivierung der Integrine bewirkt. Beide Mechanismen können somit additiv wirken. Bei einer Deletion des Motivs GFFKR sind LFA-1 Integrine schon im Grundzustand voraktiviert, was sich im Vergleich der Adhäsionen der mit Mg²⁺-Ionen stimulierten Thymozyten widerspiegelt. Eine Stimulation der LFA-1^{d/d} Zellen allein mit Mn²⁺-Ionen bewirkt schon einen Anstieg der Adhäsion auf das höchste Niveau. Ein zusätzlicher Stimulus mit PMA konnte die Adhäsion nicht weiter steigern. Hierfür könnte eine Erklärung sein, dass LFA-1^{d/d} Zellen intrazellulär schon aktiviert sind. Allerdings zeigt auch eine Inkubation mit PMA alleine eine Steigerung der Adhäsion im Vergleich zum Basalniveau. Das heißt entweder, dass eine Aktivierung durch die Deletion des Motivs GFFKR nicht vollständig ist, oder andere bzw. ergänzende Mechanismen durch eine Stimulation mit PMA wirksam werden. So ist bekannt, dass Phorbol ester auch einen positiven Einfluss auf die Mobilität von LFA-1 haben, so dass auch die Avidität der Leukozytenintegrine erhöht ist (Kucik *et al.*, 1996). Zytoskelett-Rearrangements scheinen jedoch darin nicht involviert zu sein, da die konstitutive Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 nicht durch Cytochalasin D inhibiert wird (Lu und Springer, 1997).

Die Adhäsion an den Liganden VCAM-1, welche über das Integrin $\alpha 4 \beta 1$ vermittelt wird (Lobb und Hemler, 1998), zeigt, dass die eingeführte Mutation spezifisch ist für Interaktionen von LFA-1 mit seinen Liganden wie ICAM-1. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion von WT-Zellen und LFA-1^{d/d} Thymozyten nachgewiesen.

Ergänzend zu den Adhäsionsassays an aufgereinigte Proteinliganden wurden die Bindungen *in vitro* an Endothelzellen zwischen Kontroll-Zellen und LFA-1^{d/d} Zellen verglichen. Sie kommen *in vivo* Bedingungen näher, da nicht nur die Adhäsion an einen spezifischen Liganden untersucht wird, sondern die Einflüsse mehrerer, evtl. redundanter oder sich ergänzender Bindungspartner mit einbezogen werden. Das vaskuläre Endothel bildet

einen Monolayer, der eine selektiv permeable Grenze zwischen der Blutbahn und extravaskulären Geweben und Organen darstellt (Luskinkas *et al.*, 2002). Auf Grund seiner anatomischen Lage hat es Einfluss sowohl auf normale als auch pathophysiologische Prozesse wie Entzündungen (Majno *et al.*, 1996; Cines *et al.*, 1998).

Im Zuge dieser Assays wurde das Adhäsionsvermögen an ruhendes und durch TNF- α aktiviertes Endothel verglichen. Bei der Adhäsion an ruhendes Endothel konnten nur geringe Unterschiede zwischen LFA-1^{d/d} Zellen und Kontroll-Zellen nachgewiesen werden. Dies ist dadurch erklärbar, dass der Einfluss von LFA-1 aufgrund der niedrigen basalen Expression von ICAM-1 nur gering ist. Dieser Befund korreliert mit Vorversuchen, bei denen die Adhäsion an ICAM-1 defiziente Endothelzellen (bEndJ1.1) analysiert wurde. Auch in diesem Fall bestanden keine Unterschiede zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen. Nach der Hochregulation von ICAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen durch TNF- α sind deutlich mehr LFA-1^{d/d} Zellen in der Lage, an den Monolayer zu binden als WT-Zellen. Dies bestätigt, dass die erhöhte Aktivität von LFA-1 durch ein stärkeres Adhäsionsvermögen an den Liganden ICAM-1 zum Ausdruck kommt.

Gleichzeitig wird dabei die Spezifität der Mutation unterstrichen. Es ist bekannt, dass bei der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen der induzierbare LFA-1 - Ligand ICAM-1 eine wesentlich wichtigere Rolle spielt als das konstitutiv exprimierte ICAM-2 (Roth *et al.*, 1995). Des Weiteren sind die Liganden VCAM-1 und E-Selektin an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen involviert, welche keine Bindungspartner von LFA-1 darstellen. Erst in dem der Adhäsion folgenden Schritt, der Transmigration von Zellen über die Endothelbarriere, sind weitere Liganden von LFA-1 wie ICAM-2 beteiligt (Reiss *et al.*, 1998).

4.3 Das Migrationsverhalten von LFA-1^{d/d} Leukozyten

Die gerichtete Wanderung von T-Lymphozyten aus dem Blut in extravaskuläres Gewebe stellt einen wichtigen Bestandteil bei Entzündungsreaktionen dar. Im Zuge dessen spielt die Interaktion zwischen Endothelzellen und T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle. Dabei sind Interaktionen zwischen LFA-1 und seinen Bindungspartnern auf der Oberfläche von Endothelzellen sowohl in die Auswanderung von naiven Lymphozyten in lymphatische Gewebe (Hamann *et al.*, 1988, Meerschaert and Furie *et al.*, 1995) als auch in die Rekrutierung von Lymphozyten zu Entzündungsherden (Mulligan *et al.*, 1994) involviert.

Die Entzündungssituation wurde in den durchgeführten Transmigrationsassays wie bei den Adhäsionsassays durch die Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α simuliert. Dabei kommt es zur Hochregulation von ICAM-1, was die Migrationsrate von WT-Zellen sowohl aus der Milz wie auch aus Lymphknoten um mehr als das Doppelte erhöht. Die Anzahl

transmigrierter LFA-1^{d/d} Zellen ließ sich im Gegensatz dazu durch die Stimulation der bEnd5-Zellen mit TNF- α kaum steigern, was mit der zuvor beschriebenen, verstärkten Adhäsion von LFA-1 an ICAM-1 in Korrelation steht. Im Einklang mit dieser Beobachtung stehen *in vitro* Ergebnisse von Weber *et al.* (1997), nach welchen eine Deletion der α L-Untereinheit vor dem Motiv GFFKR die transendotheliale Chemotaxis der Transfektanten auf MCP-1 hin deutlich beeinträchtigt.

In ersten Experimenten mit ICAM-1 defizienten Endothelzellen blieben die Unterschiede zwischen LFA-1^{d/d} Zellen und WT-Zellen bestehen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei der transendothelialen Migration im Gegensatz zur Adhäsion ICAM-2 als weiterer Bindungspartner von LFA-1 involviert ist. Dies wird zum einen deutlich an Hand von ICAM-1 defizienten Mäusen (Sligh *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) wie auch durch *in vitro* Studien, in welchen der inhibitorische Effekt von mAk gegen ICAM-1 geringer ist als der von mAk gegen β 2 (Greenwood *et al.*, 1995). Der quantitative Einfluss von ICAM-2 ist dabei in Abwesenheit von ICAM-1 noch einmal größer, was einen Hinweis gibt auf eine Redundanz von ICAM-1 und ICAM-2 bei der Migration von Leukozyten (Reiss *et al.*, 1998). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass darüber hinaus eine weitere Gruppe unter den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie bei der transendothelialen Migration einen Beitrag als Interaktionspartner von LFA-1 (Aurrand-Lions *et al.*, 2000; Bazzoni, 2003) leistet. Hier sind die „junctional adhesion molecules“ (JAMs) JAM-1 und JAM-2 zu nennen (Johnson-Leger *et al.*, 2002; Ostermann *et al.*, 2002).

Zusammenfassend kann man die gemachten Beobachtungen folgendermaßen erklären: Migration erfordert ein dynamisches Bilden und Lösen von Adhäsionskontakten, wobei das Lösen der Interaktionen bei LFA-1^{d/d} Zellen vermutlich gestört ist (Ridley *et al.*, 2003).

Um die Anhaltspunkte aus den *in vitro* Versuchen auf ein verändertes Migrationsverhalten von LFA-1^{d/d} Leukozyten zu bestätigen, diente als *in vivo* Model die Thioglykollat-induzierte Peritonitis. Diese sterile Infektion führt zur Rekrutierung von Leukozyten. Dabei zählen neutrophile Granulozyten zu den ersten Zellen, die zum Ort der Infektion einwandern (Issekutz und Movat, 1980). Neutrophile gehören zu den häufigsten Leukozyten im Blutstrom, haben aber nach Extravasation lediglich eine Überlebensdauer von nur wenigen Stunden (Cline, 1975). Deshalb werden Neutrophile im Laufe einer Entzündungssituation mehr und mehr durch Leukozyten aus der Makrophagen/Monozyten Linie ersetzt, welche durch das CC-Chemokin MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“) angezogen werden. Entgegen der bisherigen Meinung (Hurst *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2001) scheint nach einer neuen Untersuchung die Bildung von MCP-1 jedoch nicht Monozyten-abhängig zu sein (Henderson *et al.*, 2003). Makrophagen wiederum spielen bei der proinflammatorischen Immunantwort eine zentrale Rolle, indem sie für das Bekämpfen der Entzündung unerlässliche Zytokine produzieren (Adams und Hamilton, 1992). Um über die Endothel-Barriere zum Ort der Entzündung zu gelangen, sind in diesen mehrstufigen

Prozess (siehe 1 Einleitung) neben Selektinen die Integrine Mac-1, LFA-1 und $\alpha 4\beta 1$ involviert (Henderson *et al.*, 1994; Springer, 1995). So spricht die Reduktion der infiltrierenden Gesamtzellzahl wie auch die reduzierte Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen bei der Thioglykollat-induzierten Peritonitis in LFA-1 defizienten Mäusen für eine Rolle von LFA-1 bei Neutrophilen- und Monozytenantworten auf lokale Infektionen. Dass die Einwanderung der Zellen lediglich reduziert und nicht im Ganzen inhibiert ist, macht aber auch die Beteiligung noch andere Moleküle an diesem Prozess deutlich (Schmits *et al.*, 1996).

Die intraperitoneale Injektion von Thioglykollat in LFA-1^{d/d} Mäusen zeigt eine verzögerte Einwanderung von mutierten Granulozyten in die Bauchhöhle, was sich auch in einer Reduktion der eingewanderten Gesamtzellzahl 6 h nach Injektion widerspiegelt. Nach 12 h scheint die Zellzahl in der Bauchhöhle von LFA-1^{d/d} Mäusen noch im Steigen zu sein, während die Anzahl der Granulozyten in Kontrollmäusen wieder abnimmt. Diese verzögerte Einwanderung könnte mit verstärkten Zell-Endothel-Interaktionen wegen des aktivierten LFA-1 zu erklären sein. Die Einwanderung von Makrophagen wird von der Mutation nicht beeinflusst. Dies korreliert mit Daten von Henderson *et al.* (2003), die zeigten, dass die Rekrutierung von Monozyten zum Entzündungsherd von LFA-1 und damit auch von vorhandenen Neutrophilen unabhängig ist.

Verstärkte Zell-Endothel Interaktionen können auch als Erklärung für die verkleinerten Lymphknoten und Peyer'schen Plaques dienen. Es ist möglich, dass LFA-1^{d/d} Leukozyten auf Grund der stärkeren Zell-Zell-Interaktionen mehr Zeit benötigen, um die Endothelbarriere dieser Organe zu durchbrechen. Im Gegenzug ist die Milz in LFA-1^{d/d} Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant vergrößert. In dieses Organ können die Zellen mit dem Blutstrom einfließen, wobei keine spezifischen Zell-Zell-Interaktionen ein „Hindernis“ darstellen, so dass sich hier die LFA-1^{d/d} Leukozyten anreichern können.

4.4 Einfluss auf proliferative T Zell Antworten *in vitro* und *in vivo*

Eine Methode, um die zelluläre Immunantwort nach einem spezifischen Antigenkontakt *in vitro* quantifizieren zu können, besteht im Nachweis der Zellproliferation durch die Messung der Inkorporation von tritiummarkiertem Thymidin (Corradin *et al.*, 1977).

Nach Stimulation mit löslichem anti-CD3 mAk und PMA bzw. PMA/Ionomycin zeigen LFA-1^{d/d} Splenozyten und Zellen aus Kontrolltieren keine Unterschiede im [³H]-Thymidineinbau, wohingegen die Proliferation von LFA-1^{d/d} Splenozyten als Antwort auf die Zugabe von SEB signifikant inhibiert ist. Dies unterscheidet sich deutlich von LFA-1 defizienten Zellen, die nach Stimulation mit anti-CD3 mAk nicht mehr zur Proliferation

fähig sind (Schmits *et al.*, 1996), was die Beteiligung von LFA-1 bei der durch TZR Cross-linking hervorgerufenen T Zell Aktivierung deutlich macht (Peterson *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2001). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch lösliches CD3 die Zellen zur Proliferation angeregt werden, ohne dass Zell-Zell-Kontakte involviert sind, bei denen die verstärkten Interaktionen zwischen LFA-1 und seinen Bindungspartnern zur Geltung kommen. Diese spielen jedoch bei Stimulation mit löslichem SEB eine Rolle, was schließlich auch zu einem signifikant reduzierten Thymidineinbau in LFA-1^{d/d} Splenozyten im Vergleich zu WT-Zellen führen könnte.

Neben der Thymidininkorporation kann auch die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 für die Analyse von T-Lymphozyten Antworten herangezogen werden. Die Expression beider Aktivierungsmarker wird hervorgerufen durch Stimuli wie z. B. anti-CD3/TZR und geht der Zellproliferation voraus. Dabei ist CD69, das auch bekannt ist als „Aktivierung induzierendes Molekül“ (AIM) oder „early activation Antigen“ (EA-1) (Nakamura *et al.*, 1989), das nach Zellaktivierung früheste, induzierbare Glykoprotein auf der Zelloberfläche und geht der Expression anderer Aktivierungsmarker wie z.B. CD25 voraus. CD25 stellt die α -Untereinheit des Rezeptors für IL-2 dar. Zellaktivierung führt zu einer gesteigerten IL-2 Produktion und IL-2 Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche.

Überraschenderweise zeigten LFA-1^{d/d} Splenozyten und Zellen aus Kontrollmäusen keine Unterschiede in der Thymidininkorporation nach Stimulation mit anti-CD3 mAk, wohingegen die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD69 auf den LFA-1^{d/d} Zellen deutlich im Vergleich zu den WT-Zellen reduziert war. Auch Wells *et al.* (1997) zeigten schon ähnliche Daten. Hier hatten Ak gegen CD28 keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen, führten aber zu einer verminderten Detektion von CD25 und CD69 auf der Oberfläche. Die Erklärung, dass der IL-2R abhängig ist von kostimulatorischen Signalen über CD28, lässt eine Brücke schlagen zum möglichen Einfluss von LFA-1 als kostimulatorisches Molekül (Saventer *et al.*, 1991; Damle *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1995). Dies könnte bedeuten, dass die reduzierte Expression der Aktivierungsmarker keine Folge einer erhöhten Adhäsion sind, sondern dass die Deletion von GFFKR zusätzlich Auswirkungen auf die kostimulatorischen Fähigkeiten von LFA-1 hat. Allerdings ist noch unklar, inwieweit kostimulatorische Aktivitäten von CD28 und LFA-1 vergleichbar sind. In manchen Studien erscheinen LFA-1 Interaktionen als kostimulatorisches System, während andere den beiden Rezeptoren doch deutlich unterschiedliche Funktionen zuschreiben (Ni *et al.*, 1999; Bachmann *et al.*, 1997; Sims und Dustin, 2002). Auch eine Arbeit von Weitzel *et al.* (2002) stützt nicht die oben aufgestellte These. So führt die Blockade der ICAM-1/LFA-1 Interaktion zu einer reduzierten Proliferation als Folge einer weniger stark ausgeprägten Immunologischen Synapse (IS; auf die später noch explizit eingegangen wird), beeinträchtigt aber nicht die Expression von CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche. Es lässt sich also feststellen, dass die Stärke der Proliferation nicht automatisch mit der Expression von

Aktivierungsmarkern wie CD25 und CD69 korrelieren muss, was eventuell Hinweise liefert auf eine Beteiligung zweier verschiedener Mechanismen. Darüber hinaus ist vielleicht noch zu bedenken, dass bei der klonalen Expansion sowohl die Anzahl der T-Zellen, die auf eine Stimulation durch Teilung antworten eine Rolle spielt wie auch die Kapazität jeder einzelnen dabei involvierten T-Zelle. Möglicherweise sind die gezeigten Ergebnisse darauf zurückzuführen, dass weniger LFA-1^{d/d} Zellen aktiviert sind, diese aber stärker proliferieren als Splenozyten aus WT-Tieren. Letztendlich sind aber noch weitere Experimente nötig, um die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen abschließend erklären zu können.

Was die Proliferation nach Stimulation mit SEB betrifft, so korrelieren hier die signifikant reduzierten Thymidininkorporationen mit der verminderten Expression der Oberflächenantigene CD25 und CD69 auf den Zelloberflächen von LFA-1^{d/d} Zellen. Interessanterweise ist der Unterschied in der Proliferation zwischen WT- und LFA-1^{d/d} Zellen auch nach Stimulation mit geringen SEB-Konzentrationen signifikant. Es ist bekannt, dass eine Beteiligung von ICAM-1/LFA-1 Interaktionen bei T-Zell/APC Konjugaten die für eine T-Zell Aktivierung notwendige Ag-Dosis um das 10 bis 100 -fache herabsetzt (Kuhlmann *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1992). Denkbar wäre, dass durch die verstärkte Adhäsion LFA-1^{d/d} Zellen bei niedrigen SEB-Konzentrationen schnellere Proliferationsraten aufweisen als WT-Zellen. Allerdings ist das nicht der Fall, da die Proliferation der LFA-1^{d/d} Splenozyten über alle Konzentrationen hinweg reduziert ist. Die dafür verantwortliche Ursache könnte in der geringeren Beweglichkeit der Zellen liegen, die durch die verstärkte Adhäsion hervorgerufen wird. Darin liegt auch die Differenz zur Stimulation mit anti-CD3 mAk. Diese aktivieren die Zellen durch Crosslinking der TZR, wozu keine Zell-Zell Interaktionen nötig sind und somit ein erhöhtes Adhäsionsvermögen der Zellen ohne Einfluss bleibt. Superantigene hingegen binden auf Seiten der APCs an MHC Klasse II Moleküle (Fischer *et al.*, 1989; Fraser 1989) und werden von T-Zellen durch Interaktion mit den V β -Regionen des TZR erkannt (White *et al.*, 1989; Kappler *et al.*, 1989).

Um den Einfluss der eingeführten Mutation auf T-Zell Antworten näher zu untersuchen, wurden allogene Immunantworten *in vitro* mit Hilfe von „Mixed Lymphocytes Reactions“ analysiert. Dabei gaben die beschriebenen Resultate der Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 mAk bzw. SEB schon Hinweise auf die zu erwartenden Ergebnisse, da auch diesen Assays Interaktionen zwischen T-Zellen und APCs zu Grunde liegen. So konnte gezeigt werden, dass die Mutation eine effektive allogene Immunantwort verhindert, was durch die signifikant reduzierte Thymidininkorporation im Vergleich zu den Kontroll-Zellen zum Ausdruck kommt.

Es gilt nun also Erklärungen für das Problem zu finden, dass LFA-1^{d/d} Zellen im Vergleich zu WT-Zellen verstärkt adherieren, dies aber nicht in erhöhten Effektorleistungen resul-

tiert. Vielmehr ist die Proliferation von Splenozyten aus LFA-1^{d/d} Mäusen deutlich reduziert. Möglicherweise liegt ein Grund an der Anatomie der Immunologischen Synapse (IS). Unter einer IS versteht man die Umorganisation von Membranproteinen im Bereich der Kontaktzone von T-Zelle und APC. Damit wird durch die Anreicherung von TZR, MHC-Komplexen sowie „Lipid rafts“ das Signaling erleichtert (Bromley *et al.*, 2001; Delon und Germain, 2000). Man kann bei der IS zwei Zonen unterscheiden. Im zentralen Bereich kommt es zur Anreicherung von TZR und akzessorischen Molekülen wie CD4, CD2 und CD28, während im äußeren Ring u.a. LFA-1 zu finden ist (Grakoui *et al.*, 1999).

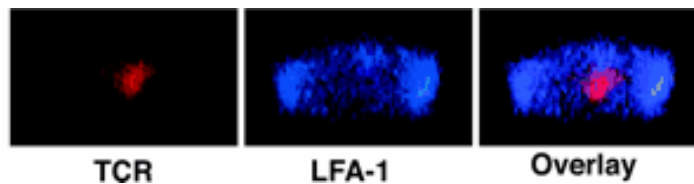


Abb. 4.1: Immunologische Synapse. Z-stack Rekonstruktion zeigt den TZR (rot) im Zentrum der Kontaktzone lokalisiert, umgeben von LFA-1 (blau) (aus Lee *et al.*, Science 2002).

Auch wenn die exakte Funktion der IS nicht aufgeklärt ist (Lee *et al.*, 2002), so scheint doch eine Rolle im Signaling als sicher und sei es nur, um eine Plattform zu bilden für sekundäre Signalwege (Hutloff *et al.*, 1999). Anhaltspunkte für die Bedeutung von LFA-1 bei der Bildung der IS geben Beobachtungen, die zeigen, dass bei einer Reduktion der TZR-induzierten LFA-1 Aktivierung auch die Formation von T-Zell/APC Konjugaten merklich beeinträchtigt ist (Ardouin *et al.*, 2003). Was die Folgen eines konstitutiv aktiven LFA-1 Integrins auf die IS betrifft, so könnte ein Defekt in der Rekrutierung von LFA-1 zur Kontaktzone zu einem weniger distinguierten Ausbilden dieser Struktur führen.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die verminderte T-Zell Aktivierung bietet die GTPase Rap1. Rap1 reguliert die T-Zell Aktivierung, indem sie T-Zell/APC Interaktionen über LFA-1 kontrolliert. Dabei beeinflusst Rap1 die Avidität von LFA-1 (Katagiri *et al.*, 2000; Reedquist *et al.*, 2000). Katagiri *et al.* (2002) stellten fest, dass T-Zell Antworten nicht nur bei Inhibierung von Rap1 sondern auch bei deren konstitutiver Expression ausbleiben. In diesem Fall kommt es zur konstitutiven Anreicherung von p27^{Kip1}, was den Übertritt der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase verhindert (Tomoda *et al.*, 1999) und so durch ein Unterbinden des Zellzyklus zu nicht responsiven T-Zellen führt. Der bekannte Zusammenhang zwischen Rap1 und LFA-1 sowie ähnliche Auswirkungen einer konstitutiven Expression der Moleküle macht denkbar, dass der verminderten T-Zell Aktivierung von LFA-1^{d/d} Zellen ebenfalls ein Defekt im Zellzyklus zu Grunde liegt.

Des Weiteren könnte eine durch konstitutiv aktives LFA-1 erzielte „Hyperaktivierung“ der T-Zellen in einer Fas/FasL-vermittelten Apoptose der Zellen resultieren. Solch ein „activation induced cell death“ (AICD) ist von überaktivierten T-Zellen bekannt (Ju *et al.*, 1995)

und auch ein Einfluss von verstärkten LFA-1/ICAM-1 Interaktionen auf die Apoptose von Zellen kann nicht ausgeschlossen werden (Wang und Leonardo, 1997).

Darüber hinaus spielt bei T-Zell/APC Interaktionen die Mobilität der polarisierten T-Zellen eine bedeutende Rolle, um Migration sowie das „Abscannen“ der Rezeptoren und Signaling optimal ausführen zu können. Demnach führt ein einmaliger Kontakt von TZRs auf der Oberfläche mit einem entsprechenden Liganden auf der APC noch nicht zur Aktivierung der T-Zelle (Friedl und Bröcker, 2002). Somit könnte die durch das mutierte LFA-1 verstärkte Adhäsion der T-Zelle an die APC eine rasches Lösen der Bindung und das Eingehen eines neuen Kontaktes erschweren.

Im Folgenden wurden schließlich die Fähigkeiten der zytotoxischen T-Zellen untersucht, Targetzellen zu lysieren. Hierbei erfolgt das Priming der T-Zellen auf das injizierte Antigen *in vivo*, dem sich die Aktivierung und Messung der Effektorleistungen *in vitro* anschließt. Auch in dieser Kombination aus *in vivo* und *in vitro* Versuch zeigt sich ein Defekt der mutierten T-Zellen bei Zell-Zell Interaktionen involvierten Reaktionen. Es deutet sich somit an, dass die *in vitro* gezeigten Defekte *in vivo* nicht durch kompensierende Effekte ausgeglichen werden können, wie das in der LFA-1 defizienten Maus der Fall ist (Schmits *et al.*, 1996).

Um die Gründe für die verminderte CTL-Aktivität und die darin involvierten Mechanismen herauszufinden, wurden Antigen-spezifische T-Zellen durch Tetramerfärbungen dargestellt. Die daraus resultierenden Ergebnisse legen nahe, dass die reduzierte spezifische Lyse von LFA-1^{d/d} Zellen nicht auf eine geringere Anzahl von aktivierten CD8 Zellen zurückzuführen ist. Es ist daher anzunehmen, dass jede einzelne Zelle in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt ist, Antigen-präsentierende Zellen erkennen und/oder abtöten zu können.

4.5 Vergleich der LFA-1^{d/d} und LFA-1^{-/-} Mäuse

Abschließend soll noch ein kurzer Vergleich gezogen werden zwischen den hier analysierten LFA-1^{d/d} Mäusen und dem aus der Literatur bekannten Stamm, der eine LFA-1 Defizienz trägt (Schmits *et al.*, 1996). Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich ist, weisen die Auswirkungen beider Mutationen große Parallelen auf. Diese betreffen z.B. die Organgrößen oder die Ergebnisse von allogenen MLRs. Auch werden in beiden Stämmen nach Thioglykollat-Injektion weniger Zellen in die Bauchhöhle rekrutiert. Ein Unterschied liegt lediglich in der CTL-Aktivität. Die Fähigkeit der LFA-1^{d/d} Zellen zur zytotoxischen Lyse sind, wie unter 3.2.7 beschrieben, deutlich reduziert, während Knock-Out Zellen nach Infektion mit LCMV oder VSV keinen Defekt in ihrer Aktivität haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Unterschied auch mit dem verwendeten Antigen zusammenhängt (Viren

versus OVA + CPG). Was die Proliferation von Splenozyten betrifft, so ist der Thymidineinbau von LFA-1^{d/d} Zellen nach Stimulation mit SEB reduziert, nach Zugabe von löslichem anti-CD3 mAk proliferieren die Zellen jedoch normal. LFA-1 defiziente Splenozyten können die Proliferationsrate von WT-Zellen auch nach letztgenanntem Stimulus nicht erreichen.

Tabelle 4.1: Vergleich der Mausstämmen LFA-1^{d/d} und LFA-1^{-/-}

	LFA-1 ^{-/-}	LFA-1 ^{d/d}
Lymphozyten Subpopulationen	normal	normal
Lymphknoten	↓	↓
Milz	↑	↑
Peritonitis	↓	↓
Proliferation	↓	(↓)
MLR	↓	↓
CTL	normal	↓

Es lässt sich also feststellen, dass ein voraktiviertes Integrin nicht etwa in einer Erhöhung der Effektorfunktionen resultiert, wie man vielleicht im Voraus erwarten könnte. Vielmehr sind die Auswirkungen einer Deletion des Motivs GFFKR fast ebenso gravierend wie eine Deletion des gesamten Integrins. Parallelen lassen sich zu der GTPase Rap1 ziehen, die unter 4.4 schon Erwähnung findet. Auch hier zeigt eine konstitutiv hohe Expression des Moleküls keine gesteigerte T-Zell Aktivität, sondern führt zu nicht responsiven T-Zellen (Katagiri *et al.*, 2002). Die gezeigten Daten machen die Notwendigkeit einer dynamischen Regulation der Adhäsionsaktivität von LFA-1 für die T-Zell Aktivierung deutlich.

4.6 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegenden Ergebnisse für Knock-In Mäuse, bei denen das hochkonservierte Motiv GFFKR in der zytoplasmatischen Domäne der α L-Untereinheit des Integrins LFA-1 deletiert wurde, einen Phänotyp im Migrationsverhalten und bei T-Zell vermittelten Immunantworten, denen Zell-Zell-Interaktionen zu Grunde liegen, definieren. Allerdings bedarf es einer Reihe weiterer Analysen, um diese Anhaltspunkte auszubauen und auch zusätzliche Ursachen und Mechanismen für den analysierten Phänotyp aufzuklären.

Wie zuvor schon erläutert, könnte im Ausbilden der IS eine Ursache für die reduzierte Proliferation von LFA-1^{d/d} Zellen liegen. Um die IS unter Einfluss der Mutation zu unter-

suchen, kann man die LFA-1 Mutante mit einer TZR transgenen Linie kreuzen, welche spezifisch ein Peptid erkennt. Bis durch diese recht langwierige Methode Resultate erzielt werden können, bietet die Generierung einer Antigen-spezifischen T-Zelllinie eine Möglichkeit, erste Anhaltspunkte zu gewinnen (Harty und Bevan, 1996). Auf jeden Fall ist die Aufklärung der IS ein sehr wichtiger Punkt, um Ursachen für die reduzierten Immunantworten im Zuge von Zell-Zell-Interaktionen herauszuarbeiten, da bekanntermaßen Größe und/oder Intensität und/oder Morphologie der IS Voraussetzung sind für eine volle T-Zell Aktivierung (Wetzel *et al.*, 2002).

Für die eingehendere Charakterisierung der LFA-1^{d/d} Maus, wird es darüber hinaus hilfreich sein, den Einfluss der Mutation auf das β 2-Integrin involvierende Signaling zu untersuchen. Aktivierte Integrine vermitteln nicht nur Adhäsion, sondern agieren auch als Signalrezeptoren, die beteiligt sind sowohl an Tyrosin Kinase- wie auch MAPK-Kaskaden (Juliano, 2002). In PMNs erwiesen sich β 2-Integrine als unerlässlich für die Aktivierung der Tyrosin-Kinase Syk, die wiederum Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten wie z.B. den „respiratory burst“ bewirken kann (Mocsai *et al.*, 2002; Lowell *et al.*, 1996). Unter 3.2.4 wurde eine verzögerte Einwanderung von LFA-1^{d/d} Granulozyten in die Bauchhöhle beschrieben. Es stellt sich also die Frage, ob die Mutation des Integrins auch Auswirkungen hat auf die Effektorleistungen der Zellen. An dieser Stelle wäre es interessant, in LFA-1^{d/d} Zellen den Adhäsions-vermittelten burst und die Phosphorylierung von Syk zu untersuchen, was beides β 2-abhängige Vorgänge sind (Graham *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2003). Allgemein ist es allerdings sehr schwierig, eine unabhängige Rolle von dem Zytoskelett zugeordneten Proteinen spezifisch für das Integrin-Signaling zu definieren, da das Zytoskelett auch sehr stark in die Aktivierung von Integrienen und die Integrin-vermittelte Adhäsion involviert ist.

In vivo Versuchen mit den LFA-1^{d/d} Mäusen werden in Zukunft eine große Bedeutung zukommen, da die bisherigen Daten zum größten Teil aus *in vitro* Experimenten gewonnen wurden und zur Notwendigkeit der Integrinregulation aus der Literatur kaum *in vivo* Daten vorliegen.

Diesbezüglich sind Immunisierungen mit T-Zell abhängigem Antigen und eine Analyse der Ak-Antwort geplant, da LFA-1/ICAM-1 Interaktionen nicht nur eine Rolle bei der Rezirkulation von T-Zellen und im Zuge von Entzündungsreaktionen spielen, sondern auch bei der Aktivierung der T-Zellen von Bedeutung sind. Im Einzelnen ist in diesem Zusammenhang der Einfluss auf die Entwicklung von T_H-Zellen zu nennen. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass LFA-1/ICAM-1 Interaktionen die Bildung von T_H1-Zellen unterstützen (Salomon und Bluestone, 1998; Luksch *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 2002). Über die Produktion von charakteristischen Zytokinen beeinflussen die T_H-Zellen schließlich auch die Verteilung der Ak-Subklassen. T_H1-Zellen werden z.B. mit IgG2a

assoziiert, während IgG1 vor allem nach T_H2-Beteiligung gebildet wird (Mosmann und Coffman, 1989). Insofern sind Auswirkungen der LFA-1-Mutation auf die nach einer Immunisierung gebildeten Ak-Subklassen möglich.

Des Weiteren kommen einige Infektionsexperimente in Frage, welche die Auswirkungen von konstitutiv aktiven LFA-1 Integrinen auf antivirale und antimikrobielle Immunantworten *in vivo* deutlich machen. So ist z.B. eine Infektion mit dem vesikulären Stomatitis Virus (VSV) denkbar. In dessen Bekämpfung sind neben T-Zell unabhängigen Mechanismen auch T-Zell abhängige Immunantworten involviert, was einen Einfluss der Mutation möglich macht. Allerdings war die CTL-Aktivität gegen Virusinfektionen von der LFA-1 Defizienz nicht beeinträchtigt (Schmits *et al.*, 1996), was im Gegensatz zu Studien mit blockierenden Ak steht (Davignon *et al.*, 1981; Springer *et al.*, 1982).

Zur Analyse der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien kann man *Listeria monocytogenes* injizieren. Im Laufe einer systemischen Infektion gelangen die Bakterien in Milz und Leber, wo sie Makrophagen und Hepatozyten befallen (Kaufmann, 1999; Gregory *et al.*, 1992). LFA-1 defiziente Mäuse erwiesen sich gegen diese gram-positiven Stäbchen resistenter als die Kontrollgruppe, was auf die erhöhte Neutrophilen-Anzahl im Blut und die damit verbundenen höheren Spiegel an G-CSF und IL-17 zurückzuführen ist. Auch war die Einwanderung in die betroffenen Organe LFA-1 unabhängig (Miyamoto *et al.*, 2003). Bei einer Infektion der LFA-1 gain-of function Mutanten könnte man die angeborene Immunantwort (24-72h) mit den Granulozyten zur ersten Abwehr und die nachfolgende adaptive Immunantwort differenziert betrachten. In letzteres sind schließlich antilisteriale CD8⁺ T-Zellen und aktivierte CD4⁺ T-Zellen involviert (Mittrucker *et al.*, 2000).

Ein interessanter Punkt wird darüber hinaus sein, den Einfluss der Mutation auf die Transplantatabstoßung zu untersuchen. Die Ergebnisse aus den MLRs, welche die LFA-1^{d/d} Splenozyten weniger responsiv auf allogene Stimulatorzellen zeigen, lassen nämlich auf eine unterschiedliche Reaktion zwischen den LFA-1 Knock-In Mäusen und den Kontrolltieren z.B. auf ein Spenderherz schließen. Daneben ist die Beteiligung von LFA-1 bei der Transplantatabstoßung durch verschiedene Studien beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Gabe von Antikörpern gegen LFA-1 und ICAM-1 die Akzeptanz eines Spenderherzes erhöht (Isobe *et al.*, 1992). Auch führte eine Blockade der LFA-1/ICAM-1 und CD28/B7 pathways im Mausmodell zu einem verlängerten Überleben der Allotransplantate (Malm *et al.*, 2002).

Ein spezifisches Problem von Knochenmarkstransplantationen stellt die akute „Graft-versus-host“ (a-GVHD) Reaktion dar. Dabei werden CTLs aus dem Spenderorgan durch die APCs des Empfängers aktiviert (Slomchik *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1996). Die Reaktionen zwischen den Lymphozyten aus dem Transplantat und den Alloantigenen des Empfängers führen schließlich zu den für die Krankheit charakteristischen Epithelnekrosen in

Haut, Leber und Darm (Ferrara und Deeg, 1991). An Hand eines gut charakterisierten Modells für die a-GVHD (Mowat und Felstein, 1990) konnte der „subepithelial dome“ in den Peyer'schen Plaques als Ort der Reaktion identifiziert werden (Murai *et al.*, 2003). Da dieses Organ in LFA-1 defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich verkleinert ist, ist auch ein verändertes Krankheitsbild nicht auszuschließen, was einen Experimentalansatz zu diesem Modell interessant macht.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde durch homologe Rekombination das hochkonservierte Motiv GFFKR des Integrins LFA-1 in Stammzellen deletiert. *In vitro* Daten zu Folge befindet sich das Integrin dadurch in einem konstitutiv aktiven Zustand. So sollte die Bedeutung der Aktivitätsregulation für die Rezeptorfunktion *in vivo* an Hand der LFA-1^{d/d} Mutante analysiert werden.

Die *in vitro* Daten konnten insofern bestätigt werden, als dass sich das Adhäsionsmolekül durch die Mutation in einem voraktivierten Zustand befindet, was durch Adhäsionsassays sowohl an immobilisierte Proteinliganden wie auch Endothelzellen nachgewiesen wurde. Die bisherige Hypothese, dass konstitutiv aktive β 2-Integrine zu unkontrollierten Entzündungsreaktionen führen (Hynes, 2002), kann bis dato jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr scheinen voraktivierte Integrine eine Beeinträchtigung der Effektorfunktionen zur Folge zu haben.

LFA-1^{d/d} Mäuse zeigen einen Phänotyp, der das Migrationsverhalten und T-Zell vermittelte Immunantworten betrifft.

Im Einzelnen erscheinen LFA-1^{d/d} Mäuse gesund und sind fertil. Auch sind keine Unterschiede in den Lymphozyten Subpopulationen im Vergleich zu WT-Mäusen nachweisbar. Was die Organgrößen betrifft, so sind periphere Lymphknoten und Peyer'sche Plaques signifikant verkleinert, während in der Milz erhöhte Zellzahlen festgestellt wurden. Damit kongruent stellt sich das Migrationsverhalten von LFA-1^{d/d} Zellen *in vivo* und *in vitro* dar. So war zum einen die Transmigration durch ein Endothelzell-Monolayer inhibiert und zum anderen wurden im Zuge einer Thioglykollat-induzierten Peritonitis weniger Leukozyten in die Bauchhöhle rekrutiert. Dieser Befund ist wie auch die verkleinerten lymphoiden Organe mit dem erhöhten Adhäsionsvermögen der Zellen am Endothel erklärbar, was die Einwanderung erschwert.

Verstärkte Zell-Zell Interaktionen sind wohl auch Grundlage für den Defekt, den LFA-1^{d/d} Zellen bei T-Zell vermittelten Immunantworten zeigen. Dafür bot eine beeinträchtigte Proliferation und Aktivierung von LFA-1^{d/d} Splenozyten nach Stimulation durch SEB einen ersten Anhaltspunkt. Weitere Verifikation erfuhr dieser Befund durch allogene MLRs, bei welchen erniedrigte [³H]-Thymidininkorporationen nachgewiesen wurden. Darüber hinaus wurden in LFA-1^{d/d} Mäusen herabgesetzte, zytotoxische T-Zell Antworten identifiziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ähnlichkeit im Phänotyp zwischen einer LFA-1 Defizienz und einem konstitutiv aktiven LFA-1 die Bedeutung eines in seiner Aktivität regulierbaren Integrins zeigt. Die Expression von Integrinen ist also für den physiolo-

gischen Ablauf von Effektorfunktionen nicht ausreichend. Vielmehr kommt der Regulation der Adhäsionsmoleküle, also deren flexibler An- und Abschaltung, eine ebenso bedeutende Rolle zu. In dieser Arbeit konnte ein Einfluss der Mutation sowohl auf die angeborene wie auch auf die adaptive Immunantwort nachgewiesen werden. Für die Identifizierung der dafür zu Grunde liegenden Mechanismen bedarf es jedoch weiterer Analysen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
β-Me	β-Merkaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	DNA-Kopie der mRNA
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxische Lyse
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser (Millipore)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF Zelle	embryonaler Fibroblast
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
ES Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Immunglobulin-Fc Teil
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
hCG	human chorionic gonadotropin
HEV	High endothelial venules
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
ICAM	intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
LAD	Leukocyte adhesion deficiency
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen-1
MAdCAM-1	mucosal adressin cell adhesion molecule 1
MHC	Major Histokompatibilität Komplex
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
Neo	Neomycin Phosphotransferase

OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PMA	4- α -Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SPF	Spezifisch pathogen frei
SSC	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat-Lösung
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
TZR	T-Zell Rezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand

7 Literaturverzeichnis

Adams, D.O., Hamilton, T.A. (1992). Macrophages as destructive cells in host defence. In: Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Snyderman, R. eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (2nd ed.) New York, NY: Raven Press; 637-662.

Albelda, S.M., Buck, C.A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4, 2868-2880.

Alon, R. and Etzioni, A. (2003). LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol.* 24, 561-566.

Altmann, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Anderson, D.C., Kishimoto, T.K., Smith, C.W. (1997). Leukocyte adhesion deficiency and other disorders of leukocyte adherence and motility. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, A.L., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. III. McGraw-Hill, Inc, New York, pp.3955-3994.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* 50, 197-263.

Ardouin, L., Bracke, M., Mathiot, A., Pagakis, S.N., Norton, T., Hogg, N., Tybulewicz, V.L. (2003). Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur. J. Immunol.* 33, 790-797.

Arnaout, A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75, 1037-1050.

Arnaout, A., Spits, H., Terhorst, C., Pitt, J., Todd, R.F. (1984). Deficiency of a leukocyte surface glykoprotein (LFA-1) in two patients with Mo1 deficiency. Effects of cell activation on Mo1/LFA-1 surface expression in normal and deficient lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 74, 1291-1300.

Aurrand-Lions, M.A., Duncan, L., Du Pasquier, L., Imhof, B.A. (2000). Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecule family? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251, 91-98.

Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W., Ohashi, P.S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7, 549-557.

Baker, B.M.B., Altman, N., Podack, E., Levey, R.B. (1996). The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J. Exp. Med.* 183, 2645-2656.

- Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J.-P., Gahmberg, C.G. (1995). The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.* 25, 3316-3320.
- Baldwin, T.J., Fazeli, M.S., Doherty, P., Walsh, F.S. (1996). Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J. Cell. Biochem.* 61, 502-513.
- Bauer, J.S., Varner, J., Schreiner, C., Kornberg, L., Nicholas, R., Juliano, R.L. (1993). Functional role of the cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 5$ Subunit. *J. Cell Biol.* 122, 209-221.
- Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (5), 525-530.
- Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M.J., Hamann, A., Hogg, N. (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 – deficient mice. *J. Exp. Med.* 189, 1467-1478.
- Brakebusch, C., Bouvard, D., Stanchi, F., Sakai, T., Fässler, R. (2002). Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.* 109, 999-1006.
- Brakebusch, C., Fässler, R. (2003). The integrin-actin connection, an internal love affair. *EMBO* 22, 2324-2333.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, A.W., Warren, R., Palmiter, R.D. (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase gene in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27, 223-231.
- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 375-396.
- Buck, C.A., Horwitz, A.F. (1987). Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 179-205.
- Busch, D.H., Pamer, E.G. (1999). T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J. Exp. Med.* 189, 701-709.
- Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition – Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J., Cybulsky, M.I. (2000). $\alpha 4\beta 1$ Integrin/VCAM-1 interaction activates $\alpha L\beta 2$ integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J. Immunol.* 164, 746-753.
- Chen, H., Mocsai, A., Zhang, H., Ding, R.-X., Morisaki, J.H., White, M., Rothfork, J.M., Heiser, P., Colucci-Guyon, E., Lowell, C.A., Gresham, H.D., Allen, P.M., Brown, E.J. (2003). Role for plastin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading. *Immunity* 19, 95-104.

- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18, 5294-5299.
- Chung, C.T., Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Methods In Enzymology* 218, 621-627.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561.
- Cline, M.J. (1975). *The White Cell*. Cambridge: Harvard Univ. Press.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential arrest under flow. *Immunity* 13, 759-769.
- Coppolino M.G., Woodside M.J., Demaurex N., Grinstein S., St-Arnaud R., Dedhar S. (1997). Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion.
- Corradin, G., Etlinger, H.M., Chiller, J.M. (1977). Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of antigen-induced in vitro T cell-dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. *J. Immunol.* 119, 1048-1053.
- Crawford, A.W., Beckerle, M.C. (1991). Purification and characterization of zyxin an 82,000 dalton component of adherens junctions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43, 186-198.
- Crowe, D.T., Chiu, H., Fong, S., Weissman, I.L. (1994). Regulation of the avidity of $\alpha 4\beta 7$ by the $\beta 7$ cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 269, 14411-14418.
- Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., Aruffo, A. (1992). Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3 and VCAM-1 on resting and antigen primed CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* 148, 1985-1992.
- Davignon, D.E., Martz, E., Reynolds, T., Kurzinger, K., Springer, T.A. (1981). Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 4535-4539.
- Dedhar, S., Hannigan, G.E. (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 657-669.
- de Fougères, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R., Springer, T.A. (1991). Characterization of the function of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174, 253-267.
- de Fougères, A.R., Qin, X., Springer, T.A. (1994). Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune response. *J. Exp. Med.* 179, 619-629.

Delon, J., Germain, R.N. (2000). Information transfer at the immunological synapse. *Curr. Biol.* 10, R923-933.

Diamond, M.S., Springer, T.A. (1994). The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.* 4, 506-517.

Dickeson, S.K., Santoro, S.A. (1998). Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *CMLS* 54, 556-566.

Doussis-Anagnostopoulou, I., Kaklamanis, L., Cordell, J.L., Jones, M., Turley, H., Pulford, K., Simmons, D., Mason, D., Gatter, K. (1993). ICAM-3 expression on endothelium in lymphoid malignancy. *Am. J. Pathol.* 143, 1040-1043.

Dubey, C., Croft, M., Swain, S.L. (1995). Costimulatory requirements of naïve CD4⁺ T cells: ICAM-1 or B7-1 can costimulate naïve CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J. Immunol.* 155, 45-57.

Etzioni, A., Doerschuk, C.M., Harlan, J.M. (1999). Of Man and Mouse: Leucocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 94, 3281-3288.

Ferrara, J. L. M., Deeg, H.J.(1996). Graft-*versus*-host disease. *N. Eng. J. Med.* 324, 667-674.

Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J., Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* 9, 2203-2213.

Fine, J.S., Kruisbeek, A.M. (1991). The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J. Immunol.* 147, 2852-2859.

Fischer, H., Gyorloff, A., Hedlund, G., Hedman, H., Lundgren, K., Kalland, T., Sjorgen, H.O., Dohlsten, M. (1992). Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen: naive CD4⁺ 45RA⁺ T cells require a costimulatory signal mediated through the LFA-1/ICAM-1 pathway. *J. Immunol.* 148, 1993-1998.

Fraser, J.D. (1989). High-affinity binding of staphylococcus enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature* 339, 221-223.

Friedl, P., Bröcker, E.B. (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen presenting cells. *Immunol. Reviews* 186, 83-89.

Gahmberg, C.G. (1997). Leucocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 643-650.

Gahmberg, C.G., Tolvanen, M., Kotovuori, P. (1997). Leucocyte adhesion: Structure and function of human leucocyte β 2-integrins and their cellular ligands. *J. Biochem.* 245, 215-232.

- Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., Noon, M.C. (1986). Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 5, 271-279.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 9065-9069.
- Gottlieb, A., Krueger, J.G., Bright, R., Ling, M., Lebwohl, M., Kang, S., Feldman, S., Spellman, M., Wittkowski, K., Ochs, H.D., Jardieu, P., White, M., Dedrick, R., Garovoy, M. (2000). Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 428-435.
- Graham, I.L., Lefkowitz, J.B., Anderson, D.C., Brown, E.J. (1993). Immune complex-stimulated neutrophil LTB₄ production is dependent on beta2 integrins. *J. Cell Biol.* 120, 1509-1517.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Greenwood, J.A., Theibert, A.B., Prestwich, G.D., Murphy-Ulrich, J.E. (2000). Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase. Regulation by PtdIns (3,4,5)-p(3) binding to α -actinin. *J. Cell Biol.* 150, 627-642.
- Greenwood, J., Wang, Y., Calder, V.L. (1995). Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *Immunology* 86, 408-415.
- Gregory, S.H., Barczynski, L.K., Wing, E.J. (1992). Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the reduction of systemic bacterial infections. *J. Leukocyte Biol.* 51, 421-424.
- Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Kong, Y.Y., Raab, M., Hyduk, S.J., Bouchard, D., Chan, V.S., Koziaradzki, I., Oliveira-dos-Santos, A.J., Wakeham, A., Ohashi, P.S., Cybulsky, M.I., Rudd, C.E., Penninger, J.M. (2001). Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293, 2260-2263.
- Grose, R., Hutter, C., Bloch, W., Thorey, I., Watt, F.M., Fässler, R., Brakebusch, C., Werner, S. (2002). A crucial role of β 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development* 129, 2303-2315.
- Gu, H., Zou, Y.R., Rajewsky, K. (1993). Independent control of immuno-globulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-1164.
- Hamann, A., Jablonski-Westrich, D., Thiele, H.G. (1986). Contact interaction between lymphocytes is a general event following activation and is mediated by LFA-1. *Eur. J. Immunol.* 16, 847-850.

Hamann, A., Jablonski-Westrich, D., Duijvestijn, A., Butcher, E.C., Baisch, H., Harder, R., Thiele, H.G. (1988). Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing. *J. Immunol.* 140, 693-699.

Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Broek, D. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-96.

Harty, J.T., Bevan, M.J. (1996). CD8 T-cell recognition of macrophages and hepatocytes results in immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Imm.* 64, 3632-3640.

Hato, T., Pampori, N., Shattil, S.J. (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin $\alpha IIb \beta 3$. *J. Cell Biol.* 141, 1685-1695.

Henderson, R.B., Lim, L.H., Tessier, P.A., Gavins, F.N., Mathies, M., Peretti, M., Hogg, N. (2001). The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and $\alpha 4$ integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J. Exp. Med.* 194, 219-226.

Henderson, R.B., Hobbs, J.A.R., Mathies, M., Hogg, N. (2003). Rapid recruitment of inflammatory monocytes is dependent of neutrophil migration. *Blood* 102, 328-335.

Hibbs, M.L., Xu, H., Stacker, S.A., Springer, T.A. (1991). Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of the LFA-1 integrin β subunit. *Science* 251, 1611-1613.

Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hogg, N., Bates, P.A. (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol.* 29, 211-222.

Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., Beard, J.W. (1979). Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J. Virol.* 29, 517-522.

Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 220-231.

Huber, O., Bierkamp, C., Kemler, R. (1996). Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 685-691.

Hughes, P., Pfaff, M. (1998). Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* 8, 359-364.

Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (1996). Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J. Biol. Chem.* 271, 6571-6574.

- Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H. (1997). Suppression of integrin activation: A novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 88, 521-530.
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., Jones, S.A. (2001). IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14, 705-714.
- Hutloff, A., Dittsch, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Krozek, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versality, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Hynes, R.O., Wagner, D.D. (1996). Genetic manipulation of vascular adhesion molecules in mice. *J. Clin. Invest.* 98, 2193-2195.
- Hynes, R.O. und Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* 150, F89-96.
- Imhof, B.A., Weerasinghe, D., Brown, E.J., Lindberg, F.P., Hammel, P., Piali, L., Dessing, M., Gisler, R. (1997). Cross talk between $\alpha(v)\beta3$ and $\alpha4\beta1$ integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule. *Eur. J. Immunol.* 27, 3242-3252.
- Issekutz, A.C., Movat, H.Z. (1980). The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. *Lab Invest.* 42, 310-317.
- Issekutz, T.B. (1995). In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. *J. Immunol.* 154, 6533-6540.
- Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., Ihara, A. (1992). Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255 (5048), 1125-1127.
- Jackson, D.Y. (2002). Alpha 4 integrin antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 8, 1229-1253.
- Janeway, C.A., Travers, P. (1997). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, Stuttgart. 2. Auflage.
- Johnson-Leger, C.A., Aurrand-Lions, M., Beltraminelli, N., Fasel, N., Imhof, B.A. (2002). Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* 100 (7), 2479-2486.

Jaenisch, R. (1976). Germline integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1260-1264.

Ju, S.T., Pamka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z., Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373, 444-448.

Juliano, R.L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 283-323.

Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y., Marrack, P. (1989). V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244, 811-813.

Kassner, P.D., Hemler, M.E. (1993). Interchangeable alpha chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a $\beta 1$ integrin. *J. Exp. Med.* 178, 649-660.

Kassner, P.D., Kawaguchi, S., Hemler, M.E. (1994). Minimum alpha chain cytoplasmic tail sequence needed to support integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 269, 19859-19867.

Kaufmann, S.H.E. (1999). Immunity to *Listeria monocytogenes*. In *Fundamental Immunology*, 4th Ed. W.E. Paul, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 1335.

Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Iie, S., Takatsu, K., Kinashi, T. (2000). Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol. Cell Biol.* 20, 1956-1969.

Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Kinashi, T. (2002). Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol. Cell Biol.* 22, 1001-1015.

Kawaguchi, S., Hemler, M.E. (1993). Role of the α subunit cytoplasmic domain in regulation of adhesive activity mediated by the integrin VLA-2. *J. Biol. Chem.* 268, 16279-16285.

Kieffer N, Fitzgerald LA, Wolf D, Cheresch DA, Phillips DR (1991). Adhesive properties of the beta 3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 451-461.

Kim, M., Carmen, C., Springer, T.A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301, 1720-1725.

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

Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C. (1989). Neutrophil and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245, 1238-1241.

- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., Seed, B. (1996). α L β 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.
- Kolanus, W., Zeitlmann, L. (1998). Regulation of integrin function by inside-out signaling mechanisms. *Curr. Opin. Microbiol. Immunol.* 231, 33-49.
- Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Drifmier, K.M., Blodgett, K.P., Gerard, G.F. (1985). Cloning and overexpression of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35, 249-258.
- Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F., Penninger, J.M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16, 331-343.
- Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M., Brown, E.J. (1996). Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 97, 2139-2144.
- Kuhlman, P., Moy, V.T., Lollo, B.A., Brian, A.A. (1991). The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation: contributions of adhesion and co-activation. *J. Immunol.* 146, 1773- 1782.
- Kuhn, K., Eble, J. (1994). The structural bases of integrin ligand interactions. *Trends Cell Biol.* 4, 256-260.
- Larson R.S., Springer T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol.* 114, 181-217.
- Lasky, L.A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 113-139.
- Laudanna, C., Campbell, J.J., Butcher, E.C. (1996). Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271, 981-983.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., Shaw, A.S. (2001). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Leinweber, B.D., Leavis, P.C., Grabarek, Z., Wang, C.L., Morgan, K.G. (1999). Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem. J.* 344, 117-123.
- Leitinger, B., Hogg, N. (1999). Integrin I domains and their function. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 826-832.
- Leitinger, B., Hogg, N. (2000). Effects of I domain deletion on the function of the β 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol. Biol. Cell* 11, 677-690.

Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J.W., Lear, J.D., De Grado, W., Bennett, J.S. (2003). Activation of integrin α IIb β 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* 300, 795-798.

Liddington, R.C. and Ginsberg, M.H. (2002). Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* 158, 833-839.

Liesveld, J.L., Winslow, J.M., Frediani, K.E., Ryan, D.H., Abboud, C.N. (1993). Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood* 81, 112-121.

Lobb, R.R. und Hemler, M.E. (1994). The pathophysiological role of α 4 integrins in vivo. *J. Clin. Invest.* 94, 1722-1728.

Loftus J.C., Liddington R.C. (1997). New insights into integrin-ligand interaction. *J. Clin. Invest.* 100, 77-81.

Lowell, C.A., Fumagalli, L., Berton, G. (1996). Deficiency of Src family kinase p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* 133, 859-910.

Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C., Rollins, B.J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187, 601-608.

Lu, C.-F., Springer, T.A. (1997). The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.* 159, 268-278.

Lub, M., van Kooyk, Y., Figdor, C.G. (1995). Ins and outs of LFA-1. *Immunol. Today* 16, 479-483.

Luksch, C.R., Winqvist, O., Ozaki, M.E., Karlsson, L., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Webb, S.R. (1999). Intercellular adhesion molecule-1 inhibits interleukin 4 production by naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3023-3028.

Luscinskas, F.W., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C.A., Shaw, S.K. (2002). The role of endothelial cell lateral junctions during leukocyte trafficking. *Immunol Rev* 186, 57-67.

Mackay, C.R. (1991). T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol. Today*, 12, 189-192.

Majno, G., Joris, I. (1996). Introduction to inflammation. In: Majno, G., Joris, I., eds. *Cells, Tissues, and Disease: Principles of general pathology*. Cambridge: Blackwell Science, 291-317.

Malm, H., Corbascio, M., Österholm, C., Cowan, S., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Ekberg, H. (2002). CTLA4Ig induces long-term graft survival of allogeneic skin grafts and totally inhibits T-cell proliferation in LFA-1 deficient mice. *Transplantation* 73, 293-318.

- Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. (1988). Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336, 348-352.
- Marin, V., Montero-Julian, F.A., Gres, S., Boulay, V., Bongrand, P., Farnarier, C., Kaplanski, G. (2001). The IL-6 soluble IL-6Ra autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J. Immunol.* 167, 3435-3442.
- Marlin, S.D., Springer, T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte-function-associated molecule-1 (LFA-1). *Cell* 51, 813-819.
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T.P., Kyriakis, J.M., Avruch, J. (1997). Actin-binding protein protein-280 binds the stress-activated protein-kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor- α activation in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2620-2628.
- Martin-Bermudo, M.D., Dunin-Borkowski, O.M., Brown, N.H. (1998). Modulation of integrin activity is vital for morphogenesis. *J. Cell Biol.* 141, 1073-1081.
- McDowall, A., Leitinger, B., Stanley, P., Bates, P.A., Randi, A.M., Hogg, N. (1998). The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J. Biol. Chem.* 273, 27396-27403.
- Meerschaert, J. and M.B. Furie (1995). The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J. Immunol.* 154, 4099-5112.
- Miller, J.M., Schwarting, R., Springer, T.A. (1986). Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *J. Immunol* 137, 2891-2900.
- Mittrucker, Kohler, A., Kaufmann, S.H. (2000). Substantial *in vivo* proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Eur. J. Immunol.* 30, 1053-1059.
- Miyamoto, M., Emoto, M., Emoto, Y., Brinlmann, V., Yoshizawa, I., Seiler, P., Aichele, P., Kita, E., Kaufmann, S.H.E (2003). Neutrophilia in LFA-1-deficient mice confers resistance to Listeriosis: Possible Contributing of granulocyte-colony-stimulating factor and IL-17. *J. Immunol.* 170, 5228-5234.
- Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V.L., Lowell, C.A. (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16, 547-558.
- Mosman, T.R. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

- Mowat, A.M., Felstein, M.V. (1990). Experimental studies of immunologically mediated enteropathy. V. Destructive enteropathy during an acute graft-versus-host reaction in adult BDF I mice. *Clin. Exp. Immunol.* 79, 279-284.
- Mulligan, M.S., Till, G.O., Smith, C.W., Anderson, D.C., Miyasaka, M., Tamatani, T., Todd, R.F.R., Issekutz, T.B., Ward, P.A. (1994). Role of leukocyte adhesion molecules in lung and dermal vascular injury after thermal trauma of skin. *Am. J. Pathol.* 44, 1008-1015.
- Murai, M., Yoneyama, H., Ezaki, T., Suematsu, M., Terashima, Y., Harada, A., Hamada, H., Asakura, H., Ishikawa, H., Matsushima, K. (2003). Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nature Immunol.* 4 (2), 154-160.
- Nagy, A., Moens, C.B., Ivanyi, E., Pawling, J., Gertsenstein, M., Hadjantonakis, A.-K., Pirity, M., Rossant, J. (1998). Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr. Biol.* 8, 661-664.
- Nakamura, S., Sung, S.S., Bjorndahl, J.M., Fu, S.M. (1989). Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA-1. *J. Exp. Med.* 169, 677-689.
- Ni, H.T., Deeths, M.J., Li, W., Mueller, D.L., Mescher, M.F. (1999). Signaling pathways activated by leukocyte function-associated Ag-1-dependent costimulation. *J. Immunol.* 162, 5183-5189.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H., Stossel, T.P. (1999). The small GTPase Ra1A targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2122-2128.
- Ostermann, G., Weber, K.S.C., Zerneck, A., Schröder, A., Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the $\beta 2$ integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immunol.* 3, 151-158
- O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (1994). Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.* 124, 1047-1059.
- O'Toole, T.E., Mandelmann, D., Forsyth, J., Shattil, S.J., Plow, E.F., Ginsberg, M.H. (1991). Modulation of the affinity of integrin α IIb β 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of α IIb. *Science* 254, 845-847.
- O'Toole, T.E., Ylanne, J., Culley, B.M. (1995). Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the β subunit cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270, 8553-8558.
- Otey, C.A., Vasquez, G.B., Burrige, K., Erickson, B.W. (1993). Mapping of the α -actinin binding-site within the β -1 integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 268, 1193-21197.

- Patey, N., Vazeux, R., Canioni, D., Potter, T., Gallatin, W.M., Brousse, N. (1996). Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 148, 465-472.
- Peterson, E.J., Woods, M.L., Dmowski, S.A., Derimanov, G., Jordan, M.S., Wu, J.N., Myung, P.S., Liu, Q.H., Priblia, J.T., Freedman, B.D., Shimizu, Y., Koretzky, G.A. (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263-2265.
- Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E.A., Wolthuis, R.M., Zwartkruis, F.J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C.D., Bos, J.L. (2000). The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J. Cell Biol.* 148, 1151-1158.
- Reiss, Y., Hoch, G., Deutsch, U., Engelhardt, B. (1998). T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 3086-3099.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rojiani, M.V., Finlay, B.B., Gray, V., Dedhar, S. (1991). In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (Calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin α subunit. *Biochemistry* 30, 9859-9866.
- Rosales, C., Juliano, R.L. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leucocytes. *J. Leukoc. Biol.* 57, 189-198.
- Rossant, J., McMahon, A. (1999). „Cre“-ating mouse mutants – a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev.* 13, 142-145.
- Roth, S.J., Carr, M.W., Rose, S.S., Springer, T.A. (1995). Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 100, 97-116.
- Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* 87, 1-5.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salomon, B., Bluestone, J.A. (1998). Cutting edge: LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J. Immunol.* 161, 5138-5142.
- Schmits, R., Kündig, T.M., Baker, D.M., Shumaker, G., Simard, J.J.L., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M.F., Ohasi, P.S., Mak, T.W. (1996). LFA-1 – deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 183, 1415-1426.
- Sharma, C.P., Ezzell, R.M., Arnaout, M.A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP-280) with the β 2-integrin subunit CD18. *J. Immunol* 154, 3461-3470.

- Shaw, L.M., Mercurio, A.M. (1993). Regulation of $\alpha 6\beta 1$ integrin laminin receptor function by the cytoplasmic domain of the $\alpha 6$ subunit. *J. Cell Biol.* 123, 1017-1025.
- Shier, P., Otulakowski, G., Ngo, K., Panakos, J., Chourmouzis, E., Christjansen, L., Lau, C.Y., Fung-Leung, W.-P. (1996). Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the $\beta 2$ integrin leucocyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.* 157, 5375-6386.
- Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N., Cantrell, D.A. (2002). Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat. Immunol.* 3, 251-258.
- Shimaoka, M., Takagi, J., Springer, T.A. (2002). Conformational regulation of integrins structure and function. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 485-516.
- Shimizu, Y., Hunt, S.W. (1996). Regulated integrin-mediated adhesion: one more function for PI3-kinase? *Immunol. Today* 17, 565-573.
- Shimizu, Y., Mobeley, J.L., Finkelstein, L.D., Chan, A.S. (1995). A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of $\beta 1$ integrin activity by CD2 antigen. *J. Cell Biol.* 131, 1867-1880.
- Shimizu, Y., Rose, D.M., Ginsberg, M.H. (1998). Integrins in the immune system. *Adv. Immunol.* 72, 325-379.
- Sims, T.N., Dustin, M.L. (2002). The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol. Rev.* 186, 100-117.
- Sligh, J., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., Beudet, A.L. (1993). Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8529-8533.
- Slomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomick, M. J., Emerson, S. G. (1999). Prevention of graft-versus-host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285 (5426), 412-415.
- Smits, H.H., de Jong, E.C., Schuitemaker, J.H.N., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M.L. Wierenga, E.A. (2002). Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J. Immunol.* 168, 1710-1716.
- Sonnenberg, A. (1993). Integrins and their ligands. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 184, 7-35.
- Soriano, P., Jaenisch, R. (1986). Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46, 19-29.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Springer, T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration. *Ann. Rev. Physiol.* 57, 827-872.
- Springer, T.A., Davignon, D., Ho, M.K., Kuerzinger, K., Martz, E., Sanchez Madrid, F. (1982). LFA-1 and Lym-2,3, molecules associated with T lymphocyte-mediated killing; and Mac-1, an LFA-1 homologue associated with complement receptor function. *Immunol. Rev.* 68, 171-195.
- Stewart, M., Hogg, N. (1996). Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. Avidity. *J. Cell. Biochem.* 61, 554-561.
- Stewart, M., McDowall, A., Hogg, N. (1998). LFA-1 – mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by Ca^{2+} -dependent Protease, Calpain. *J. Cell Biol.* 140, 699-707.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., Springer, T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-611.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 619-627.
- Tapon N., Hall A. (1997). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 86-92.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is investigated by Jab1. *Nature* 398, 160-165.
- van der Flier und Sonnenberg (2001). Functions and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305 (3), 285-298.
- van Kooyk, Y., van Vliet, S.J., Figdor, C.G. (1999). The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J. Cell Biol.* 274, 26869-26877.
- van Saventer, G.A., Newman, W., Shimizu, Y., Nutman, T.B., Tanaka, Y, Horgan, K.J., Gopal, T.V., Ennis, E., O'Sullivan, D., Grey, H. (1991). Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J. Exp. Med.* 174, 901-913.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T.A., Plow, E.F., Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin α IIb β 3 „inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587-597.
- Viola, A., Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104-106.

Vuori, K. (1998). Integrin signaling: Tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J. Membrane Biol.* 165, 1991-199.

Wachsstock, D.H., Wilkins, J.A., Lin, S. (1987). Specific interaction of vinculin with α -actinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 554-556.

Wang, J. and Leonardo, M.J. (1997). Essential lymphocyte function associated 1(LFA-1): intercellular adhesion molecule interactions for T cell mediated B cell apoptosis by Fas/APO-1/CD95. *J. Exp. Med.* 186, 1171-1176.

Wawryk, S.O., Novotny, J.R., Wicks, I.P., Wilkinson, D., Maher, D., Salvaris, E., Welch, K., Fecondo, J., Boyd, A.W. (1989). The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion. *Immunol. Rev.* 108, 135-161.

Weber, C., Lu, C.-F., Casasnovas, J. M., Springer, T.A. (1997). Role of α L β 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J. Immunol.* 159, 3968-3975.

Weisel, J.W., Nagaswami, C., Vilaire, G., Bennett, J.S. (1992). Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with the fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 267, 16637-16643.

Weiss, A., Littmann, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.

Wells, A.D., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A. (1997). Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. *J. Clin. Invest.* 100, 3173-3183.

Wetzel, S.A., McKeithen, T.W., Parker, D.C. (2002). Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J. Immunol* 169, 6092-6101.

White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W., Marrack, P. (1989). The $v\beta$ specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56, 27-35.

Williams, M.J., Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H. (1994). The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* 4, 109-112.

Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnout, M.A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of the integrin α V β 3. *Science* 296, 151-155.

Xu, H., Gonzalo, J.A., St. Pierre, Y., Williams, I.R., Kupper, T.S., Cotran, R.S., Springer, T.A., Gutierrez-Ramos, J.C. (1994). Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180, 95-109.

Zell T., Hunt, S.R., Mobley, J.L., Finkelstein, L.D., Shimizu, Y. (1996). CD28-mediated up-regulation of β 1-integrin adhesion involves phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 156, 883-886.

Zervas, C.G., Gregory, S.L., Brown, N.H. (2001). *Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 152, 1007-1018.

Zhang, J., Zhang, J., Shattil, S.J., Cunningham, M.C., Rittenhouse, S.E. (1996). Phosphoinositide 3-kinase gamma and p85/phosphoinositide 3-kinase in platelets. Relative activation by thrombin receptor or b-phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of α IIb β 3 integrin. *J. Biol. Chem.* 271, 6265-6272.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann für die Bereitstellung des Themas, die vielen Anregungen und die engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. S. Scherer danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Fakultät zu betreuen.

Frau Prof. Dr. B. Engelhardt danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor an der Universität Münster zur Durchführung der Experimente mit Endothelzellen.

Heike und Sandra möchte ich danken für ihre Tipps, die ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Caro stand mir jederzeit hilfsbereit und geduldig mit Rat und Tat zur Seite.

Mit Tanja machten die Stunden im Tierstall mehr Spaß und zu zweit war auch so manch misslungener CTL-Assay erträglicher.

Das regelmäßige Mittagessen mit Anja, Bernadett, Marit und Sandra sorgte immer für die nötige Abwechslung.

Allen meinen Kollegen danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfe und Unterstützung im Laboralltag.

Schließlich habe ich mich über alle gefreut, die durch ihr Interesse an meinen Mäusen Anteil am Fortgang dieser Arbeit genommen haben.